UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie mit den Sektionen Molekularpathologie und Zytopathologie

Direktor: Prof. Dr. med. Guido Sauter

Mismatch-Reparatur-Defizienz und Mikrosatelliteninstabilität sind seltene molekulare Befunde beim Seminom des Hodens

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

David Dum

aus Lienz/Österreich

Hamburg, 2020

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 17.09.2020

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Markus Graefen

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Thomas Steuber

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. Frank Sommer

Inhaltsverzeichnis

1. Fragestellung 1
2. Einleitung 2
3. Material und Methoden 9
   3.1. Die Tissue Microarray Methode 9
   3.2. UKE Seminom TMA 11
   3.3. Immunhistochemie 13
   3.4. PCR-Analyse 13
   3.5. Statistik 14
4. Ergebnisse 14
   4.1. TMA Analyse 14
   4.2. Großschnitt-Validierung 17
   4.3. Untersuchung der Tumor-Heterogenität 19
   4.4. PCR-Validierung der Mikrosatelliteninstabilität 19
5. Diskussion 20
6. Zusammenfassung 26
7. Summary 27
8. Abkürzungsverzeichnis 28
9. Abbildungsverzeichnis 29
10. Literaturverzeichnis 30
11. Danksagung 36
12. Lebenslauf 37
13. Eidesstattliche Erklärung 38

1. Fragestellung

Seminome, welche die größte Gruppe innerhalb der testikulären Keimzelltumoren darstellen, sind durch ein dichtes lymphozytenreiches Entzündungsinfiltrat gekennzeichnet. Eine hohe Anzahl solcher tumorinfiltrierender Lymphozyten gilt bei anderen Tumorentitäten – wie beispielsweise Endometrium- oder Kolonkarzinomen – als histologisches Charakteristikum für das Vorliegen einer Mismatch-Reparatur-Defizienz bzw. einer Mikrosatelliteninstabilität.

Bislang haben dieses Phänomen jedoch nur wenige Studien bei testikulären Seminomen untersucht. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mit Hilfe der Tissue Microarray Methode die Häufigkeit einer Mismatch-Reparatur-Defizienz an einem großen Kollektiv von über 500 Seminomen zu klären.

Zudem soll untersucht werden, ob die Mismatch-Reparatur-Defizienz in den betreffenden Tumoren homogen oder heterogen (fokal) auftritt.

2. Einleitung

Die Immunonkologie hat das Feld der systemischen Krebstherapie in den letzten Jahren revolutioniert. Im Vordergrund stehen dabei die sogenannten Immuncheckpoint-Inhibitoren. Die meisten dieser Medikamente sind humanisierte oder humane Antikörper, welche sich entweder gegen Programmed Death 1 (PD1) oder Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) richten. PD1 ist ein Oberflächenmolekül, welches auf verschiedenen Subtypen von T-Lymphozyten exprimiert wird, insbesondere auf zytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen, welche die Aufgabe haben, immunologisch fremde zelluläre Strukturen zu eliminieren (Ishida et al., 1992; Sharpe et al., 2007). Das PD1-Molekül kann durch Kontakt mit seinem Liganden PD-L1 (oder auch PD-L2) die immunologische Aktivität von zytotoxischen Zellen bremsen (Keir et al., 2008). Dementsprechend wird PD-L1 auf Zellen exprimiert, welche entweder eine Rolle bei der Immunregulation spielen oder aber besonders zuverlässig von einer überschießenden Immunantwort geschützt werden müssen. Zelltypen des Immunsystems mit PDL-1-Expression sind insbesondere monozytäre Zellen, wie Makrophagen oder dendritische Zellen, aber auch Kryptenepithelien der Tonsille. Zum Einsatz kommt PD-L1 auch beim Schutz des Schwangerschaftsproduktes. Einerseits wird PD-L1 kräftig im Zytotrophoblast der Plazenta exprimiert, andererseits exprimieren die Zellen des *Corpus luteum* PD-L1 (Luu et al., 2020). Sowohl das *Corpus luteum* als auch die Plazenta sind für die Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft von zentraler Bedeutung. Auch Nervengewebe (insbesondere Perineuralscheiden) exprimiert als zentrale Struktur eines funktionierenden Vertebraten kräftig PD-L1 (Shurell et al., 2016).

Die zentrale Aufgabe des PD1/PD-L1-Regelsystems ist das Verhindern einer überschießenden Immunantwort. Eine kräftige Immunreaktion induziert eine vermehrte PD-L1-Expression in lokalen immunregulatorischen monozytären Zellen und erwirkt so eine Einschränkung bzw. Herabregulierung der Entzündung. Eine Blockade des PD1/PD-L1-Regelsystems durch inhibierende Antikörper führt zu einer Blockade dieser physiologischen Entzündungslimitierung und somit einer gesteigerten zytotoxischen Immunantwort. Da die zytotoxische Immunreaktion auch eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Tumoren spielt, führen Immuncheckpoint-Inhibitoren auch zu einer besseren Bekämpfung von Tumoren durch das wirtseigene Immunsystem.

Die erste Zulassung eines Immuncheckpoint-Inhibitors zur Tumortherapie erfolgte 2011 für das Medikament Ipilimumab (ein CTLA-4-Inhibitor) beim malignen Melanom (Lipson and Drake, 2011). Bis heute sind die therapeutischen Erfolge bei diesem Tumor besonders offensichtlich. Eine Kombination von zwei Immuncheckpoint-Inhibitoren führte in einer Studie bei etwa 50% der Patienten mit metastasiertem malignen Melanom zu einer dauerhaften und wahrscheinlich permanenten Heilung (Wolchok et al., 2017). Seit 2011 wurden in immer

kürzeren Abständen zahlreiche weitere Immuncheckpoint-Inhibitoren zugelassen. Zu den wichtigsten Indikationen für Immuncheckpoint-Inhibitoren zählen das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom, das Harnblasenkarzinom, maligne Melanome und Nierenzellkarzinome, aber auch Kopf-Hals-Tumoren, Merkelzell-, hepatozelluläre, Magen- und Zervix-Karzinome, klassische Hodgkin Lymphome sowie triple-negative Mammakarzinome (Vaddepally et al., 2020). Viele Patienten mit Tumoren der genannten Entitäten profitieren von einer Immuncheckpoint-Inhibitor-Therapie. Trotzdem spricht immer noch die Mehrzahl der so behandelten Tumorleiden nicht oder nicht messbar auf eine Immuncheckpoint-Inhibitor-Therapie an. Im Einzelfall lässt sich also nicht voraussagen, ob ein Tumor von einer immunonkologischen Therapie profitiert oder nicht. Aus unserem Verständnis des Mechanismus von Immunantwort und Immuntherapie ergeben sich aber durchaus Ansatzpunkte, um potentielle Therapieansprecher von Therapieversagern zu differenzieren.

Ein wichtiges Kriterium für einen erfolgreichen Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren ist eine möglichst hohe Immunogenität der Tumorzellen (Topalian et al., 2016). Tumorzellen werden dann immunogen, wenn sie an ihrer Oberfläche Proteine exprimieren, welche sich von den Proteinen des wirtseigenen Immunsystems unterscheiden und von diesem als fremd erkannt werden. Auch das Ausmaß der lymphozytären Infiltration eines Tumors dürfte eine Rolle spielen (Galon et al., 2006). Die Menge der tumorinfiltrierenden Lymphozyten variiert von Tumor zu Tumor teilweise erheblich. Eine Enthemmung des Immunsystems durch die Applikation von Immuncheckpoint-Inhibitoren dürfte bei Tumoren mit fehlender oder geringer lymphozytärer Entzündungsreaktion im Tumor einen geringeren Effekt ausüben als bei Tumoren, welche von einem dichten Infiltrat zytotoxischer T-Lymphozyten durchsetzt sind. Ein ausgeprägtes lymphozytäres Entzündungsinfiltrat lässt allerdings nicht automatisch eine erfolgreiche Immunantwort bzw. eine erfolgreiche immunologische Eliminierung eines Tumors erwarten.

Tumorzellen verfügen prinzipiell über verschiedene Mechanismen, um einer Immunantwort zu entgehen. Eine davon ist die Expression von PD-L1 an der Tumorzelloberfläche. Aus den geschilderten Grundlagen der Immuntherapie ergeben sich mindestens drei Ansatzpunkte für die Prädiktion eines erfolgreichen Einsatzes von Immuncheckpoint-Inhibitoren gegen die PD1/PD-L1-Signalachse:

Ansatz 1 ist die Expression von PD-L1 in den Tumorzellen. Je mehr PD-L1 von einem Tumor exprimiert wird, desto größer dürfte die Bedeutung von PD-L1 für die Immunevasion eines Tumors sein. Tatsächlich haben zahlreiche Studien gezeigt, dass eine möglichst hohe Expression von PD-L1 in Tumorzellen die Ansprechwahrscheinlichkeit auf Immuncheckpoint-Inhibitoren erhöht. Dies gilt unter anderem für das maligne Melanom, für das

Nierenzellkarzinom, das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom, das Ovarialkarzinom und das kolorektale Karzinom (Patel and Kurzrock, 2015).

Ansatz 2 ist die Lymphozytenmenge in einem Tumor. Je größer die Menge von tumorinfiltrierenden Lymphozyten ist, desto größer müsste der Effekt einer Hemmung der PD1/PD-L1-Signalachse sein. Studien beim malignen Melanom (Skuciova et al., 2020), Kolon- (Galon et al., 2006), Ovarial- (Bosmuller et al., 2011) und Mammakarzinom (Ali et al., 2017) haben darauf hingewiesen, dass eine vermehrte Lymphozytendichte mit einem besseren Ansprechen auf konventionelle Therapien und vermutlich auch einer erhöhten Ansprechwahrscheinlichkeit auf Immuncheckpoint-Inhibitoren korreliert (Cogdill et al., 2017).

Ansatz 3 ist die Anzahl der in einem Tumor vorhandenen DNA-Mutationen (Chan et al., 2019). Es ist eine Schlüsseleigenschaft von Malignomen, dass eine erhöhte Tendenz zu Akkumulation von Mutationen in Tumorzellen besteht. Die Ursache für die Tendenz zur Mutationsentstehung liegt in verschiedenen Formen einer genetischen Instabilität, wobei die Fähigkeit der Zellen, Mutationen zu reparieren oder mutierte Zellen zu eliminieren, eingeschränkt ist. Mutationen treten weitgehend zufällig auf und betreffen die gesamte kodierende und nicht-kodierende DNA. Die meisten nicht reparierten Mutationen sind funktionell bedeutungslos (Greenman et al., 2007). Nur ein sehr kleiner Anteil betrifft onkologisch relevante Gene.

Führen Mutationen in der Sequenz von onkologisch nicht relevanten Proteinen allerdings zu Veränderungen von Proteinstrukturen, die so signifikant sind, dass sie zu einem immunologisch erkennbaren „fremden“ Protein führen, kann die Mutation zu einer gegen den Tumor gerichteten Entzündungsreaktion führen. Da immunologisch erkennbare Mutationen nach dem Zufallsprinzip entstehen, ist die Chance, dass eine immunologisch relevante Mutation auftritt, dann besonders groß, wenn eine sehr große Anzahl von Mutationen in einem Tumor besteht. Mittels Next-Generation-Sequencing lässt sich die Gesamtzahl der Mutationen in einem Tumor bestimmen. Tatsächlich sprechen Tumoren mit einer besonders hohen Zahl an Mutationen mit größerer Wahrscheinlichkeit auf Immuncheckpoint-Inhibitoren an als Tumoren mit nur geringer Mutationslast (Chan et al., 2019). Vergleichende Untersuchungen der Mutationslast verschiedener Tumorarten haben auch gezeigt, dass die Tumortypen, bei denen Immuncheckpoint-Inhibitoren heute zu den zugelassenen Medikamenten zählen, im Durchschnitt eine besonders hohe Mutationsrate aufweisen (Lawrence et al., 2013). Zu den Tumoren mit besonders hoher Mutationslast gehören beispielsweise das maligne Melanom, das Urothelkarzinom und das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (Lawrence et al., 2013). Nachteile der Mutationslastbestimmung sind der erhebliche technische Aufwand (Next-Generation-Sequencing) und die Kosten einer solchen Untersuchung. Damit ist die

Bestimmung der Tumormutationslast auf wenige Zentren beschränkt und nicht bei allen Tumorpatienten anwendbar.

Tumoren mit Mikrosatelliteninstabilität (MSI) sind eine Untergruppe der Tumoren mit hoher Mutationslast, bei denen die hohe Mutationszahl durch einen einheitlichen Mechanismus entsteht. Mikrosatelliten sind kleine repetitive DNA-Sequenzen, bei denen eine Base oder eine kleine Sequenz von Basen mehrfach wiederholt wird. Bei der im Rahmen der Zellteilung erfolgenden Replikation der DNA kommt es im Bereich von repetitiven DNA-Sequenzen (Mikrosatelliten) gehäuft zu Ablesefehlern. Diese werden durch ein spezifisches Mismatch-Reparatur-(MMR)-System repariert. Die Hauptrolle bei dieser DNA-Reparatur spielen die Mismatch-Reparatur-Proteine MLH1, PMS2, MSH2 und MSH6 (Baretti and Le, 2018). Bei einem Ausfall eines dieser Gene durch Mutation, Deletion oder Promotor-Hypermethylierung kommt es zu einem Ausfall der Funktion des gesamten Proteinkomplexes mit konsekutiv massivem Anstieg von „Mutationen“ im Bereich der Mikrosatelliten, was als Mismatch-Reparatur-(MMR)-Defizienz bezeichnet wird. Ob ein Tumor mikrosatelliteninstabil ist oder nicht, lässt sich im Gegensatz zur Mutationslast verhältnismäßig leicht immunhistochemisch oder mittels einer einfachen PCR-Untersuchung bestimmen. Immunhistochemisch manifestiert sich der Ausfall eines Mismatch-Reparatur-Gens durch den Verlust der Expression von einem oder mehreren Mismatch-Reparatur-Proteinen. Bei der PCR-Untersuchung auf Mikrosatelliteninstabilität werden fünf bestimmte Mikrosatelliten – das sogenannte Bethesda-Panel (Umar et al., 2004) – an Normal- und Tumorgewebe untersucht. Es handelt sich dabei um fünf Mikrosatelliten, welche besonders häufig von einer Mikrosatelliteninstabilität betroffen sind. Wenn mindestens zwei der fünf Mikrosatelliten im Tumorgewebe eine unterschiedliche Länge im Vergleich zu Normalgewebe aufweisen, wird eine MSI-high, wenn nur einer der Mikrosatelliten instabil ist, wird eine MSI-low diagnostiziert. Die Mikrosatelliteninstabilität kommt mit am häufigsten bei Endometriumkarzinomen (10-30%) (Fang et al., 2013; Goodfellow et al., 2015), Kolonkarzinomen (5-20%) (Ashktorab et al., 2016; Nayak et al., 2018) und Magenkarzinomen (5-20%) (Cancer Genome Atlas Research, 2014; Karpinska-Kaczmarczyk et al., 2016; Mathiak et al., 2017; Zhang et al., 2018) vor, kann aber in den meisten anderen Tumorarten wenn auch deutlich weniger häufig (1-3%) ebenfalls gefunden werden (Hause et al., 2016). Der Nachweis einer Mikrosatelliteninstabilität ist heute der bestmögliche Prädiktor für ein Ansprechen eines Tumors auf eine Immuncheckpoint-Inhibitoren-Therapie (Le et al., 2015). Das Medikament Pembrolizumab wurde von der FDA für die Erstlinientherapie von mikrosatelliteninstabilen Tumoren aller Art (unabhängig vom Ausgangsort) zugelassen (Marcus et al., 2019).

Mikrosatelliteninstabile Tumoren lassen sich – unabhängig vom Ursprungsort – oftmals an einer histomorphologischen Besonderheit erkennen. Mikrosatelliteninstabile Tumoren werden nämlich – passend zum Konzept ihrer erhöhten Immunogenität – oft durch ein sehr dichtes

intratumorales lymphozytäres Entzündungsinfiltrat auffällig. Eine dichte lymphozytäre Entzündung ist geradezu pathognomonisch für den histologischen Befund beim Seminom des Hodens. Das Seminom ist der häufigste Hodentumor und gehört zur Gruppe der malignen Keimzelltumoren (Shen et al., 2018). Die Neoplasie tritt vor allem im Alter zwischen 20 und 40 Jahren auf. Die Metastasierung erfolgt überwiegend lymphogen, wobei die retroperitonealen Lymphknoten die primären Metastasenorgane sind (Pierorazio et al., 2020). Die Entscheidung, ob neben einer Orchiektomie eine zusätzliche Behandlung erfolgen und welcher Art diese sein soll, basiert auf den von Pathologen festgelegten Tumorstadien (pT-Stadien, siehe Tabelle 1) und den radiologischen Befunden (Lokalisation der Metastase). Die Prognose des Seminoms ist wegen der Strahlensensibilität und dem Ansprechen auf Chemotherapien äußerst gut. Etwa 95% aller Patienten mit Seminom werden durch eine Orchiektomie gegebenenfalls gefolgt von Nachbestrahlung und/oder Chemotherapie definitiv geheilt (Pierorazio et al., 2020).

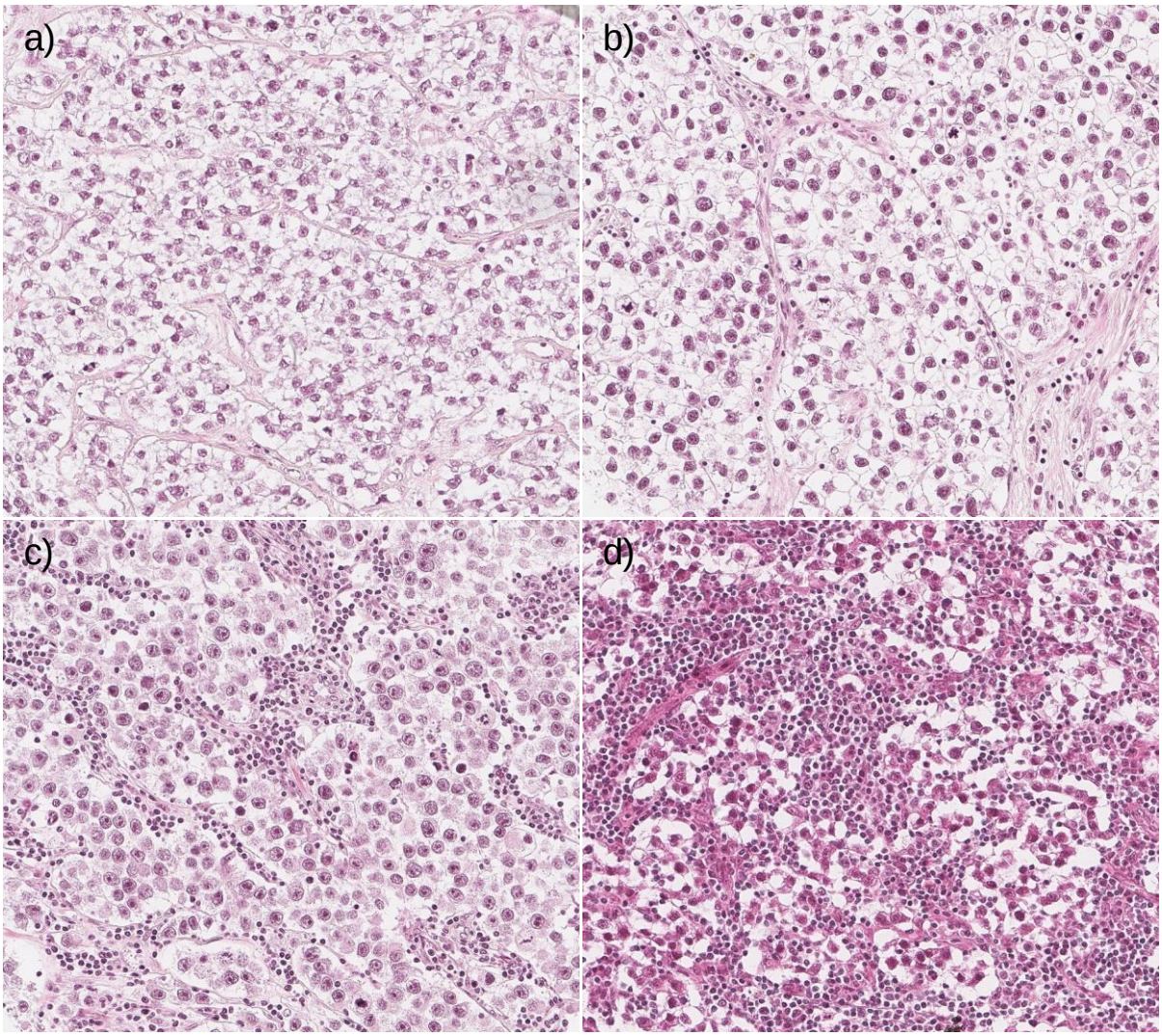
Tabelle 1: TNM-Klassifikation von Hodentumoren nach UICC-Klassifikation (Wittekind, 2017)

Primärtumor (T)	
pTX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	Kein Hinweis für einen Primärtumor (z.B. Narbengewebe)
pTis	Intratubuläre Keimzellneoplasie (Keimzellneoplasie in situ GCNIS)
pT1	Tumor ist begrenzt auf den Hoden und Nebenhoden ohne vaskuläre/lymphatische Invasion; Tumor kann in die Tunica albuginea einwandern, aber nicht in die Tunica vaginalis
pT2	Tumor ist begrenzt auf den Hoden und Nebenhoden mit vaskulärer/lymphatischer Invasion; oder er extendiert über die Tunica albuginea mit Erfassung der Tunica vaginalis
pT3	Tumor erfasst den Samenstrang mit oder ohne vaskuläre/lymphatische Invasion
pT4	Tumor infiltriert das Skrotum mit oder ohne vaskuläre/lymphatische Invasion
Regionale Lymphknoten (N)	
NX	Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen mit einem Lymphknoten von 2 cm oder weniger im größten Durchmesser; oder mehrere Lymphknoten von denen keiner mehr als 2 cm im größten Durchmesser hat
N2	Metastasen mit einem Lymphknoten über 2 cm Durchmesser aber weniger als 5 cm im größten Durchmesser; oder multiple Lymphknoten über 2cm Durchmesser aber weniger als 5 cm im größten Durchmesser
N3	Metastasen mit einem Lymphknoten über 5 cm im größten Durchmesser
Fernmetastasen (M)	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Vorhandensein von Fernmetastasen
M1a	Nicht-regionale Lymphknotenmetastasen oder pulmonale Metastasen
M1b	Fernmetastasen außer nicht-regionale Lymphknotenmetastasen oder pulmonale Metastasen

Der histologische Befund eines Seminoms ist sehr charakteristisch. Die Tumorzellen sind monomorph und weisen große Kerne mit prominenten Nukleolen auf. Geradezu charakteristisch ist ein ausgedehntes lymphatisches Entzündungsinfiltrat im Tumor. Repräsentative Beispiele von histologischen Befunden beim Seminom sind in den Abbildungen 1 a-d dargestellt. Aufgrund dieser Morphologie müsste das Seminom zu den besonders häufig mikrosatelliteninstabilen Tumoren gehören. Die Daten zur Mikrosatelliteninstabilität beim Seminom sind allerdings außerordentlich widersprüchlich. Von den 10 Studien, welche Mikrosatelliteninstabilität oder Mismatch-Reparatur-Defekte beim Seminom untersucht haben, wurden immunhistochemisch bislang keine Fälle von Mismatch-Reparatur-Defizienz beschrieben (Rudolph et al., 2017; Sadigh et al., 2020). PCR basierte Studien beschrieben eine Mikrosatelliteninstabilität in 0-27% (Carcano et al., 2016; Honecker et al., 2009; Latham et al., 2019; Mayer et al., 2002; Necchi et al., 2018; Sommerer et al., 2005; Velasco et al., 2008; Velasco et al., 2004). Die größte bisher publizierte Studie umfasste 368 Seminome (Latham et al., 2019).

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es nun, die Häufigkeit der Mikrosatelliteninstabilität beim Seminom an einem besonders großen Kollektiv von 574 Tumoren zu bestimmen. Zudem sollte geklärt werden, ob die Mikrosatelliteninstabilität in den untersuchten Tumoren nur fokal (heterogen) oder im gesamten Tumor nachweisbar ist (homogen).

Abbildung 1: Beispiele für histologische Befunde bei Seminomen. HE-Färbung, 20x. Von a) nach d) mit zunehmender Menge infiltrierender Lymphozyten (erkennbar als kleine, dunkler erscheinende Zellen).

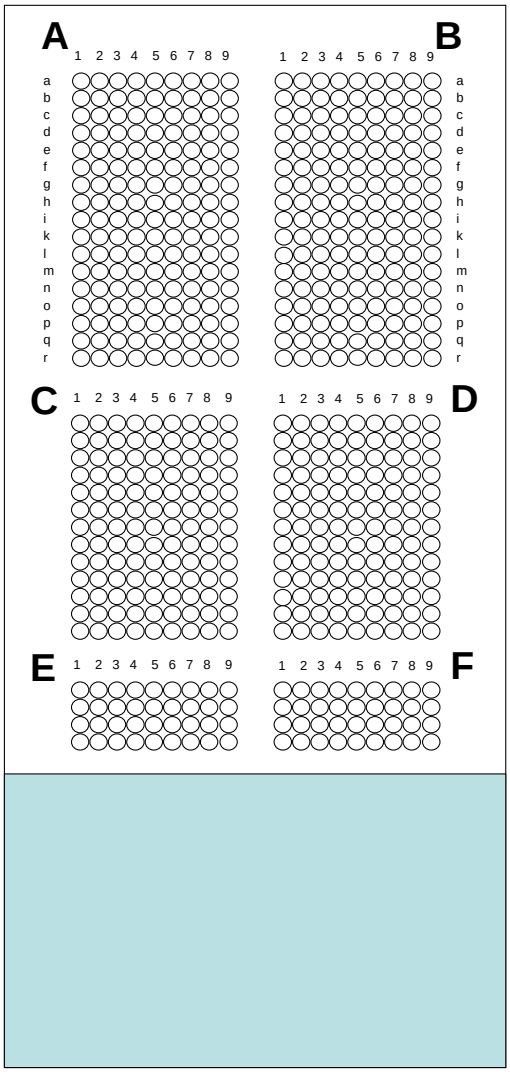


3. Material und Methoden

3.1. Die Tissue Microarray Methode

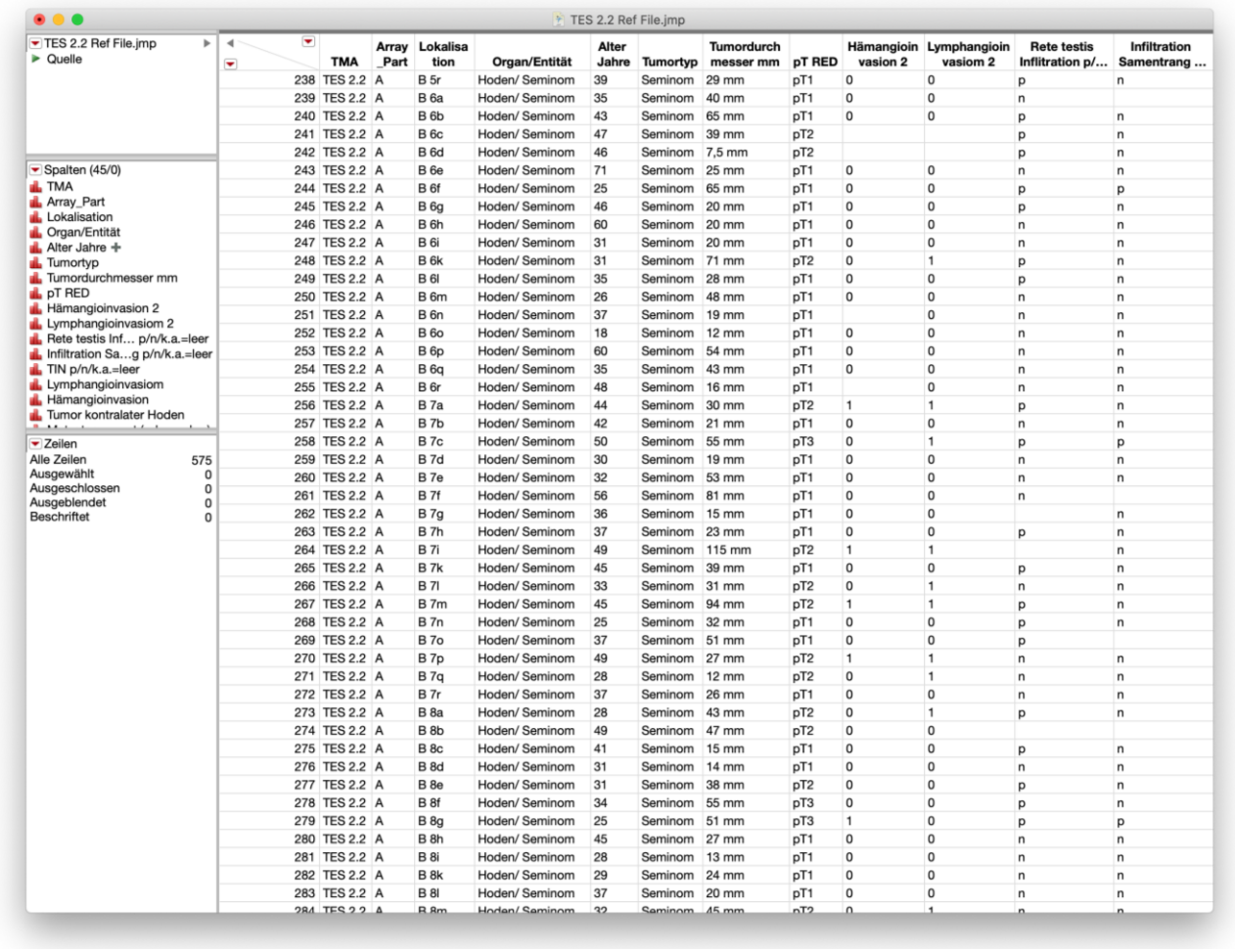
Die Tissue Microarray (TMA) Methode wurde erstmals 1998 von Kononen et al. beschrieben (Kononen et al., 1998). Die Methode hat die Art und Weise der gewebebasierten Forschung mittels in-situ Methoden nachhaltig verändert. Die Mehrzahl von Studien, welche immunhistochemische Verfahren oder Methoden der In-situ-Hybridisierung an größeren Gewebekollektiven anwenden, wird heute an TMAs durchgeführt. Das TMA-Verfahren erlaubt die gleichzeitige Untersuchung von bis zu 1.000 Tumoren auf einem einzigen Gewebeschnitt. Das am UKE verwendete Verfahren ermöglicht die routinemäßige Untersuchung bis zu 632 Proben pro Schnitt. Für die Herstellung von TMAs werden zunächst geeignete Präparate identifiziert. Diese sollen – im Falle von Tumor-TMAs – ausreichend große Tumorareale enthalten, welche so auf dem Schnitt liegen, dass sie auch auf dem korrespondierenden Paraffinblock leicht identifiziert werden können. Der Tumor sollte dabei möglichst rein sein, also wenig Stroma und wenig Nekrosen aufweisen. Geeignete Tumorareale werden von einem Pathologen auf dem HE-Schnitt markiert. Danach müssen die entsprechenden Blöcke herausgesucht und auf ihre Eignung untersucht werden. Ungeeignet sind Gewebeblöcke, die entweder zu dünn sind (Dicke kleiner 2 mm) oder offensichtlich kaum mehr Gewebe beinhalten. Im Falle von geeigneten Blöcken werden diese zusammen mit den Schnitten in einer definierten Reihenfolge neben dem Tissue Arrayer bereitgelegt. Von jedem Gewebeblock wird ein 0,6 mm im Durchmesser messender Zylinder mit einer Hohlnadel entnommen und an einer vordefinierten Stelle in ein vorgefertigtes Loch, dessen Durchmesser ebenfalls 0,6 mm beträgt, eingebracht. Typischerweise werden von einem TMA-Block mindestens acht Replikate hergestellt, so dass acht verschiedene Stanzen auf acht verschiedenen TMA-Blöcken an jeweils der gleichen Position eingebracht werden. Der Prozess wird solange wiederholt, bis der TMA-Block entweder voll aufgefüllt ist, oder aber die Tumorserie, welche dann kleiner ist als 632 Proben, abgearbeitet ist. Die Struktur der TMA-Blöcke ist am UKE immer gleich. Die Gewebeproben werden in sechs Sektoren eingebracht, welche aus Gründen der Orientierbarkeit am TMA unterschiedlich groß sind. Die Sektoren werden mit Großbuchstaben (A-F) definiert. Innerhalb der Sektoren werden die Zeilen mit den Zahlen 1-9 und die Spalten mit Kleinbuchstaben bezeichnet. Ein schematischer Bauplan eines UKE-TMAs ist in Abbildung 2 dargestellt.

Abbildung 2: Grundstruktur eines UKE TMAs



Eine wesentliche Stärke der TMA-Methode liegt auch in der Datenschutz-Tauglichkeit. Während Patientennamen im Rahmen eines TMA-Projektes nie auftauchen, wäre es theoretisch möglich, anhand der Biopsie-Nummer (E-Nummer) den Patientennamen im Pathologieinformationssystem zu identifizieren. Die Biopsie-Nummern sind allerdings für TMA-basierte Gewebeforschung nur während des Herstellungsprozesses eines TMAs erforderlich. Nach der Herstellung werden die TMA-Blöcke entweder pseudonymisiert (Ausblendung der E-Nummern aus den zugänglichen Files) oder anonymisiert (permanente Löschung der Biopsie-Nummern). Ein Ausschnitt aus dem anonymisierten Datenfile zu dem UKE-Seminom-TMA ist in Abbildung 3 dargestellt.

Abbildung 3: Datenfile zum Seminom-TMA (Ausschnitt)



TES 2.2 Ref File.jmp

TES 2.2 Ref File.jmp
Quelle

Spalten (45/0)
TMA
Array_Part
Lokalisation
Organ/Entität
Alter Jahre
Tumortyp
Tumordurchmesser mm
pT RED
Hämangioinvasion 2
Lymphangioinvasiom 2
Rete testis Inf… p/n/k.a.=leer
Infiltration Sa…g p/n/k.a.=leer
TIN p/n/k.a.=leer
Lymphangioinvasiom
Hämangioinvasion
Tumor kontralater Hoden

Zeilen
Alle Zeilen 575
Ausgewählt 0
Ausgeschlossen 0
Ausgeblendet 0
Beschriftet 0

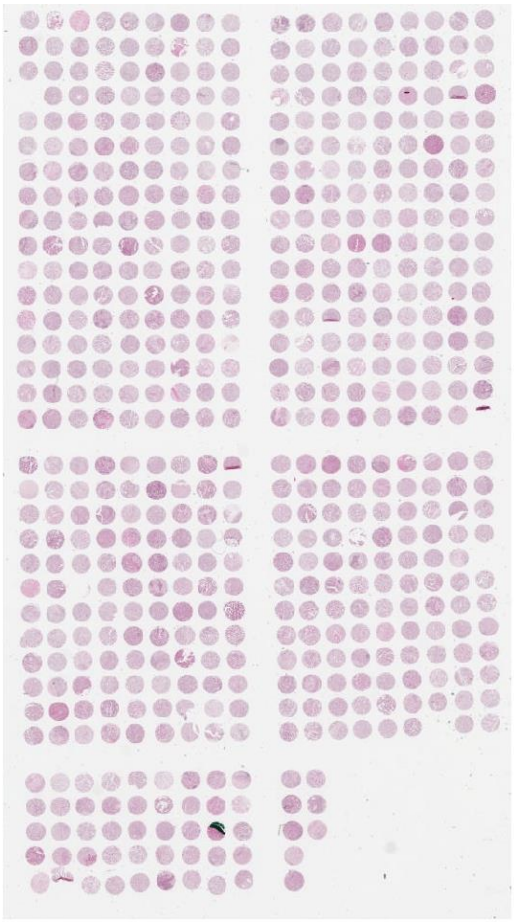
	TMA	Array_Part	Lokalisation	Organ/Entität	Alter Jahre	Tumortyp	Tumordurchmesser mm	pT RED	Hämangioinvasion 2	Lymphangioinvasiom 2	Rete testis Infiltration p/…	Infiltration Samentrang …
238	TES 2.2	A	B 5r	Hoden/ Seminom	39	Seminom	29 mm	pT1	0	0	p	n
239	TES 2.2	A	B 6a	Hoden/ Seminom	35	Seminom	40 mm	pT1	0	0	n	
240	TES 2.2	A	B 6b	Hoden/ Seminom	43	Seminom	65 mm	pT1	0	0	p	n
241	TES 2.2	A	B 6c	Hoden/ Seminom	47	Seminom	39 mm	pT2			p	n
242	TES 2.2	A	B 6d	Hoden/ Seminom	46	Seminom	7,5 mm	pT2			p	n
243	TES 2.2	A	B 6e	Hoden/ Seminom	71	Seminom	25 mm	pT1	0	0	n	n
244	TES 2.2	A	B 6f	Hoden/ Seminom	25	Seminom	65 mm	pT1	0	0	p	p
245	TES 2.2	A	B 6g	Hoden/ Seminom	46	Seminom	20 mm	pT1	0	0	p	n
246	TES 2.2	A	B 6h	Hoden/ Seminom	60	Seminom	20 mm	pT1	0	0	n	n
247	TES 2.2	A	B 6i	Hoden/ Seminom	31	Seminom	20 mm	pT1	0	0	n	n
248	TES 2.2	A	B 6k	Hoden/ Seminom	31	Seminom	71 mm	pT2	0	1	p	n
249	TES 2.2	A	B 6l	Hoden/ Seminom	35	Seminom	28 mm	pT1	0	0	p	n
250	TES 2.2	A	B 6m	Hoden/ Seminom	26	Seminom	48 mm	pT1	0	0	n	n
251	TES 2.2	A	B 6n	Hoden/ Seminom	37	Seminom	19 mm	pT1		0	n	n
252	TES 2.2	A	B 6o	Hoden/ Seminom	18	Seminom	12 mm	pT1	0	0	n	n
253	TES 2.2	A	B 6p	Hoden/ Seminom	60	Seminom	54 mm	pT1	0	0	n	n
254	TES 2.2	A	B 6q	Hoden/ Seminom	35	Seminom	43 mm	pT1	0	0	n	n
255	TES 2.2	A	B 6r	Hoden/ Seminom	48	Seminom	16 mm	pT1		0	n	n
256	TES 2.2	A	B 7a	Hoden/ Seminom	44	Seminom	30 mm	pT2	1	1	p	n
257	TES 2.2	A	B 7b	Hoden/ Seminom	42	Seminom	21 mm	pT1	0	0	n	n
258	TES 2.2	A	B 7c	Hoden/ Seminom	50	Seminom	55 mm	pT3	0	1	p	p
259	TES 2.2	A	B 7d	Hoden/ Seminom	30	Seminom	19 mm	pT1	0	0	n	n
260	TES 2.2	A	B 7e	Hoden/ Seminom	32	Seminom	53 mm	pT1	0	0	n	n
261	TES 2.2	A	B 7f	Hoden/ Seminom	56	Seminom	81 mm	pT1	0	0	n	
262	TES 2.2	A	B 7g	Hoden/ Seminom	36	Seminom	15 mm	pT1	0	0		n
263	TES 2.2	A	B 7h	Hoden/ Seminom	37	Seminom	23 mm	pT1	0	0	p	n
264	TES 2.2	A	B 7i	Hoden/ Seminom	49	Seminom	115 mm	pT2	1	1		n
265	TES 2.2	A	B 7k	Hoden/ Seminom	45	Seminom	39 mm	pT1	0	0	p	n
266	TES 2.2	A	B 7l	Hoden/ Seminom	33	Seminom	31 mm	pT2	0	1	n	n
267	TES 2.2	A	B 7m	Hoden/ Seminom	45	Seminom	94 mm	pT2	1	1	p	n
268	TES 2.2	A	B 7n	Hoden/ Seminom	25	Seminom	32 mm	pT1	0	0	p	n
269	TES 2.2	A	B 7o	Hoden/ Seminom	37	Seminom	51 mm	pT1	0	0	p	
270	TES 2.2	A	B 7p	Hoden/ Seminom	49	Seminom	27 mm	pT2	1	1	n	n
271	TES 2.2	A	B 7q	Hoden/ Seminom	28	Seminom	12 mm	pT2	0	1	n	n
272	TES 2.2	A	B 7r	Hoden/ Seminom	37	Seminom	26 mm	pT1	0	0	n	n
273	TES 2.2	A	B 8a	Hoden/ Seminom	28	Seminom	43 mm	pT2	0	1	p	n
274	TES 2.2	A	B 8b	Hoden/ Seminom	49	Seminom	47 mm	pT2	0	0		
275	TES 2.2	A	B 8c	Hoden/ Seminom	41	Seminom	15 mm	pT1	0	0	p	n
276	TES 2.2	A	B 8d	Hoden/ Seminom	31	Seminom	14 mm	pT1	0	0	n	n
277	TES 2.2	A	B 8e	Hoden/ Seminom	31	Seminom	38 mm	pT2	0	0	p	n
278	TES 2.2	A	B 8f	Hoden/ Seminom	34	Seminom	55 mm	pT3	0	0	p	n
279	TES 2.2	A	B 8g	Hoden/ Seminom	25	Seminom	51 mm	pT3	1	0	p	p
280	TES 2.2	A	B 8h	Hoden/ Seminom	45	Seminom	27 mm	pT1	0	0	n	n
281	TES 2.2	A	B 8i	Hoden/ Seminom	28	Seminom	13 mm	pT1	0	0	n	n
282	TES 2.2	A	B 8k	Hoden/ Seminom	29	Seminom	24 mm	pT1	0	0	n	n
283	TES 2.2	A	B 8l	Hoden/ Seminom	37	Seminom	20 mm	pT1	0	0	n	n

3.2. UKE Seminom TMA

Aus den Archiven der UKE-Pathologie konnten im Rahmen einer früheren Doktorarbeit (Dissertation von Frau Pia Zimmermann, Universität Hamburg) 574 reine Seminome identifiziert werden, welche zwischen 2009 und 2018 am Institut für Pathologie nach einer Orchiektomie diagnostiziert worden waren. Das Seminom-Datenfile (Ausschnitt in Abbildung 3) enthält dabei auch alle aus den Akten des Instituts für Pathologie ermittelten klinisch-pathologischen Daten zu diesen Tumoren. Von jedem Tumor wurde eine 0,6 mm im Durchmesser messende Gewebestanze in den TMA-Empfängerblock eingebracht. Zusätzlich wurden 20 Kontrollgewebe (10 normale Hoden, 2 x Haut; 2 x Niere, 2 x Leber, 2 x Colonschleimhaut, 2 x Schilddrüsenparenchym) auf den TMA gebracht. Abbildung 4 zeigt eine Übersichtsaufnahme des TMA-Blocks, ein repräsentativer Schnitt in HE-Färbung ist in Abbildung 5 gezeigt.

Abbildung 4: UKE Seminom TMA (Makroskopie)

Abbildung 5: UKE Seminom TMA (HE-Färbung/Übersicht)



3.3. Immunhistochemie

Für die Untersuchung wurden vier 2,5 µm dicke Schnitte des Seminom-TMA-Blocks angefertigt. Alle vier Schnitte wurden am gleichen Tag und unmittelbar hintereinander durch eine Assistentin hergestellt. Die Färbung erfolgte weniger als eine Woche später in einem automatischen Färbeapparat (DAKO/ Agilent Autostainer Link 48). Die Schnitte wurden für 5 Minuten bei 120°C in EDTA-Citrat-Puffer (pH 7,8) einer hitzeinduzierten Epitop-Demaskierungsprozedur unterzogen. Danach wurden die Antikörper MLH1 (Maus, monoklonal, Klon ES05), PMS2 (Kaninchen, monoklonal, Klon EP51), MSH2 (Maus, monoklonal, Klon FEL) und MSH6 (Kaninchen, monoklonal, Klon EP49) als „ready-to-use“ unverdünnt für 20 Minuten (MLH1, MSH2, MSH6) oder 30 Minuten (PMS2) appliziert. Alle Antikörper stammen von der Firma DAKO in Glostrup, Dänemark. Gebundene Antikörper wurden anschließend mit dem Envision-Kit visualisiert. Die Kernfärbung wurde für jeden Tumor registriert, wobei eine semiquantitative Abschätzung in 0, 1+, 2+ oder 3+ erfolgte. Gleichzeitig wurde der prozentuale Anteil der gefärbten Tumorzellen festgelegt. In Gewebespots, bei denen keine nukleäre Tumorzellfärbung (null) nachweisbar war, wurde gleichzeitig vermerkt, ob eine nukleäre Färbung in peritumoralen Stromazellen oder Entzündungszellen darstellbar war. Bei Ausfall von mindestens einem der Mismatch-Reparatur-(MMR)-Proteine wurde eine MMR-Defizienz angenommen, sofern der Ausfall lediglich die Tumorzellen betraf und das interne Kontrollgewebe positiv war. Bei allen TMA-Spots mit vermuteter MMR-Defizienz oder im Falle einer nicht eindeutigen Färbung wurde die Färbeprozedur an Großschnitten wiederholt. Im Falle von Befunden, welche auch am Großschnitt mit einer MMR-Defizienz vereinbar wären, wurde anschließend eine PCR-Untersuchung auf Mikrosatelliteninstabilität vorgenommen. Im Falle einer bestätigten MMR-Defizienz wurden auch sämtliche weiteren verfügbaren tumorhaltigen Gewebeblöcke an Großschnitten immunhistochemisch untersucht, um das Ausmaß der Veränderungen bzw. eine allfällige Tumorheterogenität nachzuweisen.

3.4. PCR-Analyse

Eine PCR-Analyse wurde nur in einem Seminom durchgeführt. In diesem Fall kam ein PCR-basierter Assay (MSI Analysis System, Promega, Madison, WI, USA) zum Einsatz. Der Assay beinhaltet die fünf Mikrosatellitenloci des „Bethesda Panels“ und zusätzlich den komplexen Tetra-Penta-Repeat-Locus (MYCL1). Das Bethesda Panel beinhaltet zwei Mononukleotid-Repeats (BAT25, BAT26) und drei Dinukleotid-Repeats (D2S123, D5S346, D17S250). Für die PCR-Untersuchung wurde DNA aus Tumoren und nicht-neoplastischem Gewebe separat extrahiert.

3.5. Statistik

Statistische Untersuchungen kamen in der vorliegenden Studie nicht zur Anwendung, da letztlich nur ein einziger mikrosatelliteninstabiler Fall identifiziert werden konnte.

4. Ergebnisse

4.1. TMA Analyse

Von den 574 im TMA enthaltenen Seminomen waren 536 Tumoren (93%) auswertbar. 38 Tumoren ergaben ein nicht interpretierbares Ergebnis, weil auf dem entsprechenden Gewebestück keine eindeutigen Tumorzellen abgrenzbar waren oder weil an den entsprechenden Positionen im TMA kein Gewebe enthalten war. Fehlende Gewebespots kommen bei TMA-Untersuchungen praktisch immer vor. Sie sind entweder durch ein Abschwimmen von einzelnen Gewebefragmenten während der Färbeprozedur zu erklären, oder aber auch durch ein inhärentes methodisches Problem bedingt, welches durch die unterschiedliche Dicke der für die TMA-Herstellung verwendeten Gewebeblöcke bedingt ist. Die unterschiedliche Dicke der für die TMA-Herstellung verwendeten Paraffinblöcke führt automatisch zu einer unterschiedlichen Länge der in den Empfängerblock eingesetzten Gewebezylinder. Da kurze Zylinder zudem manchmal bei der TMA-Herstellung etwas tiefer in das vorgefertigte Loch eingebracht werden als vorgesehen, gibt es bereits auf den ersten Schnitten eines TMA-Blocks gelegentlich einzelne „fehlende“ Spots. Spätestens auf den tiefen Schnittstufen des TMA-Blocks sind dann immer mehr Gewebepositionen wegen der Kürze der ursprünglichen Gewebezylinder leer.

In 481 der 536 evaluierbaren Seminome fand sich für alle vier MMR-Proteine kein Nachweis eines Expressionsverlustes. Bei den verbliebenen 55 Tumoren war mindestens ein MMR-Protein nicht auswertbar, weil sich weder im Tumor noch in den assoziierten nicht-neoplastischen Zellen eine Färbung nachweisen ließ.

Repräsentative TMA Befunde sind in den Abbildungen 6-9 dargestellt.

Abbildung 6: Immunhistochemische Färbungen der MMR-Proteine des Tumors mit der TMA-Koordinate A8q. Originalvergrößerung 10x. Ergebnis: Es zeigt sich eine erhaltene nukleäre Expression aller vier MMR-Proteine.

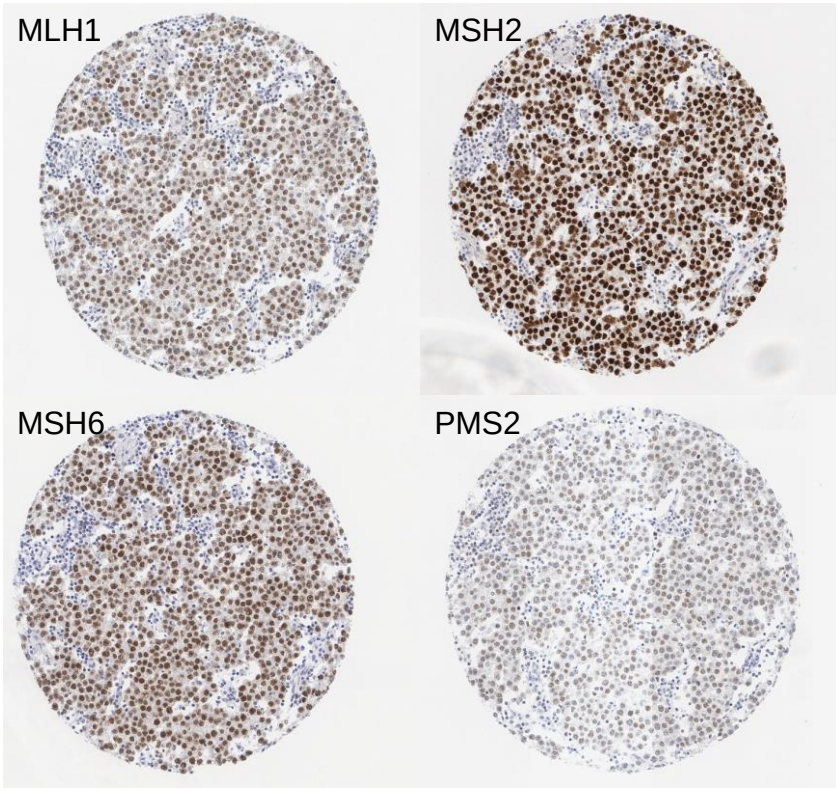


Abbildung 7: Insgesamt schwächere, aber dennoch positive immunhistochemische Färbungen aller vier MMR-Proteine des Tumors mit der TMA-Koordinate A7r. Originalvergrößerung 10x.

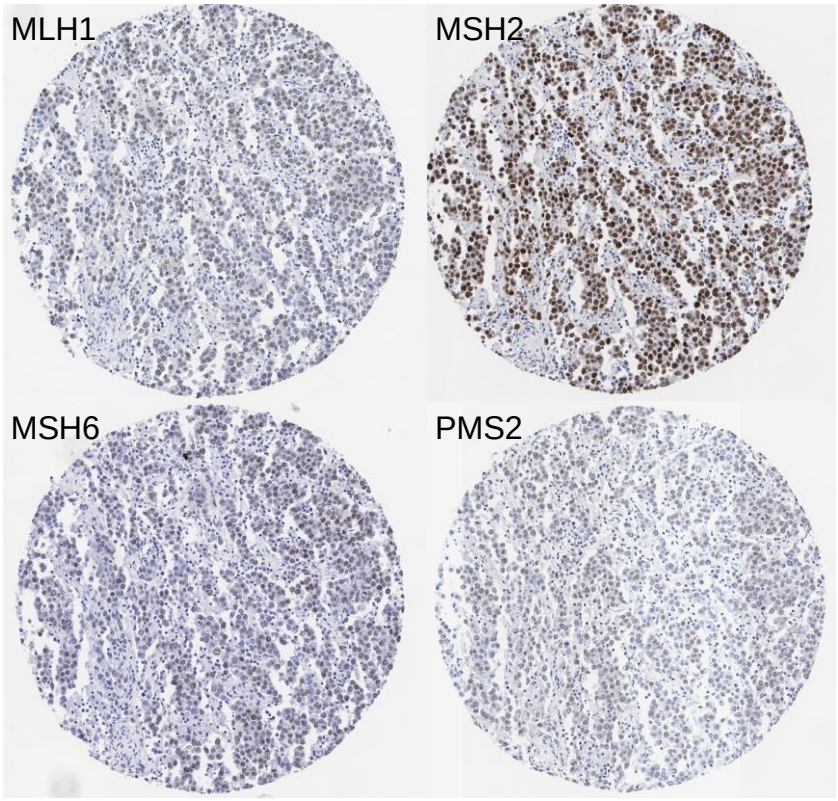


Abbildung 8: Immunhistochemische Färbungen der MMR-Proteine des Tumors mit der TMA-Koordinate A8r. Originalvergrößerung 10x.

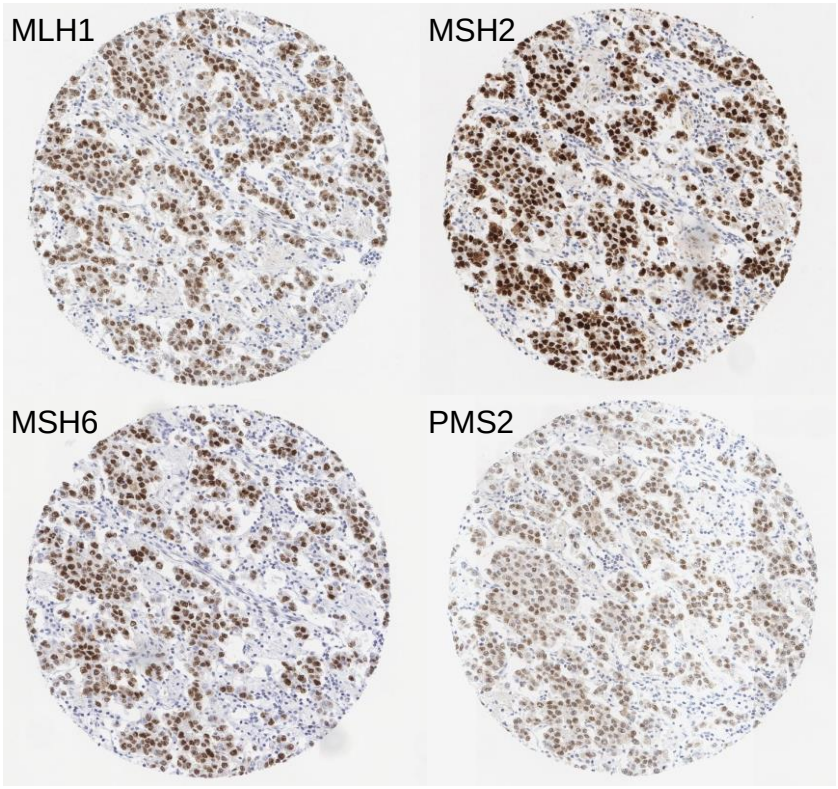
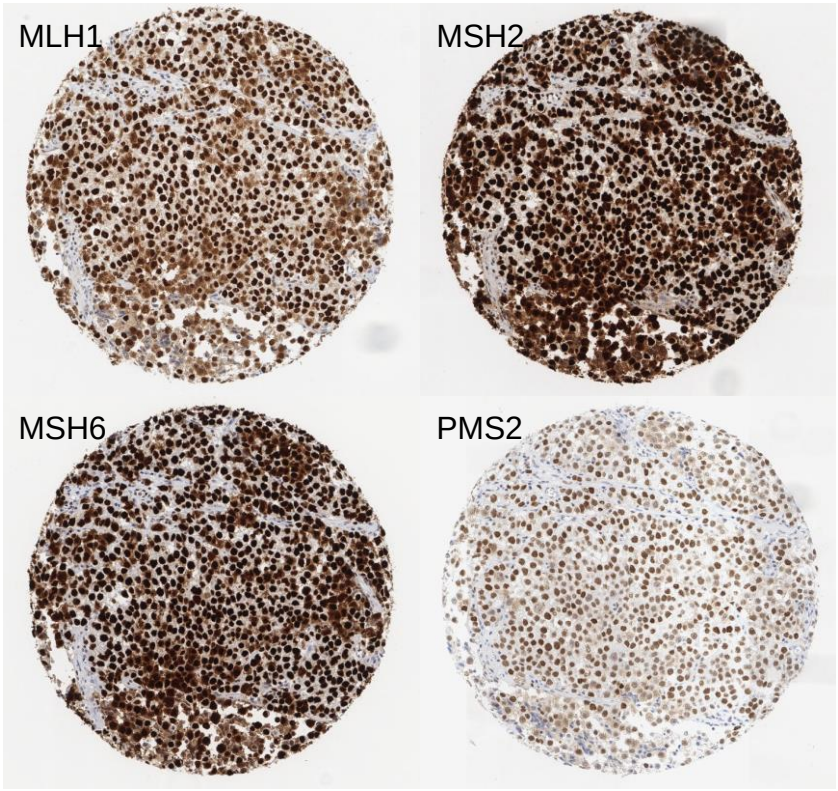


Abbildung 9: Besonders starke immunhistochemische Färbungen der MMR-Proteine des Tumors mit der TMA-Koordinate A9r. Originalvergrößerung 10x.



4.2. Großschnitt-Validierung

Um zu klären, ob bei den 55 Seminomen mit unklarem Befund am TMA-Schnitt eine MMR-Defizienz vorlag oder nicht, wurden von all diesen Fällen Großschnitte angefärbt und mit Antikörpern gegen die nicht interpretierbaren MMR-Proteine gefärbt. Die Großschnitte dieser Proteine zeigten meistens einen deutlichen Färbegradienten im Präparat mit am besten erhaltener Färbung in der Peripherie, unmittelbar unter der *Capsula albuginae* und zunehmend schlechterer, bis vollständig fehlender Färbung in Richtung des Hodenzentrums. Repräsentative Bilder zu diesen Färbegradienten sind in Abbildung 10 dargestellt. Die Abbildung macht deutlich, dass im Bereich der fehlenden Färbung die Stanzzylinder für die TMA-Herstellung entnommen worden waren. Bei 54 der untersuchten 55 Tumoren (99%) waren derartige Färbeartefakte verantwortlich für den fehlenden Nachweis von MMR-Proteinen am TMA. Nur in einem Fall fand sich ein eindeutiger Verlust der MLH1- und PMS2-Expression in Tumorzellen, wobei zumindest arealweise noch eine kräftige Anfärbung von nicht neoplastischen Zellen erkennbar war. Die Befunde in diesem Tumor sind in Abbildung 11 dargestellt. Auch hier wird erkennbar, dass im Bereich der für die TMA-Herstellung entnommenen Stanzen am Großschnitt keine nachweisbare Färbung auftrat. Somit konnte insgesamt in einem von 536 auswertbaren Seminomen (0,19%) eine MMR-Defizienz nachgewiesen werden.

Abbildung 10: Beispiel für einen Großschnitt mit inhomogener Färbung, hier von MSH6. Die runden Defekte markieren die Lage der Stanzen, die in den TMA verbaut wurden.

Die Bildausschnitte rechts zeigen eine starke, gut erhaltene Färbung in der Peripherie des Tumors und eine sehr schwache bis negative Färbung im zentralen Bereich. Im TMA wurden solche Fälle häufig mit 0 bewertet, d. h. Negativität sowohl in Tumor- als auch in Stroma- und Entzündungszellen. Originalvergrößerung 5x – 20x.

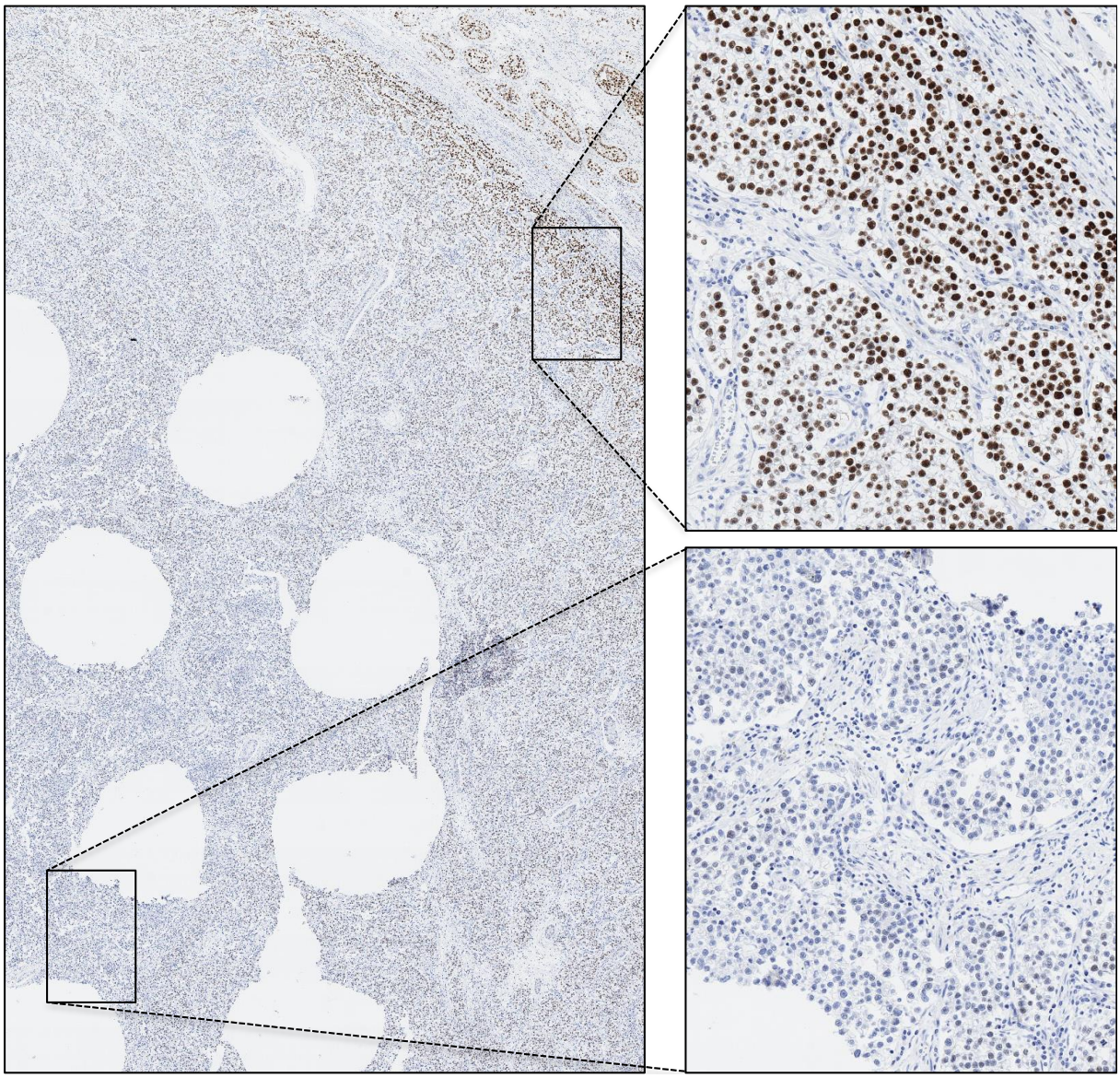
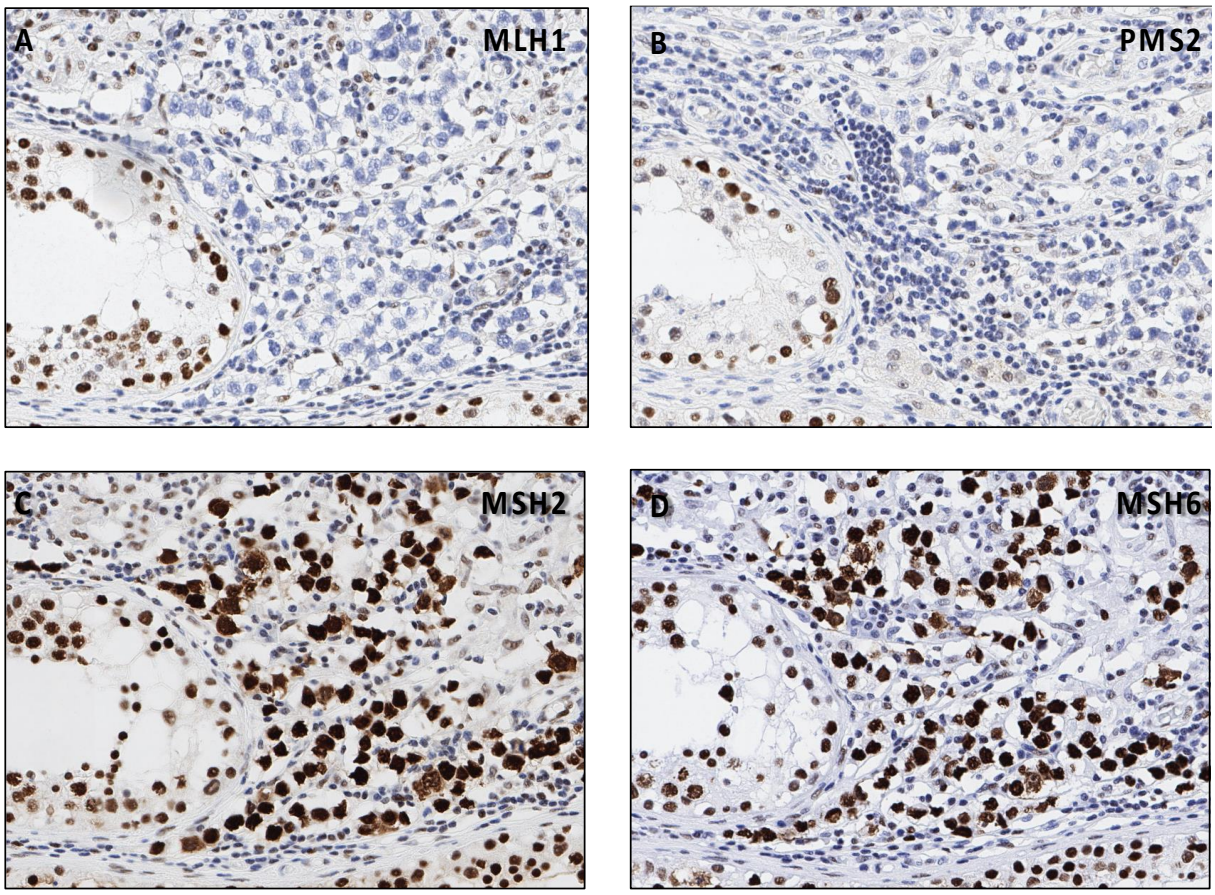


Abbildung 11: Das identifizierte Seminom mit MMR-Defizienz. Die IHC auf Großschnitten zeigt einen Expressionsverlust von MLH1 (A) und PMS2 (B) in Tumorzellen, während benachbarte Stroma- und Entzündungszellen sowie Zellen in den verbleibenden Samenkanälchen positiv sind. MSH2 (C) und MSH6 (D) sind in den Tumorzellen erhalten. Originalvergrößerungen 40x.



4.3. Untersuchung der Tumor-Heterogenität

Von dem MMR-defizienten Tumor waren insgesamt drei tumorhaltige Paraffinblöcke archiviert worden. Die immunhistochemische Evaluation von Großschnitten aller drei Blöcke zeigte überall im invasiven Tumor den gleichen Verlust von MLH1 und PMS2 wie auch im initial untersuchten Schnitt. In einem der drei Blöcke war in der Tumorperipherie auch eine Vorläuferläsion im Sinne einer Keimzellneoplasie in-situ (GCNIS)/testikulären intraepithelialen Neoplasie (TIN) darstellbar. In dieser Vorläuferläsion waren die Proteine MLH1 und PMS2 – im Gegensatz zum invasiven Tumor – noch nachweisbar.

4.4. PCR-Validierung der Mikrosatelliteninstabilität

Die PCR-Analyse ergab für die untersuchten Mikrosatellitenloci die folgenden Ergebnisse. BAT25: stabil, D12S250: stabil, BAT26: instabil, D5S346: stabil, D2S123: nicht interpretierbar, MYCL1: instabil.

Aufgrund der Kriterien für die Verwendung des Bethesda Panels wurde der Tumor als MSI-low kategorisiert. Da der zusätzlich analysierte Wert MYCL1 instabil und das Bethesda Panel unvollständig untersuchbar war (D2S123 nicht interpretierbar), ist bei dem vorliegenden Seminom aber von einer „echten“ Mikrosatelliteninstabilität auszugehen.

5. Diskussion

Die vorliegende Studie ist die mit Abstand größte ihrer Art. Frühere Untersuchungen zur Mikrosatelliteninstabilität beim Seminom des Hodens hatten lediglich 23-368 Tumoren untersucht (Carcano et al., 2016; Honecker et al., 2009; Latham et al., 2019; Mayer et al., 2002; Necchi et al., 2018; Rudolph et al., 2017; Sadigh et al., 2020; Sommerer et al., 2005; Velasco et al., 2008; Velasco et al., 2004). Die größte bisher publizierte Studie umfasste dabei 368 Seminome (Latham et al., 2019). Die Größe der Studie wurde durch das große Gewebearchiv eines uropathologischen Zentrums in Kombination mit der Tissue Microarray Technik ermöglicht. Die TMA-Technik erlaubt die gleichzeitige Untersuchung von Hunderten von Tumoren auf einem einzigen Gewebeschnitt und führt so zu einer massiven Beschleunigung und Ökonomisierung von Gewebestudien. Der einzige in der Literatur immer wieder hervorgehobene konzeptuelle Nachteil des TMA-Verfahrens ist, dass pro Tumor lediglich ein 0,6 mm im Durchmesser messendes Gewebefragment zur Untersuchung gelangt. Daraus ergibt sich die Frage der Repräsentativität von an TMAs erhobenen Befunden (Sauter, 2010). Tatsächlich haben zahlreiche Studien gezeigt, dass TMA-Untersuchungen zur klinischen oder biologischen Relevanz von Biomarkern mindestens gleich gute Ergebnisse erzielen wie Untersuchungen an Großschnitten. Alle in der Literatur bekannten etablierten molekularen Prognoseparameter konnten in TMA-Studien reproduziert werden, wenn die Studien an ausreichend großen Tumorkollektiven durchgeführt wurden. So konnte für das Mammakarzinom die prognostische Bedeutung der Expression von Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren, der nukleären p53-Akkumulation (Torhorst et al., 2001) oder eines erhöhten Ki67-Labeling-Index (Ruiz et al., 2006) sowie einer Amplifikationen von HER2 und c-MYC mit hochsignifikanten statistischen Daten am TMA nachvollzogen werden (Al-Kuraya et al., 2004). Beim Harnblasenkarzinom konnte die prognostische Bedeutung der nukleären p53-Akkumulation (Hodgson et al., 2017) und selbst des Differenzierungsgrades am TMA reproduziert werden (Nocito et al., 2001). Beim Nierenzellkarzinom ließ sich die bekannte Prognoserelevanz der Vimentin-Expression am TMA bestätigen (Moch et al., 1999). Beim Prostatakarzinom konnte die Prognoserelevanz der nukleären p53-Akkumulation (Schlomm et al., 2008) und des Expressionsverlustes (Deletion) von PTEN am TMA bestätigt werden (Krohn et al., 2012).

Als Erklärung dafür, dass TMA-Studien zumindest ähnlich gute Ergebnisse erzielen wie Studien an Großschnitten, kommen vor allem zwei Punkte infrage: Erstens sind auch Großschnitte für einen gesamten zur Untersuchung gelangenden Tumor nicht repräsentativ. Misst ein Tumor beispielsweise 5 cm im Durchmesser, wird auf einem Gewebeschnitt, der eine Fläche von 2 x 1 cm Tumorgewebe enthält und 2,5 µm dick ist, nur ein 1/130.000 des Tumor-Gesamtvolumens untersucht. Der zweite für TMA-Untersuchungen sprechende Punkt ist, dass insbesondere die immunhistochemischen Verfahren störungsanfällig sind und es auch zu artifiziell positiven (falsch-positiven) Färbungen kommen kann. Eine größere zur Untersuchung gelangende Gewebemenge führt dabei auch zu einem höheren Risiko für falsch-positive Immunfärbungen. Der Vorteil der TMA-Technik liegt – bezüglich des Risikos artifizieller falsch-positiver Ergebnisse – nicht nur in der Kleinheit der untersuchten Gewebefragmente, sondern auch in der identischen Größe der zu Untersuchung gelangenden Tumoranteile. Bei jedem Tumor ist somit das Risiko eines falsch-positiven Färbeergebnisses ungefähr gleich groß. Nur eine einzige Studie hatte in der Vergangenheit die prognostische Bedeutung von Biomarkern an TMAs und den korrespondierenden Großschnitten von den Blöcken, aus denen der TMA hergestellt worden war, untersucht. In dieser Studie von Thorhorst (Torhorst et al., 2001) wurden mehr als 500 Mammakarzinome auf die Expression von Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor und p53 untersucht, wobei vier unterschiedliche TMAs zur Untersuchung gelangten, einer mit einer Tumorprobe aus dem Tumorzentrum und drei mit drei voneinander möglichst weit entfernten Tumorproben aus der Tumorperipherie. Die Studie zeigte bezüglich Östrogen- und Progesteronrezeptor identische Ergebnisse an TMAs und an Großschnitten mit einer jeweils hochsignifikanten Prognoserelevanz für Östrogen und Progesteronrezeptor (jeweils $p<0,0001$). Für p53 wichen die Daten aber erheblich voneinander ab. An den TMAs fand sich eine Positivität in 15-21% der Tumoren, an den Großschnitten jedoch beinahe doppelt so viele positive Fälle (43%). Während diese Daten auf den ersten Blick als Argument für eine ungenügende Repräsentativität der TMA-Proben mit dementsprechendem häufigen Verpassen p53-positiver Tumoranteile hätten gewertet werden können, zeigten die Prognosedaten nur für die TMA-Befunde eine signifikante prognostische Bedeutung, nicht aber für die am Großschnitt erhobenen p53-Befunde. Diese Daten sprechen stark dafür, dass die Abweichung zwischen TMA und Großschnitt-Daten durch eine Überinterpretation von biologisch/klinisch irrelevanten p53-Färbungen am Großschnitt bedingt waren.

Die Identifikation von „seltenen“ Ereignissen ist eine besonders geeignete Anwendung der TMA-Methode. Eine rasche Untersuchung einer großen Zahl von Tumoren ist bestens dafür geeignet, geeignete Fälle für eine Folgestudie zu identifizieren. Beispielsweise hatten Marx und Kollegen (Marx et al., 2010) an einem Kolonkarzinom-TMA HER2-positive Kolonkarzinome identifiziert, um diese dann in einer Folgeuntersuchung auf eine mögliche

Heterogenität der HER2-Amplifikation zu evaluieren. Diese Studie hatte ergeben, dass eine HER2-Amplifikation bei ca. 2% der Kolonkarzinome vorkommt und dass diese Amplifikation in den meisten Fällen heterogen ist, also nur einen Teil des Tumors betrifft.

Die erfolgreiche Untersuchung von 536 Seminomen in dieser Studie hatte zur Identifikation eines einzigen Tumors mit eindeutiger Mismatch-Reparatur-Defizienz geführt. Dass die gesamte Tumormasse dieses Seminoms einen Expressionsverlust von MLH1 und PMS2 aufwies, macht deutlich, dass der Ausfall dieser Proteine früh in der Entstehung dieses Tumors aufgetreten sein muss. Dabei spricht der Nachweis von MLH1 und PMS2 in kleinen erhaltenen Anteilen einer Vorläuferläsion (Keimzellneoplasie in-situ, GCNIS bzw. testikuläre intraepitheliale Neoplasie, TIN) dafür, dass der Proteindefekt in etwa am Übergang der nicht-invasiven Vorstufe in das invasive Seminom aufgetreten sein muss. Es ist bemerkenswert, dass nur einer der fünf untersuchten bzw. der vier auswertbaren Marker des Bethesda Panels in diesem Seminom eine Instabilität zeigte. Würde man den für das Kolonkarzinom geltenden Regeln folgen, wäre hier eine MSI-low zu diagnostizieren. Der Tumor wäre folglich als Mikrosatelliten-stabil klassifiziert worden und damit kein Kandidat für eine Immuncheckpoint-Inhibitoren-Therapie mit dem Medikament Pembrolizumab. Dabei ist anzumerken, dass die Auswahl der fünf Mikrosatelliten des Bethesda Panels aufgrund von Kolonkarzinom-Daten erfolgte (Umar et al., 2004). Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Instabilität an einzelnen Loci dürfte allerdings auch vom Funktionszustand der Gene abhängen, welche in topografischer Beziehung zu dem jeweiligen Mikrosatelliten liegen (Schuster-Bockler and Lehner, 2012; Supek and Lehner, 2015). Es ist deswegen gut möglich, dass bei Tumoren, welche sich von anderen Ursprungsgeweben als dem Kolon ableiten, andere Mikrosatelliten häufiger betroffen sind als diejenigen des Bethesda Panels. Dass sich in vorliegenden MMR-defizienten Tumor auch der zusätzlich untersuchte Locus MCYL1 als instabil erwies, spricht jedenfalls auch für eine biologisch relevante Mikrosatelliteninstabilität des nachgewiesenen MMR-defizienten Seminoms.

Die vorliegenden Daten sprechen dafür, dass das Seminom eine Neoplasie mit besonders geringer Häufigkeit einer Mikrosatelliteninstabilität bzw. MMR-Defizienz ist (0,19 %). Dieses Ergebnis passt prinzipiell gut zu den Daten einiger anderer kürzlich erschienener Publikationen. Eine Untersuchung von 32 Seminomen mittels PCR unter Verwendung eines modifizierten Bethesda Panels hatte nicht zum Nachweis eines mikrosatelliteninstabilen Seminoms geführt (Carcano et al., 2016). Auch Necchi et al. fanden keine Mikrosatelliteninstabilität in 23 fortgeschrittenen, rezidivierten Seminomen (Necchi et al., 2018). Zwei kürzliche Studien hatten Daten von Next-Generation-Sequencing Untersuchungen an großen Kohorten von nicht weiter charakterisierten Keimzelltumoren beschrieben und dabei in 0 von 150 (Bonneville et al., 2017) und 1 von 354 Fällen (Latham et al., 2019) eine Mikrosatelliteninstabilität gefunden. Dabei ist unklar, ob es sich bei dem einen

mikrosatelliteninstabilen Fall um ein Seminom oder um einen anderen Keimzelltumor gehandelt hat. Mikrosatelliteninstabile Seminome waren allerdings in einigen früheren Studien beschrieben worden, welche aber Kriterien für die Definition einer Mikrosatelliteninstabilität verwendet haben, die heute nicht mehr üblich sind. Beispielsweise hatten Velasco et al. (Velasco et al., 2004) eine Mikrosatelliteninstabilität in 13 von 44 Seminomen unter Verwendung eines Panels von 10 Mikrosatellitenmarkern und einem vergleichsweise geringen Schwellenwert (30%) zur Definition einer Mikrosatelliteninstabilität gefunden. Die meisten früheren immunhistochemischen Untersuchungen zur Expression von Mismatch-Reparatur-Proteinen in Keimzelltumoren verwendeten semiquantative Ansätze zur Quantifizierung der immunhistochemischen Färbungen (low vs. high), um die immunhistochemischen Befunde mit anderen Tumorparametern, wie den klinischen Verlauf oder histopathologischen Parametern, zu vergleichen. Lediglich Olasz et al. (Olasz et al., 2005) verwendeten einen dieser Arbeit ähnlichen immunhistochemischen Ansatz für die Untersuchung von MLH1, PMS2, MSH2 und MSH6. Sie beschrieben einen Verlust von MMR-Proteinen in immerhin 14 von 51 untersuchten Keimzelltumoren verschiedener Subtypen (darunter 10 Seminome). Dass keiner der Tumoren mit einem MMR-Proteinverlust eine MSI-high in der PCR-Analyse zeigte, würde zu den Ergebnissen dieser Arbeit passen, dass die ungewöhnlich hohe Rate von Seminomen mit MMR-Proteinverlust durch technische Probleme bei der Immunhistochemie bedingt sein könnte.

Insgesamt sprechen die meisten und v.a. die aktuellsten Studien dafür, dass es sich beim Seminom – trotz einer ungewöhnlich ausgeprägten Entzündungsreaktion – um einen Tumor mit einer ungewöhnlich geringen Anzahl von Fällen mit Mikrosatelliteninstabilität handelt. Zwei verschiedene Erklärungsansätze kommen für diesen Befund infrage: Einerseits ist es möglich, dass Keimzellen einen besonderen Schutzmechanismus gegen das Auftreten einer Mikrosatelliteninstabilität aufweisen. Schließlich handelt es sich bei Keimzellen um besonders rasch proliferierende Zellen, deren genomische Integrität von besonderer Bedeutung ist. Keimzellen würden somit durch eine Defizienz des Mismatch-Reparatur-Systems besonders stark geschädigt. Die Art, eines solchen „Keimzell-Schutzsystems“ ist allerdings nicht bekannt. Eine andere Erklärung wäre, dass mikrosatelliteninstabile Tumoren im Hoden zwar mit „normaler“ Häufigkeit vorkommen, dass diese aber überdurchschnittlich häufig vom Immunsystem eliminiert werden. Tatsächlich ist eine Selbstheilung von Seminomen des Hodens ein gut bekanntes Phänomen. Es wird angenommen, dass ca. 10% aller Seminome durch eine starke Entzündung eliminiert werden (Fabre et al., 2004). Von diesen Tumoren bleiben lediglich kleine Narben im Hoden erhalten (sogenannte ausgebrannte Seminome). In einem Teil dieser Tumoren kommt es später zu retroperitonealen Rezidiven, welche dadurch erklärt werden, dass es sich um Metastasen von Seminomen handelt, welche an ihrem Ursprungsort aber entzündungsbedingt nicht überleben konnten. Es wäre interessant, eine

Serie von derartigen Metastasen daraufhin zu untersuchen, ob bei diesen Tumoren gehäuft eine Mikrosatelliteninstabilität gefunden wird.

Ein hervorzuhebender Aspekt dieser Untersuchung ist auch die hohe Zahl von Fällen mit technischen Problemen bei der Immunhistochemie. In 55 von 536 untersuchbaren Karzinomen (10%) ergab die Immunhistochemie für mindestens eines der untersuchten Mismatch-Reparatur-Proteine kein verwertbares Ergebnis. Dass die Immunhistochemie eine Methode mit beträchtlichen Fehlerquellen darstellt, ist bekannt (Miller, 2019). Immunhistochemische Untersuchungen zur Expression von Proteinen in bestimmten Geweben oder Tumortypen führen häufig zu stark voneinander abweichenden Ergebnissen, wobei die Gründe hierfür meistens in verschiedenen Färbeeigenschaften der unterschiedlichen Antikörper und in Protokollunterschieden zwischen den Laboratorien begründet sind (Schlomm et al., 2008). Die Färbeprobleme in der vorliegenden Studie können durch Antikörper-Probleme oder Protokollabweichungen allerdings nicht erklärt werden. Die falsch-negativen Ergebnisse wurden schließlich in einem zertifizierten Labor mit einem Färbeautomaten erzielt und die zahlreichen korrekt gefärbten Gewebespots auf den untersuchten TMAs belegen die prinzipielle Validität des verwendeten Färbeprotokolls.

Die Ursache für die ungenügende Färbung vieler Seminome dürfte dementsprechend in der präanalytischen Phase liegen und durch Unterschiede in der Fixation der Gewebe bedingt sein. Die Fixation mit 4%-igem, gepufftem Formalin hat den Zweck, die Autolyse des nicht mehr durchbluteten Gewebes durch eine Stabilisierung der Gewebestrukturen durch ein sogenanntes Crosslinking zu verhindern. Optimalerweise würden alle Gewebe genau gleich fixiert, doch ist dies aus praktischen Gründen nicht erreichbar. Zum Zweck der Fixation werden bei der Operation entnommene Präparate in ein formalingefülltes Gefäß gelegt, worauf das Formalin in das Gewebe eindringt. Die Durchsetzung des Gewebes durch Formalin verläuft relativ langsam und ist abhängig von der Dichte des Gewebes, vom Fettgehalt und davon, ob besonders schwer durchdringbare Kapseln oder Gewebeschichten das Eindringen des Formalins behindern. Das Ausmaß und die Qualität der Fixation sind somit innerhalb eines größeren Gewebestücks in der Regel heterogen. Die äußeren Schichten werden stärker fixiert als die zentral liegenden Gewebeanteile. Die Fixationsqualität ist auch von der Menge des für die Fixation eines Präparates verwendeten Formalins abhängig. Empfohlen wird eine zehnmal größere Formalin- als Gewebemenge, um sicherzustellen, dass das 4%-ige Formalin nicht durch im Präparat vorhandene Flüssigkeiten so stark verdünnt wird, dass die Fixationsqualität leidet. Ein weiterer Aspekt ist der Zeitdruck, der für die Bearbeitung von Präparaten in Pathologieinstituten besteht. Eine schnelle Pathologiediagnose kann dazu führen, dass die Hospitalisationszeit von Patienten verkürzt wird. Unter dem Druck, Diagnosen so schnell wie möglich abzugeben, werden Präparate häufig nur so kurz wie möglich fixiert und dann weiterverarbeitet. Viele Präparate weisen demnach ein Nebeneinander von überfixierten

(Randzone von Präparaten), normal/optimal fixierten und unterfixierten Gewebeabschnitten (im Zentrum des Präparates) auf. Unterfixierte Gewebeabschnitte kommen im Laufe der weiteren Verarbeitung mit Ethanol-Lösungen in Kontakt und werden dadurch „Ethanol-fixiert". Die Ethanolfixation führt nicht zu einem Crosslinking, sondern zu einer Koagulation, was die Epitope von Proteinen auf eine andere Art verändert und somit zu andersartigen Färbereaktionen bei immunhistochemischen Untersuchungen führen kann (Chung et al., 2018). Die Alkoholfixation ist beispielsweise eine der bekannten Ursachen für falsch-positive immunhistochemische HER2-Befunde (Jacobs et al., 1999a, b).

In früheren Untersuchungen an Harnblasenkarzinomen, fortgeschrittenen Prostatakarzinomen, Pankreaskarzinomen und Ovarialkarzinomen war am Institut für Pathologie des UKE ein identischer Ansatz zur Identifizierung der seltenen Mismatch-Reparatur-defizienten Tumoren verwendet worden wie in der aktuellen Studie. Bei diesen Studien war die Zahl der Fälle mit technischen Problemen geringer gewesen als beim Seminom (Fraune et al., 2020a; Fraune et al., 2020b; Fraune et al., 2020c; Fraune et al., 2020d; Fraune et al., 2020e). Es wäre denkbar, dass die dichte *Capsula albuginae* ein besonders starkes Hindernis für das Eindringen von Formalin ins Gewebe darstellt, so dass der Hoden für immunhistochemische Untersuchungen möglicherweise generell ein besonders artefaktanfälliges Organ darstellt.

Es ist hervorzuheben, dass falsch-negative Befunde bei der Untersuchung von Mismatch-Reparatur-Proteinen auch in der Routinepathologie vorkommen können. In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Cohen et al. (Cohen et al., 2019) wurden immunhistochemische Fehlinterpretationen einer MMR-Defizienz als wichtigste Ursache eines Nichtansprechens von mikrosatelliteninstabilen Tumoren auf eine Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren beschrieben. Angesichts der erheblichen klinischen Konsequenzen derartiger Fehldiagnosen, aufgrund deren Patienten entweder eine möglicherweise lebensrettende Therapie vorenthalten oder eine nutzlose aber teure Therapie verabreicht wird, empfiehlt die Europäische Gesellschaft für Medizinische Onkologie die gleichzeitige Bestimmung von Mismatch-Reparatur-Defizienz und Mikrosatelliteninstabilität mittels Immunhistochemie und PCR-Untersuchung (Luchini et al., 2019).

Zusammengefasst zeigen die Daten dieser Untersuchung, dass eine Mismatch-Reparatur-Defizienz bzw. eine Mikrosatelliteninstabilität in Seminomen äußerst selten ist, aber dennoch vorkommt. Die Mikrosatelliteninstabilität ist somit nicht für die pathognomonisch hohe Fraktion von tumorinfiltrierenden Lymphozyten in diesen Tumoren verantwortlich. Fixationsartefakte stellen bei Hodentumoren ein überdurchschnittlich ausgeprägtes Problem für immunhistochemische Untersuchungen dar.

6. Zusammenfassung

Eine hohe Zahl tumorinfiltrierender Lymphozyten ist beim kolorektalen Karzinom und beim Endometriumkarzinom charakteristisch für das Vorliegen einer Mismatch-Reparatur-(MMR)-Defizienz. Eine MMR-Defizienz ist von hoher klinischer Bedeutung, da MMR-defiziente Tumoren besonders häufig auf eine Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren ansprechen. Ein dichtes lymphozytäres Entzündungsinfiltrat ist ein morphologisches Charakteristikum von testikulären Seminomen. Aus diesem Grund wurde in dieser Studie die Frage untersucht, ob Seminome möglicherweise besonders häufig eine MMR-Defizienz aufweisen. Um Tumoren mit MMR-Defizienz zu identifizieren, wurde zunächst ein Tissue Microarray (TMA) hergestellt, welcher je einen 0,6 mm messenden Gewebezylinder von 574 Seminomen beinhaltete. Die Proteinexpression der MMR-Gene MLH1, PMS2, MSH2 und MSH6 wurde immunhistochemisch untersucht. Von 536 auswertbaren Tumoren zeigten 481 Seminome eine eindeutige Expression aller vier MMR-Proteine. Bei 55 Seminomen wurde für mindestens eines der MMR-Proteine eine negative oder fraglich negative Immunfärbung gefunden, wobei meist auch die assoziierten Stromazellen von der Negativität betroffen waren. Großschnittuntersuchungen an sämtlichen dieser 55 Fälle mit fraglicher MMR-Defizienz zeigten jeweils ausgeprägte Unterschiede der Färbequalität innerhalb der Schnittpräparate, was auf fixationsbedingte Immunhistochemieartefakte hindeutete. Nur in einem einzigen Fall fand sich eine eindeutige MMR-Defizienz mit Verlust der Expression von MLH1 und PMS2. Bei diesem Malignom erwies sich der Expressionsverlust als homogen innerhalb des Tumorgewebes. Lediglich die assoziierte Vorläuferläsion einer Keimzellneoplasie in-situ (GCNIS) zeigte eine intakte Expression vom MLH1 und PMS2. Eine PCR-Analyse mittels des Bethesda Panels ergab eine Instabilität von einem von vier auswertbaren Mikrosatellitenloci, was einem Befund von MSI-low entsprach. Zusammengefasst ergab die vorliegende Untersuchung von 536 Seminomen einen einzigen Tumor (0,19%) mit einer MMR-Defizienz (Verlust von MLH1 und PMS2). Dies zeigt deutlich, dass eine MMR-Defizienz keinen relevanten Faktor für die charakteristische lymphozytäre Infiltration in Seminomen ausmacht.

7. Summary

Dense tumor-associated lymphocyte infiltration is linked to mismatch repair (MMR) deficiency in colorectal and endometrial cancer. MMR deficiency is of high clinical importance as MMR deficient cancers tend to react favorably to treatment with immune checkpoint inhibitors. Strong lymphocytic infiltration is a morphological hallmark of testicular seminomas. We thus asked whether seminomas may exhibit MMR deficiency at relevant frequency. To screen for tumors with MMR deficiency, a tissue microarray (TMA) was constructed containing samples from 574 seminomas. Protein expression of the MMR genes MLH1, PMS2, MSH2, and MSH6 was analyzed by immunohistochemistry (IHC). A total of 536 cases were evaluable resulting in 481 seminomas with unequivocally intact MMR protein expression and 55 cancers with one or several equivocal immunostainings lacking detectable MMR protein in both tumor and stromal cells. Large section IHC analysis of all 55 equivocal cases demonstrated substantial staining issues due to improper fixation in 54 cases and identified one tumor with clear-cut MLH1 and PMS2 protein loss. This cancer showed homogeneous loss of MLH1 and PMS2 in the seminoma minor adjacent foci of associated germ cell neoplasia in situ (GCNIS) were MMR intact. PCR analysis using the 5 microsatellite loci of the “Bethesda Panel” revealed instability of the BAT26 locus only (“MSI-low”) in this tumor. In summary, one single seminoma with MMR deficiency, characterized by protein loss of MLH1 and PMS2, was identified among 536 interpretable seminomas (0.19%). Accordingly, MMR deficiency is not a relevant determinant of lymphocyte influx in seminoma.

8. Abkürzungsverzeichnis

IHC	Immunhistochemie
TMA	Tissue Microarray
PD-1	Programmed Death 1
PD-L1	Programmed Death Ligand 1
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MMR	Mismatch-Reparatur
DNA	Desoxyribonukleinsäure
MLH1	Mut-L Homolog 1
MSH2	Mut-S Homolog 2
MSH6	Mut-S Homolog 6
PMS2	Postmeiotic Segregation Increased
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
UICC	Union for International Cancer Control
HE	Hämatoxylin-Eosin
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
FDA	Food and Drug Administration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
TIN	Testikuläre intraepitheliale Neoplasie
GCNIS	Germinal Cell Neoplasia in-situ, Keimzellneoplasie in-situ

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispiele für histologische Befunde bei Seminomen. HE-Färbung, 20x. Von a) nach d) mit zunehmender Menge infiltrierender Lymphozyten (erkennbar als kleine, dunkler erscheinende Zellen). 8

Abbildung 2: Grundstruktur eines UKE TMAs 10

Abbildung 3: Datenfile zum Seminom-TMA (Ausschnitt) 11

Abbildung 4: UKE Seminom TMA (Makroskopie) 12

Abbildung 5: UKE Seminom TMA (HE Färbung/Übersicht) 12

Abbildung 6: Immunhistochemische Färbungen der MMR-Proteine des Tumors mit der TMA-Koordinate A8q. Originalvergrößerung 10x. Ergebnis: Es zeigt sich eine erhaltene nukleäre Expression aller vier MMR-Proteine. 15

Abbildung 7: Insgesamt schwächere, aber dennoch positive immunhistochemische Färbungen aller vier MMR-Proteine des Tumors mit der TMA-Koordinate A7r. Originalvergrößerung 10x. 15

Abbildung 8: Immunhistochemische Färbungen der MMR-Proteine des Tumors mit der TMA-Koordinate A8r. Originalvergrößerung 10x. 16

Abbildung 9: Besonders starke immunhistochemische Färbungen der MMR-Proteine des Tumors mit der TMA-Koordinate A9r. Originalvergrößerung 10x. 16

Abbildung 10: Beispiel für einen Großschnitt mit inhomogener Färbung, hier von MSH6. Die runden Defekte markieren die Lage der Stanzen, die in den TMA verbaut wurden. 18

Abbildung 11: Das identifizierte Seminom mit MMR-Defizienz. Die IHC auf Großschnitten zeigt einen Expressionsverlust von MLH1 (A) und PMS2 (B) in Tumorzellen, während benachbarte Stroma- und Entzündungszellen sowie Zellen in den verbleibenden Samenkanälchen positiv sind. MSH2 (C) und MSH6 (D) sind in den Tumorzellen erhalten. Originalvergrößerungen 40x. 19

10. Literaturverzeichnis

Al-Kuraya, K., Schraml, P., Torhorst, J., Tapia, C., Zaharieva, B., Novotny, H., Spichtin, H., Maurer, R., Mirlacher, M., Kochli, O.*, et al.* (2004). Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. Cancer Res *64*, 8534-8540.

Ali, H.R., Dariush, A., Thomas, J., Provenzano, E., Dunn, J., Hiller, L., Vallier, A.L., Abraham, J., Piper, T., Bartlett, J.M.S.*, et al.* (2017). Lymphocyte density determined by computational pathology validated as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: secondary analysis of the ARTemis trial. Ann Oncol *28*, 1832-1835.

Ashktorab, H., Ahuja, S., Kannan, L., Llor, X., Ellis, N.A., Xicola, R.M., Laiyemo, A.O., Carethers, J.M., Brim, H., and Nouraie, M. (2016). A meta-analysis of MSI frequency and race in colorectal cancer. Oncotarget *7*, 34546-34557.

Baretti, M., and Le, D.T. (2018). DNA mismatch repair in cancer. Pharmacol Ther *189*, 45-62.

Bonneville, R., Krook, M.A., Kautto, E.A., Miya, J., Wing, M.R., Chen, H.Z., Reeser, J.W., Yu, L., and Roychowdhury, S. (2017). Landscape of Microsatellite Instability Across 39 Cancer Types. JCO Precis Oncol *2017*.

Bosmuller, H., Haitchi-Petnehazy, S., Webersinke, G., Marschon, R., Roithmeier, F., Stummvoll, W., Fehm, T., Klier-Richter, M., Bonzheim, I., Staebler, A.*, et al.* (2011). Intratumoral lymphocyte density in serous ovarian carcinoma is superior to ERCC1 expression for predicting response to platinum-based therapy. Virchows Arch *459*, 183-191.

Cancer Genome Atlas Research, N. (2014). Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. Nature *513*, 202-209.

Carcano, F.M., Lengert, A.H., Vidal, D.O., Scapulatempo Neto, C., Queiroz, L., Marques, H., Baltazar, F., Berardinelli, G.N., Martinelli, C.M., da Silva, E.C.*, et al.* (2016). Absence of microsatellite instability and BRAF (V600E) mutation in testicular germ cell tumors. Andrology *4*, 866-872.

Chan, T.A., Yarchoan, M., Jaffee, E., Swanton, C., Quezada, S.A., Stenzinger, A., and Peters, S. (2019). Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic. Ann Oncol *30*, 44-56.

Chung, J.Y., Song, J.S., Ylaya, K., Sears, J.D., Choi, L., Cho, H., Rosenberg, A.Z., and Hewitt, S.M. (2018). Histomorphological and Molecular Assessments of the Fixation Times Comparing Formalin and Ethanol-Based Fixatives. J Histochem Cytochem *66*, 121-135.

Cogdill, A.P., Andrews, M.C., and Wargo, J.A. (2017). Hallmarks of response to immune checkpoint blockade. Br J Cancer *117*, 1-7.

Cohen, R., Hain, E., Buhard, O., Guilloux, A., Bardier, A., Kaci, R., Bertheau, P., Renaud, F., Bibeau, F., Flejou, J.F.*, et al.* (2019). Association of Primary Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors in Metastatic Colorectal Cancer With Misdiagnosis of Microsatellite Instability or Mismatch Repair Deficiency Status. JAMA Oncol *5*, 551-555.

Fabre, E., Jira, H., Izard, V., Ferlicot, S., Hammoudi, Y., Theodore, C., Di Palma, M., Benoit, G., and Droupy, S. (2004). 'Burned-out' primary testicular cancer. BJU Int *94*, 74-78.

Fang, W.L., Chang, S.C., Lan, Y.T., Huang, K.H., Lo, S.S., Li, A.F., Chi, C.W., Wu, C.W., and Chiou, S.H. (2013). Molecular and survival differences between familial and sporadic gastric cancers. Biomed Res Int *2013*, 396272.

Fraune, C., Burandt, E., Simon, R., Hube-Magg, C., Makrypidi-Fraune, G., Kluth, M., Buscheck, F., Hoflmayer, D., Blessin, N.C., Mandelkow, T.*, et al.* (2020a). MMR Deficiency is Homogeneous in Pancreatic Carcinoma and Associated with High Density of Cd8-Positive Lymphocytes. Ann Surg Oncol *27*, 3997-4006.

Fraune, C., Rosebrock, J., Simon, R., Hube-Magg, C., Makrypidi-Fraune, G., Kluth, M., Buscheck, F., Hoflmayer, D., Schmalfeldt, B., Muller, V.*, et al.* (2020b). High homogeneity of MMR deficiency in ovarian cancer. Gynecol Oncol *156*, 669-675.

Fraune, C., Simon, R., Hoflmayer, D., Moller, K., Dum, D., Buscheck, F., Hube-Magg, C., Makrypidi-Fraune, G., Kluth, M., Hinsch, A.*, et al.* (2020c). High homogeneity of mismatch repair deficiency in advanced prostate cancer. Virchows Arch *476*, 745-752.

Fraune, C., Simon, R., Hube-Magg, C., Makrypidi-Fraune, G., Kahler, C., Kluth, M., Hoflmayer, D., Buscheck, F., Dum, D., Luebke, A.M.*, et al.* (2020d). MMR deficiency in urothelial carcinoma of the bladder presents with temporal and spatial homogeneity throughout the tumor mass. Urol Oncol *38*, 488-495.

Fraune, C., Simon, R., Hube-Magg, C., Makrypidi-Fraune, G., Kluth, M., Buscheck, F., Amin, T., Viol, F., Fehrle, W., Dum, D.*, et al.* (2020e). Homogeneous MMR Deficiency Throughout the Entire Tumor Mass Occurs in a Subset of Colorectal Neuroendocrine Carcinomas. Endocr Pathol *31*, 182-189.

Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pages, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P.*, et al.* (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. Science *313*, 1960-1964.

Goodfellow, P.J., Billingsley, C.C., Lankes, H.A., Ali, S., Cohn, D.E., Broaddus, R.J., Ramirez, N., Pritchard, C.C., Hampel, H., Chassen, A.S.*, et al.* (2015). Combined Microsatellite Instability, MLH1 Methylation Analysis, and Immunohistochemistry for Lynch Syndrome Screening in Endometrial Cancers From GOG210: An NRG Oncology and Gynecologic Oncology Group Study. J Clin Oncol *33*, 4301-4308.

Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G.L., Hunter, C., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C.*, et al.* (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. Nature *446*, 153-158.

Hause, R.J., Pritchard, C.C., Shendure, J., and Salipante, S.J. (2016). Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. Nat Med *22*, 1342-1350.

Hodgson, A., Xu, B., and Downes, M.R. (2017). p53 immunohistochemistry in high-grade urothelial carcinoma of the bladder is prognostically significant. Histopathology *71*, 296-304.

Honecker, F., Wermann, H., Mayer, F., Gillis, A.J., Stoop, H., van Gurp, R.J., Oechsle, K., Steyerberg, E., Hartmann, J.T., Dinjens, W.N.*, et al.* (2009). Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and BRAF mutation in treatment-resistant germ cell tumors. J Clin Oncol *27*, 2129-2136.

Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., and Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. EMBO J *11*, 3887-3895.

Jacobs, T.W., Gown, A.M., Yaziji, H., Barnes, M.J., and Schnitt, S.J. (1999a). Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. J Clin Oncol *17*, 1974-1982.

Jacobs, T.W., Gown, A.M., Yaziji, H., Barnes, M.J., and Schnitt, S.J. (1999b). Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system. J Clin Oncol *17*, 1983-1987.

Karpinska-Kaczmarczyk, K., Lewandowska, M., Lawniczak, M., Bialek, A., and Urasinska, E. (2016). Expression of Mismatch Repair Proteins in Early and Advanced Gastric Cancer in Poland. Med Sci Monit *22*, 2886-2892.

Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. Annu Rev Immunol *26*, 677-704.

Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A., Barlund, M., Schraml, P., Leighton, S., Torhorst, J., Mihatsch, M.J., Sauter, G., and Kallioniemi, O.P. (1998). Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. Nat Med *4*, 844-847.

Krohn, A., Diedler, T., Burkhardt, L., Mayer, P.S., De Silva, C., Meyer-Kornblum, M., Kotschau, D., Tennstedt, P., Huang, J., Gerhauser, C*., et al.* (2012). Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer. Am J Pathol *181*, 401-412.

Latham, A., Srinivasan, P., Kemel, Y., Shia, J., Bandlamudi, C., Mandelker, D., Middha, S., Hechtman, J., Zehir, A., Dubard-Gault, M*., et al.* (2019). Microsatellite Instability Is Associated With the Presence of Lynch Syndrome Pan-Cancer. J Clin Oncol *37*, 286-295.

Lawrence, M.S., Stojanov, P., Polak, P., Kryukov, G.V., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Carter, S.L., Stewart, C., Mermel, C.H., Roberts, S.A*., et al.* (2013). Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. Nature *499*, 214-218.

Le, D.T., Uram, J.N., Wang, H., Bartlett, B.R., Kemberling, H., Eyring, A.D., Skora, A.D., Luber, B.S, Azad, N.S., *et al.* (2015). PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. N Engl J Med. 372:2509-2520.

Lipson, E.J., and Drake, C.G. (2011). Ipilimumab: an anti-CTLA-4 antibody for metastatic melanoma. Clin Cancer Res *17*, 6958-6962.

Luchini, C., Bibeau, F., Ligtenberg, M. J. L., *et at.* (2019). ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. Ann Oncol. 30:1232-1243.

Luu, T.H., Llerena Cari, E., Bales, E., Lucas, E., Bitler, B., Tamburini, B., and Johnson, J. (2020). HIGHLY INCREASED VASCULAR DENSITY IN CORPORA LUTEA OF PD-L1 KNOCKOUT MICE COMPARED TO CONTROLS. Fertility and Sterility *113*.

Marcus, L., Lemery, S.J., Keegan, P., and Pazdur, R. (2019). FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Microsatellite Instability-High Solid Tumors. Clin Cancer Res *25*, 3753-3758.

Marx, A.H., Burandt, E.C., Choschzick, M., Simon, R., Yekebas, E., Kaifi, J.T., Mirlacher, M., Atanackovic, D., Bokemeyer, C., Fiedler, W*., et al.* (2010). Heterogenous high-level HER-2 amplification in a small subset of colorectal cancers. Hum Pathol *41*, 1577-1585.

Mathiak, M., Warneke, V.S., Behrens, H.M., Haag, J., Boger, C., Kruger, S., and Rocken, C. (2017). Clinicopathologic Characteristics of Microsatellite Instable Gastric Carcinomas Revisited: Urgent Need for Standardization. Appl Immunohistochem Mol Morphol *25*, 12-24.

Mayer, F., Gillis, A.J., Dinjens, W., Oosterhuis, J.W., Bokemeyer, C., and Looijenga, L.H. (2002). Microsatellite instability of germ cell tumors is associated with resistance to systemic treatment. Cancer Res *62*, 2758-2760.

Miller, R.T. (2019). Avoiding pitfalls in diagnostic immunohistochemistry-important technical aspects that every pathologist should know. Semin Diagn Pathol *36*, 312-335.

Moch, H., Schraml, P., Bubendorf, L., Mirlacher, M., Kononen, J., Gasser, T., Mihatsch, M.J., Kallioniemi, O.P., and Sauter, G. (1999). High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. Am J Pathol *154*, 981-986.

Nayak, S.S., Roy, P., Arora, N., Arun, I., Roy, M.K., Banerjee, S., Mallick, I., and Mallath, M.K. (2018). Prevalence estimation of microsatellite instability in colorectal cancers using tissue microarray based methods - A tertiary care center experience. Indian J Pathol Microbiol *61*, 520-525.

Necchi, A., Bratslavsky, G., Corona, R.J., Chung, J.H., Millis, S.Z., Elvin, J.A., Vergilio, J.A., Suh, J., Ramkissoon, S., Severson, E.*, et al.* (2018). Genomic Characterization of Testicular Germ Cell Tumors Relapsing After Chemotherapy. Eur Urol Focus.

Nocito, A., Bubendorf, L., Tinner, E.M., Suess, K., Wagner, U., Forster, T., Kononen, J., Fijan, A., Bruderer, J., Schmid, U.*, et al.* (2001). Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. J Pathol *194*, 349-357.

Olasz, J., Mandoky, L., Geczi, L., Bodrogi, I., Csuka, O., and Bak, M. (2005). Influence of hMLH1 methylation, mismatch repair deficiency and microsatellite instability on chemoresistance of testicular germ-cell tumors. Anticancer Res *25*, 4319-4324.

Patel, S.P., and Kurzrock, R. (2015). PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. Mol Cancer Ther *14*, 847-856.

Pierorazio, P.M., Cheaib, J.G., Patel, H.D., Gupta, M., Sharma, R., Zhang, A., Tema, G., and Bass, E.B. (2020). Comparative Effectiveness of Surveillance, Primary Chemotherapy, Radiotherapy, and Retroperitoneal Lymph Node Dissection for the Management of Early-Stage Testicular Germ Cell Tumors: A Systematic Review. J Urol, 101097JU0000000000001364.

Rudolph, C., Melau, C., Nielsen, J.E., Vile Jensen, K., Liu, D., Pena-Diaz, J., Rajpert-De Meyts, E., Rasmussen, L.J., and Jorgensen, A. (2017). Involvement of the DNA mismatch repair system in cisplatin sensitivity of testicular germ cell tumours. Cell Oncol (Dordr) *40*, 341-355.

Ruiz, C., Seibt, S., Al Kuraya, K., Siraj, A.K., Mirlacher, M., Schraml, P., Maurer, R., Spichtin, H., Torhorst, J., Popovska, S.*, et al.* (2006). Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. Int J Cancer *118*, 2190-2194.

Sadigh, S., Farahani, S.J., Shah, A., Vaughn, D., and Lal, P. (2020). Differences in PD-L1-Expressing Macrophages and Immune Microenvironment in Testicular Germ Cell Tumors. Am J Clin Pathol *153*, 387-395.

Sauter, G. (2010). Representativity of TMA studies. Methods Mol Biol *664*, 27-35.

Schlomm, T., Iwers, L., Kirstein, P., Jessen, B., Kollermann, J., Minner, S., Passow-Drolet, A., Mirlacher, M., Milde-Langosch, K., Graefen, M.*, et al.* (2008). Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers. Mod Pathol *21*, 1371-1378.

Schuster-Bockler, B., and Lehner, B. (2012). Chromatin organization is a major influence on regional mutation rates in human cancer cells. Nature *488*, 504-507.

Sharpe, A.H., Wherry, E.J., Ahmed, R., and Freeman, G.J. (2007). The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. Nat Immunol *8*, 239-245.

Shen, H., Shih, J., Hollern, D.P., Wang, L., Bowlby, R., Tickoo, S.K., Thorsson, V., Mungall, A.J., Newton, Y., Hegde, A.M.*, et al.* (2018). Integrated Molecular Characterization of Testicular Germ Cell Tumors. Cell Rep *23*, 3392-3406.

Shurell, E., Singh, A.S., Crompton, J.G., Jensen, S., Li, Y., Dry, S., Nelson, S., Chmielowski, B., Bernthal, N., Federman, N.*, et al.* (2016). Characterizing the immune microenvironment of malignant peripheral nerve sheath tumor by PD-L1 expression and presence of CD8+ tumor infiltrating lymphocytes. Oncotarget *7*, 64300-64308.

Skuciova, V., Drahosova, S., Vybohova, D., Cigerova, V., and Adamkov, M. (2020). The relationships between PD-L1 expression, CD8+ TILs and clinico-histomorphological parameters in malignant melanomas. Pathol Res Pract *216*, 153071.

Sommerer, F., Hengge, U.R., Markwarth, A., Vomschloss, S., Stolzenburg, J.U., Wittekind, C., and Tannapfel, A. (2005). Mutations of BRAF and RAS are rare events in germ cell tumours. Int J Cancer *113*, 329-335.

Supek, F., and Lehner, B. (2015). Differential DNA mismatch repair underlies mutation rate variation across the human genome. Nature *521*, 81-84.

Topalian, S.L., Taube, J.M., Anders, R.A., and Pardoll, D.M. (2016). Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. Nat Rev Cancer *16*, 275-287.

Torhorst, J., Bucher, C., Kononen, J., Haas, P., Zuber, M., Kochli, O.R., Mross, F., Dieterich, H., Moch, H., Mihatsch, M.*, et al.* (2001). Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. Am J Pathol *159*, 2249-2256.

Umar, A., Boland, C.R., Terdiman, J.P., Syngal, S., de la Chapelle, A., Ruschoff, J., Fishel, R., Lindor, N.M., Burgart, L.J., Hamelin, R.*, et al.* (2004). Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. J Natl Cancer Inst *96*, 261-268.

Vaddepally, R.K., Kharel, P., Pandey, R., Garje, R., and Chandra, A.B. (2020). Review of Indications of FDA-Approved Immune Checkpoint Inhibitors per NCCN Guidelines with the Level of Evidence. Cancers (Basel) *12*.

Velasco, A., Corvalan, A., Wistuba, II, Riquelme, E., Chuaqui, R., Majerson, A., and Leach, F.S. (2008). Mismatch repair expression in testicular cancer predicts recurrence and survival. Int J Cancer *122*, 1774-1777.

Velasco, A., Riquelme, E., Schultz, M., Wistuba, II, Villarroel, L., Koh, M.S., and Leach, F.S. (2004). Microsatellite instability and loss of heterozygosity have distinct prognostic value for testicular germ cell tumor recurrence. Cancer Biol Ther *3*, 1152-1158; discussion 1159-1161.

Wittekind, C. (2017). TNM Klassifikation maligner Tumoren, 8. Auflage edn (Wiley-VCH).

Wolchok, J.D., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Rutkowski, P., Grob, J.J., Cowey, C.L., Lao, C.D., Wagstaff, J., Schadendorf, D., Ferrucci, P.F.*, et al.* (2017). Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. N Engl J Med *377*, 1345-1356.

Zhang, Q., Wang, L., Ni, S., Tan, C., Cai, X., Huang, D., and Sheng, W. (2018). Clinicopathological features and prognostic value of mismatch repair protein deficiency in gastric cancer. Int J Clin Exp Pathol *11*, 2579-2587.

11. Danksagung

Danksagung wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

12. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

13. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzen Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zu Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: ……

Hamburg, im November 2020