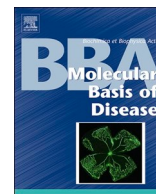




Inhaltsverzeichnisse verfügbar bei ScienceDirect

BBA - Molekulare Grundlagen von Krankheiten

Homepage der Zeitschrift www.elsevier.com/locate/bbadis

Überprüfung

Otto Warburg: Der Weg zur bahnbrechenden Entdeckung der bioenergetischen Reprogrammierung von Tumorzellen



Ana M. Urbano*

Forschungs- und Entwicklungsabteilung für molekulare Physik und Chemie, Zentrum für Umwelt-, Genetik- und Onkobiologieuntersuchungen (CIMAGO), Fakultät für Biowissenschaften, Universität Coimbra, Coimbra, Portugal

ARTICLE INFO

Schlüsselwörter:

Metabolische
Reprogrammierung
Onkometabolismus
Historische Perspektive
Frühe Forschungslaufbahn
Warburg-Effekt
Aerobe Glykolyse

ABSTRACT

Metabolische Umprogrammierung gilt heute als ein Kennzeichen von Krebs. Dieses Phänomen wurde erstmals auf Ebene der zellulären Energetik beobachtet, und zwar in Form von sehr hohen Milchsäuregärungsraten, nicht nur in Anoxie, sondern auch in Gegenwart von Sauerstoff, der die Atmung nicht beeinträchtigt. Dieser faszinierende Tumorphänotyp, der sich durch eine sehr geringe Energieausbeute auszeichnet, wurde in den frühen 1920er Jahren von Otto Warburg, einem der größten Biochemiker aller Zeiten, entdeckt. Dieses Manuskript skizziert Aspekte von Warburgs persönlichem und Forschungsleben, die im Nachhinein als Vorbereitung für seine erfolgreiche Herangehensweise an das Krebsproblem betrachtet werden können. Außerdem werden die Experimente erörtert, die zu seiner Entdeckung führten, und Warburgs Theorie zur Entstehung von Tumoren wird kurz vorgestellt. Abschließend werden Überlegungen zu den neuen Wegen angestellt, die diese monumentale und immer noch faszinierende Entdeckung im Hinblick auf die Diagnose und Behandlung von Krebs eröffnet hat.

Hinweis zu den Quellen

Die biographischen Notizen wurden größtenteils aus einer von Hans Krebs [1] verfassten Biographie über Otto Warburg übernommen. Diese Biografie ist eine Erweiterung des Nachrufs auf Warburg, den Krebs für die Royal Society of London [2] verfasst hatte. Krebs arbeitete von Januar 1926 bis März 1930 als Assistent in Warburgs Laboratorium, und die beiden pflegten eine Freundschaft und standen bis zu Warburgs Tod am 1. August 1970 in regelmäßigem Kontakt. Krebs bewunderte Warburgs "durchdringende Intelligenz und seine originelle und phantasievolle Herangehensweise an jede Situation" sowie Warburgs "Unabhängigkeit von gängigen Überzeugungen, Urteilen und Vorurteilen" [1] und räumte ein, dass er von ihm mehr gelernt habe als von jedem anderen Lehrer [3]. Bei seinen ersten Begegnungen mit Warburg erkannte Krebs sofort, dass er es mit einer einzigartigen Persönlichkeit zu tun hatte, was ihn dazu veranlasste, Notizen über "seine Lebensweise und einige seiner Aussprüche" [1] zu machen. Diese "Warburgiana", wie Krebs sie nannte, sollten sich beim Verfassen von Warburgs Biographie als unschätzbar erweisen. Eine weitere wichtige Quelle für biografische Informationen sowie für Informationen über Warburgs Forschungslaufbahn war eine von Frederick Holmes [4] verfasste Biografie über Krebs. An dieser Biographie hat Krebs selbst maßgeblich mitgewirkt, indem er eine große Anzahl seiner Labornotizbücher zur Verfügung gestellt hat und mit dem Holmes ausführliche Gespräche geführt hat. Ein Bericht aus erster Hand über Warburgs Einstellung zur wissenschaftlichen Forschung findet sich in einem autobiografischen Kapitel, das

den er 1964 für die *Annual Review of Biochemistry* schrieb [5]. Die Reden zur Annahme des Nobelpreises (Nobel Lectures) waren von unschätzbarem Wert für eine bessere Beurteilung des theoretischen Denkens der Preisträger und des vorläufigen Wissensstandes in ihren Forschungsgebieten.

Für den Abschnitt über Warburgs erste Arbeiten über den Stoffwechsel von Tumoren gab es zwei Hauptquellenarten. Zum einen die Original-Forschungsarbeiten, die in deutscher Sprache verfasst und in den Jahren 1923 und 1924 veröffentlicht wurden. Die meisten dieser Arbeiten finden sich auch in einem von Warburg 1926 herausgegebenen Sammelband mit dem Titel *Über den Stoffwechsel der Tumoren: Arbeiten aus dem Kaiser Wilhelm Institut für Biologie* [6]. Diese Zusammenstellung ist zumindest ins Englische und Französische übersetzt worden [7,8]. Die zweite Quelle ist ein in englischer Sprache verfasster und 1925 veröffentlichter Aufsatz, bei dem es sich um die Abschrift eines Vortrags handelt, den Warburg 1924 vor dem Rockefeller Institute hielt [9]. In diesem Vortrag fasste Warburg nicht nur seine frühen Erkenntnisse über den Stoffwechsel von Tumoren zusammen, sondern legte auch mit herausragender Klarheit die Gründe für seine Experimente und die Schlussfolgerungen dar, die er daraus zog.

1. Einführung

Der Onkometabolismus ist eine Teildisziplin der Krebsbiologie, die sich mit der Untersuchung der umfassenden metabolischen Umstrukturierung von Zellen befasst, die sich schrittweise zu einem neoplastischen Zustand entwickeln. Obwohl die Formalisierung als Forschungsgebiet relativ neu ist, lassen sich seine Ursprünge bis in die

*Fakultät für Biowissenschaften, Universität Coimbra, Calçada Martim de Freitas, 3000-456 Coimbra, Portugal.

: amurbano@uc.pt

In den 1920er Jahren machte Otto Warburg, einer der größten Biochemiker aller Zeiten, die verblüffende Entdeckung, dass Krebszellen einen veränderten Energiestoffwechsel aufweisen, der durch sehr hohe Milchsäurebildungsraten gekennzeichnet ist, und zwar sowohl in Anoxie als auch in Gegenwart von Sauerstoff, der die Atmung nicht beeinträchtigt.

Im Gegensatz zu anderen großen wissenschaftlichen Entdeckungen war Warburgs bahnbrechende Entdeckung des Energiestoffwechsels von Tumoren kein Zufall. Vielmehr war sie das Ergebnis jahrelanger methodischer und sorgfältiger Planung, die auch die Entwicklung optimaler Versuchsbedingungen für die Entschlüsselung der Geheimnisse des Krebses umfasste. Wie das Sprichwort sagt: Das Glück begünstigt die Vorbereiteten.

Der Ansatz, mit dem Warburg das Krebsproblem in Angriff nahm, war größtenteils originell, sowohl hinsichtlich der Fragen, die er stellte, als auch hinsichtlich der Methoden, die er unabhängig davon entwickelte, um sie anzugehen. Dennoch haben Warburgs Hintergrund, seine Ausbildung und seine frühe wissenschaftliche Laufbahn wahrscheinlich seinen Untersuchungsstil und die Wahl der Forschungslinien beeinflusst, was letztlich zur Entdeckung des metabolischen Phänotyps der Tumorzellen führte, der als Warburg-Effekt bekannt wurde. Der erste Teil dieses Manuskripts umreißt einige dieser Aspekte. Anschließend werden die wichtigsten Erkenntnisse über den veränderten Stoffwechselphänotyp zusammengefasst und Warburgs Theorie zur Entstehung von Tumorzellen kurz vorgestellt. Abschließend werden ausgewählte Fortschritte auf dem Gebiet des On- kometabolismus, insbesondere auf der Ebene der Diagnose und Behandlung von Krebs, kurz diskutiert. Es muss betont werden, dass es nicht Ziel dieses Manuskripts ist, Warburgs umfangreiche Arbeiten zum Onkometabolismus zu erörtern oder einen detaillierten Überblick über den aktuellen Wissensstand auf diesem Gebiet zu geben. Bevor wir zu den folgenden Abschnitten übergehen, müssen noch zwei letzte Anmerkungen gemacht werden. Die erste betrifft die außerordentlich große Zahl wichtiger Beiträge, die Warburg zu verschiedenen Bereichen der Biowissenschaften geleistet hat. Verständlicherweise werden nur die für Thema des vorliegenden Manuskripts relevantesten erwähnt, und auch das nur kurz, da eine ausführlichere Diskussion vom Hauptziel des Manuskripts ablenken würde. Eine Liste seiner wichtigsten Beiträge findet sich in [10]. Die zweite Anmerkung betrifft die Autorenschaft. Wie Krebs feststellt, war Warburg in jeder Hinsicht der Herr seines Labors. Diese Ansicht wird von Karl Thomas, Warburgs Jugendfreund und langjähriger Professor für Physiologische Chemie in Leipzig, bestätigt. In einem Offenen Glückwunschbrief an Warburg zu seinem 80. Geburtstag erklärte Thomas, dass in Warburgs Labor kein Experiment stattfand, von dem er nicht alle Einzelheiten kannte [1]. Daher in diesem Manuskript nur Warburgs Name erwähnt, wenn es um seine frühen Arbeiten über Krebs geht. Es muss jedoch eingeräumt werden, dass Warburg zwar einen großen Teil der experimentellen Arbeiten selbst durchführte, aber von Seigo Minami, Karl Posener und Erwin Negelein unterstützt wurde. Interessanterweise wurde eine Reihe von Veröffentlichungen aus Warburgs Laboratorium, nämlich die Referenz [11], ohne seinen Namen veröffentlicht, obwohl er die organisatorischen Ideen und die experimentellen Methoden geliefert sowie einige der Experimente durchgeführt hatte. Dies war auf Warburgs Großzügigkeit zurückzuführen, seinen Junioren Anerkennung zu zollen [1,4].

2. Hintergrund und Ausbildung

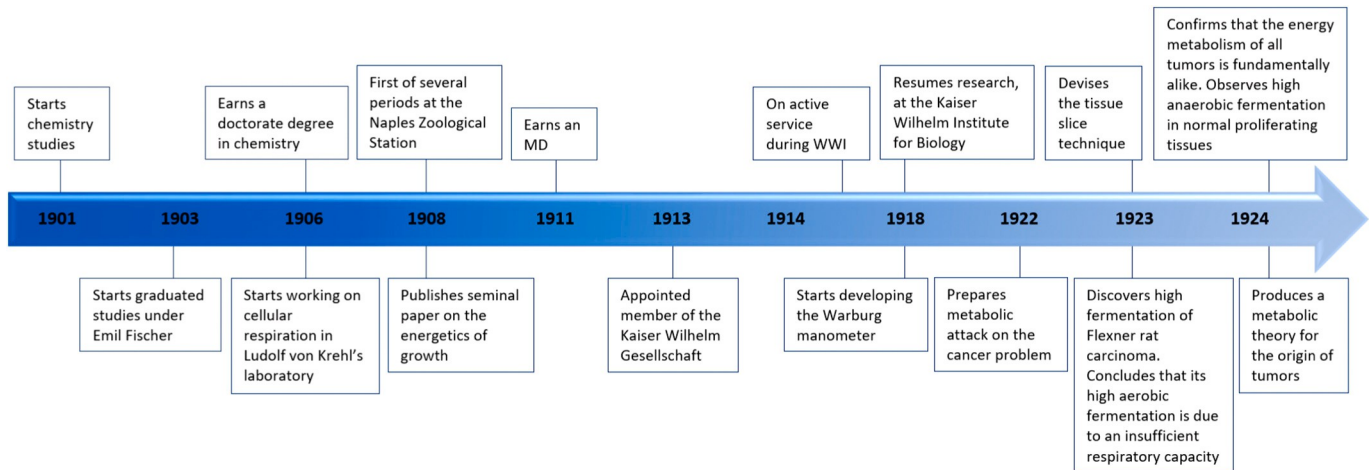
Warburg wurde am 8. Oktober 1883 in Freiburg im Breisgau, im damaligen Deutschen Reich, geboren und zog 1885, im Alter von 11 Jahren, mit seiner Familie nach Berlin (Zeitleiste). Sein Vater, Emil Warburg, war ein hoch angesehener Physikprofessor, der zu seinen häufigen Tischgästen zahlreiche führende Wissenschaftler seiner Zeit zählte, wie Jacobus Henricus van't Hoff, Walter Nernst und Emil Fischer, allesamt spätere Nobelpreisträger. Ein weiterer Hausgast war der Physiologe Theodor W. Engelmann, durch den Warburg zum ersten Mal mit der Photosynthese in Berührung kam, einer der Forschungsrichtungen, die er während seiner gesamten Karriere verfolgen sollte. Warburg war also von klein auf einem außergewöhnlich brillanten und intellektuell anregenden Umfeld ausgesetzt, das ihm wahrscheinlich die Bedeutung der exakten Wissenschaften für die Untersuchung biologischer Prozesse vermittelte. Wahrscheinlich weckte es in ihm auch den Ehrgeiz, einer der größten Wissenschaftler aller Zeiten zu werden, wie er offen zugab [1].

1901, vier Jahre nach Eduard Buchners eindeutigen Nachweis, dass die alkoholische Gärung in zellfreien Hefeextrakten stattfindet [12], trat Warburg in die Universität Freiburg ein, um Chemie zu studieren. Die Bestätigung, dass ein Lebensprozess außerhalb der lebenden Zelle kann, muss dazu beigetragen haben,

dass Warburg scharfsinnig erkannte, dass diese Prozesse aus physikalisch-chemischer Sicht, d.h. unter Berücksichtigung der physikalischen Gesetze der Thermodynamik, betrachtet werden müssen. Warburgs frühe Arbeit und sein theoretisches Denken wurden auch von Jacques Loeb tiefgreifend beeinflusst, der die künstliche Parthenogenese und die Natur der Befruchtung aus einer durch und durch physikalisch-chemischen und reduktionistischen Perspektive betrachtete [13]. Diese Sichtweise kommt in dem folgenden Auszug aus einer autobiografischen Tonbandaufzeichnung von 1966 deutlich zum Ausdruck: "Seit ich selbstständig zu arbeiten begann, war es mein Ziel und ist es auch heute noch,

herauszufinden, inwieweit sich die Vorgänge in lebenden Organismen physikalisch und chemisch auflösen lassen" [1]. Im Jahr 1903, ein Jahr nach der Verleihung des Nobelpreises für Chemie, wurde Emil Fischer, der führende organische Chemiker seiner Zeit, Warburgs . Fischers kreativer Geist und seine experimentelle Virtuosität ermöglichten es ihm, zentrale Forschungsprobleme anzugehen, über die nur sehr wenig bekannt war. Zu diesem Zweck konzipierte und perfektionierte er raffinierte Analyse- und Synthesemethoden, die häufig die Entwicklung neuartiger Reagenzien erforderten. Sein innovativer Ansatz zur Erforschung der chemischen Struktur von Kohlenhydraten, den er in den 1890er Jahren entwickelte und ausgiebig nutzte, beinhaltete deren Abbau und die anschließende Analyse der Abbauprodukte, aus denen sich ihre Struktur ableiten ließ. Zur Verifizierung versuchte er dann, das zu untersuchende Molekül *in vitro* aus seinen Abbauprodukten oder ähnlichen Substanzen zu synthetisieren. Eine verblüffende Beobachtung war, dass bei asymmetrischen Car- bohydraten die *In-vitro*-Synthese racemische Mischungen, . h. Mischungen ihrer geometrischen Isomere, ergab, während die biologische Synthese stereospezifisch war und nur eines der Isomere ergab. Überzeugt von der Beteiligung von Enzymen an den meisten chemischen Umwandlungen in der lebenden Zelle und nachdem er mit Hilfe von synthetischen Glucosiden gezeigt hatte, dass die Wirkung der Enzyme weitgehend von der Konfiguration der Substrate abhängt, führte Fischer die Stereospezifität der biologischen Synthesen zu Recht auf die sie katalysierenden Enzyme zurück und postulierte, dass Enzym und Substrat "wie Schloss und Schlüssel zusammenpassen müssen".

[14], eine Analogie, die sehr berühmt werden sollte. Fischer wird oft als "Vater der Kohlenhydratchemie" bezeichnet, da er wesentlich zu unserem Verständnis Natur der Zucker und ihres Stoffwechsels durch Hefen beigetragen hat. Als Warburg seine Doktorarbeit begann, hatte er sich jedoch bereits einem Thema zugewandt, das er selbst als schwieriger bezeichnete: der Chemie der Proteine [14]. Unter der Leitung von Fischer leistete Warburg Pionierarbeit bei der Synthese optisch aktiver Peptide [5]. Seine , die sich auch mit der enzymatischen Hydrolyse der oben genannten Peptide befasste, führte zu mehreren Veröffentlichungen (siehe Referenz [1] für eine Liste der wichtigsten Arbeiten Warburgs) und brachte ihm 1906 den Dokortitel in Chemie ein. Warburg bewunderte Fischers Mut, die großen ungelösten Probleme seiner Zeit anzupacken, sowie seine Integrität als Mensch und als Forscher. Schon bald würde er selbst wissenschaftliches Neuland betreten, unbeeindruckt vom Mangel an konzeptionellem Wissen in den jeweiligen Bereichen, und die gleichen hohen Standards wissenschaftlicher Strenge bei der Entwicklung von Instrumenten zu deren Erforschung und bei den Experimenten anwenden, die er und seine Mitarbeiter durchführten (einige der Abbrüche wurden Hunderte Male durchgeführt [9,11]). Warburgs außergewöhnliche theoretische und experimentelle Fähigkeiten lassen sich an der außerordentlich großen Zahl wichtiger Beiträge erkennen, die er zu verschiedenen Bereichen der Biowissenschaften leistete, sowie an den Werkzeugen und hochentwickelten Methoden, die er entwickelte und die oft komplexe mathematische Analysen der Messungen beinhalteten - als Krebs 1926 in Warburgs Laboratorium eintrat, hatte Warburg noch Mathematikunterricht [4]. Viele dieser innovativen Methoden, wie z. B. das *Warburg-Manometer* und die *Gewebeschnitttechnik* (siehe unten) sowie die spektrophotometrischen Methoden, die auf der ultravioletten Absorptionsbande von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid basieren, beherrschten das Feld für



Zeitleiste. Ausgewählte Ereignisse in Warburgs akademischem Leben und seiner frühen Forschungskarriere bis zu seiner bahnbrechenden Entdeckung des tumorspezifischen bioenergetischen Phänotyps, der heute als Warburg-Effekt bekannt ist.

und erwies sich als unschätzbar wertvoll für den Fortschritt der biochemischen und biomedizinischen Forschung. Die moderne Spektralphotometrie hat ihren Ursprung ebenfalls in Warburgs Labor, und zwar in den Jahren 1928-1929, als innovative Methode zur Untersuchung der Natur dessen, was Warburg als respiratorisches Ferment bezeichnete und inzwischen in Cytochromoxidase umbenannt hat [1].

3. Frühe Forschungsarbeiten

Schon während seines Chemiestudiums interessierte sich Warburg für die Prozesse des Lebens und erklärte offen, dass es sein ultimatives Forschungsziel sei, eine bedeutende Entdeckung auf dem Gebiet der Krebsforschung zu machen, idealerweise einen Weg zu finden, Krebs zu verhindern oder sogar zu heilen. So entschied er sich nach seiner Promotion in Chemie für ein Medizinstudium an der Universität Heidelberg, das er 1911 mit einem zweiten Dokortitel abschloss. Warburg verband sein Medizinstudium mit einer Forschungstätigkeit als Assistent im Labor von Albrecht Ludolf von Krehl, einem angesehenen Professor, der ein bahnbrechendes Lehrbuch über pathologische Physiologie verfasst hatte und Leiter der Medizinischen Klinik der Universität war. Im Gegensatz zu vielen seiner Zeitgenossen teilte Krehl Warburgs akute Wertschätzung der Bedeutung Grundlagenwissenschaften für die biomedizinische Forschung und letztlich für das Verständnis, die Behandlung und die Heilung von Krankheiten. Er war einer der ersten Befürworter der Multidisziplinarität in der biomedizinischen Forschung und der Vordenker des 1929 gegründeten Kaiser-Wilhelm-Instituts für medizinische Forschung (KWImF, später umbenannt in Max-Planck-Institut für medizinische Forschung) [15].

Zu Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts war es ein Hauptziel der Bio- Das Hauptziel der chemischen Forschung war die Aufklärung der Phasen der intrazellulären Verbrennung - oder, wie Warburg es nannte, der Zellatmung -, die die Nahrungsmittel in ihre Endprodukte umwandelt. Ein weiteres Hauptziel war die Aufklärung der Natur der Enzyme, die diese Verbrennung unter den für biologische Systeme charakteristischen, sehr milden Bedingungen von pH-Wert und Temperatur ermöglichen [4]. In Krehls Labor, wo er von 1906 bis 1913 arbeitete, konzentrierte sich Warburg auf letzteres und leistete Pionierarbeit bei der Untersuchung der Zellatmung in intakten Zellen. Die allgemeinen molekularen Mechanismen, die den zellulären Energieumwandlungen zugrunde liegen, blieben sein ganzes Leben lang eines seiner wichtigsten Forschungsinteressen. Auch wenn die Aufklärung bestimmter Abläufe bei Verbrennung von Nahrungsmitteln nicht zu seinen Hauptforschungsinteressen gehörte, so leistete sein Labor doch bedeutende Beiträge zu diesem Bereich [4]. Sein Mut und seine Entschlossenheit, völlig neues Land zu betreten und die Natur des respiratorischen Ferments zu entschlüsseln, trugen Früchte: 1931 erhielt er den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin für seine Arbeiten über die Natur und die Wirkungsweise dieses Proteinkomplexes [16] (und nicht für seine Arbeiten über den Tumorstoffwechsel, wie in der wissenschaftlichen Literatur oft fälschlich dargestellt wird). Nebenbei bemerkt, drei Wissenschaftler, die unter

Warburgs Schüler wurden mit Nobelpreisen ausgezeichnet: Otto Meyerhof, den Warburg betreute, als Meyerhof 1909 als Assistent in Krehls Laboratorium eintrat, sowie Hans Adolf Krebs und Hugo Theorell, die mehrere Jahre in Warburgs Laboratorium arbeiteten.

Während seiner Heidelberger Jahre verbrachte Warburg mehrere Zeiträume Gastforscher in der Abteilung für chemische Physiologie der Zoologischen Station Neapel (Stazione Zoologica di Napoli), einem Forschungszentrum, das für seine hochmodernen Bedingungen bekannt war [17]. Damals lag der Schwerpunkt der Forschung an der Zoologischen Station Neapel auf der Embryologie, wobei der Seeigel (*Echinoidea*) als Modellorganismus bevorzugt wurde. Der Grund dafür waren die vielen charakteristischen und nützlichen Eigenschaften dieser Tiere, nämlich die einfache und schnelle Gewinnung einer großen Anzahl von sich synchron entwickelnden Embryonen, die schnelle embryonale Entwicklungsphase und die einfache Struktur des Embryos mit einem hohen Verhältnis von lebender Substanz zu Eiersubstanz [18]. Warburg nutzte dieses Modellsystem, um die Auswirkungen der Befruchtung auf die Zellatmungsraten zu untersuchen. Mit dieser Studie machte Warburg seine erste große unabhängige wissenschaftliche Entdeckung: Nach der Befruchtung stieg die Atmungsrate des Seeigels um das Sechsfache. Diese Entdeckung, die 1908 veröffentlicht wurde [8], untermauerte die Auffassung von der physikalisch-chemischen Natur der biologischen Prozesse. Da die Lebenserhaltung mit Arbeit verbunden ist, erfordert sie Energie. Warburgs Entdeckungen zeigten, dass die wuchernden Zellen ihren erhöhten Energiebedarf durch eine erhöhte Zellatmung decken. Es ist wichtig zu erwähnen, dass andere Forscher bereits versucht hatten, das Problem der Energetik des Wachstums anzugehen, aber keine schlüssigen Ergebnisse erzielen konnten. Warburgs Fähigkeit, die richtigen Fragen zu stellen und die richtigen Methoden zu entwickeln, um sie zu beantworten, nämlich durch die Wahl geeigneter Modelle und die sorgfältige Überprüfung aller möglichen Fehlerquellen, ermöglichte es ihm, überzeugende Daten zu liefern und sich unter seinen Kollegen als herausragender Wissenschaftler zu etablieren.

4. Arbeit als etablierter Forscher

1913, im Alter von 30 Jahren, genoss Warburg bereits hohes Ansehen als einer der fähigsten und vielversprechendsten jüngeren Physiologen und Biochemiker in Deutschland. Er hatte etwa 30 wichtige Arbeiten veröffentlicht, die meisten davon über Arbeiten, die er unabhängig von den molekularen Mechanismen der Zellatmung durchgeführt hatte. Insbesondere hatte er wesentliche Beweise für die Beteiligung von Eisen an der katalytischen Aktivierung des ansonsten trägen molekularen Sauerstoffs erbracht, was ihn dazu veranlasste, die Zellatmung als eine Eisenkatalyse zu beschreiben. Warburg war sich der extrem niedrigen intrazellulären Konzentration des Atmungseisens bewusst und wusste, dass es nicht möglich sein würde, dessen Natur mit den heutigen Methoden der analytischen Chemie zu untersuchen. Um dies zu überwinden

Er suchte auf geniale Weise nach Substanzen, die sie unter bestimmten Bedingungen hemmten, und schloss aus dem "Charakter" dieser Substanzen und den Bedingungen, unter denen sie in intakten und atmenden Zellen (vor allem roten Blutkörperchen von Wirbeltieren und Seeigel-Eiern) reagierten, auf ihre chemische Natur [16]. Seine umfangreichen Studien hatten auch gezeigt, dass die wichtigsten oxidativen Prozesse immer an Strukturen gebunden waren. Diese Strukturen, die Warburg Grana nannte, wurden schließlich als Mitochondrien bekannt.

In Anerkennung seiner herausragenden Forschungsleistungen wurde Warburg zum Mitglied der Kaiser-Wilhelm-Gesellschaft ernannt. Das bedeutete, dass er als Sektionsleiter eines Kaiser-Wilhelm-Instituts die völlige Freiheit hatte, ein Forschungsthema seiner Wahl zu verfolgen. Während sein Labor Kaiser-Wilhelm-Institut für Biologie in Berlin-Dahlem fertiggestellt und eingerichtet wurde, arbeitete er im Labor von Walther Nernst, dem führenden Physikalischen Chemiker der damaligen Zeit. In Nernsts Laboratorium führte Warburg Arbeiten über Oxidations-Reduktions-Potentiale in lebenden Systemen durch [10]. Seine Arbeit wurde bald durch den Ausbruch des Ersten Weltkriegs am 28. Juli 1914 unterbrochen. Die meiste Zeit des Krieges leistete Warburg aktiven Dienst in einer Eliteeinheit der Kavallerie und kehrte erst gegen Ende des Krieges ins zivile Leben zurück.

Nach der Wiederaufnahme seiner wissenschaftlichen Laufbahn verfolgte Warburg mehrere Forschungslinien, die in vielerlei Hinsicht miteinander verbunden waren. Zwei der untersuchten Prozesse, nämlich die Zellatmung und die Photosynthese, waren direkt an Gasen beteiligt. In Krehls Laboratorium und in der Zoologischen Station von Neapel hatte Warburg zunächst die Sauerstoffaufnahme mit einer von Ludwig Wilhelm entwickelten titrimetrischen Methode zur Bestimmung der Menge an gelöstem Sauerstoff in Wasserproben gemessen. Unzufrieden mit der mangelnden Empfindlichkeit dieser schwerfälligen Methode, ersetzte Warburg sie 1910 durch das von Haldane und Barcroft 1902 entwickelte, genauere und weniger schwerfällige Manometer zur Messung von Gas Mengen, nämlich des an Hämoglobin gebundenen Sauerstoffs und des Kohlendioxids im Blut. In den Jahren 1918-1920 entwickelte Warburg das so genannte *Warburg-Manometer* (Abb. S1) und leistete damit einen entscheidenden Beitrag zur Theorie und Praxis der biochemischen Manometrie. Das neue Manometer, das eine geniale Adaption des oben erwähnten *Haldane-Barcroft-Blutgasmanometers* war, ermöglichte die Messung von Gasausstoßraten. Wichtig war, dass es nicht nur auf Prozesse anwendbar war, an denen Gase direkt beteiligt sind, wie z. B. Photosynthese, Zellatmung und alkoholische Gärung, sondern auch auf Prozesse, die mit einer gasproduzierenden Reaktion gekoppelt werden können, wie z. B. die Milchsäuregärung, die in bicarbonathaltigen Puffern CO_2 in einer Menge produziert, die dem erzeugten Laktat entspricht.

5. Vorbereitung des Angriffs auf das Krebsproblem aus der Perspektive des Stoffwechsels

5.1. Die Ausgangslage

Im Jahr 1922 machte sich Warburg daran, das Krebsproblem von einem metabolischen Standpunkt aus anzugehen. Konkret wollte er die metabolischen Veränderungen untersuchen, die bei Krebs im Vergleich zu normalem Gewebe stattfinden. Wie Warburg selbst einräumte, hatten sich bereits andere mit dieser Frage befasst, aber ihre Ansätze litten seiner Ansicht nach sowohl unter experimentellen als auch unter konzeptionellen Mängeln, nämlich der Verwendung von Antiseptika, von denen er festgestellt hatte, dass sie die Atmung hemmten, und der Tatsache, dass sie sich auf biochemische Prozesse konzentrierten, die fast keine Energie erzeugen, wie Autolyse, Lipolyse und Amyolyse [19]. Warburg vertrat die Ansicht, dass man bei der Suche nach einer Erklärung für das Wachstum von Tumoren auf die Reaktionen konzentrieren sollte, die die für das Wachstum erforderliche Energie erzeugen, vor allem die Atmung. Nachdem Warburg beobachtet hatte, dass die Atmung von Seeigel-Eiern im Moment der Befruchtung um das Sechsfache anstieg, erwartete er einen ähnlichen Anstieg der Atmung beim Übergang vom ruhenden Epithel zum Karzinom [9].

5.2. Das Krebsmodell

Für seine ersten Studien wählte Warburg als experimentelles Krebsmodell das Flexner-Rattenkarzinom (auch bekannt als Flexner-Jobling-Rattenkarzinom). Dieser 1906 am Rockefeller-Institut in der Samenblase einer Ratte entdeckte Tumor [20] konnte auf andere Ratten verpflanzt werden, was für die damalige Zeit eine beachtliche Leistung war.

5.3. Die Technik der Gewebeschnitte

Warburg, der mit Hilfe der Perfusion die Atmung von Lebergewebe untersucht hatte [21], wusste, dass diese Technik bei Tumoren aufgrund ihrer unregelmäßigen Blutversorgung nicht funktionieren würde. Er war sich auch bewusst, dass zerkleinertes Gewebe für die Untersuchung der Atmung ungeeignet ist, da die mechanische Zerstörung des Gewebes zum Verlust der organisierten Zellstruktur führt, von der seiner Meinung nach die Atmung abhängt. In einem weiteren Beispiel seiner experimentellen Virtuosität entwickelte er die so genannte *Gewebeschnittechnik*, eine Methode zur Vorbereitung von Gewebe, das während der gesamten Dauer der manometrischen Untersuchungen (die mehrere Stunden dauern konnten) am Leben erhalten wurde. Die Scheiben wurden mit einem Rasiermesser geschnitten, was unweigerlich die Atmung der Zellen an den Rändern der Scheiben beeinträchtigte. Je dicker die Scheibe war, desto geringer war der Prozentsatz der durch die Schnitte abgestorbenen Zellen, d. h. desto höher war der Anteil der atmenden Zellen. Andererseits sollte die Dicke der Scheiben die Diffusion vom und zum nährstoffreichen Suspensionsmedium nicht behindern, um eine ausreichende Versorgung aller Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie eine effiziente Entsorgung von Stoffwechselprodukten zu gewährleisten. Warburg entwickelte die mathematische Theorie zur Berechnung der von ihm so genannten Grenzdicke der Scheiben, d. h. der maximalen Dicke, die noch mit dem Überleben des Gewebes vereinbar ist. Bei Lebergewebe beispielsweise lag die berechnete Grenzdicke der Schnitte in reinem Sauerstoff bei 0,5 mm [11], was ca. 150 Zellschichten entspricht [1]. Mit diesen Schnitten konnten quantitative Messungen der Milchsäurebildung und der Zellatmung für mindestens 30-60 Minuten durchgeführt werden, wobei die Werte um nicht mehr als 5-7 % abwichen und nur wenige Gewebe verwendet wurden. Milchsäuremessungen mit den verfügbaren chemischen Methoden erforderten 50-mal mehr Material, waren viel umständlicher und lieferten Ergebnisse von minderer Qualität [11,19,22].

Ein weiterer großer Vorteil der Gewebeschnittechnik war die eine große Anzahl von Schnitten, die aus einem einzigen Tumor präpariert werden konnten und die parallel unter verschiedenen Versuchsbedingungen untersucht werden konnten. Alle präparierten Schnitte wurden auf ihre Transparenz hin untersucht, und nur die für geeignet befundenen Schnitte wurden verwendet - nekrotisches Gewebe, das unabhängig von Alter und Größe immer zentralen Teil der Tumoren vorhanden war, wurde verworfen, und Schnitte, die nur Epithelzellen enthielten, wurden bevorzugt [20]. Das *Warburg-Manometer* und die *Gewebeschnittechnik* wurden von Warburg selbst als zwei seiner wichtigsten Beiträge zur Weiterentwicklung der Biochemie angesehen [10]. Beide wurden nicht nur für die Untersuchung von Atmung und Gärung, sondern auch für die Untersuchung von biosynthetischen Prozessen und zellulären Transportmechanismen eingesetzt [1].

6. Die Entdeckung des verblüffenden Stoffwechselphenotyps

Wie bereits erwähnt, erwartete Warburg, in Karzinomgewebe wesentlich höhere Atmungsraten zu finden als in normalem Epithel. Zu seiner völligen Überraschung zeigten die ersten Messungen, dass die Atmung von Karzinomgewebe, das bei Körpertemperatur in Ringerlösung gelagert wurde, erheblich niedriger war als die von Leber- und Nierengewebe unter gleichen Bedingungen [9].

6.1. Die Fermentation des Karzinoms der Flexner-Ratte

Bei der Suche nach einer Erklärung für die oben erwähnte auffällige Beobachtung wurde noch ein weiteres auffälliges Stoffwechselmerkmal des Flexner-Rattenkarzinoms entdeckt: Kurz nach dem Einlegen von Scheiben dieses

Tumor in Ringerlösung, die physiologische Konzentrationen von Glukose enthält, wurde die Lösung sauer. In Abwesenheit von Glukose wurde die Ansäuerung nicht beobachtet und wurde zu Recht auf die Bildung von Laktat aus diesem Zucker zurückgeführt [22]. Gustav Embden hatte bereits 1912 die Bildung von Laktat aus Zuckern in tierischen Geweben nachgewiesen [23]. Die Geschwindigkeit der Milchsäuregärung durch diesen Tumor war jedoch 100-mal höher als die des Blutes, 200-mal höher als die des Froschmuskels in Ruhe und 8-mal höher als die des Froschmuskels bei maximaler Belastung [9,20]. Sie übersteigt auch bei weitem (um mindestens das 70-fache) die von normalem Rattenleber-, -nieren- und -herzgewebe, das in der Warburg-Studie zu Vergleichszwecken verwendet wurde [22]. In etwa 13 Stunden baute der Tumor genau so viel Glukose ab wie sein eigenes Trockengewicht. Aus den Verbrennungswärmen von Glukose und Laktat, die erst kürzlich von Meyerhof [24] bestimmt wurden, berechnete Warburg die durch die Fermentierung freigesetzte Energie und schloss daraus, dass dieser Prozess wesentlich zum Energiebedarf des Flexner-Rattenkarzinoms beitragen könnte [22].

Warburg führte die hohe Laktatproduktionsrate des Flexner-Rattenkarzinoms auf eine ungewöhnlich hohe fermentative Kapazität zurück - oder, in Warburgs Terminologie, auf eine hohe *glykolytische Fähigkeit* [22]. Bereits Louis Pasteur hatte den Begriff der Milchsäuregärung geprägt, um die Umwandlung von Zuckern in Laktat in Bakterien zu beschreiben. Da die einzelnen Schritte des anaeroben Abbaus von Lebensmitteln jedoch noch nicht bekannt waren [25], war Warburg und seinen Zeitgenossen noch nicht bewusst, dass der Stoffwechselprozess, der Glukose in tierischem Gewebe und in Bakterien in Laktat umwandelt, ein und derselbe ist. Daher führte er einen neuen Begriff ein - Glykolyse -, um "die Aufspaltung von Zucker in Milchsäure gemäß der Gleichung $C_6H_{12}O_6 = 2C_3H_6O_3$ " [19] in tierischem Gewebe, sowohl in normalem als auch in krankem, zu bezeichnen. Diese Unterscheidung findet sich noch in der Nobelpreisvorlesung von Hans von Euler-Chelpin aus dem Jahr 1929, in der er die "drei Hauptformen des biologischen Zuckerabbaus, die Gärung, die Atmung und die Glykolyse" [26] erwähnt. Nachdem bekannt wurde, dass Warburgs tierische Glykolyse und Pasteurs Milchsäuregärung ein und derselbe Stoffwechselprozess sind, wurde der Begriff Gärung allmählich auf alle Organismen ausgedehnt, und zwar von Warburg selbst, der begann, ihn zu verwenden, um die Umwandlung von Glukose in Laktat durch Tumoren zu beschreiben [27,28]. Andererseits wird die Glykolyse in den heutigen Lehrbüchern der Biochemie häufig als die metabolische Umwandlung von Glukose in Pyruvat definiert, d. h. sie umfasst nicht den Schritt der Umwandlung von Pyruvat in Laktat [29,30]. Dementsprechend und um Unklarheiten zu vermeiden, wird die Umwandlung von Glukose in Laktat in diesem Manuskript immer als Fermentation bezeichnet, unabhängig vom Versuchssystem und den äußeren Bedingungen, unter denen die quantitativen Messungen durchgeführt wurden (z. B. *Fermentation in Abwesenheit von Sauerstoff* und *Fermentation in Anwesenheit von Sauerstoff* anstelle von *anaerober Glykolyse* bzw. *aerober Glykolyse*).

6.2. Die starke Abhängigkeit des Flexner-Rattenkarzinoms von der Fermentation und fast reine Atmungs-Energiestoffwechsel des normalen Rattengewebes

Nach Überprüfung möglicher Fehlerquellen bestimmte Warburg erneut die Atmung des Flexner-Rattenkarzinoms und zum Vergleich die von normalen Organen, meist von Ratten [11]. Die Ergebnisse waren eindeutig: Die Atmung des Flexner-Rattenkarzinoms unterschied sich nicht signifikant von der des normalen epithelialen Lebergewebes der Ratte. Sie war sogar etwas niedriger, aber Warburg stellte die Hypothese auf, dass dies auf das Vorhandensein von Zellen in den Tumorscheiben zurückzuführen sein könnte, die zwar nicht nekrotisch, aber nicht mehr intakt waren. Die unmittelbare Schlussfolgerung war, dass die Respirationsrate das normale Verhalten des Krebsgewebes, nämlich das schnelle Wachstum, nicht erklären können. Es wurde auch festgestellt, dass die Atmung allein nur einen kleinen Teil (ca. 10 %) verbrauchten Glukose erklären kann. Es ist anzumerken, dass andere Forscher bereits den Glukoseverbrauch von Tumoren untersucht hatten, motiviert durch die klinische Beobachtung, dass Glukose häufig im Urin von Diabetikern fehlt, die auch Krebs haben. In einigen Fällen wurde ein erhöhter Glukoseverbrauch festgestellt, aber es wurde keine Erklärung für diesen Anstieg geliefert [11].

Die neuen Messungen bestätigten die auffällige Gärungsrate von Krebsgewebe, die wiederum in starkem Kontrast zu der für Leberepithel ermittelten Rate stand. Ähnlich wie Pasteur es für Mikroorganismen beschrieben hatte, stellte Warburg fest, dass Sauerstoff die Gärungsraten von Tumor- und Normalgewebe beeinflusste. Daher wurden in den folgenden Experimenten Messungen sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Sauerstoff durchgeführt (aerobe Fermentation und Re-Spiration wurden in Anwesenheit von 5 % CO₂ in Luft gemessen, während die anaerobe Fermentation in Anwesenheit von 5 % CO₂ in Stickstoff gemessen wurde). Bei Tumorgewebe wurde festgestellt, dass die Fermentationsraten in Abwesenheit von Sauerstoff nur geringfügig höher waren (weniger als 30 %) als in Gegenwart von Sauerstoff. Diese Beobachtung hatte eine sehr wichtige Auswirkung: Im Gegensatz zu dem, was andere Forscher in Muskeln und im Pilz *Mucor mucedo* gefunden hatten, aber in Übereinstimmung mit dem, was in Hefe beobachtet worden war, funktionierte die Hemmung der Gärung durch Sauerstoff (jetzt als Pasteur-Effekt bekannt) in Tumorgewebe nur in sehr geringem Maße. Eine genauere Betrachtung der gemessenen Gärungs- und Atmungsraten zeigte, dass die Wirkung der Atmung auf die Gärung quantitativ identisch war mit der bereits von Meyerhof für Hefe und Muskel beschriebenen Wirkung: In der Regel war der Verbrauch eines Moleküls Sauerstoff mit dem Verschwinden von ein bis zwei Molekülen Laktat verbunden. Die Auswirkung der Atmung auf die Gärung war also proportional zum Ausmaß der Atmung, was bedeutet, dass die Atmungskapazität des Tumorgewebes nicht ausreichte, um seine starke Gärung in Gegenwart von Sauerstoff zum Stillstand zu bringen. Das Gleiche galt für Hefe, die ebenfalls hohe aerobe Gärungsraten aufwies [19].

Es wurde auch festgestellt, dass im Tumorgewebe die Energiemenge, die durch aerobe Gärung freigesetzt wurde, entsprach ca. 35 % der durch die Zellatmung freigesetzten Energie, was bedeutet, dass dieses Gewebe stark auf die Gärung angewiesen ist, selbst wenn es mit einem Sauerstoffgehalt versorgt wird, der die Atmung nicht beeinträchtigt [11]. Diese starke Abhängigkeit wird noch deutlicher, wenn man sie in Form von verbrauchten Glukosemolekülen ausdrückt: Für jedes bei der Atmung verbrauchte Glukosemolekül wurden 12 Glukosemoleküle fermentiert [19]. In diesem Sinne könnte man den aeroben Energiestoffwechsel dieses Tumors als überwiegend fermentativ bezeichnen. Die Beobachtung, dass nur Tumorgewebe mit ungestörter Fermentation erfolgreich transplantiert werden konnte, bestärkte Warburgs Überzeugung, dass die Fermentation eine intrinsische Eigenschaft der Tumorzelle ist [9].

Die Fermentation konnte auch in normalem Rattenlebergewebe nachgewiesen werden, aber die Raten waren sehr niedrig (mehr als 25-mal niedriger als die des Tumorgewebes) und in An- und Abwesenheit von Sauerstoff im Wesentlichen gleich. In der Niere war die Gärung fast nicht nachweisbar, während sich andere Epithelorgane (Bauchspeicheldrüse und Unterkieferdrüse) als zu klein erwiesen, um die gewünschte Anzahl von Scheiben geeigneter Größe herzustellen. Die Ergebnisse der wenigen Messungen, die durchgeführt werden konnten, lassen darauf schließen, dass die Fermentationskapazität der Unterkieferspeicheldrüse höher ist als die der Leber und der Bauchspeicheldrüse, aber immer noch viel niedriger als die des Tumorgewebes. Warburg hielt die Gesamtergebnisse, die darauf schließen lassen, dass sich Krebsgewebe in seinem Stoffwechsel wie eine minderwertige Lebensform verhält, für äußerst wichtig und spekulierte, dass Krebszellen aufgrund ihres gemischten Energiehaushalts weniger auf Sauerstoff angewiesen sein könnten als normale Zellen [9,20].

6.3. Wichtigste Schlussfolgerungen zum Stoffwechsel von normalem und Tumorgewebe

Nachdem Warburg 1924 seine Protokolle für die manometrischen Bestimmungen geändert hatte, um die physiologischen Bedingungen besser nachzubilden, führte er eine lange Reihe von In-vitro-Studien durch, wobei er seine Untersuchungen auf eine Vielzahl anderer gutartiger und bösartiger Tumore, einschließlich menschlicher Tumore unterschiedlichen Ursprungs, ausdehnte. Es wurden auch Untersuchungen an Gewebe von 3 bis 5 Tage alten Kükenembryonen durchgeführt, deren Wachstumsgeschwindigkeit in diesem Entwicklungsstadium mit der von jungen Rattenkarzinomen vergleichbar war [20]. Menschliches Tumorgewebe, das bei Operationen entnommen wurde, wurde von Professoren der Chirurgie an Charité in Berlin zur Verfügung gestellt. Für diese Studien wurden manometrische Bestimmungen durchgeführt

im Krankenhaus durchgeführt, da die Gewebe die Zeit, die für den Transport in Warburgs Labor nötig gewesen wäre, möglicherweise nicht überlebt hätten [4].

Im Gegensatz zu den untersuchten Rattenkarzinomen, die größtenteils aus Epithel bestanden, enthielten die menschlichen Karzinome unterschiedliche - oft sehr große - Mengen an Bindegewebe. Warburg wählte menschliche Karzinome aus, die zu 30 bis 80 % aus Epithel bestanden, und führte Korrekturen für das Vorhandensein von Bindegewebe ein, wobei er davon ausging, dass das Tumorbinderewebe einen ebenso vernachlässigbaren Energiestoffwechsel besaß wie das normale Bindegewebe im Allgemeinen. Das Gleiche galt für das einzige untersuchte Sarkom. Außerdem wurden Blasenpapillome und Nasenpolypen untersucht, die epitheliale bzw. bindegewebige gutartige Tumore darstellen. Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse dieser systematischen Untersuchung zusammengefasst [9,20]. Bemerkenswert ist, dass die Vergleiche nicht zufällig erfolgten: Karzinome wurden mit embryonalem Gewebe oder mit Epithel (im Wachstum oder in Ruhe) verglichen, während Sarkome mit Bindegewebe verglichen wurden.

1. Die hohe anaerobe Fermentationsaktivität des Karzinoms der Flexner-Ratte war bei allen getesteten menschlichen Karzinomen, aber auch bei den gutartigen Tumoren (wenn auch in geringerem Maße beim Bindegewebstumor) und bei nicht bösartigen, schnell wachsenden Geweben (von Hühnerembryonen) zu beobachten. Im Gegensatz dazu war die anaerobe Gärung in normalem erwachsenem Gewebe fast nicht nachweisbar, während sie bei neugeborenen Ratten etwas höher war (fünffach so hoch in der Leber und dreimal so hoch in der Niere). Die anaerobe Gärung war also keine tumorspezifische Eigenschaft, sondern vielmehr ein Merkmal aller wachsenden Gewebe.
2. Die Auswirkung der Atmung auf die Gärung war in allen untersuchten Geweben, sowohl normalen als auch bösartigen, quantitativ (ebenso wie bei Milchsäurebakterien).
3. In nicht bösartigen, schnell wachsenden Geweben hemmte die Anwesenheit von Sauerstoff die Fermentation fast vollständig. Wie bei normalem erwachsenem Gewebe war der aerobe Stoffwechsel in diesen Geweben also fast reine Atmung. Diese Hemmung war bei gutartigen Tumoren viel weniger ausgeprägt und bei Karzinomen fast nicht vorhanden. Mit anderen Worten: Die aerobe Gärung war ein charakteristisches Merkmal von Tumorzellen, das normale Gewebe, ob schnell wachsend oder reif, nicht aufweisen. Es gab einige bemerkenswerte Ausnahmen, wie Netzhaut warmblütiger Tiere, deren aerobe Gärungsraten sogar höher waren als die von Krebsgewebe. Warburg vermutete, dass es sich dabei um ein In-vitro-Artefakt handeln könnte, das mit der hohen Empfindlichkeit dieses Gewebes zusammenhängt, schloss aber auch andere Möglichkeiten nicht aus, nämlich dass die Gärung in diesem Gewebe verschiedenen Zwecken dienen könnte. Während man also für höhere Organismen sagen kann, dass es kein Wachstum ohne Gärung gibt, könnte das Gegenteil der Fall sein, d. h. es könnte Gärung ohne Wachstum geben.
4. Daraus ergibt sich, dass zwar alle wachsenden Gewebe, ob normal oder bösartig, eine hohe Fermentationskapazität aufweisen, dass aber nur in normalem, wucherndem Gewebe die Atmung ausreicht, um die aerobe Fermentation aufzuheben. Mit anderen Worten: Der Unterschied zwischen normalem und gestörtem Wachstum lag in der Fähigkeit der Atmung, die Gärung in Gegenwart von Sauerstoff zu unterbrechen. Folglich war der aerobe Stoffwechsel normaler Zellen, ob im Wachstum oder in der Reifung, fast reine Atmung, während der Stoffwechsel von Tumorzellen im Allgemeinen, ob bösartig oder gutartig, eine Mischung aus Fermentation und Re-Spiration war. Die Unterschiede zwischen bösartigen und gutartigen Tumoren waren eher gradueller Art, wie die Pathologie bereits andeutet, als von der Art her.
5. Der embryonale Zustand war durch eine große anaerobe Gärung und eine dazu passende Atmung gekennzeichnet. Im Laufe der Entwicklung sank die anaerobe Gärung auf ein Zehntel des ursprünglichen Wertes und die Atmung war hoch. Aus diesem stationären Zustand entwickelten sich Karzinome, wobei die Gärung wieder auf das Zehnfache anstieg, ohne dass die Atmung entsprechend zunahm.

Warburg stellte die Hypothese auf, dass der Übergang von geordnetem zu ungeordnetem Wachstum durch eine Störung des Verhältnisses zwischen Gärung und Atmung erfolgt, entweder durch eine Beschleunigung der

Gärung ohne eine entsprechende Beschleunigung der Atmung oder eine Hemmung der Atmung ohne eine entsprechende Hemmung der Gärung. Um die Gültigkeit seiner Hypothese zu überprüfen, hemmte Warburg die Atmung der Embryonen teilweise, entweder durch die Zugabe von Cyanid oder indem er sie einer Anoxie aussetzte, ohne ihre Fermentationskapazität zu beeinträchtigen (was durch unveränderte Raten der anaeroben Fermentation bestätigt wurde). Die Raten der aeroben Fermentation stiegen mit der Zyanidkonzentration oder der Dauer der Anoxie und erreichten Werte, die mit denen von Tumoren vergleichbar waren [9,20].

6.4. Die Warburgsche Stoffwechseltheorie zur Entstehung von Tumoren

Auf der Grundlage seiner Erkenntnisse stellte Warburg eine Stoffwechseltheorie für Entstehung von Tumoren auf [9,20], die sich wie folgt zusammenfassen lässt. Tumore entstehen aus erwachsenen Geweben, deren scheinbarer Ruhezustand in Wirklichkeit ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Zellwachstum und Zelltod ist. Dieser Ruhezustand lässt sich an der Darmschleimhaut gut erkennen. Der Stoffwechsel des Bindegewebes ist so reduziert, dass Warburg weder Gärung noch Atmung mit Sicherheit messen konnte, und die fermentative Kapazität des ruhenden Epithels war zehnmal geringer als die von Tumoren oder embryonalem Gewebe. Normales erwachsenes Gewebe ist heterogen, was die Fermentationskapazität seiner Zellen betrifft. Ruhendes Epithel beispielsweise kann als ein Mosaik beschrieben werden, das aus einer sehr kleinen Anzahl von Zellen besteht, die eine embryonale Fermentationskapazität beibehalten, und einer sehr großen Anzahl von Zellen, die keine Fermentationskapazität besitzen. Wird ein ruhendes Gewebe einem Sauerstoffmangel ausgesetzt - verursacht durch Druck, Sklerose, Bakterien oder auf andere Weise - überleben die wenigen Zellen mit einer hohen Fermentationskapazität, während alle anderen Zellen absterben. Bei chronischem Sauerstoffmangel entsteht ein Gewebe, das die Gärfähigkeit von embryonalem Gewebe besitzt, dessen Atmung aber durch den Sauerstoffmangel geschädigt ist, also ein Tumorgewebe.

7. Nachwort

Die unmittelbare Reaktion auf Warburgs bahnbrechende Entdeckung war überwiegend enthusiastisch, da man zweifellos davon ausging, dass die Existenz eines tumorspezifischen Phänotyps neue Wege für die Krebstherapie eröffnete. Sie wurde jedoch auch mit Vorsicht aufgenommen, da es angesichts des heutigen Wissensstandes schwierig war, sich vorzustellen, wie das Muster des Zellwachstums - kontrolliert oder unkontrolliert - durch die Prozesse bestimmt werden könnte, die die Zellen zur Erzeugung von Stoffwechselenergie nutzen.

Kurz nach Warburgs Entdeckung dachten mehrere Biochemiker daran, sie weiter zu erforschen. So lieferten beispielsweise die Experimente von Gerty und Carl Cori den Beweis dafür, dass Warburgs In-vitro-Ergebnisse auch für In-vivo-Bedingungen gültig waren [31,32]. In Warburgs Laboratorium wurden auch mehrere Studien über den Stoffwechsel von Tumoren durchgeführt, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*, insbesondere über die Möglichkeit, Tumorzellen durch Sauerstoffmangel abzutöten [33]. Zu Beginn der 1930er Jahre wurden noch große Hoffnungen in das Potenzial von Warburgs Entdeckung gesetzt, was in der Präsentationsrede von Professor E. Hammarsten, Mitglied des Nobelkomitees für Physiologie oder Medizin des Königlichen Karolineninstituts, anlässlich der Verleihung des Nobelpreises an Warburg deutlich zum Ausdruck kam. In dieser Rede erklärte Professor Hammarsten: "Die medizinische Welt erwartet von Ihren Experimenten über Krebs und andere Tumore, Experimente, die bereits weit genug fortgeschritten zu sein scheinen, um eine Erklärung für zumindest eine Ursache des zerstörerischen und unbegrenzten Wachstums dieser Tumore liefern zu können" [34]. Warburgs Theorie zur Entstehung von Krebs berücksichtigte jedoch nicht die aufstrebenden neuen Erkenntnisse in anderen Bereichen der Krebsforschung [35]. Auch Warburgs wiederholte Ablehnung der Bedeutung von Virologie und Molekularbiologie für das Verständnis der Krebsentstehung [27], die bis zu seinem Tod andauern sollte [28], machte ihn bei der Mehrheit der Krebsforscher nicht beliebt, die sich zunehmend auf die genetischen Grundlagen der abnormalen zellulären Proliferation, Differenzierung und des Todes konzentrierten, die für Tumoren charakteristisch sind. Mit

Im Laufe der Zeit verloren Warburgs Ideen ihren ursprünglichen Reiz und wurden von vielen als altmodisch angesehen. Nichtsdestotrotz verschwand die Forschung zum Onkometabolismus nie ganz, und eine kleine Anzahl von Forschern verfolgte diesen Forschungszweig weiter, insbesondere Efraim Racker, der 1972 den Begriff Warburg-Effekt prägte, um das Vorhandensein einer hohen aeroben Fermentierung in Tumoren zu beschreiben [36].

Ein bedeutender Durchbruch auf dem Gebiet des Onkometabolismus erfolgte in den 1980er Jahren, als die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) mit dem fluorierten Glukoseanalogon 2-¹⁸F-Fluor-2-desoxy-D-Glukose (FDG) in der Klinik zur Krebsbildgebung eingesetzt wurde [37], nachdem Tierversuche seine hohe Empfindlichkeit zur Messung des veränderten Stoffwechsels von Tumoren bestätigt hatten [38]. Diese metabolische Bildgebungstechnik macht sich die abnorm hohe Glukoseaufnahme von Krebserkrankungen zunutze, die mit den erhöhten Anforderungen eines Energiestoffwechsels übereinstimmt, der zu stark auf Fermentierung angewiesen ist. Wichtig ist, dass mit dieser Technik eine eindeutige Korrelation zwischen dem Grad der FDG-Aufnahme und dem Tumordruck nachgewiesen werden konnte.

Trotz des großen Erfolgs der FDG-PET bei der Diagnose und Stadieneinteilung einer Vielzahl von Tumoren blieb die grundsätzliche Frage, ob der Warburg-Effekt die Krebsentstehung fördert oder nur ein Epiphänomen eines bereits laufenden karzinogenen Prozesses ist, ungelöst. Die meisten Krebsforscher erkannten zwar an, dass der Warburg-Effekt bei den meisten Krebsarten auftritt, taten ihn jedoch als sekundäres Phänomen ab, das weder wesentlich noch ausreichend für die Entstehung von Tumoren ist [1,39]. Ende der 1990er Jahre wurden jedoch ungeahnte Zusammenhänge zwischen dem zellulären Energiestoffwechsel und der Zellvermehrung, dem Zelltod und der Gewebekomöostase entdeckt [25]. So wurde beispielsweise festgestellt, dass Cytochrom *c*, das bekanntermaßen an der Erzeugung von Stoffwechselenergie beteiligt ist, auch bei der Apoptose eine entscheidende Rolle spielt [40]. Die Entdeckung, dass der Transkriptionsfaktor Myc, der traditionell mit der Regulierung des Zellzyklus und der Apoptose in Verbindung gebracht wird, *LDHA*, ein Gen, das für ein Stoffwechselenzym kodiert, transaktiviert [41], war ebenfalls ein Paradigmenwechsel. Bald wurde bekannt, dass die Expression dieses und vieler anderer Stoffwechselgene nicht nur durch Myc, sondern auch durch andere Transkriptionsfaktoren reguliert wird, die ebenfalls stark in die Krebsprävention oder -förderung involviert sind, wie p53, HIF und NF- κ B, und dass diese Transkriptionsfaktoren wichtige Akteure bei der metabolischen Neuverdrahtung sind, die während der Krebsentstehung stattfindet [42-44]. Es überrascht nicht, dass den Mitochondrien, die seit jeher als das Kraftwerk der eukaryontischen Zelle gelten, seitdem viel Aufmerksamkeit geschenkt wird. Die Rolle der Mitochondrien bei der Krebsentstehung wird in anderen Artikeln dieser Sonderausgabe erörtert [45-47].

In den letzten zehn Jahren sind andere Arten von Beweisen aufgetaucht, die die Relevanz des Warburg-Effekts in der Karzinogenese, nämlich die Entdeckung einiger Krebsarten, die wiederkehrende Funktionsverlustmutationen in den Genen aufweisen, die für Fumarat-Hydratase und Succinat-Dehydrogenase, zwei Enzyme des Tricarbonsäurezyklus, kodieren [48]. Die Beobachtung, dass sich diese beiden Stoffwechselenzyme als klassische Tumorsuppressoren verhalten, widersprach der landläufigen Meinung, dass alle Tumorsuppressorgene (und Onkogene) nur an Signalwegen beteiligt sind, die direkt die Zellvermehrung, den Zelltod und die Gewebekomöostase steuern. Inzwischen ist bekannt, dass Mutationen in Stoffwechselgenen nicht unbedingt zu einem Funktionsverlust führen. So wurde beispielsweise bei den Genen, die für die Isoformen 1 und 2 der Isocitrat-Dehydrogenase (IDH1 und IDH2) kodieren, festgestellt, dass sie bei Patienten mit Gliom, Glioblastom und akuter myeloischer Leukämie immer wieder mutiert sind, sowie in einer signifikanten Anzahl von intrahepatischen Cholangiokarzinomen und Knorpeltumoren [49-52] mutiert waren, führten Mutationen zu einer neomorphen Aktivität, insbesondere zur Umwandlung von α -Ketoglutarat in 2-Hydroxyglutarat [53,54]. Wichtig ist, dass 2-Hydroxyglutarat als Onkometabolit angesehen wird, *d. h.* als ein Metabolit, der Krebs fördern kann (die Bildung von 2-Hydroxyglutarat ist mit einer epigenetischen Dysregulation verbunden) [25]. Diese und viele andere Ungereimtheiten, die sich in den letzten zehn Jahren häuften, führten zu einer Neubewertung der Rolle der Stoffwechselverdrahtung bei der Krebsentstehung und zu einem sprunghaften Anstieg der Veröffentlichungen zu diesem Thema. Schließlich 2011, fast ein Jahrhundert nach Warburgs bahnbrechender Entdeckung, die Neuverdrahtung des Energiestoffwechsels von Douglas Hanahan und Robert Weinberg in ihrer äußerst einflussreichen Publikation zu einem neuen Kennzeichen von Krebs erhoben

mit dem Titel *Hallmarks of cancer: the next generation* [55]. Wichtig ist, dass die metabolische Umstellung, die mit der neoplastischen Transformation einhergeht, nach heutiger Auffassung weit über den Energiestoffwechsel hinausgeht und neben vielen anderen Veränderungen auch erhöhte Raten der Lipidbiosynthese und höhere Flüsse durch den Pentosephosphatweg umfasst [56,57].

Der Weg zur Entdeckung von metabolischen Krebstherapien war lang und steinig [58]. Die ersten Versuche reichen bis in die 1950er Jahre zurück, aber erst in den frühen 2000er Jahren, mit der Wiederbelebung der Onko-Stoffwechselforschung, zeigte die Pharmaindustrie Interesse an diesem Gebiet. Der bisher vielleicht größte Erfolg war kürzlich erfolgte Zulassung von IDHIFA® (Enasidenib) und Tibsovo® (Ivosidenib) durch die Food and Drug Administration für die Behandlung von akuter myeloischer Leukämie (AML) mit einer Mutation in Isocitrat-Dehydrogenase-2 (IDH2) bzw. Isocitrat-Dehydrogenase-1 (IDH1) bei einer genau definierten Gruppe von erwachsenen Patienten. IDHIFA® und Tibsovo® sind Inhibitoren von IDH2 bzw. IDH1. Im Gegensatz zu Isocitrat-Dehydrogenase-3 (IDH3) katalysieren IDH1 und IDH2 keinen Schritt des Tricarbonsäurezyklus. Mutationen in diesen beiden Isoformen können jedoch zu einer Anhäufung von 2-Hydroxyglutarat führen, das den TCA-Zyklus hemmt und den Lipidstoffwechsel hochreguliert [59]. Die Suche nach anderen, allgemeineren Stoffwechselzielen für die Krebstherapie wird zweifellos weitergehen. Ob jemals eine Behandlung für alle Krebsarten gefunden wird, kann nur die Zeit zeigen.

Ergänzende Daten zu diesem Artikel können online unter <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165965> abgerufen werden.

CRedit-Beitragserklärung

Ana M. Urbano: Schreiben - ursprünglicher Entwurf, Visualisierung.

Erklärung über konkurrierende Interessen

Die Autoren erklären, dass ihnen keine konkurrierenden finanziellen Interessen oder persönlichen Beziehungen bekannt sind, die einen Einfluss auf die Arbeit in diesem Papier haben könnten.

Danksagung

Die Forschung im Labor des Autors wird derzeit von der Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Zuschuss UIDB/00070/2020) und der Associação de Apoio ao Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia (ACIMAGO, Zuschuss 16/12) finanziert. Der Autor dankt Dr. Francisco P. Coelho für seine unschätzbare Hilfe bei der Übersetzung der ursprünglich auf Deutsch verfassten Arbeiten, Professor José Cuezva für die Überlassung einer Kopie der Biographie von Otto Warburg von Krebs (siehe [1] dieses Manuskripts), Dr. Leonardo M. R. Ferreira und Dr. A. Jorge Guiomar für das Lesen des gesamten Manuskripts, Margarida C. Sobral für die Unterstützung bei der Erstellung des Manuskripts und Oxford Publishing Limited für die Erlaubnis, Abb. S1 zu verwenden.

Referenzen

- [1] H. Krebs, Otto Warburg: Cell Physiologist, Biochemist and Eccentric, Oxford University Press, Oxford, 1981.
- [2] H. Krebs, Otto Heinrich Warburg, 1883-1970, Biogr. Mem. Fells. R. Soc. 18 (1972) 628-699.
- [3] H. Krebs, Der Zitronensäurezyklus, Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1942-1962, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1964.
- [4] F.L. Holmes, Hans Krebs: Band 1, The Formation of a Scientific Life, 1900-1933, Oxford University Press, New York, 1991.
- [5] O. Warburg, Einleitendes Kapitel, Annu. Rev. Biochem. 33 (1964) 1-14.
- [6] O. Warburg, Über den Stoffwechsel der Tumoren: Arbeiten aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem, Verlag von Julius Springer, Berlin, Dahlem, 1926.
- [7] O. Warburg, The Metabolism of Tumours: Untersuchungen aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem, Constable & Co, Ltd, London, 1930.
- [8] O. Warburg, Métabolisme Cellulaire et Métabolisme des Tumeurs: Travaux du Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem, Librairie Félix Alcan, Paris, 1928.

- [9] O. Warburg, The metabolism of carcinoma cells, *J. Cancer Res.* 9 (1925) 148-163.
- [10] D. Burk, Otto Warburg, ein Meister der Zellchemie, *Biochim. Biophys. Acta* 12 (1953) 9-14.
- [11] S. Minami, Versuche an überlebendem Karzinomgewebe [Atmung und Glykolyse], *Biochim. Z.* 142 (1923) 334-350.
- [12] E. Buchner, Zellfreie Fermentation, Nobel Lectures, Chemistry 1901-1921, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1966.
- [13] M. Teich, The making of a biochemist, *Nature*. 394 (1998) 240.
- [14] E. Fischer, Synthesis in the purine and sugar group, Nobel Lectures, Chemistry 1901-1921, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1966.
- [15] Die Gründung des Kaiser-Wilhelm-Instituts für medizinische Forschung, Nobel Lect. Nobel Media AB, 2020 [online] <https://www.nobelprize.org/prizes/uncategorized/the-foundation-of-the-kaiser-wilhelm-institute-for-medical-research>, Zugriff auf Datum: 27. März 2020.
- [16] O. Warburg, The oxygen-transferring ferment of respiration, Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1922-1941, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1965.
- [17] C. Groeben, F. de Sio, Nobelpreisträger an der stazione zoologica Anton Dohrn: Phänomenologie und Wege zur Entdeckung in den Neurowissenschaften, *J. Hist. Neurosci.* 15 (2006) 376-395.
- [18] C.A. Ettensohn, Sea urchins as a model system for studying embryonic development, *Ref. Modul. Biomed. Sci.*, 2017.
- [19] O. Warburg, Versuche an überlebendem Karzinom-gewebe (Methoden), *Biochem. Z.* 142 (1923) 317-333.
- [20] O. Warburg, K. Posener, E. Negelein, Über den stoffwechsel der karzinomezelle, *Biochem. Z.* 152 (1924) 309-344.
- [21] O. Neubauer, O. Warburg, Über eine Synthese mit essigsäure in der künstlich durchbluteten leber, *Hoppe-Seylers Zeitschr. f. Physiol. Chem.* 70 (1910) 1.
- [22] O. Warburg, S. Minami, Versuche an überlebendem Karzinom-gewebe, *Klin. Wochenschr.* 2 (1923) 776-777.
- [23] F. Kraus, G. Embden, Über Milchsäurebildung in der künstlich durchströmten Leber, *Biochem. Z.* 45 (1912) 1-17.
- [24] O.F. Meyerhof, Die Verbrennungswärme der Milchsäure, *Biochem. Z.* 129 (1922) 594-604.
- [25] L.M.R. Ferreira, A.M. Li, T.L. Serafim, M.C. Sobral, M.C. Alpoim, A.M. Urbano, Intermediary metabolism: an intricate network at the crossroads of cell fate and function, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2020 (1866) 165887.
- [26] H. von Euler-Chelpin, Fermentation of sugars and fermentative enzymes, Nobel Lectures, Chemistry 1922-1941, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1966.
- [27] O. Warburg, Über den Ursprung von Krebszellen, *Science*. 123 (1956) 309-314.
- [28] O. Warburg, Die Hauptursache und Verhütung von Krebs, Konrad Tritsch, Würzburg, 1969.
- [29] D.L. Nelson, M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 7th ed., WH Freeman, Madison, 2017.
- [30] L. Stryer, J.M. Berg, J.L. Tymoczko, J.G. Gatto Jr., *Biochemistry*, 9th ed., WH Freeman, Stanford, 2019.
- [31] C.F. Cori, G.T. Cori, The carbohydrate metabolism of tumors: I. The free sugar, lactic acid, and glycogen content of malignant tumors, *J. Biol. Chem.* 64 (1925) 11-22.
- [32] C.F. Cori, G.T. Cori, The carbohydrate metabolism of tumors: II. Veränderungen in der Zucker-, Milchsäure- und CO₂-Bindungskraft des Blutes, das einen Tumor durchströmt, *J. Biol. Chem.* 65 (1925) 397-404.
- [33] O. Warburg, F. Wind, E. Negelein, The metabolism of tumors in the body, *J. Gen. Physiol.* 8 (1927) 519-530.
- [34] E. Hammarsten, Rede zur Preisverleihung. Nobelpreis. [online], <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1955/ceremony-speech/>, (1955), Zugriffsdatum: 27. März 2020.
- [35] A.M. Urbano, L.M.R. Ferreira, J.F. Cerveira, C.F. Rodrigues, M.C. Alpoim, DNA damage, repair and misrepair in cancer and in cancer therapy, in: S. Vengrova (Ed.), *DNA Repair and Human Health*, IntechOpen, 2011, pp. 178-238.
- [36] E. Racker, Bioenergetics and the problem of tumor growth: an understanding of the mechanism of the generation and control of biological energy may shed light on the problem of tumor growth, *Am. Sci.* 60 (1972) 56-63.
- [37] A. Alavi, M. Reivich, Guest editorial: the conception of FDG-PET imaging, *Semin. Nucl. Med.* 32 (2002) 2-5.
- [38] P. Som, H.L. Atkins, D. Bandyopadhyay, J.S. Fowler, R.R. MacGregor, K. Matsui, Z.H. Oster, D.F. Sacker, C.Y. Shiue, H. Turner, C.N. Wan, A.P. Wolf, S.V. Zabinski, A fluorinated glucose analog, 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (F-18): nontoxic tracer for rapid tumor detection, *J. Nucl. Med.* 21 (1980) 670-675.
- [39] E. Racker, Bioenergetik und das Problem des Tumorwachstums, *Am. Sci.* 60 (1972) 56-63.
- [40] X. Liu, C.N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson, X. Wang, Induktion des apoptotischen Programms in zellfreien Extrakten: Bedarf an dATP und Cytochrom c, *Cell*. 86 (1996) 147-157.
- [41] H. Shim, C. Dolde, B.C. Lewis, C.S. Wu, G. Dang, R.A. Jungmann, R. Dalla-Favera, C.V. Dang, c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 6658-6663.
- [42] A.J. Levine, A.M. Puzio-Kuter, The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes, *Science*. 330 (2010) 1340-1344.
- [43] F. Schwartzberg-Bar-Yoseph, M. Armoni, E. Karnieli, The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression, *Cancer Res.* 64 (2004) 2627-2633.
- [44] H. Ying, A.C. Kimmelman, C.A. Lyssiotis, S. Hua, G.C. Chu, E. Fletcher-Sanankone, J.W. Locasale, J. Son, H. Zhang, J.L. Colloff, H. Yan, W. Wang, S. Chen, A. Viale, H. Zheng, J. Paik, C. Lim, A.R. Guimaraes, E.S. Martin, J. Chang, A.F. Hezel, S.R. Perry, J. Hu, B. Gan, Y. Xiao, J.M. Asara, R. Weissleder, Y.A. Wang, L. Chin, L.C. Cantley, R.A. DePinho, Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism, *Cell*. 149 (2012) 656-670.
- [45] I.C.M. Simoes, G. Morciano, M. Lebedzinska-Arciszewska, G. Aguiari, P. Pinton, Y. Potes, M.R. Wieckowski, The mystery of mitochondria-ER contact sites in phy-siology and pathology: a cancer perspective, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2020 (1866) 165834.
- [46] S. Boukalova, S. Hubackova, M. Milosevic, Z. Ezrova, J. Neuzil, J. Rohlena, Dihydropyruvate dehydrogenase in oxidative phosphorylation and cancer, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2020 (1866) 165759.
- [47] L. Torresano, C. Nuevo-Tapióles, F. Santacatterina, J.M. Cuezva, Metabolic reprogramming and disease progression in cancer patients, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2020 (1866) 165721.
- [48] E. Gottlieb, I.P.M. Tomlinson, Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update, *Nat. Rev. Cancer* 5 (2005) 857-866.
- [49] D.R. Borger, K.K. Tanabe, K.C. Fan, H.U. Lopez, V.R. Fantin, K.S. Straley, D.P. Schenkein, A.F. Hezel, M. Ancukiewicz, H.M. Liebman, E.L. Kwak, J.W. Clark, D.P. Ryan, V. Deshpande, D. Dias-Santagata, L.W. Ellisen, A.X. Zhu, A.J. Iafrate, Frequent mutation of isocitrate dehydrogenase (IDH)1 and IDH2 in cholangio- carcinoma identified through broad-based tumor genotyping, *Oncologist*. 17 (2012) 72-79.
- [50] D.W. Parsons, S. Jones, X. Zhang, J.C.-H. Lin, R.J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, H. Carter, L.-M. Siu, G.L. Gallia, A. Olivi, R. McLendon, B.A. Rasheed, S. Keir, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, D.A. Busam, H. Tekleab, L.A.J. Diaz, J. Hartigan, D.R. Smith, R.L. Strausberg, S.K.N. Marie, S.M.O. Shinjo, H. Yan, G.J. Riggins, D.D. Bigner, R. Karchin, N. Papadopoulos, G. Parmigiani, B. Vogelstein, V.E. Velculescu, K.W. Kinzler, An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme, *Science*. 321 (2008) 1807-1812.
- [51] N. Razumilava, G.J. Gores, Cholangiocarcinoma, *Lancet* 383 (2014) 2168-2179.
- [52] P. Wang, Q. Dong, C. Zhang, P.-F. Kuan, Y. Liu, W.R. Jeck, J.B. Andersen, W. Jiang, G.L. Savich, T.-X. Tan, J.T. Auman, J.M. Hoskins, A.D. Misher, C.D. Moser, S.M. Yourstone, J.W. Kim, K. Cibulskis, G. Getz, H.V. Hunt, S.S. Thorgeirsson, L.R. Roberts, D. Ye, K.-L. Guan, Y. Xiong, L.-X. Qin, D.Y. Chiang, Mutations in isocitrate dehydrogenase 1 and 2 occur frequently in intrahepatic cholangiocarcinomas and share hypermethylation targets with glioblastomas, *Oncogene*. 32 (2013) 3091-3100.
- [53] P.S. Ward, J. Patel, D.R. Wise, O. Abdel-Wahab, B.D. Bennett, H.A. Collier, J.R. Cross, V.R. Fantin, C.V. Hedvat, A.E. Perl, J.D. Rabinowitz, M. Carroll, S.M. Su, K.A. Sharp, R.L. Levine, C.B. Thompson, The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate, *Cancer Cell* 17 (2010) 225-234.
- [54] L. Dang, D.W. White, S. Gross, B.D. Bennett, M.A. Bittinger, E.M. Driggers, V.R. Fantin, H.G. Jang, S. Jin, M.C. Keenan, K.M. Marks, R.M. Prins, P.S. Ward, K.E. Yen, L.M. Liao, J.D. Rabinowitz, L.C. Cantley, C.B. Thompson, M.G. Vander Heiden, S.M. Su, Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate, *Nature*. 462 (2009) 739-744.
- [55] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*. 144 (2011) 646-674.
- [56] A. Schulze, A.L. Harris, How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption, *Nature*. 491 (2012) 364-373.
- [57] R.A. Cairns, I.S. Harris, T.W. Mak, Regulation of cancer cell metabolism, *Nat. Rev. Cancer* 11 (2011) 85-95.
- [58] P.L. Abreu, A.M. Urbano, Targeting the Warburg effect for cancer therapy: a long and winding road, *Frontiers in Clinical Drug Research - Anti-Cancer Agents*, 3 Bentham Science Publishers, 2016, pp. 271-324.
- [59] S. Miyata, M. Urabe, A. Gomi, M. Nagai, T. Yamaguchi, T. Tsukahara, H. Mizukami, A. Kume, K. Ozawa, E. Watanabe, An R132H mutation in isocitrate dehydrogenase 1 enhances p21 expression and inhibits phosphorylation of retinoblastoma protein in glioma cells, *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* 53 (2013) 645-654.