

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang-Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Inneren Medizin
Medizinische Klinik 1
Direktor: Prof. Dr. Stefan Zeuzem

**Der Verlauf des Serum-miR-122-Spiegels bei Patienten mit
chronischer Hepatitis-C-Infektion während der antiviralen
Therapie**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang-Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Andreea-Cristina Wähner geb. Andrei
aus Tulcea (Rumänien)

Frankfurt am Main, 2023

Dekan:

Prof. Dr. Stefan Zeuzem

Referent:

Prof. Dr. Dr. Albrecht Piiper

Korreferent:

Herr Prof. Dr. Stefan Frank

Tag der mündlichen Prüfung:

18.06.2024

Zusammenfassung

Weltweit gibt es laut WHO ca. 58 Millionen Menschen mit einer chronischen Hepatitis-C-Virus (HCV) Infektion und jährlich stecken sich ca. 1,5 Millionen Menschen neu mit diesem Virus an (Stand 2019). Da die Folge einer chronischen Hepatitis-C-Virus Infektion eine potenziell tödlich verlaufende Leberzirrhose oder die Entwicklung eines Hepatozellulären Karzinoms sein können, ist eine frühe Diagnose und eine adäquate Therapie eine wichtige Aufgabe in der Medizin.

Die bisherige Therapie erfolgte mittels pegyliertem Interferon und Ribavirin und seit einigen Jahren auch interferonfrei mittels Direkter Antiviraler Agenzien (DAA). Vor allem beim älteren Therapieregime konnten viele Nebenwirkungen und häufiger auch ein Therapieversagen auftreten, sodass ein leicht zu gewinnender Biomarker nützlich wäre, der die Patienten mit Therapieversagen frühzeitig und im besten Fall sogar vor Therapiebeginn detektieren kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Spiegel von extrazellulär im Blut zirkulierender, leberspezifischer microRNA miR-122 auf Eigenschaften als solche potenzielle Biomarker untersucht. Dazu wurden die Patientenseren von insgesamt 60 Patienten mit chronischer Hepatitis-C-Virus Infektion analysiert, die mittels pegyliertem Interferon und Ribavirin behandelt wurden. Vor, während und nach der Therapie wurden verschiedene Laborparameter sowie die miR-122 in den Patientenseren bestimmt. 20 dieser Patienten zeigten ein dauerhaftes Ansprechen auf die Therapie (sustained virological response = SVR), 20 zeigten nach einem initialen Therapieansprechen ein Rückfall der Erkrankung (Relapse) und 20 Patienten sprachen gar nicht auf die Therapie an (Non-Responder = NR).

Zunächst wurden die sogenannten Baseline-Charakteristika der Patienten vor Therapiebeginn untersucht. Dabei konnten wir jedoch keinen Unterschied zwischen den Patientengruppen hinsichtlich der Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST), zwei Laborparameter zur Bestimmung einer Leberschädigung, sowie der HCV-RNA, ein Parameter zur Bestimmung der Viruslast bei Patienten mit einer HCV-Infektion, feststellen.

Auch die miR-122-Spiegel zeigten vor Therapiebeginn keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Patientengruppen. Daraus wurde geschlossen,

dass man die miR-122 vor Therapiebeginn nicht als prognostischen Marker für einen Therapieerfolg verwenden kann.

Beim Vergleich der miR-122-Spiegel mit den Laborparametern konnte eine signifikante Korrelation zwischen der miR-122 und der ALT, AST und der Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT) festgestellt werden. Die miR-122 scheint somit ähnlich wie die anderen Laborparameter eine Leberzellschädigung widerzuspiegeln.

Nach dem Therapiebeginn konnte bereits ab Woche 4 ein signifikanter Unterschied zwischen den SVR und Non-Respondern sowie zwischen den Relapsepatienten und den Non-Respondern festgestellt werden. Jedoch war der Unterschied zwischen den SVR und den Relapse-Patienten nicht signifikant, sodass man weiterhin keine Unterscheidung dieser beiden Patientengruppen machen konnte.

Auch die ALT- und HCV-RNA-Spiegel zeigten einen ähnlichen Verlauf. In den Gruppen der SVR und Relapse-Patienten zeigte sich im Laufe der Therapie ein Rückgang der Parameter wohingegen die Gruppe der Non-Responder keine signifikante Dynamik aufwies.

Zum Schluss wurden die miR-122-Spiegel 12 bzw. 24 Wochen nach Therapieende bestimmt, dem sogenannten Zeitpunkt des Follow-Up bei dem der Therapieerfolg laut Leitlinie mit Hilfe der HCV-RNA-Messung bestimmt wird. Dabei konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den miR-122-Spiegeln bei den SVR-Patienten und den anderen beiden Patientengruppen festgestellt werden.

In Zusammenschau dieser Ergebnisse kann man sagen, dass die miR-122 gut geeignet ist um ähnlich wie die HCV-RNA den Therapieverlauf widerzuspiegeln. Als prognostischer Parameter bzw. Biomarker für ein Therapieansprechen ist sie jedoch nicht geeignet, da keine Unterscheidung zwischen den einzelnen Patientengruppen vor Therapiebeginn möglich ist und während der Therapie lediglich die Non-Responder und nicht die Relapse-Patienten detektiert werden können.

Abstract

According to the WHO, there are approximately 58 million people worldwide with chronic hepatitis C virus (HCV) infection, and approximately 1.5 million people become newly infected with this virus each year (as of 2019). Since the consequence of chronic hepatitis C virus infection can be potentially fatal liver cirrhosis or the development of hepatocellular carcinoma, early diagnosis and adequate therapy is an important task in medicine.

Therapy to date has been by means of pegylated interferon and ribavirin and, for some years, also interferon-free by means of direct antiviral agents (DAA). Especially with the older therapy regimen many side effects and more often therapy failure could occur, so that an easily obtainable biomarker would be useful to detect patients with therapy failure early and in the best case to predict therapy failure before therapy start.

In the present work, the levels of the extracellularly circulating liver-specific microRNA miR-122 were investigated for potential biomarker properties during HCV therapy. For this purpose, patient sera from a total of 60 patients with chronic hepatitis C virus infection treated by pegylated interferon and ribavirin were examined. Before, during and after therapy, various laboratory parameters as well as miR-122 in the patient sera were examined. 20 of these patients showed a sustained virological response (SVR), 20 showed a relapse of the disease after an initial response and 20 patients did not respond to the therapy at all (non-responder = NR).

Initially, the so-called baseline characteristics of the patients were investigated before the start of therapy. No differences were found between the patient groups in terms of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), two laboratory parameters used as markers of liver injury, and HCV-RNA, a parameter used to estimate viral load in patients with HCV infection.

Also, miR-122 levels showed no significant difference between the three patient groups before therapy initiation. Therefore, it can be concluded that miR-122 baseline levels were not prognostic for therapy success.

When miR-122 levels were compared with laboratory parameters, a significant correlation was found between miR-122 and ALT, AST, and gamma-glutamyl

transferase (GGT). Thus, miR-122 appeared to reflect hepatocellular injury similar to the other laboratory parameters.

After therapy initiation, a significant difference between SVR and non-responders and between relapse patients and non-responders was observed as early as week 4. However, the difference between the SVR and relapse patients was not significant. Therefore, it was still not possible to distinguish between these two groups of patients.

ALT and HCV-RNA also showed a similar trend. The SVR and relapse patient groups showed a decrease in parameters over the course of therapy whereas the non-responder group did not show significant dynamics.

Finally, miR-122 levels were determined 12 and 24 weeks after the end of therapy, the so-called time of follow-up, at which the success of therapy is determined by HCV RNA measurement according to the guideline. This revealed a significant difference between miR-122 levels in SVR patients and the other two patient groups.

In synopsis of these results, it can be concluded that miR-122 is well suited to reflect treatment success similar to HCV RNA. However, it is not suitable as a prognostic parameter or biomarker for therapy response, since no differentiation between the individual patient groups is possible before the start of therapy and only the non-responders and not the relapse patients can be detected during therapy.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	3
Abstract	5
Inhaltsverzeichnis.....	7
Abbildungsverzeichnis.....	10
Tabellenverzeichnis.....	10
Abkürzungsverzeichnis	11
1 Einleitung	14
1.1 Hepatitis-C-Virus.....	14
1.1.1 Klinischer Verlauf.....	14
1.1.2 Diagnostik.....	15
1.1.2 Therapie	16
1.2 microRNA	
1.2.1 Bedeutung und Biogenese	18
1.2.2 microRNA als Biomarker	19
2 Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	22
2.1.2 Kits	22

2.1.3	Gebrauchswaren	22
2.1.4	Geräte	23
2.1.5	Software	23
2.2	Methoden	23
2.2.1	Patientenauswahl	23
2.2.2	Blutproben	24
2.2.3	Klinische Laborwerte und HCV-Viruslast	24
2.2.4	RNA-Isolation aus Serum	24
2.2.5	Relative Quantifizierung der microRNA mittels Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	25
2.2.5.1	Reverse Transkription	25
2.2.5.2	Real-Time PCR	27
2.2.6	Statistik	28
3	Ergebnisse	30
3.1	Untersuchung der Baseline-Charakteristika der Patienten	30
3.2	Laborparameter und miR-122-Werte vor Therapiebeginn	32
3.3	Überblick über den Therapieverlauf	34
3.3.1	Verlauf der Serum-miR-122-Spiegel im Laufe der Therapie	34
3.3.2	Verlauf der Serum-miR-122-Spiegel während der Therapie im Vergleich zu anderen Laborparametern	36
3.4	Vergleich der miR-122-Spiegel in den 3 Patientengruppen kurz nach Therapiebeginn und nach Therapieende	39
4	Diskussion	42
4.1	Untersuchung der Baseline-Charakteristika der Patienten	43

4.2 Laborparameter und miR-122-Werte vor Therapiebeginn/ miR-122 als (diagnostischer und therapeutischer) Biomarker	44
4.3 Entwicklung der miR-122-Spiegel im Laufe der Therapie	51
4.3.1 miR-122-Spiegel im Laufe der Therapie mit pegyliertem Interferon-alpha/Ribavirin und mit Direkten Antiviralen Agenzien	51
4.3.2 hepatische miR-122-Expression vs. Serum miR-122-Spiegel	53
4.3.3 Serum-miR-122-Spiegel im Vergleich zu anderen Laborparametern im Laufe der Therapie.....	55
4.4 Serum-miR-122 zur Überwachung des Therapieerfolges	57
Literaturverzeichnis	60
Schriftliche Erklärung	72
Lebenslauf.....	73

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klinischer Verlauf einer Hepatitis-C-Virus (HCV) Infektion.	15
Abbildung 2: Korrelation zwischen den miR-122-Werten und den Transaminasen bzw. der HCV-RNA zur Baseline (vor Beginn der antiretroviralen Therapie)	33
Abbildung 3: Zeitverlauf der Serum miR-122-Spiegel und der Serum miR-16-Spiegel im Laufe der Antiretroviralen Therapie bei Patienten mit SVR, Relapse und NR	35
Abbildung 4: Serum miR-122-Werte 4 Wochen und 12 Wochen nach Beginn der Antiretroviralen Therapie normalisiert auf die Baseline Werte.....	36
Abbildung 5: Der zeitliche Verlauf der miR-122-Werte, der ALT, sowie der HCV-RNA bei Patienten mit SVR, Relapse und NR.....	38
Abbildung 6: Serumwerte der miR-122 und der miR-16 vier Wochen nach Beginn der antiretroviralen Therapie und zum Zeitpunkt des Follow-Up.....	40

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Master-Mix-Ansatz für Reverse Transkription.....	25
Tabelle 2: Master-Mix-Ansatz für Real-Time PCR.....	26
Tabelle 3: Patientencharakteristika zum Beginn der Therapie	29

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ago2	Argonaute RISC Catalytic Component 2
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
B-CLL	Chronische lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ
CD4	Cluster of Differentiation 4
CD8	Cluster of Differentiation 8
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
C_T -Wert	Cycle-Threshold Wert
DAA	direkt antivirale Agenzien
d.h.	das heißt
EOT	end of treatment
FET	Fluoreszenz-Energie-Transfer
FU	follow up
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
g	Gramm
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/sec ²)
HBsAG	engl.: Hepatitis-B-Virus surface antigen
HCC	Hepatocellular Carcinoma (engl.), Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus

HKG	housekeeping gene (engl.), Referenzgen
IU	international unit (engl.), Internationale Einheit
miRNA	micro ribonucleic acid
miR-15	micro ribonucleic acid 15
miR-16	micro ribonucleic acid 16
miR-122	micro ribonucleic acid 122
mRNA	messenger ribonucleic acid
MW	Mittelwert
NR	non-responder = kein Ansprechen auf die antiretrovirale
NPM1	Nucleophosmin
p-Wert	Signifikanzwert
PCR	Polymerase Chain Reaction (engl), Polymerase Kettenreaktion
PEG-IFN-	
α /RBV	PEGyliertes Interferon- α / Ribavirin
pri-miRNA	primäre micro ribonucleic acid
pre-miRNA	precursor micro ribonucleic acid
RISC	RNA induced silencing complex
RNase	Ribonuklease
RNA	Ribonucleic acid (engl.), Ribonukleinsäure
RVR	Rapid Viral Response
SD	Standardabweichung
siRNA	small interfering ribonucleic acid
SVR	sustained virological response = Ansprechen auf die antivirale Therapie
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

1.1 Hepatitis-C-Virus

Das Hepatitis-C-Virus (HCV) gehört zu der Gattung der Hepaciviren in der Familie der Flaviviridae und besteht aus einer einzelsträngigen RNA positiver Polarität ((+)ssRNA).^{1(p766),2(p531)} Aufgrund einer hohen genetischen Variabilität sind inzwischen 8 Genotypen mit diversen Subtypen bekannt.^{1(p767),3} Der Genotyp 1 ist mit 78 % in Deutschland am häufigsten vertreten.^{2(p531)}

Das Hepatitis-C-Virus wurde erstmals 1989 identifiziert (vorher Non-A-Non-B-Hepatitis).⁴ Laut einer Einschätzung der WHO⁵ hatten 2015 weltweit 71 Millionen Menschen eine chronischen Hepatitis-C-Infektion und die weltweite Prävalenz lag bei 1 %. 399 000 Menschen starben aufgrund einer durch Hepatitis-C-Virus verursachten Lebererkrankung und die Anzahl an Hepatitis-C-Neuinfektionen wurde auf 1,75 Millionen geschätzt.^{5,6} Die Übertragung erfolgt parenteral, wobei das Risiko einer Infektion bei Menschen mit intravenösem Drogenabusus (65 %) sowie Männern, die sexuellen Kontakt mit Männern haben (6 %), in Deutschland am größten ist.^{2(p531)}

1.1.1 Klinischer Verlauf

Nach einer Inkubationszeit von 6-10 Wochen verläuft die Hepatitis-C-Infektion in ca. 75 % der Fälle symptomlos. Durch eine starke Immunantwort mittels CD8⁺-cytotoxischer T-Zellen und den CD4⁺-T-Helferzellen kann es zu einer Ausheilung der Infektion kommen. In 50-80 % der Fälle besteht nach 6 Monaten noch eine HCV-Infektion (Nachweis von HCV-RNA) und es kommt zu einer Chronifizierung. Gelingt es nicht die chronische HCV-Infektion erfolgreich zu behandeln, kommt es nach ca. 10-20 Jahren bei 10-30 % der Patienten zur Entwicklung einer Leberzirrhose. Von den Patienten mit einer Leberzirrhose versterben ca. 25 % an einem Leberversagen und jährlich erkranken 1,5 – 7 % an einem hepatozellulären Karzinom (HCC).^{1(pp769-770)}

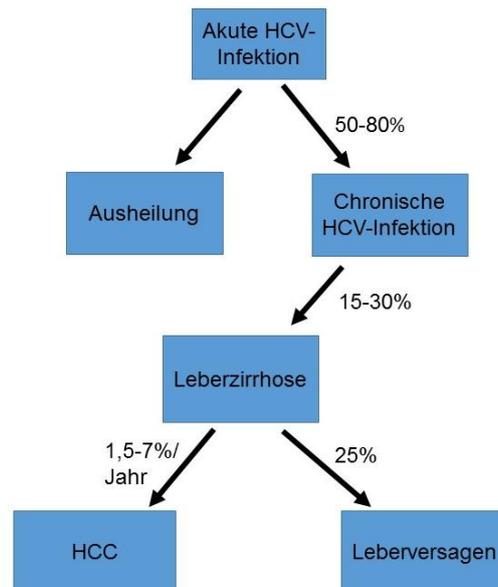


Abb. 1: Klinischer Verlauf einer Hepatitis-C-Virus (HCV) Infektion. HCC = Hepatozelluläres Karzinom

1.1.2 Diagnostik

Zur Diagnostik bzw. zum Screening einer Hepatitis-C-Infektion gehört die Bestimmung von Antikörper gegen HCV (anti-HCV) mittels Immunoassay. Da das Immunoassay sehr sensitiv ist, also auch falsch positive Befunde vorliegen können, sollte zur Sicherung der Diagnose die HCV-RNA nachgewiesen werden. Ebenso ist es sinnvoll bei Verdacht auf eine HCV-Infektion auch gleich einen direkten Virusnachweis (HCV-RNA-Bestimmung mittels PCR-Test) durchzuführen, da ein positiver Antikörpernachweis erst 7-8 Wochen nach Infektion auftreten kann (diagnostische Lücke). Die HCV-RNA ist bereits 1-2 Wochen nach Infektion nachweisbar. Bei einem Nachweis einer HCV-Infektion ist ein weiterer wichtiger Schritt, eine Bestimmung des Genotyps durchzuführen, da hiervon die Prognose und Therapie abhängig ist.^{1(p770),2(p532),7}

Es werden zusätzlich klinisch-chemische Basistests sowie eine Oberbauchsonographie durchgeführt.

Zu den klinisch-chemischen Basistests gehört die Bestimmung der Transaminasen, wozu die Aspartat-Aminotransferase (AST) sowie die Alanin-Aminotransferase (ALT) zählen. Die AST wird ubiquitär exprimiert, und weist

auch in der Leber eine hohe Aktivität auf. Die ALT entfaltet ihre spezifische Aktivität vor allem in der Leber und der Niere, aber auch in der Skelettmuskulatur, Herz, Milz, Pankreas und Lunge. Eine Erhöhung dieser Werte kann auf eine Leberzellschädigung (Nekrose) hinweisen.^{8(pp97-99),9,10}

Die Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT) ist ein Enzym, welches in vielen Geweben exprimiert wird, jedoch mengenmäßig das größte Vorkommen in der Leber und die größte spezifische Aktivität in der Niere aufweist. Es zeigt frühzeitig eine Leber- oder Gallengangsstörung an.¹¹

Bei jedem Patienten sollte eine Oberbauchsonografie zum Ausschluss einer Leberzirrhose durchgeführt werden. Zur Bestimmung des Fibrosegrades (Staging) und der entzündlichen Aktivität (Grading) gilt eine Leberbiopsie als Goldstandard. Diese invasive Diagnostik sollte jedoch nur dann erfolgen, wenn das Ergebnis für das therapeutische Vorgehen entscheidend ist.^{2(p533),7}

Als nichtinvasive Methode zur Bestimmung eines Fibrosestadiums gilt die Elastografie, bei der mittels Ultraschall die Steifigkeit der Leber bestimmt wird.⁷

1.1.3 Therapie

Die Therapieoptionen richten sich je nach Genotyp, einer vorangegangenen Therapie oder dem Vorliegen eines Fibrosestadiums.

Zur Therapie der chronischen HCV-Infektion sind sowohl die bereits in der Vergangenheit eingesetzten Substanzen (pegyliertes Interferon alpha und Ribavirin) als auch die neueren Direkt Antiviralen Agenzien (DAA) zugelassen.⁷

Die Standardtherapie einer chronischen Hepatitis-C-Infektion war in der S3-Leitlinie AWMF von 2010 die Gabe von pegyliertem Interferon alpha und Ribavirin. Die Therapiedauer richtete sich dabei vor allem nach dem Genotyp, der HCV-RNA-Konzentration zu Therapiebeginn und inwieweit ein Abfall dieser Konzentration im Laufe der Therapie erzielt werden konnte.¹² Aufgrund der Zulassung neuer Medikamente, die direkt antiviral gegen verschiedene Proteine des Hepatitis-C-Virus wirken, wurde 2015 ein Addendum zur bereits bestehenden Hepatitis-C-Leitlinie verfasst. Demnach ermöglichen die neuen Medikamente eine interferonfreie Kombinationstherapie, die hocheffektiv,

nebenwirkungsarm und mit einer kürzeren Therapiedauer verbunden ist. Dabei ist die Art der Therapie auch vom Genotyp des Hepatitis-C-Virus, der Vortherapien und dem Stadium der Lebererkrankung abhängig.^{12,13}

Auch die neuesten AWMF-Leitlinien von 2018 wurden 2020 mittels eines Addendums aufgrund neuerer Direkter Antiviraler Agenzien (DAA) überarbeitet. Diese sogenannten pangenotypischen DAA können primär ohne Bestimmung des Genotyps eingesetzt werden. Dabei wird ein Therapieansprechen von > 95 % erreicht.¹⁴

Im Gegensatz hierzu zeigte die Kombinationstherapie aus pegyliertem Interferon alpha und Ribavirin eine Heilungsrate von 40 - 80 %, je nach Genotyp.^{1(p771)}

Zur Überprüfung des Therapieerfolges wird die Viruslast, das heißt die Menge der nachweisbaren HCV-RNA im Blut, am Therapieende sowie 12 Wochen später bestimmt. Die in den älteren Leitlinien aufgeführten 24 Wochen zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Ergebnissen zu den beiden Zeitpunkten, sodass die Kontrolluntersuchung zu einem früheren Zeitpunkt als der zuvor übliche Standard festgelegt werden konnte.

Als Non-Responder (NR) werden die Patienten betrachtet, bei denen kein oder nur ein unzureichender Abfall der Viruslast detektierbar ist. Liegt die HCV-RNA-Menge unter 25 IU/ml wird von einem Therapieerfolg ausgegangen.

Der Therapieerfolg wird standardmäßig 12 Wochen nach Beenden der Therapie bestimmt. Ist zu diesem Zeitpunkt keine HCV-RNA nachweisbar, spricht man vom Sustained-virological response (SVR), das heißt der Patient gilt als geheilt. Steigt die Viruslast nach dieser Zeit erneut an, so spricht man von einem *Relapse*.^{1(pp770-771),14}

Während Ribavirin noch als Kombinationstherapie zum Einsatz kommt, wird das PEG-Interferon alpha aufgrund der zahlreichen Nebenwirkungen, der geringeren Ansprechraten sowie einer sicheren und effektiveren Therapiealternative mit DAA in Deutschland nicht mehr eingesetzt.¹⁵

Trotz der neuen Therapiemöglichkeiten finden sich noch zahlreiche Länder, in denen auch die Interferon-Therapie weiterhin eine Rolle spielt. Pakistan hat mit 4,8 %¹⁶ weltweit die zweithöchste Prävalenz. In einer im Jahre 2020 veröffentlichten Studie¹⁷ wurde die Kombinationstherapie mit Interferon und

Ribavirin verwendet. Somit ist der Therapieansatz aus der INDIV-2 Studie, von der die hier untersuchten Serumproben stammen, nicht vollkommen historisch, sondern in manchen Teilen der Welt noch aktuell.¹⁸

1.2 microRNA

1.2.1 Bedeutung und Biogenese

MicroRNAs (miRNA) sind kleine, ca. 21-25 Nukleotide lange regulatorische RNA-Moleküle. Sie wurden erstmals 1993 beschrieben und seitdem wurden mehr als tausend verschiedene miRNAs identifiziert. Sie wirken modulierend auf die Aktivität spezifischer messenger-RNA (mRNA) und spielen eine entscheidende Rolle bei vielen physiologischen und pathologischen Prozessen.¹⁹⁻²¹

Die Biogenese der microRNA besteht aus zwei Schritten, die sich zum einen im Zellkern als auch im Zytoplasma abspielen. Im Zellkern werden die microRNA Gene zunächst durch die RNA Polymerase II oder III transkribiert, wodurch eine primäre microRNA (pri-miRNA) entsteht. Diese pri-miRNAs werden im nächsten Schritt durch die RNase III Endonuklease Drosha geschnitten und es entstehen die ca. 70 Nukleotide langen precursor microRNAs (pre-miRNAs) mit einer Haarnadelstruktur. Diese werden dann mittels GTP-abhängigem Transporter, dem Exportin-5, ins Zytosol transportiert. Dort erfolgt die weitere Spaltung durch die RNase III Endonuclease Dicer in eine doppelsträngige, 21-25 Nucleotide lange miRNA. Einer der beiden Stränge wird in den Proteinkomplex RISC (RNA induced silencing complex) eingebaut. Durch diesen Komplex wird die zur miRNA komplementäre messenger-RNA (mRNA) aufgesucht und durch Spaltung degradiert oder die Translation wird inhibiert.^{20,22-24}

Es hat sich gezeigt, dass microRNAs bei der Kontrolle der Zellproliferation, der Differenzierung sowie des Zellüberlebens eine entscheidende Rolle spielen.

So übernehmen einige microRNAs die Rolle von Oncogenen und werden in manchen Tumoren überexprimiert, wie zum Beispiel miR-155 im B-Zell-Lymphom, oder sie spielen eine Rolle als Tumorsuppressoren wie miR-15 oder miR-16 bei der Chronisch Lymphatischen Leukämie (CLL).^{22,25}

1.2.2 microRNA als Biomarker

Als Biomarker werden objektiv gemessene Parameter bezeichnet, die als Indikatoren für normale biologische oder pathologische Prozesse sowie für pharmakologische Reaktionen auf eine therapeutische Intervention wirken.²⁶

Dass microRNAs als Biomarker dienen können, wurde bereits in früheren Studien gezeigt. So wurde 2008 festgestellt, dass microRNAs im menschlichen Blutplasma gesunder Patienten in einer stabilen Form vorliegen und weitgehend resistent gegenüber der RNase-Aktivität im Plasma sind.^{19,27} Es konnte auch gezeigt werden, dass unter optimalen Bedingungen (Lagerung bei -70°C) die Stabilität der microRNA im Serum auch über einen längeren Zeitraum gegeben ist.²⁸

MicroRNAs können gewebespezifisch, also hauptsächlich in einem Organ exprimiert, aber auch unspezifisch sein und somit in mehreren Geweben exprimiert werden.²⁹

Die miR-16 ist eine ubiquitär exprimierte microRNA, deren Rolle bereits 2002 in Zusammenhang mit dem B-CLL (Chronische lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ) beschrieben wurde. Dort wurde nachgewiesen, dass sowohl die miR-15 als auch die miR-16 in der Mehrzahl der untersuchten B-CLL-Fälle in einer niedrigeren Konzentration als in gesundem Gewebe nachweisbar sind, die Expression dieser beiden microRNAs vermindert und die gemessenen Serumspiegel ebenfalls erniedrigt sind.³⁰ Seitdem wurde in mehreren Studien festgestellt, dass die miR-16 in zahlreichen Geweben vorkommt und als Tumorsuppressor in verschiedenen Tumoren schwächer exprimiert wird wie zum Beispiel dem Lungen-, dem Mamma- oder dem Magenkarzinom.³¹⁻³⁴ Die miR-16 blieb in einigen pathologischen Prozessen jedoch auch konstant, sodass sie häufig auch als ein Referenzgen verwendet wurde.^{19,35-37}

Im Gegensatz dazu zählt die miR-122 zu den Gewebe-spezifischen microRNAs und wird vor allem in der Leber exprimiert.²⁹ Sie spielt eine wichtige Rolle im Cholesterin- und Fettsäuremetabolismus, wobei eine Hemmung der miR-122 zu einer Abnahme des Plasma-Cholesterinspiegels sowie zu einem Anstieg der

hepatischen Fettsäureoxidation führt.³⁸ Die miR-122 ist jedoch nicht nur in physiologischen Vorgängen relevant, sondern auch in pathologischen Vorgängen. Beispielsweise liegen erhöhte Spiegel der extrazellulär zirkulierenden miRNA-122 sowohl bei toxischen als auch bei viral bedingten Leberveränderungen vor.³⁹⁻⁴² Sowohl Patienten mit einer Hepatitis-B-Infektion als auch Patienten mit einer Chronischen-Hepatitis-C-Infektion weisen eine Erhöhung der Serum-miR-122 im Vergleich zu nicht infizierten Patienten auf.^{40,43-45} Dabei spielt die miR-122 eine wichtige Rolle bei der Virusreplikation des Hepatitis-C-Virus. Durch eine genetische Interaktion zwischen der miR-122 und des Virusgenoms wird die Virusreplikation erleichtert.^{46,47} Bei dem Hepatozellulären Karzinom hingegen liegen erniedrigte intrazelluläre Spiegel der miR-122 im HCC-Gewebe vor.^{48,49}

Bisher gehörte zur Diagnostik einer Leberzellschädigung die Bestimmung der Transaminasen ALT und AST im Serum. Dabei spielt vor allem die ALT eine wichtige Rolle, da sie ihre spezifische Aktivität vor allem in der Leber und in der Niere hat.⁹ Da sie jedoch auch in anderen Geweben exprimiert wird, kann es zum Beispiel auch bei extrahepatischen Vorgängen wie einer Skelettmuskelschädigung zu einer Erhöhung der ALT kommen.^{50,51} Man kann bei einer ALT-Erhöhung also nicht sicher davon ausgehen, dass eine Leberzellschädigung die Ursache dafür ist, sondern es könnten auch andere Gewebe in denen die ALT ihre spezifische Aktivität aufweist dafür ursächlich sein, wie z.B das Herz oder die Lunge. Aus diesem Grund wäre ein zuverlässigerer und Leber-spezifischer Biomarker wichtig, um sicher und frühzeitig das betroffene Gewebe zu detektieren. In der Studie von Zhang et al.⁵¹ wurden die miR-122 und die ALT bei unterschiedlichen Leberschädigungen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die miR-122 sensitiver ist, dass sie also bereits einen geringen Leberschaden detektieren kann, bei dem die ALT noch normwertig oder nur geringfügig erhöht ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die miR-122 spezifischer ist als die ALT, da sie im Falle einer Skelettmuskelschädigung im Gegensatz zur ALT keine signifikante Veränderung zeigte.

Da bereits gezeigt wurde, dass extrazellulär zirkulierende microRNAs als Biomarker dienen könnten, sollte nun untersucht werden, ob die miR-122 im Falle

einer Hepatitis-C-Virus-Infektion als Marker für das Therapieansprechen dienen kann. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob im Falle des Abfalls des miR-122-Spiegels im Laufe der Therapie, diese microRNA als prognostischer Marker für ein Therapieansprechen genutzt werden kann. Diese Themen gilt es in der folgenden Arbeit näher zu betrachten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Firma
ABsolute QPCR ROX Mix	Thermo Scientific (Waltham, USA)

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

2.1.2 Kits

Bezeichnung	Hersteller
miRNeasy Mini [®] Kit (50)	Qiagen (Hilden)
TaqMan [®] MicroRNA Assay	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
TaqMan [®] MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)

2.1.3 Gebrauchswaren

Bezeichnung	Hersteller
ABsolute qPCR Seal Folie	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Multiply (96-Well) PCR Plate Natural	Sarstedt (Nümbrecht)
Multiply [®] - μ Strip 8er-Deckelketten	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen	Starlab (Ahrensburg)
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Thermo-Fast [®] 96 PCR Plate, weiß	Thermo Scientific (Waltham, USA)

2.1.4 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Pipetten	Gilson (Middleton, USA)
StepOnePlus.Real-Time PCR System	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Ultrazentrifuge L8-M	Beckman (Krefeld)
Veriti®96-Well Thermal Cycler	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
Vortex Mixer IKA - MS3	Agilent Technologies (Böblingen)

2.1.5 Software

Bezeichnung	Hersteller
BiAS software für Windows, Version 9.07	Epsilon publishing (Hochheim-Darmstadt)

2.2 Methoden

2.2.1 Patientenauswahl

Es wurden 60 Patienten aus der INDIV-2 Studie⁵², einer zwischen 2005 und 2010 durchgeführten, prospektiv kontrollierten Multicenterstudie, ausgesucht. Dabei handelte es sich um Patienten mit einer chronischen Hepatitis-C-Virus-Infektion des Genotyps 1, die mit pegyliertem Interferon-alfa und Ribavirin (PEG-IFN-alfa/RBV) behandelt wurden. Als weitere Einschlusskriterien für die INDIV-Studie galten das Alter zwischen 18 und 70 Jahren, Thrombozytenwerte > 80.000/ μ l, Kreatininkonzentration im Serum < 1,5 mg/dL, keine Hepatitis-B- Virus- oder HIV-Koinfektion, sowie keinen exzessiven Alkoholkonsum (Frauen < 40 g/Tag, Männer < 60 g/Tag).

Unter den 60 ausgesuchten Patienten waren 20, die ein langanhaltendes Ansprechen auf die Therapie (SVR = sustained virological response) aufwiesen,

20 die nicht auf die Therapie ansprachen (NR = non-response) und 20 Patienten, die nach anfänglichem Ansprechen wieder einen Rückfall der Erkrankung erlitten (Relapse). Die Auswahl der Patienten innerhalb dieser drei Gruppen entsprach dem Zufallsprinzip.

Die Studie wurde von der Ethikkommission zugelassen und die schriftliche Einverständniserklärung der Patienten liegt vor.

2.2.2 Blutproben

Im Rahmen der INDIV-2-Studie⁵² wurden Blutproben bei den Patienten vor Therapiebeginn (baseline), 4, 12 und 24 Wochen nach Beginn der PEG-IFN-alfa/RBV- Therapie, am Ende der Therapie (EOT = End of treatment) und 4, 12 oder 24 Wochen nach Ende der Therapie (FU = follow up) gesammelt.

Die Blutproben wurden aufbereitet und der Überstand, das sogenannte Patientenserum, wurde bei -80 °C bis zur Benutzung gelagert.

2.2.3 Klinische Laborwerte und HCV-Viruslast

Die Standardparameter der klinischen Laborwerte und die HCV-Viruslast wurden jeweils zu den oben genannten Zeitpunkten im Rahmen der INDIV-2-Studie mitbestimmt.⁵²

2.2.4 RNA-Isolation aus Serum

Die RNA-Isolation wurde mit Hilfe des *miRNeasy Mini Kit* von Qiagen durchgeführt.

Dabei wurden zu 200 µl Patientenserum 750 µl QIAzol (aus *miRNeasy Mini Kit*) hinzugefügt, mit dem Vortex gemischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

200 µl Chloroform wurden hinzugefügt, nochmals mittels Vortex gemischt und für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Als nächstes erfolgt die Zentrifugation bei 12.000 *g* und 4 °C für 15 Minuten.

Die dabei entstehende obere wässrige Phase wurde abgenommen (circa 600 µl) und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt.

1,5 Volumen Ethanol (900 µl) wurden hinzugefügt, durch Pipettieren gemischt und anschließend auf eine RNeasy Mini Spin Säule (aus *miRNeasy Mini Kit*) aufgetragen.

Die Säulen wurden bei 13.000 *g* bei 20-25°C für 30 Sekunden zentrifugiert. Die Flüssigkeit in dem Eppendorfgefäß wurde verworfen und die Säule gewaschen, indem 700 µl RWT-Puffer (aus *miRNeasy Mini Kit*) aufgetragen und anschließend bei 13.000 *g* bei 20-25 °C für eine Minute zentrifugiert wurde. Der wässrige Anteil wurde jeweils verworfen.

Weiteres Waschen erfolgte durch zweimaliges Auftragen von 500 µl des RPE-Puffers (aus *miRNeasy Mini Kit*) nach der jeweils die Zentrifugation bei 13.000 *g* bei 20-25 °C für eine Minute erfolgte.

Die Säule wurde dann auf ein anderes 2 ml Eppendorfgefäß gesetzt und nochmals bei 13.000 *g* bei 20-25 °C für eine Minute zentrifugiert.

Die Gefäße wurden für eine Minute offenstehen gelassen und anschließend wurde die Säule auf ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gesetzt.

Zur Eluation der RNA wurden 30 µl RNase-freies Wasser (aus *miRNeasy Mini Kit*) zentral auf die Membran der Säule platziert und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 13.000 *g* bei Raumtemperatur für eine Minute.

Die isolierte RNA wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

2.2.5 Relative Quantifizierung der microRNA mittels Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

2.2.5.1 Reverse Transkription

Um eine relative Menge der microRNA in der Probe bestimmen zu können, muss zuerst eine reverse Transkription erfolgen, bei der die microRNA in einen

komplementären cDNA-Strang umgeschrieben wird. Dazu wurden *TaqMan®MicroRNA Assays* verwendet. Dabei binden microRNA-spezifische stem-loop Primer an die zu untersuchende reife microRNA, die dann von der Reversen Transkriptase verlängert wird.^{53,54} Der somit entstehende, zur microRNA komplementäre cDNA-Strang, ist durch die stem-loops deutlich länger und bietet somit genug Bindungsstellen für die Primer und die Sonde im nächsten Schritt, der Real-Time-PCR.

Für die reverse Transkription musste zunächst ein Master-Mix erstellt werden. Dafür wurde für jede zu untersuchender Probe folgende Substanzen aus dem *TaqMan®MicroRNA Assay* in ein auf Eis stehendes 1,5 ml Eppendorfgefäß gemischt:

	Verwendete Agenzien	Menge
1.	RNase-freies Wasser	6,41 µl
2.	10x RT Puffer	1,5 µl
3	dNTP mix (100 mM total) (Mischung aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,15 µl
4	RNase Inhibitor (20 U/µl)	0,19 µl
5.	Multiscribe™ RT-Enzym (50 U/µl)	1 µl

Total: 9,25 µl
+ 0,75 µl (20x RT-Primer
(microRNA-spezifisch))

Tabelle 1: Master-Mix-Ansatz für Reverse Transkription

Da sowohl die miR-16 als auch die miR-122 untersucht werden sollten, wurde der Master-Mix zweimal (also jeweils mit dem spezifischen RT-Primer) erstellt.

Auf eine *96 well Multiply PCR plate natural (Sarstedt Nümbrecht)* wurde dann jeweils 5 µl der isolierten RNA mit 10 µl des jeweiligen Master-Mixes gemischt, mit *Multiply®-µStrip 8er-Deckelketten (Sarstedt (Nümbrecht))* verschlossen und kurz in der Ultrazentrifuge zentrifugiert.

Anschließend erfolgte die Inkubation im PCR-Cycler für 30 Minuten bei 16°C, für 30 Minuten bei 42°C und für fünf Minuten bei 85°C. Bis zum weiteren Gebrauch wurden die Proben auf 4°C abgekühlt und bei dieser Temperatur gelagert.

2.2.5.2 Real-Time PCR

Für die Real-Time PCR wurden erneut zwei Master-Mix-Ansätze erstellt (jeweils für die miR-16 und miR-122). Dabei wurde die doppelte Probenzahl berechnet, da jede cDNA jeweils zweimal mit dem jeweiligen Master-Mix vermischt wird um durch den Mittelwert der beiden Proben ein signifikanteres Ergebnis zu erhalten.

Folgende Substanzen wurden hierfür in ein auf Eis stehendes 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben:

	Verwendete Agenzien	Menge
1.	Absolute QPCR ROX Mix (<i>Thermo Scientific</i>)	7,5 µl
2.	RNase-freies Wasser	3,75 µl
3	20-fache TM-Sonde (jeweils spezifisch für miR-16 oder miR-122) (<i>TaqManTMMicroRNA Assay</i>)	0,75 µl

Total: 12 µl

Tabelle 2: Master-Mix-Ansatz für Real-Time PCR

Anschließend wurden jeweils 3 µl der cDNA mit 12 µl des Master-Mixes auf eine *Thermo Fast 96 PCR Plate (Thermo Scientific)* aufgetragen und mit einer *Absolute QPCR Seal (Thermo Scientific)* verschlossen.

Nach kurzem Zentrifugieren mittels Ultrazentrifuge erfolgte die Real-Time PCR auf einem *StepOneTMPlus Real-Time PCR System*.

Dabei wurde die hitzestabile Taq-Polymerase durch Erhitzen der Proben für zwei Minuten auf 50°C und weitere 15 Minuten auf 95°C aktiviert. Anschließend

erfolgten 40 Zyklen bei denen jeweils die Denaturierung bei 95°C für 15 Sekunden erfolgte und die anschließende Polymerisation bei 60°C für eine Minute.

Bei der Denaturierung werden die beiden cDNA-Doppelstränge getrennt damit sich anschließend bei der Abkühlung die beiden Primer (ein forward und ein reverse Primer) anlagern können und die Taq-Polymerase den komplementären Strang synthetisieren kann.^{53,55}

Außer den zwei Primern befindet sich noch eine Sonde in dem Master-Mix, welche aus einem Oligonukleotid besteht und komplementär zu einem cDNA-Abschnitt zwischen den zwei Primern ist. Das 5'-Ende der Sonde ist mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff markiert, während sich am 3'-Ende ein Quencher-Farbstoff befindet. Durch die räumliche Nähe der beiden Farbstoffe wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes durch einen Fluoreszenz-Energie-Transfer (FET) unterdrückt. Erst nach der Synthese des komplementären Stranges kann durch die Exonuclease-Aktivität der Taq-Polymerase der Reporter vom Quencher getrennt werden. Durch die räumliche Trennung kommt es zur Fluoreszenzentwicklung, die gemessen werden kann.⁵⁶

Der gemessene C_T -Wert (Threshold Cycle) gibt die Zyklenzahl an, bei der die Reporter-Fluoreszenz einen vorher festgelegten Schwellenwert überschreitet. Aus diesem kann man die relative cDNA-Menge berechnen. Je kleiner der C_T -Wert ist, desto mehr cDNA war in der zu untersuchenden Probe.

2.2.6 Statistik

Für alle statistischen Auswertungen wurde das Programm BiAS für Windows (Version 9.07, Epsilon-Verlag, Hochheim-Darmstadt, Deutschland) genutzt. Korrelationskoeffizienten wurden mit der Rang-Korrelation nach Spearman berechnet. Für Gruppenvergleiche wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test und der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Für die Subanalyse eines signifikanten Kruskal-Wallis Test wurde die Bonferroni Korrektur angewandt. P Werte < 0.05 wurden als signifikant gewertet. Bei den Boxplot-Darstellungen sind Median (mittlere horizontale Linie), 1. und 3. Quartil (Begrenzungen der Box), sowie die

Spannweite (vertikale Linie) und die Einzelwerte (Punkte) gezeigt. Die Abbildungen 2-6 wurden mit dem Programm GraphPad Prism (Version 10) erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Baseline-Charakteristika der Patienten

Insgesamt wurden 60 Patienten aus drei verschiedenen Patientenkollektiven untersucht, um eine signifikante Aussage bezüglich der Unterschiede im miR-122-Verlauf während der Therapie treffen zu können. Die Therapie erfolgte laut aktueller Leitlinie zum Zeitpunkt der Studiendurchführung mittels pegyliertem Interferon alpha und Ribavirin.

Tabelle 3 zeigt eine Übersicht der epidemiologischen sowie laborchemischen Daten der drei verschiedenen Patientenkollektive. Diese umfassen Patienten mit einem dauerhaften Therapieansprechen (SVR), Patienten mit einem initialen Ansprechen und späteren Rezidiv (Relapse) sowie Patienten, welche nicht auf die Therapie ansprachen (Non-Responder), jeweils vor Beginn der Therapie (Baseline). Dargestellt sind dabei die Mittelwerte, die Standardabweichungen sowie die p -Werte, die mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt wurden. Aus epidemiologischer Sicht kann man sagen, dass es keinen signifikanten Unterschied bezüglich Alter oder Geschlecht der Patienten zwischen den einzelnen Patientengruppen gibt.

Bei den ermittelten Laborwerten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf ALT, AST sowie der HCV-RNA zwischen den SVR-Patienten, den Non-Respondern sowie den Relapse-Patienten. Lediglich die GGT-Werte wiesen einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen auf. So waren die GGT-Werte in der SVR-Gruppe deutlich niedriger als in den anderen beiden Gruppen ($p = 0,002$).

Des Weiteren fiel auf, dass die Mittelwerte und die Standardabweichung bezüglich der HCV-RNA bei den Patienten mit SVR niedriger waren als bei den restlichen Gruppen. Statistisch war dieser Unterschied jedoch nicht signifikant.

Bei den durchgeführten histologischen Untersuchungen wurden die Entzündungsaktivität (Grading) der Leber sowie der Fibrosegrad (Staging) bestimmt. Dabei wird das Grading in den Stadien 0 = keine Entzündungsaktivität bis 4 = schwere Entzündungsaktivität angegeben). Das Staging wird in den

Stadien 0 = keine Fibrose bis 4 = Zirrhose angegeben. Statistisch zeigte sich kein Anhalt für einen signifikanten Unterschied des Fibrosegrades der Leber (Staging), jedoch eine positive Korrelation des Gratings in den unterschiedlichen Gruppen ($p = 0,01$). So wiesen die Patienten mit SVR im Schnitt eine geringere Entzündungsaktivität auf.

Parameter	SVR ¹	Relapse	NR ²	P
Epidemiologie				
Patienten	20	20	20	
Alter (in Jahren), MW ³ , SD ⁴	40,2±9,2	46,9±11,1	45,2±11,9	0,114
Geschlecht, m/w (%)	12/8 (60/40)	11/9 (55/45)	12/8 (60/40)	0,935
Laborwerte				
ALT ⁵ (IU/L), MW, SD	70,7±46,5	65,2±21,8	72,1±27,1	0,516
AST ⁶ (IU/L), MW, SD	44,1±18,9	48,6±19,0	56,8±27,2	0,176
GGT ⁷ (IU/L), MW, SD	39,5±33,7	90,6±175,9	103,6±59,8	0,002
HCV-RNA (IU/mL), MW, SD	759.410± 972.468	1.075.975± 1.897.009	1.208.351± 4.637.404	0,106
Histologie				
Grading, MW, SD	1,14±0,69	2,3±0,82	2±0,71	0,010
Staging, MW, SD	1,75±1,04	1,9±1,52	2,22±1,09	0,852

¹Sustained virological response = anhaltende virologische Ansprechrate;

²non-response = kein Ansprechen auf die Therapie; ³Mittelwert; ⁴Standardabweichung;

⁵Aspartat-Aminotransferase; ⁶Alanin-Aminotransferase; ⁷γ-Glutamyltransferase

Tabelle 3: Patientencharakteristika zum Beginn der Therapie

3.2 Laborparameter und miR-122-Werte vor Therapiebeginn

Um die Hypothese zu verifizieren, dass sich die miR-122-Konzentration im Blut im Verlauf der Therapie verändert, wurden die Serumproben der Patienten aus den verschiedenen Patientenkollektiven zu unterschiedlichen Therapiezeitpunkten untersucht.

Zunächst wurden die miR-122 Serumspiegel mit Laborparametern zum Zeitpunkt der Baseline miteinander verglichen. Dabei wurden als zu vergleichende Parameter die Alanin-Aminotransferase (ALT), die Aspartat-Aminotransferase (AST), die Gamma-Glutamyltransferase (GGT) sowie die HCV-RNA gewählt. Diese Laborparameter gehören zu den seit langem etablierten und standardmäßigen Werten zur Überwachung einer Leberschädigung bzw. einer Hepatitis-C-Virusinfektion. Die Werte wurden mit den ermittelten C_T -miR-122-Werten aller Patienten korreliert. Dabei zeigte sich, dass es vor allem eine signifikante Korrelation zwischen den miR-122-Werten und der ALT gab ($r = -0,412$, $p = 0,002$). Ebenso bestand eine signifikante negative Korrelation zwischen den C_T -miR-122- und den AST-Werten sowie den GGT-Werten. Je niedriger jeweils die Laborparameter waren, desto höher waren die ermittelten C_T -miR-122-Werte, d.h. desto geringer war die relative Menge der miR-122 welche in den Patientenseren bestimmt wurde. Keine Korrelation ließ sich hingegen zwischen der gemessenen HCV-RNA und den Serum-miR-122-Spiegeln nachweisen ($r = -0,164$, $p = 0,208$).

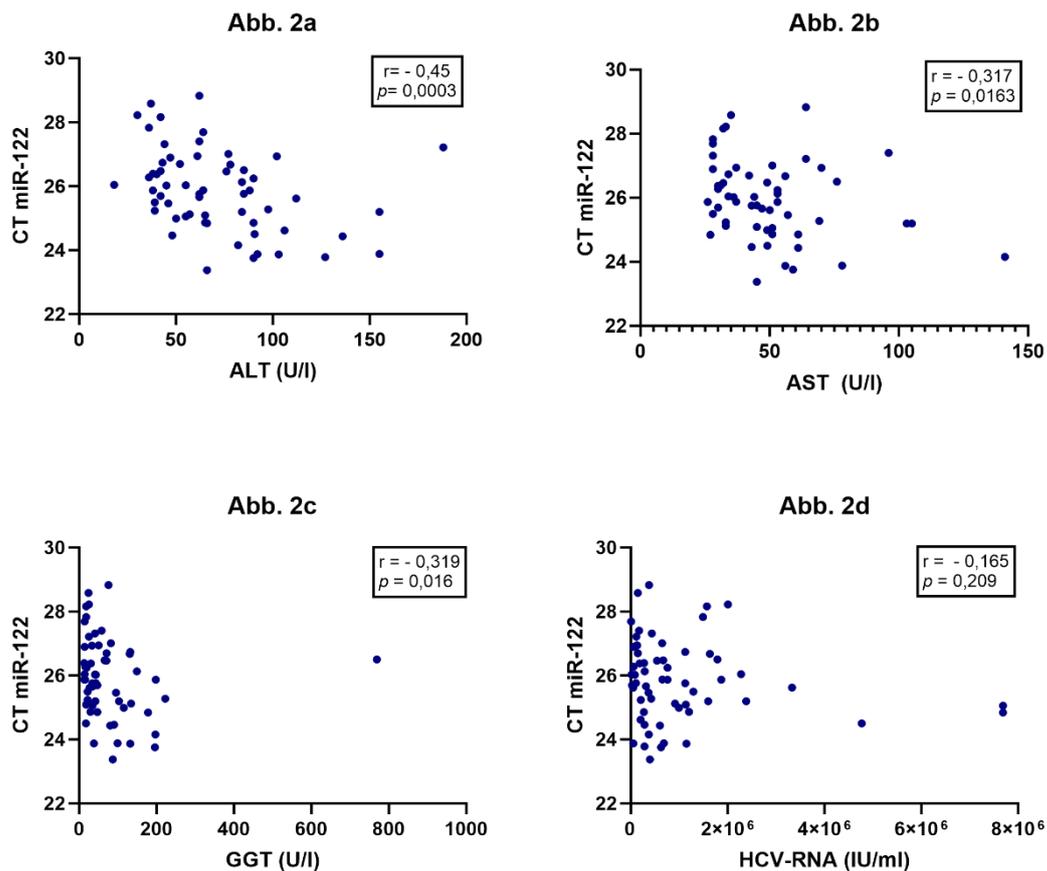


Abb.2: Korrelation zwischen miR-122-Werten und den Transaminasen bzw. der HCV-RNA zur Baseline (vor Beginn der antiretroviralen Therapie). ALT, Alanin-Aminotransferase (a); AST, Aspartat-Aminotransferase (b); GGT, Gamma-Glutamyltransferase (c); Hepatitis-C-Virus-Ribonukleinsäure (d).

Des Weiteren wurden die miR-122 Serumspiegel in den drei verschiedenen Patientengruppen (SVR, Relapse, NR) vor Beginn der Therapie mittels Kruskal-Wallis-Tests miteinander verglichen. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden ($p = 0,421$).

3.3 Überblick über den Therapieverlauf

3.3.1 Verlauf der Serum-miR-122-Spiegel im Laufe der Therapie

Nach der Bestimmung der Ausgangswerte wurden 4 Wochen, 12 Wochen und 24 Wochen nach Therapiebeginn, am Ende der Therapie (EOT = end of treatment) und zum Zeitpunkt der Kontrolluntersuchung (Follow-Up), das heißt 12 oder 24 Wochen nach Therapieende, Blutproben entnommen. Aus den Blutseren wurden unter anderem die miR-122-Spiegel sowie die miR-16-Spiegel bestimmt. Die ubiquitär exprimierte miR-16 wurde als Vergleichs-miRNA gewählt, weil deren extrazellulär im Blut zirkulierenden Spiegel häufig auch unter pathologischen Bedingungen konstant bleiben.^{19,37} Somit können wir eine leberspezifische mit einer nicht leberspezifischen microRNA miteinander vergleichen. Damit dieser Vergleich des Verlaufes während der Therapie übersichtlicher ist, wurden alle Laborparameter auf den Baseline-Wert normalisiert und dieser gleich 1 gesetzt. Um die relative Menge der microRNA darstellen zu können, wurde die d-Ct-Methode zu Hilfe genommen. Dabei konnte man, ausgehend von der Annahme, dass sich die DNA-Menge pro Zyklus verdoppelt, folgende Formel verwenden: $2^{-(\text{Ct-Wert} - \text{Ct-Baselinerwert})}$.

In Abbildung 3 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt. Dabei sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der microRNAs aller drei Patientengruppen im Laufe der Therapie aufgeführt. Betrachtet man zunächst den Verlauf der miR-122 während der Therapie (Abb. 3a), so kann man feststellen, dass 4 Wochen nach Therapiebeginn alle drei Patientengruppen zunächst einen Abfall der miR-122 im Serum aufwiesen. Dabei zeigte sich ein signifikant stärkerer Abfall der miR-122-Werte in der Gruppe der SVR (Abb. 4a) im Vergleich zu der Gruppe der Non-Responder ($p < 0,001$). Dies konnte man auch in der Therapiewoche 12 nachweisen (Abb. 4b; $p < 0,003$).

Die Gruppe der Relapse-Patienten zeigte in Therapiewoche 4 ebenfalls einen signifikanten Unterschied zu der Gruppe der Non-Responder (Abb. 4a; $p < 0,008$). Der Unterschied in Therapiewoche 12 war jedoch nicht mehr signifikant (Abb. 4b). Lediglich im Vergleich zwischen der SVR- und der Relapse-Gruppe konnte weder in Therapiewoche 4 noch in der Therapiewoche 12 ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Wenn man dagegen den Verlauf der miR-16 unter Therapie betrachtet (Abb. 3b), kann man feststellen, dass die Konzentration der microRNA in allen drei Patientengruppen und während der gesamten Beobachtungszeit relativ konstant blieb.

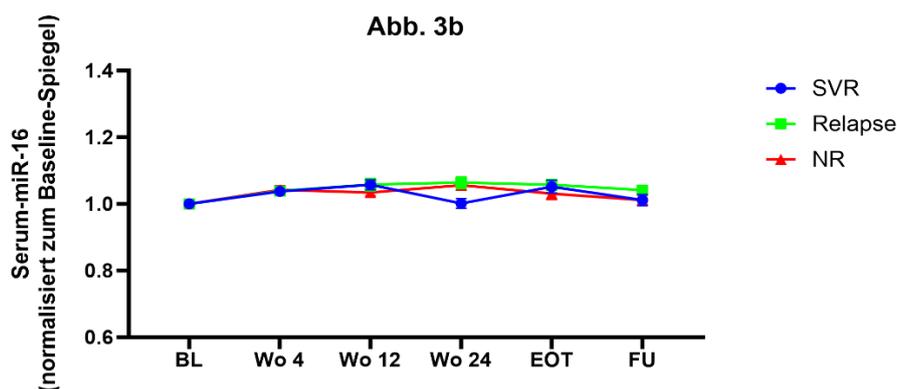
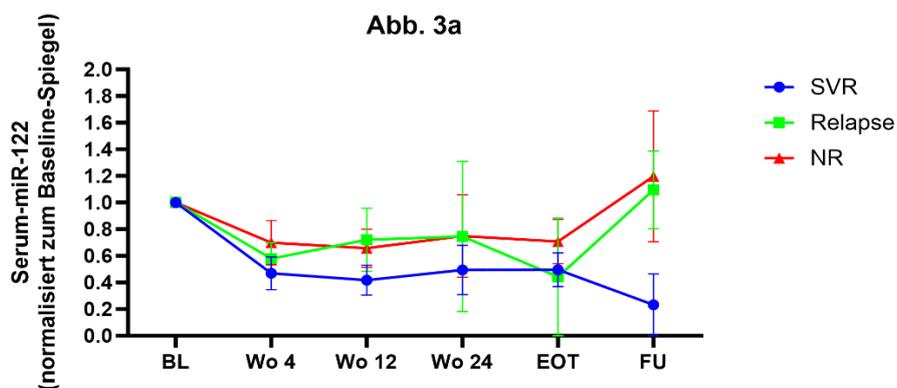


Abb. 3: Zeitverlauf der Serum miR-122-Spiegel **(a)** und der Serum miR-16-Spiegel **(b)** normalisiert auf die jeweiligen Baseline-Spiegel bei den Patienten mit Therapieansprechen (SVR = sustained virological response), Patienten ohne Therapieansprechen (NR = non-response) und Patienten mit einem Rezidiv (relapse). Die Daten zeigen die Mittelwerte und die Standardabweichungen von 20 Patienten pro Gruppe zur Baseline (BL), nach 4 Wochen (Wo 4), 12 Wochen (Wo 12) und 24 Wochen (Wo) Therapie sowie am Ende der Therapie (EOT = end of treatment) und zur Kontrolluntersuchung (FU = follow up).

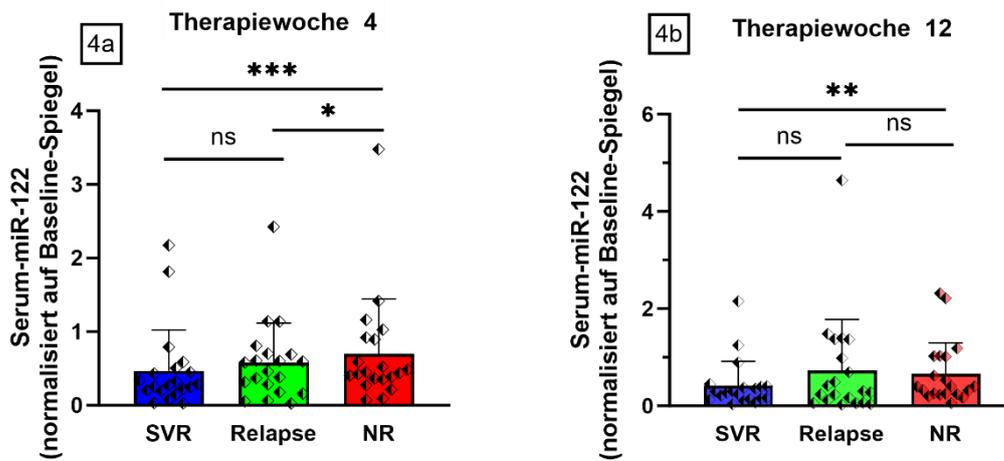


Abb. 4: Auf die Baseline normalisierte Serumwerte der miR-122 4 Wochen **(a)** und 12 Wochen **(b)** nach Beginn der antiretroviralen Therapie. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den Einzelwerten sowie die Standardabweichungen. Mittels Wilcoxon-Mann Whitney Test wurden die Korrelationen zwischen den Gruppen ermittelt. Die Sternchen geben die Signifikanz der Unterschiede an.

* $P < 0,008$, ** $P < 0,003$, *** $P < 0,001$, ns = nicht signifikant

3.3.2 Verlauf der Serum-miR-122-Spiegel während der Therapie im Vergleich zu anderen Laborparametern

Es konnte gezeigt werden, dass die miR-122-Spiegel sich im Laufe der Therapie verändern und dass es signifikante Unterschiede zwischen den Patientenkollektiven gibt. Nun bleibt jedoch die Frage, ob man die miR-122 als neuen diagnostischen Marker zur Prognose für das Therapieansprechen verwenden kann.

Dazu wurde ein Vergleich zwischen dem Verlauf der miR-122 Spiegel und den Laborparametern durchgeführt, welche bereits etablierte Parameter zur Überwachung des Therapieverlaufes sind, d.h. ALT und HCV-RNA.

In Abbildung 5 sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung der miR-122, der ALT sowie der HCV-RNA in allen drei Patientengruppen dargestellt. Hierbei wurden wiederum alle Werte auf die Baseline normalisiert und gleich eingesetzt. In allen drei Patientengruppen ist erkennbar, dass sich der Verlauf aller drei gemessenen Werte ähnlich verhielt.

So zeigte die Gruppe der SVR (Abb. 5a) einen raschen Abfall aller drei Werte und blieb selbst nach der Therapie unterhalb der Ausgangswerte. Die HCV-RNA war dabei teilweise nicht mehr nachweisbar.

Auch in der Gruppe der Relapse-Patienten (Abb. 5b) kam es zunächst zu einem Abfall der HCV-RNA, der ALT und der miR-122-Spiegel. Am Ende der Therapie lagen auch hier die Werte unterhalb der Ausgangswerte vor Therapiebeginn. In dieser Gruppe stiegen die gemessenen Werte nach Beenden der Therapie wieder an und waren in der Kontrolluntersuchung annähernd so hoch wie die Ausgangswerte.

In der Gruppe der Non-Responder (Abb. 5c) hatten die drei Werte einen annähernd ähnlichen Verlauf, jedoch zeigte sich hier kein wesentlicher Abfall weder der beiden Laborparameter HCV-RNA und ALT noch des Serum-miR-122-Spiegels.

Man konnte sehen, dass der Verlauf der miR-122 und der ALT in allen drei Patientengruppen annähernd gleich war.

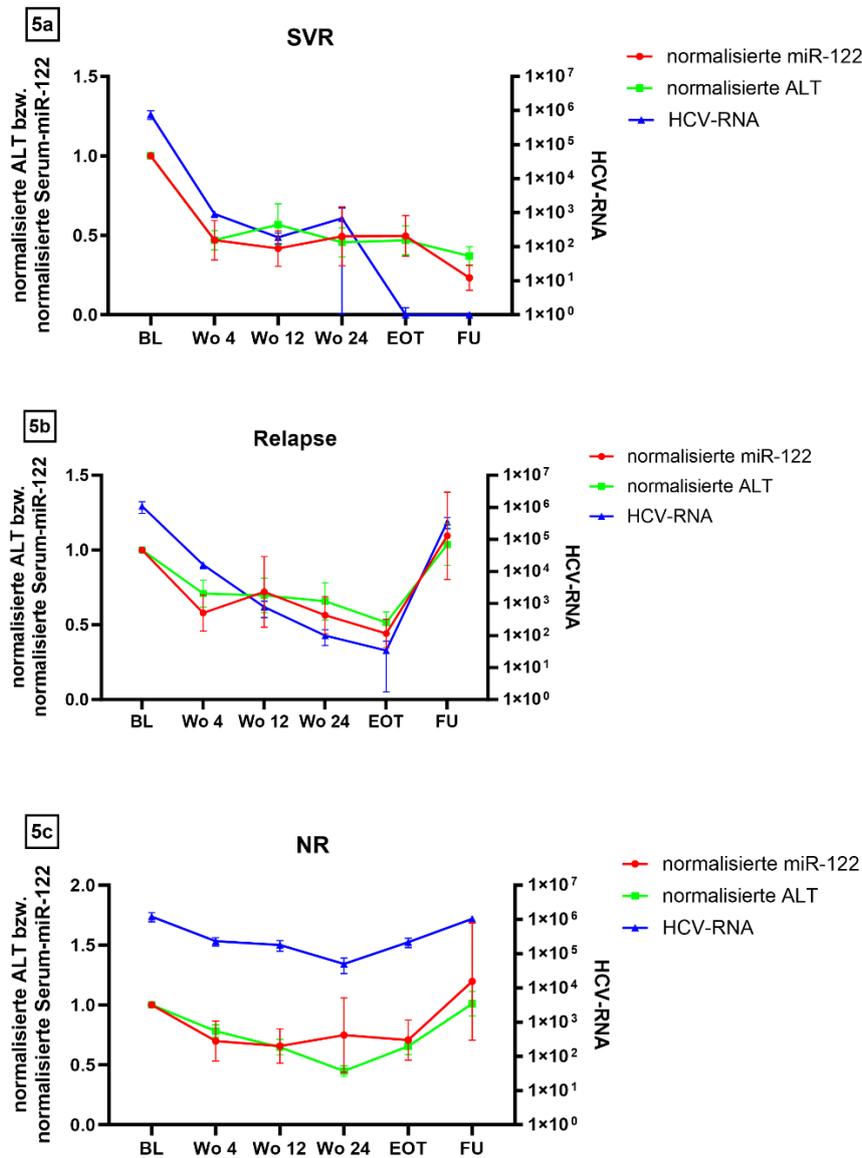


Abb. 5: Der zeitliche Verlauf der miR-122-Werte (zur Baseline normalisiert), der Alanin-Aminotransferase (ALT) Werte (normalisiert zu den Baseline-Werten) sowie der Hepatitis-C-Virus (HCV)-RNA bei Patienten mit **(a)** einem anhaltenden Therapieansprechen (SVR), **(b)** einem Rezidiv (Relapse) und **(c)** einem Nichtansprechen auf die Antiretrovirale Therapie. Die Daten sind die Mittelwerte mit der \pm Standardabweichung von 20 Patienten je Gruppe zum Ausgangszeitpunkt (Baseline, BL), 4 Wochen (Wo 4), 12 Wochen (Wo 12) und Woche 24 (Wo 24) nach Beginn der Therapie mit pegyliertem Interferon und Ribavirin, am Ende der Therapie (End-of-treatment, EOT) und zur späteren Kontrolle (follow-up, FU).

3.4 Vergleich der miR-122-Spiegel in den drei Patientengruppen kurz nach Therapiebeginn und nach Therapieende

Als nächstes wurde der Verlauf der Parameter während der initialen Therapie sowie zum Zeitpunkt der follow-up Kontrolluntersuchung eingehend analysiert. Falls die microRNA als Biomarker bezüglich des Therapieansprechens genutzt werden soll, müsste sich bereits früh nach Therapiebeginn ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen zeigen.

In Abschnitt 3.2 wurde bereits gezeigt, dass es vor dem Therapiebeginn keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen gab. Wenn man die Serum-miR-122-Spiegel 4 Wochen nach Therapiebeginn betrachtet, so ist in Abbildung 5a bereits feststellbar, dass es in allen drei Patientengruppen zu einem Abfall der Werte gekommen war. Dieser Abfall der Serum-miR-122-Konzentration nach 4-wöchiger Therapie in den verschiedenen Patientengruppen ist im Boxplot-Diagramm (Abb. 6a) dargestellt. Es ist ersichtlich, dass Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen vorhanden waren. So waren die Werte in der Gruppe der SVR-Patienten signifikant niedriger als in der Gruppe der Non-Responder ($p < 0,001$). Auch die Patienten in der Relapse-Gruppe wiesen signifikant niedrigere Serum-miR-122-Spiegel auf als diejenigen in der Non-Responder-Gruppe ($p < 0,05$). Jedoch war der Unterschied zwischen der Responder- und der Relapse-Gruppe in der Therapiewoche 4 nicht signifikant ($p = 0,18$).

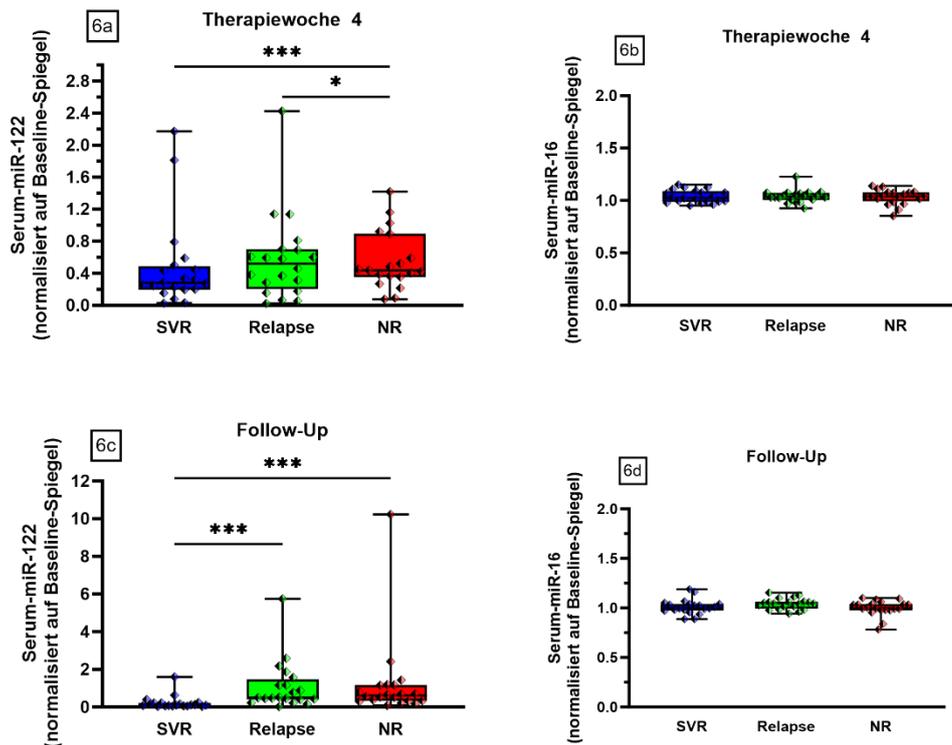


Abb. 6: Serumwerte der miR-122 (a, c) und der miR-16 (b, d) 4 Wochen nach Beginn der antiretroviralen Therapie (a, b) und zum Zeitpunkt des follow-up (c, d) normalisiert auf die Baseline-Werte bei Patienten mit Therapieansprechen (SVR), Patienten mit Rezidiv (Relapse) und bei Patienten ohne Therapieansprechen (NR). Die Sternchen geben die Signifikanz der Unterschiede an.

* $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.

Betrachtet man die normalisierten Serum-miR-122-Spiegel der drei Patientengruppen zum Zeitpunkt der Kontrolluntersuchung, das heißt 12 bzw. 24 Wochen nach Beenden der Therapie, so sieht man erneut Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 6c). Die miR-122-Werte in der SVR-Gruppe waren sowohl im Vergleich zur Relapse-Gruppe als auch zur Non-Responder-Gruppe signifikant niedriger ($p < 0,001$). Dies war bereits in Abbildung 3a erkennbar. Dort zeigte lediglich die Gruppe der SVR niedrigere miR-122-Spiegel im Rahmen der Kontrolluntersuchung als die gemessenen Spiegel am Ende der Therapie. Die beiden anderen Gruppen wiesen annähernd gleich hohe miR-122 Werte wie vor Therapiebeginn auf.

Im Boxplot-Diagramm sind auch die miR-16-Spiegel im Serum der drei Patientengruppen vier Wochen nach Therapiebeginn (6b) und zum Zeitpunkt der Kontrolluntersuchung (6d) dargestellt. Wie bereits in Abbildung 3b gezeigt, kann man auch hier erkennen, dass die miR-16-Werte im Laufe der Therapie keinen signifikanten Veränderungen unterliegen. Die für die miR-122 gefundenen Unterschiede waren also spezifisch für miR-122.

4 Diskussion

Weltweit steckten sich allein im Jahr 2015 mehr als 1,75 Millionen Menschen an einem Hepatitis-C-Virus an.⁶ Lediglich bei einem Teil der Infizierten konnte das Virus im Rahmen einer akuten Hepatitis-C-Infektion mittels körpereigener Immunabwehr eliminiert werden. Generell geht man davon aus, dass es bei ca. 50 – 80 % der Betroffenen zur Entwicklung einer chronischen Hepatitis-C-Infektion kommt, mit einem Virusnachweis über 6 Monate hinaus. Als Komplikationen können sich eine potenziell tödlich verlaufende Leberzirrhose sowie ein Hepatozelluläres Karzinom entwickeln. 2015 wurde die Zahl der Menschen mit einer chronischen Hepatitis-C-Infektion auf 71 Millionen geschätzt.⁶

Aufgrund dieser hohen Prävalenz und der schwerwiegenden Folgeerkrankungen setzte sich die WHO das Ziel die Virushepatitiden im Rahmen des *“Global Health Sector Strategy on viral hepatitis”* bis zum Jahre 2030 zu eliminieren.⁶ Das Ziel soll, neben einem erhöhten Fokus auf die Prävention, durch eine frühe Diagnose sowie eine adäquate und effektive Therapie erreicht werden. Dank dieser Verbesserung zeigte sich ein Rückgang der Prävalenz, die im Jahr 2019 laut WHO bei 58 Millionen Menschen lag, was jedoch weiterhin hoch ist.⁵⁷ Durch die Entwicklung der neuen Direkten Antiviralen Agenzien (DAA) konnte eine deutlich bessere Heilungsrate teilweise unabhängig vom zu Grunde liegenden Genotyp erzielt werden. Dennoch wird in weiten Teilen der Welt, weiterhin die Kombinationstherapie aus pegyliertem Interferon und Ribavirin verwendet.¹⁷ Während das letztere Therapieregime je nach HCV-Genotyp nur eine relativ niedrige Ansprechrate (40 - 80 %¹) aufwies, bewirken eine Kombinationstherapie der neuen Direkten Antiviralen Agenzien (DAA) ein Therapieansprechen von > 90 %¹⁴. In beiden Fällen ist es sinnvoll einen geeigneten Biomarker zu finden, der den Therapieerfolg anzeigt und im besten Fall auch vorher prognostizieren kann.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine microRNA und in diesem Fall die leberspezifische miR-122 als ein solcher Biomarker in Frage kommt.

4.1 Untersuchung der Baseline-Charakteristika der Patienten

Die in unserer Studie untersuchten Patienten wurden anhand ihres Therapieansprechens mit pegyliertem Interferon Alpha/Ribavirin in drei unterschiedliche Gruppen aufgeteilt. Diese drei Gruppen waren Patienten mit einem anhaltenden Therapieansprechen (SVR), einem initialen Therapieansprechen und späteren Rezidiv (Relapse), sowie Patienten ohne Therapieansprechen (Non-Responder = NR).

Zunächst erfolgte der Vergleich zwischen den unterschiedlichen Patientenkollektiven bezüglich der Mittelwerte unterschiedlicher Laborparameter vor Beginn der Therapie (siehe Tabelle 3). Dabei konnten wir keine signifikanten Unterschiede bezüglich der konventionellen Laborparametern zur Detektion einer Leberschädigung, der Alanin-Aminotransferase (ALT) und der Aspartat-Aminotransferase (AST), erkennen. Es zeigten sich lediglich signifikant niedrigere Gamma-Glutamyl-Transferase-Werte (GGT) bei den Patienten mit SVR.

Im Gegensatz hierzu fand die Studie von El-Ahwany et al. von 2016⁵⁸ signifikante Unterschiede zwischen der Responder- und der Non-Responder-Gruppe, sowohl bei den ALT als auch bei den AST-Werten.

Eine Ursache für die unterschiedlichen Studienergebnisse könnten die unterschiedlichen HCV-Genotypen der beiden Studien sein. In der Studie von El-Ahwany et al.⁵⁸ wird lediglich im Abstract kurz der Genotyp 4 erwähnt. In der weiteren Studienbeschreibung wird nicht weiter darauf eingegangen, sodass man nicht definitiv sagen kann welchen Genotyp die untersuchten Patienten aufwiesen. Da in Ägypten, dem Land in der die Studie durchgeführt wurde, der Genotyp 4 mit einer Prävalenz von > 90 % vorliegt, ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass die Mehrzahl der Patienten einen HCV-Genotyp 4 hatte.

Ein Hinweis darauf, dass die Genotypen eine Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse darstellen könnten, konnte in der Studie von Fan et al. von 2017⁵⁹ erbracht werden. Dort wurde festgestellt, dass die ALT- und AST-Werte in der Gruppe mit dem Genotyp 1b signifikant höher waren als in der Kontrollgruppe. Bei den Genotypen 2a, 3a und 6a ließ sich keine signifikante Korrelation zur Kontrollgruppe feststellen.

Jedoch müsste sich laut dieser Feststellung ein signifikanter Unterschied bei unserer Studie zeigen, in die lediglich Patienten mit dem Genotyp 1 inkludiert wurden.

Aufgrund dieser heterogenen Ergebnisse kann man sagen, dass die gängigen Laborparameter zum Zeichen einer Leberschädigung nicht als geeignete Biomarker zur Vorhersage des Therapieerfolges geeignet sind.

Auch durch die Bestimmung der HCV-RNA, also die sogenannte Viruslast, konnte unsere Studie keinen signifikanten Unterschied zwischen den SVR, Relapse-Patienten und NR zeigen. Dies stimmt auch mit den Ergebnissen mehrerer Studien überein.^{60,61}

4.2 Laborparameter und miR-122-Werte vor Therapiebeginn/ miR-122 als (diagnostischer und therapeutischer) Biomarker

Um eine HCV-Infektion früher diagnostizieren und besser behandeln zu können, sind zuverlässigere Parameter zur Detektion notwendig, sogenannte Biomarker. In unserer Studie wurde die leberspezifische miR-122 als möglicher Biomarker untersucht.

Seit 1993 von Lee et al.²¹ die erste microRNA beschrieben wurde, gab es zahlreiche Folgestudien, in denen deren Rolle und Funktion näher erforscht und beschrieben wurden.

Es wurde ferner gezeigt, dass die microRNAs auch im Blutplasma in ausreichender Konzentration vorhanden sind und auch eine ausreichende Stabilität aufweisen um als Biomarker dienen zu können.^{19,27}

MicroRNAs werden ubiquitär exprimiert und sind auch extrazellulär in Flüssigkeiten unter anderem Blutplasma, Liquor und Urin nachweisbar.^{22,25,62,63} Verschiedene Zelltypen weisen verschiedene microRNA-Expressionsmuster auf. Jedoch unterscheidet sich das extrazelluläre Spektrum deutlich von dem intrazellulären, und es gibt keine Korrelation zwischen den intra- und den extrazellulären Spiegeln.^{45,64,65} Dabei scheinen die microRNAs nach extrazellulär

transportiert zu werden. Es wurden verschiedene Möglichkeiten des Transportes der microRNA von intra- nach extrazellulär beschrieben. Der genaue Mechanismus ist bisher noch nicht eindeutig nachgewiesen. Im Extrazellulärraum wurden microRNAs in membranumschlossenen Partikeln wie zum Beispiel Exosomen gefunden.⁶⁶ In zahlreichen Studien weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die microRNAs mittels Exosomen nach extrazellulär gelangen und diese Exosomen für einen Transport von microRNAs ins Zielgewebe zuständig sind^{64,67-70} Dabei werden die Exosomen in einem sogenannten multivesicular body gebündelt, welches dann mit der Zellmembran verschmilzt und die Exosomen in den Extrazellulärraum abgibt.⁷¹⁻⁷³

Kosaka et al.⁷⁴ konnten in ihrer Studie noch einen anderen Weg der Sekretion aufweisen. Sie zeigten, dass die exosomalen microRNAs über einen Ceramid-abhängigen Weg nach extrazellulär transportiert werden können. Jedoch sind nur ca. 10 % der extrazellulären microRNA in Vesikel verpackt.^{68,75} Einige microRNAs sind auch an Proteine gebunden, wie zum Beispiel Proteine aus der Argonaute-Protein-Familie (AGO), das HDL oder das NPM1, und gelangen über einen aktiven, ATP-abhängigen, Transport nach extrazellulär.^{64,66,68,69,76} Obwohl einige Studien gezeigt haben, dass HDL als ein Transportprotein für microRNAs dient, spielt vor allem das Ago2 aus der Argonaute-Protein-Familie eine wichtige Rolle bei der Bindung von microRNA.^{68,69,76,77} Der microRNA-Ago2-Komplex spielt dann als Bestandteil des RISC-Komplexes eine entscheidende Rolle in verschiedenen genregulatorischen Prozessen.^{78,79} Die miR-122 ist ebenfalls an das Ago2 gebunden.^{80,81}

Hauptenthal et al.⁸² haben bereits 2006 zeigen können, dass small interfering RNAs (siRNAs) durch Enzyme der RNase A Familie abgebaut werden und eine Stabilität im Serum nur durch RNase A Inhibitoren oder durch Bindung der siRNAs an Transportproteine erreicht werden kann. Auch Köberle et al.⁸³ konnten in ihrer Studie von 2013 zeigen, dass es Unterschiede in der Stabilität der extrazellulär zirkulierenden microRNA gab. Die Vesikel-assoziierten microRNAs wurden kaum durch RNase A abgebaut und waren somit stabiler als nicht Vesikel-assoziierte microRNAs.

Sowohl die Vesikel als auch die microRNA-bindenden Proteine scheinen für die hohe Stabilität der micro-RNAs im Extrazellulärraum verantwortlich zu sein.^{64,68}

In zahlreichen Studien konnte festgestellt werden, dass viele Serum-microRNAs sowohl gegenüber der RNase A als auch gegenüber anderen Störfaktoren, wie zum Beispiel extremer Hitze oder einer langen Lagerung, weitgehend stabil sind und die Expression zwischen den Individuen reproduzierbar ist.²⁷ Auch die Bindung an das Ago2 sorgt für die extrazelluläre Stabilität der microRNA.^{68,81} Es wurde bereits in vielen Studien gezeigt, dass microRNAs bei vielen physiologischen aber auch vor allem bei pathologischen Prozessen eine Rolle spielen und sie als diagnostische Parameter verwendet werden können.⁸⁴⁻⁸⁶ Da das Blutserum/-plasma ein gut zugängliches und wenig invasives Testmedium ist, eignen sich die microRNAs gut als Biomarker.^{42,62,63}

Die miR-122 wird hauptsächlich in der Leber exprimiert und wird somit als leberspezifische microRNA angesehen.²⁹ Um zu überprüfen, ob die miR-122 auch als Biomarker im Rahmen einer HCV-Infektion als klinischer Parameter für das Therapie-Ansprechen geeignet sein könnte, haben wir diese auch vor der Therapie im Patientenserum bestimmt und mit einigen Laborparametern verglichen. So konnte gezeigt werden, dass eine signifikante Korrelation zwischen der miR-122 und der ALT, der AST sowie der GGT besteht (siehe Abb. 2). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die miR-122-Spiegel im Serum ähnlich wie ALT ein Marker für die Schädigung der Hepatozyten sind. Dieser Befund wurde durch etliche weitere Arbeitsgruppen bestätigt.^{18,87-89} Der annähernd gleiche Verlauf der miR-122 und der ALT konnte man graphisch auch in der Abbildung 3 gut sehen.

Butt et al.¹⁸ konnten in ihrer Studie ebenfalls eine signifikante Korrelation zwischen den miR-122 Werten und den oben genannten Laborparametern vor Therapiebeginn zeigen. Sie konnten außerdem zeigen, dass die miR-122 ein weitaus sensibler und spezifischer Parameter im Vergleich zur ALT ist, um Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion von gesunden Patienten zu unterscheiden.

Jiao et al.⁹⁰ postulierten in ihrer Arbeit 2017 sogar, dass die miR-122 ein sensitiverer Biomarker als die ALT und AST wäre, da in ihrer Studie die miR-122 mit einer höheren Effizienz zwischen Patienten mit SVR und NR unterscheiden kann. Auch Su et al.⁹¹ konnten eine positive Korrelation zwischen der miR-122 und der ALT zeigen. Sie vermuteten einen positiven Zusammenhang zwischen

den Serum-miR-122 Werten und der Schwere der Leberschädigung. Dies zeigte bereits 2011 die Studie von Bihrer et al.⁴³ Dort konnte auch eine stärkere Korrelation zwischen der miR-122 und der ALT als zwischen der miR-122 und der AST festgestellt werden. Dies zeigte sich bei unserer Studie ähnlich ($p = 0,002$ vs $p = 0,017$) und diese Tendenz spiegelte sich auch in der Studie von Bala et al.⁹² von 2012 wieder.

Die miR-122 scheint jedoch nicht nur mindestens genauso sensitiv bezüglich einer Leberschädigung zu sein wie die ALT, sondern auch spezifisch für die Leber. Dies bestätigten Laterza et al.⁴², indem sie zeigten, dass die ALT auch bei einem Muskelschaden deutlich erhöht war, wohingegen eine signifikante miR-122-Erhöhung lediglich bei einer Leberschädigung vorlag.

Im Gegensatz hierzu konnte in der Studie von van der Ree et al.⁹³ keine Korrelation zwischen der miR-122 und der ALT gezeigt werden. Allerdings handelte es sich dabei um eine sehr kleine Studie bei der lediglich 16 Patienten eingeschlossen wurden.

Eine deutlich größere Studie wurde von Wang et al.⁹⁴ 2015 durchgeführt. Es wurden 105 Patienten mit einer chronischen Hepatitis-C-Infektion, 11 Patienten mit einer akuten Hepatitisinfektion sowie 33 gesunde Probanden untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die miR-122-Konzentration bei den Patienten mit einer chronischen bzw. akuten Hepatitisinfektion signifikant höher war im Vergleich zu den gesunden Probanden. Jedoch konnte keine signifikante Korrelation zwischen der miR-122 und der ALT, einem Marker der Leberentzündung, nachgewiesen werden, was erneut im Widerspruch zu unserer Studie steht.

Da hier sowohl die Studiengröße als auch der Genotyp (ebenfalls HCV-Genotyp 1) ähnlich sind, können diese nicht als mögliche Ursache für die unterschiedlichen Studienergebnisse herangezogen werden. Es müssen weitere Faktoren eine Rolle spielen, vor allem da es auch weitere Studien mit höheren Patientenzahlen gibt, die ebenfalls keine Korrelation zwischen der miR-122 und den anderen Laborparametern feststellen konnten.⁹⁵

Elfimova et al.⁹⁶ vermuteten bereits 2012 in ihrem „*Hypothesen und Theorien*“-Artikel, dass Unterschiede auch aufgrund der unterschiedlichen

Normierungsmethoden unter Verwendung unterschiedlicher microRNA in den einzelnen Studien resultieren können. Sie stützen sich weiterhin auf der Studie von Kim et al.⁹⁷ von 2012, die besagt, dass verschiedene Ergebnisse in den detektierten microRNA-Werten unter anderem durch Verwendung unterschiedlicher Taq-Polymerasen entstehen können oder dass Antikoagulanzen wie z.B. Heparin die Funktion der Taq-Polymerasen beeinflussen können.

Somit wäre, falls die Einführung einer microRNA als klinischer Biomarker erfolgen sollte, die Einführung einer standardisierten Quantifizierung notwendig, um einheitliche und valide Ergebnisse zu erzielen.

Bustin et al.⁹⁸ haben bereits 2002 mehrere Probleme in der Quantifizierung von mRNA mittels RT-PCR aufgezeigt. So konnten sie in einem ihrer Experimente nachweisen, dass RT-PCR-Ergebnisse von einer ähnlichen Probe im gleichen Labor eine größere Variabilität aufwiesen, weil sie durch verschiedene Untersucher mit einem unterschiedlichen Erfahrungsstand durchgeführt wurden. Sie gehen außerdem auch auf das Problem der Normalisierung ein. Eine standardisierte Methode zur Normalisierung wurde bisher noch nicht einheitlich festgelegt.⁹⁹

Eine Möglichkeit um die Expression eines untersuchten Zielgens korrekter darstellen zu können, ist die Normalisierung auf ein endogenes oder exogenes Referenzgen (auch *Housekeeping Gene* (HKG) genannt).⁹⁹ Dabei sollte das ideale Referenzgen in allen Zell- und Gewebearten exprimiert werden und keinen inneren oder äußeren Einflüssen unterliegen.¹⁰⁰ Es stellt sich jedoch als äußerst schwierig heraus, ein geeignetes HKG zu identifizieren. Einige HKG, die in der Vergangenheit aufgrund ihrer ubiquitären Expression häufig verwendet wurden, wie z. B. GAPDH, wiesen in zahlreichen Studien eine hohe Expressions-Variabilität in unterschiedlichen Geweben auf.¹⁰⁰⁻¹⁰⁵ Eine Verwendung von inadäquaten Housekeeping Genen kann zu Verfälschungen der Ergebnisse führen.^{28,104}

Aufgrund der schwierigen Datenlage, haben sich einige Forscher dazu entschlossen in ihren Studien exogene, also synthetische, Referenz- bzw. Housekeeping Gene zur Normalisierung zu verwenden.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ Diese werden in

der Regel dazu verwendet um die Effizienz der Reversen Transkription zu überprüfen und sicher zu stellen, dass die Quantifizierung der microRNA nicht durch technische Teilschritte beeinflusst wird.⁹⁹

Ein weiterer Aspekt zur Vergleichbarkeit der Expressionsrate ist die Verwendung der gleichen Probenmenge⁹⁹, was in unserer Studie erfolgt ist.

Seit die microRNAs an Bedeutung gewonnen und diese als Biomarker ernsthaft in Betracht gezogen werden, gibt es auch hier den Anspruch auf eine Reproduzierbarkeit. Zahlreiche Studien haben sich auch mit den microRNAs und geeignete HKG bzw. Housekeeping RNAs befasst. Jedoch gibt es auch hier bisher noch keine einheitliche Datenlage. Rice et al.¹⁰⁹ befassten sich in ihrer Studie zur Untersuchung von Plasma microRNAs bei Patienten mit verschiedenen Karzinomen mit 10 Potenziellen Housekeeping RNAs. Dabei zeigte sich unter anderem das RNU6 als eine gute Housekeeping RNA, weil sie in allen Proben exprimiert wurde und eine geringe Standardabweichung vorlag. Genauso wurde in einer Studie mit flüssigkeitsbasierter Zervix Zytologie das RNU6B als eine stabile RNA identifiziert, welche zur Normalisierung herangezogen werden kann.¹¹⁰ Lamba et al.¹¹¹ zeigten in ihrer Studie jedoch, dass weder RNU6 noch RNU6B als gute Referenzgene im Lebergewebe dienen. Auch in der Studie von Benz et al.¹¹² wurde eine hohe Variabilität der RNU6B festgestellt. Dabei wurden Patientenserum von gesunden Probanden, Patienten auf einer Intensivstation sowie Patienten mit Leberfibrose untersucht. Auch für die quantitative microRNA-Analyse von gesundem hepatischem Gewebe ist die RNU6B nicht geeignet.¹¹¹ Somit kann festgestellt werden, dass es wichtig ist, eine geeignete Housekeeping RNA für eine Untersuchung zu verwenden, und dass weitere Studien erforderlich sind, um optimale Housekeeping RNAs zu bestimmen.^{100,103,109,113}

Neben den hier beschriebenen analytischen Faktoren können auch prä-analytische Faktoren die Ergebnisse der Studien beeinflussen. So kann die Anwesenheit von Polymerase-Inhibitoren, wie zum Beispiel das Heparin, die Detektion der miRNA erschweren.^{97,114,115} Außerdem scheinen auch die Lagerungsbedingungen eine entscheidende Rolle zu spielen. Werden die Plasmaproben bei 4°C gelagert, findet eine Reduktion der microRNA bereits

nach 24 Stunden Lagerung statt. Wird die microRNA hingegen extrahiert und bei -70°C gelagert können die Proben für mehr als 1 Jahr stabil bleiben.²⁸

Köberle et al.⁸³ zeigten, dass die miR-122 im Serum nicht stabil ist. Nach einer längeren Inkubationszeit fielen die miR-122-Spiegel ab. Der Einsatz von RNase-Inhibitoren konnte dabei eine bessere Stabilität erzielen.

Eine Korrelation zwischen den miR-122 Werten und der HCV-RNA konnte nicht nur in unserer Studie, sondern in zahlreichen anderen Studien gezeigt werden.^{40,87,88,91,94} Man konnte jedoch auch hierzu gegenteilige Aussagen finden. Zum Beispiel zeigte die Studie von Fan et al.⁵⁹ eine negative Korrelation zwischen der HCV-RNA und der miR-122 im Serum.

Damit eine microRNA als prädiktiver Marker bzgl. eines Therapieerfolges eingesetzt werden kann, müsste sie bereits vor Therapiebeginn in unterschiedlicher Konzentration in den einzelnen Gruppen vorliegen. Unsere Studie zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied der miR-122-Werte zwischen den Respondern (SVR), den Relapse-Patienten und den Non-Respondern (NR).

Auch Waidmann et al.⁴⁰ konnten in ihrer Studie keine Unterschiede bezüglich der miR-122-Spiegel zwischen den Patienten mit einem Therapieansprechen (SVR) und den Non-Respondern vor Therapiebeginn feststellen.

Wie bereits in Kapitel 4.1 beschrieben, haben El-Ahwany et al.⁵⁸ in ihrer Studie bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis-C-Infektion festgestellt, dass sowohl die ALT als auch die AST signifikant unterschiedlich zwischen den Patienten mit einem SVR und den Non-Respondern waren. Des Weiteren konnte dieser signifikante Unterschied auch bezüglich der miR-122 festgestellt werden.

In dem vorangehenden Kapitel wurde postuliert, dass die gegensätzlichen Ergebnisse einiger Studien aufgrund der unterschiedlichen untersuchten HCV-Genotypen gegeben sind. Butt et al.¹⁸ haben Patienten mit dem Genotyp 3 untersucht und konnten ebenfalls einen signifikanten Unterschied der miR-122-Spiegel zwischen den SVR und den NR feststellen. Diese Theorie kann auch durch die Studie von Su et al.⁹¹ untermauert werden. In dieser Studie wurden 126 Patienten mit einer chronischen Hepatitis-C-Infektion in einer retrospektiven und 51 Patienten in einer prospektiven Studie untersucht. Das

Patientenkollektiv umfasste sowohl den HCV-Genotyp 1 als auch den Genotyp 2. Dabei zeigten sich zunächst deutlich höhere miR-122-Spiegel bei den Patienten mit einem Therapieansprechen (SVR) im Gegensatz zu den Patienten ohne Therapieansprechen (NR). Eine weitere Untersuchung der Untergruppen, also eine Aufteilung in Patienten mit Genotyp 1 und Patienten mit Genotyp 2 zeigte allerdings, dass dieser Unterschied signifikanter bei den Patienten mit dem Genotyp 2 war. Bei den Patienten mit dem Genotyp 1 ließ sich das nicht mehr nachweisen.

Auch Waring et al.⁸⁸ untersuchten insgesamt 111 Patienten mit den HCV-Genotypen 1-3. Dabei konnte vor Therapiebeginn lediglich bei den Patienten mit dem HCV-Genotyp 2 eine Korrelation zwischen den miR-122-Spiegel bei Patienten mit SVR im Vergleich zu NR gesehen werden. Bei den Genotypen 1 und 3 gab es keine signifikante Korrelation.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die miR-122 einen guten Parameter zur Detektion einer Leberentzündung darstellt und eventuell ein besserer Biomarker als die ALT oder die AST ist. Da es in unserer Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen (SVR, Relapse, NR) bezüglich der miR-122 vor Therapiebeginn gegeben hat, kann man daraus schließen, dass die miR-122 nicht als zuverlässiger prädiktiver Biomarker bezüglich des Therapieerfolges gewertet werden kann.

4.3 Entwicklung der miR-122-Spiegel im Laufe der Therapie

4.3.1 miR-122-Spiegel im Laufe der Therapie mit pegyliertem Interferon-alpha/Ribavirin und mit Direkten Antiviralen Agenzien

Die Untersuchung der miR-122-Spiegel unter Therapie zeigte, dass 4 Wochen nach Therapiebeginn die miR-122-Spiegel in allen drei Patientengruppen zunächst abfielen. Dabei zeigte sich ein signifikant stärkerer Abfall in der Gruppe der SVR-Patienten als in der Gruppe der Non-Respondern (siehe Abb. 3 und 4).

Su et al.⁹¹ untersuchten auch den Verlauf der miR-122 während der Therapie mit pegyliertem Interferon und Ribavirin. Sie konnten zwar generell einen signifikanten Unterschied zwischen der miR-122 Spiegel von SVR-Patienten und NR feststellen, jedoch ergaben ihre Untersuchungen keine relevante Änderung im Laufe der Therapie. Ihre untersuchte Kohorte war allerdings relativ klein (10 Patienten aus der SVR- und 15 Patienten aus der NR-Gruppe) und ist somit nicht geeignet, um als ein repräsentatives Ergebnis eingestuft zu werden.

Um die Leberspezifität der miR-122 nochmals darzustellen, wurde in unserer Studie zusätzlich die ubiquitär exprimierte miR-16 im Laufe der Therapie untersucht. Dabei zeigte sich im gesamten Therapieverlauf eine konstante Konzentration dieser microRNA (siehe Abb. 3b). Es konnte bereits in einigen Studien gezeigt werden, dass die Spiegel der extrazellulären miR-16 in Patienten mit chronischen Lebererkrankungen, aber auch in einigen anderen Erkrankungen, meist unverändert sind.^{37,116} Daraus kann man schließen, dass die Schwankungen der miR-122 spezifisch für Leberprozesse sind.

Auch Waring et al.⁸⁸ untersuchten verschiedene microRNAs bezüglich ihres Verhaltens im Laufe der Hepatitis-C-Therapie.

Sie konnten ebenfalls feststellen, dass die miR-122 unter den untersuchten microRNAs den größten Schwankungen während der Therapie unterlag.

Die untersuchten Patienten stammten jedoch aus 2 Studiengruppen, die beide mit einer interferonfreien Kombinationstherapie mit Direkten Antiviralen Agenzien (DAA) behandelt wurden. Die erste Gruppe mit dem HCV-Genotyp 1 wurde mit Paritaprevir/Ritonavir, Dasabuvir und Ribavirin behandelt. Die zweite Studiengruppe mit den Genotypen 1-3 wurden mit der Kombination Paritaprevir/Ritonavir, Ombitasvir und mit/ohne Ribavirin therapiert.

Es zeigte sich, genau wie in unserer Studie, zunächst ein Rückgang der miR-122-Spiegel in allen drei Patientengruppen (SVR, Responder, NR) in der zweiten Therapiewoche. In der Therapiewoche 10 zeigten die NR einen erneuten Anstieg der miR-122-Spiegel, wohingegen die Relapse-Patienten einen Rückgang bis zum Therapieende aufwiesen und dann erst im Follow-up (8 Wochen nach Therapieende) einen erneuten Anstieg der miR-122-Spiegel auf die

Ausgangswerte zeigten. Lediglich die SVR-Patienten hatten einen dauerhaften Rückgang der miR-122-Spiegel. Dies stimmt mit unseren Ergebnissen überein.

4.3.2 Hepatische miR-122-Expression vs. Serum miR-122-Spiegel

In unserer Studie war in Therapiewoche 4 ein signifikanter Unterschied der Serum-miR-122 Spiegel zwischen den SVR- und den NR-Patienten zu verzeichnen (siehe Abb. 3a). Es wurde ein deutlicher Rückgang der miR-122-Spiegel in der SVR-Gruppe detektiert.

Gegensätzlich dazu zeigte die Studie von Kamo et al.¹¹⁷, dass Patienten mit dem Genotyp 1 und einer SVR eine signifikant höhere hepatische miR-122 Expression aufwiesen als die Patienten ohne Therapieansprechen. Aus dem Artikel geht jedoch nicht klar hervor, zu welchem Zeitpunkt die Leberbiopsien zur Bestimmung der hepatischen miR-122-Spiegel abgenommen wurden. Es wird mehrfach erwähnt, dass die Woche 4 nach Therapiebeginn als ausschlaggebender Zeitpunkt für die Definition eines Therapieansprechens sei, indem ein Rückgang der Viruslast zu verzeichnen war. Ob dies auch der Zeitpunkt der miR-122 Bestimmung war, ist anhand des Artikels jedoch unklar.

Dass sich die hepatischen und die extrazellulär zirkulierenden miR-122-Spiegel unterscheiden, wurde bereits in einigen anderen Studien beschrieben.

Butt et al.¹⁸ konnten zeigen, dass es einen signifikanten Unterschied der miR-122 Konzentration zwischen den Patienten mit SVR und den Patienten mit NR oder Relapse gab. Allerdings zeigte sich die hepatische miR-122 Expression bei Patienten mit SVR deutlich niedriger, die Serum-miR-122-Spiegel hingegen waren deutlich höher.

Trebicka et al.¹¹⁸ untersuchten in ihrer Studie den Zusammenhang zwischen der hepatischen und der zirkulierenden miR-122 bei Patienten mit chronischer Hepatitis-C-Infektion und unterschiedlicher Fibrorestadien. Aufgrund ihrer Ergebnisse stellten sie ein Modell auf, welches die Ursachen der unterschiedlichen miR-122 Expression in der Leber bzw. der unterschiedlichen Spiegel der Serum-miR-122 aufzeigt.

Dem Modell zufolge findet sich in gesunden Probanden eine hohe hepatische miR-122-Expression wohingegen die Serum-miR-122-Spiegel gering sind. Im Rahmen einer akuten Leberschädigung, wie sie auch bei Hepatitis-C-Infektionen zunächst vorkommt, zeigt sich ein Rückgang der hepatischen miR-122-Expression, die möglicherweise durch Zerstörung von Hepatozyten hervorgerufen wird. Die Serum-miR-122-Spiegel steigen gleichzeitig an, vermutlich durch die vermehrte Freisetzung von miR-122 aus den geschädigten Hepatozyten. Im weiteren Verlauf, also beim beginnenden Umbau der Leber im Sinne einer Fibrose, sind sowohl die hepatische als auch die Serum-miR-122 reduziert, da durch den fibrotischen Umbau der Leber auch keine Expression der miR-122 stattfindet.

Mit ihren Ergebnissen, dass die Serum-miR-122 je nach Fibrosestadium unterschiedliche Spiegel haben kann, untermauern sie die Ergebnisse von Morita et al.¹¹⁹, die in ihrer Studie eine negative Korrelation zwischen der hepatischen miR-122-Expression und dem Grad der histopathologischen Leberschädigung feststellen konnten.

Bereits zuvor konnten auch Sarasin-Filipowicz et al.¹²⁰ bei einem höheren Fibrosestadium eine signifikant geringere Expressionsrate der miR-122 im Lebergewebe feststellen. Generell konnten sie ebenfalls eine höhere hepatische miR-122 Expression bei Patienten mit einem Therapieansprechen (SVR) im Vergleich zu den Non-Respondern zeigen.

In unserer Studie konnte kein signifikanter Unterschied im Fibrosegrad zwischen den unterschiedlichen Patientengruppen vor Therapiebeginn festgestellt werden. Dies spiegelt sich auch dadurch wider, dass wir vor Therapiebeginn keinen signifikanten Unterschied bezüglich der miR-122 in unserer Patientenkohorte feststellen konnten.

Aus der Zusammenschau dieser Ergebnisse kann man schließen, dass es zwar einen Zusammenhang zwischen dem Grad der Leberschädigung und der miR-122 geben könnte, dass es jedoch keine direkte Korrelation zwischen der hepatischen miR-122 und der zirkulierenden, im Serum gemessenen, miR-122 gibt. Je nach Fibrosestadium der Leber hat dies auch eine Auswirkung auf die Höhe der Serum-miR-122 Spiegel.

4.3.3 Serum-miR-122-Spiegel im Vergleich zu anderen Laborparametern im Laufe der Therapie

In der vorliegenden Studie wurden neben der miR-122-Spiegel auch die HCV-RNA sowie die ALT als Zeichen einer Nekroinflammation während der Therapie bestimmt und deren Verlauf in den unterschiedlichen Patientengruppen verglichen (siehe Abb. 5).

Dabei zeigten die Patienten der SVR-Gruppe einen dauerhaften Rückgang aller drei Parameter (miR-122, HCV-RNA, ALT).

Dass ein rascher Abfall der HCV-RNA mit einem dauerhaften Therapieansprechen zusammenhängen kann, wurde auch in der Studie von Bayram, Koksal et al.¹²¹ festgestellt. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein frühes Ansprechen auf die Therapie (kein Nachweis von HCV-RNA in Woche 4 nach Therapiebeginn) mit einem dauerhaften Therapieansprechen (SVR) assoziiert ist. Auch die Patienten, die in Woche 12 nach Therapiebeginn keinen HCV-RNA-Nachweis mehr hatten oder einen Abfall um mehr als 2 log₁₀ aufwiesen, hatten einen signifikant höheren Anteil an SVR-Raten.¹²¹

Eine ähnliche Aussage konnten auch Yu, Chuang et al. 2006¹²² in ihrer Studie darstellen. Dort zeigte sich, dass eine frühe HCV-Clearance (in Woche 4 nach Therapiebeginn) mit einem hohen positiv prädiktiven Wert für ein Therapieansprechen (SVR) assoziiert ist.

Die dort aufgestellten Schlussfolgerungen, dass eine Vorhersage über ein dauerhaftes Therapieansprechen mit Hilfe der HCV-RNA getroffen werden kann, konnten wir so jedoch nicht bestätigen. In unserer Studie zeigten auch die Relapse-Patienten einen deutlichen Rückgang der HCV-RNA in Therapiewoche 4 und 12 (siehe Abb. 5b). Dies zeigte sich jedoch nur im Laufe der Therapie. Zum Zeitpunkt der Kontrolluntersuchung (Follow-Up) lag die HCV-RNA annähernd in der Höhe der Ausgangswerte.

In der Gruppe der Non-Responder (NR) gab es im Gegensatz dazu bereits während der Therapie keinen großen Abfall der Parameter und somit kein Ansprechen auf die durchgeführte Therapie.

Ähnliche Ergebnisse zeigte auch die Studie von Waring et al.⁸⁸, wobei die Therapie der HCV-Patienten hier mittels Direkter Antiviraler Agenzien (DAA) erfolgte. Hierbei hatten die SVR-Patienten einen kontinuierlichen Rückgang der miR-122-Spiegel sowie der HCV-RNA bis hin zum Zeitpunkt des Follow-Up (in dieser Studie war dies 8 Wochen nach Therapieende). Die Relapse-Patienten wiesen nach einem anfänglichen Rückgang dieser beiden Parameter zum Zeitpunkt des Follow-Up einen erneuten Anstieg auf, wohingegen die Non-Responder bereits ab Woche 2 nach Therapiebeginn bereits einen Anstieg der miR-122 und der HCV-RNA zeigten.

Die ALT wurde in dieser Studie ebenfalls zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt und wies bei allen drei Gruppen eine signifikante Korrelation zwischen der miR-122-Spiegel und der ALT auf.

Waring et al.⁸⁸ untersuchten außerdem noch die Unterschiede zwischen den Genotypen 1-3 unter DAA-Therapie. Dabei fanden sie heraus, dass die Änderungen der miR-122 gentypübergreifend waren, dass beim Genotyp 1 jedoch bis zum Zeitpunkt des Follow-Up ein kontinuierlicher Abfall der miR-122-Spiegel beobachtet werden konnte, der jedoch nicht so ausgeprägt bei den Patienten des Genotyps 2 und 3 war.

In der Literatur finden sich zwar viele Studien, welche die miR-122 und viele Laborparameter zu Beginn der Therapie miteinander vergleichen, jedoch nur wenige, die diesen Vergleich auch im Laufe der Therapie herstellen.

Die meisten Studien, die nicht nur die HCV-RNA, sondern auch die ALT im Laufe der Therapie untersuchen, stammen aus den 90er Jahren und sind bei dem Versuch entstanden einen prädiktiven Laborparameter zum Therapieerfolg zu finden. Eine gute Übersichtsarbeit wurde 1999 im Journal of Hepatology von Civeira und Prieto¹²³ veröffentlicht. Sie verglichen zahlreiche Studien miteinander, die auf der Suche nach einem Laborparameter zur Vorhersage des Therapieansprechens waren.

Dabei zeigte sich, dass vor allem die frühe HCV-Clearance (also in Therapiewoche 4 und 12) ausschlaggebend ist, um ein Therapieerfolg vorhersagen zu können. Es zeigte sich hier, dass lediglich die Non-Responder

aufgrund der HCV-Persistenz sicher als eine Therapierefraktäre Gruppe detektiert werden konnte.

Bezüglich der ALT konnte jedoch keine gewichtige Aussage getroffen werden. In manchen Studien wurde bei den SVR-Patienten zwar ein Rückgang der ALT nachgewiesen, jedoch konnte dieser Parameter nicht signifikant zwischen den SVR und den Relapse-Patienten unterscheiden, ähnlich wie in unserer Studie.

Eine aktuellere Studie von Raza et al. 2021¹²⁴ verglich 2 Patientengruppen mit unterschiedlichen Therapien bei HCV-Patienten in Pakistan. Die eine Gruppe erhielt eine interferonbasierte Therapie und die andere eine Therapie mit DAA. Dabei wurden auch die Viruslast (HCV-RNA) und die ALT im Laufe der Therapie untersucht. Es zeigte sich, dass in der Gruppe der DAA-Patienten bereits zu einem deutlich früheren Zeitpunkt (also teilweise schon nach 1 Woche) eine Reduktion beider Parameter bei Patienten mit einem dauerhaften Therapieansprechen zu sehen war.

Dass ein schnelles Ansprechen auf die Therapie (RVR = Rapid Viral Response) ein signifikanter Parameter zur Prognose eines SVR ist, konnten Aziz, Raza et al.¹²⁵ auch in ihrer Studie von 2012 nachweisen.

Man kann also sowohl aus den vorhergehenden Studien als auch aus der hier vorliegenden Studie schließen, dass sowohl mit Hilfe der HCV-RNA als auch der miR-122 unter Therapie eine gute Vorhersage bezüglich der Non-Responder getroffen werden kann. Eine sichere Unterscheidung zwischen den Relapse und den SVR-Patienten ist jedoch nicht möglich.

4.4 Serum-miR-122 zur Überwachung des Therapieerfolges

Die Überwachung des Therapieerfolges findet laut Leitlinie aktuell mittels Bestimmung der HCV-RNA statt. Dabei erfolgt die quantitative Bestimmung vor Beginn der Therapie, während der Therapie und 12 Wochen nach Therapieende.^{2(p534)}

In unserer Studie gab es eine Korrelation zwischen einem Therapieansprechen (SVR) und einem signifikant niedrigeren Serum-miR-122-Spiegel zum Zeitpunkt

der Kontrolluntersuchung, das heißt 12 bzw. 24 Wochen nach Therapieende (siehe Abb. 6).

Sowohl in der Gruppe der Non-Responder als auch in der Gruppe der Relapse-Patienten zeigte sich nach initialem Abfall der miR-122 Serum-Konzentration nach Therapiebeginn ein erneuter Anstieg der miR-122-Spiegel.

Ähnlich wie im vorherigen Kapitel beschrieben, finden sich in der Literatur nur wenige Studien, welche die miR-122 auch am Ende der Therapie bzw. zum Zeitpunkt des Follow-Up untersuchen.

Dubin et al.¹²⁶ untersuchten die miR-122 sowohl bei Patienten mit einem akuten Leberversagen als auch bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis-C-Infektion. Dabei konnten sie zeigen, dass Patienten mit einer chronischen Hepatitis-C-Infektion und einer Therapie mittels pegyliertem Interferon und Ribavirin einen Rückgang der Serum-miR-122-Spiegel sowohl im Laufe der Therapie als auch am Ende der Therapie sowie zum Zeitpunkt der Kontrolluntersuchung (12 oder 24 Wochen nach Therapieende) aufwiesen.

In einer Studie von Yen et al.¹²⁷ von 2016 wurden Patienten untersucht, die sowohl eine Hepatitis-B- als auch eine Hepatitis-C-Infektion hatten. Diese Patienten wurden ebenfalls mittels pegyliertem Interferon und Ribavirin therapiert und die miR-122-Spiegel wurden im Laufe der Therapie sowie im Schnitt bis zu 5 Jahren nach Therapieende ermittelt. Dabei wurde das HBsAG bestimmt, welches bei einer Hepatitis-B-Infektion sowohl als diagnostischer Marker als auch zur Kontrolle unter bzw. nach einer Therapie verwendet wird. Als Überwachung eines Therapieerfolges wurde der fehlende Nachweis des HBsAG (HBsAG-Seroclearance) bestimmt. Dabei zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der miR-122 und der HBsAG-Seroclearance.

Eine sehr ähnliche Aussage bezüglich der miR-122 im Therapieverlauf und als Parameter eines Therapieerfolges konnte in der Studie von Waring et al.⁸⁸ getroffen werden. In dieser Studie wurden die Patienten jedoch mit neuen DAA und teilweise zusätzlich mit Ribavirin therapiert. Die miR-122 wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Therapie sowie 8 Wochen nach Therapieende (Follow-Up) bestimmt.

Dabei konnte bei den SVR- und Relapse-Patienten ein deutlicher Rückgang der miR-122-Spiegel im Laufe der Therapie ermittelt werden. Einen konstant niedrigen Spiegel (also auch zum Zeitpunkt des Follow-Up) konnte nur bei den Patienten mit einem dauerhaften Therapieansprechen (SVR) gezeigt werden.

Somit kann man postulieren, dass sich die miR-122 unabhängig vom Therapieregime verhält und sie alternativ zur HCV-RNA zur Überwachung des Therapieerfolges bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis-C-Infektion verwendet werden kann.

Abschließend kann man sagen, dass die leberspezifische miR-122 ein guter Biomarker zur Überwachung des Therapieerfolges zu sein scheint. Dies gilt sowohl für die klassische Therapie mit pegyliertem Interferon/Ribavirin als auch die neuere interferonfreie Therapie mit den Direkten Antiviralen Agenzien.

Als prognostischer Parameter zur Vorhersage eines Therapieerfolges scheint die miR-122 aufgrund widersprüchlicher Studiendaten und laut der hier durchgeführten Studie nicht geeignet zu sein. Man kann zwar bereits kurz nach Therapiebeginn die Patienten mit einem Therapieansprechen von den Non-Respondern unterscheiden, jedoch ist keine sichere Unterscheidung zwischen den Patienten mit SVR und den Relapse-Patienten möglich.

5 Literaturverzeichnis

1. Wölk B. Virushepatitis. In: Suerbaum S, Burchard G-D, Kaufmann SHE, Schulz TF, eds. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2020:766-771.
2. Herold G. *Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung : 2022 : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung, mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. Köln: Gerd Herold; 2022.
3. Borgia SM, Hedskog C, Parhy B, et al. Identification of a Novel Hepatitis C Virus Genotype From Punjab, India: Expanding Classification of Hepatitis C Virus Into 8 Genotypes. *J Infect Dis*. 2018;218(11):1722-1729. doi:10.1093/infdis/jiy401.
4. Robert Koch-Institut. Epidemiologisches Bulletin 29/2018. 2018. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2018/Ausgaben/29_18.pdf?__blob=publicationFile. Accessed January 28, 2022.
5. *Guidelines for the care and treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis C virus infection*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2018. Guidelines. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531733/>. Accessed January 17, 2022.
6. World Health Organization. Global Hepatitis Report 2017. 2017. <https://www.who.int/publications/i/item/global-hepatitis-report-2017>. Accessed January 18, 2022.
7. Sarrazin C, Zimmermann T, Berg T, et al. S3-Leitlinie 2018 „Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-C-Virus (HCV) -Infektion“. *Z Gastroenterol*. 2018;56(7):756-838. doi:10.1055/a-0599-1320.
8. Renz H. *Practical Laboratory Diagnosis: Textbook of Laboratory Medicine, Clinical Chemistry, and Hematology : Lehrbuch Zur Laboratoriumsmedizin, Klinischen Chemie und Hamatologie*. Berlin/Boston, UNITED STATES: Walter de Gruyter GmbH; 2018. <http://ebookcentral.proquest.com/lib/senc/detail.action?docID=5155864>.
9. Gressner AM, Gressner OA. Alanin-Aminotransaminase. In: Gressner AM, Arndt T, eds. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2017:1-3.

-
10. Gressner AM, Gressner OA. Aspartat-Aminotransaminase. In: Gressner AM, Arndt T, eds. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2017:1-3.
 11. Gressner AM, Gressner OA. γ -Glutamyltransferase. In: Gressner AM, Arndt T, eds. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018:1-3.
 12. Sarrazin C, Berg T, Ross RS, et al. Update der S 3-Leitlinie Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-C-Virus(HCV)-Infektion, AWMF-Register-Nr.: 021/012. *Z Gastroenterol*. 2010;48(2):289-351. doi:10.1055/s-0028-1110008.
 13. Sarrazin C, Berg T, Buggisch P, et al. Aktuelle Empfehlung zur Therapie der chronischen Hepatitis C. *Z Gastroenterol*. 2015;53(4):320-334. doi:10.1055/s-0034-1399322.
 14. Sarrazin C, Zimmermann T, Zeuzem S. Addendum zur S3-Leitlinie „Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-C-Virus-Infektion“. *Z Gastroenterol*. 2020;58(11):1107-1108. doi:10.1055/a-1226-1841.
 15. Sarrazin C, Zimmermann T, Berg T, et al. S3-Leitlinie HCV 2020 Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-C-Virus(HCV)-Infektion. *Z Gastroenterol*. 2020;58(11):1110-1131. doi:10.1055/a-1226-0241.
 16. Abbas Z, Abbas M. The cost of eliminating hepatitis C in Pakistan. *The Lancet Global Health*. 2020;8(3):e323-e324. doi:10.1016/S2214-109X(20)30036-X.
 17. Khan SZ, Talha MU, Iftikhar B, et al. Induction of Combination Therapy for the Management of Hepatitis C: An Observational Study. *Cureus*. 2020;12(9):e10259. doi:10.7759/cureus.10259.
 18. Butt AM, Raja AJ, Siddique S, et al. Parallel expression profiling of hepatic and serum microRNA-122 associated with clinical features and treatment responses in chronic hepatitis C patients. *Sci Rep*. 2016;6:21510. doi:10.1038/srep21510.
 19. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(30):10513-10518. doi:10.1073/pnas.0804549105.
 20. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004;5(7):522-531. doi:10.1038/nrg1379.

-
21. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-854.
 22. Macfarlane L-A, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics*. 2010;11(7):537-561. doi:10.2174/138920210793175895.
 23. Liu X, Fortin K, Mourelatos Z. MicroRNAs: biogenesis and molecular functions. *Brain Pathol*. 2008;18(1):113-121. doi:10.1111/j.1750-3639.2007.00121.x.
 24. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-297.
 25. Voorhoeve PM. MicroRNAs: Oncogenes, tumor suppressors or master regulators of cancer heterogeneity? *Biochim Biophys Acta*. 2010;1805(1):72-86. doi:10.1016/j.bbcan.2009.09.003.
 26. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69(3):89-95. doi:10.1067/mcp.2001.113989.
 27. Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008;18(10):997-1006. doi:10.1038/cr.2008.282.
 28. Sourvinou IS, Markou A, Lianidou ES. Quantification of Circulating miRNAs in Plasma: Effect of Preanalytical and Analytical Parameters on Their Isolation and Stability. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2013;15(6):827-834. doi:10.1016/j.jmoldx.2013.07.005.
 29. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*. 2002;12(9):735-739.
 30. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15524-15529. doi:10.1073/pnas.242606799.
 31. Zhang J, Song Y, Zhang C, et al. Circulating MiR-16-5p and MiR-19b-3p as Two Novel Potential Biomarkers to Indicate Progression of Gastric Cancer. *Theranostics*. 2015;5(7):733-745. doi:10.7150/thno.10305.

-
32. Mobarra N, Shafiee A, Rad SMAH, et al. Overexpression of microRNA-16 declines cellular growth, proliferation and induces apoptosis in human breast cancer cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2015;51(6):604-611. doi:10.1007/s11626-015-9872-4.
33. Pekarsky Y, Croce CM. Role of miR-15/16 in CLL. *Cell Death Differ*. 2015;22(1):6-11. doi:10.1038/cdd.2014.87.
34. Navarro A, Diaz T, Gallardo E, et al. Prognostic implications of miR-16 expression levels in resected non-small-cell lung cancer. *J Surg Oncol*. 2011;103(5):411-415. doi:10.1002/jso.21847.
35. Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods*. 2010;50(4):298-301. doi:10.1016/j.ymeth.2010.01.032.
36. Song J, Bai Z, Han W, et al. Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients. *Dig Dis Sci*. 2012;57(4):897-904. doi:10.1007/s10620-011-1981-7.
37. Asaga S, Kuo C, Nguyen T, Terpenning M, Giuliano AE, Hoon DSB. Direct serum assay for microRNA-21 concentrations in early and advanced breast cancer. *Clin Chem*. 2011;57(1):84-91. doi:10.1373/clinchem.2010.151845.
38. Esau C, Davis S, Murray SF, et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab*. 2006;3(2):87-98. doi:10.1016/j.cmet.2006.01.005.
39. Starkey Lewis PJ, Dear J, Platt V, et al. Circulating microRNAs as potential markers of human drug-induced liver injury. *Hepatology*. 2011;54(5):1767-1776. doi:10.1002/hep.24538.
40. Waidmann O, Bihrer V, Pleli T, et al. Serum microRNA-122 levels in different groups of patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat*. 2012;19(2):e58-65. doi:10.1111/j.1365-2893.2011.01536.x.
41. Wang K, Zhang S, Marzolf B, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(11):4402-4407. doi:10.1073/pnas.0813371106.
42. Laterza OF, Lim L, Garrett-Engele PW, et al. Plasma MicroRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury. *Clin Chem*. 2009;55(11):1977-1983. doi:10.1373/clinchem.2009.131797.

-
43. Bihrer V, Friedrich-Rust M, Kronenberger B, et al. Serum miR-122 as a biomarker of necroinflammation in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol*. 2011;106(9):1663-1669. doi:10.1038/ajg.2011.161.
44. van der Meer AJ, Farid WRR, Sonneveld MJ, et al. Sensitive detection of hepatocellular injury in chronic hepatitis C patients with circulating hepatocyte-derived microRNA-122. *J Viral Hepat*. 2013;20(3):158-166. doi:10.1111/jvh.12001.
45. Cermelli S, Ruggieri A, Marrero JA, Ioannou GN, Beretta L. Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One*. 2011;6(8):e23937. doi:10.1371/journal.pone.0023937.
46. Narbus CM, Israelow B, Sourisseau M, et al. HepG2 cells expressing microRNA miR-122 support the entire hepatitis C virus life cycle. *J Virol*. 2011;85(22):12087-12092. doi:10.1128/JVI.05843-11.
47. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*. 2005;309(5740):1577-1581. doi:10.1126/science.1113329.
48. Lin CJ-F, Gong H-Y, Tseng H-C, Wang W-L, Wu J-L. miR-122 targets an anti-apoptotic gene, Bcl-w, in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;375(3):315-320. doi:10.1016/j.bbrc.2008.07.154.
49. Tsai W-C, Hsu PW-C, Lai T-C, et al. MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2009;49(5):1571-1582. doi:10.1002/hep.22806.
50. Nathwani RA, Pais S, Reynolds TB, Kaplowitz N. Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases. *Hepatology*. 2005;41(2):380-382. doi:10.1002/hep.20548.
51. Zhang Y, Jia Y, Zheng R, et al. Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases. *Clin Chem*. 2010;56(12):1830-1838. doi:10.1373/clinchem.2010.147850.
52. Sarrazin C, Schwendy S, Möller B, et al. Improved responses to pegylated interferon alfa-2b and ribavirin by individualizing treatment for 24-72 weeks. *Gastroenterology*. 2011;141(5):1656-1664. doi:10.1053/j.gastro.2011.07.019.

-
53. Applied Biosystem. TaqMan MicroRNA Assays and Arrays: Applied Biosystems. MicroRNA & Non-Coding RNA Analysis. miRNA quantitation. Literature: TaqMan® MicroRNA Assays and Arrays (Product Bulletin). Accessed July 10, 2013.
54. Schmittgen TD, Lee EJ, Jiang J, et al. Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods*. 2008;44(1):31-38. doi:10.1016/j.ymeth.2007.09.006.
55. Löffler G, ed. *Basiswissen Biochemie: Mit Pathobiochemie*. 6. komplett überarbeitete und aktualisierte Auflage // 7. komplett überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2005 // 2008. Springer-Lehrbuch.
56. Dr. Thomas A. Schild, Applied Biosystems GmbH. *Einführung in die Real-Time TaqMan PCR-Technologie*.
57. WHO. Updated recommendations on HCV simplified service delivery and HCV diagnostics: policy brief. Updated November 18, 2022. Accessed November 18, 2022.
58. El-Ahwany E, Nagy F, Zoheiry M, et al. The Role of MicroRNAs in Response to Interferon Treatment of Chronic Hepatitis C patients. *Electron Physician*. 2016;8(2):1994-2000. doi:10.19082/1994.
59. Fan Z, Zhang Q, Chen H, et al. Circulating microRNAs as a biomarker to predict therapy efficacy in hepatitis C patients with different genotypes. *Microb Pathog*. 2017;112:320-326. doi:10.1016/j.micpath.2017.10.003.
60. Waidmann O, Bihrer V, Kronenberger B, Zeuzem S, Piiper A, Forestier N. Pretreatment serum microRNA-122 is not predictive for treatment response in chronic hepatitis C virus infection. *Dig Liver Dis*. 2012;44(5):438-441. doi:10.1016/j.dld.2011.11.011.
61. Murakami Y, Tanaka M, Toyoda H, et al. Hepatic microRNA expression is associated with the response to interferon treatment of chronic hepatitis C. *BMC Med Genomics*. 2010;3:48. doi:10.1186/1755-8794-3-48.
62. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(8):467-477. doi:10.1038/nrclinonc.2011.76.
63. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. 2010;56(11):1733-1741. doi:10.1373/clinchem.2010.147405.

-
64. Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(20):7248-7259. doi:10.1093/nar/gkq601.
65. Pigati L, Yaddanapudi SCS, Iyengar R, et al. Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS One.* 2010;5(10):e13515. doi:10.1371/journal.pone.0013515.
66. Zhu H, Fan G-C. Extracellular/circulating microRNAs and their potential role in cardiovascular disease. *Am J Cardiovasc Dis.* 2011;1(2):138-149.
67. Yuan A, Farber EL, Rapoport AL, et al. Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles. *PLoS One.* 2009;4(3):e4722. doi:10.1371/journal.pone.0004722.
68. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(12):5003-5008. doi:10.1073/pnas.1019055108.
69. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol.* 2011;13(4):423-433. doi:10.1038/ncb2210.
70. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):654-659. doi:10.1038/ncb1596.
71. Février B, Raposo G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16(4):415-421. doi:10.1016/j.ceb.2004.06.003.
72. Zhang Y, Liu D, Chen X, et al. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell.* 2010;39(1):133-144. doi:10.1016/j.molcel.2010.06.010.
73. Masyuk AI, Masyuk TV, LaRusso NF. Exosomes in the pathogenesis, diagnostics and therapeutics of liver diseases. *J Hepatol.* 2013;59(3):621-625. doi:10.1016/j.jhep.2013.03.028.
74. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem.* 2010;285(23):17442-17452. doi:10.1074/jbc.M110.107821.

-
75. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(16):7223-7233. doi:10.1093/nar/gkr254.
76. Michell DL, Vickers KC. HDL and microRNA therapeutics in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther.* 2016;168:43-52. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.09.001.
77. Kakumani PK. AGO-RBP crosstalk on target mRNAs: Implications in miRNA-guided gene silencing and cancer. *Transl Oncol.* 2022;21:101434. doi:10.1016/j.tranon.2022.101434.
78. Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(1):23-36. doi:10.1038/nrm2085.
79. Iwakawa H-O, Tomari Y. Life of RISC: Formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex. *Mol Cell.* 2022;82(1):30-43. doi:10.1016/j.molcel.2021.11.026.
80. Wilson JA, Zhang C, Huys A, Richardson CD. Human Ago2 is required for efficient microRNA 122 regulation of hepatitis C virus RNA accumulation and translation. *J Virol.* 2011;85(5):2342-2350. doi:10.1128/JVI.02046-10.
81. Conrad KD, Giering F, Erfurth C, et al. MicroRNA-122 dependent binding of Ago2 protein to hepatitis C virus RNA is associated with enhanced RNA stability and translation stimulation. *PLoS One.* 2013;8(2):e56272. doi:10.1371/journal.pone.0056272.
82. Hauptenthal J, Baehr C, Kiermayer S, Zeuzem S, Piiper A. Inhibition of RNase A family enzymes prevents degradation and loss of silencing activity of siRNAs in serum. *Biochem Pharmacol.* 2006;71(5):702-710. doi:10.1016/j.bcp.2005.11.015.
83. Köberle V, Pleli T, Schmithals C, et al. Differential stability of cell-free circulating microRNAs: Implications for their utilization as biomarkers. *PLoS One.* 2013;8(9):e75184. doi:10.1371/journal.pone.0075184.
84. Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med.* 2006;12(12):580-587. doi:10.1016/j.molmed.2006.10.006.
85. Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005;435(7043):834-838. doi:10.1038/nature03702.

-
86. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(11):857-866. doi:10.1038/nrc1997.
87. Marquez RT, Bandyopadhyay S, Wendlandt EB, et al. Correlation between microRNA expression levels and clinical parameters associated with chronic hepatitis C viral infection in humans. *Lab Invest*. 2010;90(12):1727-1736. doi:10.1038/labinvest.2010.126.
88. Waring JF, Dumas EO, Abel S, et al. Serum miR-122 may serve as a biomarker for response to direct acting antivirals: effect of paritaprevir/R with dasabuvir or ombitasvir on miR-122 in HCV-infected subjects. *J Viral Hepat*. 2016;23(2):96-104. doi:10.1111/jvh.12470.
89. Zhang S, Ouyang X, Jiang X, et al. Dysregulated Serum MicroRNA Expression Profile and Potential Biomarkers in Hepatitis C Virus-infected Patients. *Int J Med Sci*. 2015;12(7):590-598. doi:10.7150/ijms.11525.
90. Jiao X, Fan Z, Chen H, et al. Serum and exosomal miR-122 and miR-199a as a biomarker to predict therapeutic efficacy of hepatitis C patients. *J Med Virol*. 2017;89(9):1597-1605. doi:10.1002/jmv.24829.
91. Su T-H, Liu C-H, Liu C-J, et al. Serum microRNA-122 level correlates with virologic responses to pegylated interferon therapy in chronic hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(19):7844-7849. doi:10.1073/pnas.1306138110.
92. Bala S, Tilahun Y, Taha O, et al. Increased microRNA-155 expression in the serum and peripheral monocytes in chronic HCV infection. *J Transl Med*. 2012;10:151. doi:10.1186/1479-5876-10-151.
93. van der Ree MH, van der Meer AJ, van Nuenen AC, et al. Miravirsen dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016;43(1):102-113. doi:10.1111/apt.13432.
94. Wang J, Jiang D, Rao H, Zhao J, Wang Y, Wei L. Absolute quantification of serum microRNA-122 and its correlation with liver inflammation grade and serum alanine aminotransferase in chronic hepatitis C patients. *Int J Infect Dis*. 2015;30:52-56. doi:10.1016/j.ijid.2014.09.020.
95. Oliveira KG, Malta FM, Natri ACSS, et al. Increased hepatic expression of miRNA-122 in patients infected with HCV genotype 3. *Med Microbiol Immunol*. 2016;205(2):111-117. doi:10.1007/s00430-015-0431-0.

-
96. Elfimova N, Schlattjan M, Sowa J-P, Dienes HP, Canbay A, Odenthal M. Circulating microRNAs: promising candidates serving as novel biomarkers of acute hepatitis. *Front Physiol.* 2012;3:476. doi:10.3389/fphys.2012.00476.
97. Kim D-J, Linnstaedt S, Palma J, et al. Plasma components affect accuracy of circulating cancer-related microRNA quantitation. *J Mol Diagn.* 2012;14(1):71-80. doi:10.1016/j.jmoldx.2011.09.002.
98. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of molecular endocrinology.* 2002;29(1):23-39. doi:10.1677/jme.0.0290023.
99. Schwarzenbach H, da Silva AM, Calin G, Pantel K. Data Normalization Strategies for MicroRNA Quantification. *Clin Chem.* 2015;61(11):1333-1342. doi:10.1373/clinchem.2015.239459.
100. Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;313(4):856-862. doi:10.1016/j.bbrc.2003.11.177.
101. Zhu G, Chang Y, Zuo J, et al. Fudenine, a C-terminal truncated rat homologue of mouse prominin, is blood glucose-regulated and can up-regulate the expression of GAPDH. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;281(4):951-956. doi:10.1006/bbrc.2001.4439.
102. Hsiao LL, Dangond F, Yoshida T, et al. A compendium of gene expression in normal human tissues. *Physiol Genomics.* 2001;7(2):97-104. doi:10.1152/physiolgenomics.00040.2001.
103. Janovick-Guretzky NA, Dann HM, Carlson DB, Murphy MR, Loor JJ, Drackley JK. Housekeeping gene expression in bovine liver is affected by physiological state, feed intake, and dietary treatment. *J Dairy Sci.* 2007;90(5):2246-2252. doi:10.3168/jds.2006-640.
104. Fu L-Y, Jia H-L, Dong Q-Z, et al. Suitable reference genes for real-time PCR in human HBV-related hepatocellular carcinoma with different clinical prognoses. *BMC Cancer.* 2009;9:1-11. doi:10.1186/1471-2407-9-49.
105. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262.

-
106. Anadol E, Schierwagen R, Elfimova N, et al. Circulating microRNAs as a marker for liver injury in human immunodeficiency virus patients. *Hepatology*. 2015;61(1):46-55. doi:10.1002/hep.27369.
107. Liu M, Liu J, Wang L, et al. Association of serum microRNA expression in hepatocellular carcinomas treated with transarterial chemoembolization and patient survival. *PLoS One*. 2014;9(10):e109347. doi:10.1371/journal.pone.0109347.
108. Wang P, Yang D, Zhang H, et al. Early Detection of Lung Cancer in Serum by a Panel of MicroRNA Biomarkers. *Clin Lung Cancer*. 2015;16(4):313-9.e1. doi:10.1016/j.clcc.2014.12.006.
109. Rice J, Roberts H, Rai SN, Galandiuk S. Housekeeping genes for studies of plasma microRNA: A need for more precise standardization. *Surgery*. 2015;158(5):1345-1351. doi:10.1016/j.surg.2015.04.025.
110. Causin RL, Pessôa-Pereira D, Souza KCB, et al. Identification and performance evaluation of housekeeping genes for microRNA expression normalization by reverse transcription-quantitative PCR using liquid-based cervical cytology samples. *Oncol Lett*. 2019;18(5):4753-4761. doi:10.3892/ol.2019.10824.
111. Lamba V, Ghodke-Puranik Y, Guan W, Lamba JK. Identification of suitable reference genes for hepatic microRNA quantitation. *BMC Res Notes*. 2014;7:1-10. doi:10.1186/1756-0500-7-129.
112. Benz F, Roderburg C, Vargas Cardenas D, et al. U6 is unsuitable for normalization of serum miRNA levels in patients with sepsis or liver fibrosis. *Exp Mol Med*. 2013;45(9):e42. doi:10.1038/emm.2013.81.
113. Morata-Tarifa C, Picon-Ruiz M, Griñan-Lison C, et al. Validation of suitable normalizers for miR expression patterns analysis covering tumour heterogeneity. *Sci Rep*. 2017;7:39782. doi:10.1038/srep39782.
114. Beutler E, Gelbart T, Kuhl W. Interference of heparin with the polymerase chain reaction. *Biotechniques*. 1990;9(2):166.
115. Boeckel J-N, Thomé CE, Leistner D, Zeiher AM, Fichtlscherer S, Dimmeler S. Heparin selectively affects the quantification of microRNAs in human blood samples. *Clin Chem*. 2013;59(7):1125-1127. doi:10.1373/clinchem.2012.199505.
116. Bihrer V, Waidmann O, Friedrich-Rust M, et al. Serum microRNA-21 as marker for necroinflammation in hepatitis C patients with and without

-
- hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2011;6(10):e26971.
doi:10.1371/journal.pone.0026971.
117. Kamo Y, Ichikawa T, Miyaaki H, et al. Significance of miRNA-122 in chronic hepatitis C patients with serotype 1 on interferon therapy. *Hepatol Res*. 2015;45(1):88-96. doi:10.1111/hepr.12317.
118. Trebicka J, Anadol E, Elfimova N, et al. Hepatic and serum levels of miR-122 after chronic HCV-induced fibrosis. *J Hepatol*. 2013;58(2):234-239. doi:10.1016/j.jhep.2012.10.015.
119. Morita K, Taketomi A, Shirabe K, et al. Clinical significance and potential of hepatic microRNA-122 expression in hepatitis C. *Liver Int*. 2011;31(4):474-484. doi:10.1111/j.1478-3231.2010.02433.x.
120. Sarasin-Filipowicz M, Krol J, Markiewicz I, Heim MH, Filipowicz W. Decreased levels of microRNA miR-122 in individuals with hepatitis C responding poorly to interferon therapy. *Nat Med*. 2009;15(1):31-33. doi:10.1038/nm.1902.
121. Bayram M, Koksar AR, Alkim H, et al. First Week HCV RNA Level Under the Pegylated Interferon and Ribavirin Treatment Predicts Sustained Virological Response. *Am J Ther*. 2016;23(6):e1612-e1618. doi:10.1097/MJT.0000000000000279.
122. Yu M-L, Chuang W-L, Dai C-Y, et al. Different viral kinetics between hepatitis C virus genotype 1 and 2 as on-treatment predictors of response to a 24-week course of high-dose interferon-alpha plus ribavirin combination therapy. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2006;148(3):120-127. doi:10.1016/j.trsl.2006.04.006.
123. Civeira MP, Prieto J. Early predictors of response to treatment in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 1999;31 Suppl 1:237-243. doi:10.1016/s0168-8278(99)80409-7.
124. Raza MN, Sughra K, Zeeshan N, et al. Recurrence of hepatitis C virus after treatment with pegylated interferon and direct acting antivirals in Punjab Pakistan. *Braz J Biol*. 2021;83. doi:10.1590/1519-6984.252610.
125. Aziz H, Raza A, Waheed Y, Gill U, Gill ML. Analysis of variables and interactions among variables associated with a sustained virological response to pegylated interferon alfa-2a plus ribavirin in hepatitis C virus genotype 3-infected patients. *Int J Infect Dis*. 2012;16(8):e597-602. doi:10.1016/j.ijid.2012.03.012.

-
126. Dubin PH, Yuan H, Devine RK, Hynan LS, Jain MK, Lee WM. Micro-RNA-122 levels in acute liver failure and chronic hepatitis C. *J Med Virol*. 2014;86(9):1507-1514. doi:10.1002/jmv.23987.
127. Yen Y-H, Huang C-M, Wei K-L, et al. MicroRNA-122 as a predictor of HBsAg seroclearance in hepatitis B and C dual infected patients treated with interferon and ribavirin. *Sci Rep*. 2016;6:33816. doi:10.1038/srep33816.

