mRNA-Quantifizierung

Die nächste Herausforderung in der Routinediagnostik

Therapie und prädiktive Diagnostik – Theranostik

Mit der Aufschlüsselung der Grundlagen der molekularen Signalwegtransduktion entstand ein ursächliches Verständnis der Molekularpathologie von Tumoren. Es zeigte sich, dass Tumorzellen praktisch aller Tumoren einige grundlegenden Eigenschaften („hallmarks of cancer“) für Ihre Transformation erlangen müssen [3]. Diese Eigenschaften werden meist durch Mutationen in (Proto-) Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen induziert. Dabei zeigen Tumoren verschiedener, aber auch schon innerhalb einer einzigen Entität ein breites Spektrum an Mutationen, die sich jedoch im Regelfall 12 Signalwegen zuordnen lassen [5].

Abkürzungen	
<i>Cpt 11</i>	Camptothecin
<i>DPD</i>	Dihydropyrimidin-Dehydrogenase
<i>dTMP</i>	2'-Deoxy-Thymidin-5'-mono-Phosphat
<i>dUMP</i>	2'-Deoxy-Uracil-5'-mono-Phosphat
<i>EGFR</i>	„Epidermal growth factor receptor“
<i>FdUMP</i>	5-Fluoro-2'-Deoxy-Uracil-5'-mono-Phosphat
<i>FISH</i>	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
<i>Her/neu</i>	Humaner EGFR/„neuro/glioblastoma derived oncogene homolog“
<i>NSCLC</i>	„Non small cell lung cancer“
<i>TP</i>	Thymidylat-Phosphorylase
<i>TS</i>	Thymidylat-Synthase
<i>VEGF</i>	„Vascular endothelial growth factor“
<i>XPF</i>	„Xeroderma pigmentosum group F“
<i>UGT</i>	UDP-Glucuronosyl-Transferase

Auf der Basis dieser Kenntnisse wurden Therapeutika entwickelt, die bestimmte Zielstrukturen („targets“) angreifen, die für das Überleben der Tumorzellen essenziell sind. Diese Form der Therapie wird als zielgerichtete Therapie („targeted therapy“) bezeichnet und hat den Vorteil, dass sie weniger Nebenwirkungen für das normale Gewebe hat. Weiterhin konnten Indikatoren identifiziert werden, die eine Vorhersage (Prädiktion) des Ansprechens der Therapie ermöglichen. Diese werden als Biomarker bezeichnet [20]. Der Einsatz von Biomarkern ermöglicht die personalisierte oder individualisierte Therapie („personalized therapy“), in der individuell für einen Patienten diejenige Therapie gefunden wird, auf die sein Tumor besonders gut oder überhaupt anspricht. Da die Analyse der Biomarker über die Therapie entscheidet, ist sie daher konsequenterweise Bestandteil der Zulassungen der Therapeutika geworden. Die Bestimmung des kritischen Zustands der Biomarker erfolgt mithilfe der Immunhistochemie, FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung), DNA-Sequenzierung oder Modifikation von DNA durch Methylierung (■ **Tab. 1**) und wird in aller Regel in Einrichtungen für Pathologie durchgeführt. Dadurch hat sich das Aufkommen der molekularpathologischen Diagnostik rasant entwickelt, die in der Folge zu einem festen Bestandteil der pathologischen Diagnosefindung geworden ist.

Immer noch umstritten ist die Rolle der hochgradigen Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) als prädiktiver Biomarker in der Applikation bei 5-FU-Monothera-

pien, obwohl bereits in prospektiven Studien ein klarer Zusammenhang zwischen Nichtansprechen auf 5-FU-Monotherapie bei Vorliegen von MSI-H gezeigt werden konnte [7].

Die Majorität der molekularpathologischen Untersuchungen besteht zurzeit in der Bestimmung der folgenden 3 Biomarker (■ **Tab. 1**):

- *Her2/neu*-Amplifikation bei Mammakarzinomen,
- *KRAS*-Mutationszustand beim metastasierten kolorektalen Karzinom,
- *EGFR*-Mutationszustand beim nichtkleinzelligen Lungentumor (NSCLC).

Die damit verbundenen zielgerichteten Therapien basieren auf Antikörpern oder kleinen membrangängigen Stoffen („smart drugs“; ■ **Tab. 1**). Diese neuartige Kombination aus Therapie mit einem zielgerichteten Therapeutikum und Diagnostik auf der Basis eines prädiktiven Biomarkers wird als Theranostik bezeichnet [20].

Chemotherapie als Theranostik

Im Jahre 1957 wurde 5-Fluorouracil (5-FU) durch Charles Heidelberger synthetisiert, patentiert und als Chemotherapeutikum auch beim kolorektalen Karzinom [12] eingesetzt. Trotz der grundsätzlich ubiquitären Wirkungsweise von 5-FU sprechen jedoch nur etwa 25% der behandelten Patienten an [8]. Durch die Hinzunahme weiterer Zytostatika und zytotoxischer Stoffe entstanden die heute üblicherweise eingesetzten Kombinationsthe-

rapien FOLFOX (Folsäure/Leucovorin - 5-FU - Oxaliplatin) oder FOLFIRI (Folsäure/Leucovorin - 5-FU - Irinotecan; [14]). In klinischen Studien wurde schließlich auf empirischer Basis gezeigt, dass eine auf dem Tumorstadium (UICC I–IV) basierte Einteilung der Tumoren nützlich für die Entscheidung einer adjuvanten Therapie ist. Dieses Wissen ist heute Kern der S3-Leitlinien zur Behandlung von kolorektalen Karzinomen [14]. Insbesondere durch das molekulare Verständnis der DNA-Replikation und DNA-Reparaturmechanismen sind gerade für die einzelnen Komponenten der Chemotherapie, 5-FU und Folsäure/Leucovorin, komplexe Platinverbindungen und Irinotecan, sowohl die Zielstrukturen („targets“) als auch die Wirkmechanismen sehr gut bekannt, sodass es sich beim Einsatz von FOLFOX oder FOLFIRI im eigentlichen Sinne bereits um zielgerichtete Therapien handelt. Um den nächsten Schritt in die prädiktive Diagnostik und Therapie oder Theranostik gehen zu können, fehlen prädiktive Biomarker. Diese sind für die genannten Therapeutika im Regelfall mit den Zielstrukturen identisch.

Thymidylat-Synthase

Die Thymidylat-Synthase (TS) ist das Hauptziel von 5-FU und Folsäure/Leucovorin. Sie ist ein Schlüsselenzym in der De-novo-Synthese von 2'-Deoxy-Thymin-5'-mono-Phosphat (dTMP). Die TS katalysiert die Methylierung von 2'-Deoxy-Uracil-5'-mono-Phosphat (dUMP) in dTMP. Die Methylgruppe wird dabei von dem aktivierten Methylgruppendonor 5,10-Methylen-tetra-Hydrofolat (CH₂-THF) bereitgestellt. Die TS kann durch 5-Fluoro-2'-Deoxy-Uracil-5'-mono-Phosphat (FdUMP) inhibiert werden, das den aktiven Metaboliten von 5-FU darstellt. Diese Inhibition ist sehr effizient, weil FdUMP mit einer Affinitätskonstante (K_A) im geringen nanomolaren Bereich bindet. Die Affinität der FdUMP-TS-Komplexe wird durch Folsäure/Leucovorin stabilisiert, sodass die TS noch effizienter gehemmt werden kann [11].

Hohe Mengen an TS stellen erwartungsgemäß einen negativen Prädiktor für das Ansprechen auf 5-FU [8] oder in 5-FU-basierten Kombinationstherapien

Zusammenfassung · Abstract

Pathologie 2010 · [Suppl 2] 31:280–284 DOI 10.1007/s00292-010-1378-y
© Springer-Verlag 2010

A. Jung · S. Jaitner · A.J. Schöffauer · T. Kirchner

mRNA-Quantifizierung.

Die nächste Herausforderung in der Routinediagnostik

Zusammenfassung

Durch Einsatz prädiktiver Biomarker lassen sich Ansprechraten und Gesamtüberleben von Tumorpatienten steigern. Dies wurde eindrucksvoll für die Bestimmung von Mutationen in den *KRAS*- und *EGFR*-Protoonkogenen für den Einsatz von EGFR-zielgerichteten Therapeutika für das metastasierte kolorektale Karzinom bzw. das nichtkleinzellige Lungenkarzinom gezeigt. Diese Mutationsnachweise sind qualitativer Natur. Daneben sind jedoch auch für den Einsatz der gängigen Chemotherapeutika 5-Fluoruracil, Platinkomplexe und Irinotecan prädiktive Biomarker bekannt, die im Regelfall mit den Zielstrukturen dieser Therapeutika identisch sind. Die

Bestimmung dieser prädiktiven Biomarker führt ebenfalls zu einer Steigerung der Ansprechraten und des Gesamtüberlebens. Jedoch erfolgt die Bestimmung über den quantitativen Nachweis der mRNA-Expression, was einen erhöhten Aufwand für die Detektion nach sich zieht, die Kenntnis von Schwellenwerten („cut-off levels“) erforderlich macht und erhöhte Anforderungen für eine flächendeckende Etablierung mit sich bringt.

Schlüsselwörter

mRNA-Nachweis · Prädiktive Therapie · Biomarker · Kolorektales Karzinom · Molekularpathologie

mRNA quantification. The next challenge in routine diagnostics

Abstract

The application of predictive biomarkers results in an increase in the response rates and overall survival of cancer patients. This had been shown impressively for the detection of mutations in the proto-oncogenes *KRAS* and *EGFR* for the application of anti-EGFR targeted therapies in metastatic colorectal carcinomas and non-small-cell lung cancer, respectively. This mutation detection is of a qualitative nature. In addition, predictive biomarkers are known for the use of the commonly administered chemotherapeutics 5-fluorouracil, platinum-containing complexes, and Irinotecan, which are normally identical to the tar-

gets of the therapeutic compounds. The determination of these predictive biomarkers also results in an increase in response rates and overall survival. However, this detection is done via the quantitative determination of mRNA expression levels, implying greater efforts in detection, knowledge of cut-off levels, and higher requirements for nationwide establishment.

Keywords

mRNA detection · Predictive therapy · Biomarkers · Colorectal carcinoma · Molecular pathology

Tab. 1 Zielgerichtete Therapeutika, zugehörige Tumorentitäten, Zielstrukturen („targets“) und Typ des Nachweises der Alteration in der Theranostik

Substanz Handelsname (Firma)	Tumorentität	Zielstruktur („target“)	Biomarker (Alteration)
<i>Trastuzumab</i> Herceptin® (Roche)	Mammakarzinom Magenkarzinom	RYK (HER2)	HER2 (Amplifikation)
<i>Rituximab</i> MabThera® (Roche)	B-Zell-Lymphom	CD20	CD20 (Expression)
<i>Imatinib</i> Gleevec® (Novartis)	CML (chronische myeloische Leukämie) GIST (gastrointestinaler Stroma- tumor)	RYK (c-KIT)	c-KIT (Expression)
<i>Panitumumab</i> Vectibix® (Amgen) <i>Cetuximab</i> Erbix® (Merck-Serono)	Kolorektales Karzinom	RYK (EGFR)	KRAS (Mutation)
<i>Gefitinib</i> Iressa® (AstraZeneca)	NSCLC („non small cell lung cancer“)	RYK (EGFR)	EGFR (Mutation)
<i>Temozolomid</i> Temodal® (Merck)	Glioblastom	DNA-Reparatur (MGMT)	MGMT (Methylierung)
<i>Sorafenib</i> Melanox® (Roche)	Melanom	S/T-Kinase (BRAF)	BRAF (Mutation)

BRAF „Ras associated factor-B-type“, Bestandteil des RAS-RAF-MAPK („mitogen activated protein kinase“) Signaltransduktionsweges, KRAS „Kerstin rat sarcoma gene“ Bestandteil des RAS-RAF-MAPK-Signaltransduktionsweges, MGMT O⁶-Methyl-Guanosin-DNA-Methyl-Transferase, MMR „mismatch repair system“, RYK Rezeptortyrosinkinase, S/T-Kinase Serin/Threonin-Kinase.

dar [15]. Weiterhin wird die Wirkung von 5-FU durch hohe Aktivitäten der Thymidylat-Phosphorylase (TP) und des 5-FU abbauenden Enzyms Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) verringert. Erwartungsgemäß konnte gezeigt werden, dass die Expressionshöhe der für die jeweiligen Enzyme kodierenden mRNA ebenfalls mit einem schlechten Ansprechen auf 5-FU korreliert [10, 13].

Oxaliplatin

Komplexe Platinverbindungen, wie Oxaliplatin, bilden mit der DNA Addukte, die sich in Form von Quervernetzungen in und zwischen den DNA-Strängen manifestieren. Diese Alterationen der DNA werden durch das Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER)-System erkannt und repariert [4]. Für den Reparaturvorgang sind insbesondere die Endonukleasen ERCC-1 und -2 („excision repair cross complementing“) sowie XPF („xeroderma pigmentosum group F“)/ERCC-4 von essenzieller Bedeutung. Bei einer erhöhten Expression von ERCC-1 in den Tumorzellen zeigen Oxaliplatin-basierte Kombinationstherapien (FOLFOX) eine geringere bis fehlende Effizienz [9, 15].

Irinotecan

Irinotecan ist ein semisynthetisches Therapeutikum, das sich von dem natürlich vorkommenden Alkaloid Camptothecin (Cpt11) ableitet, das im Krebsbaum (*Camptotheca acuminata*) gefunden wird. Irinotecan stabilisiert während der S-Phase Komplexe aus DNA-Topoisomerase I und DNA. Dies hat zur Folge, dass strukturelle Torsionen der DNA nicht entfernt werden können, die beim Öffnen der Replikationsgabel während der DNA-Synthese entstehen. Dies hat wiederum zur Folge, dass Tumorzellen ohne S-Checkpoint-Kontrolle in den Zelltod getrieben werden.

SN-38, die aktive Form von Irinotecan kann über die enzymatische Wirkung von UDP-Glucuronosyl-Transferasen (UGT) in den inaktiven Metaboliten SN-38G umgewandelt werden. UGT finden sich in der Leber, wie UGT1A1, UGT1A6 und UGT1A9, oder außerhalb der Leber, wie UGT1A7. Präklinische und klinische Studien haben gezeigt, dass Polymorphismen im Promoter/Enhancer insbesondere von UGT1A1 helfen, die Wirkung von Irinotecan in Patienten vorherzusagen [19]. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass eine hohe Expressionsstärke von UGT1A1 ei-

ne negative Auswirkung auf die Wirkung von Irinotecan in kolorektalen Karzinomen hat [17]. Weiterhin hat die Stärke der mRNA-Expression der detoxifizierenden Glutathion-S-Transferase 1 (GSTP1) einen prädiktiven Wert für das Nichtansprechen auf Irinotecan-basierende Kombinationstherapien wie FOLFIRI [18].

Auf der Basis dieser Zusammenhänge konnte ein einfacher Algorithmus entwickelt werden (Abb. 1a), der dazu führt, dass die Ansprechraten auf über 50% gesteigert und das progressionsfreie Überleben deutlich erhöht werden können (Abb. 1b; [8–13, 15, 17, 18]), ohne auf teurere, moderne zielgerichtete Therapeutika zurückgreifen zu müssen [2].

Kombinationstherapie

Die Kombinationschemotherapien FOFOX und FOLFIRI werden wiederum in Kombination mit zielgerichteten Therapeutika eingesetzt, die gegen EGFR (Cetuximab oder Panitumumab) oder VEGF (Bevacizumab) gerichtet sind. Daraus ergeben sich zahlreiche Möglichkeiten der Kombination. Diese komplexe Situation lässt sich jedoch durch die Kombination an Biomarkern schrittweise zu einem Algorithmus vereinfachen (Abb. 1a; [8–13, 15, 17, 18]). Zunächst wird durch die Bestimmung der Expressionsmenge an ERCC-1 und TS entschieden, ob FOLFIRI oder FOLFOX besser wirkt. Dabei wirkt FOLFIRI bei hohen Expressionsniveaus an ERCC-1, während FOLFOX bei geringer Expression von ERCC-1 und TS eine größere Wirkung entfalten kann (Abb. 1b). Damit ist das „backbone“ der Therapie bestimmt. Nun entscheidet der Mutationszustand des Biomarkers KRAS, ob die gegen EGFR gerichteten Antikörper Cetuximab oder Panitumumab (Tab. 1) eine Wirkung („response“) hervorrufen können (KRAS ist WT) oder nicht (KRAS ist mutiert). Ein kombinierter Einsatz mit dem gegen VEGF gerichteten Antikörper Bevacizumab ist in jedem Fall möglich (Abb. 1a). Denn momentan ist kein prädiktiver Biomarker für dieses zielgerichtete Therapeutikum bekannt, sodass keine Prädiktion möglich ist.

Analyse der mRNA-Expressionsstärke

Um diese Zusammenhänge messbar zu machen, ist es notwendig, mRNA („messenger RNA“)-Expressionsniveaus zu bestimmen. mRNA-Messungen unterscheiden sich von Mutationsanalysen erheblich, weil mRNA-Expressionsniveaus einen Gleichgewichtszustand („steady state“) darstellen, der von Transkription (Zugewinn) und Degradation (Verlust) betroffen ist. mRNA-Bestimmungen sind daher im Unterschied zum Nachweis von Mutationen in der DNA quantitative Nachweissysteme, die einen erheblich komplexeren und vor allem aufwändigeren Ansatz erfordern. mRNA-Messungen müssen daher an jeweils individuelle Bedingungen angepasst werden und sind in der Regel als Relativmessung konzipiert, d. h. es wird die relative Menge an mRNA in Bezug zu einem oder mehreren Referenzgenen gesetzt. Diese Messtechnik wird als quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-qPCR) bezeichnet.

Ein wichtiger Messparameter ist die Bestimmung oder Kenntnis der Schwellenwerte („cut-off levels“), ab denen ein Zustand – z. B. die Indikation für eine Therapie – empfohlen werden kann. Da die RT-qPCR ein quantitatives Verfahren ist, besteht die Notwendigkeit, diese Schwellenwerte in jedem Labor individuell zu etablieren oder über geeichtes Probenmaterial einen mathematischen Relator zu bestimmen, der eine Umrechnung vom Schwellenwert eines Labors auf den eines anderen Labors erlaubt. Dies ist praktisch vergleichbar mit einer Umrechnung von Inch in Zentimeter: Beide Systeme messen Länge, aber bezogen auf eine jeweils andere Grundeinheit. Diese Zusammenhänge bedeuten für die Umsetzung von quantifizierenden mRNA-Messungen in die Praxis hohe Schwierigkeiten. Denn es muss zunächst ein Kollektiv an Patienten vorhanden sein, die auf die Therapie, für die die Schwellenwerte bestimmt werden sollen, sehr gut reagiert haben („Super-Responder“), und solche, die wenig bis gar nicht reagiert haben („progressive disease“). Die Hälfte des Abstands der beiden Mediane wird dann in aller Regel als Schwellenwert eingesetzt [8, 9, 13, 18].

Abb. 1 ▶ Algorithmus für die Entscheidung der Therapieart auf der Basis prädiktiver Biomarker und Effekt auf das Gesamtüberleben.

a Patienten mit niedriger Expression von ERCC-1 oder TS werden einer FOLFOX-Therapie zugeführt. Patienten mit hoher ERCC-1-Expression profitieren unabhängig vom Expressionsniveau der TS von FOLFIRI. Die Bestimmung des KRAS-Mutationszustandes erlaubt weiterhin die Einteilung, ob anti-EGFR-bindende Antikörper, Cetuximab (CTX) oder Panitumumab (PT) zusätzlich appliziert werden können (KRAS: WT). Da es für Bevacizumab (BEVA) noch keinen prädiktiven Biomarker gibt, kann dieses Therapeutikum in jedem Falle als Option eingesetzt werden. **b** Bereits durch die Bestimmung der mRNA-Expressionsniveaus von ERCC-1 und TS können die mittleren Überlebenszeiten im Vergleich zur unselektierten Anwendung erhöht werden [2, 8–13, 15, 17, 18]

mRNA-Bestimmung aus formalinfixiertem Gewebe

Bei der Messung von mRNA-Werten aus formalinfixiertem paraffineingebettetem (FFPE-) Gewebe fällt auf, dass die Messergebnisse der mRNA-Mengen selten homogene Wertegruppen sind, sondern im Regelfall ein Kontinuum an Messwerten. So gehen auch beim Vergleich der mRNA-Expressionsmengen in Tumoren von „Super-Respondern“ und „Non-Respondern“ die erhaltenen Messergebnisse oft nahtlos ineinander über. Dafür kann es mehrere Gründe geben. Eine oft wenig beachtet Ursache kann auf der präanalytischen Seite liegen, indem die Expressionsniveaus der verschiedenen mRNA-Spezies durch die lebenserhaltenden Maßnahmen während eines operativen Eingriffs stark verändert werden [6, 16]. Eine andere Ursache kann in der mangelnden Reinheit der untersuchten Gewebeareale sowie der ungeeigneten Wahl der Referenzgene liegen. Durch Anteile von Zellen aus nichttumorigen Stromaanteilen wird die Bestimmung der tumorspezifischen mRNA-Spezies verändert. Hier könnte die zusätzliche Einführung von epithelzellspezifischen Referenzgenen wie *EpCAM* („epithelial cell adhesion molecule“) eine Verbesserung erzielen.

Fazit

Zusammenfassend ist der Wert der Bestimmung von mRNA-Expressionsniveaus als weiteres molekularpathologisches Instrument für die Diagnose und Therapieentscheidung unbestritten und seit Langem bekannt. Die Herausforderung besteht in der praktischen Umsetzung, die im Unterschied zu DNA-Mutationsnachweisen wegen des Einbeziehens von kritischen Schwellenwerten („cut-off levels“) mit größeren Schwierigkeiten behaftet ist. Insbesondere für eine flächendeckende Umsetzung müssen bei der Bereitstellung von geeichtem Probenmaterial neue Wege gefunden und gegangen werden.

Korrespondenzadresse

PD Dr. rer. nat. A. Jung

Pathologisches Institut,
Ludwig-Maximilians-
Universität München
Thalkirchner Str. 36,
80337 München
andreas.jung@lmu.de

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor weist auf folgende Beziehungen hin: A. Jung und T. Kirchner haben für die Firmen Amgen, Merck-Serono und Roche Beratungstätigkeiten ausgeübt und Honorare für Vorträge erhalten.

Literatur

1. Anonymous (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69:89–95
2. El-Khoueiry AB, Pohl A, Danenberg K et al (2009) WT Kras and gene expression levels of VEGFR2, EGFR, and ERCC-1 associated with progression-free survival (PFS) in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with first-line 5-FU or capecitabine with oxaliplatin and bevacizumab (FOLFOX/BV or XELOX/BV). *J Clin Oncol* 27:4056
3. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57–70
4. Hoeijmakers JH (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411:366–374
5. Jones S, Zhang X, Parsons DW et al (2008) Signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 321:1801–1806
6. Juhl H (2010) Preanalytical aspects: a neglected issue. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 242:63–65
7. Kirchner T, Jung A (2010) Pathologische Diagnostik für die individualisierte Therapie des Dickdarmkarzinoms. *Pathologie* 31:16–21
8. Leichman CG, Lenz HJ, Leichman L et al (1997) Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for disseminated colorectal cancer response and resistance to protracted-infusion fluorouracil and weekly leucovorin. *J Clin Oncol* 15:3223–3229
9. Lenz HJ, Zhang W, Shi MM et al (2008) ERCC-1 gene expression levels and outcome to FOLFOX chemotherapy in patients enrolled in CONFIRM1 and CONFIRM2. *J Clin Oncol* 26:4131
10. Metzger R, Danenberg K, Leichman CG et al (1998) High basal level gene expression of thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial cell growth factor) in colorectal tumors is associated with nonresponse to 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 4:2371–2376
11. Peters GJ, Backus HH, Freemantle S et al (2002) Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1587:194–205
12. Rousselot LM, Cole DR, Grossi CE et al (1968) A five year progress report on the effectiveness of intraluminal chemotherapy (5-fluorouracil) adjuvant to surgery for colorectal cancer. *Am J Surg* 115:140–147

13. Salonga D, Danenberg KD, Johnson M et al (2000) Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res* 6:1322–1327
14. Schmiegel W, Reinacher-Schick A, Arnold D et al (2008) Update S3-guideline „colorectal cancer“ 2008. *Z Gastroenterol* 46:799–840
15. Shirota Y, Stoecklacher J, Brabender J et al (2001) ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 19:4298–4304
16. Spruessel A, Steimann G, Jung M et al (2004) Tissue ischemia time affects gene and protein expression patterns within minutes following surgical tumor excision. *Biotechniques* 36:1030–1037
17. Stoecklacher J, Lenz HJ (2003) Implications of genetic testing in the management of colorectal cancer. *Am J Pharmacogenomics* 3:73–88
18. Vallbohmer D, Iqbal S, Yang DY et al (2006) Molecular determinants of irinotecan efficacy. *Int J Cancer* 119:2435–2442
19. Walther A, Johnstone E, Swanton C et al (2009) Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 9:489–499
20. Warner S (2004) Diagnostics + Therapy = Theragnostics. *Scientist* 18:38