

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko- biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Karolína Kolářová

Role kaspázy-3 při apoptóze

The role of caspase-3 in apoptosis

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Tereza Tlapáková, Ph.D.

Praha, 2022

Poděkování

Ráda bych poděkovala mé školitelce, paní RNDr. Tereze Tlapákové, Ph.D., za vstřícný přístup a možnost vypracování bakalářské práce pod jejím vedením. Také bych chtěla poděkovat mému příteli, rodině a kamarádům za jejich podporu při celém mém studiu.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného akademického titulu.

V Praze 4. 8. 2022

Karolína Kolářová

ABSTRAKT

Kaspázy zajišťují v organismech protizánětlivé, apoptotické, ale také vývojové procesy. Jedná se o enzymy se širokou působností ve všech buňkách. Pokud však dojde k narušení jejich správné funkce, může docházet k různým patologickým stavům. Od 90. let jsou kaspázy zajímavým tématem pro vědce, neboť jejich přímá spojitost se spouštěním apoptotických procesů je nadějnou možností terapie chorob, které s apoptózou souvisí, jako je například rakovina, neurodegenerativní onemocnění, ale také srdeční ischemie či diabetes. Kaskáda apoptotických procesů je řízena právě zmíněnými kaspázami, které se nachází v tzv. kaspázové kaskádě. Pokud dojde ke spuštění kaskády v buňce, děje se tak kvůli přítomnému signálu „nebezpečí“, který však může být velmi různý. Nejznámějšími spouštěči apoptotické kaskády jsou např. aktivovaný receptor Fas a ligand FasL, cytochrom c přítomný v cytoplazmě, nevyrovnané množství IAPs v buňce, poškozená DNA, a mnoho dalších. Po přijetí signálu, dochází k aktivaci iniciační kaspázy-2, kaspázy-8, kaspázy-9, které následně aktivují efektorové kaspázy. Kaspáza-3, kaspáza-6 a kaspáza-7 štěpí mnohé substráty, čímž propagují apoptózu. Kaspáza-3 je tedy efektorovým enzymem zodpovědným za samotné provedení apoptózy.

Vlastnosti kaspázy-3 nejsou ale pouze jen apoptotické, podílí se také na proliferaci, regeneraci i diferenciaci buněk. Kaspáza-3 a její inhibitory lze využít k potlačení či léčbě nemocí související s apoptózou.

Klíčová slova: kaspáza-3, apoptóza, proliferace, rakovina, neurodegenerativní onemocnění

ABSTRACT

Caspases provide anti-inflammatory, apoptotic and developmental processes in organisms. They are enzymes with a wide range of activities in all cells, and various pathogeneses can occur if their proper function is disturbed. Since the 1990s, caspases have been a topic of interest for scientists, as their direct link to the triggering of apoptotic processes is a promising possibility for the therapy of diseases related to apoptosis, such as cancer, neurodegenerative diseases, but also cardiac ischemia and diabetes. The cascade of apoptotic processes is controlled by the aforementioned caspases, which are located in the caspase cascade. When the cascade is triggered in a cell, it is due to the presence of a "danger" signal, which can be very different. The most well-known triggers of the apoptotic cascade include activated Fas receptor and FasL ligand, cytochrome c present in the cytoplasm, an imbalance of IAPs in the cell, damaged DNA, and many others. Upon receipt of a signal, initiator caspase-2, caspase-8, and caspase-9 are activated, which in turn activate effector caspases-3, caspase-6, and caspase-7, cleaving many substrates to promote apoptosis. Thus, caspase-3 is the effector enzyme responsible for the actual execution of apoptosis.

However, caspase-3 properties are not only apoptotic, it is also involved in cell proliferation, regeneration and differentiation. Caspase-3 and its inhibitors can be used to suppress or treat apoptosis-related diseases.

Key words: caspase-3, apoptosis, proliferation, cancer, neurodegenerative disease

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. KASPÁZY.....	2
2.1. Struktura	2
2.2. Mechanismus štěpení vazeb	5
2.3. Substráty	6
3. KASPÁZA-3	7
3.1. Apoptotické funkce.....	10
3.2. Neapoptotické funkce	10
Proliferace	10
Diferenciace	10
4. APOPTÓZA	11
4.1. Vnitřní aktivace	13
4.2. Vnější aktivace.....	15
5. ONEMOCNĚNÍ SOUVISEJÍCÍ S APOPTÓZOU	16
5.1. Rakovina	16
5.2. Alzheimerova choroba.....	18
5.3. Huntingtonova choroba	19
5.4. Srdeční ischemie	19
5.5. Autoimunitní onemocnění	19
Diabetes Mellitus I. typu	19
6. ZÁVĚR.....	20
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	21

SEZNAM ZKRATEK

A β	Amyloid beta
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor- 1
APP	Amyloid precursor protein
Ala, A	Alanin
Arg, R	Arginin
Asn, N	Asparagin
Asp, D	Kyselina asparagová
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bid	BH3-interacting domain death antagonist
CAD	Caspase-activated deoxyribonuclease
CARD	Caspase activating recruiting domain
Cys, C	Cystein
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DISC	Death inducing signalling complex
FADD	Fas-associated death domain
FasL	Fas ligand
FasR	Fas receptor
Gln, Q	Glutamin
Glu, E	Kyselina glutamová
Gly, G	Glycin
His, H	Histidin
HTT	Huntigtin gen
IAP	Inhibitor of apoptosis
ICAD	Inhibitor CAD
MOMP	Mitochondria outer membrane permeabilization

Phe, F	Fenylalanin
Ser, S	Serin
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspases
tBid	Truncated Bid
Thr, T	Threonin
TNF	Tumor necrosis factor
Tyr, Y	Tyrosin
Val, V	Valin
XIAP	X- linked IAP

1. ÚVOD

Apoptóza je důležitou a nedílnou součástí všech organismů. Jedná se o regulační mechanismus, který zamezuje přežití poškozené, infikované a patogenní buňky, ale je také naprosto klíčovým procesem vývoje tělních dutin, orgánů, nervové soustavy (Glücksman, 1951), končetin (Macias et al., 1997), diferenciací buněk a regulace počtu buněk (Voss & Strasser, 2020). První definice apoptózy popisovala morfologické změny buněk procházejících apoptózou, které byly odlišitelné od nekrotických buněk (Kerr et al., 1972). Jedná se především o kondenzaci chromatinu, zmenšení objemu buňky, degradaci buněčného cytoskeletu a následné tvorby apoptotických tělísek.

Proces apoptózy je přísně regulován a pokud dojde k jakémukoli narušení, dochází k rozvoji patogenních stavů. Hlavními regulátory apoptózy jsou především kaspázy, proteiny rodiny Bcl-2 a IAPs. Abnormální regulace apoptózy může vést k nesprávnému vývoji buněk, tvorbě rakoviny a autoimunitních či neurodegenerativních onemocnění. Jednotlivé mechanismy spuštění apoptózy budou vysvětleny v této práci v souvislosti s kaspázou-3, neboť se jedná o klíčový enzym vyskytující se v kaspázové kaskádě, která stojí na začátku apoptózy. Tento proces zániku buněk může být vyvolán mnohými faktory. Vnitřními signály, jako například detekce poškozené a fragmentované DNA, výskyt cytochromu c v cytoplazmě anebo vnějšími, interakcí TNF receptorů s jejich ligandy. Ve všech zmíněných případech dojde v buňkách k narušení homeostázy, tj. stability vnitřního prostředí a za normálních okolností je buňka degradována.

Jelikož je rakovina jednou z nejčastějších příčin úmrtí na světě, mnoho vědců se snaží o nalezení efektivní metody léčby. Dle predikce Sung et al. (2021) lze v roce 2040 očekávat přes 28 milionů nových případů rakoviny. Je tedy pochopitelné, že snaha objevovat přesné a účinné metody léčby je velká. Z důvodu klíčové role kaspázy-3 v apoptóze je cíleno při léčbě na aktivaci i inhibici tohoto enzymu.

Cílem této práce je shrnout poznatky o enzymu, který je hlavním spouštěčem apoptotických procesů v buňkách a je také zodpovědný za správný vývoj mnoha tkání.

2. KASPÁZY

Kaspázy jsou rodina enzymů se schopností endoproteasového štěpení, tj. přerušení peptidových vazeb uvnitř substrátu (Cade & Clark, 2015). Prvním objeveným genem souvisejícím s apoptózou byl *ced-3* *Caenorhabditis elegans* (Ellis & Horvitz, 1986), jehož homologem u savců je ICE. Název genu byl odvozen z anglického „interleukin-1- β converting enzyme“ a nyní je označován jako kaspáza-1. Dodnes bylo u člověka identifikováno celkem 12 kaspáz (Eckhart et al., 2008).

Kaspázy jsou evolučně konzervované a jejich struktura i mechanismus aktivity je napříč zástupci stejný (Sakamaki & Satou, 2009). Svůj anglický název „caspase“ získaly odvozením od jejich struktury aktivního místa, které obsahuje nukleofilní cystein- „c“, dále podle jejich charakteristického štěpení za tetrapeptidovým motivem s molekulou aspartátu- „asp“ a faktu, že se jedná o proteázy „protease“ (Alnemri et al., 1996).

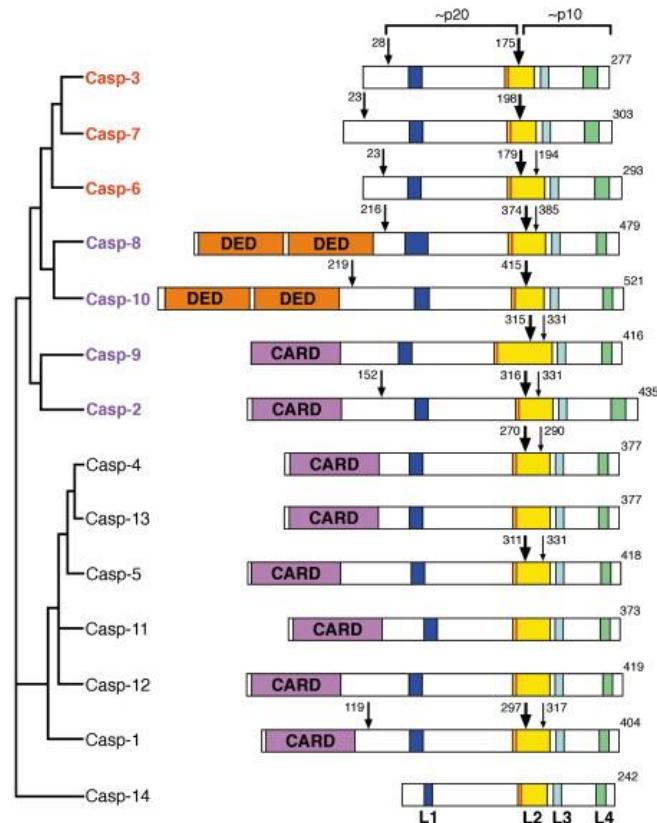
2.1. Struktura

Kaspázy jsou v buňkách syntetizovány nejprve ve formě neaktivního zymogenu, tzv. prokaspázy. Skládají se z velké podjednotky, malé podjednotky a N-koncové prodomény (Shi, 2002). Velká podjednotka zprostředkovává proteolýzu, zatímco malá podjednotka tvoří oblast pro vazbu substrátu. Podjednotky jsou spojeny linkerem, který udržuje prokaspázy v neaktivní formě, neboť konformace při spojení podjednotek není vhodná pro navázání substrátu. Prodomény, lišící se délkou a složením, určují funkční vlastnosti kaspáz, podle kterých je můžeme rozřítit do dvou základních skupin, na zánětlivé a apoptotické (Obr. č. 1) (McIlwain et al., 2013). Jedinou výjimkou z tohoto rozdělení je kaspáza-14, která řídí diferenciaci keratinocytů (Denecker et al., 2007).

Sekundární struktura monomeru kaspáz je tvořena ze 6 β -listů a 5 α -helixů, které spojují 4 smyčky (loops), tvořící oblast pro vazbu substrátu. Tento motiv je konzervován napříč kaspázami. Smyčky jsou označovány písmenem L a číslem 1-4. V místě L2 se nachází katalytický cystein (Obr. č. 1), který slouží jako nukleofil zprostředkovávající hydrolyzu vazby substrátu (Stennicke & Salvesen, 1999).

Skrze prodomény, CARD či DED, dochází k provázání kaspáz s adaptorovými molekulami a tvorbě makromolekulárních proteinových struktur. Zánětlivé kaspázy-1, kaspáza-4, kaspáza-5, kaspáza-12 obsahují CARD doménu (Martinon et al., 2002). V případě aktivace imunitní odpovědi CARD domény umožní připojení kaspáz ke CARD doménám inflammasomu (Xu et al., 2021). Apoptotické kaspázy jsou dále děleny podle pozice v kaskádě

a podle funkce na dva základní typy, a to iniciační kaspázy, vyskytující se na začátku kaskády, a efektorové kaspázy, které spouští apoptózu. Liší se délkou i typem N-koncové prodomény. Efektorová kaspáza-3, kaspáza-6, kaspáza-7 nemají doménu s funkčním motivem, ale pouze krátký peptid, zatímco iniciační kaspázy mohou mít CARD doménu (kaspáza-8, kaspáza-10), anebo DED doménu (kaspáza-2, kaspáza-9) (Nicholson, 1999).



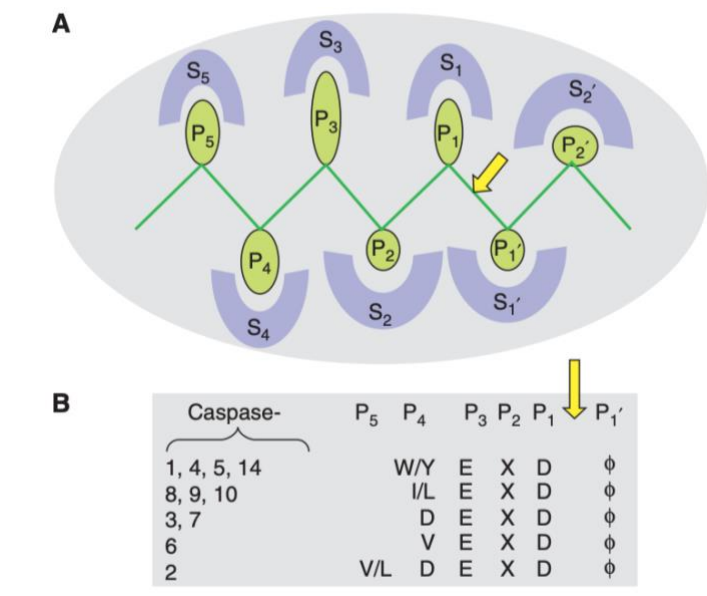
Obrázek č. 1- Rozdělení kaspáz dle funkcí- kaspázy apoptotické iniciační (-2, -8, -9, -10) a efektorové (-3, -6, -7) zánětlivé (-1, -4, -5, -11, -12, -13) a kaspáza-14 (zodpovědná za diferenciaci keratinocytů. Grafické zobrazení rozlišuje DED a CARD prodomény, velkou (p20) a malou (p10) podjednotku, šipkou místo, kde dochází k proteolýze linkeru a domény. Červenou barvou je označen cystein, který se nachází na L2. Převzato z Shi (2002).

Iniciační prokaspázy jsou syntetizovány jako monomery a k jejich aktivaci je nutná dimerizace, která je zajištěna autokatalyticky, nebo vytvořením makromolekulárního komplexu s dalšími proteiny (apoptosom, inflamasom, DISC). Iniciační kaspázy v komplexu rychleji oligomerují a jsou schopné aktivovat kaspázy vyskytující se v kaskádě pod nimi (Rodriguez & Lazebnik, 1999).

Efektorové prokaspázy jsou stabilní dimery, jejichž podjednotky jsou spojeny a aby byly funkční, je nutné odštěpit linker mezi nimi. Odštěpením linkeru dochází ke změně konformace prokaspázy a vytvoření nových vazeb mezi L2, L2' a L4, které stabilizují aktivní

místo (Chai et al., 2001). K přerušení proteinu dochází v konkrétních místech s obsahem aminokyseliny Asp (Obr. č.1). Po odštěpení linkeru a změně konformace se efektorové kaspázy mění v aktivní. Vytvoří se tak homodimer, který je složen ze dvou monomerů. Každý monomer je složen z velké (α) a malé (β) podjednotky. Souhrnně lze dimer označovat $\alpha\beta\beta'\alpha'$ (Bose & Clark, 2001).

V místě rozpoznávání substrátu se nachází čtyři specifická místa pro vazbu aminokyselin, která v případě lokace na N-konci označujeme S1, S2, S3, S4 a od C-konce je označujeme jako S1', S2', S3', S4'. Toto neplatí pouze pro kaspázu-2, která obsahuje jedno specifické místo navíc, S5 a S5'. Do těchto míst se vážou místa substrátu, označována na N-konci P1, P2, P3, P4 a na C-konci P1', P2', P3', P4', případně i P5 a P5' (Obr. č. 2). Štěpení peptidové vazby probíhá v oblasti P1-P1'. S1 místo je tvořeno aminokyselinami Arg179, Glu283, Arg341, interagujícími s Asp, který je na P1 pozici striktně vyžadován. S2 oblast tvoří hydrofobní aminokyseliny a pouze hydrofobním aminokyselinám na pozici P2 umožní vazbu. S3 je tvořeno Arg, který určuje preferenční vazbu s Glu na P3 (Chéreau et al., 2003). S4 místo obsahuje aromatické aminokyseliny, jako je tryptofan zajišťující preferenční navázání Asp na P4, neboť přítomnost aromatické aminokyseliny zmenšuje žlábek pro vazbu, do kterého dobře zapadá Asp (Fuentes- Prior & Salvesen, 2004).

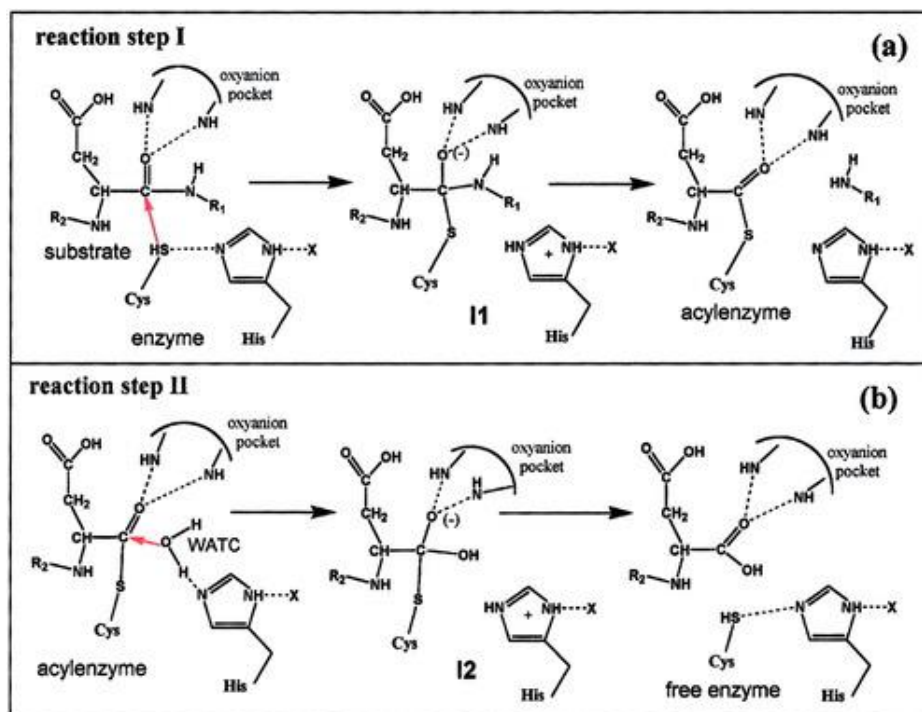


Obrázek č. 2- A) Grafické znázornění aktivního místa kaspáz. Fialové- S oblasti značí místa na enzymu a zeleně- P určují aminokyseliny substrátu. B) Tabulka preferenčních sekvencí substrátů. Převzato z Poreba et al. (2013).

2.2. Mechanismus štěpení vazeb

Díky přítomnosti katalytických molekul histidinu a cysteinu dochází v substrátu k hydrolyze peptidové vazby. Kaspázy obsahují dvě aktivní místa rozpoznávající specifický tetrapeptidový motiv obsahující na P1 místě vždy molekulu aspartátu (Chéreau et al., 2003). Na ostatních pozicích se mohou vyskytovat různé kombinace aminokyselin, nicméně pro každou variantu mají kaspázy svou preferenční vazebnost (Nicholson, 1999).

Prvním krokem štěpení je přeměna peptidové vazby substrátu ze standardní triagonální na tetrahedrální strukturu. Dochází k tomu nukleofilním atakem histidinu, neboť se chová jako báze a odebírá proton z cysteinu. Po deprotonaci se cystein stává nukleofilem, který bude reagovat s peptidovou vazbou substrátu, a následně vytvoří se substrátem tetrahedrální komplex. Tento meziprodukt označovaný jako I1, je stabilizován vazbami kyslíku a NH₂ skupin s nimiž tvoří oxyanionovou díru snižující potřebnou aktivační energii reakce (Miscione et al., 2010). Dále dochází k protonaci NH₂-R skupiny a k jejímu uvolnění (Obr. č. 3- a) V druhé fázi reakce dochází k nukleofilnímu ataku karbonylové vazby molekulou vody, která odevdala jeden proton α -N histidinu. Po štěpení dvojné vazby vzniká druhý meziprodukt I2. Protonací sulfátové skupiny meziproduktu I2 dochází k přerušení vazby spojující acylenzym, k uvolnění samotného enzymu a finálního produktu (Obr. č. 3- b) (Sulpizi et al., 2003).



Obrázek č. 3- Reakční mechanismus kaspáz. První část (a) zobrazuje nukleofilní atak enzymu, tvorbu prvního meziproduktu a uvolnění NH₂-R skupiny. V druhé fázi (b) dochází k vytvoření druhého meziproduktu a následnému uvolnění enzymu a štěpeného substrátu. Převzato z Sulpizi et al. (2003).

Aktivita kaspáz se liší v závislosti na faktorech prostředí či sekvence substrátů a je různá mezi jednotlivými zástupci. Kaspázy jsou schopné udržet si svou aktivitu v rozmezí pH 6,8- 7,2 (Stennicke & Salvesen, 1997).

2.3. Substráty

Po aktivaci iniciačních kaspáz dochází k proteolýze efektorových kaspáz, zodpovědných za štěpení širokého spektra substrátů udržujících stabilitu DNA. Dodnes jich bylo identifikováno přes 1000, nicméně každá kaspáza štěpí různé proteiny a má své preferenční substráty. Podmínkou aktivity kaspáz je výskyt Asp na P4 místě substrátu (Obr. č. 2). Není to však 100% zajištění štěpení, neboť i na pozici P1` musí být ideální zástupci, vhodnými skupinami jsou Gly, Ala, Thr, Ser, Asn (Stennicke et al., 2000). Jednotlivé kaspázy se liší v počtu substrátů a zároveň mohou být některé substráty rozpoznávány vícero kaspázami. Například kaspáza-3 a kaspáza-7 jsou vysoce homologní a jejich cílové proteiny jsou mnohdy stejné (Pereira & Song, 2008). Po štěpení substrátu může docházet k získání funkce (tzv. gain of function), anebo ve většině případů ke ztrátě funkce (tzv. loss of function).

Degradaci těchto proteinů dochází k propagaci apoptózy vlivem jejich funkcí a aktivit. Důsledkem jsou morfologické a biochemické změny („find me“ signály) pozorované v apoptotických buňkách (Coleman et al., 2001; Povea-Cabello et al., 2017). Substráty kaspáz jsou nejčastěji proteiny s funkcí udržení morfologické stability v buňce, ale také genetické stability.

Cílem kaspázové aktivity jsou dále laminy, cytoskeletární proteiny, spektriny, protein kinasa B- Akt, gelsolin (Kothakota et al., 1997), myofibrilární proteiny, adhezní molekuly, enzymy, flipázy a mnoho dalších. Nejvíce substrátů bylo identifikováno pro kaspázu-3, která je schopna štěpit stovky různých proteinů i substráty ostatních kaspáz (Julien & Wells, 2017). Studie substrátů (Araya et al., 2021) odhalila skutečnost, že kaspáza-9 nemá pouze schopnost aktivace efektorových kaspáz, ale štěpí také proteiny nutné k propagaci apoptózy, jako je například RECQL5- DNA helikáza či topoizomeráza II. Iniciační kaspázy nemají tedy pouze aktivační funkci efektorových kaspáz.

Dalším substrátem kaspáz je proapoptotický protein Bid, štěpený kaspázou-8 na tBid. Protein tBid je přímým spouštěčem vnitřní mitochondriální apoptózy, neboť jeho funkcí je aktivace proteinů Bax a Bak (viz kapitola 4.1).

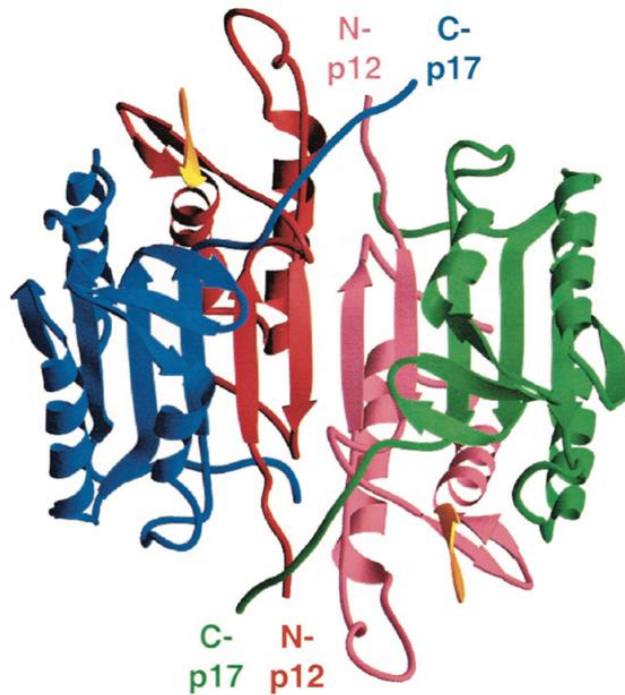
Již v úvodu byly popsány souvislosti kaspáz a jejich substrátů s neurodegenerativními onemocněními, je proto logické, že i klíčové proteiny jako Huntingtin, APP či preseniliny budou cílem kaspáz (Gervais et al., 1999).

3. KASPÁZA-3

Neaktivní forma kaspázy-3, tzv. prokaspáza-3, je za standardních podmínek (pH~ 7) stabilní dimer. Pokud by však pH v cytosolu kleslo na hodnotu 4, až 90 % dimerů bude disociovat na monomery (Bose & Clark, 2005). Každý monomer je složen z 277 aminokyselin (Fuentes-Prior & Salvesen, 2004).

Prodoména, která bude později odštěpena, se skládá přibližně z 20-30 aminokyselin a je na rozdíl od prodomén aktivačních kaspáz, složených až z 90 aminokyselin, kratší. Velká podjednotka prokaspázy-3, která je označována p20, se vyskytuje na N-konci enzymu a je tvořena ze 175 aminokyselin a po proteolýze je označována jako p17 (Han et al., 1997). Malá podjednotka p12, na C-konci enzymu, se skládá ze 102 aminokyselin. K tomu, aby se z prokaspázy-3 stal funkční enzym, musí dojít ke štěpení linkeru mezi podjednotkami, k čemuž dochází na pozici Asp175 mezi β -4 a β -5 listy (Adams & Cory, 2002). Po štěpení linkeru dochází ke změně konformace enzymu a zpřístupnění aktivního místa, které je tvořeno L smyčkami. L1 ve spolupráci s L4 tvoří strany žlábků, L3 tvoří spodní část a katalytický nukleofil nese L2 (Feeney et al., 2006). Změnou konformace je rotace L2` smyčky o 180°, která vede k vytvoření nových vazeb mezi L2`, L2 a L4, čímž se stabilizuje aktivní konformace enzymu (Chai et al., 2001). Druhým krokem je odštěpení prodomény na pozicích Asp9 a Asp28. Dochází tak ke zrychlení aktivace enzymu, nicméně kaspáza-3 je funkční i bez tohoto kroku (Meergans et al., 2000). Tento proces je zajištěn aktivitou iniciačních kaspáz v rámci vnitřní či vnější aktivace apoptózy.

Aktivní kaspáza-3 je homodimer s hmotností 32 kDa, skládající se ze dvou identických monomerů. Každý monomer se skládá z velké podjednotky p17 a malé podjednotky p12 (Obr. č. 4) (Ponder & Boise, 2019). Velká podjednotka nese katalytické aminokyseliny, zatímco malá podjednotka slouží k vazbě substrátu (Pop et al., 2003). Nukleofilními molekulami zajišťující proteolýzu peptidové vazby substrátu jsou Cys163 a His121, nacházející se na velké podjednotce (Sulpizi et al., 2003).



Obrázek č. 4- Struktura kaspázy-3 s navázaným inhibítor (označen žlutě). Velké podjednotky p17 jsou označeny modře a zeleně, malé podjednotky p12 jsou označeny červeně a růžově. Převzato z Chang & Yang (2000).

Oblast S1, kde dochází k nejvýraznější vazbě substrátu, se skládá ze sekvence aminokyselin Arg64, Gln161, Arg207, které tvoří hluboký žlábek ideálně velký pro Asp P1 (Stennicke & Salvesen, 1998). Oblast S2 se skládá z hydrofobních aminokyselin Tyr204, Trp206 a Phe256, které tvoří pouze malé místo pro substrát. Na pozici P2 budou tedy preferovány malé aminokyseliny Ala či Val. Oblast S3 obsahuje Ser209 a Arg207, tvořící vazbu s P3- preferenčně Glu. Oblast S4 kaspázy-3 je tvořena aromatickým Trp214, zmenšující velikost žlábků a tvořící ideální místo pro vazbu Asp. Dále také interaguje s Phe250 a Asn208, které váží molekuly vody, nutné k proteolytické aktivitě (Chéreau et al., 2003).

Motiv rozpoznávané sekvence substrátů je u kaspázy-3 DEVD. Výzkum však prokázal, že kaspáza-3 je schopna degradovat i substráty ostatních kaspáz (McStay et al., 2008).

Jedním z těchto substrátů je ICAD (DFF40) -inhibitor kaspázou aktivované DNAsy. Před proteolýzou je CAD (DFF45) nekovalentně spojena s inhibítor, jejichž vazbou je zajištěna neaktivita nukleázy. Kaspáza-3 cílí na ICAD, naruší sekvenci v místech DETD117*S a DEVD224*T, čímž uvolní CAD a umožní její dimeraci. Po aktivaci je CAD odpovědná za fragmentaci DNA, což vede k další propagaci apoptózy (Sakahira et al., 1998). CAD je zodpovědná za dvouvláknové zlomy v DNA a kondenzaci chromatinu (Enari et al., 1998).

Poly (ADP- ribóza) polymeráza- PARP, je dalším enzymem štěpeným v apoptóze, jehož funkcí je ligace zlomů na DNA. Pokud je PARP štěpen kaspázou-3, v místě DEVD214*, přichází o svou funkci a v buňce nedochází k opravám DNA (Lazebnik et al., 1994).

Dalším cílem kaspázy-3 je také cytoskelet buňky (Gourlay et al., 2004). Protein gelsolin je jedním z hlavních aktin-vázajících proteinů, závislých na Ca^{2+} iontech. Štěpení probíhá v místě DQTD352*G (Kamada et al., 1998) a dochází tak k zakulacení buňky vlivem rozpadu aktinových filament (Kothakota et al., 1997). Dalším enzymem ovlivňující rozpad cytoskeletu je ROCK-1 kináza (Rho asociovaná coiled coil kináza), která fosforyluje lehký řetězec myosinu a indukuje vytvoření aktin-myosin kontraktálního prstence. Kaspáza-3 cílí také na intermediální filamenta (Byun et al., 2001). Substráty štěpené kaspázami přispívají k propagaci apoptózy vytvářením apoptotického fenotypu a produkcí „eat me“ signálů, jako je například translokace fosfatidylserinu na vnější povrch buněčné membrány pomocí flipázy (Ravichandran, 2010).

Inhibitory kaspázy-3

K inhibici kaspázy-3 jsou využívány molekuly vázající se do aktivního místa enzymu, nebo inhibitory alosterické, schopné vazby mimo aktivní místo. Alosterické molekuly interagují s molekulou Cys, tvoří disulfidickou vazbu a tím dojde ke změně konformace enzymu. Změnou konformace dochází k zablokování aktivního místa a enzym je pak neaktivní. Inhibitory mohou být přírodní či syntetické, zároveň reversibilní a ireversibilní.

IAPs molekuly se v buňce vyskytují přirozeně a jejich vazba zamezuje spuštění apoptózy. Obsahují 3 BIR domény (bakulovirové IAP repetice), které zprostředkovávají interakci mezi proteiny. Nejúčinnějším inhibitorem kaspázy-3, kaspázy-7, a kaspázy-9 je XIAP. Tento inhibitor obsahuje také UBA doménu vázající ubiquitin a RING doménu, která disponuje ligázovou aktivitou, čímž katalyzuje degradaci aktivní kaspázy-3 a kaspázy-9 (Scott et al., 2005). Doménami BIR2 inhibuje kaspázu-3 a BIR3 inhibuje kaspázu-9 (Silke, 2001).

Syntetické ortosterické inhibitory se váží do aktivního místa substrátu. Jejich struktura bývá rozdělována do tří částí. První část- N-koncový Asp na pozici P4, prostřední částí jsou dva peptidy a poslední částí- P1 je elektrofilní skupina, která inaktivuje katalytický cystein jejich vazbou (Drag & Salvesen, 2010). Elektrofilní skupinou mohou být aldehydy či ketony a jejich deriváty (haloketony, methylketony). Zástupci těchto inhibitorů jsou Ac-DNLD-CHO, Ac-DEVD-CHO, Ac-DQTD-CHO a Ac-DMQD-CHO (Yoshimori et al., 2007).

Inhibitorů kaspáz bylo syntetizováno velké množství, ale velmi často nejsou použitelné pro terapii, neboť jsou toxické, jako například univerzální inhibitor Z-VAD-FMK. Dalšími syntetickými inhibitory jsou alosterické DICA a FICA, navozující změnu konformace podobné neaktivnímu zymogenu (Hardy et al., 2004).

3.1. Apoptotické funkce

Kaspáza-3 je hlavním spouštěčem apoptózy a je důležitá pro udržení homeostázy v organismu. Během apoptózy dochází k odstranění poškozených, infikovaných, patogenních a nadbytečných buněk. Podílí se také na procesu vývoje tělních dutin, nervové soustavy, orgánů, končetin a maturaci pohlavních buněk (de Pol et al., 1997; Voss & Strasser, 2020; Wang & Lenardo, 2000). Mechanismy aktivace apoptózy jsou popsány v kapitole č. 4.

3.2. Neapoptotické funkce

Proliferace

Role kaspázy-3 v propagaci buněčné smrti je neopomenutelná, nicméně kaspáza-3 ovlivňuje také buňky v okolí apoptotické buňky. Jedná se o kompenzační mechanismus tzv. AiP (apoptosis induced proliferation), kdy v okolních buňkách dochází k indukci proliferace. Tento jev se uplatňuje při hojení ran a regeneraci tkání (Connolly et al., 2014). Například Tseng et al. (2007) prokázali přítomnost tohoto mechanismu při regeneraci odvrhnutého ocasu u žáby *Xenopus laevis*. Také další výzkumné skupiny objevily souvislost mezi působením efektorových kaspáz a hojením ran u myši (Li et al., 2010) a obecně u savců (Ankawa et al., 2021). Zároveň je tento mechanismus zodpovědný za indukci proliferace nádorových buněk a tím dochází k repopulaci tumorů (Huang et al., 2011). Zároveň bylo dokázáno, že kaspáza-3 štěpí a aktivuje fosfolipázu A2 (iPLA2), čímž dochází k tvorbě prostaglandinu E2, který indukuje proliferaci buněk. Prostaglandin poté ovlivňuje epiteliálně-mezenchymální přechod buněk, tedy metastázování (Tong et al., 2018).

Diferenciace

Komparativní metoda srovnávání wild-type genotypu myši s deficientními genotypy (Cas3 $-/-$) *in vivo*, prokázala souvislost s aktivitou kaspázy-3 a regulací počtu myocytů (Cardona et al., 2015), diferenciací kosterního svalstva (Fernando et al., 2002), opožděním osifikace kostí a snížené mineralizace (Miura et al., 2004). Kaspáza-3 se také podílí na tvorbě embryonálních a indukovaných kmenových buněk skrze štěpení Rb proteinu (Dejosez et al., 2008). Další role

kaspázy-3 zahrnují regulaci proliferace kardiomyocytů a fibroblastů u myši, ale také u jiných druhů savců (Knapp et al., 2017).

Mezi další funkce kaspázy-3 patří schopnost řízení diferenciací hematopoetických buněk. Prvním zmíněným typem buněk, které kaspáza-3 ovlivňuje, jsou erythrocyty. Červené krevní buňky jsou tvořeny z erythroidní linie progenitorů a jejich tvorbu stimuluje hormon erythropoetin. Pokud je erythropoetin ve vazbě s receptorem erythropoetinu, dochází k aktivaci kaspázy-3, která následně štěpí proteiny figurující ve vývoji krevních buněk. Spolu s aktivací kaspázy-3 dochází k transportu Hsp70 do jádra, kde chrání transkripční faktor GATA-1 před destrukcí kaspázou (Ribeil et al., 2007). GATA-1 reguluje hladinu proapoptotických proteinů, tedy i nepřímo spuštění apoptózy. Pokud je GATA-1 štěpena, dochází k zániku buněk apoptózou (de Thonel et al., 2010). Dalšími buňkami, jejichž diferenciací je řízena aktivitou kaspázy-3, jsou megakaryocyty a monocyty (Sordet et al., 2002).

Kaspáza-3 ovlivňuje také synaptickou plasticitu neuronů. Základem nervové soustavy jsou neurony, buňky přenášející signály nervového vzruchu. Jednotlivé neurony se spojují v sítě a pomocí synapsí mezi sebou přenášejí signál, vzruch. Ve správně se vyvíjejícím mozku se nachází redundantní počet neuronů, nepotřebné či nefunkční neurony jsou redukovány. Díky těmto změnám dochází k přeměně a vytváření nových synapsí (Mukherjee & Williams, 2017). Tato skutečnost není patologickým jevem, ale nutností pro správnou mozkovou činnost, neboť změny v synaptických spojkách umožňují správné kognitivní funkce (D'Amelio et al., 2010). Pokud dojde k inhibici kaspázy-3, nedochází v organismu k pruningu neboli ke změnám spojení či zániku spojení mezi axony, dendrity a synapsemi. Na modelu myši s vyřazenou kaspázou-3 (Cas3^{-/-}) bylo prokázáno, že bez přítomnosti kaspázy-3 nedocházelo ke správnému vývoji neuroektodermu a mutace byla letální (Kuida et al., 1996).

4. APOPTÓZA

Veškeré procesy v buňkách jsou řízeny důsledným mechanismem a regulací každého komponentu. Pokud dojde v buňce k vytvoření proapoptotického signálu a narušení homeostázy, dochází ke spuštění apoptózy a degradaci buňky. Po přijetí signálu dochází v buňce k aktivaci apoptotické kaskády, která zajistí změny morfologické i fyziologické. Apoptotickou buňku můžeme odlišit od ostatních viditelnou změnou velikosti i struktury membrány. Dochází totiž k degradaci cytoskeletárních proteinů, ztrátě pevného tvaru a adheze buňky (Mashima et al., 1999). Postupným štěpením kaspázových substrátů je buňka čím dál tím více degradována, dochází k fragmentaci DNA, až do vytvoření apoptotických tělísek.

K tomu, aby byla buňka pohlcena fagocytem vystavuje na svém povrchu fosfatidylserin („eat me“ signál), který je za normálních okolností v buněčné membráně zabudován intracelulárně. Dalšími molekulami, které lákají fagocyty, jsou nukleotidy (Elliott et al., 2009), annexin (Arur et al., 2003) a kalretikulín (Gardai et al., 2005).

Proces apoptózy je v organismu nezbytný po celý život. Každý den je v lidském těle vytvořeno přibližně 300 miliard buněk, které nahrazují buňky degradované apoptózou (Sender & Milo, 2021). Výskyt apoptózy je naprosto nutný již během embryonálního vývoje (Voss & Strasser, 2020).

Apoptóza je nedílnou součástí vývoje zdravých pohlavních buněk (T. Liu et al., 2017), orgánů (Martínez-Lagunas et al., 2020), prstů, účastní se regulace množství neuronů a oligodendrocytů, odstranění protonefros, Wolfových cest (Glücksman, 1951) a mnoho dalších dějů. Narušení mechanismu apoptózy může vést k významným abnormalitám ve vývoji nervové soustavy (Cecconi et al., 1998; Kuida et al., 1996; Lakhani et al., 2006; Weil et al., 1997), rozvoji rakoviny, neurodegenerativních či autoimunitních onemocnění a srdečnímu selhání (viz kapitola č. 5).

Ke spuštění apoptózy může dojít více způsoby. Prvním druhem aktivace je tzv. apoptóza vnitřní, vyvolaná signály zevnitř buňky, mezi které se počítá poškození DNA, oxidativní stres, nedostatek růstových faktorů, ztrátu adheze k okolním buňkám, přítomnost virové infekce, nerovnováhu hormonů (Herold et al., 2006), či aktivaci onkogenů (Wong, 2011). K poškození DNA dochází v případě, kdy se buňka setká s různými mutageny. Mezi mutageny řadíme UV záření, ionizující záření, mnohé chemikálie, ale také viry. K patogenezi přispívají i protoonkogeny a tumor supresorové geny, které mají za normálních okolností regulovat buněčný cyklus. Pokud jsou však mutovány, nedochází k regulaci buněčného cyklu, buňky se opakovaně dělí a mutace se hromadí.

V případě vnitřní aktivace na proapoptotické signály odpovídají svou činností proteiny rodiny Bcl-2 (Wei et al., 2001). Druhým typem aktivace je vnější mechanismus, který je řízen TNFR receptory a jejich ligandy.

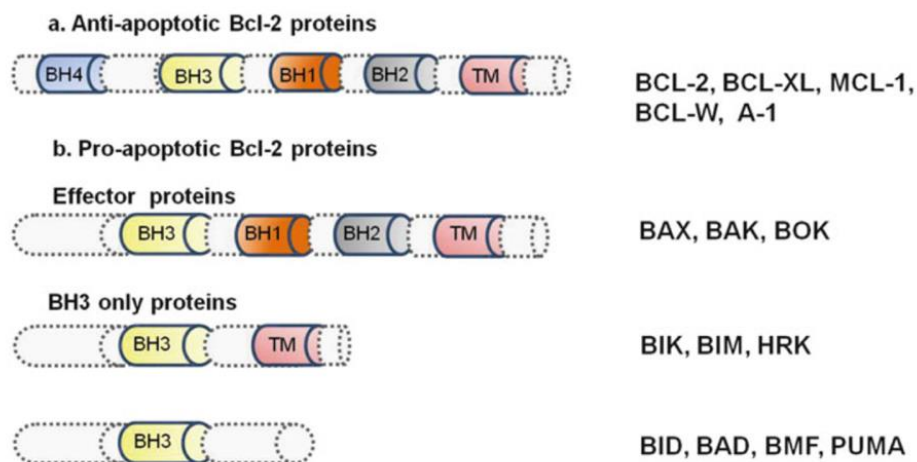
Iniciační kaspázy jsou schopné aktivovat více efektorových kaspáz v krátkém intervalu, čímž amplifikují apoptotický signál a urychlují degradaci buněk. V obou typech aktivace dochází na konci kaskády ke štěpení mnohých substrátů, kondenzaci chromatinu, rozpadu cytoskeletu, na cytoplazmatické membráně se objevují váčkovité výrůstky (tzv blebbing) a dochází k vytvoření apoptotických tělísek, které jsou posléze pohlceny fagocytující buňkou.

4.1. Vnitřní aktivace

První mechanismus apoptózy je spuštěn aktivitou iniciační kaspázy-9 a narušením vnější mitochondriální membrány. Tento způsob aktivace je řízen proteiny rodiny Bcl a pokud jejich koncentrace v buňce není rovnoměrná, dochází skrze jejich aktivitu k permeabilizaci mitochondriální membrány (Shamas-Din et al., 2013). Přes vytvořený pór v membráně pronikají proteiny zevnitř mitochondrie do cytoplazmy. Těmito proteiny, které se za normálních okolností vyskytují pouze uvnitř mitochondrie, jsou například cytochrom c, AIF, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 či endonukleáza G. Jejich přítomnost v cytoplazmě evokuje narušení homeostázy a spouští apoptotickou kaskádu. Dochází k tomu v důsledku jednotlivých funkcí proteinů. Endonukleáza G a AIF degradují DNA, cytochrom c již neplní svou funkci v elektronovém řetězci v mitochondrii a tvoří komplex s Apaf-1, Smac a Omi inhibují IAPs, které inhibovaly apoptózu (Ghavami et al., 2009). Následuje tvorba apoptosomu a aktivace efektorových kaspázy.

Bcl rodina proteinů

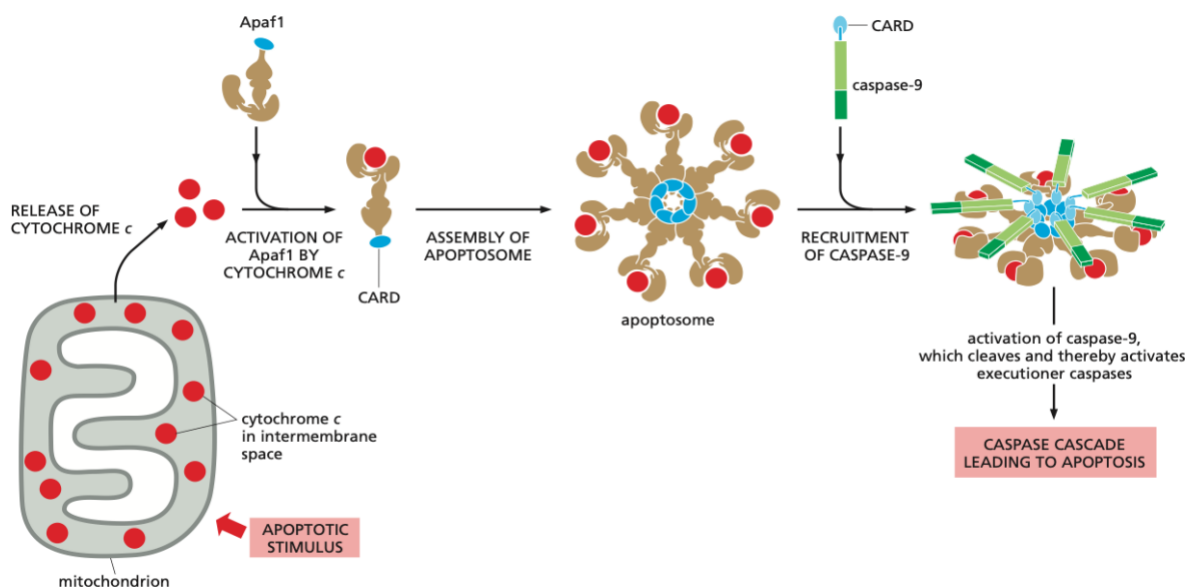
Proteiny Bcl-2 získaly svůj název odvozením od svého původu, a to z B- buněk lymfomu 2. V závislosti na jejich funkci odlišujeme proapoptotické a antiapoptotické Bcl proteiny. Tyto dvě skupiny se liší složením čtyř BH domén, které jsou sekvenčně homologními oblastmi a jejich zastoupení udává funkci proteinů (Obr. č. 5) (Tsujimoto, 1998). Zástupci proapoptotických proteinů, obsahující tři BH domény, jsou Bax, Bak, a Bok, kteří odpovídají na proapoptotický signál svou oligomerizací na vnější mitochondriální membráně. Protein Bak je ukotven v membráně mitochondrie, zatímco Bax translokuje na membránu až po přijetí signálu.



Obrázek č. 5- Bcl proteiny a zastoupení BH domén, převzato z Singh & Bose (2015).

Antiapoptotické Bcl proteiny se vyskytují v cytoplasmě, obsahují všechny BH domény a mají tyto zástupce- Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, A-1, Mcl-1. Tato skupina za standardních podmínek tvoří s proapoptotickými proteiny heterodimery a vzájemně se inhibují (Youle & Strasser, 2008). Existuje také třetí skupina Bcl proteinů, obsahující pouze BH3 doménu, kam řadíme Bad, Bid, Bim, Bik, Hrk, Bmf, Puma (p53 upregulační mediátor apoptózy) a Noxu. Jejich funkcí je inhibice antiapoptotických proteinů, k čemuž dochází jejich vazbou do hydrofobního žlábků antiapoptotických proteinů. Následně dochází k zesílení proapoptického signálu, aktivaci Bax, Bak a k propagaci apoptózy (Wei et al., 2001). V případě aktivace proapoptickým signálem, Bax a Bak oligomerují a permeabilizují vnější mitochondriální membránu. Tím vytváří pór v membráně a umožní tak prostoupení proteinů z mitochondrie do cytosolu. Bcl proteiny nefigurují pouze v apoptóze, jsou i regulátory metabolismu Ca²⁺ v endoplazmatickém retikulu a vrozené imunity při virové nákaze (Hardwick & Soane, 2013).

Po průchodu cytochromu c (a dalších proteinů) z mitochondrie do cytoplasmy dochází k jeho navázání na Apaf-1 (Obr. č. 6) za přítomnosti dATP.



Obrázek č. 6- Vnitřní aktivace apoptózy. Cytochrom c (červeně) uvolněný z mitochondrie tvoří komplex s Apaf-1 a kaspázou-9, apoptosom. Apoptosom aktivuje efektorové kaspázy a propaguje apoptózu. Převzato z Alberts et al. (2017).

Apaf-1 je protein o velikosti 140 kDa složený z N- koncové CARD domény, NOD domény a repetitivní sekvence WD40 (Bao et al., 2005). NOD domény zprostředkovávají vazbu nukleotidu (dATP) a oligomerizaci, WD domény vážají cytochrom c a CARD domény Apaf-1 interagují s CARD doménami prokaspázy-9 (Zou et al., 1997). Touto vazbou dochází k aktivaci

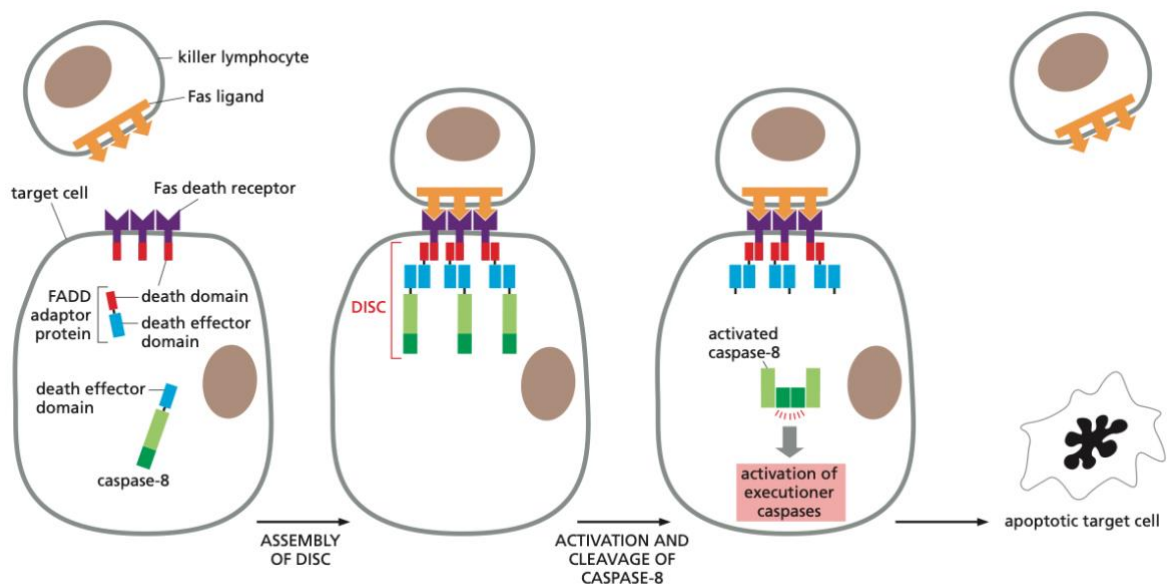
prokaspázy-9 a tvorbě heptamerního apoptosomu (Obr. č. 6). Aktivní kaspáza-9 následně svou proteolytickou aktivitou štěpí prokaspázu-3 a prokaspázu-7 na aktivní formu (Sakamaki & Satou, 2009). Tímto dochází k zahájení proteolytické kaskády štěpení mnoha substrátů a propagaci degradace buňky.

4.2. Vnější aktivace

Druhý způsob aktivace apoptózy je řízen transmembránovými receptory DR, pocházející z rodiny TNFR a jejich ligandy.

Nejvíce prozkoumaným TNFR proteinem je Fas. Obsahuje intracelulární DD doménu a extracelulární doménu sloužící k navázání ligandu FasL. Fas a FasL oligomerují a tvoří trimery. Na DD doménu trimery se váže molekula FADD, obsahující DD i DED. Touto vazbou dochází ke zpřístupnění DED domény FADDu a umožnění vazby prokaspázy-8 skrz DED doménu. Takto dochází k vytvoření DISC komplexu, který aktivuje iniciační kaspázu (Kischkel et al., 1995). Aktivní iniciační kaspáza-8 proteolyticky štěpí efektorové prokaspázy v aktivní kaspázy. Dochází k předání signálu efektorovým kaspázám a propagaci apoptózy (Obr. č. 7).

Kaspáza-8 je schopna aktivovat vnitřní mechanismus štěpením Bid proteinu na tBid, který je translokován na membránu mitochondrie a je schopný rekrutace Bax, který následně oligomerizuje a permeabilizuje membránu (Lovell et al., 2008).



Obrázek č. 7- Vnější aktivace apoptózy. Vazba Fas receptoru k Fas ligandu indukuje tvorbu DISC komplexu aktivující iniciační kaspázu-8. Přejato z Alberts et al. (2017).

5. ONEMOCNĚNÍ SOUVISEJÍCÍ S APOPTÓZOU

Při nedostatečné aktivitě kaspázy-3 nedochází ke spuštění apoptózy a organismus není schopen degradovat poškozené buňky. Tyto buňky postupem času tvoří onemocnění zvané rakovina. Pokud je situace opačná, organismus se zbavuje nadměrného množství buněk, i buněk zdravých a dochází k rozvoji neurodegenerativních onemocnění, vad srdce či autoimunitních onemocnění.

5.1. Rakovina

Nádorová onemocnění jsou v posledních desítkách let jedním z nejčastějších onemocnění i příčin úmrtí (Ferlay et al., 2020). K rozvoji rakoviny přispívá mnoho faktorů genetických (mutace v protonkogenech a tumor supresorových genech), ale také vnějších. Hlavními příčinami je nezdravý životní styl jako je kouření, nezdravá strava, nedostatek pohybu, požívání alkoholu, ale také prostředí, ve kterém se pohybujeme (Dartois et al., 2014). V případě neschopnosti organismu opravovat chyby DNA dochází k mutacím. Nejvíce náchylné k mutacím jsou populace buněk rychle se obnovujících tkání, jako jsou např. buňky trávicí, dýchací soustavy či krevní buňky. Pokud tyto poškozené buňky nejsou degradovány, proliferují a vytvoří nádor.

Tento proces se nazývá tumorigeneze. Buňky, které označujeme jako rakovinné, již nepodléhají kontrolované regulaci, dochází u nich k neřízené a neomezené proliferaci, rezistenci k apoptóze, ztrátě adheze a ztrátě kontaktní inhibice s důsledkem tvorby neoplasií. Nádory rozdělujeme podle morfologických znaků a podle chování na dva typy - benigní a maligní. Benigní tumory jsou lokální, membránou obalené ohraničené nemigrující útvary. Maligní tumory jsou tvořené nádorovými buňkami, které jsou vysoce invazivní, snadno tak překonávají epitel-mezenchymální bariéru a pomocí transportu krevním řečištěm zakládají sekundární ložiska nádorů neboli metastáze v jiných orgánech.

K přežití nádorových buněk dochází v důsledku nedostatečné aktivace apoptózy, tedy nedostatečného množství efektorové kaspázy-3, případně iniciačních kaspáz. Množství aktivní kaspázy-3 ovlivňují její inhibitory, IAPs a antiapoptotické Bcl-2 proteiny. V případě jejich zvýšené koncentrace nedochází k aktivaci kaspázy-3. Studie prokázaly výskyt malého množství kaspázy-3 u akutní leukémie, rakoviny prostaty a střeva. U rakoviny prsou byla zjištěna nízká hladina kaspázy-3 u 75 % pacientů (Devarajan et al., 2002).

Dalším důležitým faktorem tumorigeneze je schopnost buněk obcházet apoptotické procesy, stávají se tedy rezistentními i vůči chemoterapeutikům. Jak již bylo zmíněno, proteiny

rodiny Bcl se podílí na spouštění apoptózy mechanismem permeabilizace mitochondriální membrány. Tyto proteiny lze v organismu detekovat, a proto se využívají jako nástroj pro diagnostiku nádorového bujení (Lopez et al., 2022).

Metastáze

Kaspáza-3 ovlivňuje svým působením hladiny proteinů, které tvoří epiteliálně-mezenchymální přechod. První protein, u kterého dochází ke zvýšení exprese je E-kadherin. Odpovědí na tuto změnu je snížení hladin N-kadherinů, Snail a Slug proteinů. Konečným výsledkem těchto změn je metastázování, tedy stav, kdy buňky migrují do dalších tkání, neboť dochází k narušení integrity epitelů. Při testování této skutečnosti bylo zjištěno, že v buňkách bez kaspázy-3 nedocházelo k migraci buněk, a navíc se snížila rezistence vůči radiaci (Zhou et al., 2018). Dalším substrátem, který ovlivňuje metastázování je prostaglandin. Pokud dojde k jeho aktivaci, dochází k proliferaci rakovinných buněk a zvyšování pravděpodobnosti přežití.

Použitím inhibitoru z-VAD-fmk došlo k inhibici aktivity kaspázy-3 a snížení schopnosti migrace (Vartanian et al., 2007).

Terapie

Terapeutické možnosti léčby rakoviny jsou zkoumány již od roku 1930, neboť tímto onemocněním trpí na celém světě přes 18 milionů lidí (Sung et al., 2021). Klasické metody léčby zahrnují ozařování, chemoterapii, případně chirurgické odstranění, pokud je tento způsob možný. Ačkoli tyto možnosti aktivace kaspázy-3 existují, ukázalo se ve studiích, že kaspáza-3 opět vykazuje protichůdné mechanismy, neboť po vystavení buněk radiaci či po chemoterapii, docházelo místo k degradaci nádoru, k jeho repulaci.

Rezistence nádorových buněk vůči léčbě může být zapříčiněná mutacemi v inhibitech či aktivátorech apoptózy. Hlavními regulátory apoptózy jsou Bcl-2 proteiny. Pokud v buňce bude převažovat koncentrace antiapoptotických Bcl-2 proteinů, anebo proapoptotické Bcl-2 proteiny budou mutované, k apoptóze nedojde. Skutečnost, že kaspáza-3 propaguje rezistenci vůči léčbě a zároveň podporuje invazivitu a metastázování nádorů, nabízí možnost léčby kombinací inhibice kaspázy-3 a ozařování.

Způsoby léčby se odvíjí od druhu nádoru, stádia nemoci a množství metastáz. Standardní léčba postihuje i zdravé buňky, proto jsou zkoumány metody využití specifických léčiv cílících na kaspázu-3, její inhibitory a další proteiny figurující v apoptotické kaskádě (Wong, 2011). Zajímavou a úspěšnou metodou je vpravení kaspázy-3 do buněk za využití

nanomotoru, který je obalen polymerem. Po vpravení do buňky reaguje polymer na změnu pH a uvolňuje kaspázu-3 (Esteban-Fernández de Ávila et al., 2017). Také lokální anestetika prokázala schopnost potlačení proliferace a indukce apoptózy. Úspěšné výsledky v případech rakoviny plic a střeva měli např. lidokain či ropivacain (Wang et al., 2019).

Detekce aktivní kaspázy-3 v buňkách lze provést například změřením změny fluorescence, kterou produkuje kaspázou štěpený biosenzor. Tímto způsobem se dají ověřit účinky léčiv (Gong et al., 2022).

5.2. Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je neurodegenerativní onemocnění mozku. Postihuje především starší generace a u věkové skupiny nad 70 let se projeví přibližně u 50 % (Spuch & Navarro, 2011). Hlavními znaky jsou stupňující se demence, ztráta paměti a omezené kognitivní i motorické funkce (Jana, 2013). Hromaděním fosforylovaného proteinu Tau vznikají neurofibrilární uzlíky a přítomností toxických fragmentů A β proteinu vznikají senilní plaky. Dochází tak ke ztrátě funkce neuronů a synapsí vedoucí k atrofii mozku.

β - a γ - sekretázy štěpí protein APP (amyloidní prekurzor protein) na dva fragmenty A β , které oligomerují, agregují v nerozpustné plaky a indukují vznik oxidativního stresu. Na proapoptotický signál reagují Bcl-2 proteiny aktivací vnitřní apoptózy. Kaspáza-3 zajistí propagaci apoptózy a zároveň štěpí protein Tau (Gamblin et al., 2003).

Bylo prokázáno, že aktivní kaspáza-3 se vyskytuje především v oblasti synapsí. Proapoptotický signál se nejprve tvoří u synapse a dále se šíří do těla. Výrazně vyšší hodnoty prokaspázy i kaspázy-3 byly objeveny u pacientů s Alzheimerovou chorobou v postsynaptických oblastech oproti zdravým kontrolám (Louneva et al., 2008). Také Gastard et al. (2003) prokázali přítomnost kaspázy-3 již v raných počátcích vývoje Alzheimerovy choroby.

Limitem léčiv neurodegenerativních onemocnění je nutnost překonání hematoencefalické bariéry, oddělující mozek a cévní systém. Velká naděje se vkládá do terapie Alzheimerovy choroby pomocí minocyklinu (Khatoon et al., 2022), který zamezuje úniku cytochromu c z mitochondrie a tím nedochází k aktivaci kaspázy-3 (Zhu et al., 2002). Výhodou minocyklinu je schopnost překonání hematoencefalické bariéry a jeho netoxicity. Ve studiích bylo po podání minocyklinu zaznamenáno zpomalení degenerace a zlepšení kognice, neboť nedocházelo ke štěpení Tau a APP (Choi et al., 2007).

Existují také přírodní látky, které jsou schopné ovlivnit Alzheimerovu chorobu (Khan et al., 2015). Například aktivní látka šalvěže, kyselina rozmarýnová, inhibuje kaspázu-3 a tím

ovlivňuje tvorbu A β toxických fragmentů (Iuvone et al., 2006). Inhibiční funkci má také kurkumin, který nejen inhibuje agregaci A β , ale také cílí rakovinné buňky (Jiang et al., 2012).

5.3. Huntingtonova choroba

Autozomálně dominantní dědičné onemocnění způsobené mutací v genu HTT způsobuje neovladatelné třesy a demenci (Hermel et al., 2004). Symptomy jsou důsledkem aktivity kaspázy-6 a kaspázy-3, které štěpí mutovaný protein Htt na toxický produkt, usazující se v neuronech.

5.4. Srdeční ischemie

Srdeční svalovina je tvořena kardiomyocyty, které se skládají z myofibril a jsou schopné kontraktilní činnosti. Stav, kdy srdce nezasobuje tělo dostatečným množstvím krve, nazýváme srdeční ischemií. K tomu může dojít, pokud je redukován počet kardiomyocytů nebo jejich schopnost kontraktility. Některé kardiomyofibrilární proteiny- aktin, aktinin a troponin jsou cílem kaspázové aktivity. Myosin ani tropomyosin degradaci nepodléhají (Communal et al., 2002). Přítomnost nadměrného množství kaspázy-3 u myši způsobovala silnější infarkt a horší prognózu léčby i přežití (Condorelli et al., 2001). V opačné situaci, v případě malého množství kaspázy-3 byla prognóza optimistická, došlo dokonce ke snížení rizika infarktu (Liu, 2014). V případě brzkého a konzistentního podávání inhibitoru z-VAD-fmk docházelo k rychlejší rekonvalescenci a ke zmírnění poškození (Yaoita et al., 1998). Zajímavým objevem bylo popsání tzv. „zombie“ stavu, kdy nedochází v kardiomyocytech k aktivaci PARP= k degradaci DNA, ale buňky ztratí pouze svou funkci kontrakce (Narula et al., 1999). Tento fakt naznačuje opět duální funkci kaspázy-3.

5.5. Autoimunitní onemocnění

Diabetes Mellitus I. typu

Onemocnění, při kterém není organismus schopný odbourávat glukózu v důsledku nedostatku inzulínu, nazýváme cukrovka prvního typu. Hormon insulin je za normálních podmínek produkován β buňkami Langerhansových ostrůvků ve slinivce břišní. K projevu nemoci dochází vlivem destrukce β buněk apoptózou. (Maedler et al., 2001; McKenzie et al., 2008). β buňky tak neprodukují insulin a glukóza není štěpena. K apoptóze dochází po interakci FasR a FasL, které aktivují vnější mechanismus- kaspázu-8 a ta později kaspázu-3. Na aktivaci se podílí vysoká hladina glukózy a také cytokiny aktivující imunitní odezvu. Jedna z knock out

studií potvrdila, že přítomnost kaspázy-3 vedla k rozvoji cukrovky, zatímco u deficientních myší byl insulin produkován a k nemoci nedošlo (Liadis et al., 2005).

Existuje také druhá varianta cukrovky, a to získaná. K rozvoji tohoto onemocnění dochází v důsledku obezity, nezdravé diety a nedostatku pohybu. I v tomto případě jsou β buňky degradovány, nicméně nedochází k aktivaci imunity (Federici et al., 2001).

6. ZÁVĚR

Kaspáza-3 je proteáza účastnící se mnoho buněčných procesů. Podílí se na regulaci proliferace, diferenciace, vývoji orgánů a končetin, regulaci počtu buněk a mnoha dalších. Bylo prokázáno, že bez přítomnosti tohoto enzymu by nedocházelo ke správnému vývoji. Hlavní a více prozkoumanou funkcí kaspázy-3 je indukce apoptózy. Kaspáza-3 je efektorová proteáza, která je aktivována iniciačními kaspázami na popud proapoptotických signálů. Po přijetí signálu o poškození buňky kaspáza-3 štěpí mnohé substráty a propaguje tak degradaci buňky, neboť mnohé ze substrátů jsou zodpovědné za opravy DNA poškození a struktury cytoskeletu. Štěpené substráty navozují morfologické a fyziologické změny, které jsou odlišitelné od buněk zdravých. Konečnou fází apoptotických buněk je tvorba apoptotických tělísek a pohlcení fagocytující buňkou.

Stejně jako mohou kaspázy mít pozitivní vliv na organismus, mohou také dávat vznik patogenezi, které jsou dnes tak časté, že jsou označovány jako populační chorobami. Jedná se o rakovinu, Alzheimerovu chorobu, Huntingtonovu chorobu, srdeční ischemie, ale také autoimunitní onemocnění.

Terapeutické možnosti léčby rakoviny jsou každým rokem zlepšovány, nicméně stále jsou nejvíce využívané destruktivní a nespecifické radioterapie, chemoterapie nebo chirurgické odstranění. Právě proto jsou kaspázy a jejich inhibitory studovanými molekulami, neboť jsou možným východiskem pro specificky cílenou léčbu. Detekcí aktivní kaspázy-3 lze rychle zjistit úspěšnost podaných léčiv, což by mohlo vést k urychlení vývoje nových terapeutik.

I v případě neurodegenerativních onemocnění jsou zkoumána nová terapeutika. Do nedávna byla léčba cílena pouze na zmírnění symptomů, avšak nyní je velmi nadějným antibiotikem minocyklin, který potlačuje aktivitu kaspázy-3, a tak i tvorbu A β plaků a neurofibrilárních uzlíků. Zároveň existují i přírodní látky, které jsou schopny inhibovat kaspázu-3.

Tvorba specificky cílených léčiv je budoucností medicíny, a proto je nezbytné dále zkoumat možnosti využití inhibitorů a aktivátorů kaspáz při léčbě zmíněných onemocnění.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Souhrnné články jsou v seznamu označeny hvězdičkou.

- *Adams, J. M., & Cory, S. (2002). Apoptosomes: engines for caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology*, 14(6), 715–720. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(02\)00381-2](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(02)00381-2)
- *Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2017). *Molecular Biology of the Cell* (J. Wilson & T. Hunt, Eds.). W.W. Norton & Company. <https://doi.org/10.1201/9781315735368>
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., & Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell*, 87(2), 171. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81334-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81334-3)
- Ankawa, R., Goldberger, N., Yosefzon, Y., Koren, E., Yusupova, M., Rosner, D., Feldman, A., Baror-Sebban, S., Buganim, Y., Simon, D. J., Tessier-Lavigne, M., & Fuchs, Y. (2021). Apoptotic cells represent a dynamic stem cell niche governing proliferation and tissue regeneration. *Developmental Cell*, 56(13), 1900-1916.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.06.008>
- Araya, L. E., Soni, I. v., Hardy, J. A., & Julien, O. (2021). Deorphanizing Caspase-3 and Caspase-9 Substrates In and Out of Apoptosis with Deep Substrate Profiling. *ACS Chemical Biology*, 16(11), 2280–2296. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.1c00456>
- Arur, S., Uche, U. E., Rezaul, K., Fong, M., Scranton, V., Cowan, A. E., Mohler, W., & Han, D. K. (2003). Annexin I Is an Endogenous Ligand that Mediates Apoptotic Cell Engulfment. *Developmental Cell*, 4(4), 587–598. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00090-X](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00090-X)
- *Bao, Q., Riedl, S. J., & Shi, Y. (2005). Structure of Apaf-1 in the Auto-Inhibited Form: A Critical Role for ADP. *Cell Cycle*, 4(8), 1001–1003. <https://doi.org/10.4161/cc.4.8.1849>
- Bose, K., & Clark, A. C. (2001). Dimeric Procaspase-3 Unfolds via a Four-State Equilibrium Process. *Biochemistry*, 40(47), 14236–14242. <https://doi.org/10.1021/bi0110387>
- Bose, K., & Clark, A. C. (2009). pH effects on the stability and dimerization of procaspase-3. *Protein Science*, 14(1), 24–36. <https://doi.org/10.1110/ps.041003305>
- Byun, Y., Chen, F., Chang, R., Trivedi, M., Green, K. J., & Cryns, V. L. (2001). Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 8(5), 443–450. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400840>
- *Cade, C. E., & Clark, A. C. (2015). Caspases – Key Players in Apoptosis. In *Proteases in Apoptosis: Pathways, Protocols and Translational Advances* (pp. 1–51). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19497-4_2
- Cardona, M., López, J. A., Serafin, A., Rongvaux, A., Inserte, J., García-Dorado, D., Flavell, R., Llovera, M., Cañas, X., Vázquez, J., & Sanchis, D. (2015). Executioner Caspase-3 and 7 Deficiency Reduces Myocyte Number in the Developing Mouse Heart. *PLOS ONE*, 10(6), e0131411. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131411>

- Cecconi, F., Alvarez-Bolado, G., Meyer, B. I., Roth, K. A., & Gruss, P. (1998). Apaf1 (CED-4 Homolog) Regulates Programmed Cell Death in Mammalian Development. *Cell*, 94(6), 727–737. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81732-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81732-8)
- Chai, J., Wu, Q., Shiozaki, E., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., & Shi, Y. (2001). Crystal Structure of a Procaspase-7 Zymogen. *Cell*, 107(3), 399–407. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00544-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00544-X)
- *Chang, H. Y., & Yang, X. (2000). Proteases for Cell Suicide: Functions and Regulation of Caspases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 821–846. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.821-846.2000>
- Chéreau, D., Kodandapani, L., Tomaselli, K. J., Spada, A. P., & Wu, J. C. (2003). Structural and Functional Analysis of Caspase Active Sites. *Biochemistry*, 42(14), 4151–4160. <https://doi.org/10.1021/bi0205931>
- Choi, Y., Kim, H.-S., Shin, K. Y., Kim, E.-M., Kim, M., Kim, H.-S., Park, C. H., Jeong, Y. H., Yoo, J., Lee, J.-P., Chang, K.-A., Kim, S., & Suh, Y.-H. (2007). Minocycline Attenuates Neuronal Cell Death and Improves Cognitive Impairment in Alzheimer’s Disease Models. *Neuropsychopharmacology*, 32(11), 2393–2404. <https://doi.org/10.1021/bi0205931>
- Coleman, M. L., Sahai, E. A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., & Olson, M. F. (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nature Cell Biology*, 3(4), 339–345. <https://doi.org/10.1038/35070009>
- Communal, C., Sumandea, M., de Tombe, P., Narula, J., Solaro, R. J., & Hajjar, R. J. (2002). Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9), 6252–6256. <https://doi.org/10.1073/pnas.092022999>
- Condorelli, G., Roncarati, R., Ross, J., Pisani, A., Stassi, G., Todaro, M., Trocha, S., Drusco, A., Gu, Y., Russo, M. A., Frati, G., Jones, S. P., Lefler, D. J., Napoli, C., & Croce, C. M. (2001). Heart-targeted overexpression of caspase3 in mice increases infarct size and depresses cardiac function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(17), 9977–9982. <https://doi.org/10.1073/pnas.161120198>
- *Connolly, P. F., Jäger, R., & Fearnhead, H. O. (2014). New roles for old enzymes: killer caspases as the engine of cell behavior changes. *Frontiers in Physiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00149>
- *D’Amelio, M., Cavallucci, V., & Cecconi, F. (2010). Neuronal caspase-3 signaling: Not only cell death. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 17, Issue 7, pp. 1104–1114). <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.180>
- Dartois, L., Fagherazzi, G., Boutron-Ruault, M.-C., Mesrine, S., & Clavel-Chapelon, F. (2014). Association between Five Lifestyle Habits and Cancer Risk: Results from the E3N Cohort. *Cancer Prevention Research*, 7(5), 516–525. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-13-0325>
- de Pol, A., Vaccina, F., Forabosco, A., Cavazzuti, E., & Marzona, L. (1997). Apoptosis of germ cells during human prenatal oogenesis. *Human Reproduction*, 12(10), 2235–2241. <https://doi.org/10.1093/humrep/12.10.2235>

- de Thonel, A., Vandekerckhove, J., Lanneau, D., Selvakumar, S., Courtois, G., Hazoume, A., Brunet, M., Maurel, S., Hammann, A., Ribeil, J. A., Zermati, Y., Gabet, A. S., Boyes, J., Solary, E., Hermine, O., & Garrido, C. (2010). HSP27 controls GATA-1 protein level during erythroid cell differentiation. *Blood*, 116(1), 85–96. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-241778>
- Dejosez, M., Krumenacker, J. S., Zitur, L. J., Passeri, M., Chu, L.-F., Songyang, Z., Thomson, J. A., & Zwaka, T. P. (2008). Ronin Is Essential for Embryogenesis and the Pluripotency of Mouse Embryonic Stem Cells. *Cell*, 133(7), 1162–1174. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.047>
- Denecker, G., Hoste, E., Gilbert, B., Hochepped, T., Ovaere, P., Lippens, S., van den Broecke, C., van Damme, P., D’Herde, K., Hachem, J.-P., Borgonie, G., Presland, R. B., Schoonjans, L., Libert, C., Vandekerckhove, J., Gevaert, K., Vandenamee, P., & Declercq, W. (2007). Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss. *Nature Cell Biology*, 9(6), 666–674. <https://doi.org/10.1038/ncb1597>
- Devarajan, E., Sahin, A. A., Chen, J. S., Krishnamurthy, R. R., Aggarwal, N., Brun, A.-M., Sapino, A., Zhang, F., Sharma, D., Yang, X.-H., Tora, A. D., & Mehta, K. (2002). Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene*, 21(57), 8843–8851. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206044>
- *Drag, M., & Salvesen, G. S. (2010). Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(9), 690–701. <https://doi.org/10.1038/nrd3053>
- Eckhart, L., Ballaun, C., Hermann, M., VandeBerg, J. L., Sipos, W., Uthman, A., Fischer, H., & Tschachler, E. (2008). Identification of Novel Mammalian Caspases Reveals an Important Role of Gene Loss in Shaping the Human Caspase Repertoire. *Molecular Biology and Evolution*, 25(5), 831–841. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn012>
- Elliott, M. R., Chakeni, F. B., Trampont, P. C., Lazarowski, E. R., Kadl, A., Walk, S. F., Park, D., Woodson, R. I., Ostankovich, M., Sharma, P., Lysiak, J. J., Harden, T. K., Leitinger, N., & Ravichandran, K. S. (2009). Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*, 461(7261), 282–286. <https://doi.org/10.1038/nature08296>
- Ellis, H., & Horvitz, H. R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44(6), 817–829. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90004-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90004-8)
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., & Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391(6662), 43–50. <https://doi.org/10.1038/34112>
- Esteban-Fernández de Ávila, B., Ramírez-Herrera, D. E., Campuzano, S., Angsantikul, P., Zhang, L., & Wang, J. (2017). Nanomotor-Enabled pH-Responsive Intracellular Delivery of Caspase-3: Toward Rapid Cell Apoptosis. *ACS Nano*, 11(6), 5367–5374. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b01926>
- Federici, M., Hribal, M., Perego, L., Ranalli, M., Caradonna, Z., Perego, C., Usellini, L., Nano, R., Bonini, P., Bertuzzi, F., Marlier, L. N. J. L., Davalli, A. M., Carandente, O., Pontiroli, A. E., Melino, G., Marchetti, P., Lauro, R., Sesti, G., & Folli, F. (2001). High Glucose Causes Apoptosis in Cultured Human Pancreatic Islets of Langerhans. *Diabetes*, 50(6), 1290–1301. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.6.1290>

- Feeney, B., Pop, C., Swartz, P., Mattos, C., & Clark, A. C. (2006). Role of Loop Bundle Hydrogen Bonds in the Maturation and Activity of (Pro)caspase-3. *Biochemistry*, 45(44), 13249–13263. <https://doi.org/10.1021/bi0611964>
- Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Mery, L., Piñeros, M., & et. al. (2020). *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon: International Agency for Research on Cancer. <https://Gco.Iarc.Fr/Today>.
- Fernando, P., Kelly, J. F., Balazsi, K., Slack, R. S., & Megeney, L. A. (2002). Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(17), 11025–11030. <https://doi.org/10.1073/pnas.162172899>
- *Fuentes- Prior, P., & Salvesen, G. S. (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochemical Journal*, 384(2), 201–232. <https://doi.org/10.1042/BJ20041142>
- Gamblin, T. C., Chen, F., Zambrano, A., Abraha, A., Lagalwar, S., Guillozet, A. L., Lu, M., Fu, Y., Garcia-Sierra, F., LaPointe, N., Miller, R., Berry, R. W., Binder, L. I., & Cryns, V. L. (2003). Caspase cleavage of tau: Linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(17), 10032–10037. <https://doi.org/10.1073/pnas.1630428100>
- Gardai, S. J., McPhillips, K. A., Frasch, S. C., Janssen, W. J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J. E., Bratton, D. L., Oldenborg, P.-A., Michalak, M., & Henson, P. M. (2005). Cell-Surface Calreticulin Initiates Clearance of Viable or Apoptotic Cells through trans-Activation of LRP on the Phagocyte. *Cell*, 123(2), 321–334. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.032>
- Gastard, M. C., Troncoso, J. C., & Koliatsos, V. E. (2003). Caspase activation in the limbic cortex of subjects with early Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 54(3), 393–398. <https://doi.org/10.1002/ana.10680>
- Gervais, F. G., Xu, D., Robertson, G. S., Vaillancourt, J. P., Zhu, Y., Huang, J., LeBlanc, A., Smith, D., Rigby, M., Shearman, M. S., Clarke, E. E., Zheng, H., van der Ploeg, L. H. T., Ruffolo, S. C., Thornberry, N. A., Xanthoudakis, S., Zamboni, R. J., Roy, S., & Nicholson, D. W. (1999). Involvement of Caspases in Proteolytic Cleavage of Alzheimer's Amyloid- β Precursor Protein and Amyloidogenic A β Peptide Formation. *Cell*, 97(3), 395–406. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80748-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80748-5)
- *Ghavami, S., Hashemi, M., Ande, S. R., Yeganeh, B., Xiao, W., Eshraghi, M., Bus, C. J., Kadkhoda, K., Wiechec, E., Halayko, A. J., & Los, M. (2009). Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *Journal of Medical Genetics*, 46(8), 497–510. <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.066944>
- *Glücksman, A. (1951). Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biological Reviews*, 26(1), 59–86. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1951.tb00774.x>
- Gong, R., Wang, D., Abbas, G., Li, S., Liu, Q., Cui, M., & Zhang, X.-E. (2022). A switch-on molecular biosensor for detection of caspase-3 and imaging of apoptosis of cells. *Science China Life Sciences*, 65(3), 540–549. <https://doi.org/10.1007/s11427-021-1986-7>

- Gourlay, C. W., Carpp, L. N., Timpson, P., Winder, S. J., & Ayscough, K. R. (2004). A role for the actin cytoskeleton in cell death and aging in yeast. *Journal of Cell Biology*, 164(6), 803–809. <https://doi.org/10.1083/jcb.200310148>
- Han, Z., Hendrickson, E. A., Bremner, T. A., & Wyche, J. H. (1997). A Sequential Two-Step Mechanism for the Production of the Mature p17:p12 Form of Caspase-3 in Vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 272(20), 13432–13436. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.20.13432>
- *Hardwick, J. M., & Soane, L. (2013). Multiple Functions of BCL-2 Family Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(2), 1–22. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008722>
- Hardy, J. A., Lam, J., Nguyen, J. T., O'Brien, T., & Wells, J. A. (2004). Discovery of an allosteric site in the caspases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(34), 12461–12466. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404781101>
- Hermel, E., Gafni, J., Propp, S. S., Leavitt, B. R., Wellington, C. L., Young, J. E., Hackam, A. S., Logvinova, A. v, Peel, A. L., Chen, S. F., Hook, V., Singaraja, R., Krajewski, S., Goldsmith, P. C., Ellerby, H. M., Hayden, M. R., Bredesen, D. E., & Ellerby, L. M. (2004). Specific caspase interactions and amplification are involved in selective neuronal vulnerability in Huntington's disease. *Cell Death & Differentiation*, 11(4), 424–438. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401358>
- *Herold, M. J., McPherson, K. G., & Reichardt, H. M. (2006). Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(1), 60. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5390-y>
- Huang, Q., Li, F., Liu, X., Li, W., Shi, W., Liu, F. F., O'Sullivan, B., He, Z., Peng, Y., Tan, A. C., Zhou, L., Shen, J., Han, G., Wang, X. J., Thorburn, J., Thorburn, A., Jimeno, A., Raben, D., Bedford, J. S., & Li, C. Y. (2011). Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nature Medicine*, 17(7), 860–866. <https://doi.org/10.1038/nm.2385>
- Iuvone, T., de Filippis, D., Esposito, G., D'Amico, A., & Izzo, A. A. (2006). The Spice Sage and Its Active Ingredient Rosmarinic Acid Protect PC12 Cells from Amyloid- β Peptide-Induced Neurotoxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317(3), 1143–1149. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.099317>
- Jana, K. (2013). Caspases: A Potential Therapeutic Targets in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Translational Medicine*, 01(S2). <https://doi.org/10.4172/2161-1025.S2-006>
- Jiang, T., Zhi, X.-L., Zhang, Y.-H., Pan, L.-F., & Zhou, P. (2012). Inhibitory effect of curcumin on the Al(III)-induced A β 42 aggregation and neurotoxicity in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1822(8), 1207–1215. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.04.015>
- *Julien, O., & Wells, J. A. (2017). Caspases and their substrates. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 24, Issue 8, pp. 1380–1389). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.44>
- Kamada, S., Kusano, H., Fujita, H., Ohtsu, M., Koya, R. C., Kuzumaki, N., & Tsujimoto, Y. (1998). A cloning method for caspase substrates that uses the yeast two-hybrid system: Cloning of the antiapoptotic gene gelsolin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(15), 8532–8537. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.8532>

- *Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239–257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>
- Khan, S., Ahmad, K., Alshammari, E. M. A., Adnan, M., Baig, M. H., Lohani, M., Somvanshi, P., & Haque, S. (2015). Implication of Caspase-3 as a Common Therapeutic Target for Multineurodegenerative Disorders and Its Inhibition Using Nonpeptidyl Natural Compounds. *BioMed Research International*, 2015, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/379817>
- Khatoon, R., Kaushik, P., & Parvez, S. (2022). Mitochondria-Related Apoptosis Regulation by Minocycline: A Study on a Transgenic Drosophila Model of Alzheimer’s Disease. *ACS Omega*, 7(23), 19106–19112. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c05653>
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., & Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO Journal*, 14(22), 5579–5588. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00245.x>
- Knapp, D. J. H. F., Kannan, N., Pellacani, D., & Eaves, C. J. (2017). Mass Cytometric Analysis Reveals Viable Activated Caspase-3+ Luminal Progenitors in the Normal Adult Human Mammary Gland. *Cell Reports*, 21(4), 1116–1126. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.096>
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T. J., Kirschner, M. W., Kohts, K., Kwiatkowski, D. J., & Williams, L. T. (1997). Caspase-3-Generated Fragment of Gelsolin: Effector of Morphological Change in Apoptosis. *Science*, 278(5336), 294–298. <https://doi.org/10.1126/science.278.5336.294>
- Kuida, K., Zheng, T. S., Na, S., Kuan, C.-Y., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P., & Flavell, R. A. (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature*, 384(6607), 368–372. <https://doi.org/10.1038/384368a0>
- Lakhani, S. A., Masud, A., Kuida, K., Porter, G. A., Booth, C. J., Mehal, W. Z., Inayat, I., & Flavell, R. A. (2006). Caspases 3 and 7: Key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science*, 311(5762), 847–851. <https://doi.org/10.1126/science.1115035>
- Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G., & Earnshaw, W. C. (1994). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*, 371(6495), 346–347. <https://doi.org/10.1038/371346a0>
- Li, F., Huang, Q., Chen, J., Peng, Y., Roop, D. R., Bedford, J. S., & Li, C.-Y. (2010). Apoptotic Cells Activate the “Phoenix Rising” Pathway to Promote Wound Healing and Tissue Regeneration. *Science Signaling*, 3(110). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000634>
- Liadis, N., Murakami, K., Eweida, M., Elford, A. R., Sheu, L., Gaisano, H. Y., Hakem, R., Ohashi, P. S., & Woo, M. (2005). Caspase-3-Dependent β -Cell Apoptosis in the Initiation of Autoimmune Diabetes Mellitus. *Molecular and Cellular Biology*, 25(9), 3620–3629. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.9.3620-3629.2005>

- Liu, Q. (2014). Lentivirus mediated interference of Caspase-3 expression ameliorates the heart function on rats with acute myocardial infarction. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 18(13), 1852–1858. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25010613>
- Liu, T., Wang, L., Chen, H., Huang, Y., Yang, P., Ahmed, N., Wang, T., Liu, Y., & Chen, Q. (2017). Molecular and Cellular Mechanisms of Apoptosis during Dissociated Spermatogenesis. *Frontiers in Physiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00188>
- Lopez, A., Reyna, D. E., Gitego, N., Kopp, F., Zhou, H., Miranda-Roman, M. A., Nordstrøm, L. U., Narayanagari, S.-R., Chi, P., Vilar, E., Tsirigos, A., & Gavathiotis, E. (2022). Co-targeting of BAX and BCL-XL proteins broadly overcomes resistance to apoptosis in cancer. *Nature Communications*, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28741-7>
- Louneva, N., Cohen, J. W., Han, L.-Y., Talbot, K., Wilson, R. S., Bennett, D. A., Trojanowski, J. Q., & Arnold, S. E. (2008). Caspase-3 Is Enriched in Postsynaptic Densities and Increased in Alzheimer's Disease. *The American Journal of Pathology*, 173(5), 1488–1495. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.080434>
- Lovell, J. F., Billen, L. P., Bindner, S., Shamas-Din, A., Fradin, C., Leber, B., & Andrews, D. W. (2008). Membrane Binding by tBid Initiates an Ordered Series of Events Culminating in Membrane Permeabilization by Bax. *Cell*, 135(6), 1074–1084. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.010>
- Macias, D., Ganan, Y., Sampath, T. K., Piedra, M. E., Ros, M. A., & Hurle, J. M. (1997). Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development*, 124(6), 1109–1117. <https://doi.org/10.1242/dev.124.6.1109>
- Maedler, K., Spinas, G. A., Lehmann, R., Sergeev, P., Weber, M., Fontana, A., Kaiser, N., & Donath, M. Y. (2001). Glucose Induces β -Cell Apoptosis Via Upregulation of the Fas Receptor in Human Islets. *Diabetes*, 50(8), 1683–1690. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.8.1683>
- Martínez-Lagunas, K., Yamaguchi, Y., Becker, C., Geisen, C., DeRuiter, M. C., Miura, M., Fleischmann, B. K., & Hesse, M. (2020). In vivo detection of programmed cell death during mouse heart development. *Cell Death & Differentiation*, 27(4), 1398–1414. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0426-2>
- *Martinon, F., Burns, K., & Tschopp, J. (2002). The Inflammasome. *Molecular Cell*, 10(2), 417–426. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00599-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00599-3)
- Mashima, T., Naito, M., & Tsuruo, T. (1999). Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal actin plays a positive role in the process of morphological apoptosis. *Oncogene*, 18(15), 2423–2430. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202558>
- *McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), 1–28. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>
- McKenzie, M. D., Carrington, E. M., Kaufmann, T., Strasser, A., Huang, D. C. S., Kay, T. W. H., Allison, J., & Thomas, H. E. (2008). Proapoptotic BH3-Only Protein Bid Is Essential For Death Receptor-Induced Apoptosis of Pancreatic β -Cells. *Diabetes*, 57(5), 1284–1292. <https://doi.org/10.2337/db07-1692>

- McStay, G. P., Salvesen, G. S., & Green, D. R. (2008). Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: implications for analysis of apoptotic pathways. *Cell Death & Differentiation*, 15(2), 322–331. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402260>
- Meergans, T., Hildebrandt, A.-K., Horak, D., Haenisch, C., & Wendel, A. (2000). The short prodomain influences caspase-3 activation in HeLa cells. *Biochemical Journal*, 349(1), 135. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3490135>
- Miscione, G. pietro, Calvaresi, M., & Bottoni, A. (2010). Computational evidence for the catalytic mechanism of caspase-7. A DFT investigation. *Journal of Physical Chemistry B*, 114(13), 4637–4645. <https://doi.org/10.1021/jp908991z>
- Miura, M., Chen, X.-D., Allen, M. R., Bi, Y., Gronthos, S., Seo, B.-M., Lakhani, S., Flavell, R. A., Feng, X.-H., Robey, P. G., Young, M., & Shi, S. (2004). A crucial role of caspase-3 in osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells. *Journal of Clinical Investigation*, 114(12), 1704–1713. <https://doi.org/10.1172/JCI20427>
- *Mukherjee, A., & Williams, D. W. (2017). More alive than dead: Non-apoptotic roles for caspases in neuronal development, plasticity and disease. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 24, Issue 8, pp. 1411–1421). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.64>
- Narula, J., Pandey, P., Arbustini, E., Haider, N., Narula, N., Kolodgie, F. D., Dal Bello, B., Semigran, M. J., Bielsa-Masdeu, A., Dec, G. W., Israels, S., Ballester, M., Virmani, R., Saxena, S., & Kharbanda, S. (1999). Apoptosis in heart failure: Release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(14), 8144–8149. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.8144>
- *Nicholson, D. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death & Differentiation*, 6(11), 1028–1042. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400598>
- Pereira, N. A., & Song, Z. (2008). Some commonly used caspase substrates and inhibitors lack the specificity required to monitor individual caspase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377(3), 873–877. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.10.101>
- Ponder, K. G., & Boise, L. H. (2019). The prodomain of caspase-3 regulates its own removal and caspase activation. *Cell Death Discovery*, 5(1), 56. <https://doi.org/10.1038/s41420-019-0142-1>
- *Pop, C., Feeney, B., Tripathy, A., & Clark, A. C. (2003). Mutations in the Procaspase-3 Dimer Interface Affect the Activity of the Zymogen. *Biochemistry*, 42(42), 12311–12320. <https://doi.org/10.1021/bi034999p>
- *Poreba, M., Strozyk, A., Salvesen, G. S., & Drag, M. (2013). Caspase Substrates and Inhibitors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(8), a008680–a008680. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008680>
- *Povea-Cabello, S., Oropesa-Ávila, M., de la Cruz-Ojeda, P., Villanueva-Paz, M., de la Mata, M., Suárez-Rivero, J., Álvarez-Córdoba, M., Villalón-García, I., Cotán, D., Ybot-González, P., & Sánchez-Alcázar, J. (2017). Dynamic Reorganization of the Cytoskeleton during Apoptosis: The Two Coffins Hypothesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2393. <https://doi.org/10.3390/ijms18112393>

- *Ravichandran, K. S. (2010). Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *Journal of Experimental Medicine*, 207(9), 1807–1817. <https://doi.org/10.1084/jem.20101157>
- Ribeil, J.-A., Zermati, Y., Vandekerckhove, J., Cathelin, S., Kersual, J., Dussiot, M., Coulon, S., Cruz Moura, I., Zeuner, A., Kirkegaard-Sørensen, T., Varet, B., Solary, E., Garrido, C., & Hermine, O. (2007). Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*, 445(7123), 102–105. <https://doi.org/10.1038/nature05378>
- Rodriguez, J., & Lazebnik, Y. (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes & Development*, 13(24), 3179–3184. <https://doi.org/10.1101/gad.13.24.3179>
- Sakahira, H., Enari, M., & Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 391(6662), 96–99. <https://doi.org/10.1038/34214>
- *Sakamaki, K., & Satou, Y. (2009). Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates. *Journal of Fish Biology*, 74(4), 727–753. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02184.x>
- Scott, F. L., Denault, J.-B., Riedl, S. J., Shin, H., Renatus, M., & Salvesen, G. S. (2005). XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs. *The EMBO Journal*, 24(3), 645–655. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600544>
- Sender, R., & Milo, R. (2021). The distribution of cellular turnover in the human body. *Nature Medicine*, 27(1), 45–48. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-01182-9>
- *Shamas-Din, A., Kale, J., Leber, B., & Andrews, D. W. (2013). Mechanisms of Action of Bcl-2 Family Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), a008714–a008714. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008714>
- *Shi, Y. (2002). Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. *Molecular Cell*, 9(3), 459–470. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00482-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00482-3)
- Silke, J. (2001). Direct inhibition of caspase 3 is dispensable for the anti-apoptotic activity of XIAP. *The EMBO Journal*, 20(12), 3114–3123. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.12.3114>
- *Singh, N., & Bose, K. (2015). Apoptosis: Pathways, molecules and beyond. In *Proteases in Apoptosis: Pathways, Protocols and Translational Advances* (pp. 1–30). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19497-4_1
- Sordet, O., Rébé, C., Plenchette, S., Zermati, Y., Hermine, O., Vainchenker, W., Garrido, C., Solary, E., & Dubrez-Daloz, L. (2002). Specific involvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages. *Blood*, 100(13), 4446–4453. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1778>
- *Spuch, C., & Navarro, C. (2011). Liposomes for Targeted Delivery of Active Agents against Neurodegenerative Diseases (Alzheimer’s Disease and Parkinson’s Disease). *Journal of Drug Delivery*, 2011, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2011/469679>
- Stennicke, H. R., Renatus, M., Meldal, M., & Salvesen, G. S. (2000). Internally quenched fluorescent peptide substrates disclose the subsite preferences of human caspases 1, 3, 6, 7 and 8. *The Biochemical Journal*, 350 Pt 2, 563–568. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10947972>

- Stennicke, H. R., & Salvesen, G. S. (1997). Biochemical Characteristics of Caspases-3, -6, -7, and -8. *Journal of Biological Chemistry*, 272(41), 25719–25723. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.41.25719>
- *Stennicke, H. R., & Salvesen, G. S. (1998). Properties of the caspases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1387(1–2), 17–31. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(98\)00133-2](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(98)00133-2)
- *Stennicke, H., & Salvesen, G. (1999). Catalytic properties of the caspases. *Cell Death & Differentiation*, 6(11), 1054–1059. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400599>
- Sulpizi, M., Laio, A., VandeVondele, J., Cattaneo, A., Rothlisberger, U., & Carloni, P. (2003). Reaction mechanism of caspases: Insights from QM/MM Car-Parrinello simulations. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 52(2), 212–224. <https://doi.org/10.1002/prot.10275>
- *Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- *Tong, D., Liu, Q., Wang, L., Xie, Q., Pang, J., Huang, Y., Wang, L., Liu, G., Zhang, D., Lan, W., & Jiang, J. (2018). The roles of the COX2/PGE2/EP axis in therapeutic resistance. *Cancer and Metastasis Reviews*, 37(2–3), 355–368. <https://doi.org/10.1007/s10555-018-9752-y>
- Tseng, A.-S., Adams, D. S., Qiu, D., Koustubhan, P., & Levin, M. (2007). Apoptosis is required during early stages of tail regeneration in *Xenopus laevis*. *Developmental Biology*, 301(1), 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.10.048>
- *Tsujimoto, Y. (1998). Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes to Cells*, 3(11), 697–707. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1998.00223.x>
- Vartanian, A. A., Burova, O. S., Stepanova, E. v., & Baryshnikov, A. Y. (2007). The involvement of apoptosis in melanoma vasculogenic mimicry. *Melanoma Research*, 17(1), 1–8. <https://doi.org/10.1097/CMR.0b013e3280112b76>
- *Voss, A. K., & Strasser, A. (2020). The essentials of developmental apoptosis. In *F1000Research* (Vol. 9). F1000 Research Ltd. <https://doi.org/10.12688/f1000research.21571.1>
- *Wang, J., & Lenardo, M. J. (2000). Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *Journal of Cell Science*, 113(5), 753–757. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.5.753>
- Wang, W., Zhu, M., Xu, Z., Li, W., Dong, X., Chen, Y., Lin, B., & Li, M. (2019). Ropivacaine promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through damaging mitochondria and activating caspase-3 activity. *Biological Research*, 52(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0242-7>
- Wei, M. C., Zong, W.-X., Cheng, E. H.-Y., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B., & Korsmeyer, S. J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: A Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death. *Science*, 292(5517), 727–730. <https://doi.org/10.1126/science.1059108>

- Weil, M., Jacobson, M. D., & Raff, M. C. (1997). Is programmed cell death required for neural tube closure? *Current Biology*, 7(4), 281–284. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(06\)00125-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(06)00125-4)
- *Wong, R. S. Y. (2011). Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. In *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* (Vol. 30, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87>
- Xu, Z., Zhou, Y., Liu, M., Ma, H., Sun, L., Zahid, A., Chen, Y., Zhou, R., Cao, M., Wu, D., Zhao, W., Li, B., & Jin, T. (2021). Homotypic CARD-CARD interaction is critical for the activation of NLRP1 inflammasome. *Cell Death & Disease*, 12(1), 57. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03342-8>
- Yaoita, H., Ogawa, K., Maehara, K., & Maruyama, Y. (1998). Attenuation of Ischemia/Reperfusion Injury in Rats by a Caspase Inhibitor. *Circulation*, 97(3), 276–281. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.97.3.276>
- Yoshimori, A., Sakai, J., Sunaga, S., Kobayashi, T., Takahashi, S., Okita, N., Takasawa, R., & Tanuma, S. (2007). Structural and functional definition of the specificity of a novel caspase-3 inhibitor, Ac-DNLD-CHO. *BMC Pharmacology*, 7(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2210-7-8>
- *Youle, R. J., & Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 47–59. <https://doi.org/10.1038/nrm2308>
- Zhou, M., Liu, X., Li, Z., Huang, Q., Li, F., & Li, C. Y. (2018). Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells. *International Journal of Cancer*, 143(4), 921–930. <https://doi.org/10.1002/ijc.31374>
- Zhu, S., Stavrovskaya, I. G., Drozda, M., Kim, B. Y. S., Ona, V., Li, M., Sarang, S., Liu, A. S., Hartley, D. M., Wu, D. C., Gullans, S., Ferrante, R. J., Przedborski, S., Kristal, B. S., & Friedlander, R. M. (2002). Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature*, 417(6884), 74–78. <https://doi.org/10.1038/417074a>
- Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., & Wang, X. (1997). Apaf-1, a Human Protein Homologous to *C. elegans* CED-4, Participates in Cytochrome c-Dependent Activation of Caspase-3. *Cell*, 90(3), 405–413. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80501-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80501-2)