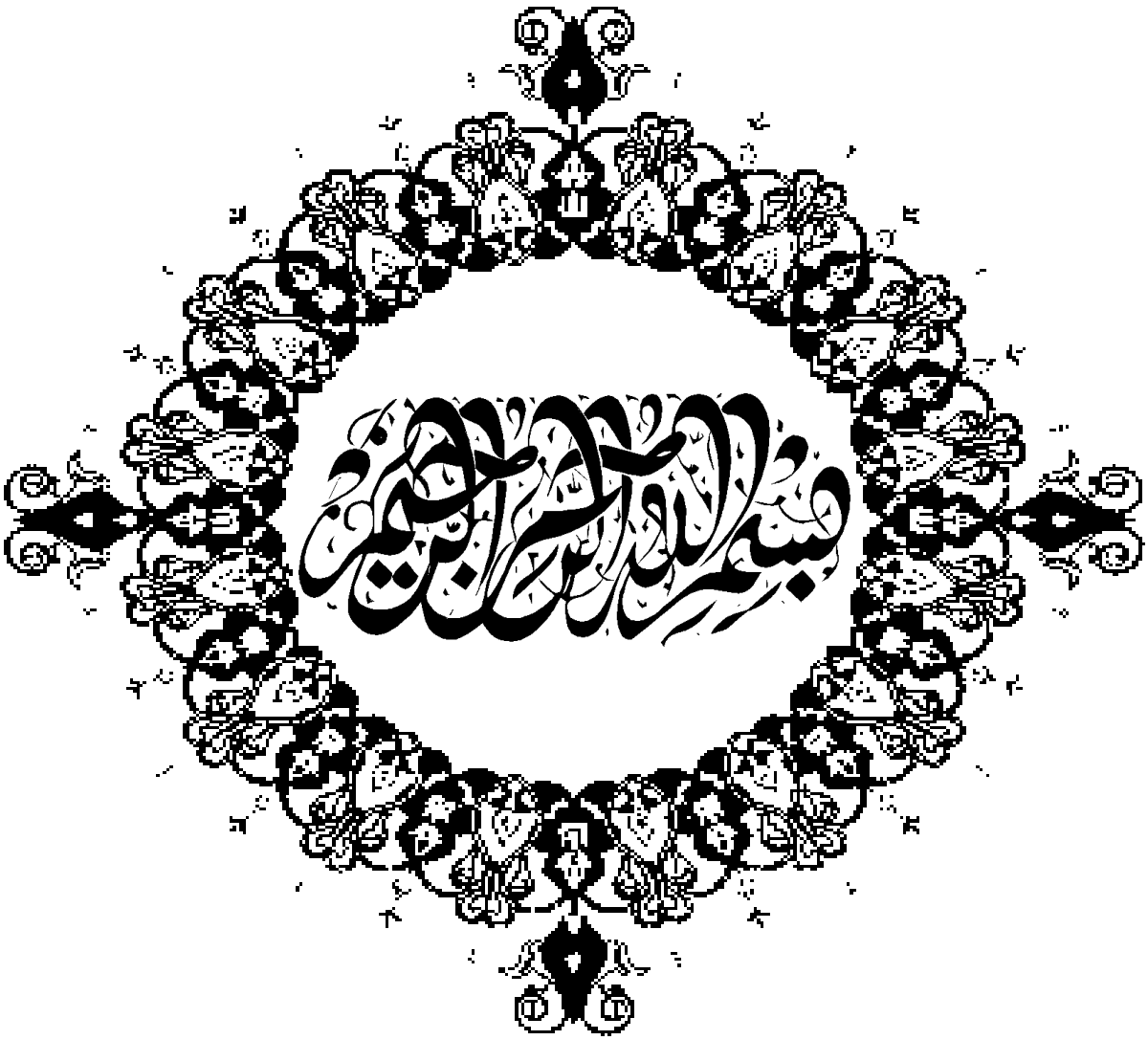
بسم الله الرحمن الرحيم

A Thesis Entitled

MOLECULAR STUDY ON HCV GENOME IN EGYPTIAN PATIENTS

Presented By

Wael Nabil

B.Sc., FACULTY OF SCIENCE, ZAGZIG UNIVERSITY, 2004

SUBMITTED FOR

THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

IN BIOCHEMISTRY

TO THE

FACULTY OF SCIENCE

CAIRO UNIVERSITY

2009

دراسة جزيئية على جينوم فيروس الالتهاب الكبدى الوبائى (سى) فى المرضى المصريين

رسالة مقدمةمن

وائل نبيل فرحات محمد

الحاصل على بكالوريوس علوم-جامعة الزقازيق٢٠٠٤

للحصول على

درجة الماجستير فى الكيمياء الحيوية

الى
كلية العلوم
جامعة القاهرة

٢٠٠٩

ACKNOWLEDGEMENTS

*First of all many and great thanks to **GOD**.*

*I wish to express my deep gratitude to **Dr. Mervat El-Sayd,** Assistant Professor of Biochemistry, Faculty of Science, Cairo University, for her kind supervision and continuous encouragement during this work.*

*Specific acknowledgment and deepest thanks to **Prof. Dr. Mostafa Kamel El-Awady,** for suggesting the point of this thesis precise supervision, valuable criticism, indispensable directions and sincere encouragement throughout the whole work.*

*Many thanks and gratitude to **Dr. Moataza Hasan Omran**, Assistant Professor of Medical Biotechnology, National Research Center, for her meticulous and close supervision, effective help, constant advice, enlightening suggestions, generous and continuos support.*

Special thanks to all my colleagues at National Research Center for their support and sincere help.

ABSTRACT

Name: Wael Nabil Farahat

Title of thesis: Molecular study of HCV genome in Egyptian patients

Degree: Master of Science in Biochemistry, Faculty of Science,
Cairo University

Abstract: Hepatitis C virus (HCV) infection is a major health problem in Egypt, as it is estimated that more than 20% of Egyptians are infected by the virus and spontaneous viral clearance occurs in about 20% of acutely infected patients. The majority of infected individuals develop chronic hepatitis can then progress to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Current therapies for HCV genotype 4 with interferon / ribavirin have not been successful and thus finding a cure for this disease is of utmost importance. Due to the heterogeneity of HCV virus with both high replication and high mutation rate in vivo, this study was conducted to analyze different isolates of Egyptian patients of the most mutant regions of the virus (E1 and E2). These regions were found to play an important role in viral persistence by escaping from the immune system of the host body. Heterogeneity of genotype 4, which the prevalent genotype in Egypt of our local strains was, studied by sequencing and phylogenetic analysis, calculating synonyms and non-synonyms substitutions, finding the possible glycosylation sites and different epitope domains. Thus, the present work found that the heterogeneity of the quasispecies of our local strains 4a was high showing up 15% diversity. This study also showed four glycosylation sites that play a major role in protein folding and virus entry. Besides, different epitpoes were identified in different domains of the E1 and E2 that would help in determining the neutralizing and non- neutralizing antibodies. These data would be fundamental in planning the development of vaccine trials in Egypt.

Key Words: HCV, envelope region E1 and E2, PCR,
Sequencing analysis, Phylogenetic analysis.

Supervisors: 1- Prof. Dr. Mervat El-Sayd **Signature:**

2-Prof. Dr. Mostafa Kamel El-Awady **Signature:**

Prof. Dr.

Chairman of Chemistry Department
Faculty of Science, Cairo University

المستخلص العربى

اسم الطالب: وائل نبيل فرحات محمد

عنوان الرسالة :- دراسة جزيئية على جينوم فيروس الالتهاب الكبدي الوبائى (سى) فى المرضى المصريين

الدرجة :- الحصول على الماجستير فى الكيمياء الحيوية- كلية العاوم _ جامعة القاهرة

المستخلص العربى :- تعتبر الإصابة بالفيروس الكبدى "سى" من اكبر المشاكل الصحية فى مصر وقد تم تقدير ان اكثر من ٢٠٪ من المرضى المصريين مصابون بالفيروس وغالبية المصابين يتطور بهم المرض الى تليف الكبد وسرطان الكبد. والعلاج الموجود حاليالفيروس(سى) هوعقار الانترفيرون والريبافيرين. وهدا العقار لاينجح فى كل الحالات فهناك مرضى يستجيبون للعلاج بة ومرضى لايستجيبون نتيجة لتغير الشكل الجينى للفيروس عن طريق زيادة معدل الطفرات ومن هنا تأتى الحاجة لتواجد العلاج البديل للفيروس. وقد تم اجراء هذة الدراسة على مرضى مصريين مصابين بالفيروس. وكانت الدراسة على منطقة الغلاف الاول والثانى لجينوم الفيروس وهى اكبر منطقة بها طفرات فى جينوم فيروس الالتهاب الكبدى الوبائى (سى)والتى تلعب دورا هاما فى تواجد الفيروس عن طريق الهروب من استجابة الجهاز المناعى لجسم العائل. وقد تم دراسة تغير الشكل الجينى للفيروس فى المرضى المصريين وذلك عن طريق اجراء تحليل التتابع النيوكليوتيدى ودراسة علاقة التتابع النيوكليوتيدى بالانماط الجينية الاخرى وحساب الطفرات الساكنة التى لاتؤدى لتغير فى الاحماض النووية والطفرات الغير الساكنة التى تؤدى لتغير فى الاحماض النووية وكذلك معرفة المناطق الكربوهيدراتية. وقد وجد من خلال هدة الدراسة ان الاختلافات الجينية لفيروس سى النمط الرابع فى المرضى المصريين تصل الى ١٥٪. وتواجد اربع مناطق كربوهيدراتية والتى تلعب دورا فى انطواء الفيروس ودخولة للخلية الكبدية.وكذلك دراسة اجزاء من الفيروس والتى يتعرف عليها الجهاز المناعى لمعرفة الاجسام المضادة المعادلة من الاجسام المضادة غير المعادلة. وهذة الدراسة خطوة هامة للتخطيط لمحاولة عمل عقار لفيروس الالتهاب الكبدى الوبائى (سى).

الكلمات الدالة:- فيروس الالتهاب الكبدى الوبائى (سى)، الغلاف الاول والثانى، تفاعل البلمرة المتسلسل، تحليل التتابع النيوكليوتيدى

المشرفون:-

(١)الاسم: د.مرفت السيد التوقيع:-

(٢)الاسم/ أ.د. مصطفى العوضى التوقيع:-

أ.د. محمد شكرى

رئيس قسم الكيمياء الحيوي- كلية العلوم – جامعة القاهرة

Contents

Page

Abstract ……..……...

Acknowledgement…….....

List of Abbreviations……

List of Figures…….....

List of Tables…….....

Introduction and Aim of the Work…….. 1

1. Review of Literature……. 3

I- Epidemiology of HCV …… **3**

II. Hepatitis C Virus in Egypt…… **9**

III-Molecular Biology of Hepatitis C virus**…**……... **13**

IV-E1/E2 Envelope Glycoprotein..... **20**

V- HCV Replication……..... **26**

VI-Diagnosis of Hepatitis C Virus ……..... **33**

VII-Therapy of hepatitis C virus……... **41**

2. Materials and Methods……. 51

3. Results……..... 67

4. Discussion……... 110

5. Summary and Conclusion……. 122

6.Recommendations…….. 127

7.References…… 128

Contents

List of Figures

		Page
Fig. (1) :	HCV prevalence world wide	4
Fig. (2) :	HCV prevalence in a number of countries compared to Egypt	9
Fig. (3) :	HCV genome organization	14
Fig. (4) :	Structure of HCV 5_UTR and 3_UTR	14
Fig. (5) :	HCV poly protein translation	15
Fig. (6) :	Structure of the full-length NS3 protein	17
Fig. (7) :	Linear representation of the E2 and NS5A proteins of the HCV	19
Fig. (8) :	HCV E1 and E2 ectodomains	20
Fig. (9) :	HCV E2 structure model	21
Fig. (10) :	HCV E1/E2 heterodimer	22
Fig.(11) :	HCV E1 and E2 glycosylation sites	23
Fig.(12) :	Highly conserved regions in the 5'UTR and core regions, and high viral diversity in envelope genes and NS5A	24
Fig. (13) :	HCV life cycle	27
Fig. (14) :	systems for studying HCV replication, entry, and infectivity	31
Fig. (15) :	Phylogenetic tree of HCV genotypes	37
Fig. (16) :	Proposed algorithm for the use of virologic tests in the treatment of chronic hepatitis C	41

Fig. (17) :	**Mechanism of IFN action**	**44**
Fig. (18) :	**Candidate target for new therapeutic approach**	**46**
Fig. (19) :	**NS5B Polymerase and NS3 Protease in HCV life cycle**	**47**
Fig. (20) :	**Agrose gel electrophorysis of HCV RNA PCR product**	**68**
Fig. (21) :	**HCV genotyping in Egyptian Patients**	**70**
Fig. (22) :	**Agrose gel electrophorysis of HCV E1/E2 amplified PCR product**	**71**
Fig. (23) :	**Negative control for JM109 competent cells**	**72**
Fig. (24) :	**White colonies of transformed JM109 competent cells**	**73**
Fig. (25) :	**Plasmid DNA miniprep**	**74**
Fig. (26) :	**Amplification of plasmid DNA within the insert**	**75**
Fig. (27) :	**HCV nucleotide sequence of the Egyptian genotype clone (28) in alignment with HCV 4a RNA**	76
Fig. (28) :	**Location of HCV E1/E2 nucleotide sequence of Egyptians clone**	**77**
Fig. (29) :	**Multiple sequence alignment of HCV E1/E2 of 28 Egyptians clone with HCV 4a**	**79**
Fig. (30) :	**phylogenetic tree of the 28 Egyptian clones and different genotypes of HCV from gene bank**	**91**

Fig. (31) :	**Translation of nucleotide sequence of Egyptians clone into it's amino acids**	**92**
Fig. (32) :	**Multiple alignment for amino acids**	**93**
Fig. (33) :	**Prediction of glycosylation sites**	**99**
Fig. (34) :	**HCV E1/E2 secondary structure of Egyptians clone**	**108**

List of Tables

		Page
Table (1) :	**Identities of E1/E2 sequence alignment of HCV Egyptia clones with**	**77**
Table (2) :	**Synonymous and non-synonymous substitution rates** …….	**96-97**
Table (3) :	**Probability of glycosylation sites……..**	**99**
Table (4) :	**Identification of the epitopes H2-Db nonamers**	**101**
Table (5) :	**Identification of the epitopes H2-Kd nonamer …….**	**102**
Table (6) :	**Identification of the epitopes HLA-A*26 nonamers ……**	**103**
Table (7) :	**Identification of the epitopes HLA-B*1402 nonamers ……..**	**104**
Table (8) :	**Identification of The epitopes HLA-B*2705 nonamers** ……	**105**
Table (9) :	**Identification of The epitopes HLA-A*0201 nonamer** ……	**106**
Table (10) :	**Secondary structure predicton of 28 Egyptian clones and prototype 4a……**	**108**

List of Abbreviations

ASMA	:	Anti- smooth muscle antibodies
anti-LC1	:	anti-liver cytosol antibodies type 1
anti-LKMI	**:**	anti-liver and kidney microsomal antibodies type 1
ANA	:	antinuclear antibodies
ALT	:	alanine aminotransferase
AST	:	aspartate aminotransferase
AFP	:	alpha- fetoprotein
b-DNA	:	branshed DNA
bp	:	base pair
BVDV	:	Bovine viral diarrhea virus
CD81	:	Cluster of differentiation 81
cDNA	:	Complementary DNA
CT	:	computerized tomography
DNA	:	Deoxynucleic acid
E1	:	Envelope 1
E2	:	Envelope 2
EDTA	:	Ethylene diamine tetra acetic acid
ELISA	:	Enzyme linked immunosorbant assay