



# Mikroszatellita instabilitás immunhisztokémiai kimutatása colorectális carcinomában: antitestek, módszerek, standardizálás

Dr. Krenács Tibor

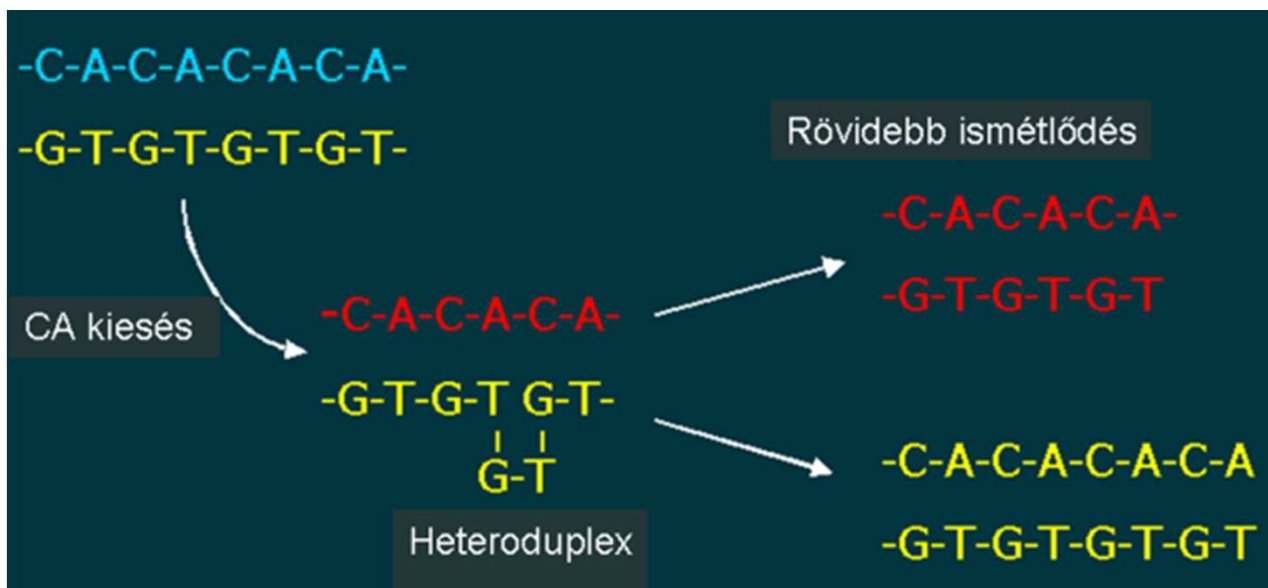
*Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és  
Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest*



70. Patológus Kongresszus  
2011. szeptember 29 – október 01.

## Mikroszatelliták

- Egyszerű repetitív DNS szekvenciák, 1-6 bázispár (pl. CA) akár 100x ismétlődve
- DNS duplikáció (replikáció) során sérülékenyek (elcsúszás, inzerció, deléció)

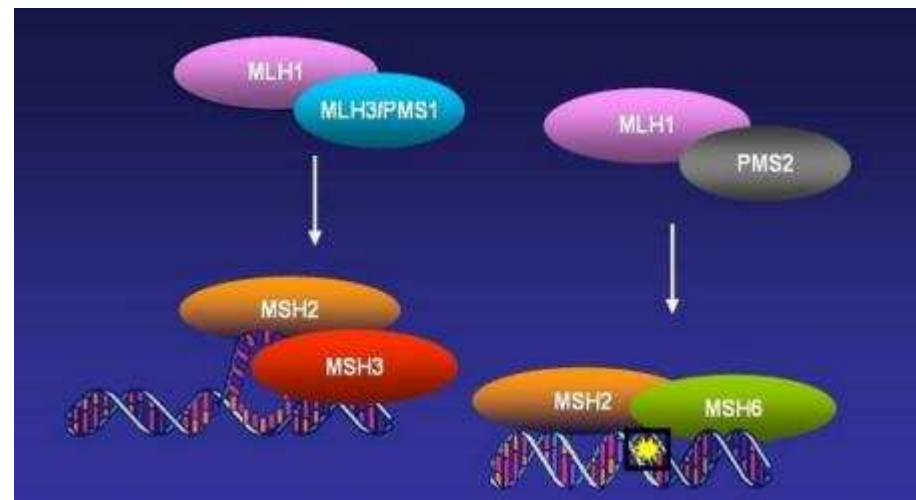


- „Mismatch repair” (MMR) fehérjék a bázisillesztési hibákat kivágják
- Az MMR gének mutációja (epigenetika) – mikroszatellita instabilitás (**MSI-High/Low**)
- Következmény: daganatgátló gének mutációja **CARCINOMAGENEZIS**

## „Mismatch repair” - MMR fehérjék

### 9 DNS hibajavító gén

- Nukleáris enzimek - Heterodimerek – DNS replikációs bázis hibák korrekciója
- MSH2-MSH6: szimpla DNS bázis korrekciók - MLH1-PMS2 - későbbi lépés
- MSH2-MSH3: hosszabb 2-8 bázishibák korrigálása
- MSH6-nak ill. PMS2-nek csak 1-1 partnere van (labilisabbak)

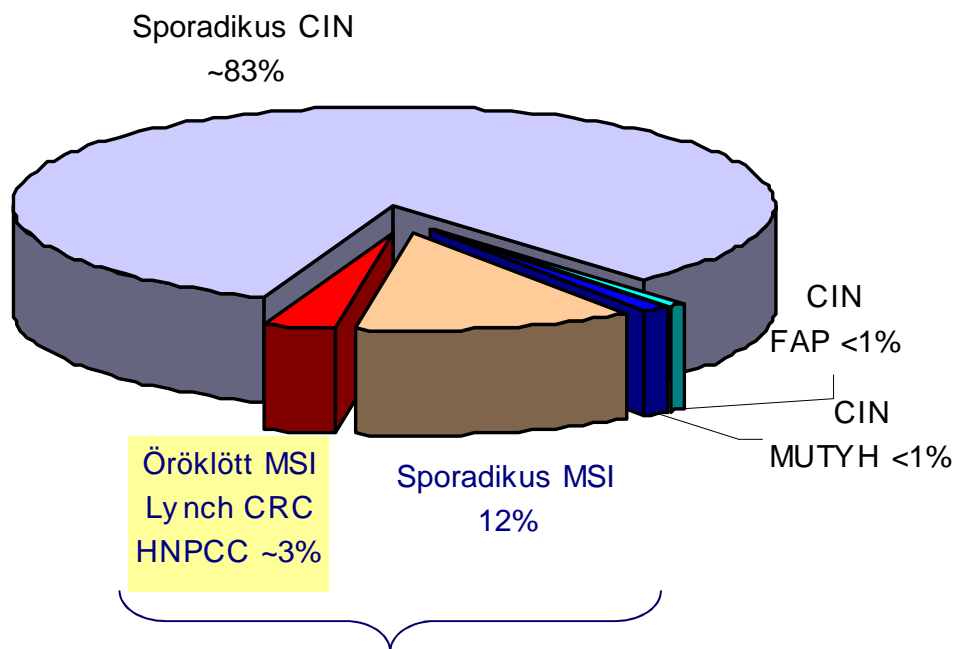


**Mutáció:**  
Promóter  
hipermetiláció

MMR fehérje hiánya/funkció kiesése  
**Mikroszatellita instabilitás - MSI**

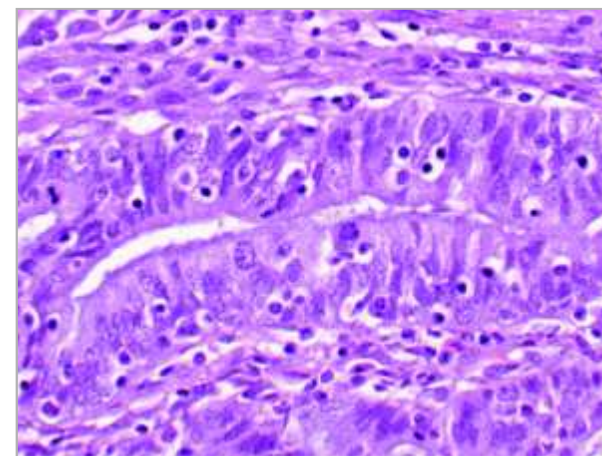
# Colorectális carcinoma

## CIN - kromoszóma instabilitás



## MSI - mikroszatellita instabilitás

## HNPCC



- 2/3 jobboldalon
- mucinosus
- necrosis
- alacsonyan differenciált
- lymphoid infiltráció

**Lynch szindróma CRC:** Öröklődő nem-polipózis típusú colorectális carcinoma (**HNPCC**)



# Colorectális carcinoma - MSI típus

## ■ Sporadikus MSI CRC

- MLH1 promóter hipermetiláció
- MLH1 fehérje hiánya, ill. funkció kiesése (+BRAF V600E mutáció)
- Idősebb korban, női predominancia

**Szűrés – Genetikai gondozás - Követés**

## ■ Lynch szindrómához társuló HNPCC:

- MMR gének (MLH1, MSH2, MSH6, ill. PMS2) csírasejtes mutációja - konstitutív (minden utódsejtben)
- Autoszómális domináns öröklődés (utódok 50% érintett)
- Fokozott hajlam (~70%): synchron, metachron CRC; endometrium carcinoma (egyéb cc.)
- Korábbi életkorban, mint az MSS CRC, felgyorsult carcinogenezis (2 év adenomatosus polyp - carcinoma)
- Rosszul reagál cytotoxikus szerekre (5-FU)
- Kedvezőbb prognózis, mint a MSS daganatok (stádium-független)



# Lynch-szindróma diagnózisa

- Családtörténet
- Daganat tesztje (MMR-IHC, MSI)
- Genetikai teszt (MMR gének) **MIKOR?**

**AJÁNLÁS:** Amszterdam I-II, módosított Bethesda

Családi halmozódás:

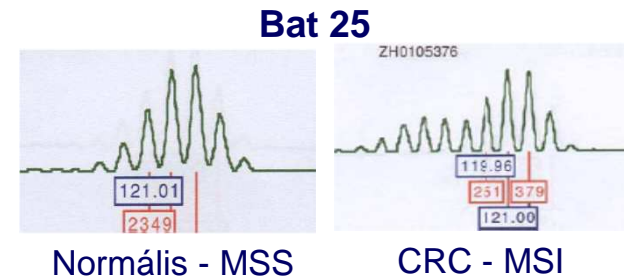
- CRC és más Lynch-carcinomák (synchron, metachron)
- Fiatalabb életkor (<50 év CRC, <60 év HNPCC jelleg)
- Két, első- másodági rokon MSI carcinomája kortól függetlenül

**Előszűrés: IHC, vagy MSI**

# Lynch szindróma – Genetikai szűrés

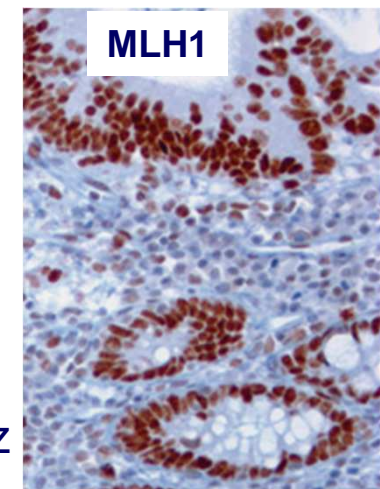
## ■ MSI teszt - PCR

- 5-féle mikroszatellita  
(Bat 25, Bat 26, D2S123, D5S346, D17S250)
- Legalább 3-féle+: MSI-High
- Kontroll paraffinos normál szövet v. vér



## ■ IMMUNHISZTOKÉMIA (IHC)

- MLH1, ill. MSH2 mutáció felelős az MSI 90%-ért, ilyen **2-es panel** mutáció szűrő érzékenysége ~85%
- MSH6 és PMS2-vel a **4-es panel** érzékenysége ~94%  
*Shia és mtsai. J Mol Diagn 2008;10:293–300.*
- Az MSH6 és PMS2 **2-es panel** érzékenysége a 4-eshez hasonló >90%; mert az MMR partner is destabilizálódik  
*Mojtahed és mtsai. Modern Pathology 2011; 24: 1004-1014.*





# MMR genetikai teszt algoritmus

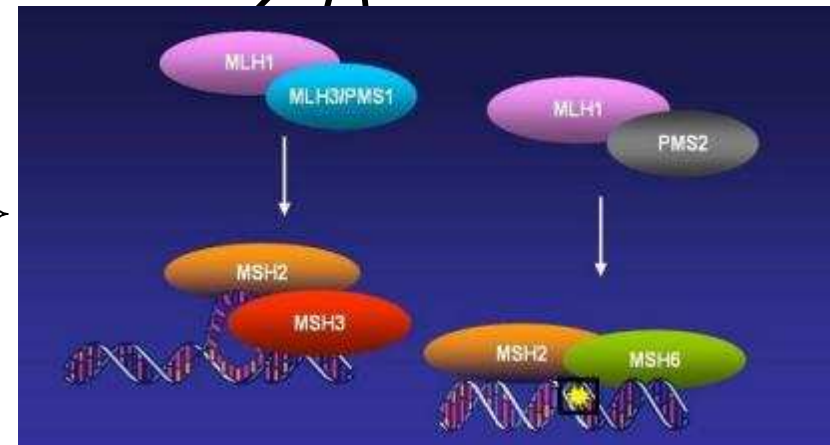
CRC - HNPCC gyanú  
Amsterdam/Bethesda

IMMUNHISZTOKÉMIA

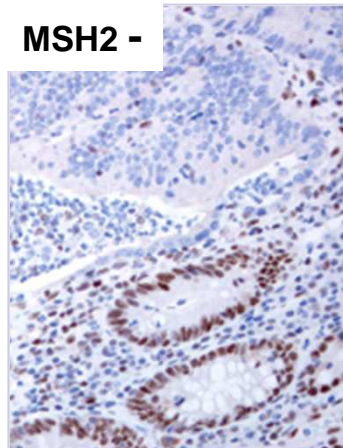
MSI analízis

MMR fehérje kimutatás

Csírsejtes mutáció	MLH1	MSH2	MSH6	PMS2
MLH1	-	+	+	-
MSH2	+	-	-	+
MSH6	+	+	-	+
PMS2	+	+	+	-



MSH2 -



IHC -

MSI-H/L

MMR mutáció analízis  
HNPCC / Lynch szindróma

MMR mutáció negatív  
Sporadikus MSI CRC (BRAF mutáció)

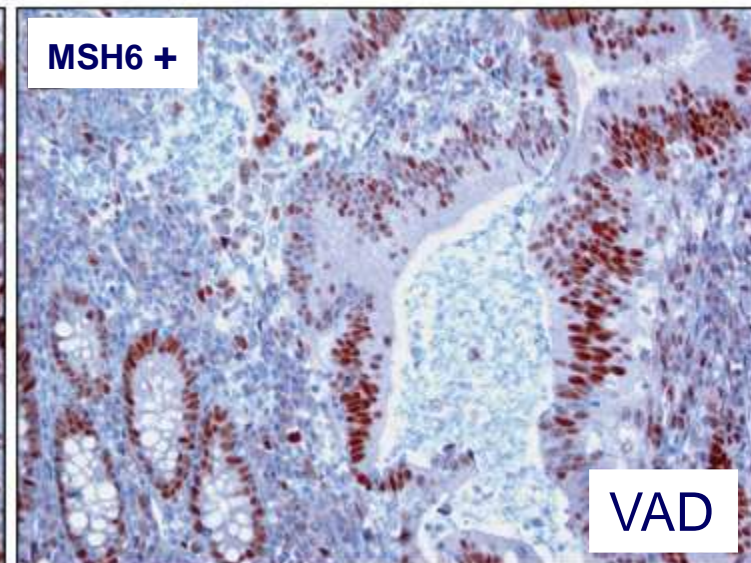
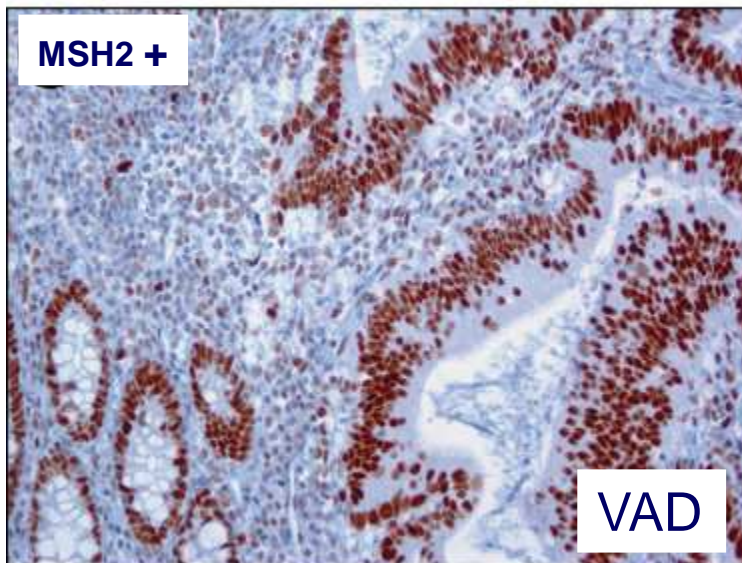
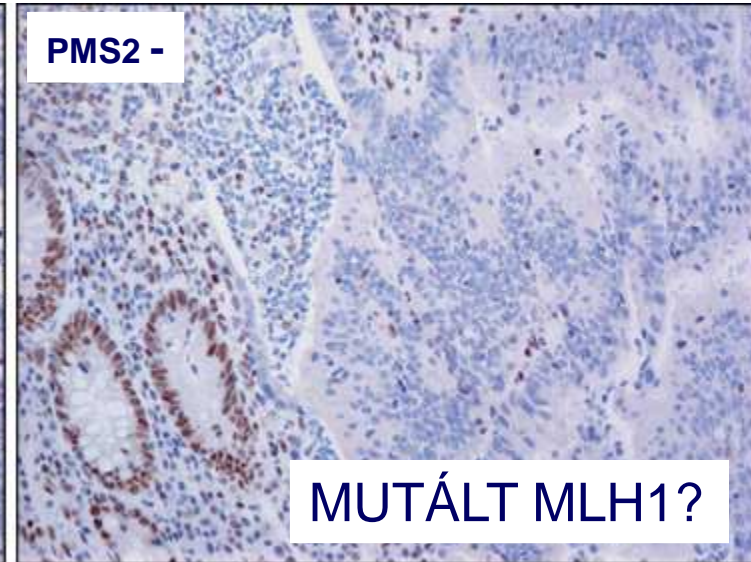
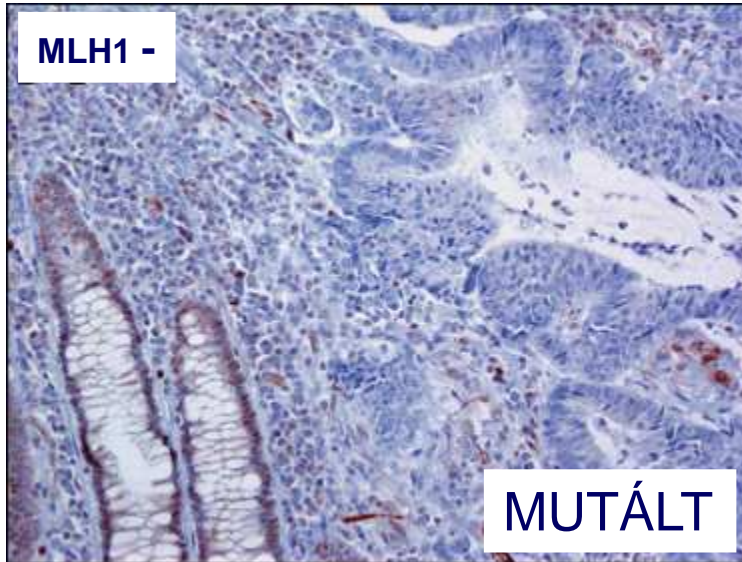




Érzékeny  
szövetelőkészítésre

# MMR - IHC

Endogén kontroll !



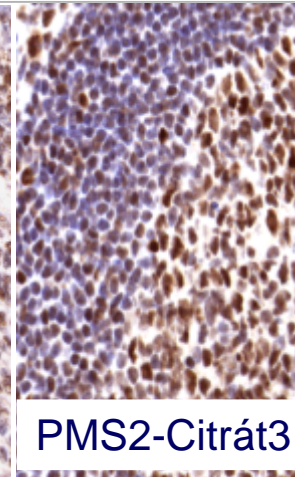
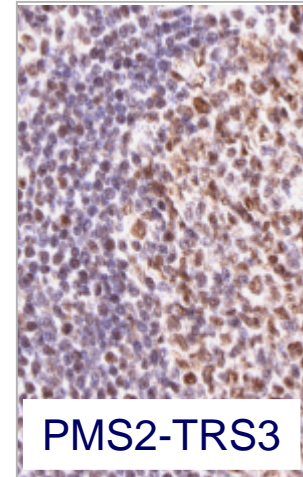
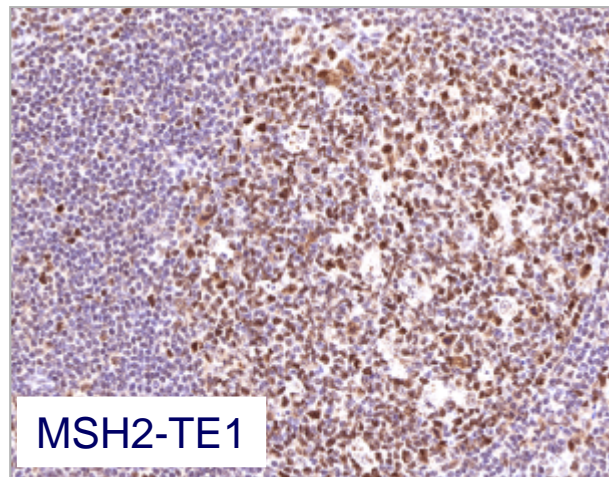
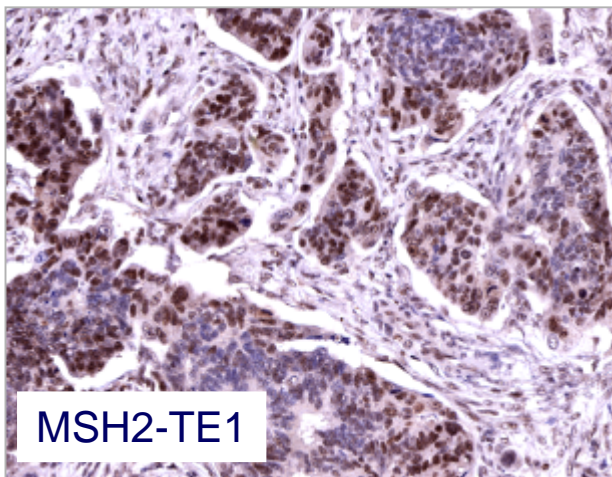
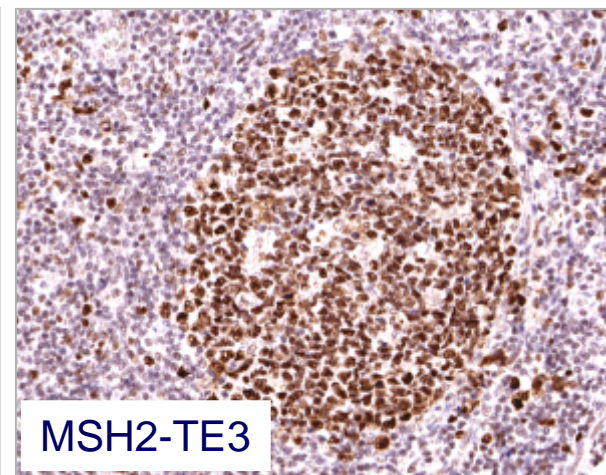
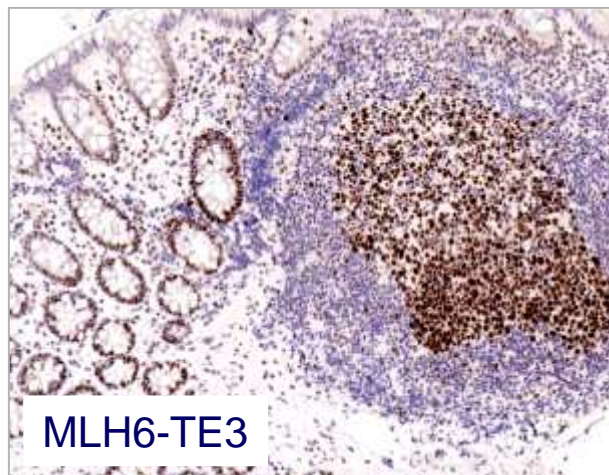
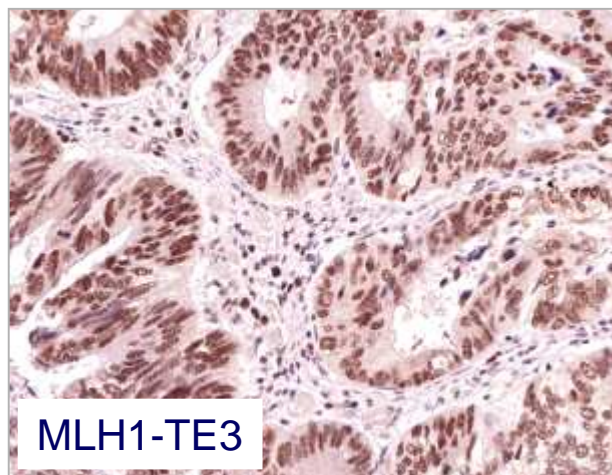


## MMR IHC antitestek - módszertan

MLH1/ES05

G168-728; MSH2/25D12; MSH6/PU2 = Tris-EDTA pH9

PMS2/M0R4G = Citrát pH6



Szövetrögzés minősége döntő, a PMS2 a legkritikusabb





Interpretation of Immunohistochemical Analysis of MisMatch Repair (MMR) Protein Expression in Tissue Sections for Investigation of Suspected Lynch, Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (HNPCC) Syndrome  
Mark Arends, Merdol Ibrahim, Lisa Happerfield, Ian Frayling & Keith Miller



## UK NEQAS ajánlás (2008): [www.ukneqas.org.uk](http://www.ukneqas.org.uk)

- 4-es antitest panel
- az MSH6/MSH2-t ill. PMS2/MLH1-t validálja
- Csak jó rögzült részletben értékelhető
- Endogén kontroll: normál hám, lymphocytá, stroma, izom

## KONTROLL SZÖVET:

- Appendix, normál colon (tonzilla)
  - bazálistól-apikálisig csökkenő intenzitás
  - folliculusok csíracentruma erősen festődik
- Tonsilla kevés graduálisan festődő struktúra (hám)

## ÉRTÉKELÉS

- **Normális:**  
Erős festődés a tumorsejt magokban - és a kontroll sejtekben
- **Negatív:**  
A magfestődés hiánya a daganatban – de a kontroll pozitív
- **Foltos/gyenge:**  
1-2 MMR gyenge/foltos magreakciója – és a kontroll pozitív  
Cytoplazma pozitívitas - destabilizáció.

## PATOLÓGIAI RIPORT:

- Megállapítás:
- Abnormális, vagy nem az MMR expresszió
  - Ha igen - diagnosztikus Lynch/HNPCC-re
  - MSI vizsgálat nem szükséges
  - Genetikai vizsgálata javasolt.

## [www.nordiqc.org](http://www.nordiqc.org)

### NORDIQC körvizsgálatok:

- Alkalikus pH-jú antigénfeltárás,
- Háromlépéses polimer jelzőrendszer
- Automatizált festés (Dako, Bond, Ventana)

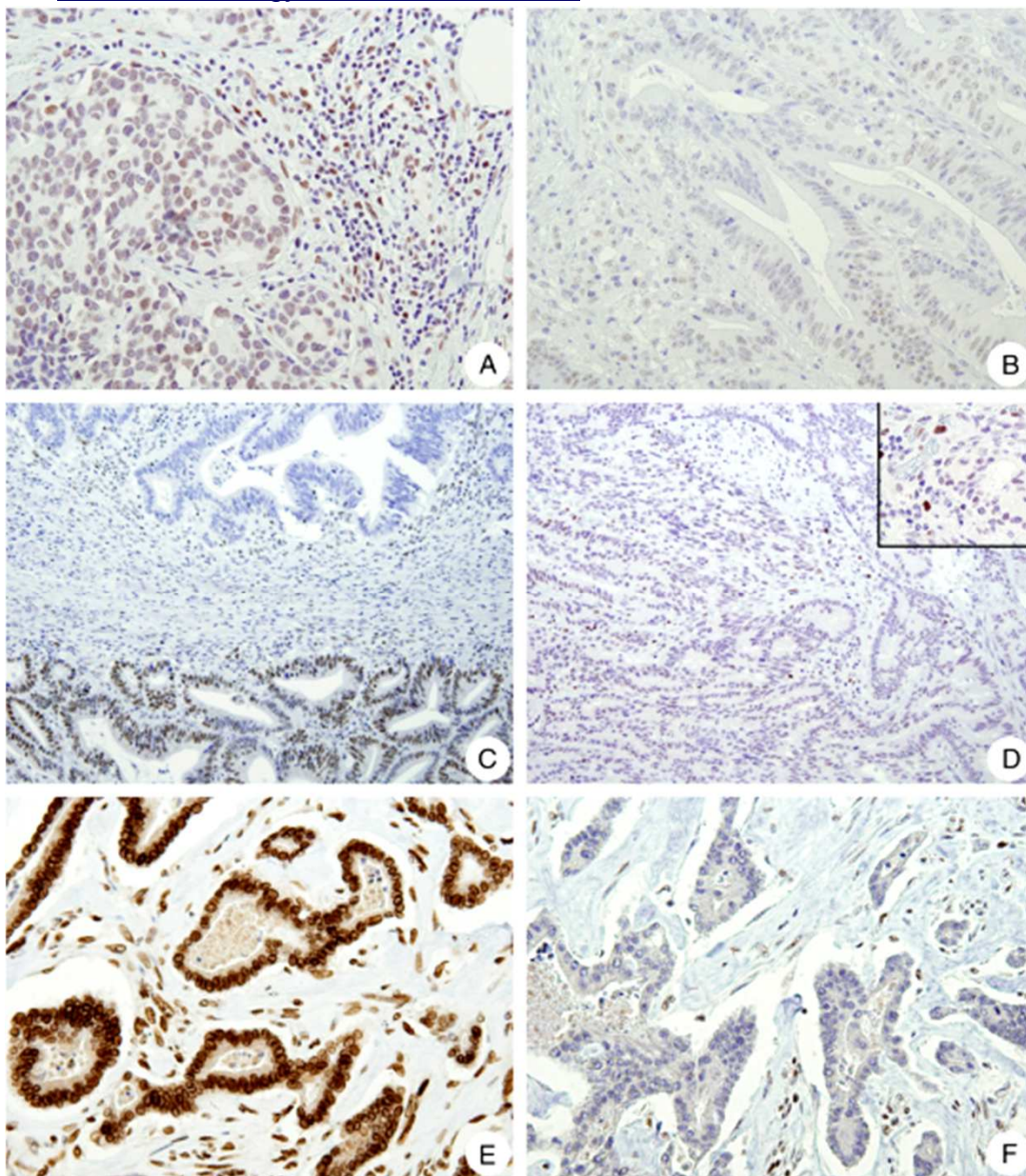
### MEGFELELŐ KLÓNOK:

- **MLH1:** ES05 > G168-15
- **MSH2:** FE11, ill. 27-es > 25D12; G219-1129
- **MSH6:** nyúl mEPR3945 ill. EP49 > egér 44-es  
PU29
- **PMS2:** A16-4 > M0R4G

### LEGGYAKORIBB HIBÁK:

- Nem megfelelő rögzítés
- Elégtelen antigénfeltárás
- Elégtelen antitest koncentráció

**Klarskov és mtsai.** Interobserver variability in the evaluation of mismatch repair protein immunostaining  
*Human Pathology 2010; 41:1387-1396*



## HIBALEHETŐSÉGEK

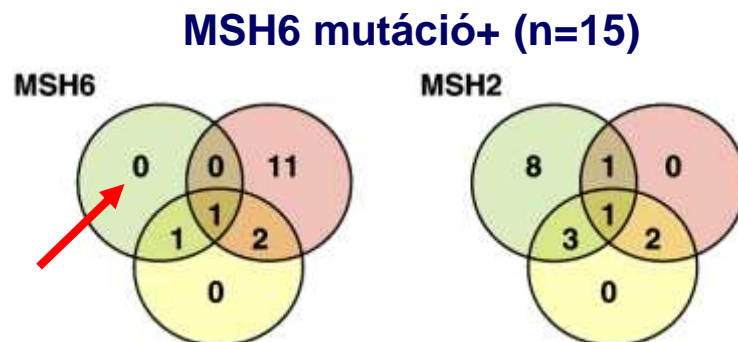
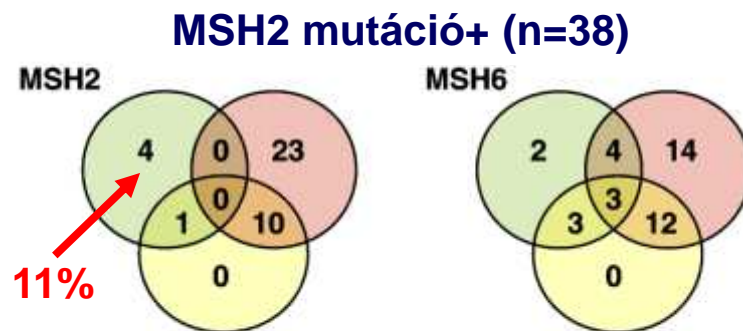
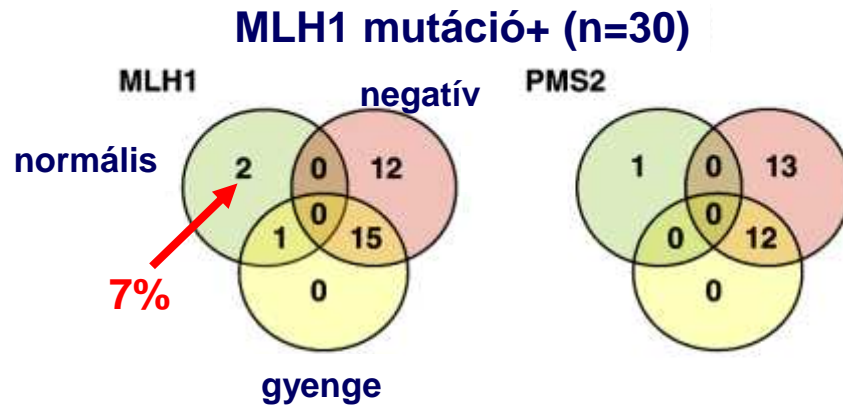
- A. MLH1 mutáció+: stroma > daganat
- B. MSH1 mutáció-: alig van festődés  
(egyébként MSH6+) **technikai negativitás**
- C. MSH2 mutáció-: klonális heterogitás  
MSH6 mutáció+, de **technikai negativitás**
- D. MSH6 mutáció+: gyenge, heterogén,  
de a tumor <stroma
- E. MLH1 mutáció+: magmembrán festődés  
alulrögzült erősen feltárt – álpozitív
- F. PMS2 vesztes: az MLH1 mutáció (E) miatt



## INTERPRETÁLÁS

225 eset: IHC 4-es panel, mutációanalízis 83-ban

6 értékelő: 3 gastro-patológus; 3 rezidens



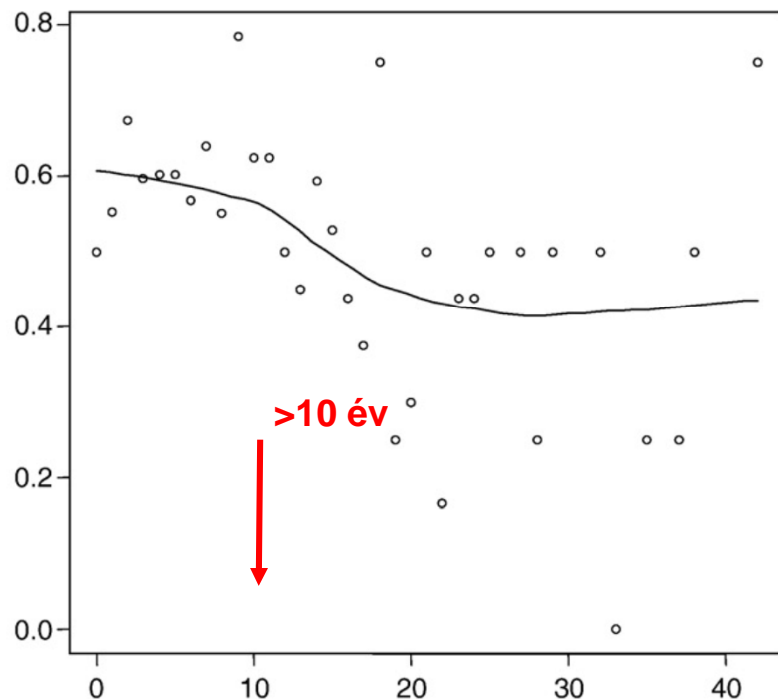
- MLH1 mutált: 2/30 eset (7%) IHC+
- MSH2 mutált: 4/38 eset (11%) IHC+
- MSH6 mutált: 0/15 eset IHC+
- Ellentétes (**negatív-pozitív**) értékelés csak 2-6%-ban
- A **gyenge-negatív értékelés** keveredése az MLH1, ill. MSH2 mutáns esetekben magas (~50%), az MSH6 negyede
- Kihívás a technikailag **suboptimális metszetek** értékelése.
- **Hasonló konszenzus** eredmények a 2 csoport között

Minőségbiztosítási programok!  
Interpretálási konszenzus kurzusok!



**Klarskov és mtsai. Interobserver variability in the evaluation of mismatch repair protein immunostaining**  
*Human Pathology* 2010; 41:1387-1396

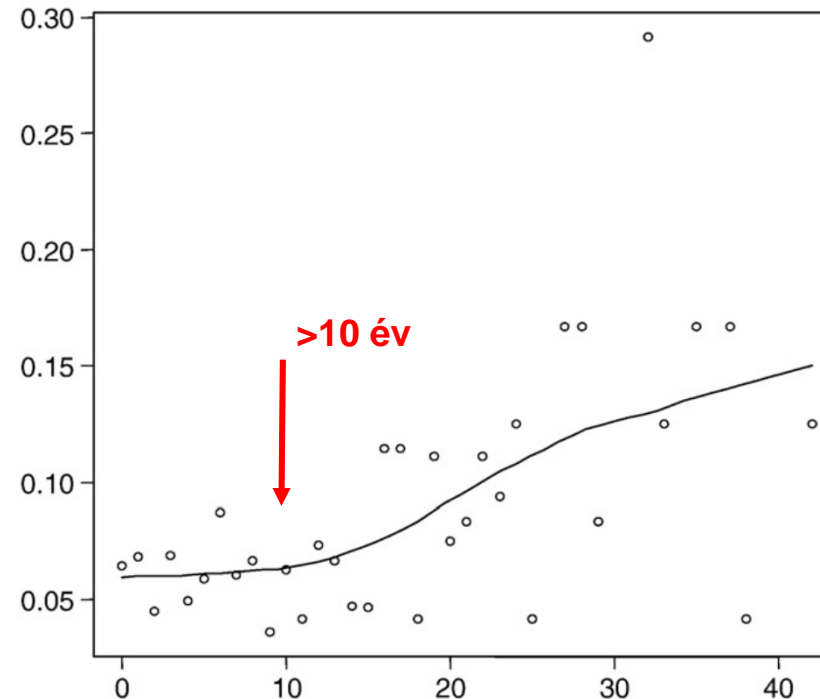
### Értékelési frakciók egyezése



**Blok életkora**

Antibody	Total consensus (%)		p-value
	0-10 years	>10 years	
MLH1	83/143 (58)	31/79 (39)	0.007
PMS2	79/117 (68)	28/58 (48)	0.014
MSH2	119/141 (84)	62/78 (79)	n.s.
MSH6	68/136 (50)	27/76 (36)	0.042

### „Gyenge” értékelést kapott frakciók



**Blok életkora**

Antibody	Evaluations of weak staining (%)		
	0-10 years	>10 years	p-value
MLH1	74/867 (9)	66/479 (14)	0.019
PMS2	36/712 (5)	28/348 (8)	n.s.
MSH2	30/866 (3)	19/477 (4)	n.s.
MSH6	74/861 (9)	49/476 (10)	n.s.



# MMR Immunhisztokémia - Összegzés

## ELŐNYÖK

- Széles körben hozzáférhető
- Alkalmas (~90% érz./spec.) az MMR mutáció előszűrésére
- Előnye, hogy a mutált génre utal, célzott DNS analízis
- Az MSH6/MHS2, a PMS2/MLH1 génhibáit validálja
- Minden Lynch-ajánlás javasolja - első elsőszűrőnek
- Gyanús, de nem konkluzív esetben - MSI

## JELLEMZŐK – HIBALEHETŐSÉGEK

- Többnyire non-sense mutáció - hibás/hiányzó MMR
- De, missense mutáció (MLH1) - epitóp – fals-negativitás
- Függ szövet-előkészítéstől, az értékelés szubjektív
- Hiányos/foltos festődés - pl. hipoxia, vagy oxidatív stressz
- Endogén kontroll sejtekhez viszonyítás – Kötelező
- Magas pH-jú feltárás, háromlépcsős polimer, automata festés
- Technológia-Értékelés standardizálása – Külső minőségbiztosítás



A photograph of a sunset over a large body of water. The sun is low on the horizon, creating a bright orange and yellow glow that reflects on the water. Two people are silhouetted in a small boat in the middle ground. The sky is filled with soft, wispy clouds. The overall mood is peaceful and serene.

# Köszönet

- Parsch Edit