



Online teilnehmen

3 Punkte sammeln auf [CME.SpringerMedizin.de](https://www.CME.SpringerMedizin.de)

Teilnahmemöglichkeiten

Die Teilnahme an diesem zertifizierten Kurs ist für 12 Monate auf [CME.SpringerMedizin.de](https://www.CME.SpringerMedizin.de) möglich. Den genauen Teilnahmeschluss erfahren Sie dort.

Teilnehmen können Sie:

- als Abonnent dieser Fachzeitschrift,
- als e.Med-Abonnent.

Zertifizierung

Diese Fortbildungseinheit ist zertifiziert von der Ärztekammer Nordrhein gemäß Kategorie D und damit auch für andere Ärztekammern anerkennungsfähig. Es werden 3 Punkte vergeben.

Anerkennung in Österreich

Gemäß Diplom-Fortbildungs-Programm (DFP) werden die auf [CME.SpringerMedizin.de](https://www.CME.SpringerMedizin.de) erworbenen Fortbildungspunkte von der Österreichischen Ärztekammer 1:1 als fachspezifische Fortbildung angerechnet (§26(3) DFP Richtlinie).

Kontakt

Springer Medizin Kundenservice
Tel. 0800 77 80 777
E-Mail: kundenservice@springermedizin.de

CME Zertifizierte Fortbildung

W. Dietmaier¹ · R. Büttner² · J. Rüschoff³

¹ Institut für Pathologie, Universität Regensburg, Regensburg, Deutschland

² Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Köln, Köln, Deutschland

³ Institut für Pathologie Nordhessen, Kassel, Deutschland

Mikrosatelliteninstabilität

Aktueller Überblick über Methoden und Anwendungen

Zusammenfassung

Mit Begründung des Bethesda-Mikrosatelliten-Testpanels war der Nachweis von Mikrosatelliteninstabilität (MSI) bzw. der zugrunde liegenden Mismatch-Reparaturgen-Defizienz (MMRD) Bestandteil des Screenings auf erbliches Lynch-Syndrom (LS, vormals HNPCC). Neuerdings ist MSI/MMRD zu einem wichtigen Biomarker zur Vorhersage des Therapieerfolgs moderner Checkpointimmuntherapien geworden. Die MSI-Analyse erfolgt mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit und ohne Fragmentlängenbestimmung und Next Generation Sequencing (NGS). Für den MMRD-Nachweis stehen immunhistochemische Methoden zur Verfügung. Bezogen auf einzelne Tumorentitäten kommen diese Testverfahren unterschiedlich zur Anwendung. Aktuell ist MSI/MMRD ein Biomarker mit sehr breitem Indikationsspektrum in der Tumorphathologie vor allem beim Kolorektal-, Endometrium- und Magenkarzinom. Bei fortgeschrittenen Karzinomen ist MSI ein etablierter Parameter zur Prädiktion der Therapieresponse checkpointgerichteter Immuntherapien.

Schlüsselwörter

Neoplasien · DNA-Fehlpaarungs-Reparatur · Genetische Prädisposition · Prognose · Prädiktive Wertigkeit von Tests

Das MSI-Phänomen begründet in vielen Tumoren einen eigenen Karzinogeneseweg

Lernziele

Nach der Lektüre dieses Beitrages ...

- kennen Sie die Indikationen für eine Bestimmung der Mikrosatelliteninstabilität (MSI) bzw. den Nachweis einer Mismatch-Reparaturgen-Defizienz (MMRD);
- sind Ihnen die Unterschiede zwischen den verschiedenen Nachweisverfahren von MSI und MMRD und deren diagnostische Wertigkeit geläufig;
- können Sie die sich aus MSI und/oder MMRD ergebenden Befundkonstellationen im Hinblick auf deren klinische Bedeutungen interpretieren und bewerten.

Hintergrund

Die gegenüber dem Normalgewebe ursprünglich im kolorektalen Karzinom (KRK) beobachteten Längenabweichungen in einfach repetitiven DNA-Sequenzen – vor allem in kurzen Mono(A)_n- und Dinukleotid(CA)_n-Abfolgen – wird als Mikrosatelliteninstabilität (MSI) bezeichnet und wird durch den mutations- oder methylierungsbedingten Funktionsausfall bestimmter Mismatch-Reparaturgene (MMRD) hervorgerufen. Dieser Zusammenhang wurde vor etwa 20 Jahren als Markerläsion des **Lynch-Syndroms** (vormals HNPCC) aufgedeckt. Das Phänomen begründet in vielen Tumoren einen eigenen Karzinogeneseweg und ist ein wichtiger Biomarker für die mit dem Lynch-Syndrom assoziierte Krebsdisposition und für die Prognose. Neben der Bedeutung zur Krebsrisikodiagnostik wurde kürzlich die prädiktive Relevanz zur Vorhersage des Ansprechens auf Immuntherapie, aktuell auch für das Ansprechen auf Checkpointimmuntherapien, unabhängig von der Tumorentität („tumor agnostic“) nachgewiesen. Heutzutage kommt der Bestimmung von MSI/MMRD demnach eine erhebliche klinisch-therapeutische Relevanz zu. Aktuell stehen die Fragen nach einer universellen Testung auf MSI/MMRD, der optimalen Untersuchungsmethode und deren klinische Relevanz im Zentrum der Diskussion.

Mithilfe der vorliegenden genomweiten Daten aus dem **Krebsgenomatlaskprojekt** (TCGA) besteht ein umfassendes Bild über die Prävalenz von MSI für inzwischen 39 verschiedene Malignome (■ **Abb. 1**; [1]). Es stellt sich die Frage, wann eine Testung auf MSI/MMRD mit welcher klinischen Fragestellung, an welchem Tumor und mit welchem Untersuchungsverfahren erfolgen sollte.

Microsatellite instability. Review of methods and applications

Abstract

After introduction of the Bethesda microsatellite test panel demonstration of microsatellite instability (MSI) and/or loss of mismatch repair proteins (MMRD) was primarily used as a marker for cancer predisposition of Lynch syndrome (LS, previous: HNPCC). Nowadays MSI/MMRD has become an important biomarker to predict therapy response to checkpoint immunotherapies. MSI can be determined either by polymerase chain reaction (PCR)-based technologies with or without specification of fragment sizes or next generation sequencing (NGS) methods. Depending on the individual tumor entities, these test methods are used differently. Currently, MSI/MMRD is a tumor biomarker which covers a broad spectrum of indications in tumor pathology, especially in colorectal, endometrial and gastric cancer. In advanced carcinomas, MSI is an established predictor of therapy response to checkpoint-directed immunotherapies.

Keywords

Neoplasms · DNA mismatch repair · Genetic predisposition · Prognosis · Predictive value of tests

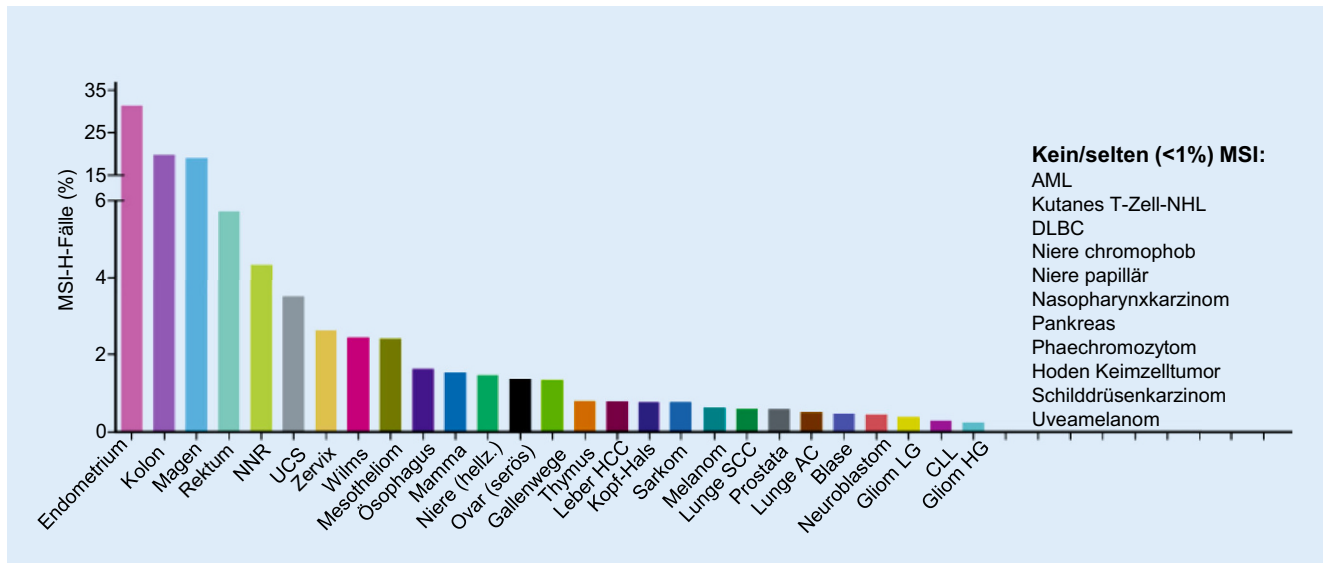


Abb. 1 ▲ Häufigkeit der Mikrosatelliteninstabilität in 39 verschiedenen Tumorentitäten (exombasierte Analyse an Daten des Krebsgenomatlansprojekts, TCGA). AC Adenokarzinom, AML akute myeloische Leukämie, CLL chronische lymphatische Leukämie, DLBC diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom, HCC hepatozelluläres Karzinom, hellz. hellzellig, HG „high grade“, LG „low grade“, MSI Mikrosatelliteninstabilität, MSI-H „MSI-high“, NHL Non-Hodgkin-Lymphom, NNR Nebennierenrinde, SCC „small cell carcinoma“, UCS „uterine carcinosarcoma“. (Modifiziert nach [1])

Mikrosatelliteninstabilitätstestung

Diagnostisches Primerpanel

Die Verwendung geeigneter **Mikrosatellitenmarker** ist für die Bestimmung des Mikrosatellitenstatus von großer Bedeutung. In der ersten systematisch vergleichenden Analyse haben die Autoren dazu Mono-, Di-, Tri-, Tetra- und Pentanukleotid-Repeats an kolorektalen Karzinomproben mit charakterisierten MMRD-Status verglichen und Cut-off-Werte zur Definition einer Mikrosatelliteninstabilität („MSI-high“ [MSI-H], „MSI-low“ [MSI-L], MSS) ermittelt [2]. Diese Ergebnisse haben bereits im Jahr 1998 und nachfolgend in einer überarbeiteten Fassung (2004) Eingang in die vom National Cancer Institute (NCI) formulierten Empfehlung zur Definition von MSI und der Testung mit geeigneten Mikrosatellitenmarkern gefunden [3]. Das „NCI-Bethesda-Panel“ basiert somit auf den von den Autoren validierten beiden Mononukleotidmarkern BAT25 und BAT26 sowie auf den 3 polymorphen Dinukleotidmarkern D5S346, D2S123 und D17S250. Der Schwellenwert für eine hochfrequente Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) liegt bei 2 instabilen Markern und für eine niederfrequente Instabilität (MSI-L) bei einem instabilen Marker (ein Fünftel= 20%). Zusätzliche Marker (BAT40 als Mono-, D10S197, D13S153, D18S58 als Di- und MYCL₁ als Tetranukleotid-Repeat) sollen als alternative Loci im Fall eines MSI-L-Status zusätzlich untersucht werden. Bleiben nur 1–2 von 10 Markern instabil ($\leq 20\%$), wird der Tumor weiter als schwach instabil (MSI-L) eingestuft. Bei 3 oder mehreren instabilen Markern wird der Tumor als MSI-H und bei jeglichem Fehlen einer Instabilität als MSS (mikrosatelliten stabil) klassifiziert. Daneben wurde vermerkt, dass Dinukleotidmarker nicht alleine, sondern nur in Kombination mit Mononukleotidmarkern verwendet werden sollten. Dies ist naheliegend, da insbesondere MSH6-Mutationen bevorzugt Mononukleotid-Repeats betreffen und auch gering ausgeprägte Allelverschiebungen zur Folge haben können. Andererseits kann es bei MSI/MMRD-positiven Tumoren sekundär, ganz selten auch primär als **Keimbahnmutation**, zum Ausfall von MSH3 kommen, was vor allem zur Instabilität an Tri- und Tetranukleotid-, seltener Dinukleotid-Repeats führt und als „elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotide repeats“ (EMAST) bezeichnet wird. Diese Form der MSI wird mit Mononukleotidpanels nicht erfasst [4].

Die Marker eines diskutierten **Pentaplexmononukleotidpanels** mit möglichst monomorphen (*quasi-monomorphen*) Mononukleotid-Repeats zeigen eine geringe, wenn auch noch vorhandene Allelvariabilität, sodass gleichzeitig detektierte Allelverschiebungen in mehreren (mindestens 3)

Das „NCI-Bethesda-Panel“ basiert auf den Mononukleotidmarkern BAT25 und BAT26 und den Dinukleotidmarkern D5S346, D2S123 und D17S250

Die Marker BAT25 und BAT26 zeigten die höchste Sensitivität zur Detektion von MSI

Die bei den gängigen DNA-Sequenziergeräten verwendete Kapillarelektrophorese liefert die höchstmögliche Fragmentlängenauftrennung

Bei NGS reicht die Zahl der untersuchten Mikrosatellitenloci von wenigen einzelnen Markern bis zu mehreren Tausend Loci

dieser „quasi-monomorphen“ Marker sehr unwahrscheinlich sind und daher als Folge eines Mismatch-repair-Defekts und als eine tumorspezifische Mikrosatelliteninstabilität interpretiert werden. Demnach sei ein MSI-H-Phänotyp möglicherweise auch ohne eine parallele Untersuchung von DNA aus Normalgewebe oder Blut als Normalkontrollmuster nachweisbar, was nach Erfahrung der Autoren speziell bei gering ausgeprägten Allelverschiebungen sehr kritisch zu sehen ist. In der dem Pentaplexmononukleotidpanel zugrunde liegenden Arbeit [5] wurde aufgrund von ethnisch-spezifischen Repeat-Varianten und der damit verbundenen Markervariabilität der „quasi-monomorphen“ Marker (BAT25, BAT26, NR21, NR22 und NR24) ein höherer Schwellenwert (30%; i.e. mindestens 3 von 5 instabilen Marker) angelegt. Wie bereits für das *NCI-Bethesda-Panel* zutreffend, zeigten die Marker BAT25 und BAT26 die höchste Sensitivität, MSI zu detektieren.

Aktuell stellen das *NCI-Bethesda-Panel*, bestehend aus den Markern BAT25, BAT26, D5S346, D2S123 und D17S250 (plus weitere 5 Marker bei MSI-L) und ein weiteres MSI-System, das BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 und MONO-27 als MSI-Marker sowie Penta-C und Penta-D als Marker zur Probenunterscheidung enthält, die am häufigsten verwendeten Systeme dar.

Nachweisverfahren

PCR mit Fragmentlängenbestimmung

Für die Analyse der Mikrosatelliteninstabilität sind verschiedene Verfahrensweisen möglich. Ein gängiges Standardverfahren ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit nachfolgender automatischer Fragmentlängenbestimmung. Mit diesen Verfahren können grundsätzlich alle Mikrosatelliten untersucht werden. Technisch liefert die bei den gängigen DNA-Sequenziergeräten verwendete Kapillarelektrophorese die höchstmögliche Fragmentlängenauftrennung, womit auch Allelverschiebungen von nur einem Basenpaar (bp) grundsätzlich erkennbar sind (Abb. 2). Derartige hochauflösende Kapillarelektrophoresegeräte, wie sie auch für die Sanger-Sequenzierung verwendet werden, sind somit bestens für Mikrosatellitenanalysen geeignet.

Neben der hochauflösenden Kapillarelektrophorese gibt es auch weitere elektrophoretische Analyseverfahren, die technisch bedingt, z. B. wegen deutlich geringerer Laufstrecke, jedoch eine geringere Fragmentlängenauftrennung der Mikrosatelliten aufweisen. Dabei werden z. B. Elektropherogramme mit Mikrosatelliten-Muster von DNA aus Tumor und Normalgewebe vergleichend mit einer Auflösung von etwa $\pm 2,5$ bp dargestellt, die vom Anwender zu interpretieren sind.

Geräte mit elektrophoretischem Verfahren, die konstruktionsbedingt keine hochauflösende Darstellung von 1- bis 2-bp-Allelverschiebungen ermöglichen und deren Einsatz eher für gröber auflösende Fragmentanalysen vorgesehen ist, können für eine valide MSI-Untersuchung nicht empfohlen werden.

MSI-PCR ohne Fragmentlängenbestimmung

Die Real-time-PCR mit nachfolgender „high resolution melting“ (HRM) bzw. **Denaturierungsprofilanalyse** stellt z. B. ein PCR-basierendes MSI-Analysesystem ohne Fragmentlängenanalysen dar.

MSI-Analyse mittels Next Generation Sequencing

Neben üblichen PCR-basierenden Systemen ist aktuell auch der Einsatz von Next Generation Sequencing (NGS) für die MSI-Analyse stark im Kommen. Der Vorteil einer NGS-basierenden MSI-Testung besteht dabei insbesondere darin, dass hier gleichzeitig eine umfassende Mutationsanalyse und, abhängig vom jeweiligen NGS-System (komplexe Genpanels, Whole Exome Sequencing), auch gleichzeitig eine Untersuchung der Tumor Mutational Burden (TMB) möglich ist. Da NGS-basierende MSI-Analysen bisher vorwiegend im Rahmen wissenschaftlicher Studien mit unterschiedlichen Analysestrategien durchgeführt wurden, sind die Auswahl und Anzahl der untersuchten Mikrosatellitenloci sowie die **Auswertekriterien** und -algorithmen sehr unterschiedlich und noch nicht standardisiert.

Die Zahl der untersuchten Mikrosatellitenloci reicht dabei von wenigen einzelnen Markern (5 Mikrosatellitenloci innerhalb eines 6-Gen-Panels, [6]) bis zu mehreren Tausend, z. B. 7317 Mikrosatellitenloci innerhalb eines 592-Gen-Panels [7]. Die Detektion instabiler Mikrosatellitenloci bei NGS-basierenden MSI-Analysen beruht im Prinzip auf der Quantifizierung der als unter-

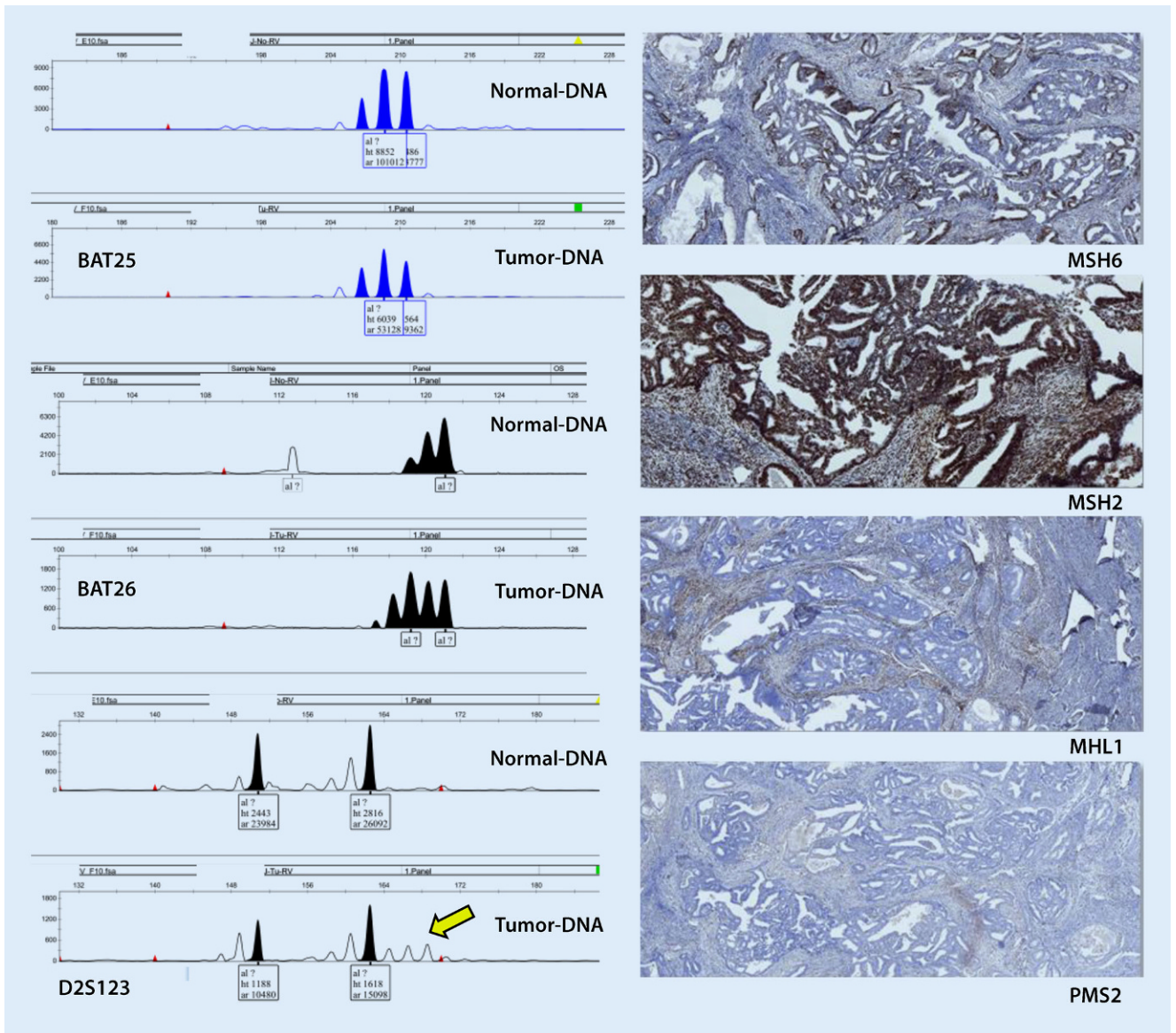


Abb. 2 ▲ Mikrosatellitenmuster bei einem Endometriumkarzinom mit *MLH1*-/*PMS2*-Expressionsausfall. In der Tumor-DNA: keine Allelverschiebung bei BAT25 und eine nur gering ausgeprägte Allelverschiebung bei BAT26. Deutlich ausgeprägte Allelverschiebung zu verlängerten Fragmenten bei D2S123 (Pfeil)

schiedlich lang detektierten (sequenzierten) „repeats“ an den jeweiligen Mikrosatellitenloci und einer statistischen Auswertung, meist im Vergleich mit einer **Normalkontrolle**, die entweder experimentell mitgeführt oder als bestehender Datensatz eingesetzt wird. Beispiele für publizierte und frei zugängliche Algorithmen sind 1) mSINGS [8], 2) MSIsensor [9] und 3) MANTIS [10].

Die Sensitivität und Spezifität der MSI-Detektion mittels NGS im Vergleich zur PCR-basierenden MSI-Analyse wird mit über 95 % (Sensitivität) bzw. 99 % (Spezifität) beschrieben (95,8 % bzw. 99,4 % [7]; 97 % bzw. 99 %: [10]). Die unterschiedliche Auswahl und Anzahl der Mikrosatellitenloci sowie verschiedene **Auswertelgorithmen** und -kriterien können naturgemäß zu unterschiedlichen Werten dieser Kenngrößen führen. Zudem stellen auch die unterschiedlichen zum Vergleich herangezogenen PCR-MSI-Untersuchungsverfahren eine Quelle der **Variabilität** dar. Eine Konkordanz von 99,4 % zwischen einer NGS-, einer PCR- oder einer auf einer Immunhistochemie (IHC) der Mismatch-Reparaturproteine basierenden Untersuchung wurde bei einem Kollektiv von insgesamt 138 Fällen kolorektaler und endometrialer Karzinome mit MSIsensor und einem MSIsensor-Score von 10 berichtet [11]. Diese Arbeit zeigt aber auch, dass die Schwellenwerte der jeweiligen MSI-Scores tumorentitätsspezifisch sein können und jeweilig angepasst

Die Sensitivität bzw. Spezifität der MSI-Detektion mittels NGS wird mit über 95 % bzw. 99 % beschrieben

Die MMR-Proteine bilden Heterodimere, wobei MSH2 an MSH6 und MLH1 an PMS2 bindet

Die Immunhistochemie stellt eine weit verbreitete Technologie zum verlässlichen indirekten Nachweis von MSI dar

Etwa 2–3 % der kolorektalen Karzinome und 0,8–1,4 % der Endometriumkarzinome sind mit Lynch-Syndrom assoziiert

und validiert werden müssen. In einer anderen Arbeit wurden anhand von **Whole-exome-Daten** von 11.139 Tumor-Normalgewebe-Paaren von 39 verschiedenen Tumorentitäten (Datensätze aus The Cancer Genome Atlas [TCGA], TARGET und anderen Studien) eine MSI-Analyse mittels des **MANTIS-Scores** durchgeführt [1]. Der relative MANTIS-Score und die tumorspezifische MSI-Häufigkeit zeigen sich auch hier tumorentitätsabhängig sehr variabel. In dieser Arbeit wurde auch untersucht, welche Mikrosatellitenloci sich am besten für eine MSI-Analyse für die Mehrheit der verschiedenen Tumorentitäten eignen. Dabei konnten 22 Loci aus 2530 Mikrosatellitenloci identifiziert werden, von denen interessanterweise keine in den besprochenen Panels enthalten sind. Dies spricht wiederum für eine Heterogenität der MSI-Muster und -Kriterien in verschiedenen Tumortypen, die bei einer MSI-Untersuchung berücksichtigt werden sollte.

Mittlerweile werden auch verschiedene kommerziell verfügbare NGS-basierende MSI-Analysesysteme angeboten, die auf verschiedenen Geräteplattformen einsetzbar sind und meist über **proprietäre Auswertetools** verfügen. Für eine Anwendung in der diagnostischen Routine wird dabei auf jeden Fall eine eingehende Validierung im Labor empfohlen.

Nachweis der Mismatch-Reparaturgen-Defizienz

Mithilfe der IHC lässt sich der der Mikrosatelliteninstabilität zugrunde liegende Funktionsverlust in einem der wesentlichen Mismatch-Reparaturgene (*MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS2*) relativ einfach als ein Ausfall der Immunreaktion in den Tumorzellkernen nachweisen. Für die Interpretation der Färbegergebnisse bei Einsatz des 4er-IHC-Markerpanels ist die Kenntnis der Funktionsweise der MMR-Proteine hilfreich. Die Proteine bilden Heterodimere, wobei MSH2 an MSH6 und MLH1 an PMS2 bindet [4]. Bei Ausfall des 1. Bindungspartners kommt es typischerweise auch zum Ausfall des 2. Bindungspartners während im umgekehrten Falle (Ausfall von MSH6 oder PMS2) der erste Bindungspartner weiterhin nachweisbar ist (▣ **Abb. 2**). Aufgrund dieses Sachverhalts kann man im diagnostischen Alltag auch zur Kostenersparnis in einem ersten Untersuchungsschritt zunächst mit einem 2er-IHC-Markerpanel (bevorzugt PMS2 und MSH6) beginnen und im Fall eines Expressionsausfalls noch den zugehörigen 1. Bindungspartner ergänzen.

Da der Expressionsverlust einer der MMR-Proteine zur MSI führt, stellt die IHC als eine weit verbreitete und kostengünstige Technologie ein verlässliches indirektes Nachweisverfahren von MSI dar. Genau genommen identifiziert man mithilfe der IHC – im Unterschied zum direkten MSI-Nachweis – einen Tumor vom MSI-Typ. Nur bei unklaren immunhistochemischen Befunden mit nicht eindeutigen Expressionsausfall in weniger als 90 % der Tumorzellen oder bei fehlender Färbung im Normalgewebe (als interner Kontrolle) wird zur Absicherung eine MSI-Analyse empfohlen.

Anwendungsbereiche der MSI/MMRD-Testung

Die Notwendigkeit des MSI/MMRD-Nachweises liegt in der klinischen Bedeutung als Prädispositions-, Prognose- und als Prädiktionsmarker.

Prädispositionsmarker für klassisches Lynch-Syndrom

Mit Aufklärung der dem klassischen LS zugrunde liegenden Mutationen in einem der 4 MMR-Gene (40 % *MLH1*, 34 % *MSH2*, 18 % *MSH6*, 8 % *PMS2*) oder des mit *EPCAM* assoziierten „*MSH2* silencing“ [12] stand über mehr als 2 Jahrzehnte der Nachweis von MSI bzw. des Ausfalls der MMR-Proteine im Tumorgewebe als **Screeningverfahren** auf LS im Vordergrund. Die Autoren haben dazu mehrfach in dieser Zeitschrift berichtet (Rüschoff et al. 1998, 2004, 2010; [13]; Rau et al. 2017; Übersicht in: [14]).

Beim LS bilden das Kolonkarzinom mit einem Lebenszeitrisiko von etwa 50–80 % und das Endometriumkarzinom mit einem Lebenszeitrisiko von 25–60 % die beiden am häufigsten auftretenden Tumoren, gefolgt von Ovar-, Magen-, Harntrakt- und Dünndarmkarzinomen sowie Talgdrüsentumoren der Haut mit je einem Lebenszeitrisiko von 10–20 %. Dementsprechend sind etwa 2–3 % der KRK und 0,8–1,4 % der Endometriumkarzinome mit LS assoziiert [15]. Aufgrund dieser Frequenz war eine grundsätzliche Testung aller KRK auf MSI lange Zeit umstritten und selbst in der aktuellen S3-Leitlinie zum KRK wird dies nicht empfohlen [16]. Eine MSI/MMRD-

Testung ist demnach nur dann angezeigt, wenn eines der Bethesda-Kriterien erfüllt ist. Da dies die Berücksichtigung der **Familienanamnese** impliziert und eine grundsätzliche Tumortestung nur bei Patienten <50 Jahren (oder <60 Jahren mit „typischer“ Histologie) beinhaltet, wird von einer hohen Dunkelziffer des LS ausgegangen. Im klinischen Alltag werden schätzungsweise bis zu 40 % der LS-Familien nicht erkannt [17]. So geht H. Hample aus der Forschungsgruppe um A. de la Chapelle, Ohio State University, USA, davon aus, dass allein aufgrund der Familienanamnese etwa 25 % der mit LS assoziierten KRK und 65 % der LS-assoziierten Endometriumkarzinome verkannt werden [18].

Zur Verbesserung der Erfassung des LS wird heute eine grundsätzliche MSI/MMRD-Testung aller erstdiagnostizierten KRK vom englischen Nationalen Institut für Gesundheit (NICE) empfohlen, wobei zuerst eine immunhistochemische Prüfung der 4 Reparaturgene erfolgen sollte [19]. Das US amerikanische Nationale Cancer Netzwerk (NCCN) empfiehlt eine universelle MSI/MMRD-Testung aller KRK und Endometriumkarzinome [20].

Prognosemarker

Die prognostische Bedeutung von MSI/MMRD ist heute je nach Organtumor und Tumorstadium differenziert zu beurteilen. Etwa 15 % der KRK weisen eine MSI/MMRD auf, die zumeist auf eine erworbene **Promotormethylierung** des *MLH1*-Gens zurückzuführen und in etwa 60 % mit *BRAF*(V600E)-Mutation assoziiert ist. Diese Tumoren zeigen in frühen Stadien (I und II) ohne Chemotherapie eine im Mittel um etwa 10–15 % verbesserte progressionsfreie 5-Jahres-Überlebensrate (Übersicht in [21, 22]). Dies impliziert, dass MSI/MMRD-Tumoren häufiger nicht metastasiert sind und somit fernmetastasierte Karzinome im Stadium IV deutlich seltener, in nur etwa 5 %, mit MSI/MMRD einhergehen. Für genau diese Gruppe wurde in jüngsten Metaanalysen gezeigt, dass hier MSI/MMRD mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist. Dabei zeigten *BRAF*-mutierte MMR-intakte (MSS/MMRP) und MSI/MMRD-Tumoren ein nahezu identisch auf 11 Monate verkürztes mittleres Überleben. Es wird vermutet, dass die in beiden Gruppen nachgewiesene ***BRAF*-Mutation** den entscheidenden ungünstigen Prognosefaktor bildet [23]. Fujiyoshi et al. [24] beobachteten kürzlich ein deutlich besseres Überleben bei MSI/MMRD-Stadium-IV-Karzinomen mit dominant **peritonealer Aussaat** gegenüber solchen mit überwiegend hämatogener und lymphogener Metastasierung. Dabei zeigten die Tumoren mit peritonealer Aussaat im Unterschied zu den primär fernmetastasierten Karzinomen keine *BRAF*-Mutation. Ein weiterer Hinweis dafür, dass *BRAF* auch bei MSI/MMRD-KRK im fortgeschrittenen Stadium einen ungünstigen Prognosefaktor darstellt. Möglicherweise muss dies auch bei MSI/MMRD-Tumoren im Stadium III berücksichtigt werden; dieses Kollektiv wies eine gegenüber MSS-Tumoren im Stadium III sogar ungünstigere Prognose auf [25]. Die Beziehung zwischen *BRAF*-Mutations- und MSI-Status ist Gegenstand einer großen Metaanalyse mit 24.067 KRK-Patienten [26]. Bei kombinierter Betrachtung beider Parameter sollte zur Prognosebeurteilung zunächst der *BRAF*-Mutationsstatus herangezogen und dann die Einteilung nach MSI/MMRD+/- erfolgen. Im Stadium I–III weisen *BRAF*mut-/MSS-Tumoren die ungünstigste Prognose, Tumoren mit *BRAF*wt-/MSS und *BRAF*mut/MSI+/- vergleichbare und Tumoren mit *BRAF*wt/MSI die beste Prognose auf. Im Stadium IV ist dagegen MSI/MMRD unabhängig vom *BRAF*-Status ein ungünstiger Prognosefaktor.

Diese Daten stellen die in der **Weltgesundheitsorganisation** (WHO, 2010, [27]) pauschal für alle MSI-H-KRK angegebene Klassifikation als „low grade“ Tumoren infrage. Man sollte zumindest in einem Kommentar ergänzen, dass die prognostische Bedeutung je nach Stadium (I/II/III vs. IV) unterschiedlich zu bewerten ist.

Nach dem Kolonkarzinom weisen noch das Endometrium- und Magenkarzinom relativ häufig MSI/MMRD auf (Abb. 1). Beim Endometriumkarzinom ist die Datenlage bezüglich der prognostischen Relevanz widersprüchlich. In einer aktuellen populationsbasierten australischen Studie zeigen nur die MSI/MMRD-Karzinome mit erblichem Hintergrund eine günstigere Prognose, während die sporadischen instabilen Tumoren auch im Vergleich zu den MSS-Tumoren deutlich ungünstiger verlaufen [28]. In einer weiteren aktuellen Studie mit 138 analysierten Karzinomen wurde gezeigt, dass MSI/MMRD- (29 %) und vor allem *POLE*-mutierte (8,7 %) Endometriumkarzinome ein günstigeres progressionsfreies Überleben gegenüber der Kontrollgruppe aufwiesen allerdings ohne signifikante Unterschiede im tumorspezifischen Gesamtüberleben [29]. Im Un-

Das NICE empfiehlt eine grundsätzliche MSI/MMRD-Testung aller erstdiagnostizierten kolorektalen Karzinome zur LS-Erfassung

MSI/MMRD-Tumoren sind häufiger nicht metastasiert

Beim Endometriumkarzinom ist die Datenlage bezüglich der prognostischen Relevanz widersprüchlich

terschied dazu erweist sich MSI/MMRD beim Magenkarzinom als günstiger Prognosefaktor weitgehend stadienunabhängig (Review in: [30]). Unabhängig von diesen teilweise widersprüchlichen Daten zur prognostischen Relevanz liegt heutzutage die Bedeutung der MSI/MMRD-Testung vor allem in der prädiktiven Wertigkeit.

MSI/MMRD als prädiktiver Marker

Mit Einführung **PD-1-/PD-L1-gerichteter Checkpointtherapien** hat die Bestimmung des MSI/MMRD-Status erheblich an Bedeutung gewonnen. In einer ersten Phase-II-Studie an fortgeschrittenen kolischen und extrakolischen instabilen soliden Tumoren zeigte sich eine Responderate von 71 % [31]. Diese führte im Jahr 2017 seitens der Food and Drug Administration (FDA) zur ersten von der Tumorlokalisation unabhängigen („tumor agnostic“) Zulassung eines molekularen Tests als Grundlage zur Therapieentscheidung für ein PD-1-gerichtetes Medikament (Pembrolizumab).

Die European Medicines Agency (EMA) hat sich dieser Vorgehensweise nicht angeschlossen und fordert eine auf die jeweilige Tumorentität bezogene Prüfung des Vorhersagewerts von MSI/MMRD bei Checkpointtherapien. Inzwischen konnten die Daten bei Ausdehnung auf 12 verschiedene Tumorentitäten [32] und auch in einzelnen weiteren extrakolischen Organtumorserien bestätigt werden [33, 34].

In der Arbeit von Lee et al. [31] wurde mittels NGS nachgewiesen, dass MSI mit einer überdurchschnittlichen Akkumulation von Mutationen in der Tumorzelle verbunden ist (1782 vs. 73 Mutationen/Tumorgenom). Damit treten in MSI/MMRD-Karzinomen eine Vielzahl von **Neoantigenen** auf, die zur Aktivierung des Immunsystems führen. Aktuell wurde gezeigt, dass das MSI-Ausmaß und das Immunresponseprofil bei Lynch-assoziierten MSI/MMRD-positiven Tumoren eng miteinander verknüpft sind [35]. Die **tumorspezifische Immunantwort** wird dann mithilfe der Checkpointtherapie weiter verstärkt bzw. (re)aktiviert. Letztlich ist MSI somit Ausdruck einer erhöhten Tumormutationslast, die inzwischen mit NGS-basierten Verfahren zusätzlich zum MSI-Status bestimmt werden kann und Gegenstand klinischer Prüfungen als weiterer prädiktiver Marker für Checkpointtherapien ist.

Gegenüber dieser immunprädiktiven Anwendung tritt die Bedeutung der MSI/MMRD-Bestimmung zur Vorhersage des Ansprechens auf Chemotherapie aktuell in den Hintergrund. Generell erscheinen MSI/MMRD-Tumoren gegenüber 5-Fluoruracil(FU)-basierten Therapien tendenziell resistent zu sein. Dazu passen präklinische Daten, dass für eine 5-FU-Chemosensitivität die Erkennung eines 5-Fluoro-2'-deoxyuridine-5'-triphosphat(5-FdUTP)-Einbaus in die DNA durch ein intaktes MMR-System (MSS) erforderlich ist [13]. Allerdings ist die Datenlage beim Kolonkarzinom nicht eindeutig. In 2 größeren Metanalysen [21, 36] besteht zwar ein Trend dahingehend, dass MSI/MMRD-Kolonkarzinome weniger von 5-FU als die MSS-Tumoren profitieren, dieser Unterschied ist aber auch im Stadium II nicht statistisch signifikant. Gleichwohl wird in den NCCN-Empfehlungen vom Einsatz einer 5-FU-basierten Therapie im Stadium II abgeraten, da in diesem Tumorstadium MSI/MMRD mit einer günstigen Prognose assoziiert ist, die durch Chemotherapie auch bei bestehenden Risikofaktoren nicht verbessert werden kann.

Im Unterschied dazu ist die Datenlage beim operablen Magenkarzinom eindeutig. In einer retrospektiven Analyse der MAGIC-Studie lag die mittlere 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit MSI/MMRD-Karzinom bei 70 %; kam es in dieser Tumorgruppe zum Einsatz einer perioperativen Chemotherapie, fiel die Überlebensrate deutlich auf nur 18 % ab [37]. In der unbehandelten Gruppe ist MSI/MMRD mit günstiger Prognose, im Behandlungsarm hingegen mit ungünstigem Outcome als Ausdruck der MSI-assoziierten Chemoresistenz gegenüber 5-FU-basierten Therapien verbunden. Die Autoren der Studie folgern, dass beim Magenkarzinom an den präoperativ entnommenen Biopsien MSI/MMRD bestimmt werden sollte, um die für eine perioperative Chemotherapie geeigneten Patienten herauszufinden. Inzwischen konnten die Ergebnisse in einer unabhängigen japanischen Studie bestätigt werden [34]. In einer aktuellen Tumorkohorte mit 101 kaukasischen Patienten wiesen dagegen die 9 MSI-H Fälle trotz perioperativer Chemotherapie einen gegenüber MSS günstigeren Verlauf auf, was bei histologisch nachgewiesener Non-Response (in 8/9 Pat.) vermutlich eher Beleg für die stadienunabhängige prognostische Bedeutung von MSI beim Magenkarzinom als Ausdruck eines Zusatzeffekts der Chemotherapie ist [38].

Die EMA fordert eine auf die jeweilige Tumorentität bezogene Prüfung des Vorhersagewerts von MSI/MMRD bei Checkpointtherapien

MSI ist mit einer überdurchschnittlichen Akkumulation von Mutationen in der Tumorzelle verbunden

MSI/MMRD-Tumoren scheinen generell gegenüber 5-Fluoruracil-basierten Therapien tendenziell resistent zu sein

Beim Magenkarzinom sollte zur Wahl geeigneter Patienten für eine perioperative Chemotherapie MSI/MMRD präoperativ bestimmt werden

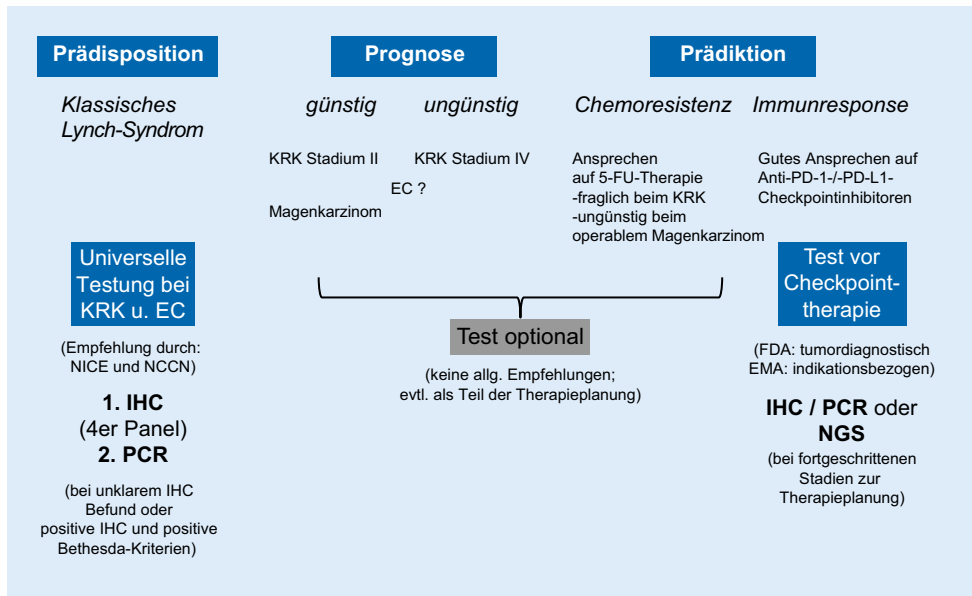


Abb. 3 ▲ Anwendungsgebiete und Testalgorithmus der Testung bezüglich Mikrosatelliteninstabilität/Mismatch-Reparaturen-Defizienz. *Prädipositionsdiagnostik:* Zum Screening auf Lynch-Syndrom wird die universelle („Reflex“-)Testung kolorektaler und endometrialer Karzinome mittels IHC empfohlen, dies erlaubt gleichzeitig die Identifikation des zugrunde liegenden Gendefekts. *Prognose:* MSI/MMRD gelten beim Magenkarzinom als günstiger Prognosemarker; beim KRK sollten Tumorstadium und *BRAF*-Status mit berücksichtigt werden. *Prädiktion:* Bei fortgeschrittenen Karzinomen ist MSI/MMRD ein etablierter Biomarker für das Ansprechen auf eine checkpointgerichtete Immuntherapie unabhängig vom Tumortyp („tumor agnostic“). Die Bedeutung als Indikator für eine 5-FU-Chemoresistenz ist für das KRK und Magenkarzinom belegt. *EC* Endometriumkarzinom, *EMA* European Medicines Agency, *FDA* Food and Drug Administration, *5-FU* 5-Fluoruracil, *IHC* Immunhistochemie, *KRK* kolorektales Karzinom, *MMRD* Mismatch-Reparaturen-Defizienz, *MSI* Mikrosatelliteninstabilität, *NGS* Next Generation Sequencing, *PCR* Polymerase-Kettenreaktion

MSI/MMRD-Testalgorithmus

Derzeitig weist kaum ein Biomarker in der Onkologie ein solches **breites Indikationsspektrum** auf wie MSI/MMRD, dieser sollte somit zum diagnostischen Standardrepertoire gehören. Die Frage aber, welches Testverfahren dabei am geeignetsten ist, wird allerdings unterschiedlich beantwortet. Angesichts der aktuell in den Vordergrund gerückten Bedeutung als Prädiktor für Checkpointtherapie ist eine Reihe von Testverfahren auf den Markt gekommen auch mit dem Argument, diese seien der immunhistochemischen Testung (IHC) überlegen. Dabei wird gerne auf frühere Studien Bezug genommen, in denen entweder nur *MLH1* und *MSH2* geprüft oder die eingesetzten Antikörper, speziell für die Testung von *MSH6* und *PMS2*, häufig noch zu unspezifischen Kreuzreaktionen neigten. Bei den heute zur Verfügung stehenden Klonen und der verfügbaren **Qualitätssicherung** (QuIP) ist die Sachlage allerdings differenzierter zu betrachten.

Die höchste Korrelation zwischen MSI-Test und MMRD-Befund ergibt sich für das KRK (ca. 98 %) mit einer Sensitivität von etwa 95 % und einer Spezifität von 100 % [39]. Anders verhält es sich bei extrakolischen Tumoren, vor allem beim Endometriumkarzinom. Stelloo et al. [40] haben von 854 Studienpatienten in 696 Fällen den MSI-Test, welcher BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 und MONO-27 als MSI-Marker sowie Penta-C und Penta-D als Marker zur Probenunterscheidung enthält, mit dem immunhistochemischen MMRD-Ergebnis (4er-ich-Panel) verglichen. Die Konkordanz zwischen MSI und MMRD lag bei 94 % (Übereinstimmung in 655 Fällen). Diskordanzen fanden sich in 6 % ($n = 41$), wobei in der Hälfte der Fälle (20 von 41) ein stabiler Testbefund (MSS/MSI-L) mit vollständigem Ausfall eines der 4 MMR-Proteine einhergehend, 12-mal *MLH1/PMS2* (davon 10-mal mit nachgewiesener *MLH1*-Promotormethylierung), 5-mal isoliert *MSH6*, 2-mal isoliert *PMS2* und 1-mal *MSH2/MSH6*. Insgesamt wurden 50 % der Endometriumkarzinome mit komplettem *MSH6*-Verlust (5 von 10) mittels PCR fälschlicherweise stabil (MSS; 2-mal) oder MSI-L (3-mal) klassifiziert. Nur in 2 der diskordanten Fälle fand sich eine erhaltene MMR-Expression trotz MSI-H-Befund; hier ließ sich der MSI-H-Befund auf eine Muta-

Beim Endometriumkarzinom lag die Konkordanz zwischen MSI und MMRD bei 94 %

In einer aktuellen großen Serie waren 16,3% der mittels NGS als MSI-H klassifizierten Malignome mit LS assoziiert

tion im **POLE-Gen** zurückführen. Weiteren 18 diskordanten Fällen (43,9%) lag eine in der 1. PCR nicht erfasste Heterogenität mit subklonalen MMR-Ausfällen zugrunde, die sich nach **Mikrodissektion** aufklären ließen (Nachweis einer herdförmigen MSI-H). Diese Zahlen verdeutlichen, dass sich die Frage nach dem zur MSI-Analyse am besten geeigneten Untersuchungsverfahren nicht einfach anhand der Daten für das KRK beantworten lässt. Offenbar bestehen erhebliche Unterschiede je nach Organ, sodass für das Endometriumkarzinom ein PCR-basierter MSI-Test nicht uneingeschränkt empfohlen werden kann [41].

Auch wenn davon auszugehen ist, dass die MSI-Analyse mittels NGS möglicherweise eine gegenüber PCR-basierten Testverfahren höhere Sensitivität aufweist, ist auch bei primär prädiktiver Testintention zur Abklärung von **Therapietargets** bei fortgeschrittenen Karzinomen auf die Bedeutung einer ggf. zusätzlich durchzuführenden MMR-Protein-Untersuchung hinzuweisen.

In einer aktuellen großen Serie von 15.045 mittels NGS auf MSI getesteter Malignome wurde gezeigt, dass 16,3% der so als MSI-H klassifizierten Malignome mit LS assoziiert waren (bei MSI-L: 1,9%; bei MSS: 0,3%). Dabei wurde nur die Hälfte der LS über die typischerweise häufig assoziierten Neoplasien des Kolorektums und Endometriums identifiziert. Die andere Hälfte betrafen **Indextumoren** aus Magen, Harntrakt, Prostata, Pankreas, Nebennierenrinde, Dünndarm sowie Sarkome, Melanome und Keimzelltumoren. Bis auf einen Tumor ließ sich das zugrunde liegende betroffene MMR-Gen auch in diesen seltenen Lokalisationen mittels IHC eindeutig abgrenzen [42].

Somit empfiehlt es sich, bei mit primär prädiktiver Intention an fortgeschrittenen Karzinomen erhobenem positivem MSI-Test eine immunhistochemische MMR-Testung anzuschließen, auch bei Tumoren, die nicht prima vista dem (vermeintlich) typischen Lynch-Tumor-Spektrum zugehören (▣ Abb. 3).

Fazit für die Praxis

- Für die Bestimmung der Mikrosatelliteninstabilität (MSI) stehen 2 unterschiedliche Verfahren zur Verfügung, die auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierten direkten und die indirekten immunhistochemischen Nachweismethoden.
- Beide Verfahren weisen eine hohe Präzision auf und unterscheiden sich im Wesentlichen darin, dass mittels Immunhistochemie der der MSI zugrunde liegende Mismatch-Reparaturgen-Defekt (MMRD) bestimmt werden kann. Als eine weithin in der Pathologie verfügbare Technologie wird diese vor allem zum Screening auf MSI/MMRD-Tumoren empfohlen.
- Zur Therapieentscheidung bei fortgeschrittenen Karzinomen, insbesondere auch zur Frage einer Checkpointtherapie, wird MSI zunehmend als Teil einer multigenbasierten Diagnostik (z. B. Next Generation Sequencing) mitbestimmt.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. J. Rüschoff
 Institut für Pathologie Nordhessen
 Germaniastr. 7, 34119 Kassel, Deutschland
 rueschoff@patho-nordhessen.de

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. Gemäß den Richtlinien des Springer Medizin Verlags werden Autoren und Wissenschaftliche Leitung im Rahmen der Manuskripterstellung und Manuskriptfreigabe aufgefordert, eine vollständige Erklärung zu ihren finanziellen und nichtfinanziellen Interessen abzugeben.

Autoren. **Wolfgang Dietmaier:** A. Finanzielle Interessen: Teilnahme an Expertentreffen mit Honorar und Kostenerstattung von Novartis, Roche und AstraZeneca – B. Nichtfinanzielle Interessen: Leitung Bereich Molekularpathologie, Universität Regensburg, Institut für Pathologie | Mitgliedschaft: DGP. **Reinhard Büttner:** A. Finanzielle Interessen: Mitbegründer und CSO von Targos Molecular Pathology GmbH, Kassel – B. Nichtfinanzielle Interessen: Direktor des Instituts für Pathologie, Universitätsklinikum Köln | Mitgliedschaften: DGP, IAP, AACR, IASLC, DKH. **Josef Rüschoff:** A. Finanzielle Interessen: Advisory Boards: Merck, Roche – B. Nichtfinanzielle Interessen: Niedergelassener Pathologe, Pathologie Nordhessen, Kassel | Medizinischer Leiter, Targos Molecular Pathology GmbH, Kassel | Mitgliedschaften: Deutsche Gesellschaft für Pathologie, Berufsverband Deutscher Pathologen.

Wissenschaftliche Leitung. Die vollständige Erklärung zum Interessenkonflikt der Wissenschaftlichen Leitung finden Sie am Kurs der zertifizierten Fortbildung auf www.springermedizin.de/cme.

Der Verlag erklärt, dass für die Publikation dieser CME-Fortbildung keine Sponsorengelder an den Verlag fließen.

Für diesen Beitrag wurden von den Autoren keine Studien an Menschen oder Tieren durchgeführt. Für die aufgeführten Studien gelten die jeweils dort angegebenen ethischen Richtlinien.

Literatur

- Bonneville R, Krook MA, Kautto EA et al (2017) Landscape of Microsatellite Instability Across 39 Cancer Types. *JCO Precis Oncol* 1:1–15
- Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T et al (1997) Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res* 57:4749–4756
- Umar A, Boland CR, Terdiman JP et al (2004) Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 96:261–268
- Carethers JM (2017) Microsatellite instability pathway and EMAS in colorectal cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep* 13:73–80
- Suraweera N, Duval A, Reperant M et al (2002) Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* 123:1804–1811
- Kloth M, Ruessler V, Engel C et al (2016) Activating ERBB2/HER2 mutations indicate susceptibility to pan-HER inhibitors in Lynch and Lynch-like colorectal cancer. *Gut* 65:1296–1305
- Vanderwalde A, Spetzler D, Xiao N et al (2018) Microsatellite instability status determined by next-generation sequencing and compared with PD-L1 and tumor mutational burden in 11,348 patients. *Cancer Med* 7:746–756
- Salipante SJ, Scroggins SM, Hampel HL et al (2014) Microsatellite instability detection by next generation sequencing. *Clin Chem* 60:1192–1199
- Niu B, Ye K, Zhang Q et al (2014) MSIsensor: Microsatellite instability detection using paired tumor-normal sequence data. *Bioinformatics* 30:1015–1016
- Kautto EA, Bonneville R, Miya J et al (2017) Performance evaluation for rapid detection of pan-cancer microsatellite instability with MANTIS. *Oncotarget* 8:7452–7463
- Middha S, Zhang L, Nafa K et al (2017) Reliable pan-cancer microsatellite instability assessment by using targeted next-generation sequencing data. *JCO Precis Oncol*. <https://doi.org/10.1200/PO.17.00084>
- Peltomäki P (2016) Update on Lynch syndrome genomics. *Fam Cancer* 15:385–393
- Dietmaier W (2010) Microsatellite instability. A new predictive marker (?). *Pathologie* 31(Suppl2):268–273
- Rüschoff J, Büttner R (2013) Hereditäre Tumoren. In: Stolte M, Rüschoff J, Klöppel G (Hrsg) *Verdauungstrakt und Peritoneum*. Pathologie. Springer, Berlin Heidelberg, S227–259
- Kohlmann W, Gruber SB (2018) Lynch syndrome. Synonyms: HNPCC, hereditary non-Polypoidosis colon cancer. *Genereviews*[®], last revision: April 12, 2018. www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1211/. Zugegriffen: 16. Mai 2019
- AWMF: S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom (2019). AWMF-Registernummer: 021/007OL
- Schneider R, Schneider C, Büttner R et al (2015) Colorectal carcinoma with suspected Lynch syndrome: a multidisciplinary algorithm. *Zentralbl Chir* 140:591–599
- Hampel H (2018) Universal tumor screening for lynch syndrome: Past, present and future. (Oral presentation)
- Molecular testing strategies for Lynch syndrome in people with colorectal cancer. <https://www.nice.org.uk/guidance/dg27/chapter/1-Recommendations>. Zugegriffen: 04. Mai 2019
- Aiming to prevent hereditary cancers, researchers focus on Lynch syndrome. <https://www.cancer.gov/about-cancer/screening/research/lynch-syndrome-hereditary-cancers>. Zugegriffen: 04. Mai 2019
- Copija A, Waniczek D, Witkoś A et al (2017) Clinical significance and prognostic relevance of microsatellite instability in sporadic colorectal cancer patients. *Int J Mol Sci* 18(1). <https://doi.org/10.3390/ijms18010107>
- Richman S (2015) Deficient mismatch repair: read all about it (review). *Int J Oncol* 47:1189–1202
- Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS et al (2014) Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. *Clin Cancer Res* 20:5322–5330
- Fujiyoshi K, Yamamoto G, Takenoya T et al (2017) Metastatic pattern of stage IV colorectal cancer with high-frequency microsatellite instability as a prognostic factor. *Anticancer Res* 37:239–247
- Mohan HM, Ryan E, Balasubramanian I et al (2016) Microsatellite instability is associated with reduced disease specific survival in stage III colon cancer. *Eur J Surg Oncol* 42:1680–1686
- Yang Y, Wang D, Jin L et al (2018) Prognostic value of the combination of microsatellite instability and BRAF mutation in colorectal cancer. *Cancer Manag Res* 10:3911–3929
- Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND (2010) WHO Classification of tumours of the digestive system, 4. Aufl.
- Nagle CM, Tracy A, O'Mara TA et al (2018) Endometrial cancer risk and survival by tumor MMR status. *J Gynecol Oncol* 29(3):e39
- Haruma T, Nagasaka T, Nakamura K et al (2018) Clinical impact of endometrial cancer stratified by genetic mutational profiles, POLE mutation, and microsatellite instability. *PLoS ONE* 13(4):e195655
- Vrána D, Matzenauer M, Neoral C et al (2019) From tumor immunology to immunotherapy in gastric and esophageal cancer. *Int J Mol Sci* 20:13
- Le DT, Uram JN, Wang H et al (2015) PD-1 Blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med* 372:2509–2520
- Le DT, Durham JN, Smith KN et al (2017) Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* 357:409–413
- Abida W, Cheng ML, Armenia J et al (2018) Analysis of the prevalence of microsatellite instability in prostate cancer and response to immune checkpoint blockade. *JAMA Oncol*. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.5801>
- Hashimoto T, Kurokawa Y, Takahashi T et al (2019) Predictive value of MLH1 and PD-L1 expression for prognosis and response to pre-operative chemotherapy in gastric cancer. *Gastric Cancer*. <https://doi.org/10.1007/s10120-018-00918-4>
- Binder H, Hopp L, Schweiger MR et al (2017) Genomic and transcriptomic heterogeneity of colorectal tumours arising in Lynch syndrome. *J Pathol* 243:242–254

36. Webber EM, Kauffman TL, O'Connor E et al (2015) Systematic review of the predictive effect of MSI status in colorectal cancer patients undergoing 5FU-based chemotherapy. *BMC Cancer* 15:156
37. Smyth EC, Wotherspoon A, Peckitt C et al (2017) Mismatch repair deficiency, microsatellite instability, and survival: An exploratory analysis of the medical research council adjuvant gastric infusional chemotherapy (MAGIC) trial. *JAMA Oncol* 3:1197–1203
38. Haag GM, Czink E, Ahadova A et al (2019) Prognostic significance of microsatellite-instability in gastric and gastroesophageal junction cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy. *Int J Canc* 144(7):1697–1703
39. Engel C, Forberg J, Holinski-Feder E et al (2006) Novel strategy for optimal sequential application of clinical criteria, immunohistochemistry and microsatellite analysis in the diagnosis of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Int J Cancer* 118:115–122
40. Stelloo E, Jansen AML, Osse EM et al (2017) Practical guidance for mismatch repair-deficiency testing in endometrial cancer. *Ann Oncol* 28:96–102
41. Powell MA (2017) Immunohistochemistry to determine mismatch repair-deficiency in endometrial cancer: the appropriate standard. *Ann Oncol* 28:9–10
42. Latham A, Srinivasan P, Kemel Y et al (2019) Microsatellite instability is associated with the presence of lynch syndrome pan-cancer. *J Clin Oncol* 37:286–295

CME-Fragebogen

Teilnahme am zertifizierten Kurs auf CME.SpringerMedizin.de

- Der Teilnahmezeitraum beträgt 12 Monate, den Teilnahmeschluss finden Sie online beim CME-Kurs.
- Fragen und Antworten werden in zufälliger Reihenfolge zusammengestellt.
- Pro Frage ist jeweils nur eine Antwort zutreffend.
- Für eine erfolgreiche Teilnahme müssen 70 % der Fragen richtig beantwortet werden.

? Durch welchen Reparaturenverlust wird Mikrosatelliteninstabilität (MSI) am häufigsten verursacht?

- MSI wird etwa gleichhäufig durch Mutationen in den 4 verschiedenen Mismatch-repair-Genen (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) hervorgerufen.
- MSI ist praktisch immer mit einer erblichen Tumordisposition, dem Lynch-Syndrom, assoziiert und betrifft meistens das *MSH6*-Gen.
- MSI wird vor allem durch Promotormethylierung des *MLH1*-Gens verursacht.
- MSI wird vor allem durch den kombinierten Ausfall von *MLH1* und *MSH6* hervorgerufen.
- MSI wird meistens durch eine erworbene Promotormethylierung im *MSH2*-Gen ausgelöst.

? Wann kann ein Tumor als mikrosatelliteninstabil bzw. als Tumor vom Mikrosatelliteninstabilität(MSI)-Typ bezeichnet werden?

- Wenn mindestens ein Mikrosatellitenmarker des Bethesda-Panels des National Cancer Institute (NCI) eine Instabilität aufweist.
- Wenn sich immunhistochemisch im Tumor typischerweise ein Ausfall der Expression von *MLH1* und *PMS2* oder von *MSH2* und *MSH6* nachweisen lässt.
- Nur wenn *MLH1* und *MSH2* immunhistochemisch keine spezifische nukleäre Färbung im Tumorgewebe aufweisen.
- Die Diagnose MSI kann erst dann als gesichert gelten, wenn der immunhistochemische Ausfall der Mismatch-repair-Gen-Expression durch eine auf einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierten Testung abgesichert worden ist.

- Diese Diagnose ist erst mit Einführung von auf Next Generation Sequencing (NGS) basierten Methoden zuverlässig zu stellen.

? Warum können für die Testung der Mikrosatelliteninstabilität (MSI) Mononukleotidprimerpanels das Bethesda-Panel nicht vollständig ersetzen?

- Die Nutzung eines Pentaplex-Mononukleotid-Panels ist auf einen Schwellenwert von einem instabilen Marker angelegt.
- Das Bethesda-Panel erfasst auch Instabilitäten an Dinukleotid-Repeats, die vor allem bei Karzinomen, in denen auch ein *MSH3*-Funktionsverlust vorliegt, erfassen.
- Mononukleotidpanels sind praktisch nur für den MSI-Nachweis im Endometriumkarzinom besonders gut geeignet.
- Nur mithilfe des Bethesda-Panels lassen sich intratumorale klonale Heterogenitäten zuverlässig erfassen.
- Das Bethesda-Panel ist bezüglich Sensitivität und Standardisierung mononukleotidbasierten Panels überlegen.

? Bei welcher Vorgehensweise ist mit einer Verbesserung der Erkennung eines der häufigsten Tumordispositionssyndrome, dem Lynch-Syndrom (vormals HNPCC), zu rechnen?

- Die gezielte Befragung von männlichen Patienten nach Kolonkarzinomen und von weiblichen Patientinnen nach Endometriumkarzinomen in der Familie.
- Die Tumortestung bei solchen Patienten, deren Familienanamnese die Bethesda-Kriterien erfüllen (entsprechend S3-Leitlinie).

- Bevorzugte Testung von Mikrosatelliteninstabilität (MSI)/Mismatch-Reparaturgen-Defizienz (MMRD) in Dickdarmkarzinomen mit sog. medullärer Histologie vor dem 50. Lebensjahr.
- Die Testung aller erstdiagnostizierter kolorektaler Karzinome (entsprechend National Institute for Health and Care Excellence, NICE) und auch aller Endometriumkarzinome (entsprechend National Comprehensive Cancer Network, NCCN).
- Die Detektionsraten des Lynch-Syndroms sind 20 Jahre nach Aufklärung der zugrunde liegenden Genmutationen praktisch nicht mehr zu verbessern und liegen über 90 %.

? Wie ist der Nachweis von Mikrosatelliteninstabilität (MSI) bzw. Mismatch-Reparaturgen-Defizienz (MMRD) mit und ohne BRAF-Mutation beim kolorektalen Karzinom (KRK) zu bewerten?

- Beim KRK ist MSI unabhängig vom *BRAF*-Status und unabhängig vom Tumorstadium ein günstiger Prognosemarker.
- Der Nachweis einer *BRAF*(V600E)-Mutation ist beim KRK stets ein ungünstiger Prognosemarker.
- Im Stadium IV weisen MSI/MMRD-Karzinome eine den MSS/*BRAF*mut-Karzinomen vergleichbare ungünstige Prognose auf.
- Checkpointgerichtete Immuntherapien sind bei MSI/MMRD-Karzinomen mit *BRAF*-Mutation unwirksam.
- 5-Fluoruracil(FU)-basierte Therapien sind beim KRK unabhängig vom MSI/MMRD-Status gleich wirksam.

- ? Sie haben ein Mikrosatelliteninstabilität (MSI)-positives Magenkarzinom Mismatch-mit Reparaturgen-Defizienz (MMRD) diagnostiziert. In der post-operativen Tumorkonferenz wird die Notwendigkeit einer 5-Fluoruracil(FU)-basierten Chemotherapie diskutiert. Wozu raten Sie?**
- Eine 5-FU-basierte Therapie ist unabhängig vom MSI/MMRD-Status angezeigt.
 - Diese Tumoren weisen über alle Stadien eine ungünstigere Prognose auf und sollten deshalb adjuvant weiter behandelt werden.
 - MSI/MMRD kennzeichnet beim Magenkarzinom einen eigenen Karzinogeneseweg (Daten des Krebsgenomatlaskprojekts, TCGA) mit nachgewiesener Chemosensibilität.
 - 5-FU-basierte Therapien sollten beim operablen Magenkarzinom mit MSI/MMRD gemieden werden.
 - Für die weitere Behandlung sind nur das Tumorstadium (Staging) und der Tumordifferenzierungsgrad (Grading) entscheidend.
- ? Bei einer 65 Jahre alten Patientin wird ein bereits metastasiertes Endometriumkarzinom (EC) diagnostiziert, das immunhistochemisch einen isolierten Ausfall des MSH6-Proteins im Tumor aufweist. Welche klinisch-therapeutische Implikation ergibt sich aus diesem Befund?**
- Gerade bei älteren Patientinnen ist der Verlust von MSH6 im EC Ausdruck einer erworbenen Reparaturgendefizienz und somit ohne nennenswerte klinische Relevanz.
 - Der Befund (Mismatch-mit Reparaturgen-Defizienz, MMRD) ist beim EC stets ein Indikator für eine günstige Prognose, sodass auch im metastasierten Stadium von einem prolongierten Verlauf auszugehen ist.
 - Dieser Befund sollte zunächst noch mittels Testung bezüglich Mikrosatelliteninstabilität (MSI) abgesichert werden, da gerade im EC die MSI-Testung dem einfachen immunhistochemischen Testverfahren überlegen ist.
- Dieser Befund impliziert, dass diese Patientin an einem Lynch-Syndrom-assoziierten Endometriumkarzinom erkrankt ist und gut für eine checkpointgerichtete Immuntherapie geeignet ist.
 - In Europa gibt es aufgrund der Zulassungssituation seitens der European Medicines Agency (EMA) keine andere Möglichkeit, als dieser Patientin eine stadiengerechte Chemotherapie anzubieten.
- ? Welche Aussage trifft für die immunhistochemische Testung hinsichtlich der Mismatch-Reparatur (MMR) nicht zu?**
- Beim Ausfall von MLH1 kommt es sekundär immer auch zum Ausfall von PMS2.
 - Beim Ausfall von MSH6 kommt es sekundär immer auch zum Ausfall von MSH2.
 - Nur Expressionsausfälle von MSH6 und PMS2 können isoliert auftreten und weisen auf eine erbliche Ursache hin.
 - Es ist möglich, anstelle des 4er-Antikörperpanels zunächst nur mit 2 Antikörpern zu screenen, bevorzugt MSH6 und PMS2.
 - Bei unklaren immunhistochemischen Befunden mit nicht eindeutigem Expressionsausfall oder fehlender Färbung im Normalgewebe (als interner Kontrolle) wird zur Absicherung eine Analyse bezüglich Mikrosatelliteninstabilität (MSI) empfohlen.
- ? Was ist die Voraussetzung dafür, dass ein Karzinom für eine checkpointgerichtete Immuntherapie geeignet ist?**
- MSI/MMRD-Tumoren sind aufgrund ihrer hohen Mutationslast für eine Checkpointimmuntherapie geeignet.
 - Ohne positivem Biomarkertest (z. B. nach PD-L1-Testung) kann keine Immuntherapie durchgeführt werden.
 - Tumoren dürfen keine muzinöse Histologie aufweisen, da hier Immuntherapien wirkungslos sind.
 - Tumoren müssen noch operabel sein, da ansonsten die Tumorlast für eine Immuntherapie zu groß ist.
- Nur Tumoren mit einer hohen intratumoralen lymphozytären Infiltration (TIL) sind für Checkpointtherapien geeignet.
- ? Auf welche Weise kann das Auffinden einer dem Lynch-Syndrom (LS) zugrunde liegenden erblichen Genmutation vereinfacht werden?**
- In der Regel reicht es, nach Mutationen im *MSH2*-Gen zu fahnden, da dieses Gen am häufigsten beim LS betroffen ist.
 - Man sollte immer erst das *APC*-Gen sequenzieren, da man so das häufigste erbliche Tumorsyndrom, die familiäre Polyposis (FAP), ausschließen kann.
 - Es empfiehlt sich, zunächst *PMS2* und *MSH6* auf Mutationen zu untersuchen, da diese Gene als Bindungspartner von *MLH1* und *MSH2* immer auch Sekundärmutationen aufweisen.
 - Der immunhistochemische Nachweis eines Ausfalls eines MMR-Gens im Tumor hilft bei der Suche nach einer Genmutation.
 - Mithilfe von Next Generation Sequencing (NGS) lassen sich alle Gene gleichzeitig analysieren, was das diagnostische Vorgehen erheblich vereinfacht.

Hier steht eine Anzeige.

