

Detekcia mikrosatelitnej instability v nádoroch asociovaných s Lynchovým syndrómom

Jakub Styk^{1,2}, Vanda Repiská¹, Tomáš Szemes^{2,3,4}

¹Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UNB, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

²Vedecký park Univerzity Komenského, Bratislava

³Geneton, s. r. o., Bratislava

⁴Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave

Mikrosatelitná instabilita (MSI) predstavuje stav genomickej alterácie vyskytujúcej sa v oblasti mikrosatelitov, tvorených zvyčajne 1 – 6 nukleotidovými opakovaniami. Je všeobecne známe, že determinácia stupňa MSI je kritickým parametrom pre celoživotný skrining pacientov s Lynchovým syndrómom. Aktuálne dostupné diagnostické prístupy v klinickej praxi, ktoré slúžia na detekciu MSI, však vykazujú isté limitácie. Moderné technológie sekvenovania novej generácie majú v kombinácii s analýzou tekutej biopsie veľký potenciál tieto obmedzenia prekonať. Viaceré štúdie preukazujú, že technológia masívne paralelného sekvenovania môže poskytnúť presnejší, cenovo efektívnejší a dostupnejší prístup detekcie a skriningu MSI v nádoroch asociovaných s Lynchovým syndrómom.

Kľúčové slová: Lynchov syndróm, mikrosatelitná instabilita, masívne paralelné sekvenovanie

Detection of microsatellite instability in Lynch syndrome-associated tumours

Microsatellite instability (MSI) is a state of genomic alteration occurring in the region of microsatellites, usually formed by 1 - 6 nucleotide repeats, which accumulate indels of several base pair sizes. It is well known that the determination of the degree of MSI is a critical parameter for lifelong screening of patients with Lynch syndrome. Currently available diagnostic approaches in clinical practice, which are used to detect MSI, have certain limitations. Modern next-generation sequencing technologies, combined with liquid biopsy analysis, have great potential to overcome these limitations. Several studies have shown that massively parallel sequencing technology, coupled with appropriate bioinformatics tools, can provide a more accurate, cost-effective, and affordable approach to detecting and screening MSI in Lynch syndrome-associated tumours.

Keywords: Lynch syndrome, microsatellite instability, massively parallel sequencing

NewsLab, 2021; roč. 12 (1): 27 – 31

Lynchov syndróm je autozomálne dominantné dedičné ochorenie charakterizované defektmi v systéme opravy chybné spárovaných báz – MMR systéme (*mismatch repair system*). Ide o postreplikatívny opravný systém zaisťujúci integritu genómu prostredníctvom reparácie chybné inkorporovaných nukleotidov, tvorený predovšetkým štyrmi hlavnými génmi *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* a *PMS2*. Je známe, že pacienti s diagnostikovaným Lynchovým syndrómom sú vystavení zvýšenému riziku rozvoja viacnásobných synchronných alebo metachrónnych kolonických a/alebo extrakolonických malignít so včasným nástupom fenotypu. U pacientov s Lynchovým syndrómom sa tieto typy malignít objavujú pomerne skoro, a to priemerne okolo 40. až 50. roku života (**tabuľka 1**). Medzi najčastejšie typy nádorov asociovaných s Lynchovým syndrómom patrí kolorektálny karcinóm, a to pri oboch pohlaviach, a karcinóm endometria u žien, ale aj rakovina žalúdka, ovárií, tenkého čreva, hepatobiliárneho a urinárneho traktu, mozgu a CNS a tiež široké spektrum ďalších onkologických ochorení⁽¹⁾.

Mikrosatelity a ich instabilita u pacientov s Lynchovým syndrómom

Mikrosatelity alebo aj krátke tandemové repetície (STR; *short tandem repeats*) sú vo všeobecnosti definované ako sekvenčné opakovania až do dĺžky 100 bázových párov⁽²⁾. Sú tvorené opakujúcimi sa sekvenciami pozostávajúcimi z motívov veľkosti 1 – 6 nukleotidov, pričom pokrývajú zhruba 2,5 % ľudského genómu s počtom ~ 2,5 milióna lokusov⁽³⁾. Sú označované za genetické *hotspots* s mierou mutability 10- až 100 000× vyššou v porovnaní so zvyškom genómu⁽⁴⁾. Udávaná frekvencia mutácií na generáciu je oproti jednonukleotidovým polymorfizmom rádovo vyššia⁽⁵⁾. Predpokladá sa, že variácie dĺžky STR oblastí sú podmienené prekĺznutiu DNA v procese replikácie, čo v konečnom dôsledku vedie k indeľom veľkosti jedného alebo viacerých mikrosatelitných motívov. Vzniknuté indeľy sú v oblastiach mikrosatelitných lokusov opravované najmä funkčným MMR systémom⁽⁶⁾. Keďže mikrosatelity predstavujú veľmi nestabilné časti genómu, prítomnosť patologických zárodočných mutácií v *MMR* génoch a následná dysfunkcia MMR opravného systému u pacientov s Lynchovým syndrómom môžu vyústiť do mikrosatelitnej

Tabuľka 1. Riziko vzniku rakoviny v bežnej populácii a u pacientov s mutáciami v génoch *MLH1* a *MSH2*, spolu s priemerným nástupom veku ochorenia.

Typ nádoru	Riziko v bežnej populácii	Lynchov syndróm (heterozygot <i>MLH1</i> , <i>MSH2</i>)	
		Riziko	Priemerný vek nástupu
Kolorektálny karcinóm	4 – 5 %	52 – 82 %	41 – 46 rokov
Endometrium	2,7 %	25 – 60 %	48 – 62 rokov
Prostata	11,6 %	~ 30 %	NA
Žalúdok	< 1 %	6 – 13 %	58 rokov
Ováriá	1,3 %	<i>MLH1</i> – 11 – 20 % <i>MSH2</i> – 15 – 24 %	43 rokov
Hepatobiliárny trakt	< 1 %	1,4 – 4 %	NA
Urínárny trakt	4 %	~ 7 %	~ 55 rokov
Tenké črevo	0,3 %	3 – 6 %	49 rokov
Mozog/CNS	0,6 %	1 – 3 %	~ 50 rokov
Pankreas	1 %	< 5 %	NA

*NA – not available/dáta nie sú k dispozícii

instability (MSI, *microsatellite instability*) (obrázok 1), pričom jej detekcia predstavuje v klinickej praxi dôležitý prognostický a diagnostický marker.

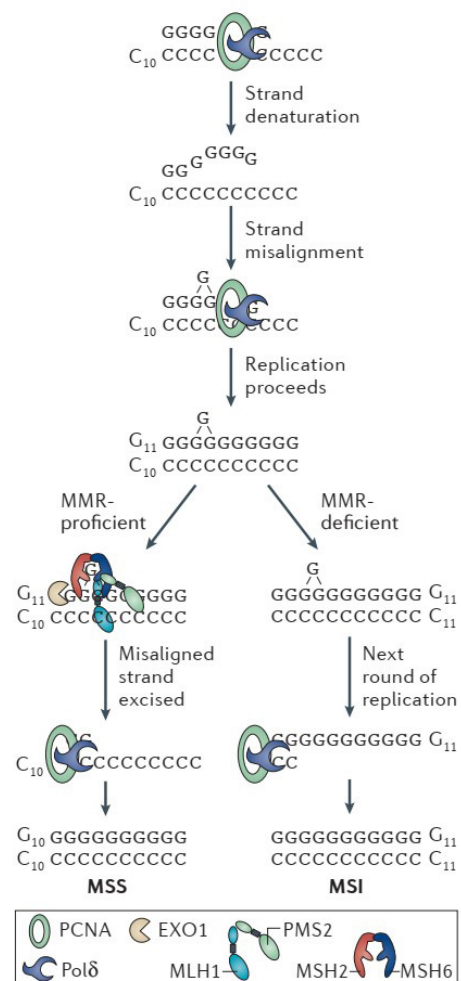
Aktuálne skrínigové prístupy detekcie MSI v klinickej praxi

Detekcia MSI a skrínig pacientov s Lynchovým syndrómom sú založené na dvoch základných prístupoch. Prvý, vychádzajúci z imunohistochemie (IHC; *immunohistochemistry*) proteínov zahrnutých v MMR systéme, a druhý, využívajúci PCR amplifikáciu vybraného počtu mikrosatelitových markerov (MSI-PCR) (tabuľka 2). Detekcia MSI predstavuje skrínigový test, ktorý umožňuje z pomerne rozsiahlej vzorky nádorov vybrať tie, ktoré môžu byť asociované s Lynchovým syndrómom. Uvádza sa, že MSI vykazuje ~ 90 % Lynchových asociovaných nádorov v porovnaní s ~ 15 % sporadických kolorektálnych karcinómov, spôsobených najmä hypermetyláciou promotora génu *MLH1*⁽⁷⁾. Vhodným markerom na selekciu sporadických nádorov je vyšetrenie na prítomnosť daných metylácií *MLH1* alebo analýza mutácie p. V600E v géne *BRAF*⁽⁸⁾.

Metóda MSI-PCR kombinuje fluorescenčnú multiplex PCR a kapilárovú elektroforézu, čím umožňuje detegovať status MSI porovnaním fragmentačného profilu amplifikovaných markerov medzi zdravým a nádorovým tkanivom získaným od toho istého pacienta. V priebehu dekád boli predstavené viaceré panely, súčasné testy široko využívané v klinickej diagnostike sa však spoliehajú predovšetkým na lokusy tvorené mononukleotidovými opakovaniami – homopolymérmí. V súčasnosti najpoužívanejšou esejou založenou na tomto princípe je metóda fragmentačnej analýzy MSI Analysis System verzia 1.2 (Promega), ktorá využíva panel 5 kvázi-monomorfných homopolymérnych markerov BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 a MONO-27⁽⁹⁾.

Na druhej strane IHC sa odporúča ako prvotné skrínigové vyšetrenie pri liečbe pacientov, u ktorých existuje podozrenie na prítomnosť mutácií v *MMR* génoch, s cieľom identifikovať pacientov, ktorí sú vhodní na ďalšie molekulárnogenetické analýzy. IHC predstavuje rýchlu a relatívne jednoduchú esej, ktorá deteguje expresiu MMR proteínov *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* a *MSH6* v tkanive odobratého z reprezentatívnej časti biopsie⁽¹⁰⁾. Výraznejšou limitáciou IHC je nevyhnutná prítomnosť vysokokvalifikovaného personálu, a to pri odbere biopsie

Obrázok 1. Molekulárny mechanizmus MSI. Počas replikácie STR oblasti (*C10*) môže dôjsť k reanelácii DNA reťazca mimo pôvodného miesta s následnou inzerciou alebo deléciou jedného alebo viacerých nukleotidov (G11). Heterodimér *MSH2-MSH6*, ktorý rozpoznáva chybné spárované bázy, spolu s heterodimérom *MLH1-PMS2* podporuje excíziu tejto časti chybného vlákna, a to aj za pomoci exonukleázy *EXO1*. Pri absencii aktivity MMR systému zostáva tento úsek neopravený. V priebehu nasledujúcej replikácie DNA sa vlákno obsahujúce G11 stáva templátom, pričom jeho úspešná replikácia vedie k trvalej fixácii nukleotidu a ku generovaniu novej alely *C11*. Komplex *PCNA* a DNA polymeráza δ zabezpečujú syntézu nového vlákna. MSI – mikrosatelitná instabilita; MSS – mikrosatelitná stabilita.



Tabuľka 2. Porovnanie IHC a MSI-PCR.

Metóda	Výhody	Limitácie
IHC	<ul style="list-style-type: none"> výsledok v rámci 4 – 6 h identifikácia MMR génov pre sekvenčné analýzy ľahko aplikovateľná metóda realizovateľná na vzorkách s < 20 % neoplastických buniek cenová efektivita 	<ul style="list-style-type: none"> separátna analýza 4 MMR proteínov (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6) potreba špecialistu na interpretáciu výsledkov falošná pozitivita: artificioálne straty expresie ako príčina preanalytických faktorov alebo v dôsledku technických limitácií zriedkavá falošná negativita: žiadna zjavná strata expresie v dôsledku missense mutácií v MMR génoch s intaktnou imunoreaktivitou v ~ 10 % prípadov prítomnosť špecialistu
MSI-PCR	<ul style="list-style-type: none"> výsledok v rámci < 5 h multiplex PCR ľahká reprodukovateľnosť experimentov cenová efektivita 	<ul style="list-style-type: none"> žiadna indikácia o MMR génoch vzorky najmenej s 20 % neoplastických buniek zriedkavá falošná pozitivita: mikrosatelitné polymorfizmy informatívna iba pre limitovaný typ nádorov

aj pri vyhodnocovaní analýz. Bolo pozorované, že medzi výsledkami MSI a IHC analýzami existuje nesúlad, pričom uvádzaná citlivosť IHC pri predpovedaní MSI je ~ 92 %^(11,12). Negatívami IHC sú takisto falošne pozitívne výsledky, ktoré vznikajú pri takých mutáciách v MMR génoch, ktoré vo výsledku neovplyvňujú transláciu, stabilitu a antigenicitu proteínu, čím dochádza k jeho intaktnému zafarbeniu⁽¹²⁾. Porovnanie technických a metodologických aspektov MSI-PCR a IHC aj ich limitácie sumarizuje **tabuľka 2**.

MSI ako indikátor prognózy odpovede na imunoterapiu

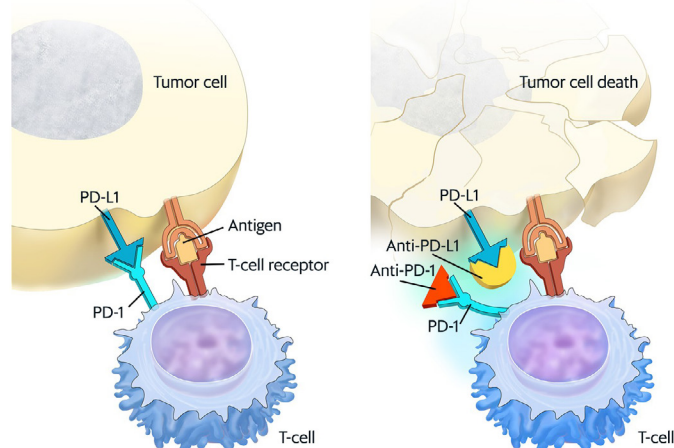
Okrem iného detekcia MSI pomáha pri selekcii pacientov na zaradenie na imunoterapiu. Preukázalo sa, že pri metastatickom kolorektálnom karcinóme je ~ 10 % pacientov nesprávne zaradených do imunoterapeutických štúdií v dôsledku falošne pozitívnych výsledkov IHC alebo MSI-PCR⁽¹³⁾. Na posúdenie adekvátnosti liečby pomocou inhibítorov imunitného kontrolného bodu (ICI; *immune checkpoint inhibitors*) sa odporúča kombinácia prístupu IHC a MSI-PCR pri metastatickom CRC aj pri iných druhoch nádorov spadajúcich do spektra Lynchovho syndrómu⁽¹⁴⁾. Preukázalo sa, že nádory s vysokým stupňom MSI majú vo všeobecnosti vysokú pravdepodobnosť reakcie na inhibíciu PD-1/PD-L1 dráhy (*programmed cell death 1/programmed cell death ligand 1*), ktorá je považovaná za jeden z kontrolných bodov imunitnej odpovede. Proteín PD-1, vysokoexprimovaný aktivovanými T-bunkami, B-bunkami, dendritickými bunkami a NK bunkami, ktorý po väzbe na PD-L1 receptor, nachádzajúci sa vo veľkom množstve na niektorých rakovinových bunkách, pomáha takýmto bunkám uniknúť pred imunitným systémom hostiteľa. Monoklonálne protilátky, akými sú inhibítory anti-PD-1 alebo anti-PD-L1 môžu takúto väzbu blokovať a zvyšovať tak imunitnú odpoveď proti bunkám nádoru (**obrázok 2**). Na základe predklinických štúdií je tento typ liečby účinný v kombinácii s rádioterapiou, chemoterapiou, inhibítormi kináz a epigenetickými liečivami⁽¹⁵⁾.

Využitie masívne paralelného sekvenovania v MSI diagnostike

Aktuálne sa dostáva do popredia názor, že použitie panelového sekvenovania ako prvotného skríningu MSI predstavuje v klinickej praxi cenovo efektívny spôsob diagnostiky Lynchovho syndrómu a iných nádorových a polypóznych syn-

drómov⁽¹⁶⁾, pričom sekvenovanie nádoru ako prvotný krok pri skríningu Lynchovho syndrómu môže nahradiť súčasne používané prístupy⁽¹⁷⁾. Veľkou výhodou NGS metód oproti MSI-PCR je predovšetkým súbor analyzovaných markerov, ktorý varíruje až po niekoľko tisíc. Okrem vyššej citlivosti je to v niektorých prípadoch absencia párovej vzorky kontrolného nenádorového tkaniva, ktorá je pre prístupy MSI-PCR nevyhnutná. Dôkazy o adekvátnosti masívne paralelného sekvenovania pri detekcii MSI poskytlo sekvenovanie štandardne používaného génového panela Bethesda/NCI. Získané výsledky korelovali s metódou MSI-PCR analýzy, čo demonštruje, že prístupy založené na vysokoparalelnom sekvenovaní predstavujú vhodnú skrínigovú a diagnostickú metódou na testovanie MSI⁽¹⁸⁾. Detekcia MSI vychádzajúca z rozličných sekvenačných platforiem dosahuje vysokú špecifickosť a senzitivitu, čo demonštruje, že tento prístup môže v blízkom čase plnohodnotne nahradiť konvenčne používané skrínigové metódy⁽¹⁹⁾. Vybrané štúdie zaoberajúce sa detekciou MSI v nádoroch kolorekta pomocou masívne paralelného

Obrázok 2. Mechanizmus účinku anti-PD-1 a anti-PD-L1 liečiv. Keď sa PD-L1 (ligand programovanej bunkovej smrti 1) na nádorovej bunke naviaže na receptor PD-1 (receptor programovanej bunkovej smrti 1) na T-bunke, sú apoptické mechanizmy T-buniek inhibované a bránia imunitnému systému pri napadnutí nádorovej bunky. Blokovanie PD-L1 alebo PD-1 umožňuje T-bunkám po naviazaní antigénu napadnúť nádorové bunky.



Tabuľka 3. Štúdie zaoberajúce sa detekciou MSI pomocou masívne paralelného sekvenovania.

Štúdia	Platforma	Typ nádoru	Vstup
Lee et al. (2021) ²⁶	Illumina NextSeq 500	Kolorektálny karcinóm	Tkanivo
Kim et al. (2019) ²⁷	Illumina MiSeq	Kolorektálny karcinóm	Tkanivo
Nowak et al. (2017) ²⁸	Illumina HiSeq 2500	Kolorektálny karcinóm	Tkanivo
Hempelmann et al. (2015) ²⁹	Illumina MiSeq	Kolorektálny karcinóm	Tkanivo

sekvenovania zobrazuje **tabuľka 3**. Napriek širokému spektru nástrojov na vyhodnocovanie MSI zo sekvenčných dát vykazujúcich v porovnaní s MSI-PCR konkordanciu, ktorá varíruje od 92,3 % do 100 %⁽¹⁹⁻²¹⁾, neboli doposiaľ predstavené konsenzuálne kritériá na vyhodnocovanie MSI, čo do istej miery limituje ich zavedenie do rutínnej klinickej praxe.

Potenciál cirkulujúcej nádorovej DNA v MSI diagnostike

Potenciál cirkulujúcej nádorovej DNA (ctDNA, *circulating tumour DNA*) je pripisovaný vlastnostiam, ako je schopnosť sledovať progresiu nádorového ochorenia, možnosť predpovedať recidívu nádoru a v neposlednom rade schopnosť odrážať stav nádorovej heterogenity⁽²²⁾. Zároveň medzi MSI fenotypom v ctDNA a nádorovom tkanive existuje vysoká miera korelácie. Keďže len malá časť z fragmentov ctDNA v cirkulácii pochádza z nádorových buniek, detekcia MSI založená na báze tekutej biopsie si vyžaduje veľmi citlivý prístup. Presnosť a citlivosť menej invazívnych metód založených na analýze voľných cirkulujúcich nukleových kyselín je ovplyvnená faktormi, medzi ktoré patria napríklad technické a bioinformatické výzvy pre efektívne sekvenovanie, mapovanie, volanie variantov a korekciu chýb v oblasti vysokorepetitívnych mikrosatelitných lokusov, nízka frakcia ctDNA v cirkulácii, respektíve chyby vznikajúce pri replikácii genómu⁽²³⁾.

Prístupy na hodnotenie stavu MSI prostredníctvom analýzy ctDNA dosahujú konkordanciu na úrovni ~ 99 % pre status MSI medzi vzorkami tkaniva a ctDNA^(12,24). Kritickým parametrom esejí vychádzajúcich z analýzy voľných cirkulujúcich nukleových kyselín je frakcia nádorových buniek, pretože účinnosť detekcie MSI vo vzorkách s vysokou kontamináciou zdravých buniek významne klesá⁽²⁴⁾. V neposlednom rade je to heterogenita a dynamika nádoru, pri ktorej inter- a intratumorová variabilita sú kľúčovým faktorom prispievajúcim k nesúladu medzi pacientmi/kohortami. Ná-

dorové bunky prechádzajú v odpovedi na stres spôsobený prostredím a terapiou klonálnou evolúciou, ktorá môže meniť ich genetickú informáciu. Napriek tomu sa predpokladá, že tekutá biopsia má v porovnaní s tkanivom potenciál niekoľkonásobne lepšieho záchytu tumorovej heterogenity⁽²³⁾. Najnovšie validácie preukazujú 100 % senzitivitu a špecifitu, a to aj v prípade 0,05 % obsahu ctDNA⁽²⁵⁾. Napriek evidencii, že prístupy založené na analýze ctDNA poskytujú pri detekcii MSI pomocou vysokoparalelného sekvenovania mikrosatelitných lokusov dostatočnú citlivosť, sú pre ich zavedenie do klinickej praxe potrebné ďalšie funkčné validácie.

Záver

Široká dostupnosť detekcie MSI pomocou vysokoparalelného sekvenovania v klinickej praxi môže v konečnom dôsledku eliminovať spektrum komplikácií, ktoré sú spojené s aktuálne zaužívanými prístupmi. Zároveň, neustále inovácie vo výpočtových algoritmoch umožňujú rozsiahly skrining v desiatkach až stovkách vzoriek súčasne, so senzitivitou na úrovni konvenčne používaných skriningových nástrojov. Analýza telových tekutín okrem iného vedie ku kvalitnejšiemu manažmentu pacientovho ochorenia, a to pri monitorovaní odpovede tumoru na protinádorovú terapiu aj pri sledovaní jeho prípadnej recidívy.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt kód ITMS: 313011V578, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-18-0319 a projektom VEGA 1/0305/19

Konflikt záujmov

Autori vyhlasujú, že nemajú žiadny konflikt záujmov.

LITERATÚRA

1. Tamura K, Kaneda M, Futagawa M, et al. Genetic and genomic basis of the mismatch repair system involved in Lynch syndrome. *Int J Clin Oncol.* 2019;24(9):999-1011.
2. Nadir E, Margalit H, Gallily T, Ben-Sasson SA. Microsatellite spreading in the human genome: evolutionary mechanisms and structural implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1996;93(13):6470-6475.
3. Avvaru AK, Sharma D, Verma A, et al. MSDB: a comprehensive, annotated database of microsatellites. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(D1):D155-D159
4. Balzano E, Pelliccia F, Giunta S. Genome (in)stability at tandem repeats. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* Published online 2020.
5. Sun JX, Helgason A, Masson G, et al. A direct characterization of human mutation based on microsatellites. *Nat Genet.* 2012;44(10):1161-1165.
6. Murat P, Guilbaud G, Sale JE. DNA polymerase stalling at structured DNA constrains the expansion of short tandem repeats. *Genome Biol.* 2020;21(1):209.

7. Copija A, Waniczek D, Witkoš A, et al. Clinical Significance and Prognostic Relevance of Microsatellite Instability in Sporadic Colorectal Cancer Patients. *Int J Mol Sci.* 2017;18(1).
8. Hegde M, Ferber M, Mao R, et al. ACMG technical standards and guidelines for genetic testing for inherited colorectal cancer (Lynch syndrome, familial adenomatous polyposis, and MYH-associated polyposis). *Genet Med.* 2014;16(1):101-116.
9. Arulananda S, Thapa B, Walkiewicz M, et al. Mismatch Repair Protein Defects and Microsatellite Instability in Malignant Pleural Mesothelioma. *J Thorac Oncol.* 2018;13(10):1588-1594.
10. McCarthy AJ, Capo-Chichi J, Spence T, et al. Heterogenous loss of mismatch repair (MMR) protein expression: a challenge for immunohistochemical interpretation and microsatellite instability (MSI) evaluation. *The Journal of Pathology: Clinical Research.* 2019;5(2):115-129.
11. Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn.* 2008;10(4):293-300.

12. Zhang L. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part II. The utility of microsatellite instability testing. *J Mol Diagn*. 2008;10(4):301-307.
13. Cohen R, Hain E, Buhard O, et al. Association of Primary Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors in Metastatic Colorectal Cancer With Misdiagnosis of Microsatellite Instability or Mismatch Repair Deficiency Status. *JAMA Oncol*. 2019;5(4):551-555.
14. Luchini C, Bibeau F, Ligtenberg MJL, et al. 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. *Annals of Oncology*. 2019;30(8):1232-1243.
15. Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, et al. Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer Cell*. 2015;28(6):690-714.
16. Gallego CJ, Shirts BH, Bennette CS, et al. Next-generation sequencing panels for the diagnosis of colorectal cancer and polyposis syndromes: a cost-effectiveness analysis. *J Clin Oncol*. 2015;33(18):2084.
17. Hampel H, Pearlman R, Beightol M, et al. Assessment of Tumor Sequencing as a Replacement for Lynch Syndrome Screening and Current Molecular Tests for Patients With Colorectal Cancer. *JAMA Oncol*. 2018;4(6):806-813.
18. Gan C, Love C, Beshay V, et al. Applicability of next generation sequencing technology in microsatellite instability testing. *Genes*. 2015;6(1):46-59
19. Zhu L, Huang Y, Fang X, et al. A Novel and Reliable Method to Detect Microsatellite Instability in Colorectal Cancer by Next-Generation Sequencing. *J Mol Diagn*. 2018;20(2):225-231.
20. Niu B, Ye K, Zhang Q, et al. MSIsensor: microsatellite instability detection using paired tumor-normal sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(7):1015-1016.
21. Kautto EA, Bonneville R, Miya J, et al. Performance evaluation for rapid detection of pan-cancer microsatellite instability with MANTIS. *Oncotarget*. 2017;8(5):7452-7463.
22. Myint NNM, Verma AM, Fernandez-Garcia D, et al. Circulating tumor DNA in patients with colorectal adenomas: assessment of detectability and genetic heterogeneity. *Cell Death & Disease*. 2018;9(9).
23. Wang L, Ajani JA. Ushering in Liquid Biopsy for the Microsatellite Status: Advantages and Caveats. *Clinical Cancer Research*. 2019;25(23):6887-6889.
24. Willis J, Lefterova MI, Artyomenko A, et al. Validation of Microsatellite Instability Detection Using a Comprehensive Plasma-Based Genotyping Panel. *Clinical Cancer Research*. 2019;25(23):7035-7045.
25. Han X, Zhang S, Zhou DC, et al. MSIsensor-ct: microsatellite instability detection using cfDNA sequencing data. *Brief Bioinform*. Published online 18 January 2021.
26. Lee Y, Lee JA, Park HE, et al. Targeted next-generation sequencing-based detection of microsatellite instability in colorectal carcinomas. *PLoS One*. 2021;16(2):e0246356.
27. Kim JE, Chun S-M, Hong YS, et al. Mutation Burden and I Index for Detection of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer by Targeted Next-Generation Sequencing. *J Mol Diagn*. 2019;21(2):241-250.
28. Nowak JA, Yurgelun MB, Bruce JL, et al. Detection of Mismatch Repair Deficiency and Microsatellite Instability in Colorectal Adenocarcinoma by Targeted Next-Generation Sequencing. *J Mol Diagn*. 2017;19(1):84-91.
29. Hempelmann JA, Scroggins SM, Pritchard CC, Salipante SJ. MSIplus for Integrated Colorectal Cancer Molecular Testing by Next-Generation Sequencing. *J Mol Diagn*. 2015;17(6):705-714.

Mgr. Jakub Styk

Vedecký park Univerzity Komenského
Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava
e-mail: styk6@uniba.sk