



Diesen Artikel zitieren: Watson J. 2013

Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers. *Open Biol* 3: 120144. <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.120144>

Empfangen: 4. Oktober 2012
Angenommen: 3. Dezember 2012

Themenbereich:
Molekularbiologie/Genetik

Schlüsselwörter:
Krebs, reaktive Sauerstoffspezies, metastasierender Krebs

Autor für die Korrespondenz:

Jim Watson
e-mail: berjka@cshl.edu

Oxidantien, Antioxidantien und die derzeitige Unheilbarkeit von metastasierenden Krebserkrankungen

Jim Watson

Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, NY 11724, USA

1. Zusammenfassung

Die überwiegende Mehrheit aller Mittel, die zur direkten Abtötung von Krebszellen eingesetzt werden (ionisierende Strahlung, die meisten Chemotherapeutika und einige zielgerichtete Therapien), wirken entweder direkt oder indirekt durch die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies, die wichtige Schritte im Zellzyklus blockieren. Da sich mesenchymale Krebsarten aus ihren epithelialen Vorläufern entwickeln, verfügen sie fast zwangsläufig über viel höhere Mengen an Antioxidantien, die ansonsten hochwirksame Oxidationstherapien effektiv blockieren. Ein weiterer Schlüssel zum besseren Verständnis ist die Frage, warum und wie das Antidiabetikum Metformin (das weltweit am häufigsten verschriebene pharmazeutische Produkt) mesenchymale p5322-Zellen mit Oxidationsmitteldefizit bevorzugt abtötet. Die Entwicklung neuer Medikamente, die gegen p5322-Krebs wirksam sind, sollte viel schneller vorangetrieben werden.

Obwohl die Sterblichkeitsrate bei vielen Krebsarten, vor allem bei den Blutkrebszellen, ständig sinkt, ist es vielleicht noch wichtiger, dass so viele Epithelkarzinome (Karzinome) und praktisch alle Mesenchymkarzinome (Sarkome) weitgehend unheilbar bleiben. Auch wenn eine zunehmende Zahl von intelligent konzipierten, auf das Gen abzielenden Medikamenten in der klinischen Praxis eingesetzt wird, können sie den tödlichen Verlauf schwerer Krebsarten wie Lungen-, Dickdarm- und Brustkrebs, die bereits Metastasen gebildet haben und für den geschickten Chirurgen oder Strahlentherapeuten unerreichbar geworden sind, nur vorübergehend aufhalten. Auch wenn wir bald ein umfassendes Bild davon haben werden, wie die meisten Krebsarten auf genetischer und biochemischer Ebene entstehen und funktionieren, scheint ihre „Heilung“ für viele erfahrene Wissenschaftler heute ein noch entmutigenderes Ziel zu sein als zu der Zeit, als Präsident Nixon im Dezember 1971 den „Krieg gegen den Krebs“ begann.

Was mich damals, vor 40 Jahren, dazu antrieb, das Cold Spring Harbor Laboratory zu einem bedeutenden Zentrum für die Entschlüsselung der genetischen Grundlagen von Krebs zu machen, war die Überzeugung, dass medizinische Chemiker, sobald die genetisch bedingten molekularen Wege zu Krebs bekannt würden, viel wirksamere, auf die Gene ausgerichtete Medikamente entwickeln würden. Im Gegensatz zu den meisten frühen Befürwortern des „Kriegs gegen den Krebs“, die davon ausgingen, dass DNA-schädigende Chemotherapeutika in ein bis zwei Jahrzehnten echte Siege bringen würden, war ich der Meinung, dass drei, wenn nicht vier weitere Jahrzehnte konzentrierter Forschung nötig sein würden, bevor wir in der Lage sein würden, den totalen Sieg zu erringen [1]. Tatsächlich war es erst möglich, sich der wahren genetischen Komplexität von Krebs anzunähern, nachdem das Humangenomprojekt von 1988 bis 2003 der Welt die hochpräzisen Sequenzen von drei Milliarden menschlicher DNA-Buchstaben geliefert hatte.

2. Molekulare Krebswege, die durch DNA-Sequenzierung aufgedeckt wurden

Inzwischen wissen wir, dass Mutationen in mindestens mehreren hundert menschlichen Genen (von insgesamt 21 000 Genen) zu ernsthaften „Triebkräften“ des abnormen Zellwachstums und der Zellteilung werden, die Krebs beim Menschen erzeugen [2]. Denn sie kodieren die Proteinkomponenten von „Signaltransduktionswegen“, die es externen Signalen

(Wachstumsfaktoren) ermöglichen, von den Rezeptoren an der Zelloberfläche zu den wichtigen Promotor-Enhancer-Regionen entlang der 24 menschlichen Chromosomen zu gelangen. Dort kurbeln sie die Expression von Genen an, die für das Zellwachstum und die Zellteilung sowie für die Umgehung des programmierten Zelltods benötigt werden, wobei letzteres eine wichtige Ursache für die zunehmende Resistenz von aggressiven Krebszellen im Spätstadium gegenüber Radio- und Chemotherapeutika ist. Am wichtigsten ist, dass es mehrere molekulare Wege gibt, die das Zellwachstum und die Zellvermehrung bewirken, jeder mit seinen eigenen spezifischen Oberflächenrezeptoren, zytoplasmatischen Transducern sowie Promotoren und Enhancern der Genexpression [3].

Zwischen diesen Wegen gibt es viele potenzielle Überschneidungen, die es neuen DNA-Mutationen ermöglichen, neue Wege zum Krebs zu schaffen, wenn bereits bestehende blockiert sind. Wir wissen bereits, dass das Auftreten von Resistenzen gegen das auf das Gen BRAF ausgerichtete Anti-Melanom-Medikament Zelboraf häufig auf eine Überschneidung der Antriebswege zurückzuführen ist, ebenso wie die Resistenz gegen die zielgerichteten Medikamente Iressa und Tarceva, wenn sie gegen EGFR-getriebenen Lungenkrebs eingesetzt werden. In Anbetracht der scheinbar fast intrinsischen genetischen Instabilität vieler Krebsarten im fortgeschrittenen Stadium sollten wir nicht überrascht sein, wenn wichtige alte Hasen der Krebsgenetik daran zweifeln, dass die meisten Opfer von weit verbreitetem metastasierendem Krebs wirklich geheilt werden können.

Die Resistenz gegen gentechnisch veränderte Krebsmedikamente ist auch eine Folge der radikalen Veränderungen der zugrundeliegenden Genexpressionsmuster, die mit der Umwandlung von Epithel- in mesenchymale Zellen (EMT) einhergehen, die Krebszellen durchlaufen, wenn ihre Umgebung hypoxisch wird [4]. Bei EMTs entstehen frei schwimmende mesenchymale Zellen, deren flexible Form und immer noch hohes ATP-erzeugendes Potenzial ihnen die Fähigkeit zu amöboiden, zellähnlichen Bewegungen verleihen, die es ihnen ermöglichen, sich an andere Körperstellen (Gehirn, Leber, Lunge) zu metastasieren. Erst wenn sie sich so bewegt haben, werden die meisten Krebsarten wirklich lebensbedrohlich.

3. Epitheliale zu mesenchymale Übergänge sind eine Folge von Veränderungen in der Transkriptionsregulation

EMTs lassen die bereits bestehende Reihenfolge der DNA-Basen intakt, verändern aber die Art und Weise, wie sie in RNA-Transkripte abgelesen werden. Der Transkriptionsregulierung liegen ortsspezifische DNA-bindende Proteine und manchmal regulatorische RNAs zugrunde, die die für das Ablesen der Gene erforderliche Maschinerie an die Gene binden. Dazu gehören die allgemeine Transkriptionsmaschinerie und auch Enzyme, die die Histone, um die die chromosomale DNA gewickelt ist, und die DNA selbst verändern. Diese Enzyme vermitteln die Methylierung und Acetylierung von Histonen sowie die Umgestaltung der Nukleosomen auf verschiedene Weise und die Methylierung von DNA-Basen, Veränderungen, die die Expression eines bestimmten Gens beeinflussen können. Die Regulierung der Transkription geht weit über ihre Rolle bei der Beeinflussung der Reaktion von Krebszellen auf Veränderungen in ihrer Umgebung hinaus. Diese Regulierung liegt all den zahlreichen Umschaltvorgängen zugrunde, die den Übergang von befruchteten Eizellen zu den differenzierten Zellen (Lunge, Niere usw.) reifer Organismen begleiten.

4. IL6-ähnliche Zytokine treiben mesenchymale Zellen zur Zellproliferation an

Ein großes Hindernis bei der Entwicklung wirksamer Medikamente gegen mesenchymale Krebszellen war lange Zeit die Unkenntnis der von außen

gesteuerten Signalwege, die sie zum Stammzellwachstum und zur anschließenden Differenzierung antreiben. Die meiste Aufmerksamkeit wurde bisher dem Wnt-Signalweg gewidmet, der b-Catenin in den Zellkern schickt, um den Transkriptionsfaktor TCF zu aktivieren, der eine wesentliche Rolle bei der EMT und der Funktion von Stammzellen spielt [5,6]. Ein noch wichtigerer Bösewicht steht uns vielleicht schon seit fast zwei Jahrzehnten ins Gesicht geschrieben - einer oder mehrere der Zytokin-Mediatoren für Entzündungen und Immunität, insbesondere das Interleukin IL6. Der IL6-Blutserumspiegel beispielsweise steigt stetig an, wenn unheilbare Krebserkrankungen immer lebensbedrohlicher werden [7,8]. Wahrscheinlich gibt es autokrine Regelkreise, in denen die Bindung von Zytokinen an ihre jeweiligen Zelloberflächenrezeptoren nachgeschaltete genaktivierende Wege in Gang setzt, die nicht nur mehr IL6-Moleküle erzeugen, sondern den jeweiligen Krebszellen eine Aura fast wahrer Unsterblichkeit verleihen, indem sie den wichtigsten Weg zum programmierten Zelltod (Apoptose) blockieren. *Dass Zytokine ansonsten ruhende mesenchymale Krebszellen zum Wachstum und zur Teilung anregen, erklärt wahrscheinlich, warum entzündungshemmende Mittel wie Aspirin bei Menschen, die sie regelmäßig einnehmen, zu deutlich weniger Krebs führen [9].*

Leider ist es aufgrund der großen Anzahl von Proteinen, deren Expression entweder ansteigt oder abfällt, wenn die mesenchymalen Krebszellen aus dem Ruhezustand in den Zellzyklus übergehen, immer noch sehr schwierig, neben den Zytokinen zu wissen, auf welche anderen treibenden Proteine man sich bei der Arzneimittelentwicklung konzentrieren sollte. Idealerweise sollten wir uns zunächst darauf konzentrieren, Hemmstoffe für die Proliferation von Krebszellen zu finden, im Gegensatz zu Hemmstoffen für das Wachstum von Krebszellen. Wenn man beispielsweise die Synthese von molekularen Bausteinen der Zellen hemmt, verlangsamt sich nicht nur der Stoffwechsel der Krebszellen, sondern auch der der normal funktionierenden Zellen unseres Körpers. Im Gegensatz dazu dürfte die Blockierung von Proteinen, die sich spezifisch durch den Zellzyklus bewegen, das normale Funktionieren der großen Mehrheit unserer Körperzellen unberührt lassen und somit viel weniger unerwünschte Nebenwirkungen hervorrufen.

5. Der Gentranskriptionsaktivator Myc ermöglicht es den Zellen, den Zellzyklus zu durchlaufen

Lange Zeit galt der mächtige Gentranskriptionsaktivator Myc als ein Schlüsselprotein, wenn nicht sogar *als das* Schlüsselprotein, gegen das zellproliferationshemmende Medikamente entwickelt werden können. Zunächst bekannt für seine Rolle bei der Entstehung von Krebserkrankungen der blutbildenden Lymphozyten (z. B. Burkitt-Lymphom), hat sich Myc jetzt auch als Haupttriebkraft für die schnell tödlich verlaufenden „kleinzelligen“ Lungenkarzinome erwiesen sowie als wahrscheinliche Triebkraft für viele unheilbare Krebsarten im Spätstadium, einschließlich rezeptornegativer und duktaler Brustkrebsarten. *Eine große Menge Myc könnte sich als wesentliches Merkmal vieler wirklich unheilbarer Krebsarten erweisen.* Es kurbelt gleichzeitig die Synthese von mehr als 1000 verschiedenen Proteinen an, die erforderlich sind, um alle Zellen durch den Zellzyklus zu bewegen. Obwohl die genaue Funktionsweise dieses fast 400 Aminosäuren langen Polypeptids auf molekularer Ebene noch nicht geklärt ist, scheint es eine einzigartige Rolle zu spielen, die von keiner anderen Klasse von Transkriptionsfaktoren übernommen werden kann. Im Gegensatz zu unserer ersten Vermutung, dass Myc die Genaktivität irgendwie an- und ausschaltet, ist es ein nichtlinearer Verstärker der Expression, der universell auf aktive Gene wirkt, mit Ausnahme der frühen Gene, die vor Myc exprimiert werden [10,11]. Es wurden bereits viele ernsthafte Anstrengungen unternommen, um Medikamente zu entwickeln,

die seine zellwachstumsfördernden Aktivitäten blockieren. Leider sind alle diese direkten Bemühungen bisher gescheitert.

Mit Hilfe eines dominant-negativen Plasmids, das alle Myc-Funktionen blockiert, hat das Labor von Gerard Evans, zunächst an der UCSF und jetzt in Cambridge, UK, anhand von Maus-Xenographie-Modellen mehrerer wichtiger menschlicher Krebsarten gezeigt, dass Myc eine unverzichtbare Rolle bei der Bewegung durch den Zellzyklus spielt [12]. Obwohl Mäusestammzellen in Abwesenheit von Myc aufhören zu wachsen und sich zu teilen, nehmen sie ihre normale Funktion wieder auf, wenn Myc wieder eingeschaltet wird. Im Gegensatz dazu treibt das Ausschalten von Myc in menschlichen Krebszellen diese vorzugsweise in den programmierten Zelltod (Apoptose), mit einer wichtigen Ausnahme: Adenokarzinomzellen der Bauchspeicheldrüse treten nicht in die Apoptose ein, was möglicherweise erklärt, warum Bauchspeicheldrüsenkrebs so resistent gegen praktisch alle zelltötenden Reagenzien ist (G. Evans 2012, persönliche Mitteilung).

6. Bromodomain-4-Proteine spielen eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der für das Wachstum und die Teilung leukämischer Zellen erforderlichen Myc-Konzentrationen

Die Entdeckung, dass die Unheilbarkeit der akuten myeloischen Leukämie (AML) MLL-AF9 vom Vorhandensein des noch nicht sehr gut verstandenen Proteins Bromodomain 4 (BRD4) abhängt, hat zu einer unerwartet wirksamen Methode zur Senkung des Myc-Spiegels bei blutbildenden Krebsarten geführt. Als JQ1, das im vergangenen Jahr zur Behandlung des BRD4-bedingten seltenen NUT-Mittellinienkarzinoms entwickelt wurde, auf menschliche MLL-AF9-AML-Zellen angewendet wurde, hörten diese rasch auf, sich zu vermehren und differenzierten sich in Makrophagen [13,14]. Gleichzeitig sank der Myc-Spiegel rapide ab. Am wichtigsten ist jedoch, dass JQ1 die normale Makrophagenproduktion nicht blockiert, was darauf hindeutet, dass der Myc-Spiegel in Makrophagen bildenden Stammzellen nicht von BRD4 abhängt. Ihre Bildung muss von einem anderen chromosomalen Remodeller abhängen.

7. Myc wird über mehrere molekulare Wege aktiviert

Wie Myc nicht nur bei anderen Krebsarten, sondern auch während der normalen menschlichen Entwicklung eingeschaltet wird, ist noch weitgehend ungeklärt. Ebenso wenig ist bekannt, wie das BRD4-Protein auf molekularer Ebene dazu beiträgt, die Myc-Synthese bei MLL-AF9-gesteuerter Leukämie zu aktivieren. Bis JQ1 gegen Leukämie Ende des Jahres in die Klinik kommt, werden wir außerdem nicht mit Sicherheit wissen, ob eine Resistenz gegen JQ1 seinen klinischen Nutzen beeinträchtigt. Leider lautet die Antwort wahrscheinlich ja, da die künstliche Aktivierung von Myc durch Umgehung von BRD4 zu einer JQ1-Resistenz führt. Darüber hinaus sind bereits mehrere Wege bekannt, wie die Myc-Expression in normalen Zellen aktiviert werden kann. Jeder dieser Wege beginnt mit der Bindung von Signalen an spezifische Zelloberflächenrezeptoren, die dann durch eine oder mehrere Schichten von Signalübertragern in den Zellkern wandern, um die Transkription von Genen zu aktivieren, die für das Zellwachstum und die Zellteilung benötigt werden. Die Myc-Synthese ist nicht nur dem Zytokin Jak-Stat3-Signalübertragungsweg nachgeschaltet, sondern auch dem HER2-RAS-RAF-SHP2-ERK3-Signalweg, der das Wachstum vieler, wenn nicht der meisten Brustkrebsarten fördert [15]. Ob sie ihrerseits in BRD-Protein-abhängige Genaktivierungswege einfließen, wird die Zukunft zeigen. Möglicherweise müssen wir eine Vielzahl spezifischer Myc-hemmender Medikamente in unser Arsenal aufnehmen, bevor wir routinemäßig über

die Verzögerung des Todes bei unheilbaren Krebserkrankungen hinausgehen und echte, lebenslange Heilung erreichen können.

8. Aufspüren wichtiger Schwachstellen von Krebszellen durch RNAi-Screens

Dass das BRD4-Protein zu den größten Achillesfersen der unheilbaren AML gehört, wurde nicht durch eine zufällige Beobachtung bekannt, sondern durch den Einsatz einer leistungsstarken neuen Methode zum Aufspüren molekularer Schwachstellen, die krebszellspezifisch sind. Das Herzstück dieser Methode ist die in den letzten Jahren von Greg Hannon am Cold Spring Harbor Laboratory durchgeführte Entwicklung von kurzen Haarnadel-RNA-Molekülen (shRNAs), die speziell dafür entwickelt wurden, die Funktion einzelner menschlicher Gene zu unterdrücken [16]. Eine genomische shRNA-Bibliothek mit mehreren Sonden (vier bis sechs) für jedes menschliche Gen enthält etwa 100 000 shRNAs. Sie alle ausgiebig gegen eine einzige Krebsart zu testen, stellt immer noch eine gewaltige logistische Herausforderung dar, für die selbst „große Wissenschaftslabors“ wahrscheinlich ein- bis zweijährige Zeiträume benötigen.

Sehr viel kleinere, hochspezialisierte Bibliotheken können jedoch jetzt von hochwertigen wissenschaftlichen Labors auf Universitätsebene eingesetzt werden, sofern bereits Hinweise auf mögliche molekulare Schwachstellen vorliegen. Ausgehend von der Erkenntnis, dass unheilbare Formen der akuten myeloblastischen Leukämie (AML) immer auf Umlagerungen eines Schlüsselgens zurückzuführen sind, das an der epigenetischen Umgestaltung der Chromosomen beteiligt ist, fanden Chris Vakoc und Johannes Zuber vom Cold Spring Harbor Laboratory das genaktivierende BRD4 als die ausgeprägteste potenzielle molekulare Schwachstelle einer menschlichen MLL-AF9-AML. Dazu durchsuchten sie Bibliotheken mit nur etwa 1000 Sonden, die 234 Gene ausschalten sollten, die für die Schlüsselproteine kodieren, die an der epigenetisch gesteuerten Genexpression beteiligt sind.

Kürzlich hat Vakoc drei weitere wichtige Proteinakteure (Menin, Ezh1/2 und Eed) gefunden, die zusammen mit BRD4 dafür sorgen, dass MLL-AF9-AML durch derzeit eingesetzte Krebsmedikamente unheilbar wird [17]. Medikamente, die ihre jeweilige Funktion hemmen, sollten ebenfalls wirksame Mittel gegen AML darstellen. Ezh1/2 und Eed kodieren für Polycomb-Proteine, die eine bestimmte Genexpression blockieren, während das Menin-Gen, wie das BRD4-Gen, die Genexpression steuert. Der Verlust von funktionellem Ezh1/2 und Eed blockiert die Expression der vom *Cdkn2a*-Gen kodierten p16- und p19-Proteine, die eine weit verbreitete Rolle bei der Blockierung der Zellzyklusprogression spielen. Die molekulare Rolle des Menin-Proteins besteht wahrscheinlich in seiner bereits bekannten Bindung an MLL. Wie BRD4 könnte es eine Myc-Level-Raising-Funktion haben. Wenn wir herausfinden, wie solche Chromosomenumbau-Abhängigkeiten während der Tumorprogression entstehen und sich entwickeln, wird dies direkte Auswirkungen auf die klinische Umsetzung von Krebstherapien auf epigenetischer Basis haben.

9. Die Funktion von BRD4 ist nicht nur für schnell wachsende Leukämien, sondern auch für viele, wenn nicht sogar die meisten gefährlichen Lymphome und Myelome von entscheidender Bedeutung

Wir müssen so bald wie möglich genauer herausfinden, inwieweit die krebshemmende Wirkung des Medikaments JQ1 über die MLL-AF9-spezifischen AMLs hinausgeht. Wir wissen bereits, dass es bei Mäusen die heilbareren, nicht MLL-umstrukturierten AML-Stämme ebenso gut stoppt wie alle Formen der akuten lymphatischen Leukämie (ALL). Die Fähigkeit von BRD4, den Myc-Spiegel zu erhöhen, erstreckt sich also wahrscheinlich

auf fast alle Leukämien. Ob die Polycomb-Proteine der ALL, wie die der AML, auch die zellzyklushemmenden *Cdk2a-kodierten* Proteine p16 und p19 ausschalten, bleibt abzuwarten. JQ1 stoppt bei Mäusen auch das Wachstum vieler schnell wachsender B- und T-Zell-Lymphome, was darauf hindeutet, dass deren unbehandeltes BRD4-Protein die hohen Myc-Konzentrationen aufrechterhält, die notwendig sind, um sie tödlich zu machen. Bei JQ1-resistenten Lymphomen (z. B. Jurkat-Zellen) muss die Myc-Synthese auf einem anderen Weg eingeschaltet werden. Zelllinien der meisten menschlichen Opfer des Multiplen Myeloms zeigen ebenfalls häufig eine hohe Empfindlichkeit gegenüber JQ1 [18]. Der Zweiercocktail aus JQ1 und dem inzwischen weit verbreiteten Proteasom-Inhibitor Velcade verstärkt hier gegenseitig seine Anti-Myelom-Wirkung. Wenn JQ1 auf breiter Basis klinisch verfügbar wird, hoffentlich bis Mitte 2013, könnte es die 3 bis 5 zusätzlichen Lebensjahre, die den meisten Myelomopfern durch die Verabreichung von Velcade gewährt werden, erheblich verlängern.

JQ1 verlangsamt auch deutlich das Wachstum einer kleinen, aber realen Anzahl von Zelllinien, die von vielen großen soliden Krebsarten (z. B. Prostata- und Melanom) stammen. BRD4 wurde möglicherweise erst spät ins Spiel gebracht, als sich diese Krebsarten zu aggressiveren Formen entwickelten. Von größerer Bedeutung ist, dass JQ1 das Wachstum der überwiegenden Mehrheit der Zelllinien solider Tumore nicht stoppen kann. Die erhöhten Myc-Werte, die z. B. bei Prostata- und Brustkrebs benötigt werden, könnten stattdessen durch die Intervention eines oder mehrerer der etwa 35 anderen BRD-Proteine oder anderer Chromatin-Regulatoren erreicht werden. Leider wissen wir noch nicht, wie die meisten von ihnen funktionieren, abgesehen von der Tatsache, dass ihre BRD-Taschen durch die Bindung an die Acetylgruppen dazu beitragen, die Genaktivierung einzuschalten und nicht abzuschalten. Die unerwartete Blockierung der Spermienfunktion durch JQ1 hat vor kurzem zur Entdeckung einer Hoden-spezifischen Bromodomäne (BRDT) geführt, die für die Umgestaltung des Chromatins während der Spermatogenese wesentlich ist. Die Besetzung der Acetyl-Lysin-Tasche der BRDT durch JQ1 bewirkt eine vollständige und reversible kontrazeptive Wirkung [19]. Erste Hinweise deuten darauf hin, dass BRDT die Myc-Synthese nicht fördert. Vielleicht gibt es bald Brust- oder prostataspezifische BRD-Genaktivatoren. Die wichtigste Frage ist, ob sie auch die Myc-Synthese fördern oder nicht.

10. Der Regulator des zirkadianen Rhythmus (PER2) fungiert durch negative Regulierung des Myc-Spiegels als wichtiger Tumorsuppressor

Die herausragende Rolle von Myc bei der Bewegung von Krebszellen durch den Zellzyklus wurde vor kurzem durch zwei voneinander unabhängige RNAi-Screens untermauert, mit denen Gene gefunden wurden, deren Funktionsverlust Krebszellen selektiv abtötet [20,21]. Bei der Entnahme von weitgehend unterschiedlichen Genen konzentrierten sich beide auf das Gen *CSNKe*, das für die Proteinkinase Caseinkinase 2 epsilon kodiert. Zu seinen zahlreichen Zielen für die Phosphorylierung und den anschließenden proteosomalen Abbau gehört das Gen *PER2*, dessen selektive Bindung an die DNA die Funktion vieler Gene, einschließlich *Myc*, ausschaltet. Schon seit langem ist bekannt, dass PERIOD 2 (PER2) ein Uhrenprotein ist, das im Zentrum der zirkadianen Rhythmen höherer Tierzellen steht. Später wurde ganz unerwartet festgestellt, dass PER2 als Tumorsuppressor fungiert, wobei das Fehlen beider Kopien zu einem Anstieg der strahleninduzierten Krebserkrankungen führt. Es scheint nun offensichtlich, dass seine krebshemmende Wirkung auf seiner Fähigkeit beruht, *Myc* auszuschalten. In Abwesenheit von PER2 steigen die Myc-Werte stark an, was erklärt, warum Tumore vieler Arten höhere

CSNKe-Werte aufweisen als ihre normalen Zelläquivalente. Der gesunde Menschenverstand legt nahe, dass spezifische *CSNKe*-Inhibitoren bald auf breiter Basis gegen eine Vielzahl menschlicher Krebsarten getestet werden sollten.

11. Hoch-Myc-gesteuerte, schnell proliferierende Zellen weisen Schwachstellen im Zellzyklus auf

Proliferierende Zellen mit hohem Myc-Gehalt durchlaufen den mitotischen Zyklus weniger effizient als Zellen mit niedrigerem Myc-Gehalt. Warum ein hoher Myc-Gehalt zu viel mehr mitotisch bedingten Chromosomenanomalien führt, wurde vor kurzem durch einen groß angelegten RNAi-Screen erklärt, der darauf abzielte, „synthetisch tödliche“ Gene zu entdecken, die nur unter Bedingungen eines hohen Myc-Gehalts eine lebenswichtige Funktion haben. Überraschenderweise konnten die SUMO-aktivierenden Gene *SAE1* und *SAE2*, die am Proteasom-spezifischen Proteinabbau beteiligt sind, als Schlüsselgene identifiziert werden [22]. Wenn sie in ihrer Funktion blockiert sind, wird eine große Anzahl von Myc-gesteuerten Genen irgendwie ein- und ausgeschaltet. Wie erwartet, sind viele davon an der Bildung und dem Abbau der mitotischen Spindel beteiligt. Eine zweite, viel weniger erwartete Klasse ist am Ubiquitin-vermittelten Proteinabbau beteiligt, der durch das Proteasom vermittelt wird. Es ist denkbar, dass die schnellen Wachstumsraten von Zellen mit hohem Myc-Gehalt mehr an der Mitose beteiligte Proteine erzeugen, als die jeweiligen Proteasomen rechtzeitig abbauen können. In jedem Fall sollten Medikamente, die *SAE1* und *SAE2* blockieren, vorzugsweise schnell proliferierende Krebszellen abtöten.

Eine hohe Myc-Anfälligkeit wird auch durch eine suboptimale Versorgung mit CD-Kinase 1 (CDK1) hervorgerufen, die während der späten S-Phase des Zellzyklus mit den Zyklinen vom Typ A zusammenarbeitet. Solange der Myc-Spiegel dem von normalen Zellen entspricht, verfügen proliferierende Zellen über ausreichend CDK1. Wenn jedoch mehr Myc zu schnelleren Zellzyklen führt, wird viel mehr CDK1 benötigt, um fehlgeschlagene Zellteilungen zu verhindern. Daher ist es ein hervorragender Kandidat für die Entwicklung eines wirksamen Medikaments gegen Krebs mit hohem Myc-Gehalt [23].

12. Selektive Abtötung von Krebszellen durch Ausnutzung krebsspezifischer metabolischer und oxidativer Schwächen

Wir müssen uns viel mehr auf das breite Spektrum an metabolischen und oxidativen Schwachstellen konzentrieren, die als Folge der unkontrollierten Wachstums- und Vermehrungsfähigkeit von Krebszellen entstehen. Da menschliche Krebszellen in immer aggressivere glykolytische Zustände getrieben werden, sind sie durch ihren ständig zunehmenden Stoffwechselstress besonders anfällig für eine plötzliche Verringerung ihrer lebenswichtigen ATP-Energieversorgung. 3-Bromopyruvat, der wirksame duale Inhibitor der Hexokinase und der oxidativen Phosphorylierung, tötet hochgefährliche hepatozelluläre Karzinomzellen mehr als zehnmals schneller ab als die widerstandsfähigeren normalen Leberzellen und hat somit die Fähigkeit, zumindest bei Ratten einen ansonsten hochgradig unheilbaren Krebs wirklich zu heilen [24,25]. Der strukturell sehr unterschiedliche Hexokinase-Hemmer 2-Desoxy-Glukose hat durch seine Fähigkeit, die Glykolyse zu blockieren, ebenfalls das Potenzial, ein wichtiges Krebsmedikament zu sein. Es überrascht nicht, dass er noch besser wirkt, wenn er mit Inhibitoren der ATP-erzeugenden oxidativen Phosphorylierung wie dem Mitochondrien-Target-Medikament Mito Q kombiniert wird [26].

Ein wichtiger Vermittler der zellulären Reaktion auf sinkende ATP-Werte ist die AMP-abhängige Proteinkinase AMPK, die in Zeiten von

Ernährungsstress wichtige Zielproteine phosphoryliert, um den Stoffwechsel von anabolen Wachstumsmustern wegzubringen [27]. Durch Hemmung von mTOR verlangsamt sie die Proteinsynthese, und durch Phosphorylierung der Acetyl-CoA-Carboxylase verlangsamt sie die Lipidsynthese. Die glykolytischen Wege, die die zellulären Bausteine produzieren, werden indirekt von AMPK durch seine Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors p53 kontrolliert. Aktiviertes p53 verlangsamt die Glykolyse während des Zellzyklus-Stillstands, indem es sein *TIGAR*-Gen-Ziel anschaltet. Das entsprechende Protein baut den Schlüsselregulator der Glykolyse, Fruktose-2,6-Bisphosphat, ab und blockiert weitere Zellzyklen durch Aktivierung des *p21*-Gens.

13. Bevorzugte Abtötung von Krebszellen durch Apoptose spiegelt hohe p53-Werte wider

Die erhöhte Apoptosefähigkeit von Epithelkrebszellen im Frühstadium im Vergleich zu ihren normalen Zelläquivalenten spiegelt ihren höheren Gehalt an aktiviertem p53-Transkriptionsfaktor wider. Überexpression und Amplifikation der p53-Repressoren MDM2 und MDM4 sind bei allen Krebsarten verbreitet. Bei Melanomen wird die p53-Funktion in der Regel durch eine Überexpression von MDM4 ausgeschaltet. Es gibt bereits ein Medikament, das durch die Hemmung von MDM4 das Melanom wesentlich besser behandelbar macht [28]. Mehr darüber zu erfahren, warum die Aktivierung von p53 manchmal zum Stillstand des Zellzyklus (Seneszenz) und unter anderen Umständen zur Apoptose führt, bleibt eine wichtige Herausforderung für die nahe Zukunft.

14. P53 leitet die Apoptose ein, indem es die Synthese von Genen anschaltet, deren Hauptfunktion die Synthese reaktiver Sauerstoffspezies ist

Wie p53 die Apoptose in Gang setzt, wurde erstmals 1997 durch elegante Genexpressionsstudien im Labor von Bert Vogelstein an der Johns Hopkins University enthüllt [29]. Obwohl sie nach Genen suchten, die nur während der Apoptose exprimiert werden, entdeckten sie eine Reihe von 13 p53-induzierten Genen (PIG-Gene), von denen jedes wahrscheinlich eine Schlüsselrolle bei der zellulären Synthese reaktiver Sauerstoffspezies (ROS; H_2O_2 Wasserstoffperoxid, OH^\cdot Strahlung und O_2^\cdot Superoxide) spielt. *PIG3* beispielsweise kodiert für eine Chinon-Oxidoreduktase, die ein potenter Generator von ROS ist [30,31]. p53-Zielgene spielen auch eine wichtige Rolle bei nachgeschalteten Prozessen, indem sie die Synthese von etwa 10 verschiedenen mitochondrialen Funktionsproteinen wie BAX, PUMA und NOXA sowie von Todesrezeptoren wie DR4 und DR5 anregen, die auf noch zu klärende Weise dazu beitragen, die vielen aufeinander folgenden Proteolyse-Stufen der Apoptose durchzuführen [32].

Ebenso wichtig ist, dass p53 die Synthese der Schlüsselproteine ankurbelt, die an der apoptotischen (programmierten Zelltod) Beseitigung von Zellen beteiligt sind, die keine langfristige Zukunft haben, z. B. durch unhaltbaren Stoffwechselstress oder Schädigung der zellulären Chromosomen durch ultraviolette oder ionisierende Strahlung. Die Beseitigung solcher Zellen ist also ein komplexer Vorgang, der hauptsächlich in den Mitochondrien stattfindet. Im Laufe der aufeinander folgenden Apoptosestufen verlieren die jeweiligen sterbenden Zellen ihre mitochondriale Funktion und setzen Cytochrom c frei, was schließlich zur Auflösung der Zelle unter Befreiung der DNA führt.

15. Leckagen aus medikamentengestörten mitochondrialen Elektronentransportketten erhöhen den Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies

Der mitochondriale Elektronentransport zur Erzeugung von ATP und Wärme geht zwangsläufig mit der Produktion von ROS (wie OH^\cdot Radikale, H_2O_2 und O_2^\cdot Superoxide) einher. Normalerweise verhindern starke antioxidative Moleküle wie Glutathion und Thioredoxin, dass die ROS-Moleküle wichtige Nukleinsäure- und Proteinmoleküle irreversibel schädigen [33]. Wenn sie in normalen Mengen vorhanden sind, können sie die viel größere Menge an ROS nicht bewältigen, die entsteht, wenn die oxidative Phosphorylierung durch mitochondrienspezifische Medikamente wie Rotenon, das die Einspeisung von NADH in die Atmungskette blockiert, oder durch 30-30'-Diindolyl-Methan (DIM), den aktiven Bestandteil des seit langem bekannten chemopräventiven *Brassica*-Gemüses, das den mitochondrialen F1F0-ATP-Synthese-Komplex hemmt, inhibiert wird [34]. Die noch verbleibenden ROS-Moleküle lösen durch die Oxidation intra-mitochondrialer Ziele die apoptotische Beseitigung der durch übermäßigen oxidativen Stress geschädigten Zellen aus. DIM wird bereits als adjuvante Therapie bei rezidivierender respiratorischer Papillomatose beim Menschen eingesetzt. Der oder die molekularen Mechanismen, durch die ROS die Apoptose auslösen, müssen noch gefunden werden - hoffentlich bald. Es würde uns überraschen, wenn sie nicht irgendwie direkt oxidieren und so eines oder mehrere der BAX-ähnlichen Proteine aktivieren, die an der p53-vermittelten Apoptose beteiligt sind.

Dass ROS selbst Apoptose vermitteln können, wurde vor kurzem überzeugend durch die Feststellung belegt, dass das „First-in-Class“-Mitochondrienmedikament Elesclomol (das von Synta Pharmaceuticals durch Screening nach anti-apoptotischen Wirkstoffen entdeckt wurde) Krebszellen durch Förderung der ROS-Bildung tötet [35]. Wenn diese entstehenden ROS-Moleküle durch die gleichzeitige Verabreichung des antioxidativen Moleküls N-Acetylcystein zerstört werden, wird die bevorzugte Abtötung der Krebszellen beendet. Die Tatsache, dass Elesclomol in Nicht-Krebszellen keine Apoptose auslöst, ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die von der normalen mitochondrialen Elektronentransportmaschinerie erzeugten ROS-Werte von Natur aus niedriger sind.

16. Reaktive Sauerstoffspezies können einen Großteil der Apoptose direkt auslösen

Die Tatsache, dass Elesclomol die Apoptose durch ROS-Erzeugung fördert, wirft die Frage auf, ob ein Großteil des programmierten Zelltods, der durch Krebstherapien verursacht wird, ebenfalls ROS-induziert ist. Lange Zeit war es rätselhaft, warum der hochgradig sauerstoffempfindliche „Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktor“ HIF1 α sowohl durch die, wie man bisher dachte, sehr unterschiedlich wirkenden „Mikrotubuli-bindenden“ Anti-Krebs-Taxane wie Paclitaxel und die Anti-Krebs-DNA-interkalierenden Topoisomerasen wie Topotecan oder Doxorubicin als auch durch Frame-shifting-Mutagen wie Acriflavin inaktiviert wird [36,37]. All diese scheinbar unzusammenhängenden Fakten ergeben schließlich einen Sinn, wenn man postuliert, dass nicht nur ionisierende Strahlung Apoptose durch ROS erzeugt, sondern auch die heute wirksamsten Chemotherapeutika gegen Krebs sowie die effizientesten rahmenverschiebenden Mutagen Apoptose durch die Erzeugung von ROS induzieren [38-40]. Dass das Taxan Paclitaxel durch seine Bindung an die DNA ROS erzeugt, wurde aus Experimenten bekannt, die zeigten, dass seine relative Wirksamkeit gegen Krebszelllinien mit sehr unterschiedlicher Empfindlichkeit umgekehrt mit ihrer jeweiligen antioxidativen Kapazität korreliert ist [41,42]. Ein gemeinsamer ROS-vermittelter Weg, über den fast alle

Krebsmedikamente die Apoptose auslösen, erklärt, warum Krebsarten, die gegen Chemotherapeutika resistent sind, auch gegen ionisierende Strahlentherapie resistent werden.

Kürzlich wurde am Koch Cancer Center des MIT eine chemische Bibliothek mit 50 000 Bestandteilen ausgewertet, um Moleküle zu finden, die selektiv *K-RAS*-transformierte menschliche Fibroblasten abtöten, und dabei wurde das Piperidin-Derivat Lanperison entdeckt [43]. Seine krebszellenabtötende Wirkung beruht auf der Erzeugung von ROS. Überraschenderweise löste dieses bereits klinisch verwendete Muskelrelaxans den nicht-apoptotischen Zelltod unabhängig von p53 (p53 versus p21) aus. Wurde Lanperison in Gegenwart der ROS-zerstörenden antioxidativen Scavenger-Moleküle Deferoxamin, butyliertes Hydroxylamin oder des Antioxidans Trolox verabreicht, wurde keine Aktivität beobachtet.

17. Blockierung der durch reaktive Sauerstoffspezies ausgelösten Apoptose durch Antioxidantien

Obwohl wir wissen, dass ROS durch ihre Apoptose-induzierende Rolle eine positive Kraft für das Leben darstellen, haben wir sie lange Zeit wegen ihrer Fähigkeit gefürchtet, wichtige Proteine und Nukleinsäuremoleküle irreversibel zu schädigen. Wenn sie also nicht gebraucht werden, werden sie ständig durch antioxidative Proteine wie Glutathion, Superoxiddismutase, Katalase und Thioredoxin neutralisiert. Der Transkriptionsfaktor Nrf2, der die Synthese dieser und vieler weiterer kleinerer Antioxidantien steuert, entstand wahrscheinlich kurz nach dem Beginn des Lebens, wie wir es kennen. Vor allem aber hat das Labor von David Tuveson bei Cancer Research UK in Cambridge kürzlich gezeigt, dass die Nrf2-Synthese durch die das Zellwachstum und die Zellteilung fördernden Onkogene *RAS*, *RAF* und *MYC* irgendwie hochreguliert wird [44]. Bio-logisch gesehen macht dies Sinn, denn wir wollen, dass Antioxidantien vorhanden sind, wenn die DNA so funktioniert, dass sie mehr von sich selbst produziert.

Die Tatsache, dass Krebszellen, die größtenteils durch *RAS* und *Myc* angetrieben werden, zu den am schwierigsten zu behandelnden gehören, könnte daher oft auf ihren hohen Gehalt an ROS-zerstörenden Antioxidantien zurückzuführen sein. Ob ihr hoher Gehalt an Antioxidantien die effektive Unheilbarkeit von Bauchspeicheldrüsenkrebs vollständig erklärt, muss noch gezeigt werden. Die Tatsache, dass Krebserkrankungen im Spätstadium häufig multiple Kopien der Onkogene *RAS* und *MYC* aufweisen, deutet stark darauf hin, dass ihre allgemeine Unheilbarkeit mehr als nur gelegentlich auf hohe Antioxidantienpiegel zurückzuführen ist. Es ist zweifellos wichtig zu erfahren, welche anderen Moleküle existieren, die die Nrf2-Expression anregen. Während des Lebenszyklus der Hefe und wahrscheinlich auch der meisten anderen Organismen ist die oxidative Phosphorylierung zeitlich deutlich von der DNA-Synthese getrennt. Ob die Nrf2-Konzentration auch während des Zellzyklus auf- und absteigt, muss bald bekannt sein.

18. Verstärkung der apoptotischen Abtötung durch bereits existierende Medikamente, die den Gehalt an Antioxidantien senken

Es gibt bereits Experimente mit blutbildenden Zellen, in denen gezeigt wurde, dass die krebszellabtötende Wirkung des ROS-Generators Arsenitrioxid (As_2O_3) umgekehrt mit dem Gehalt des wichtigsten zellulären Antioxidans Glutathion korreliert [45]. As_2O_3 schwächt auch die Reduktionskraft von Thioredoxin, das für mehrere wichtige Schritte im Zellstoffwechsel erforderlich ist. Seine Fähigkeit, sowohl Thioredoxin als auch Glutathion zu hemmen, erweitert sein Potenzial für einen erfolgreichen Einsatz gegen viele wichtige Krebsarten über die promyeloblastische Leukämie hinaus. Ebenfalls in der Lage, die zytotoxische Wirkung von As_2O_3 zu verstärken, ist Ascorbinsäure, die

zwar für ihre antioxidative Rolle in den Zellen bekannt ist, jedoch in ihre oxidierende Form Dehydroascorbinsäure umgewandelt wird. Leider gibt es bisher noch keine klinisch wirksamen Methoden zur Senkung des Glutathionspiegels. Die Senkung des Glutathionspiegels durch den Einsatz des Medikaments Buthioninsulfazin, das die Synthese von Glutathion blockiert, führt schnell zu einer Hochregulierung des Transkriptionsfaktors Nrf2, der wiederum die Glutathionsynthese hochreguliert [46]. Eine allgemeinere Methode zur Senkung des Antioxidantienpiegels ist der Einsatz von Motexafin-Gadolinium, einem Mitglied einer Klasse von Porphyrinmolekülen, die Texaphyrine genannt werden. Durch einen Prozess, der als vergebliches Redox-Recycling bezeichnet wird, überträgt es Wasserstoff aus Antioxidantien, um ROS zu erzeugen. Leider haben klinische Versuche zur Verbesserung der Chemo- und Strahlentherapie bisher nur eine bescheidene Lebensverlängerung, aber keine Heilung gezeigt.

Durch die Suche nach Verbindungen, die vorzugsweise die Apoptose in Krebszellen im Gegensatz zu normalen Zellen auslösen, wurde das Naturprodukt Piperlongumin aus der Pflanze *Piper longum* kürzlich als potenzielles Krebsmedikament entdeckt [47]. Besonders interessant ist, dass es seine Wirkung über die Bindung an die aktiven Stellen mehrerer wichtiger zellulärer Antioxidantien (z. B. Glutathion-S-Transferase und Carbonyl-Reduktase 1) vermittelt, von denen bekannt ist, dass sie an den zellulären Reaktionen auf ROS-induzierten oxidativen Stress beteiligt sind. Die Tatsache, dass Piperlongumin die ROS-Konzentrationen in nicht-krebsartigen Zellen nicht erhöht, ist wahrscheinlich auf die geringeren Konzentrationen dieser Antioxidantien zurückzuführen, die wiederum auf eine geringere Aktivierung des Nrf2-Transkriptionsfaktors zurückzuführen sind.

19. Anti-angiogene Medikamente wirken nur in Verbindung mit Generatoren reaktiver Sauerstoffspezies

Das ungiftige Anti-Angiogenese-Protein Endostatin (das in den späten 1990er Jahren im Labor von Judah Folkman in Boston entdeckt und gefördert und nun von Yongzhang Luo in Peking wiederbelebt wurde) zeigt nur dann eine krebshemmende Wirkung, wenn es zusammen mit herkömmlichen Chemotherapeutika eingesetzt wird. Diese Tatsache, die mir lange Rätsel aufgab, könnte darauf zurückzuführen sein, dass die chemotherapeutische Komponente die für die Abtötung der Krebszellen erforderlichen ROS liefert [48]. Die aus der Endostatin-Wirkung resultierende Hypoxie allein reicht möglicherweise nicht aus, um die Krebszellen abzutöten. Eine ähnliche Erklärung könnte erklären, warum das Avastin von Genentech ebenfalls nur in Kombination mit einer Chemotherapie wirkt. Im Gegensatz dazu funktioniert die Abtötung mutierter *BRAF*-Melanomzellen durch Zelboraf sehr gut, ohne dass es eine offensichtliche direkte Quelle für ROS gibt. Es ist denkbar, dass der Stoffwechselstress, der sich aus der Ausschaltung der *RAS*-*ERK*-Signalwege ergibt, die Nrf2-Signalwege irgendwie ausschaltet, so dass die ROS auf das Niveau ansteigen, das für die Abtötung der durch das Medikament geschwächten Melanomzellen erforderlich ist.

20. Geringere Mengen reaktiver Sauerstoffspezies in Stammzellen spiegeln einen höheren Gehalt an Antioxidantien wider

Seit mehr als einem Jahrzehnt gibt es Beweise dafür, dass normale Stammzellen niedrigere ROS-Werte aufweisen als ihre differenzierten Nachkommen, die zu lange ignoriert wurden. Erst vor einem Jahr haben noch überzeugendere Experimente gezeigt, dass Brustkrebstammzellen ebenfalls niedrigere ROS-Werte aufweisen als ihre krebsartigen epithelialen Vorläuferzellen [49]. Alle Stammzellen, ob normal oder krebsartig, weisen wahrscheinlich niedrigere ROS-Werte auf, weil sie entsprechend höhere Mengen an prominenten

antioxidativen Molekülen wie Glutathion und Thioredoxin aufweisen. Höchstwahrscheinlich haben sich diese erhöhten Mengen entwickelt, um die chromosomale RNA vor ROS-induzierten Schäden an der stärker exponierten Region der chromosomalen DNA zu schützen, wenn diese im Laufe des Zellzyklus Veränderungen in der Verdichtung erfährt. Ob alle sich teilenden Zellen einen höheren Gehalt an Antioxidantien aufweisen, muss noch geklärt werden. Wenn dies der Fall ist, sind alle Stammzellen von Natur aus viel widerstandsfähiger gegen die ROS-induzierte apoptotische Zerstörung als differenziertere, weniger antioxidantienreiche Nachkommenzellen.

21. Metformin zielt selektiv auf mesenchymale Krebsstammzellen ab (tötet sie)

Wir verfügen bereits über ein relativ ungiftiges, sehr gut getestetes Medikament, das bevorzugt mesenchymale Stammzellen abtötet. In einem noch immer viel zu wenig beachteten Artikel, der vor drei Jahren in der Zeitschrift *Cancer Research* veröffentlicht wurde, zeigte das Labor von Kevin Struhl von der Harvard Medical School erstmals, dass Metformin, ein Blocker der oxidativen Phosphorylierung der Stufe 2, selektiv auf Stammzellen wirkt. Wird es zusammen mit Chemotherapeutika eingesetzt, um das xenographische Tumorwachstum zu blockieren, führt es zu einer verlängerten Remission, wenn nicht sogar zu einer echten Heilung [50,51]. Wurde Metformin bei diesen Experimenten jedoch weggelassen, führte die anschließende Vermehrung nicht abtötbarer mesenchymaler Stammzellen dazu, dass diese Xenographien zu lebensbedrohlichen Formen heranwuchsen, was zeigt, dass die Chemotherapie allein die Stammzellen nicht abtötet. Die erhöhte Fähigkeit dieses am häufigsten verwendeten Antidiabetikums, mesenchymale Krebszellen im Spätstadium abzutöten, erklärt wahrscheinlich, warum Menschen, die es regelmäßig einnehmen, seltener an vielen Krebsarten erkranken.

Metformin wird derzeit einer Reihe von Chemotherapeutika zur Krebsbekämpfung zugesetzt, um festzustellen, ob es deren Wirksamkeit beim Menschen verstärkt. Die Tatsache, dass Metformin viel wirksamer gegen $p53^{-/-}$ -Zellen wirkt, deutet darauf hin, dass es bei Krebserkrankungen im Spätstadium, bei denen die große Mehrheit der Zellen beide $p53$ -Gene verloren hat, am wirksamsten sein könnte. Im Gegensatz dazu könnten die hochgradig chemo-radioempfindlichen Krebsarten im Frühstadium, auf die sich der Großteil der Entwicklung von Krebsmedikamenten konzentriert hat, sehr wohl eine geringe Wirksamkeit von Metformin aufweisen. Bis Ende 2013 sollten wir wissen, ob Metformin die derzeit verwendeten Therapien radikal verbessert. Die Entwicklung neuer Medikamente sollte gezielt darauf ausgerichtet werden, über Metformin hinaus Wirkstoffe zu finden, die Stammzellen selektiv abtöten. Und es sollte noch aktiver nach dem Grund gesucht werden, warum Metformin bevorzugt $p53^{-/-}$ -Stammzellen abtötet.

22. Antioxidative Nahrungsergänzungsmittel, die freie Radikale zerstören, haben möglicherweise mehr Krebserkrankungen verursacht als sie verhindert haben

Seit ich mich mit dem Verständnis und der Heilung von Krebs beschäftige (ich habe im Herbst 1959 in Harvard einen Kurs über Krebs gelehrt), nehmen wohlmeinende Menschen antioxidative Nahrungsergänzungsmittel zur Krebsvorbeugung, wenn nicht sogar zur Therapie ein. Der frühere prominenteste wissenschaftliche Befürworter ihres Wertes war der große Caltech-Chemiker Linus Pauling, der gegen Ende seiner glänzenden Karriere zusammen mit Ewan Cameron 1979 ein Buch mit dem Titel *Cancer and Vitamin C* (Krebs und Vitamin C) über das große Potenzial von Vitamin C als Anti-Krebs-Mittel schrieb [52].

Als er 1994 im Alter von 93 Jahren an Prostatakrebs starb, nahm Linus täglich 12 g Vitamin C zu sich. Angesichts der jüngsten Daten, die stark darauf hindeuten, dass ein Großteil der Unbehandelbarkeit von Krebs im Spätstadium auf den Besitz von zu vielen Antioxidantien zurückzuführen ist, ist es an der Zeit, sich ernsthaft zu fragen, ob die Einnahme von Antioxidantien Krebs eher verursacht als verhindert.

Alles in allem haben die mittlerweile zahlreichen Studien zur Ernährungsintervention mit den Antioxidantien β -Carotin, Vitamin A, Vitamin C, Vitamin E und Selen keine offensichtliche Wirksamkeit bei der Prävention von Magen-Darm-Krebs oder bei der Verlängerung der Sterblichkeit gezeigt [53]. Vielmehr scheinen sie das Leben derjenigen, die sie einnehmen, leicht zu verkürzen. Zukünftige Daten könnten in der Tat zeigen, dass die Einnahme von Antioxidantien, insbesondere von Vitamin E, zu einer kleinen Anzahl von Krebserkrankungen führt, die ohne die Einnahme von Antioxidantien nicht aufgetreten wären. Blaubeeren werden am besten gegessen, weil sie gut schmecken, nicht weil ihr Verzehr zu weniger Krebs führt.

23. Ein viel schnellerer Zeitplan für die Entwicklung von Medikamenten gegen Metastasen

Die Welt der Physik wusste schon vor 20 Jahren, dass sie keine andere Wahl hatte, als das Higgs-Boson ganz groß zu suchen. Zur großen Erleichterung der zivilisierten Welt haben sie es nun endlich. Auch die Biologie und die Medizin müssen sich jetzt wieder große Ziele setzen - wie 1988, als wir der Welt zum ersten Mal versprochen, dass sich das noch zu entdeckende menschliche Genom später als unentbehrlich für die Heilung der meisten Krebserkrankungen erweisen würde, und deshalb große Ziele anstreben. Wenn wir jedoch weiterhin mit der heutigen, niemals hektischen, größtenteils fünftägigen Arbeitswoche vorankommen, wird der niemals zurücktretende 10-20 Jahre entfernte Endsieg, den unsere Krebswelt jetzt sicher zu prognostizieren glaubt, weiterhin die Mägen der informierten Krebsopfer und ihrer Familien belasten. Die Tatsache, dass wir derzeit keinen einflussreichen, geschweige denn mächtigen General, sagen wir einen Eisenhower oder noch besser einen Patton, haben, der den Krieg unseres Landes gegen den Krebs führt, sagt alles. Wir brauchen bald eine Führungspersonlichkeit, die unsere Welt der Entwicklung von Krebsmedikamenten jeden Tag und die ganze Nacht hindurch arbeiten lässt.

Die jetzt viel gepriesenen genom-basierten persönlichen Krebstherapien könnten sich als weitaus weniger wichtige Instrumente für die zukünftige Medizin erweisen, als die heutigen Zeitungen uns hoffen lassen [54]. Die Gelder des Nationalen Krebsinstituts (NCI) wären besser eingesetzt, wenn mehr staatliche Gelder für die Entwicklung innovativer, anti-metastatischer Medikamente an geeignete, qualitativ hochwertige akademische Einrichtungen fließen würden, als die großen Summen, die derzeit für die Erprobung von Medikamenten ausgegeben werden, bei denen wir kaum Hoffnung auf einen echten Durchbruch haben. Das größte Hindernis auf dem Weg zu einem echten *Kampf gegen den Krebs* könnte in der Tat in der konservativen Natur der heutigen Krebsforschungseinrichtungen liegen. Sie sind immer noch zu sehr darauf fixiert, mit Medikamentencocktails voranzukommen, die sich gegen die wachstumsfördernden Moleküle (wie HER2, RAS, RAF, MEK, ERK, PI3K, AKT und mTOR) der Signaltransduktionswege richten und nicht gegen Myc-Moleküle, die den Zellzyklus spezifisch fördern.

Am dringendsten benötigt werden jetzt viele neue Anti-Myc-Medikamente, die über die aufregenden neuen BRD4-Inhibitoren wie JQ1 hinausgehen, sowie mehrere Medikamente, die die antioxidativen Moleküle hemmen, die z. B. Bauchspeicheldrüsenkrebs wahrscheinlich so unheilbar machen. Sie dürften die Wirksamkeit aller derzeitigen Radio- und Chemotherapieregime erheblich verbessern. So werden sie wahrscheinlich viele weitere heute unheilbare Krebsarten heilen. Es bleibt abzuwarten, wie sie als Cocktailpartner mit den neueren zielgerichteten Therapien, die nicht direkt ROS erzeugen,

zusammenwirken werden. Genauso wichtig könnte eine erweiterte Suche nach Medikamenten sein, die den Abbau von p53 verhindern.

24. Eine Milliarde Dollar sollte ausreichen, um alle verbleibenden Proteine zu identifizieren, die zur Heilung der meisten metastasierenden Krebsarten benötigt werden

Die Gesamtsumme, die für RNAi-Methoden benötigt wird, um die verbleibenden wichtigen molekularen Ziele für die künftige Entwicklung von Krebsmedikamenten aufzudecken, muss nicht mehr als 500-1000 Millionen Dollar betragen. Leider ist es unwahrscheinlich, dass das NCI noch ein weiteres großes wissenschaftliches Projekt in Angriff nehmen wird, wenn es so unter Druck steht, die derzeit finanzierten Krebsprogramme zu finanzieren. Das Projekt The Cancer Genome Atlas (TCGA) dominiert nach wie vor das Budget des NCI für Großforschungsprojekte, das naturgemäß nur Krebszelltreiber und keine Schwachstellen (synthetische Lethale) findet. Während ich anfangs dafür war, dass TCGA große Summen erhält, tue ich dies nun nicht mehr. Weitere 100 Millionen Dollar jährlich, die auf diese Weise ausgegeben werden, werden wahrscheinlich nicht die wirklich bahnbrechenden Medikamente hervorbringen, die wir jetzt so dringend brauchen.

Erfreulicherweise hat der erste RNAi-Ganzgenom-Großversuch, der von einem „Big Pharma“-Unternehmen unterstützt wird, gerade mit Pfizer in Zusammenarbeit mit dem Cold Spring Harbor Laboratory begonnen. Aber selbst wenn sich noch weitere, separat arbeitende Giganten anschließen, werden sie sich gemeinsam natürlich

auf die wichtigsten Krebsarten wie Brust, Dickdarm und Lunge konzentrieren. Ich bezweifle, dass sie in nächster Zeit groß gegen, sagen wir, Melanom oder Speiseröhrenkrebs vorgehen werden. Greg Hannon hier in Cold Spring Harbor wird wahrscheinlich der erste akademische Wissenschaftler sein, der sich mit den nicht-trivialen experimentellen Herausforderungen auseinandersetzt, die Ganzgenom-Screens mit 100 000 RNAi-Sonden bieten, und zwar sowohl durch seine Zusammenarbeit mit Pfizer als auch durch die Verwendung von Geldern, die von der in Long Island ansässigen Lustgarten Foundation für ein umfassendes Screening von Bauchspeicheldrüsenkrebs-Targets und von Hollywoods „Stand up against cancer“ für die Identifizierung von Brustkrebs-Targets bereitgestellt wurden. Obwohl unser Enthusiasmus für große RNAi-Screens bei weitem nicht von allen geteilt wird, sollte Geldmangel uns nicht davon abhalten, bald zu sehen, ob die Ganz-Genom-Methoden die viel gepriesenen Erwartungen erfüllen [55]. Das Cold Spring Harbor Laboratory verfügt glücklicherweise über die Mittel, um voranzukommen, als befände es sich in einem echten Krieg.

Weitere finanzielle Unterstützung, die es vielen weiteren auf Krebs spezialisierten akademischen Einrichtungen ermöglichen würde, mit der Entdeckung von RNAi-basierten Zielmolekülen große Erfolge zu erzielen und sie in die frühen Stadien der anschließenden Arzneimittelentdeckung voranzutreiben, liegt nicht jenseits der Macht der großen staatlichen Forschungsförderungseinrichtungen oder der vielen, vielen Supermilliardäre dieser Welt. Der Hauptfaktor, der uns davon abhält, die meisten metastasierenden Krebsarten in den nächsten zehn Jahren zu besiegen, könnte bald nicht mehr der Mangel an Wissen sein, sondern das zunehmende Versagen unserer Welt, ihre „monetäre Macht“ auf intelligente Weise in Richtungen zu lenken, die für die Menschen und die Gesellschaft von Nutzen sind.

AUTORENPROFIL



Jim Watson's (JDWs) Interesse an Krebs äußerte sich zum ersten Mal öffentlich durch seine Lehrtätigkeit über Tumorzellen, nachdem er im Herbst 1956 an die biologische Fakultät der Harvard-Universität gekommen war. Später, im Rahmen der neuen Vorlesung Introductory Biology II, befasste er sich in seiner letzten von zehn Vorlesungen mit der Frage, wie Krebs durch DNA-Tumorzellen ausgelöst werden könnte, von denen die kleinsten wahrscheinlich nur über eine DNA verfügen, die für 3-5 Proteine kodiert. In seinem Lehrbuch „*The Molecular Biology of the Gene*“ aus dem Jahr 1965 wurde im letzten Kapitel („A geneticist's view of cancer“) die Frage aufgeworfen, wie ein Virus in der Lage sein könnte, den Zellzyklus in Gang zu setzen. Als er 1968 Direktor des Cold Spring Harbor Laboratory wurde, verlagerte er den Forschungsschwerpunkt von der mikrobiellen Genetik auf die

Krebsforschung (indem er Joe Sambrook aus dem Labor von Renato Dulbecco am Salk Institute einstellte). Zu den wichtigsten eukaryotischen Errungenschaften des Cold Spring Harbor Laboratory gehörte 1977 die gemeinsame Entdeckung des RNA-Spleißens durch Richard Roberts und Phil Sharp (MIT). JDW widmete dann notwendigerweise einen Großteil seiner Zeit der Wissenschaftspolitik, zum einen, um die Akzeptanz der National Institutes of Health (NIH) für die Sicherheit rekombinanter DNA-Verfahren zu erreichen (1973-1978), und zum anderen, um für die Rolle der NIH im Humangenomprojekt zu argumentieren und diese dann zu leiten (1986-1992). Im Jahr 2008 verlagerte sich JDWs Hauptinteresse auf die Heilung von Krebs und konzentrierte sich dabei auf die Biochemie von Krebszellen im Gegensatz zu deren genetischen Ursprüngen.

Referenzen

- McLaughlin L. 1975 *War-on-cancer is called 'sham', 'wishful thinking' by Nobel winner*. Boston Herald American, March 7.
- Jones S, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. 2008 Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* **321**, 1801. (doi:10.1126/science.1164368)
- Lemmon MA, Schlessinger J. 2010 Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117–1134. (doi:10.1016/j.cell.2010.06.011)
- Zeng Q *et al.* 2012 CD146, an epithelial-mesenchymal transition inducer, is associated with triple-negative breast cancer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 1127–1132. (doi:10.1073/pnas.1111053108)
- Nusse R, Varmus H. 2013 *Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed*. Wnt Signaling 1–23. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Wu Z-Q, Li X-Y, Hu CY, Ford M, Kleer CG, Weiss SJ. 2012 Canonical Wnt signaling regulates Slug activity and links epithelial-mesenchymal transition with epigenetic breast cancer 1, early onset (BRCA1) repression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 16 654–16 659. (doi:10.1073/pnas.1205822109)
- Tamm I, Krueger JG. 1994 Cell-adhesion-disrupting action of interleukin 6 in human ductal breast carcinoma cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 3329–3333. (doi:10.1073/pnas.91.8.3329)
- Grivnenkov S, Karin M. 2008 Autocrine IL-6 signaling: a key event in tumorigenesis? *Cancer Cell* **13**, 7–9. (doi:10.1016/j.ccr.2007.12.020)
- Rothwell PM *et al.* 2012 Short-term effects of daily aspirin on cancer incidence, mortality, and non-vascular death: analysis of the time course of risks and benefits in 51 randomised controlled trials. *Lancet* **379**, 1602–1612. (doi:10.1016/S0140-6736(11)61720-0)

10. Nie Z *et al.* 2012 c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. *Cell* **151**, 68–79. (doi:10.1016/j.cell.2012.08.033)
11. Lin CY, Lovén J, Rahl RB, Paranal RM, Burge CB, Bradner JE, Lee TI, Young RA. 2012 Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *Cell* **151**, 56–67. (doi:10.1016/j.cell.2012.08.026)
12. Soucek L *et al.* 2008 Modelling Myc inhibition as a cancer therapy. *Nature* **455**, 679–683. (doi:10.1038/nature07260)
13. Filippakopoulos P *et al.* 2010 Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* **468**, 1067–1073. (doi:10.1038/nature09504)
14. Zuber J, Vakoc C. 2011 RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. *Nature* **478**, 524–528. (doi:10.1038/nature10334)
15. Aceto N *et al.* 2012 Tyrosine phosphatase SHP2 promotes breast cancer progression and maintains tumor-initiating cells via activation of key transcription factors and a positive feedback signaling loop. *Nat. Med.* **18**, 529–537. (doi:10.1038/nm.2645)
16. Silva JM *et al.* 2005 Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nat. Genet.* **37**, 1281–1288. (doi:10.1038/ng1650)
17. Shi J, Wang E, Zuber J, Rappaport A, Taylor M, Johns C, Lowe SW, Vakoc CR. In press. The polycomb complex PRC2 supports aberrant self-renewal in a mouse model of MLL-AF9; Nras (G12D) acute myeloid leukemia. *Oncogene* (doi:10.1038/onc.2012.110)
18. Delmore JE *et al.* 2011 BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* **146**, 904–917. (doi:10.1016/j.cell.2011.08.017)
19. Matzuk MM *et al.* 2012 Small-molecule inhibition of BRDT for male contraception. *Cell* **150**, 673–684. (doi:10.1016/j.cell.2012.06.045)
20. Toyoshima M *et al.* 2012 Functional genomics identifies therapeutic targets for MYC-driven cancer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 9545–9550. (doi:10.1073/pnas.1121119109)
21. Yang WS, Stockwell BR. 2008 Inhibition of casein kinase I-epsilon induces cancer-cell-selective, PERIOD2-dependent growth arrest. *Genome Biol.* **9**, R92. (doi:10.1186/gb-2008-9-6-r92)
22. Kessler JD *et al.* 2012 A SUMOylation-dependent transcriptional subprogram is required for Myc-driven tumorigenesis. *Science* **335**, 348–353. (doi:10.1126/science.1212728)
23. Goga A, Yang D, Tward AD, Morgan DO, Bishop JM. 2007 Inhibition of CDK1 as a potential therapy for tumors over-expressing MYC. *Nat. Med.* **13**, 820–827. (doi:10.1038/nm1606)
24. Ko YH, Smith BL, Wang Y, Pomper MG, Rini DA, Torbenson MS, Hullihen J, Pedersen PL. 2004 Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**, 269–275. (doi:10.1016/j.bbrc.2004.09.047)
25. Kim JS, Ahn KJ, Kim J-A, Kim HM, Lee JD, Lee JM, Kim SJ, Park JH. 2008 Role of reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysregulation in 3-bromopyruvate induced cell death in hepatoma cells. *J. Bioenerg. Biomembr.* **40**, 607–618. (doi:10.1007/s10863-008-9188-0)
26. Cheng G, Zielonka J, Dranka BP, McAllister D, Mackinnon AC, Joseph J, Kalyanaraman B. 2012 Mitochondria-targeted drugs synergize with 2-deoxyglucose to trigger breast cancer cell death. *Cancer Res.* **72**, 2634–2643. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3928)
27. Jones RG, Thompson CB. 2009 Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev.* **23**, 537–548. (doi:10.1101/gad.1756509)
28. Gembarska A *et al.* 2012 MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. *Nat. Med.* **18**, 1239–1247. (doi:10.1038/nm.2863)
29. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. 1997 A model for p53-induced apoptosis. *Nature* **389**, 300–305. (doi:10.1038/38525)
30. Wang H, Luo K, Tan L-Z, Ren B-G, Gu L-Q, Michalopoulos G, Luo J-H, Yu YP. 2012 p53-induced gene 3 mediates cell death induced by glutathione peroxidase 3. *J. Biol. Chem.* **287**, 16 890–16 902. (doi:10.1074/jbc.M111.322636)
31. Kotsinas A, Aggarwal V, Tan E-J, Levy B, Gorgoulis VG. 2011 PIG3: a novel link between oxidative stress and DNA damage response in cancer. *Cancer Lett.* **327**, 97–102. (doi:10.1016/j.canlet.2011.12.009)
32. Green DR. 2011 *Means to an end: apoptosis and other cell death mechanisms*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
33. Liu B, Chen Y, St Clair DK. 2008 ROS and p53: versatile partnership. *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 1529–1535. (doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.011)
34. Wondrak GT. 2009 Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 3013–3069. (doi:10.1089/ars.2009.2541)
35. Kirshner JR, He S, Balasubramanyam V, Kepros J, Yang C-Y, Zhang M, Du Z, Barsoum J, Bertin J. 2008 Elesclomol induces cancer cell apoptosis through oxidative stress. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 2319–2327. (doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0298)
36. Semenza GL. 2007 Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Drug Discov. Today* **12**, 853–859. (doi:10.1016/j.drudis.2007.08.006)
37. Lee K, Zhang H, Qian DZ, Rey S, Liu JO, Semenza GL. 2009 Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 17 910–17 915. (doi:10.1073/pnas.0909353106)
38. Engel RH, Evens AM. 2006 Oxidative stress and apoptosis: a new treatment paradigm in cancer. *Front. Biosci.* **11**, 300–312. (doi:10.2741/1798)
39. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. 2009 Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 579–591. (doi:10.1038/nrd2803)
40. Wang J, Yi J. 2008 Cancer cell killing via ROS. *Cancer Biol. Ther.* **7**, 1875–1884. (doi:10.4161/cbt.7.12.7067)
41. Ramanathan B, Jan K-Y, Chen C-H, Hour T-C, Yu H-J, Pu Y-S. 2005 Resistance to paclitaxel is proportional to cellular total antioxidant capacity. *Cancer Res.* **65**, 8455–8460. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1162)
42. Alexandre J, Batteux F, Nicco C, Chéreau C, Laurent A, Guillemin L, Weill B, Goldwasser F. 2006 Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Cancer* **119**, 41–58. (doi:10.1002/ijc.21685)
43. Shaw AT *et al.* 2011 Selective killing of K-ras mutant cancer cells by small molecule inducers of oxidative stress. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 8773–8778. (doi:10.1073/pnas.1105941108)
44. DeNicola GM *et al.* 2011 Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* **475**, 106–109. (doi:10.1038/nature10189)
45. Lu J, Chew EH, Holgren A. 2007 Targeting thioredoxin reductase is a basis for cancer therapy by arsenic trioxide. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 12 288–12 293. (doi:10.1073/pnas.0701549104)
46. Lee HR, Cho J-M, Shin D, Yong CS, Choi H-G, Wakabayashi N, Kwak MK. 2008 Adaptive response to GSH depletion and resistance to L-buthionine-(S,R)-sulfoximine: involvement of Nrf2 activation. *Mol. Cell Biochem.* **318**, 23–31. (doi:10.1007/s11010-008-9853-y)
47. Raj L *et al.* 2011 Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. *Nature* **475**, 231–234. (doi:10.1038/nature10167)
48. Fu Y, Luo Y. 2010 The N-terminal integrity is critical for the stability and biological functions of endostatin. *Biochemistry* **49**, 6420–6429. (doi:10.1021/bi100489x)
49. Diehn M *et al.* 2009 Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* **458**, 780–783. (doi:10.1038/nature07733)
50. Hirsch HA, Iliopoulos D, Tschlis PN, Struhl K. 2009 Metformin selectively targets cancer stem cells and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. *Cancer Res.* **69**, 7507–7511. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2994)
51. Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. 2011 Metformin decreases the dose of chemotherapy for prolonging tumor remission in mouse xenografts involving multiple cancer cell types. *Cancer Res.* **71**, 3196–3200. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3471)
52. Cameron E, Pauling LC. 1979 *Cancer and vitamin C*. Philadelphia, PA: Camino Books.
53. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud L, Simonetti R, Gluud C. 2007 Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention. *JAMA* **297**, 842–857. (doi:10.1001/jama.297.8.842)
54. Kolata G. 2012 *A treatment's tantalizing promise: heartbreaking ups and downs in fighting a rare cancer*. The New York Times, 9 July 2012.
55. Kaelin WG. 2012 Use and abuse of RNAi to study mammalian gene function. *Science* **337**, 421–422. (doi:10.1126/science.1225787)