

Prediction of HBsAg Conformational Changes in Iranian Patients with Occult Hepatitis B Infection with Bioinformatics Tools

S. Sofian

Assistant Professor, Payame Noor University
(Received: May 25, 2012; Accepted: Dec. 1, 2013)

پیشگویی تغییرات کنفورماسیونی پروتئین HBsAg در بیماران ایرانی مبتلا به عفونت نهفته هپاتیت B به کمک ابزارهای بیوانفورماتیکی

صفیه صوفیان

عضو هیئت علمی گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام‌نور
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۳/۵، تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۹/۱۰)

Abstract

Occult hepatitis B infection (OHB) is defined as infection with detectable HBV DNA and undetectable surface antigen (HBsAg) in patients' blood. It is believed that detection of hepatitis B virus by host in "a" region of surface antigen (HBsAg) is performed. However, there have never been successful attempts to provide evidence for this hypothesis, partly because the 3D structure of HBsAg molecule has not been determined. Tertiary structure prediction of HBsAg solely from its primary amino acid sequence may reveal the structural changes of the mutant proteins. We carried out this study to analyze the predicted HBsAg conformation changes of OBH variant and wild isolated from Iranian patient blood. We extracted HBsAg sequences (OBH and wild) of Iranian from Gen Bank. Tertiary structures of the wild & occult HBsAg were predicted using "ab initio" modeling and I-TASSER method. Then visualized using deep View/Siwws-pdb Viewer. Dipole moments of 3D structures were determined by chimera software. Wild & occult HBsAg sequences were analyzed in CLC Main *Workbench to prediction antigenic index of each sequence*. Our results showed the single amino acid substitutions in OBH, may alter structural properties of variant HBsAg, which can be shown by both its antigenic index and dipole moment of predicted 3D conformation. This survey suggested that the moreover "a" region mutations, other mutations can be change structure of HBsAg. It suggested to detection and vaccine design should be pay attention to three-dimensional structure of HbsAg.

Keywords: Tertiary structure, Prediction, Surface antigen, Latent infection, Hepatitis.

چکیده

عفونت نهفته بیماری هپاتیت B به عنوان عفونت با DNA HBV قابل شناسایی و آنتی‌ژن سطحی HbsAg غیرقابل شناسایی در خون بیماران است. عقیده بر این است که شناسایی ویروس هپاتیت B به وسیله میزبان در منطقه a از آنتی‌ژن سطحی (HBSAg) انجام می‌شود. اما به دلیل فقدان ساختار سه بعدی HBsAg، مدرکی برای این فرضیه وجود ندارد. پیشگویی ساختار سه بعدی توالی موتان یافته و وحشی از توالی اولیه، تغییرات ساختاری را آشکار می‌کند. این مطالعه به منظور بررسی تغییرات ساختاری HBsAg در حالت نهفته و وحشی در نمونه‌های ایرانی است. توالی HBsAg در بیماران ایرانی مبتلا به عفونت نهفته و بارز از بانک ژن استخراج شد. پیشگویی ساختار ۳ بعدی با استفاده از مدل‌سازی از نو و متد L-TASSER انجام شد. سپس با استفاده از SPDBV مشاهده شد. ممان دوقطبی توسط نرم افزار CHIMERA انجام شد. هر دو توالی وحشی و موتان برای پیشگویی مناطق آنتی‌ژنیک در نرم‌افزار CLC Main *Workbench* بررسی شد. نتایج نشان داد که موتان در حالت نهفته باعث تغییر درخواص ساختاری آن می‌شود. این تغییر در شاخص آنتی‌ژنیک و ممان دوقطبی ساختار سه بعدی پیشگویی شده نشان داده شده است. یافته‌های این مطالعه تأکید می‌کند که علاوه بر موتاسیون در منطقه a، موتاسیون‌های دیگری هم می‌توانند باعث تغییر ساختاری HBsAg شوند. پس در شناسایی و طراحی واکسن باید به ساختار سه بعدی HBsAg توجه کرد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌ژن سطحی، پیشگویی ساختار سه بعدی، عفونت نهفته، هپاتیت B.

مقدمه

ویروس هپاتیت B از سال ۱۹۶۰ مطالعه شده است و هنوز هم خطر مهمی برای سلامت جامعه محسوب می‌شود. تخمین زده می‌شود که حدود دو میلیارد نفر شواهد سرولوژیک آلودگی قدیمی یا فعلی با HBV را داشته باشند. بیش از ۳۵۰ میلیون نفر حامل مزمن HBV می‌باشند و ۷۵٪ این حاملین مزمن در آسیا و غرب اقیانوس آرام زندگی می‌کنند. شیوع HBV در ایران بین ۱۷٪ تا بیش از ۵٪ در بین استان‌های مختلف متغیر می‌باشد (Gust, 1996). این عفونت منتهی به کارسینوم کبدی می‌شود (Alter, 2003).

HBV یک ویروس دارای DNA دو رشته‌ای با ژنومی در حدود ۳۲۰۰ جفت باز است که چهار پروتئین S، P، C و X را کد می‌کند (Alert, 2003). مناطقی از ژنوم با استفاده از قالب‌های متفاوت خواندن، پروتئین‌های متفاوتی را کد می‌کند (Sleisenger and Fortrans, 2006).

HBV ۸ ژنوتیپ A, B, C, C, E, F, G دارد. این تنوع ژنوتیپ بر اساس ۸٪ تغییر یا بیشتر در توالی نوکلئوتیدی است (Yuh et al., 1992). مطالعات اخیر تفاوت‌های مهمی را در تظاهرات کلینیکی و ژنوتیپ نشان داده شده است (Miyakawa and Mizokami, 2003). مثلاً ژنوتیپ C تظاهرات بالینی کمتری را نسبت به ژنوتیپ B نشان می‌دهد (Norder et al., 2003).

به حضور Anti-HBc بدون وجود HBsAg و Anti HBs در سرم، ایزوله اطلاق می‌شود که می‌تواند به عنوان مارکر عفونت مزمن HBV مطرح باشد. موتاسیون‌های این ناحیه در سراسر جهان مشاهده می‌گردند ولی به طور عمده در آسیا مشاهده می‌شوند. از نظر بالینی موتانت‌های ناحیه S حائز اهمیت بسیار هستند. به طور طبیعی در عفونت HBV، سیستم ایمنی سلولی و هومورال علیه پروتئین‌های اختصاصی ویروس وارد عمل شده و موجب پاک‌سازی ویروس می‌گردند. در حالی که موتانت‌های S ویروس HBV از شناسایی توسط سیستم ایمنی فرار کرده و سبب بیماری مزمن کبدی می‌گردند که می‌تواند به سمت نارسایی کبدی و یا سرطان کبدی پیشرفت نماید. به علاوه این جهش یافته‌ها از طریق انتقال خون، همودالیز و پیوند اعضا می‌توانند به سایرین نیز منتقل شده و باعث گسترش عفونت HBV می‌شوند (Norder et al., 2004).

نظریه‌های متعددی در مورد مکانیسم‌های احتمالی عدم شناسایی HBsAg با وجود ویروس HBV در سرم است از جمله جهش‌های موجود در ناحیه S ژنوم ویروس، کاهش viral load و حساسیت ناکافی تست‌های موجود برای

شناسایی HBsAg (Grob et al., 2000).

بنابراین واریانت‌های HBV از نظر شناسایی توسط سیستم ایمنی میزبان، افزایش ویرولانسی و تکثیر ویروس، مقاومت به داروهای ضد ویروس و تسهیل اتصال و نفوذ به سلول‌های کبدی حائز اهمیت می‌باشند. بررسی جهش‌ها در ناحیه S دارای اهمیت بالینی در شناسایی سویه‌های منجر به عفونت نهفته HBV است (Kaviani et al., 2006).

HBsAg، مهم‌ترین بخش پوششی ویروس هپاتیت B است که ۲۲۶ آمینواسید دارد که توسط ژن P بیان می‌شود. یک منطقه مهم برای آنتی ژنیسیته HBV، منطقه a است که از اسید آمینه ۱۲۴ تا ۱۴۷ را شامل می‌شود. پیشگویی شده است که این منطقه یک ساختار دو لپه‌ای دارد که از سطح HBV بیرون زده است و گمان بر این است که تغییرات آمینو اسیدی در این منطقه می‌تواند پاسخ ایمنی را تغییر دهد (Gerlich, 2004).

شایع‌ترین جهش‌ها به صورت جایگزینی گلیسین به آرژنین در موقعیت ۱۴۵ (G145R) در منطقه a می‌باشد. تغییرات خارج این منطقه و وجود کدون‌های پایان نیز در بیماران دارای عفونت نهفته HBV گزارش شده‌اند و تغییرات در اسید آمینه‌های موقعیت‌های ۱۲۶، ۱۳۳، ۱۳۱، ۱۴۲، ۱۴۵، ۱۴۴ و ۱۴۶ در بیماران دارای عفونت نهفته HBV در سراسر جهان گزارش شده‌اند (Zu, 2000; Yamamoto et al., 1994; Araujo et al., 2008; Datta et al., 2007; Yang et al., 2003; Tang et al., 1998).

تا به حال برای نمونه‌های ایرانی دارای عفونت نهفته، تنها تغییرات خارج از منطقه a یا کدون‌های توقف گزارش شده است (Arababadi et al., 2011; Norouzi et al., 2010). هنوز واضح نیست که کدام تفاوت‌های ژنتیکی باعث تغییر در ژنوتیپ و در نتیجه نهفته بودن بیماری می‌شود. زیرا تا بحال دانشمندان به علت عدم موفقیت در تهیه بلور این پروتئین؛ قادر به تعیین ساختار سه بعدی آن نشده‌اند.

در این تحقیق ما از ابزارهای بیوانفورماتیکی برای پیشگویی ساختار سه بعدی نمونه وحشی و نمونه جهش یافته پروتئین استفاده کردیم و سپس با بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی هر دو نمونه، برای تفسیر جانشین‌سازی‌های آمینواسیدی که احتمالاً ساختار پروتئین S را در بیماران ایرانی مبتلا به عفونت نهفته تحت تأثیر قرار می‌دهد و باعث تغییر در عملکرد پروتئین S می‌شود، استفاده کردیم.

مواد و روش‌ها

با بررسی توالی پروتئینی HbsAg مربوط به بیماران ایرانی

به هیپاتیت B، ۱۰ کد مربوط به بیماران ایرانی مبتلا به عفونت نهفته است. که چهار تا از آنها کاملاً مشابهند (ACN29393, ACN29392, ACN29390, ACN29389)، و در آن سرین ۲۰۷ به آسپاراژین تبدیل شده است. و در ۵ مورد دیگر موتاسیون در نوکلئوتیدها منجر به کدون توقف در موقعیت Leu15 و Gly 10 شده است و تعداد اسید آمینه‌ها از ۱۹۵ تا ۲۱۱ اسید آمینه است. مورد آخر با کد پروتئینی ABY66902 دارای ۲۲۶ اسیدآمینه که اطلاعات مربوط به تعداد اسیدآمینه‌ها، نقطه ایزوالکتریک، حالیت، پایداری، وزن مولکولی در جدول ۱ برای مقایسه با سویه وحشی ارائه شده است. ردیف‌سازی دو توالی با CLUSTAL w (Hamkar et al., 2010) (شکل ۱) نشان داد که دو موتان مهم در موقعیت ۷ و ۱۸۵ وجود دارد و اسیدآمینه گلیسین به آرژنین تبدیل شده است. مقادیر آنتی‌ژنیسیته (شکل ۲) نشان می‌دهد که جانشین‌سازی آمینواسیدی با آرژنین در موقعیت ۱۸۵ و ۷ باعث تغییر آنتی‌ژنیسیته می‌شود.

پیشگویی آنتی‌ژنیسیته توالی سویه وحشی نشان داد که شدت تغییرات آنتی‌ژنیسیته در موقعیت ۷ بین ۰/۳۵ تا ۰/۷ است و در موقعیت ۱۸۵ بین ۰/۵ تا ۰/۷۵ است. در حالی که برای موتانت، اندیکس آنتی ژنتیک اسید آمینه در موقعیت (± 5) بین ۰/۰۵ تا ۰/۶۵ است. اندیکس آنتی ژنتیک اسید آمینه در موقعیت (± 5) ۱۸۵ در نوع موتانت بین ۰/۲۴ تا ۰/۴۶ است. این تغییرات آنتی ژنیک در دسته تغییرات منفی طبقه‌بندی می‌شود.

ترسیم ممان دو قطبی ساختار سه بعدی پیشگویی شده برای هر دو توالی در شکل ۳ نشانگر تفاوت جهت‌گیری ممان دوقطبی و میزان آن است.

مبتلا به هیپاتیت B ثبت شده در بانک ژن، دو توالی با کد پروتئینی ABY66902 (عفونت نهفته) و ADG63312 (سویه وحشی) از بانک ژن استخراج شد (Arababadi et al., 2010; Norouzi et al., 2011) با استفاده از Blast p (Weinberger et al., 2000) و جستجو در بانک اطلاعات ساختار سه بعدی پروتئین نشان داده شد که هیچ توالی مشابه وجود ندارد. بنابراین برای پیشگویی باید از روش abinitio یا de novo استفاده کرد (Zhang, 2008).

در این جا روش I_TASSER به کار گرفته شد که بر اساس الگوریتمی که از Threading، تجمع قطعات و تکرار برای به دست آوردن ساختار با حداقل انرژی استفاده می‌کند. پیشگویی همه ساختارهای موتانت‌ها و نوع وحشی به طور مجزا با I-TASSER انجام شد (Zhang, 2007; Zhang, 2008; Wu et al., 2007).

نمایش و آنالیز ساختارها با نرم‌افزار گرافیکی Deep View/Swiss-Pdb Viewer (Guex et al., 1997) و Bigger (Palma et al., 2000) انجام شد. مدل پیشگویی شده، مدل قابل قبولی است زیرا با بررسی مدل شبیه‌سازی شده در سرور What IF، ساختار اعتبارسنجی شد (Vriend, 1990). خواص آنتی ژنیک، مناطق حفظ شده و متغیر، نقطه ایزوالکتریک و خصوصیات فیزیکوشیمیایی توالی‌های پروتئین HbsAg بیماران ایرانی استخراج شده از بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار CLCmain workbench6 و سرور EXPASY انجام شد.

نتایج

از ۴۶۴ داده موجود در بانک ژن مربوط به بیماران ایرانی مبتلا

جدول ۱. خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین H BsAg موتان یافته و وحشی

کد ژنی	کد پروتئینی	نقطه ایزو الکتریک	اندیکس آلفاتیکی	اندیکس هیدروپاتیسیته	وزن مولکولی	تعداد اسیدآمینه‌ها
EU346890.1	ABY66902	8.56	98.76	0.586	25566.3	226
GU938362.1	ADG63312	8.21	99.60	0.649	25387.1	226

```

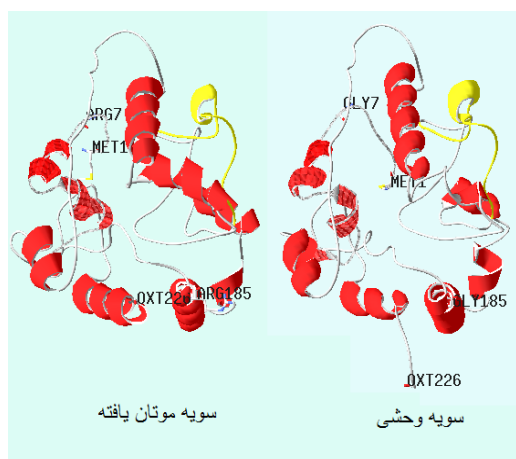
ABY66902. OBI MENITSRFLGFLLVLQAGFFLLTRILTIPOSLDSWWTSLNFLGGSPVCLG 50
ADG63312.1 MENITSGFLGFLLVLQAGFFLLTRILTIPOSLDSWWTSLNFLGGTTVCLG 50
*****

ABY66902. OBI QNSQSPTSNHSPSCPPTCPGYRWMCLRRFIIIFLFIILLCLIFLLVLLDY 100
ADG63312.1 QNSQSPTSNHSPSCPPTCPGYRWMCLRRFIIIFLFIILLCLIFLLVLLDY 100
*****

ABY66902. OBI QGMLFVVCPLIPGSSSTTSTGFCRITCTTPAQGTSMYFSCCCTKPSDGNCTCI 150
ADG63312.1 QGMLFVVCPLIPGSSSTTSTGFCRITCTTPAQGTSMYFSCCCTKPSDGNCTCI 150
*****

ABY66902. OBI PIPSSWAFGKFLWEWASARFWSLWLLVFFVQWVFLSPTVWLSAIVMMWY 200
ADG63312.1 PIPSSWAFGKFLWEWASARFWSLWLLVFFVQWVFLSPTVWLSVIVMMWY 200
*****

ABY66902. OBI WGPLYNIILSFFLLPIFFCLWVYI 226
ADG63312.1 WGPLSYILSFFLLPIFFCLWVYI 226
*****
    
```



شکل ۴. مقایسه ساختار پیشگویی شده سویه وحشی و سویه موتان یافته نشان می‌دهد که در سویه موتان یافته در موقعیت ۹۱ تا ۱۰۰ ساختار هلیکس تشکیل می‌شود که از نظر فضایی در ۱۰ آنگسترومی منطقه a قرار دارد. در ناحیه C ترمینال نیز ساختار هلیکس از لوسین ۲۱۵ تا تیروزین ۲۲۵ ادامه می‌یابد.

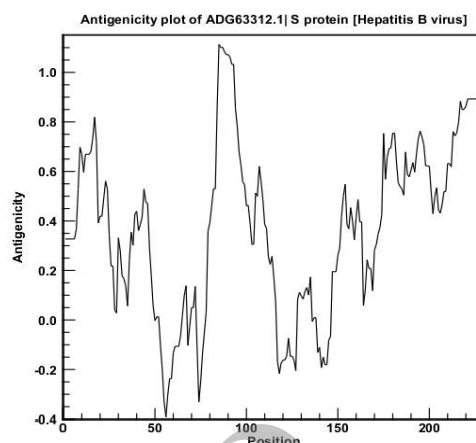
پیشگویی ساختار سوم توالی موتانت نشان داد که نوع وحشی از موتانت در منطقه لوپ یکسان است و ساختار اصلی که هلیکس است در توالی موتانت در منطقه C ترمینال و موقعیت ۹۱ تا ۱۰۰ شکل گرفته است.

بحث

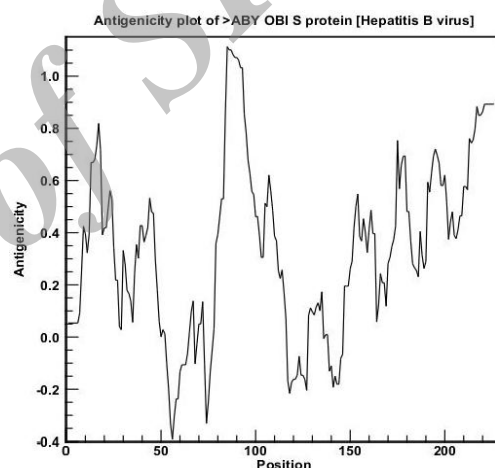
مکانیسم همانندسازی HBV شامل یک RNA واسطه است که به طور معکوس به وسیله RNA پلیمراز رونویسی می‌شود. وجود این مراحل احتمال موتان را افزایش می‌دهد به طوری احتمال موتان $10^{-5} \times 3/2 - 1/4$ در هر منطقه از ژن وجود دارد (Higgins *et al.*, 1996; Okamoto *et al.*, 1987). جانشین‌سازی آمینواسیدی ممکن است پایداری و ساختار پروتئین را تحت تأثیر قرار بدهد و باعث تغییر خواص آن و میانکنش آن با ذرات دیگر شود.

مطالعات بی‌شمار نشان داده است که ساختار سه بعدی پروتئین‌ها نمایانگر عملکردشان است و جانشین‌سازی آمینواسیدی روی پایداری و ساختار پروتئین با تغییر در خواص و میانکنش آن با دیگر ماکرومولکول‌ها تأثیر می‌گذارد (Zaaijer *et al.*, 2008). مدل‌سازی پروتئینی، اطلاعات مهمی در مورد اساس تغییر HBsAg در سطح مولکولی می‌رسد و این که چطور این موضوع تشخیص HBsAg را به وسیله آنتی‌بادی خاص تحت تأثیر قرار می‌دهد.

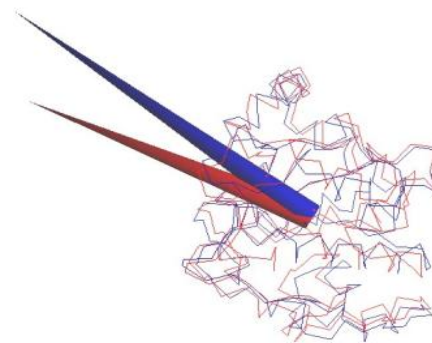
بعضی مطالعات می‌گویند که تغییر آمینو اسیدی منجر به تغییر آنتی‌ژنیسیته می‌شود و در نتیجه آنتی‌بادی‌ها نمی‌توانند



شکل ۱. ردیف‌سازی توالی پروتئین سطحی ژن S در (موتانت) عفونت نهفته (ABY66902) و سویه وحشی (ADG63312.1) با نرم‌افزار Clustalw



شکل ۲. پیشگویی آنتی‌ژنیسیته توالی سویه وحشی و موتانت با CLC main workbench6 نشان داد که شدت تغییرات آنتی‌ژنیسیته در موقعیت ۷ و ۱۸۵ باعث کاهش آنتی‌ژنیسیته در سویه موتان یافته می‌شود.



شکل ۳. ممان دوقطبی در ساختار سویه وحشی (آبی) و سویه موتانت (قرمز) ترسیم شده با نرم‌افزار Chimera

(Fasman, 1989). زنجیره کناری آرژنین به طور اتفاقی ممکن است که نامنظم باشد و بیشتر در داخل پروتئین قرار می‌گیرد. دارای بار مثبت است. انعطاف‌پذیر است و زنجیره کناری آن هیدروفوب است. اکثراً میانکنش‌های واندروالسی ایجاد می‌کند و می‌تواند سطح هیدروفوب خوبی را در حد اسید آمینه ایزولوسین ایجاد کند (Fasman, 1989). با توجه به ویژگی‌های آرژنین و نتایج این تحقیق به نظر می‌رسد علت عدم تشخیص آنتی‌ژن تنها موتاسیون در منطقه a پروتئین نیست، بلکه نوع موتاسیون مهم است. طبق نتایج مطالعه حاضر، در صورتی که موتاسیون به نوعی باشد که باعث تغییر سطوح الکتروستاتیکی شود، تغییر سطوح الکتروستاتیکی باعث تغییر در ممان دو قطبی و در نتیجه تغییر آنتی‌ژنیسیته می‌شود و باعث عدم شناسایی آن توسط آنتی‌بادی می‌گردد.

نتایج

نتایج مقایسه مدل‌سازی ساختاری توالی‌ها وحشی و نهفته نشان داد تغییر گلیسین به اسید آمینه آرژنین باعث تفاوت در ممان دوقطبی و خواص آنتی‌ژنیک می‌گردد. تغییر خواص ممان دوقطبی در اثر تغییر یک آمینو اسید باعث عدم شناخت آن در آزمایشگاه می‌شود. پس در شناسایی و طراحی واکسن باید به ساختار سه بعدی HBsAg و ممان دوقطبی آن توجه کرد. البته این فرضیات باید توسط تجربیات آزمایشگاهی تأیید شود.

سپاسگزاری

نویسنده از سرکار خانم الهام نیک‌پی که در استخراج داده‌ها از بانک ژن کمک کرده‌اند، تشکر و قدردانی می‌کند.

REFERENCES

- Arababadi MK, Pourfathollah AA, Jafarzadeh A, Hassanshahi G, et al. (2011) Hepatitis B virus genotype, HBsAg mutations and co-infection with HCV in occult HBV infection. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 35(8-9): 554-9.
- Araujo NM, Branco-Vieira M, Silva AC, Pilotto JH, et al. (2008) Occult hepatitis B virus infection in HIV-infected patients: Evaluation of biochemical, virological and molecular parameters. *Hepatol Res*, 38(12): 1194-203.
- Alter MJ (2003) Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide, *J Hepatol*, 39(1): 64-9.

HBsAg را تشخیص دهند (Fairchild *et al.*, 1995). بیشتر جانشین‌سازی‌ها در دومین لوپ از لوپ دوتایی منطقه a است. یعنی لوپ دوم خیلی مهم است و گمان بر این است که اسید آمینه ۴۱-۴۵ به آنتی‌بادی پیوند می‌شود (Ponsel, 2003).

ولی نتایج مطالعه ما نشان می‌دهد در نمونه نهفته ایرانی، جانشین‌سازی گلیسین با آرژنین در موقعیت ۷ و ۱۸۵، با این که خارج از ناحیه a است، منجر به تغییر خصوصیات آنتی‌ژنیک می‌گردد.

تشکیل کمپلکس پروتئین-پروتئین یا آنتی‌ژن-آنتی‌بادی به واسطه حذف آب از سطوح بین پروتئینی است. تشخیص پروتئین HBsAg به وسیله آنتی‌بادی نیازمند آن است که آب روی سطوح پروتئینی حذف شود. پنج هیدروژن موجود در گروه گوآنیدین آرژنین اغلب با آب واکنش می‌دهد (Tonekaboni *et al.*, 2000).

خواص فیزیکوشیمیایی توالی هر دو نمونه وحشی و جهش یافته طبق جدول ۱ تقریباً مشابه است ولی در جهت و اندازه ممان دوقطبی (ناشی از تغییر سطوح الکتروستاتیک) به دست آمده از ساختار پیشگویی شده تفاوت وجود دارد (شکل ۳). می‌توان علت عدم تشخیص HBsAg در حالت موتان را تغییر سطوح الکتروستاتیک و در نتیجه تغییر آنتی‌ژنیسیته در اثر جانشین‌سازی با آرژنین دانست.

آرژنین تمایل دارد در آخرین ترن آلفا هلیکس قرار بگیرد (Fasman, 1989). آرژنین پل نمکی قوی با ماکرومولکول‌هایی با بار منفی مثل اسیدهای نوکلئیک برقرار می‌کند و در واکنش‌های غیراختصاصی مانند انتهای لوپ‌های نامنظم در پوشش‌های پروتئینی ویروس وجود دارد و باعث اتصال آن با DNA یا RNA می‌شود

- Datta S, Banerjee A, Chandra PK, Chakraborty S, et al. (2007) Detection of a premature stop codon in the surface gene of hepatitis B virus from an HBsAg and antiHBc negative blood donor. *J Clin Virol*, 40(3): 255-8.
- Fairchild S, Pachter R, Perrin R (1995) Protein Structure Analysis and prediction. *The Mathematica Journal*, 5(4):64-69.
- Fasman GD (1989) Prediction of protein structure and the principles of protein conformation, New York.
- Gerlich WH (2004) Diagnostic problems caused by HBsAg mutants-A Consensus Report of an expert meeting.

- Intervirology, 47: 310-313.
- Grob P, Jilg W, Bornhak H, Gerken G, et al. (2000) Serological pattern "anti-HBc alone" Report on a workshop. *J Med Virol*, 62: 450-455.
- Guex N, Peitsch MC (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer, an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18: 2714-2723
- Higgins DG, Thompson JD, Gibson TJ (1996) Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods in Enzymology*, 226: 383-402.
- Hamkar R, Aghakhani A, Soufian S, Banifazl M, et al. (2010) Surface gene mutations of hepatitis B virus among high-risk patients with occult hepatitis B virus infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 66(3): 285-291.
- Kaviani MJ, Behbahani B, Mosallai MJ, Sari-Aslani F, et al. (2006) Occult hepatitis B virus infection and cryptogenic chronic hepatitis in an area with intermediate prevalence of HBV infection. *World J Gastroenterol*, 12(31): 5048-50.
- Miyakawa Y, Mizokami M (2003) Classifying hepatitis B virus genotypes. *Intervirology*, 46 (6): 329-338.
- Norder H, Arauz-Ruiz P, Blitz L, Pujol FH et al. (2003) The T(1858) variant predisposing to the precore stop mutation correlates with one of two major genotype F hepatitis B virus clades. *J Gen Virol*, 84(8): 2083-2087.
- Norder H, Courouce AM, Coursaget P, Echevarria JM et al. (2004) Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology*, 47(6): 289-297.
- Norouzi M, Ghorashi SA, Ataei B, Yaran M, et al. (2010) Hepatitis B Virus Surface Antigen Variants Clustered Within Immune Epitopes in Chronic Hepatitis B Carriers from Hormozgan Province, South of Iranian *Journal of Basic Medical Sciences*, 13(4): 213-224.
- Okamoto H, Imai M, Kametani M, Nakamura T, et al. (1987) Genomic Heterogeneity of Hepatitis B Virus in a 54-year-old woman who contracted the infection through Materno-Fetal transmission. *J Exp Med*, 57(4): 231-236.
- Palma PN, Krippahl L, Wampler JE, Mouran JG (2000) BiGGER: A New (Soft) Docking Algorithm for Predicting Protein Interactions. *Proteins*, 39: 372-384.
- Ponsel D, Bruss V (2003) Mapping of Amino acid Side Chains on the surface of Hepatitis B Virus Capsids required for the envelopment and virion formation. *J Virol*, 77(1): 416-422.
- Sleisenger and Fortran's (2006) *Gastrointestinal and Liver disease* 8th edition, 1647-1680.
- Tang JH, Yeh CT, Chen TC, Hsieh SY, et al. (1998) Emergence of an S gene mutant during thymosin alpha1 therapy in a patient with chronic hepatitis B. *J Infect Dis*, 178: 866-869.
- Tonekaboni S, Waters JA, Jeffers S, Gehrke R, et al. (2000) Effect of variation in the common "a" determinant on the antigenicity of hepatitis B surface antigen. *J Med Virol*, 60(2): 113-21.
- Vriend G (1990) WHAT IF: A molecular modeling and drug design program. *J Mol Graph*, 8: 52-56.
- Weinberger KM, Bauer T, Boehm S, Jilg W (2000) High genetic variability of the group-specific a-determinant of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum. *J Gen Virol*, 81: 1165-1174.
- Yamamoto K, Horikita M, Tsuda F, Itoh K, et al. (1994) Naturally occurring escape mutants of hepatitis B virus with various mutations in the S gene in carriers seropositive for antibody to hepatitis B surface antigen. *J Virol*, 68: 2671-2676.
- Yang X, Tang XP, Lei JH, Luo HY, et al. (2003) A novel stop codon mutation in HBsAg gene identified in a hepatitis B virus strain associated with cryptogenic cirrhosis. *World J Gastroenterol*, 9(7): 1516-20.
- Yuh CH, Chang YL, Ting LP (1992) Transcriptional regulation of, precore and pregenomic RNAs of hepatitis B virus. *J Virol*, 66: 4073-4084.
- Zaaijer HL, Bouter S, Boot HJ (2008) Substitution rate of hepatitis B surface gene. *J Viral Hepat*, 15: 239-245.
- Zhang Y (2008) Progress and challenges in protein structure prediction. *Current*

- Opinion in Structural Biology, 18: 342-348.
- Zhang Y (2007) Template- based modeling and free modeling by I-TASSER in CAPS7. Proteins, 69(58): 108-117.
- Zhang Y (2008) I-TASSER server for protein 3 D structure prediction. BMC Bioinformatics, 9: 40-47.
- Zuc Zuckerman AJ (2000) Effect of hepatitis B virus mutants on efficacy of vaccination. Lancet 355: 1382-1384.

Archive of SID