

# EL FACTOR INDUCIDO POR LA HIPOXIA-1 (HIF-1) Y LA GLUCÓLISIS EN LAS CÉLULAS TUMORALES\*

Alvaro Marín-Hernández

## RESUMEN

El factor inducido por la hipoxia 1 (HIF-1) tiene un papel fundamental en la respuesta a la baja tensión del oxígeno, ya que regula la expresión de una gran variedad de genes, cuyos productos participan en procesos como la angiogénesis, el metabolismo energético, la eritropoyesis y la proliferación celular. Diversos estudios indican que existe una relación estrecha entre el cáncer y el HIF-1, debido a que los mecanismos que regulan su expresión se encuentran alterados en las células tumorales. El HIF-1 es uno de los factores involucrados en el incremento de la glucólisis en las células tumorales, ya que aumenta la actividad de ciertas isoformas de las enzimas glucolíticas (GLUT1, GLUT3, HKI, HKII, PFK-L, ALD-A, ALD-C, PGK1, ENO- $\alpha$ , PYK-M2, LDH-A, PFKFB-3), promoviendo un aumento del flujo glucolítico (producción de lactato, H<sup>+</sup>, ATP e intermediarios de la glucólisis). Por otra parte, algunas de estas isoformas participan activamente en otros procesos como son la inhibición de la apoptosis (HKI y HKII), la transcripción de histonas (LDH-A) y la migración celular (ENO- $\alpha$ ), las cuales favorecen el desarrollo tumoral.

**PALABRAS CLAVE:** Hipoxia, glucólisis, HIF-1, isoenzimas glucolíticas, células tumorales.

## INTRODUCCION

La baja tensión de oxígeno altera la homeostasis de la célula, lo que conduce a la activación del factor inducido por la hipoxia 1 (HIF-1). El HIF-1 tiene como función incrementar la transcripción de genes cuyos productos son proteínas que participan en la angiogénesis, la eritropoyesis, la proliferación celular, la remodelación vascular y el metabolismo energético;

permitiendo a la célula adaptarse a estas condiciones tan adversas (1).

En la mayoría de los tumores primarios de cerebro, páncreas, mama, colon, ovario, pulmón y próstata, y sus metástasis, se detectan altos niveles del HIF-1 comparados con los tejidos normales de los cuales provienen o tumores benignos (2). Las causas que promueven la sobreexpresión del HIF-1 en las células tumorales son la baja

## ABSTRACT

The hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) is an important key mediator during low-oxygen cellular adaptation. Several genes involved in angiogenesis, erythropoiesis, energy metabolism and cell survival are up-regulated by HIF-1. In tumour cells, HIF-1 overexpression and activation is associated with malignancy, development and angiogenesis; whereas HIF-1 low expression has been determined in normal tissues and benign tumors. At metabolic level, HIF-1-activation stimulates transporters (GLUT1, GLUT3) and glycolytic enzymes (HKI, HKII, PFK-L, ALD-A, ALD-C, PGK1, ENO- $\alpha$ , PYK-M2, LDH-A, PFKFB-3) transcription. In consequence, a significant increment in the glycolytic flux (lactate, ATP, and H<sup>+</sup>) and glycolytic intermediates levels are attained. An additional role of some of these HIF-induced isoforms as activators of survival, histones transcriptional activation (LDH-A), apoptotic inhibition (HKI y HKII) and cellular migration (ENO- $\alpha$ ) pathways is discussed.

**KEY WORDS:** Hypoxia, glycolysis, HIF-1, glycolytic enzymes, tumour cells.

tensión de oxígeno presente en los tumores y las alteraciones en los mecanismos que regulan su expresión. Por lo anterior, el HIF-1 puede considerarse como un marcador tumoral y un blanco terapéutico.

En esta revisión se analiza el papel que juega el HIF-1 en la regulación de la glucólisis, así como las ventajas que ofrece a las células tumorales la expresión de las enzimas

\*Recibido: 19 de agosto de 2008 Aceptado: 14 de abril de 2009

Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez". Departamento de Bioquímica. Juan Badiano No. 1. Col. Sección XVI. México DF, 14080. Correo E: marinhernandez@yahoo.com.mx

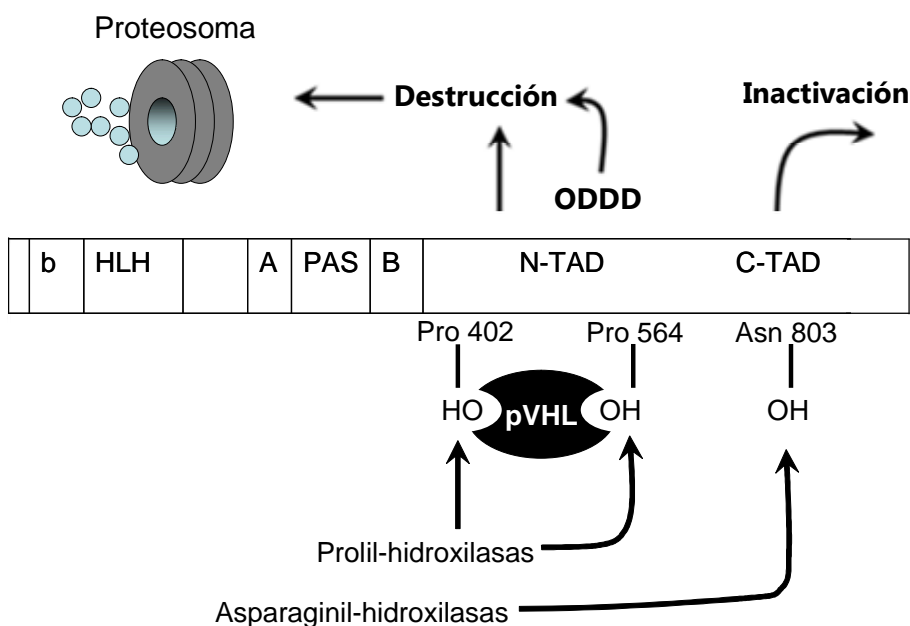
glucolíticas inducida por este factor transcripcional.

### Mecanismos de regulación del HIF-1

El HIF-1 es un heterodímero que incrementa la transcripción de varios genes al unirse al ADN en regiones consenso 5'-RCGTG-3' (R= A o G). Este factor transcripcional está constituido por dos proteínas llamadas HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$  también conocido como ARNT (Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator), las cuales tienen en su extremo amino terminal, un dominio bHLH (basic-Helix-Loop-Helix) y dos dominios PAS (Period clock-Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-Single minded) (Fig. 1). El dominio bHLH regula la dimerización del HIF-1 lo cual controla su unión al ADN. El dominio PAS, al parecer, participa en la selección del gen blanco (1, 3, 4).

Debido a que la expresión del HIF-1 $\beta$  es constitutiva, la actividad del HIF-1 puede ser regulada exclusivamente por la expresión del HIF-1 $\alpha$ . En normoxia (concentración normal de oxígeno ~ 20-50  $\mu$ M), el HIF-1 $\alpha$  no se detecta y su tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) es de 5 minutos, pero en hipoxia (concentración de O<sub>2</sub> del 1% o 12.5  $\mu$ M), su  $t_{1/2}$  aumenta considerablemente hasta 30 minutos (3).

El HIF-1 $\alpha$  tiene un dominio de degradación altamente sensible al oxígeno (ODDD: Oxygen -dependent degradation domain) que regula su estabilidad. Bajo normoxia, este dominio es hidroxilado en las prolinas 402 y 564 por las HIF-1 $\alpha$  prolin-4-hidroxilasas, esto permite su interacción con los aminoácidos 549-572 del dominio  $\beta$  de la proteína von Hippel-Lindau (pVHL) (Fig. 1). El pVHL es un componente del complejo E3 ubiquitin ligasa que es el encargado de ubiquitinar al HIF-1 $\alpha$ , conduciéndolo a ser degradado por el proteosoma (Fig 1). Por otra parte, si el HIF-1 $\alpha$  no es degradado, su activi-



**Figura 1.** Mecanismos de regulación del HIF-1 $\alpha$ . Para que VHL se asocie con el HIF-1 $\alpha$ , éste deberá ser hidroxilado en las prolinas (Pro) 402 y 564 en las regiones ODDD por las HIF-1 $\alpha$  prolin-4-hidroxilasas, el HIF-1 $\alpha$  es degradado por el proteosoma. Cuando el HIF 1 $\alpha$  no es degradado, su actividad transcripcional puede ser inhibida al ser hidroxilada la asparagina (Asn) 803 del dominio de transactivación (CAD) por las asparaginil-aspartil hidroxilasas, lo cual inhibe el reclutamiento de los co-activadores (p300) que se unen a HIF-1 $\alpha$  para formar el complejo transcripcional. Esta es una figura modificada a partir de la referencia 4.

dad transcripcional es bloqueada cuando las asparaginil-aspartil hidroxilasas hidroxilan la asparagina 803, que se encuentra en el dominio de transactivación (CAD) (Fig. 1) (3, 4).

Las hidroxilasas juegan un papel importante en la regulación de la actividad del HIF-1 $\alpha$ , sin embargo, bajo hipoxia no es claro cómo su actividad disminuye. Ambas enzimas necesitan de varios sustratos para catalizar la hidroxilación del HIF-1 $\alpha$ : Fe<sup>2+</sup>,  $\alpha$ -cetoglutarato, ascorbato y oxígeno. Lo que se propone es que bajo hipoxia, la reducción en la concentración de O<sub>2</sub> es la que limita la actividad de las hidroxilasas (3, 4). Sin embargo, con respecto a la concentración de O<sub>2</sub> que se puede encontrar en el citosol, en los capilares y en las arteriolas (~12.5- 50  $\mu$ M) (5), las afinidades (Km) de las hidroxilasas por el O<sub>2</sub> son demasiado altas (90 y 230  $\mu$ M); esto supondría que las dos enzimas se mantendrían

inactivas aún en normoxia dejando al HIF-1 $\alpha$  estable, lo cual no ocurre fisiológicamente. Otra propuesta alternativa es que la disminución en la concentración de O<sub>2</sub> promueve un aumento en la generación de los radicales libres en la mitocondria, al parecer producidos por el complejo III de la cadena respiratoria (6), aunque no es claro como se generan los radicales libres (7). Estos radicales oxidan el Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup> lo que limita la actividad de las hidroxilasas. Esta propuesta se ha comprobado experimentalmente en diversos tipos de células (células de hepatoma, células vasculares de músculo liso, células cardíacas, células de epitelio gástrico, células epiteliales de túbulo renal y macrófagos), al no encontrarse HIF-1 $\alpha$  estable y activo cuando las células son sometidas a hipoxia y tratadas al mismo tiempo con anti-oxidantes (8, 9).

### ¿Cómo es que el HIF-1 $\alpha$ se mantiene estable en las células tumorales?

La estabilización del HIF-1 $\alpha$  se debe a la hipoxia a la que se ven sometidas las células tumorales desde que el tumor tiene un tamaño de 2-3 mm de diámetro, y aunque los tumores puedan generar nuevos vasos sanguíneos (proceso conocido como angiogénesis) estos están desorganizados, son frágiles y angostos por lo que tienen un flujo irregular y dejan, bajo hipoxia, zonas grandes del tumor (1,3).

Bajo normoxia, la estabilización del HIF-1 $\alpha$  se promueve por diversos mecanismos en las células tumorales:

a) La activación de algunos oncogenes como *v-src*, HER2<sup>neu</sup> y H-RAS o con la pérdida de supresores de tumores como p53 y PTEN. Aún no es muy claro el mecanismo por el cual ocurre esto (1, 3).

b) Mutaciones en el factor pVHL que modifican o eliminan el dominio  $\beta$  (el cual interacciona con el dominio ODDD del HIF-1 $\alpha$ ) lo que impide la degradación del HIF-1 $\alpha$  (1,3).

c) La acumulación del lactato y del

piruvato generados por la glucólisis (incrementada en células tumorales), pueden estabilizar al HIF-1 $\alpha$  y evitar que sea degradado. Se sospecha que ambos monocarboxilatos inhiben la actividad de las hidroxilasas porque compiten por el sitio de unión del  $\alpha$ -cetoglutarato (9).

d) Mutaciones en los genes de la succinato deshidrogenasa (SDH) y de la fumarato hidratasa (FH) que propician una respuesta de pseudo-hipoxia que mantiene al HIF-1 $\alpha$  estable. Esto ocurre porque al incrementarse el succinato, producto de la reacción de las hidroxilasas, induce una inhibición por producto, en tanto que el fumarato compite por el sitio de unión del  $\alpha$ -cetoglutarato de estas enzimas (8, 9).

### Glucólisis

En las células tumorales se observa en general un aumento en la velocidad de glucólisis con respecto a los tejidos de origen, inducido por varios mecanismos, entre los que destaca la activación del HIF-1, que induce el incremento en la transcripción de los genes

de la mayor parte de las enzimas que forman la glucólisis (Fig. 2) (Tabla 1) (1). Sin embargo, a pesar de que algunas de las enzimas de la glucólisis tienen varias isoformas (Tabla 1), el HIF-1 solo induce el incremento de algunas de ellas (Fig. 2). En esta sección se analizan las características que posee cada una de las enzimas inducidas por el HIF-1, así como las ventajas que brindan a las células tumorales.

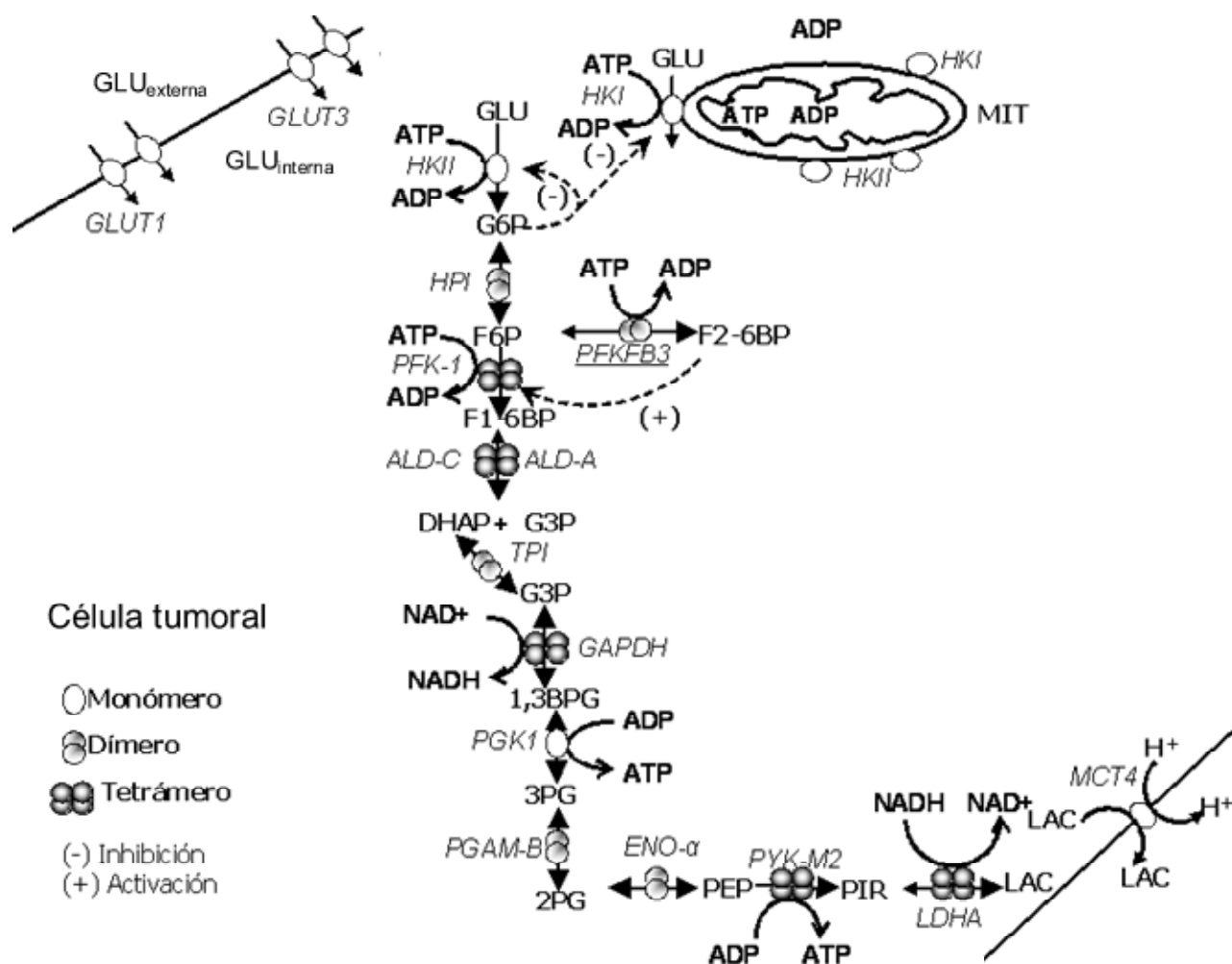
### Transportador de glucosa (GLUT)

La familia de transportadores de glucosa se divide en tres clases. En la clase 1 se agrupa a cuatro transportadores (GLUT1-GLUT4) (Tabla 1) que tienen como sustrato a la glucosa, de los cuales el GLUT1 y el GLUT3 son blanco del HIF-1 $\alpha$  (Fig.2). El GLUT1 se expresa normalmente en todos los tejidos, en tanto que el GLUT3 se encuentra preferentemente en el cerebro. El por qué estos transportadores son sobreexpresados específicamente por el HIF-1 tiene que ver probablemente con sus afinidades por la glucosa (lo que puede favorecer una mayor entrada de

TABLA 1  
Isoformas de los transportadores y enzimas que forman parte de la glucólisis

Enzimas	Genes	Isoformas	Oligomerización
Transportador de glucosa (GLUT)	4	GLUT1, GLUT2, GLUT3 y GLUT4	M
Hexocinasa (HK)	4	HKI, HKII, HKIII y HKIV	M
Hexosa fosfato isomerasa (HPI)	1	No se conocen isoformas	D
Fosfofructocinasa (PFK-I)	3	PFK-L, PFK-M, PFK-P	T
Aldolasa (ALD)	3	ALD-A, ALD-B, ALD-C	T
Triosa fosfato isomerasa (TPI)	1	No se conocen isoformas	D
Gliceraldehído 3-P deshidrogenasa (GAPDH)	1	No se conocen isoformas	T
Fosfoglicerato cinasa (PGK)	2	PGK1 y PGK2	M
Fosfoglicerato mutasa (PGAM)	2	PGAM-A y PGAM-B	D
Enolasa (ENO)	3	ENO- $\alpha$ , ENO- $\beta$ , ENO $\gamma$	D
Piruvato cinasa (PK)	2	PK-R, PK-L, PK-M1, PK-M2	T
Lactato deshidrogenasa (LDH)	3	LDH-A y LDHB	T
Fosfofructocinasa tipo 2 (PFK-II)	4	PFKFB1, PFKFB2, PFKFB3 y PFKFB4	D
Transportador de monocarboxilatos (MCT)	4	MCT1, MCT2, MCT3, MCT4	M

M, monómero; D, dímero; T, Tetrámero.



**Figura 2.** Enzimas de la glucólisis cuyos genes son blancos de HIF-1. HIF-1, factor inducible por la hipoxia-1; GLUT, transportador de glucosa; HK, hexocinasa; HPI, hexosa fosfato isomerasa; PFK, fosfofructocinasa tipo 1; ALD, aldolasa; PFKFB3, fosfofructocinasa tipo II; TPI, triosa fosfato isomerasa; GAPDH, gliceraldehído 3-P deshidrogenasa; PGK, fosfoglicerato cinasa; PGAM, fosfoglicerato mutasa; ENO, enolasa; PK, piruvato cinasa; LDH, lactato deshidrogenasa; MCT, transportador de monocarboxilatos; Glu, glucosa; ext, externa; int, interna; G6P, glucosa 6-fosfato; F6P, fructosa 6-fosfato; F2-6BP, fructosa 2, 6 bifosfato; F1-6BP, fructosa 1,6 bifosfato; DHAP, dihidroxi acetona fosfato; G3P, gliceraldehído 3-fosfato; 1,3BPG, 1,3 bifosfo-glicerato; 3PG, 3-fosfoglicerato; 2PG, 2-fosfoglicerato; PEP, fosfoenolpiruvato; PIR, piruvato; LAC, lactato.

glucosa a la célula, para incrementar la glucólisis), aunque experimentalmente solo se han determinado las afinidades de estos transportadores por análogos como la 2-desoxi-glucosa (GLUT3,  $K_m = 1.8$  mM; GLUT4,  $K_m = 4.6$ ; GLUT1,  $K_m = 6.9$  mM; GLUT2,  $K_m = 17.1$  mM) (10), pero no por la glucosa. Por lo tanto, es difícil establecer si en realidad tienen una afinidad alta por su sustrato fisiológico. Sin embargo, cabe señalar que para observar un incremento en la velocidad de glucólisis es necesario incrementar la cantidad del transportador, pues se ha determinado que esta proteí-

na ejerce un control de flujo importante sobre la glucólisis (30-70%), tanto en las células tumorales como en las no tumorales (11). Así pues, pequeños cambios en la actividad del GLUT modifican significativamente el flujo de la glucólisis.

El GLUT1 es el transportador que más se incrementa en los diversos tipos de cáncer (Tabla 2) (12) sobre todo en aquellos con alta proliferación y malignidad. En cambio, el GLUT3 se puede encontrar en el cáncer de pulmón, de colon, de ovario, de laringe y de glándula mamaria (13).

### Hexocinasa (HK)

La HK tiene cuatro isoenzimas (Tabla 1, la reacción que cataliza se indica en la Fig. 2). HKI, HKII y HKIII tienen un peso molecular de 100 kDa y la glucocinasa (HKIV) un peso de 50 kDa; la diferencia entre las isoenzimas es su afinidad ( $K_m$ ) por la glucosa ( $HKIII > HKI > HKII > HKIV$ ), que va de 0.003 hasta 5 mM. La actividad de las isoenzimas I-III es regulada por la concentración de la glucosa 6-fosfato (G6P) que ejerce mientras que la HKIV es insensible a esta inhibición (14).

Los genes de las HKI y HKII son blanco del HIF-1 (Fig. 2) (1). La sobre-expresión de la HKII ocurre en la mayoría de los tumores, en tanto que en tumores cerebrales se encuentra preferentemente la HKI (Tabla 2) (11). Con el incremento en la actividad de ambas isoenzimas de la HK se propicia un aumento en la velocidad de la glucólisis en las células tumorales, debido a que ejercen un control significativo sobre esta vía (11).

Otra característica que comparten las dos enzimas es que pueden unirse a la membrana externa mitocondrial, a través de un segmento de 15 aminoácidos hidrofóbicos del extremo amino terminal. La asociación de la HK es preferentemente con el canal dependiente de voltaje (VDAC); a través de esta unión se puede impedir la salida del citocromo c mediado por

Bax y Bid (proteínas pro-apoptóticas) con lo cual la célula tumoral se protege contra la apoptosis (15).

#### Hexosa fosfato isomerasa (HPI)

Esta enzima es un homodímero con dos subunidades de 63-kDa (14) de la cual no se conocen isoenzimas (Tabla 1, la reacción que cataliza se indica en la Fig. 2). La HPI (también conocida como AMF, autocrine motility factor) además de participar en la glucólisis, puede promover la migración, la proliferación celular y la metástasis (15). Es factible que esta sea la razón por la cual el HIF-1 incrementa la expresión de esta enzima y se encuentre elevada en los tumores (Tabla 2).

#### Fosfofructocinasa tipo I (PFKI)

La PFKI es un homo-heterotetrámero con un peso aproximado de 380 kDa,

con tres isoenzimas (Tabla 1, la reacción que cataliza se indica en la Fig. 2). La PFK-M que se encuentra en el músculo, la PFK-L que se localiza en el hígado y la PFK-P o C que se encuentra preferentemente en las plaquetas. La combinación de las tres isoenzimas se encuentra en el resto de los tejidos (16).

La PFK-M tiene mayor afinidad por la fructosa 6-fosfato (F6P) ( $K_{0.5} = 0.6-2 \text{ mM}$ ) y es menos sensible a la inhibición inducida por el ATP; la PFK-L es menos susceptible a la inhibición por el citrato ( $K_i \text{ aparente} = 0.18 \text{ mM}$ ); la PFK-P es la isoenzima que tiene la afinidad mas baja por F6P ( $K_{0.5} = 1.4-4 \text{ mM}$ ) y es la más susceptible al efecto inhibitorio del citrato ( $K_i \text{ aparente} = 0.08 \text{ mM}$ ) (17). Consecuentemente, resulta comprensible que en los tumores las isoenzimas

TABLA 2

Tipos de cáncer en donde se han encontrado expresadas algunas isoformas de las enzimas de la glucólisis

Isoformas	Tipos de cáncer																			
	Hígado	Páncreas	Gm	Esófago	Cerebro	Riñón	Pulmón	Piel	Colon	Endo.	Ovario	Cérvix	Laringe	Testículo	C y C.	N. Lin	Próstata	Estomago	Útero	SN
GLUT1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
GLUT3			X				X		X		X		X							
HKI					X									X	X					
HKII	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	
HPI	X	X		X	X	X	X	X			X			X	X	X	X	X	X	
PFK-L				X	X	X	X									X	X			X
ALD-A	X	X	X			X	X	X			X			X	X		X	X	X	X
TPI	X	X	X	X	X	X	X	X			X			X		X	X	X	X	X
GAPDH	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X	X
PGK1	X	X	X	X					X					X		X	X	X	X	X
PGAM-B	X		X				X		X											X
ENO- $\alpha$	X	X		X	X	X	X	X			X	X		X			X	X	X	X
PYK M	X	X	X	X	X	X	X	X			X			X	X	X	X	X	X	X
LDH A	X		X		X		X							X	X	X	X	X	X	X
PFKFBP3			X						X		X						X			
MTC4	No hay reportes																			

Datos obtenidos de las referencias 12, 13, 22, 35 y 36. Gm, glándula mamaria; Endo, endometrio; C y C, cabeza y cuello; N. Lin, nódulos linfáticos; SN, sistema nervioso; LR, linfoma reticular; MO, médula ósea.

PFK-L y PFK-M sean las que se expresan preferentemente, por su baja sensibilidad a sus inhibidores fisiológicos (aunque el HIF-1 solo afecta la expresión de la PFK-L). Por lo que en las células tumorales la PFK se mantiene muy activa contribuyendo así al incremento de la glucólisis.

Además, cabe señalar que en las células tumorales se mantienen niveles elevados de la fructosa 2,6 bifosfato (F2-6BP), el activador mas potente que se conoce de la PFK tipo I (aspecto abordado en la sección de la PFKII) y que reduce significativamente el efecto inhibitorio del ATP y el citrato.

### **Aldolasa (ALD)**

La ALD es un tetrámero de subunidades de 40 KDa, de la cual existen tres isoenzimas (Tabla 1), la ALD-A que se encuentra predominantemente en el músculo, la ALD-B que se encuentra el hígado y la ALD-C en el cerebro, y combinaciones de ellas se distribuyen en todos los tejidos (16).

Las ALDs A y C son más eficientes en catalizar la reacción de la fructosa 1,6 bifosfato (F1-6BP) a gliceraldehído 3-fosfato (G3P) y dihidroxi acetona fosfato (DHAP) ( $F1-6BP > G3P + DHAP$ ) de 10 a 20 veces que la isoenzima B (18), en tanto que la ALD B presentan una mayor afinidad por G3P y DHAP que le permite generar fácilmente F1-6BP (reacción reversa,  $G3P + DHAP > F1-6BP$ ). Debido a esto, la ALD-A y C se encuentran preferentemente en los tejidos con activa glucólisis como el músculo, en cambio la ALD-B se encuentra preferentemente en los tejidos gluconeogénicos como el hígado y el riñón. El HIF-1 incrementa la expresión de las ALD-A y ALD-C (Fig. 2) (1), lo que favorece el incremento de la glucólisis. De manera interesante, la isoenzima A es la que se encuentra expresada predominantemente en los tumores (12) (Tabla 2), aunque cabe

señalar que también se ha reportado el aumento en la expresión de las isoenzimas B y C.

### **Triosa fosfato isomerasa (TPI)**

Es un dímero que consta de dos subunidades de 27 KDa de la cual no se conocen isoenzimas (Tabla 1, la reacción que cataliza se indica en la Fig. 2), aunque pueden encontrarse proteínas con modificaciones post-traduccionales (16). La expresión de la TPI es afectada por el HIF-1, aunque es la enzima con la mayor actividad de todas las enzimas que forman la glucólisis, pues su actividad oscila entre 6-61 U/mg, mientras que el resto de las enzimas de la vía tienen actividades de 0.003 a 0.8 U/mg. Entonces, es probable que el incremento observado en la actividad de la TPI en los tumores (Tabla 2), más que para favorecer el incremento de la glucólisis, su contribución sea en algún otro proceso que aún se desconoce.

### **Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)**

Esta enzima es un homo-tetrámero de subunidades de 37 KDa (14) (Tabla 1, la reacción que cataliza se indica en la Fig. 2). Al igual que otras enzimas de la glucólisis, la GAPDH ejerce otras funciones. Por ejemplo, participa en la endocitosis, en la reparación del ADN (debido a que es una uracil ADN glucosilasa y remueve uracilos), en la transcripción, en la exportación de tARN al núcleo y al parecer puede participar también en la apoptosis (15). En los tumores su incremento es inducido por el HIF-1 lo que puede favorecer alguna de las actividades antes descrita.

### **Fosfoglicerato cinasa (PGK)**

La PGK es un monómero de 48 kDa que tiene dos isoenzimas (Tabla 1, la reacción que cataliza se indica en la Fig. 2); la PGK1 que se expresa en todas las células somáticas y la PGK2 que se expresa solamente en el esper-

matozoide. El HIF-1 induce la expresión de la PGK1 (Fig. 2) (1) y es la isoenzima que se ha encontrado sobre-expresada en los tumores (Tabla 2). La sobre-expresión de la PGK1 puede tener mayor relevancia en otros procesos que en la misma glucólisis, pues se ha determinado que la PGK1 participa en la generación de la angiostatina (inhibidor de la angiogénesis y la metástasis) que es un producto de la proteólisis de la plasmina. Después de ser secretada por el tumor, la PGK1 reduce los enlaces disulfuro de la plasmina con lo cual quedan expuestas secciones que son eliminadas por proteasas, originando la angiostatina (19). Sin embargo, se desconoce la contribución que puede tener la angiostatina en el desarrollo tumoral.

### **Fosfoglicerato mutasa (PGAM)**

Esta enzima cataliza la conversión del 3-fosfoglicerato (3PG) a 2-fosfoglicerato (2PG) (Fig. 2) y tiene como cofactor al 2,3-bisfosfoglicerato (2,3BPG). La PGAM es un dímero (Tabla 1) compuesto por las isoenzimas A y B (AA, BB y AB) las cuales están codificadas por dos genes diferentes (20). Los parámetros cinéticos determinados en las isoenzimas de ratón indican que la afinidad de la PGAM-B por el 3PG ( $K_m = 0.5 \text{ mM}$ ) y el 2,3BPG ( $K_m = 25 \mu\text{M}$ ) es mayor con respecto a la PGAM-A ( $K_m = 0.8 \text{ mM}$  y  $60 \mu\text{M}$ ). En tanto que la afinidad por el 2PG de ambas isoenzimas es similar ( $K_m = 0.28 \text{ mM}$ ) (21).

En estudios realizados con fibroblastos de ratón se encontró que el incremento de ambas isoenzimas favorecía la proliferación e inmortalización de estas células, en tanto que cuando se disminuía su transcripción con ARN de interferencia se inducía una senescencia prematura (22). Por ello se les ha relacionado con la inmortalización de las células tumorales. La sobre-expresión de

la PGAM-B se ha encontrado en diversos tipos de cáncer (hígado, pulmón, colon y glándula mamaria) (22). El HIF-1 regula la expresión de la PGAM-B (23).

### Enolasa (ENO)

Es una metaloenzima dimerica (Tabla 1, la reacción que cataliza se indica en la Fig. 2); cada subunidad tiene un peso molecular de 82-100 KDa. Puede estar constituida por la combinación de tres isoenzimas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , encontrándose solo las siguientes combinaciones  $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$ ,  $\beta\beta$ ,  $\alpha\gamma$  y  $\gamma\gamma$  (24). La ENO- $\alpha$  se encuentra en la mayoría de los tejidos incluyendo el hígado, la ENO- $\beta$  se encuentra preferentemente en el músculo y la ENO- $\gamma$  se encuentra en los tejidos cerebrales (24). La caracterización parcial indica que las isoenzimas tienen una afinidad similar por el 2PG ( $K_m = 30 \mu\text{M}$ ) (25).

El gen de la ENO- $\alpha$  es blanco del HIF-1 y se ha observado el aumento en su transcripción en diversos tipos de cáncer (Tabla 2). Esta isoenzima puede favorecer el crecimiento y la diseminación de los tumores (metástasis), debido a que actúa como receptor del plasminógeno. El sistema del plasminógeno se encarga de degradar los coágulos de fibrina que se generan en el organismo, así como de favorecer la migración celular debido a que facilita la penetración a través de las barreras proteicas (24).

### Piruvato cinasa (PYK)

Esta enzima es un tetrámero con cuatro isoenzimas (Tabla 1, la reacción que cataliza se indica en la Fig. 2). La PYK-L que se encuentra en hígado y riñón (tejidos gluconeogénicos) y la PYK-R que se expresa en eritrocito son codificadas por el mismo gen (compuesto de 12 exones), pero por el uso de promotores alternativos se transcribe una u otra isoforma. El promotor específico para PYK-R se localiza en el exón 1 y para PYK-L en

el exón 2. La isoenzima PYK-M1 se encuentra en cerebro, corazón y músculo y la PYK-M2 se expresa en las células con activa proliferación como células embrionarias, células stem, leucocitos, plaquetas y células tumorales. Las isoenzimas M1 y M2 son productos de un mismo gen sometido a splicing alternativo (25).

La PYK-M1 es la única isoforma que no presenta cooperatividad con respecto al fosfoenolpiruvato (PEP). La PYK-M1 tiene la mayor afinidad por PEP ( $K_m = 0.08 \text{ mM}$ ), mientras que la PYK-R tiene la menor afinidad ( $K_m = 1.4 \text{ mM}$ ). Tres de las cuatro isoenzimas (R, L y M2) se activan por F1-6BP ( $K_a = 0.06$  a  $0.4 \mu\text{M}$ ). El ATP ejerce una potente inhibición sobre las isoformas L y R ( $K_i = 0.1$  y  $0.04 \text{ mM}$ , respectivamente) y una ligera inhibición sobre las isoformas M1 y M2 ( $K_i = 3$  y  $2.5 \text{ mM}$ , respectivamente). La actividad de la PYK-L y PYK-R también se regula por fosforilación/desfosforilación en cambio, las isoenzimas M1 y M2 no son fosforiladas y por lo tanto no son reguladas por acción hormonal (26).

El HIF-1 incrementa la expresión de la isoenzima M2, que es la principal isoenzima que se encuentra en tumores (Tabla 2). Esto puede favorecer a la glucólisis por ser poco sensible al efecto inhibitorio del ATP y no ser regulada por fosforilación. Además, la PYK-M2 se encuentra como dímero (poco activa) y como tetrámero (activa); la proporción de estas dos formas depende de las concentraciones de F1-6BP y de algunas oncoproteínas (pp60 v-src y HPV-16 E7) (27). Recientemente se ha establecido que la PYK-M2 es la única isoenzima que une péptidos fosforilados en tirosina; estos péptidos se inducen al ser estimulada la célula por factores de crecimiento (28). A su vez, los péptidos y las oncoproteínas que interaccionan directamente con la enzima, inducen la liberación del activador (F1-6BP) de la

PYK-M2, propiciando la dimerización de la enzima y su inactivación. Con esto disminuye el flujo glucolítico y se acumulan los intermediarios de la vía antes de la PYK, con lo que se favorece la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos indispensables para la duplicación celular (27, 28).

### Lactato deshidrogenasa (LDH)

Esta enzima es un tetrámero con 2 isoenzimas, LDH-A (isoenzima de músculo) y LDH-B (isoenzima de corazón) y con cinco combinaciones formadas a partir de las dos isoformas (Tabla 1, la reacción que cataliza se indica en la Fig. 2); LDH1 ( $B_4$ ), LDH-2 ( $B_3A$ ), LDH-3 ( $B_2A_2$ ), LDH-4 ( $BA_3$ ) y LDH-5 ( $A_4$ ), las cuales difieren en sus propiedades cinéticas. En testículo y en los espermatozoides se expresa exclusivamente otra isoenzima de la LDH conocida como LDH-C<sub>4</sub> (29).

En los tejidos en donde se generan grandes cantidades de lactato (hígado y músculo esquelético) se encuentra predominantemente LDH-5 y LDH-4, isoenzimas con alto contenido subunidad A que preferentemente genera lactato a partir del piruvato. En cambio en aquellos tejidos que consumen lactato (corazón, eritrocito y riñón) se encuentran predominantemente las isoenzimas con mayor proporción de la subunidad B (LDH-1 y LDH-2) que tienen mayor afinidad por lactato ( $K_m = 4 \text{ mM}$ ) con respecto a la isoenzima A ( $K_m = 7 \text{ mM}$ ) (30).

Es claro que para favorecer el aumento en la velocidad de glucólisis y por lo tanto la producción de lactato, el HIF-1 induce la sobre-expresión de la LDH-A (Fig. 2). Sin embargo, puede que el incremento en la cantidad de esta enzima también sea para favorecer otras de las actividades que realiza. Diversos reportes indican que la enzima se une a ADN de una sola cadena por lo cual se especula sobre su participación en la transcripción. La unión de la LDH al ADN se inhibe por NADH, porque los

sitios de la enzima que permiten la unión a la cadena de ADN son próximos al sitio de unión de la coenzima; por ello se considera que la relación NADH/NAD<sup>+</sup> puede regular la unión de la LDH al ADN. Además, se ha encontrado que la LDH forma parte de un complejo transcripcional denominado OCA-S el cual en fase S induce la transcripción de la histona H2B (15).

### Fosfofructocinasa tipo II (PFK-II)

Esta es una enzima homodimérica bifuncional con actividad de cinasa y bifosfatasa que se localizan en los extremos carboxilo y amino terminal, respectivamente (31). Regula las concentraciones de F2-6BP (el activador más potente de la PFK-I), ya que la cinasa sintetiza F2-6BP a partir de F6P y ATP, en tanto que la bifosfatasa degrada la F2-6BP a F6P y fosfato inorgánico (Fig. 2). Así, la relación cinasa/bifosfatasa determina que reacción se favorece y por lo tanto el contenido de F2-6BP en la célula. A su vez, las dos actividades en la enzima se regulan por algunos metabolitos (PEP,  $\alpha$ -glicerol fosfato y citrato) y por fosforilación en la serina 32 por la proteína cinasa A, que inhiben la actividad de cinasa y favorecen la de fosfatasa (31).

En el genoma de la rata y del humano hay cuatro genes (PFKFB-1, 2, 3 y 4) que codifican para cuatro isoenzimas (hígado, corazón, placenta y testículo) (Tabla 1) de la PFK-II. Al parecer los cuatro genes pueden ser regulados por HIF-1, aunque solo para el gen de la PFKFB-3 se ha demostrado la presencia de secuencias consenso para la unión de este factor de transcripción (32). El producto de este gen (isoenzima de placenta) se llega a encontrar sobre-expresado en una gran variedad de tumores (Tabla 2). La presencia de esta isoenzima propicia un aumento en la concentración de la F2-6BP, debido a que la actividad de fosfatasa es muy baja (0.2 mU/mg para

la enzima recombinante) en comparación de la actividad de cinasa (140 mU/mg); estos valores de actividad corresponden a una relación cinasa/fosfatasa de 710 que, comparado al valor de otras isoenzimas (0.4-4.1) es muy alto. Además se ha descrito que la actividad de cinasa de PFKFB-3 no se inhibe por fosforilación, debido a que esta isoenzima carece del sitio de fosforilación (serina 36) (31).

El aumento en la concentración de F2-6BP en las células tumorales favorece el incremento en el flujo glucolítico, debido a que la PFK-I se activa al máximo y deja de ser inhibida por el ATP y el citrato.

### Transportador de monocarboxilatos (MCT)

Con el aumento en la glucólisis, el lactato y los H<sup>+</sup> que se producen tienen que ser expulsados por las células tumorales antes de que induzcan estrés osmótico y la acidificación del citosol, lo cual afectaría la homeostasis de la célula (33).

La familia de MCTs está compuesta por 14 miembros. Se ha documentado experimentalmente que los primeros cuatro miembros (MCT1-MCT4) transportan y expulsan L-lactato así como otros importantes monocarboxilatos (piruvato y cuerpos cetónicos) junto con un protón. La expulsión del lactato (generado por la glucólisis) se favorece con la disminución del pH a nivel intracelular.

El MCT1 se encuentra en todos los tejidos, mientras, el MCT2 se expresa en el riñón y el cerebro. En retina se localiza el MCT3, en tanto el MCT4 se localiza preferentemente en los tejidos con una activa glucólisis, como músculo esquelético, leucocitos, testículo, pulmón, placenta y corazón. Las afinidades que se han determinado para las cuatro isoformas oscilan entre 0.7 a 28 mM por L-lactato y de 0.1 a 150 mM por piruvato, siendo el MCT4 el que mostró la afinidad mas

baja por ambos sustratos ( $K_m = 28$  y 150 mM) (33).

Hasta el momento, no hay estudios enfocados en determinar que isorformas de los MCTs se expresan en los diversos tipos de cáncer, aunque recientemente se describió que MCT4 se sobre-expresa por el HIF-1(34). Por lo tanto, no se descarta que MCT4 se sobre-exprese en algunos tipos de cáncer.

La expresión del MCT4 favorece el incremento de la glucólisis debido a que la baja afinidad del transportador por piruvato impide la rápida expulsión de éste del interior de la célula. Esto permite que la LDH-A lo utilice para regenerar NAD<sup>+</sup> (Fig. 2), sustrato indispensable para que se mantenga la glucólisis activa. Además, este transportador expulsa al lactato y los H<sup>+</sup> (productos de la reacción de la LDH-A), impidiendo la disminución del pH intracelular que afectaría la actividad de las enzimas de la glucólisis (Fig. 2).

Integrando la información anterior, el HIF-1 incrementa la velocidad de la glucólisis en las células tumorales debido a que induce un aumento en la actividad de todas las enzimas que forman parte de esta vía metabólica. En primera instancia el HIF-1 incrementa la actividad de las enzimas que controlan la glucólisis como el transportador de glucosa (GLUT1 y GLUT3) y la hexocinasa (HKI y HKII). Con ello se facilita la entrada de la glucosa y su fosforilación, generándose G6P. Con el incremento en la actividad de la HPI se favorece la conversión de la G6P a F6P. Posteriormente la PFK-L toma la F6P para generar F1-6BP, esta enzima es muy activa debido a su baja sensibilidad a la inhibición ejercida por el ATP y el citrato, lo que permite que no se frene la glucólisis. El aumento en la concentración de la F2-6BP (potente activador de la enzima) inducido por la PFKII (isoenzima



PFKFB-3) contribuye en esta falta de sensibilidad. A partir de la F1-6BP la ALD A o ALD C generan G3P y DHAP, como estas enzimas catalizan con mayor eficiencia esta reacción que la reacción reversa ( $G3P + DHAP > F1-6BP$ ), permiten la acumulación de G3P y DHAP, para que puedan ser tomados por la TPI (que transforma la DAHP a G3P) y la GAPDH (que transforma al G3P a 1,3 bifosfoglicerato). Con el incremento en la actividad de la PGK, de la PGAM y de la ENO se favorece la transformación del 1,3 bifosfo-glicerato a PEP con la generación de ATP. El PEP es tomado por la PYK-M2 para producir piruvato y ATP. Esta enzima es muy activa a causa de que no es inhibida por el ATP, es activada por la F1-6BP y no es fosforilada por acción hormonal. El piruvato producido es transformado en lactato por la LDH-A regenerando el  $NAD^+$  (Fig. 2), lo que permite que se mantenga funcionando la glucólisis. La baja afinidad que tiene la LDH-A por el lactato impide catalizar eficientemente la reacción reversa ( $lactato > piruvato$ ) y por lo tanto de-

tener a la glucólisis. Finalmente la expresión del MTC-4 permite que el piruvato generado no salga de la célula para que se regenere el  $NAD^+$ , además de expulsar eficientemente el lactato y los  $H^+$  que afectan el pH intracelular.

Por otra parte el HIF-1 favorece el desarrollo de las células tumorales al inducir la expresión de enzimas de la glucólisis, que pueden participar en otros procesos como: la transcripción (GAPDH, LDH-A), la reparación del ADN (GAPDH), la migración celular (HPI), la inhibición de la apoptosis (HKI y HKII), la proliferación celular (PGAM-B, HPI), la inmortalización celular (PGAM-B), la invasión ( $ENO-\alpha$ , HPI) y la metástasis ( $ENO-\alpha$ , HPI).

### Conclusiones

Con base en la información vertida en esta revisión, podemos concluir que el HIF-1 incrementa la expresión de determinadas isoformas de las enzimas glucolíticas en las células tumorales (Tabla 2), para favorecer el aumento de la glucólisis y de otros

procesos (transcripción reparación del ADN, migración celular, inhibición de la apoptosis, proliferación celular, inmortalización celular, invasión y metástasis), que permiten el desarrollo de los tumores. Por ello, el HIF-1 es un blanco terapéutico atractivo.

A este respecto, existen avances y la inhibición del HIF-1 ha dado como resultado una reducción en el crecimiento tumoral. Sin embargo, en algunos tipos de cáncer la inhibición del HIF-1 causó un aumento en la proliferación celular (37). Por tal motivo, es indispensable establecer cuales son las circunstancias que favorecen uno u otro efecto, ya que hasta el momento no es muy claro. Adicionalmente, la inhibición del HIF-1 puede acarrear algunos efectos secundarios adversos, sobre todo por que este factor participa en varios procesos fisiológicos como en el desarrollo del corazón, del sistema vascular y de los osteoblastos. Además de ser un factor clave en el desarrollo embrionario y en el mantenimiento del sistema inmune (37).

## REFERENCIAS

1. Semenza GL (2000) HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 88: 1474-1480.
2. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs W, Semenza GL, Simons JW (1999) Overexpression of hypoxia-inducible factor  $1\alpha$  in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 59: 5830-5835.
3. Fedele AO, Whitelaw ML, Peet DJ (2002) Regulation of gene expression by the hypoxia-inducible factors. *Molecular Interventions* 2, 229-243.
4. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM (2006) Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 441: 437-443.
5. Ward JPT (2008) Oxygen sensors in context. *Biochim. Biophys. Acta* 1777: 1-14.
6. Bell EL, Klimova TA, Eisenbart J, Moraes CT, Murphy MP, Budinger GRS, Chandel NS (2007) the Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. *J. Cell. Biol.* 177: 1029-1036.
7. Guzy RD, Schumacker PT (2006) Oxygen sensing by mitochondrial at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp. Physiol.* 91: 807-819.
8. Lee K, Roth RA, LaPres JJ. (2007) Hypoxia, drug therapy and toxicity. *Pharmacol. Ther.* 113, 229-246.
9. Pouyssegur J, Mechta-Grigoriou (2006) Redox regulation of the hypoxia-inducible factor. *Biol. Chem.* 387: 1337-1346.
10. Burant CF, Bell GI (1992) Mammalian facilitative glucosa transporters: evidence for similar substrate recognition sites in functionally monomeric proteins. *Biochemistry* 31: 10414-10420.

11. Marín-Hernández A, Rodríguez-Enríquez S, Vital-González PA, Flores-Rodríguez FL, Macías-Silva M, Sosa-Garrocho M, Moreno-Sánchez R (2006) Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *FEBS J.* 273: 1975-1988.
12. Alterberg B, Greulich KO (2004) Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics* 84: 1014-1020.
13. Macheda ML, Rogers S, Best JD (2005) Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J. Cell. Physiol.* 202: 654-662.
14. Wilson JE (2003) Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J. Exp. Biol.* 206:2049-2057.
15. Kim JW, Dang CV (2005) Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *TRENDS Biochem. Sci.* 30: 142-150.
16. van Wijk R, van Solinge WW (2005) The energy-less red blood cell is lost-erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. *Blood* 106: 4034-4042.
17. Danaway GA, Kasten TP, Sebo T, Trapo R (1988) Analysis of the phosphofructokinase subunits and isoenzymes in human tissues. *Biochem. J.* 251:677-683.
18. Pezza JA, Choi KH, Berardini TZ, Beernink PT, Allen KN, Tolan DR (2003) Spatial clustering of isozyme-specific residues reveals unlikely determinants of isozyme specificity in fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *J. Biol. Chem.* 278: 17307-17313.
19. Lay AJ, Jiang XM, Kisker O, Flynn E, Underwood A, Condron R, Hogg PJ (2000) Phosphoglycerate kinase acts in tumour angiogenesis as a disulphide reductase. *Nature* 408: 869-873.
20. Repiso A, Ramirez Bajo MJ, Vives Corrons JL, Carreras J, Climent F (2005) Phosphoglycerate mutase BB isoenzyme deficiency in a patient with non-spherocytic anemia: familial and metabolic studies. *Haematologica* 90: 257-259.
21. Fundele R, Krietsch WKG (1985) Purification and properties of the phosphoglycerate mutase isoenzymes from the mouse. *Comp. Biochem. Physiol.* 81:965-968.
22. Kondoh H, Leonart ME, Gil J, Wang J, Degan P, Peters G, Martinez D, Camero A, Beach D (2005) Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. *Cancer Res.* 65: 177-185.
23. Tarahashi Y, Tarahashi S, Yoshimi T and Miura T (1998) Hypoxia-induced expression of phosphoglycerate mutase B in fibroblast. *Eur. J. Biochem.* 254:497-504.
24. Pancholi V (2001) Multifunctional  $\alpha$ -enolase: its role in diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 58:902-920.
25. Shimizu A, Suzuki F, Kato K (1983) Characterization of alpha alpha, beta beta, gamma gamma and alpha gamma human enolase isoenzymes, and preparation of hybrid enolases (alpha gamma, beta gamma and alpha beta) from homodimeric forms. *Biochem. Biophys. Acta* 748:278-284.
26. Imamura K, Tanaka T (1982) Pyruvate kinase isozymes from rat. *Methods Enzymol.* 90:150-165.
27. Mazurek S, Grimm H, Boschek CB, Vaupel P, Eigenbrodt E (2002) Pyruvate kinase type M2: a crossroad in the tumor metabolome. *Brit. J. Nutr.* 87:23-29.
28. Chirstofk HR, Vander Heiden MG, Wu N, Asara JM, Cantley LC (2008) Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature* 452:181-188.
29. Drent M, Cobben NAM, Henderson RF, Wouters EFM, van Diejen-Visser M (1996) Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes as indicators of lung damage or inflammation. *Eur. Respir. J.* 9:1736-1742.
30. Buhl SN, Jackson KY, Vanderlinde RE (1977) The effect of temperature on kinetic constants of human lactate dehydrogenase 1 and 5. *Clin. Chem. Acta* 80: 265-270.
31. Okar DA, Manzano A, Navarro-Sabate A, Riera LI, Bartrons R, Lange AJ (2001) PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2, 6-bisphosphate. *TRENDS Biochem. Sci.* 26: 30-35.
32. Obach M, Navarro-Sabate A, Caro J, Kong X, Duran J, Gómez M, Perales JC, Ventura F, Rosa JL, Bartrons R (2004) 6-phosphofructo-2-kinase (*pfkfb3*) gene promoter contains hypoxia-inducible factor-1 binding sites necessary for transactivation in response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* 279: 53562-53570.
33. Halestrap AP, Meredith (2004) The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MTCs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch.* 447:619-628.
34. Ullah MS, Davis AJ, Halestrap AP (2006) The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 $\alpha$ -dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 281:9030-9037.
35. Balinsky D, Platz CE, Lewis JW (1983) Isozyme patterns of normal, benign, and malignant human breast tissues. *Cancer Res.* 43: 5895-5901.
36. Atsumi T, Chesney J, Metz A, Leng L, Donnelly S, Makita Z, Mitchell R, Bucala R (2002) High expression of inducible 6-phosphofructokinase-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (iPFK-2; PFKFB3) in human cancers. *Cancer Res.* 62: 5881-5887.
37. Weidemann A, Johnson RS (2008) Biology of HIF-1 $\alpha$ . *Cell Death Differ.* 15: 621-627.