Kaspaze kao ciljne molekule u razvoju antitumorskih lijekova

Oršulić, Katarina

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:382625

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Sveučilišni preddiplomski studij kemije

Katarina Oršulić

Kaspaze kao ciljne molekule u razvoju antitumorskih lijekova

Caspases as target molecules in antitumor drug development

Završni rad

Mentor:
doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik
Neposredni voditelj:
Marija Paurević, mag. chem.

Osijek, 2018.

Sažetak:

Kaspaze su proteaze koje u svom aktivnom mjestu sazdrže cistein te cijepaju proteinski supstrat nakon aspartata. Imaju ulogu u raznim staničnim procesima, uključujući apoptozu, diferencijaciju, upalne odgovore i dr.. Kod ljudi je prisutno 12 kaspaza, a dijele se na kaspaze koje sudjeluju u procesu apoptoze i kaspaze uključene u upalnom odgovoru. Kaspaze koje sudjeluju u apoptozi se dijele na kaspaze inicijatore i kaspaze izvršitelje.

Iako sudjeluju u mnogim staničnim procesima, u tumorsikim se stanicama kaspaze najčešće povezuju s apoptozom, pri čemu imaju ključnu ulogu u izvršenju stanične smrti. Tumori nastaju nekontroliranom proliferacijom stanica, koja je, među ostalim, uzrokovana upravo gubitkom kontrole stanične smrti. Time dolazi do preživljavanja tumorskih stanica te u konačnici metastaziranja tumora. Novija se istraživanja se usmjeravaju na kaspaze kao ciljne molekule u liječenju tumora, odnosno regulaciju njihova djelovanja kojom bi se pospješila apoptoza u tumorskim stanicama. Upotrebom inhibitora ili aktivatora kaspaza može se utjecati na sudbinu stanice, odnosno na njeno preživljavanje ili smrt. Cilj je pronaći lijek sa što manje nuspojava, bez utjecaja na zdrave stanice.

Ključne riječi: kaspaze, apoptoza, tumor, antitumorski lijekovi

Abstract:

Caspases as target molecules in antitumor drug development

Caspases are a proteases with a conserved cysteine residue at their active site. There enzymes cleave their substrates after an aspartate residue. They have role in various cellular processes, including apoptosis, differentiation and inflammatory responses. Twelve caspases have been identified in humans and are divided into two groups, caspases involved in the process of apoptosis and caspases involved in inflammatory response. Caspases participating in apoptosis are divided into caspases initiators and caspases effectors.

Even though, caspases have an effect on many cellular processes, when it comes to tumors, caspases are most commonly associated with apoptosis, having the crucial role inthe execution of cell death. Tumors are caused by uncontrollable cell proliferation, which is usually a result of the loss of cell death control. This results in the survival of tumor cells and, ultimately, tumor metastasis. Current research is directed to caspases as target molecules in cancer treatment or to the regulation of their activity in order to increase apoptosis in tumor cells. Caspase inhibitor or activator can affect the cell fate, survival or its death. The goal is to find a drug with as little side effects as possible and without affecting the healthy cells.

Keywords: caspases, apoptosis, tumor, antitumor drugs

Sadržaj:

1. Uvod 6
2. Apoptoza 7
   2.1.Vanjski mehanizam 7
   2.2.Unutarnji mehanizam 9
3. Kaspaze 11
   3.1. Struktura i funkcija kaspaza 11
   3.2. Supstrati kaspaza 14
   3.3. Neapoptozni put kaspaze 14
      3.3.1. Popravak i regeneracija tkiva 15
      3.3.2. Proliferacija limfocita 15
      3.3.3. Motilitet i metastaze 16
4. Kaspaze i tumori 17
   4.1. Kaspaza-1 18
   4.2. Kaspaza-2 18
   4.3. Kaspaza-3 19
   4.4. Kaspaza-6 i kaspaza-7 19
   4.5. Kaspaza-8 21
   4.6. Kaspaza-10 21
   4.7. Kaspaza-14 22
5. Aktivatori kaspaze 23
   5.1. PAC-1 23
   5.2. Spoj-42 24
   5.3. Spoj-2 24
   5.4. Spoj-1541 25
   5.5. Derivati biljke *Justicia procumbens* 26

6. Inhibitori kaspaza 26
6.1. IAP proteini 26
6.2. Survivin 27
6.3. Peptidomimetički inhibitori 28
6.4. Male molekule inhibitori kaspaza 29
6.5. Alosterički inhibitori kaspaze 30
7. Zaključak 31
8. Literatura 32

1. Uvod

Kaspaze su skupina proteaza koje u aktivnom mjestu sadrže cistein te cijepaju proteinski supstrat nakon aspartata. Kod sisavaca je poznato 18 kaspaza, a kod ljudi postoji ukupno 12 poznatih kaspaza.[1,2] Podijeljene su u dvije skupine, kaspaze koje sudjeluju u procesu apoptoze i kaspaze koje sudjeluju u upalnom odgovoru. U prvu skupinu ubrajaju se kaspaze-2, -3 te kaspaze 6-10, a u drugu skupinu kaspaze-1, -4, -5 i -12. Apoptozne kaspaze se dalje dijele na kaspaze inicijatore i kaspaze izvršitelje.[2,3,4] Kaspaze u stanici postoje kao prokaspaze, a do njihove aktivacije dolazi unutarnjim ili vanjskim mehanizmom apoptoze.[1,4,5]

Tumori nastaju zbog nekontroliranog povećanja proliferacije, što je posljedica gubitka kontrole stanične smrti.[6,7] Kod takvih stanica dolazi do izbjegavanja apoptoznog mehanizma.[8,9] Upravo kod takvih stanica se može vidjeti važnost kaspaza. Jedna od uloga kaspaza je sprječavanje tumora.[10]

Cilj ovog rada je istražiti mogući potencijal kaspaza kao ciljnih molekula u liječenju tumora. U radu je za svaku pojedinu kaspazu navedeno u kojim tumorskim stanicama je prisutna te nalazi li se u tim stanicama u povišenoj ili smanjenoj ekspresiji. Ovisno o ekspresiji kaspaza, koriste se aktivatori ili inhibitori. I aktivatori i inhibitori još uvijek su nedovoljno istraženi. Ukoliko se u nekoj tumorskoj stanici nalazi smanjena ekspresija određene kaspaze, potrebno je koristiti aktivatore.[11] Aktivatori opisani u ovom radu su PAC-1, spoj-2, spoj-1541, spoj-42[12] te se kao aktivatori koriste i derivati biljke Justicia procumbens.[13] Inhibitori se koriste kod povišene ekspresije određene kaspaze [11] i inhibitori opisani u radu su IAP proteini[10], survivin[14], peptidomimetički inhibitori, male molekule i alosterički inhibitori kaspaze.[5]

2. Apoptoza

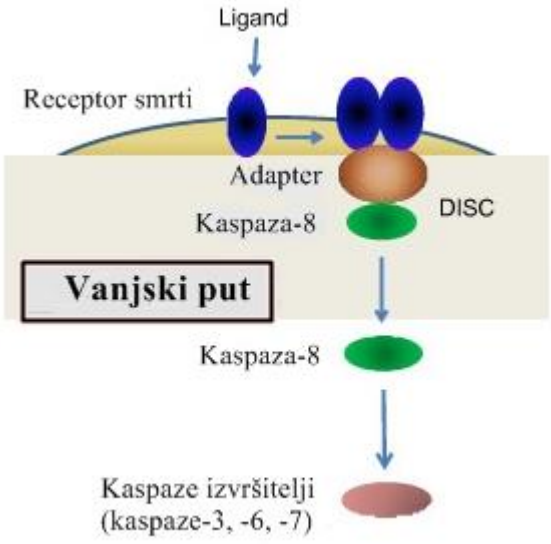
Apoptoza je jedan od oblika stanične smrti koji služi za uklanjanje oštećenih, starih, inficiranih i općenito neželjenih stanica u svrhu održavanja normalnog razvoja tkiva.[3-5,10,14-19] Ovim se procesom dnevno ukloni oko 60 milijardi stanica iz ljudskog tijela[16] te proces apoptoze može trajati od 6 do 24 sata.[4] Za stanice je vrlo bitno stanično održavanje ravnoteže između apoptoze i proliferacije i upravo zbog toga apoptoza mora biti strogo reguliran proces. Neispravna regulacija i promjene u proteinima, koji su odgovorni za tu ravnotežu, može rezultirati ljudskim oboljenjima, uključujući nastanak malignih stanica.[5,16,17]

Postoje dva mehanizma apoptoze, unutarnji i vanjski. Vanjski mehanizam karakterizira vezanje liganada na receptore smrti, dok unutarnji mehanizam ovisi o metaboličkom stanju stanice te signalima koji se prenose kroz mitohondrije.[3,4,10,14-21] Oba mehanizma uzrokuju biokemijske i strukturne promjene stanice.[4,1,16] Morfološke promjene kroz koje prolaze stanice u apoptozi su kondenzacija kromatina i stvaranje mjehurića na membrani, kidanje molekule deoksiribonukleinske kiseline te razlaganje citoskeleta i formiranje apoptoznih tjelešaca.[4,19] Makrofagi i susjedne stanice dovode do uklanjanja takvih stanica iz tkiva, ali bez izazivanja upalnog procesa.[3,4,13] Svi ti podaci koriste se za razvoj strategija koje će koristiti u liječenju zloćudnih bolesti jer je poznato da su tumorske stanice otpornije na smrt te daimaju sposobnost zaobilaženja kontrolnih točaka koje normalno održavaju promet stanica u zdravim tkivima.[20] Upravo zbog toga, koriste se kemoterapijski lijekovi koji potiču proces smrt stanice. Međutim, visoke doze u terapiji protiv raka mogu imati neželjene nuspojave, odnosno mogu indirektno utjecati na smrt zdravih stanica.[3,20]

2.1.Vanjski mehanizam

Vanjski put ili mehanizam apoptoze aktiviraju ligandi vezanjem na transmembranske receptore smrti, kao odgovor na izvanstanični signal. Ti receptori pripadaju superobitelji

faktora nekroze tumora (TNF, eng. *tumor necrosis factor*).[4,10,13,15,22] Članovi obitelji TNF sadrže unutarstaničnu domenu koja se naziva domenom smrti (DD, eng. *death domain*).[4,10,15] Ta domena potrebna je za učinkovito prenošenje signala za smrt s vanjske površine stanice u citosol. Neki od TNF receptora su CD95, potom receptori za ligand povezan s TNF koji inducira apoptozu npr. TRAIL-R1 i TRAIL-R2 (eng. TNF – *related apoptosis inducing ligand receptor* 1 i 2) te receptor za faktor nekroze tumora 1 (TNFR-1, eng. *tumor necrosis factor receptor*). Njihovi ligandi za signal smrti su FasL, TNFα i TRAIL. Domena za smrt na citoplazmatskom repu receptora smrti prima signalni kompleks koji inducira smrt (DICS,eng. *death-inducing signaling complex*). Smještajem prokaspaze-8 ili -10 proksimalno u DISC dolazi do aktivacije tih kaspaza.[1,4,10,15-17,20,22] Slijedeći njihovu aktivaciju, kaspaze pokretači, ili inicijatori, cijepaju prokaspaze-3, -6 ili -7 (Slika 1.). [2,4,13,15-17,20] Postoje dva načina, ukoliko je razina aktivirane kaspaze-8 dovoljna, doći će do izravne aktivacije kaspaze-3 i time i do smrti stanice. No, ako razina aktivirane kaspaze-8 nije dovoljna, apoptoza ide amplifikacijom kroz mitohondrije, putem aktivacije proteina Bid. Nakon vezanja liganda na receptor, na kompleks se vežu inicijacijske kaspaze, odnosno kaspaze-8 i -10 te dolazi do aktivacije prokaspaza, kidanja izvršnih kaspaza-3 i -7[4,15,16], kidanja jezgrine DNA u fragmente od oko 200 baznih parova, a time i do strukturnih promjena.[4]



Slika 1. Prikaz vanjskog mehanizma apoptoze. Slika adaptirana iz [2].

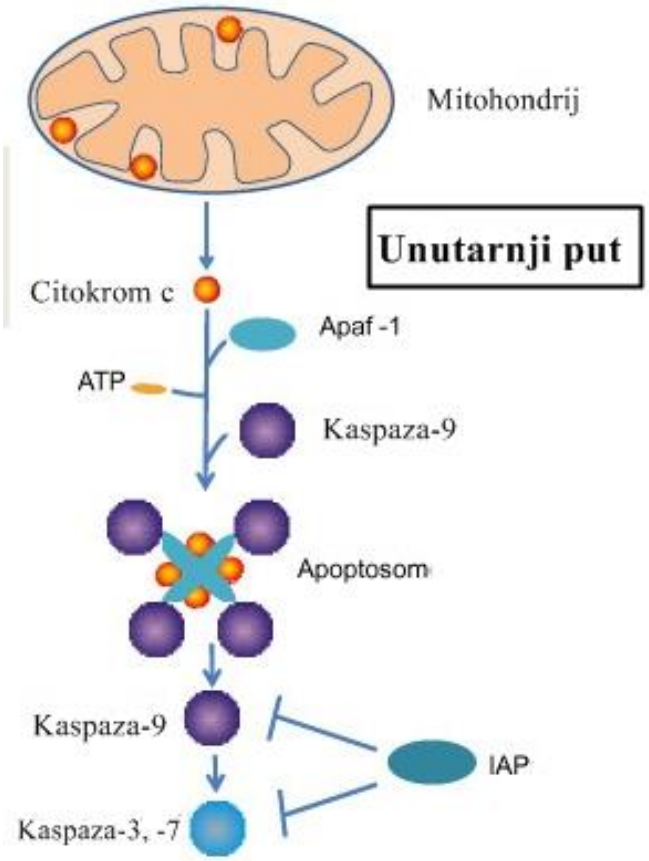
2.2.Unutarnji mehanizam

Unutarnji put je ovisan o mitohondrijima.[10] U stanicama može biti aktiviran oštećenjem DNA, nedostatkom hormona rasta, kemoterapijskim sredstvima, virusnom infekcijom, citokinima, reaktivnim kisikovim vrstama te prisutnošću dvolančane RNA (dsRNA, eng. double stranded ribonucleic acid).[1,3,4,10,13,14,17]

Protein p53 se u normalnim stanicama nalazi u inaktivnom obliku i on je ključan kod pokretanja unutarnjeg puta uzrokovanog oštećenjem DNA. Protein p53 ima funkciju tumorskog supresora, a mnogi tumori imaju mutiran gen za sintezu p53 proteina. Oštećenje DNA potiče transkripciju *p53* gena i njegovo nakupljanje u stanici. Nakon toga moguća su dva slučaja, dolazi do zaustavljanja staničnog ciklusa u G1-fazi i popravljanja oštećene DNA ili može doći do pokretanja apoptoze, ukoliko se oštećenja ne mogu popraviti.[4]

Unutarnji put počinje otvaranjem pora na mitohondrijskoj membrani i otpuštanjem mnogih apoptoznih faktora, uključujući citokrom c, Smac (aktivator kaspaze)/DIABLO (IAP vezajući protein) i endonukleazu G. Time se stvara Apaf-1 čimbenik (eng. *apoptotic protease activating factor*) te apoptosom. Apoptosom je sastavljen od citokroma c, kaspaze-9 i Apaf-1 čimbenika. Taj kompleks aktivira prokaspazu-9 te služi za pokretanje izvršnih kaspaza, što dovodi do apoptoze (Slika 2.). [1,3,4,10,13,15-18,20,22]

Ključni za preživljavanje stanica su članovi obitelji B limfoma tipa 2 (Bcl-2, eng. *B cell limphom 2 protein*). Bcl-2 proteini dijele se na proapoptotske (Bax, Bak, Bid, Bad i Bik) i antiapoptotske (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1) proteine.[4,10,14,16,20] Omjer tih proteina utječe na osjetljivost stanice na apoptozu, a povećana propusnost mitohondrija je djelomično zadovoljena cijepanjem Bid proteina te kaspazama-2, -8 i -10. Bcl-2 proteini kontroliraju propusnost mitohondrija oblikovanjem pora na vanjskoj membrani ili reguliranjem otvaranja i zatvaranja pora za propusnost.[4,10,13] Unutarnji i vanjski put nisu međusobno isključujući te su procesi ključni u liječenju tumorskih stanica. Tumorske stanice uništavaju se citotoksičnim lijekovima koji dovode do stanične smrti putem apoptoze, a unutarnji put je važan jer dovodi do povećanja osjetljivosti tumorskih stanica na citotoksične lijekove.[10]



Slika 2. Prikaz unutarnjeg mehanizma apoptoze. Slika adaptirana iz [2].

3. Kaspaze

Kaspaze su skupina proteaza koje u svom aktivnom mjestu sadrže cistein i cijepaju proteinski supstrat nakon aspartata te upravo od toga potječe i sama riječ kaspaza (eng. *caspase, c-asp-ase* od eng. *cysteine dependent aspartate-specific protease*).[1-5,7,10,12,13,22-24,25] Ovi enzimi imaju mnoge uloge u staničnim procesima, od kojih se mogu izdvojiti uloge u apoptozi, diferencijaciji, upalnim odgovorima, neuronskoj pregradnji i slično. Nalaze se i kod ljudi i kod životinja.[2,12,23] Kod sisavaca je poznato ukupno 18 kaspaza[7], od čega se kod ljudi nalazi samo 12. Kaspaze pronađene kod ljudi su kaspaze 1-10, kaspaza-12 i kaspaza-14.[1,2] Ovisno o njihovoj funkciji, podijeljene su u dvije skupine. Prva skupina uključuje kaspaze koje sudjeluju u procesu apoptoze, a to su kaspaze-2, kaspaze-3 te kaspaze 6-10. Druga skupina kaspaza je uključena u upalnom odgovoru, odnosno te kaspaze sudjeluju kao aktivatori citokina[a]. U drugu skupinu ubrajaju se kaspaze-1, -4, -5 i -12.[2-4] Apoptozne kaspaze se dijele na još dvije skupine, na kaspaze inicijatore i kaspaze izvršitelje. Ovakva je podjela s obzirom na vrijeme ulaska u apoptoznu kaskadu. Kaspaze inicijatori rano ulaze u kaskadu i u tu se skupinu ubrajaju kaspaze-2, -8, -9 i -10. Kaspaze inicijatori aktiviraju kaspaze izvršitelje, odnosno kaspaze- 3, -6 ili -7.[2-4,10,23] Ove kaspaze cijepaju različite proteine u stanici, time uzrokuju morfološke i biokemijske promjene te u konačnici i apoptozu.[4,23] U stanicama u kojima dolazi do apoptoze, zapravo dolazi do aktivacije kaspaza vanjskim ili unutarnjim mehanizmom.[1,4,5]

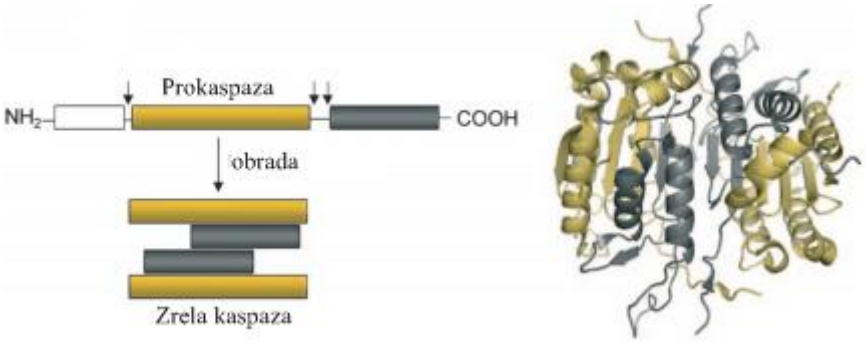
Kontroliranjem aktivnosti kaspaza može se regulirati apoptoza u različitim stanicama. Općenito, suzbijanje aktivnosti kaspaza može dovesti do tumora, a to je važna spoznaja u pronalasku terapije za tumore.

3.1. Struktura i funkcija kaspaza

Kaspaze su u stanici prisutne u obliku zimogena odnosno inaktivnih preteča koje se nazivaju prokaspaze. Neaktivni zimogeni sastoje se od prodomena. Neke prokaspaze su monomeri, neke dimeri, a struktura te monomerne jedinice je ista u svih prokaspaza. Svaka

[a] Citokini su polipeptidi ili glikolipidi koji prenose informacije među stanicama. Izlučuju ih mnogobrojne stanice kao odgovor na određeni podražaj. Djeluju na aktivaciju, proliferaciju i diferencijaciju stanica, posreduju pri imunološkim reakcijama ili ih reguliraju, reguliraju upalne procese i dr.

monomerna jedinica sadrži N-terminalnu prodomenu te veliku i malu podjedinicu (Slika 3.).[2,3,11,13,22,23,25] Također, monomer se sastoji od jezgre koju čini šest lančanih β-listova te pet α-uzvojnica na površini proteina.[11,21] Velika podjedinica je približno 20 kDa, a mala oko 10 kDa.[6,11] Podjedinice su međusobno povezane kovalentnom vezom preko slijeda aminokiselina koji čini tzv. poveznicu među podjedinicama. Ona se sastoji od oko 10 aminokiselina[3,6,11] i njenim cijepanjem dolazi do sazrijevanja kaspaza. Domene kaspaza mogu sadržavati različit broj aminokiselina. Najmanje aminokiselina, njih 19, ima kaspaza-14, a najviše kaspaza-10 koja sadržava 219 aminokiselina. U pravilu, kaspaze inicijatori sadrže duge prodomene, dok kaspaze izvršitelji sadrže kratke.[3,23] Domene imaju razne funkcije, među kojima se mogu izdvojiti olakšavanje dimerizacije, odvajanje proteina u citoplazmi, pomaganje u održavanju kaspaza kao intramolekularnih šaperona i slično. Domene kaspaza inicijatora sadrže prepoznavajuće motive uključene u interakcije koje vode do aktivacije zimogena.[3,6]

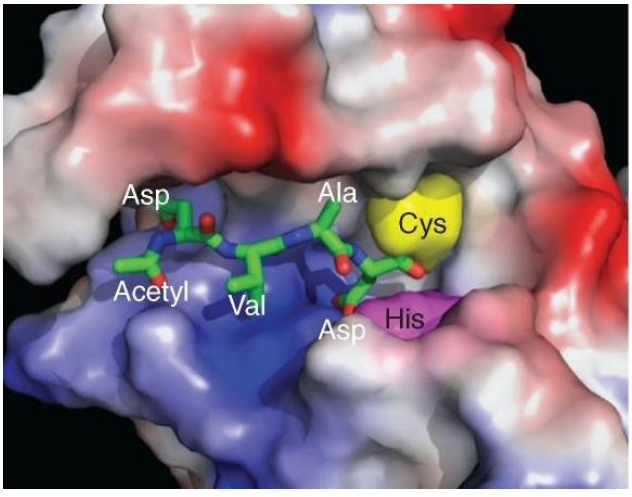


Slika 3. Prikaz prokaspaze te dobivanje zrele kaspaze, odnosno tetramera LSSL konfiguracije. Slika adaptirana iz [26].

Aktivna molekula kaspaze dobiva se povezivanjem dva prokaspazna monomera, čime se dobivaju zrele kaspaze, odnosno dimeri heterodimera koji sadrže dvije kopije velike i male podjedinice (Slika 3.). Konfiguracija tog tetramera označava se s LSSL, gdje L označava veliku podjedinicu (eng. *large subunit*), a S malu podjedinicu (eng. *small subunit*). Dimer sadrži dva aktivna mjesta na otprilike suprotnim krajevima molekule. Srž dimera sastoji se od 12 lanaca β-listova te je okružena sa mrežom α-uzvojnica.[3,6] Prostor za vezanje supstrata čini pet petlji koje se nalaze na površini proteina. Petlje su označene sa L1, L2, L3, L4 i L2'. Petlje L1-L4 su iz jednog heterodimera, a L2' iz drugog.[3,23]

Dimerizacija je ključna za stvaranje aktivnog mjesta. Kaspaze inicijatori se u fiziološkim koncentracijama nalaze u obliku monomera i moraju proći dimerizaciju da bi

postali aktivni. Suprotno, kaspaze izvršitelji pronađeni su kao stabilni, ali neaktivni dimeri pri fiziološkoj koncentraciji. Prokaspaze su neaktivne zbog neusklađenih aktivnih mjesta koja onda spriječavaju učinkovitu katalizu. Proteolitičkim cijepanjem poveznice među podjedinicama dolazi do aktivacije kaspaze jer dolazi do preuređenja petlji kod aktivnog mjesta.[3] Tetramer aktivnih kaspaza ima dva aktivna mjesta u obliku šupljina. U aktivnom mjestu nalazi se Cys^{285}, a u blizini njega je imidazolni dio His^{237}.[6,11] His^{237} privlači proton iz cisteina i na taj način pojačava njegovu nukleofilnost (Slika 4.). Bočni lanci Arg^{179} i Arg^{341} sudjeluju u direktnoj interakciji naboja sa asparaginskom kiselinom supstrata, time se pridonosi boljem prepoznavanju Asp na P1 položaju supstrata. P1 položaj označava aminokiselinu koja se nalazi na N-terminalnom kraju, kod mjesta cijepanja Asp.[6] Kaspaze kao specifične cisteinske proteaze mogu prepoznati četiri aminokiseline, koje su nazvane S4-S3-S2-S1. Cijepanje se odvija obično nakon C-terminalnog ostatka (S1), koji je obično asparagin.[11] Aminokiseline iz male podjedinice tvore S2 i S3 mjesta, a glavna razlika između kaspaza je S4 mjesto koje može primati različite supstrate.[6] Preferirani S3 položaj, za sve kaspaze sisavaca, je obično glutamin. Upravo zbog toga, specifičnost cijepanja kaspaze može se opisati kao X-Glu-X-Asp.[11] Istraživanjima je pokazano da su kaspaze osjetljive na prijelazne metale, kao što je Zn^{2+}, jer takvi ioni reagiraju s katalitičkim tiolom. Upravo se zbog toga, pretpostavlja da cink može spriječiti apoptozu, reagirajući sa kaspazom. Kaspaze se svrstavaju u najspecifičnije endopeptidaze te su otkriveni poželjni slijedovi prepoznavanja za kaspazu-1 i kaspazu-3, odnosno slijedovi koje supstrati moraju imati da bi ih te kaspaze prepoznale. Za kaspazu-1 poželjni slijed je Tyr-Val-Ala-Asp, dok je za kaspazu-3 Asp-Glu-Val-Asp.[6]



Slika 4. Aktivno mjesto kaspaze koje sazdrži Cys^{285}, u blizini kojeg se nalazi His^{237}.[25]

3.2. Supstrati kaspaza

Danas postoji velik broj poznatih proteina koji su supstrati kaspaza, a s daljnjim istraživanjima kaspaza taj se broj još povećava. Kaspaze imaju strogi zahtjev za aspartatnim ostatkom na P1 mjestu te različite preferencije za ostatcima za P2 do P4 mjesta, upravo zbog toga je jednostavno identificirati vjerojatna mjesta cijepanja unutar proteinskog supstrata. P2, P3 i P4 mjesta odnose se drugu, treću i četvrtu aminokiselinu, N-terminalnu do mjesta cijepanja Asp. Do sada otkriveni supstrati kaspaza dijele se u dvije skupine, velika skupina proteina za koje se smatra da su uključeni u regulaciji i izvođenju apoptoze te mala skupina protuupalnih citokinskih prekursora. Supstrati su također podijeljeni i u manje skupine, pa se razlikuju proteini stanične smrti, spojevi koji sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa, citoskeletni spojevi, prekursori citokina, tvari uključene u metabolizam DNA, bjelančevine neurodegenerativnih bolesti, tvari koje sudjeluju u metabolizmu RNA, prijenosu signala, transkripcijski faktori te ostali.[6]

Sve se više istražuju i mogući sintetski supstrati te postoji jako puno podataka o dizajnu, konstrukciji i primjeni sintetskih supstrata koji su doveli do jasnih uvida u katalitičke mehanizme i preferencije različitih kaspaza. Općenito, postoje dva načina proučavanja supstrata kaspaza. Prvi način su „urođene“ preferencije u rascjepima aktivnog mjesta po kojima se mogu razlikovati jedni od drugih. Drugi način uključuje proučavanje njihovih prirodnih bioloških supstrata te se to znanje onda može primijeniti za razvoj sintetskih supstrata. Prvo proučavanje govori o katalizi kaspaze. Ta istraživanja dovela su do određivanja sklonosti kaspaze za pojedine peptidne sekvence i time omogućavanja razvoja peptidnih i genski kodiranih sondi koje se mogu koristiti za praćenje aktivnosti kaspaze u stanici, ali i cijelom organizmu.[25]

3.3. Neapoptozni put kaspaze

Kaspaze se najvećim dijelom spominju kao regulatori apoptoze, ali one mogu sudjelovati i u drugim, neapoptoznim putevima. Upravo zbog toga, kaspaze sudjeluju u širokom rasponu staničnog ponašanja.[1,22]

3.3.1. Popravak i regeneracija tkiva

Kaspaze su ključne u održavanju homeostaze između apoptoze i regeneracije što je pak bitno za održavanje strukture i funkcije tkiva. Regeneracija počinje kao odgovor na ozljedu na način da mrtve stanice sudjeluju u signalom putu koji pokreće proliferaciju stanica na periferiji mjesta ozljede. Time se oštećeni dio tkiva zamijeni novim, koji je istog oblika i veličine.[22]

Jetra ima veliku moć regeneracije nekon ozljede. Istraživanja su pokazala da je kod nedostatka kaspaze-3 i kaspaze-7 smanjena regeneracija jetre i zacjeljivanja kožnih rana. U regeneraciji ovisnoj o kaspazama važne su i parakrine molekule koje luče apoptotske stanice, a koje djeluju na okolne stanice. Kao primjer se može navesti molekula prostaglandin E2 koja je pod kontrolom kaspaze-3 te ima veliku ulogu u regeneraciji i proliferaciji.[22]

Regenerativni procesi su u skladu s neizravnim modelom apoptoze koji prikazuje funkciju kaspaza u neapoptoznom procesu. Kaspaze također reguliraju staničnu proliferaciju cijepanjem regulatora staničnog ciklusa.[22]

Apoptozne stanice proizvode lizofosfatidilkolin (LPC). To su molekule koje također imaju ulogu regeneracije, a njihova aktivnost uvjetovana je aktivnošću kaspaza. LPC djeluje kao signal privlačenja fagocita, odnosno inducira diferencijaciju keratinocita, što je neophodan korak u ozdravljenju kože.[22]

Fraktalkin, odnosno molekulu CX3CL1, luče apoptozne stanice u procesu koji je ovisan o kaspazama. To je veliki peptid koji ima funkciju preživljavanja u različitim tipovima stanica te je normalno povezan s kemotaksijom imunološkog stanja. Molekula potiče migraciju stanica endotela i diferencijaciju osteoblasta te ju upravo to čini potencijalnim parakrinim, signalnim faktorom kojeg oslobađaju apoptozne stanice u svrhu regeneracije tkiva.[22]

3.3.2. Proliferacija limfocita

Istraživanja su pokazala da i kaspaze inicijatori i kaspaze izvršitelji sudjeluju u kontroli staničnog ciklusa limfocita te da abnormalna aktivnost kaspaza može dovesti do

hipoaktivne ili hiperaktivne proliferacije stanica. Uloga u regulaciji stanične proliferacije pokazana je za kaspaze-8, -10 i -3. Izazvanu staničnu proliferaciju, kaspaze postižu selektivnim cijepanjem regulatora staničnog ciklusa, ne nužno induciranjem apoptoze. Također, pokazano je da je kaspaza-1 uključena u otkrivanje toksina, a kaspaza-11 u proizvodnji upalnih čimbenika. Te kaspaze imaju ulogu u programima diferencijacije imunoloških stanica ili su povezane sa modulacijom samog imunog odgovora. Modulacija se može javiti kroz stvaranje upalnih i protuupalnih čimbenika ili kroz njihovu ulogu u apoptozi zaraženih stanica.[22]

3.3.3. Motilitet i metastaze

Kaspaze su glavni upravitelji citoskeletne strukture tijekom apoptoze i upravo zbog toga pretpostavljeno je da mogu imati ulogu u pokretljivosti stanice. U istraživanjima *in vivo*, na miševima, otkriveno je da su kaspaze-3 i kaspaze-8 uključene u pokretljivost stanica. Također, farmakološka inhibicija aktivnosti kaspaze-3 smanjuje pokretljivost i invazivnost stanica karcinoma.[22] Metastaziranje tumorskih stanica uključuje staničnu migraciju i invaziju drugih tkiva. U normalnom stanju, stanice ne mogu otići u cirkulaciju jer bi to izazvalo smrt stanice. Kada je apoptoza ugrožena smanjenjem nizvodnih kaspaza izvršitelja-3, kaspaza-8 može djelovati na promicanje metastaze i dovesti do signalnog puta koji inducira migraciju stanice.[22]

4. Kaspaze i tumori

Stanični rast i stanična smrt usko su povezani, a tumori nastaju zbog nekontroliranog povećanja proliferacije, odnosno gubitka kontrole stanične smrti.[6,7] Oslabljeni apoptozni mehanizam dovodi do preživljavanja tumorskih stanica te potiče tumorsku angiogenezu i invazivnost, a to je ključni korak kod metastaziranja tumora. Takve stanice, izbjegavanjem apoptoznog mehanizma, stječu i otpornost na terapiju što u konačnici ne može dovesti do izliječenja.[8,9] Upravo zbog toga, kaspaze imaju veliku ulogu kod sprječavanja tumora. Razina ekspresije kaspaza izvršitelja u tumorskim stanicama ima glavnu odrednicu u terapiji protiv tumora. Smanjene razine koncentracije kaspaza u tumorskim stanicama mogu dovesti i do smanjenja apoptoze. Istraživanja su otkrila i veliku ulogu prokaspaze-3 u tumorskim stanicama te da razina prokaspaze može varirati do 5 puta u odnosu na zdrave stanice. Smanjena ekspresija prokaspaze-3 povezana je s različitim tumorima među koje se ubrajaju leukemija, limfom, melanom, neuroblastom, rak dojke, pluća, nadbubrežne žlijezde i bubrega. Povećanje koncentracije prokaspaze-3 povezano je i s većom osjetljivošću na citotoksične lijekove.[10] Velik utjecaj na tumorske stanice primijećen je i kod kaspaza inicijatora te je primjerice hipermetilacija promotora kaspaze-8 promatrana u različitim tumorskim stanicama kao što su stanice neuroblastoma, maligni tumori mozga, Ewingovi tumori i mali karcinomi pluća.[10] Općenito, kaspaze potiču smrt stanice, a time premala razina kaspaza može poboljšati razvoj tumorskih stanica[7] te će tumorskim stanicama omogućiti dugoročan rast i opstanak.[6,11] Pronađeno je nekoliko potencijalnih lijekova protiv tumora koji djeluju tako da aktiviraju kaspazu i time izazovu apoptozu.[11]

Izravna inhibicija kaspaza također je potencijalni alat u liječenju raznih upalnih poremećaja, ozljeda jetre, sepse, lateralne skleroze i nekoliko drugih bolesti, koje u konačnici mogu dovesti i do tumora.[11] Općenito, kaspaze mogu biti idealni ciljevi za farmaceutsku terapiju.[6] Kao ciljne molekule mogu pomoći liječenju raznih bolesti, uključujući i tumore. Upravo zbog toga, kaspaze se sve više istražuju te se pronalaze načini kako dobiti lijek sa što manje nuspojava. To je vrlo teško jer se mogu pojaviti i neželjeni učinci. Neželjeni učinci mogu se pojaviti inhibicijom neciljnih kaspaza, ciljanjem procesa neovisnih o apoptozi koje se mogu provoditi kaspazama ili biti neovisni o kaspazama. Kaspaze imaju uloge i u drugim procesima, kao što su proliferacija i diferencijacija te se sve to mora uzeti u obzir i stvoriti terapeutik visoke specifičnosti, sa što manje nuspojava. Iako su već osmišljeni neki potencijalni lijekovi, poput Pralnacasana i drugih, velik je

izazov za razvoj sigurnih i učinkovitih lijekova, osobito tijekom duže primjene lijeka.[1] Cilj je blokirati rast malignih stanica tumora bez utjecaja na zdrave stanice, a to se želi postići aktiviranjem ili inhibiranjem neke od kaspaza, ovisno o kakvom se tumoru radi.[24]

4.1. Kaspaza-1

Kaspaza-1 se često regulira u tumorskim stanica, a najviše istraživana je kod raka prostate.[7] Rak prostate jedan je od najčešćih uzroka smrti kod muškaraca.[27] Različita istraživanja pokazala su da je gubitak kaspaze-1 potencijalni korak u gubitku kontrole apoptoze tijekom tumorigeneze prostate i da upravo zbog toga razina kaspaze-1 može imati veliku ulogu u progresiji bolesti.[28] Prekomjerna razina kaspaze-1 čini tumorske stanice raka prostate ovisne o androgenima, osjetljivijim na zračenje i time potiče smrt stanice. U tumorskim stanicama raka bubrega, razina kaspaze-1 često varira, dok je kod raka prostate niska.[7]

4.2. Kaspaza-2

Gubitak kaspaze-2 dovodi do povećanja tumorigenog potencijala stanica te njihove transformacije inducirane onkogenima[b]. Provedena su istraživanja na miševima te je ustanovljeno da gubitak kaspaze-2 uzrokuje tumorigenezu u nekoliko različitih tumorskih modela.[7] Kaspaza-2, odnosno gen CASP2 smatra se tumor supresorskim genom[c] i može imati važnu ulogu u prevenciji tumora.[29,30] Općenito, kaspaza-2 može zaštiti stanicu od transformacija regulacijom starenja, odnosno mehanizmom koji spriječava razmnožavanje stanica koje posjeduju potencijalno štetne mutacije ili doživljavaju onkogeni stres. Ispitivanja na miševima također su pokazala da nedostatak kaspaze-2 pospješuje nastanak tumora dojke.[29]

Tumori s nedostatkom kaspaze-2 osjetljivi su na kemoterapiju te nakon ponovljenog liječenja dolazi do znatnog smanjenja volumena tumora.[31] Kod djece s

[b]Onkogeni su geni koji uzrokuju nekontrolirani rast i diobu stanica, što može rezultirati razvojem zloćudnih tumora.

[c] Tumor supresorski geni, antionkogeni ili emerogeni su geni čiji gubitak funkcije rezultira razvitkom tumora. Promjene tih gena pronađene su u velikom broju nasljednih i nenasljednih karcinoma te su skupina gena koji priječe zloćudnu preobrazbu stanice na različitim razinama.

akutnom limfoblastičnom leukemijom uočena je rezistencija na lijekove koja je povezana s nedostatkom kaspaze-2.[32] Kaspaza-2 u odgovoru na oštećenje DNA djeluje na način da potiče stabilnost tumorskog supresora p53. p53 je protein čiji je gen najčešće mutiran u svim tipovima tumorskih stanica, a njegov gubitak uzrokuje razvoj tumora, potiče gensku nestabilnost i povezuje se s lošim ishodima.[31,32] Također, postoji mogućnost da se inaktivacija kaspaze-2 u tumorskim stanicama javlja uslijed mutacije ili nepravilne regulacije proteina koji reguliraju aktivnost kaspaze-2, no to nije dovoljno istraženo.[30]

4.3. Kaspaza-3

Kaspaza-3 se smatra glavnom kaspazom izvršiteljem, a aktiviranaje cijepanjem s kaspazom-8 ili kaspazom-9. Do cijepanja dolazi na aspartatnom ostatku i time se dobiju podjedinice p12 i p17, čime se kaspaze-3 aktivira. Ova kaspaza odgovorna je za morfološke promjene te fragmentaciju DNA u stanici tijekom apoptoze. Istraživanja provedena na miševima pokazala su da nedostatak kaspaze-3 potiče formiranje i napredovanje tumora te otpornost na liječenje u nekoliko vrsta raka.[8] Nedostatak kaspaze-3 javlja se u većini tumorskih stanica, međutim problem može predstavljati i njezina povišena razina. U nekim malignim tumorskim stanicama pronađena je viša koncentracija kaspaze-3, u odnosu na nemaligne stanice, što je za posljedicu imalo povećanje apoptoze. Istraživanja su pokazala da se kaspaza-3 aktivira u mrtvim, tumorskim stanicama što u konačnici dovodi do repopulacije tumora i otpornosti na radioterapiju.[7] Zbog velikog potencijala kaspaze-3, metode koje dovode do njene aktivacije mogu biti vrlo korisne u razvijanju terapije za liječenje tumora.[33]

4.4. Kaspaza-6 i kaspaza-7

Kaspaza-6 i kaspaza-7 klasificiraju se u kaspaze izvršitelje, a jedna od njihovih karakteristika je kratka prodomena. Međutim, postoje i značajne razlike između ove dvije kaspaze. Kaspaza-6 razlikuje se s obzirom na specifičnost supstrata, te svojom sposobnošću da sama sebe intramolekularno aktivira. Također, aktivna kaspaza-6 može biti prisutna u stanici bez izazivanja apoptoze.[34] Ekspresija kaspaza-6 i -7 smanjena je u

stanicama raka želuca što dovodi do zaključka da gubitak ekspresije može sudjelovati u razvoju tumora želuca.[35]

Kaspaza-6 nalazi se u gotovo svim tkivima, a njena je koncentracija smanjena u starijim tkivima. Istraživanja su pokazala da je veća razina kaspaze-6 nađena u fetusu i organizmu odraslih. Visoke razine kaspaze nalaze se u starijem ljudskom mozgu te pokazuju veliku važnost kod bolesti kao što su Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest i Huntingtonova bolest. Upravo zbog toga, kaspaza-6 može se koristiti kao terapijski pristup neurodegenerativnim bolestima.[32,34] Također, veće količine kaspaze nađene su u normalnim, epitelnim stanicama ljudskog debelog crijeva, a inhibicija kaspaze-6 može potaknuti karcinogenezu debelog crijeva. U istraživanjima u kojima je tumor debelog crijeva iniciran upalom, pokazano je da nedostatak ili povećana ekspresija kaspaze-6 ne utječe na formiranje i veličinu tumora te da kaspaza neće biti uključena u karcinogenezu kod takvih tumora.[34]

Prokaspaza-7 sastoji se od 303 aminokiseline koje čine homodimer. Homodimer se sastoji od 12 β-ploča oko kojih se nalazi 10 α-uzvojnica. Enzim ima dva aktivna mjesta. Cijepanjem prokaspaze između Asp^{198} i Ser^{199} i između Asp^{206} i Ala^{207} dolazi do aktivacije kaspaze-7.[36] Kaspaza-7 bitna je za inicijaciju apoptoze u mnogim tkivima, ali može imati ulogu i u neapoptoznim procesima, odnosno u diferencijaciji odontoblasta[d] i ameloblasta[e]. Kaspaza je također povezana s razvojem i formiranjem kostiju.[37] Mutacije kaspaze-7, odnosno gena CASP7, pronađene su u tumorima debelog crijeva, jednjaka, glave/vrata te su istraživanja pokazala da takve mutacije dovode do gubitka njezine apoptozne funkcije, a time i do razvoja ljudskih tumora.[32,38] Također, inhibicija kaspaze-7 može biti korisna u slučajevima u kojima prekomjerna smrt stanice doprinosi bolesti pa time ometanje aktivacije kaspaze-7 može imati terapijsku ulogu u liječenju tumora i upalnih bolesti. Inhibicija kaspaze-7 korisna je i u liječenju neurodegenerativnih bolesti, kod kojih visoka količina ovog enzima uzrokuje pretjeranu smrtnost neuronskih stanica.[36]

[d]Odontoblasti su stanice neuralnog porijekla, a dio su vanjske površine zubne pulpe čija je biološka funkcija dentinogeneza (proces formiranja dentina, tvari koja se nalazi ispod zubne cakline na kruni i cementu korijena).

[e] Ameloblasti su stanice prisutne samo tijekom razvoja zuba,a imaju ulogu u zaštiti zuba od okolnog vezivnog tkiva te omogućuju nesmetano nicanje zuba.

4.5. Kaspaza-8

Kaspaza-8 postoji u obliku monomerne prokaspaze-8 koja se aktivira dimerizacijom. Kaspaze cijepaju peptidnu vezu nakon aspartatne kiseline, a poželjna sekvenca prepoznavanja kaspaze-8 je izoleucin-glutaminska kiselina-treonin-aspartatna kiselina, ali ona može cijepati i druge sekvence, uključujući asparaginsku kiselinu-glutaminsku kiselinu-valin-asparaginsku kiselinu (DEVD).[7]

Kaspaza-8 je dobar kandidat u liječenju tumora jer djeluje kao tumorski supresor. Kod mnogih tumora pronađen je nedostatak gena CASP8, osobito kod pedijatrijskih tumora.[32]

Gubitak ekspresije kaspaze-8 se obično ne javlja utumorima epitela. Kod karcinoma debelog crijeva rijetko se uočava gubitak kaspaze-8 [39], a u tumore epitelnog tkiva također se ubrajaju rak želuca i dojke.[7] Nasuprot tome, kod malignih, neuroendokrinih tumora, se uočava gubitak ekspresije kaspaze-8, a kao primjer se mogu navesti tumori neuroblastoma, neuroektodermni tumori i tumori pluća te tumori mozga kao što su meduloblastom i relapsivni glioblastom.[7,39] Neuroblastomi su najčešći pedijatrijski tumori od kojih umire 15% djece s tumorom. Upravo zbog toga, kaspaza-8 ima veliki potencijal za korištenje u terapijske svrhe.[40] Niska ekspresija kaspaze-8 pronađena je i kod tumora želuca te je pronađeno da mutacija gena kaspaze-8 dovodi do gubitka apoptozne funkcije i da time može utjecati na patogenezu želučanih karcinoma, pogotovo u kasnoj fazi karcinogeneze žuluca.[41,42] Visoka razina kaspaze-8 nađena je u mnogim tumorima u naprednom stadiju, čime se može zaključiti da kaspaza-8 može promicati metastaze.[7] Polimorfizam kaspaze-8 također može imati zaštitnu ulogu te je pokazano da može igrati ulogu u smanjenju rizika od različitih tumora.[32]

4.6. Kaspaza-10

Kaspaza-10 je inicijacijska kaspaza[43] prisutna u ranoj fazi apoptoze.[44] Kaspaza-10 također može potaknuti preživljavanje stanice jer posjeduje faktor smrti (DED).[36] Postoje pretpostavke da se kaspaza-10 eksprimira u stresnim stanjima stanice, primjerice pri kemoterapijskom liječenju.[45] Pokazano je da je za stanice mijeloma neophodna kaspaza-10 kako bi preživjele.[7] Somatska mutacija gena CASP10 koji kodira kaspazu-10 pronađena je

u tumorima dojke, pluća[7,43], želuca[46] te rijetko kod tumora debelog crijeva, ali može pridonijeti patogenezi nekih oblika ovog tumora zajedno sa ostalim mutacijama gena CASP.[44]

4.7. Kaspaza-14

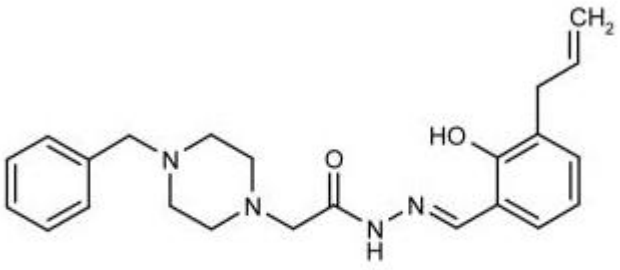
Kaspaza-14 se uglavnom se povezuje s difernecijacijom epitelnih stanica, a ne apoptozom ili upalom. Podaci su pokazali da je ekspresija kaspaze-14 u tumorskim stanicama cervikalnog tumora te tumora debelog crijeva i želuca značajno smanjena u odnosu na zdrave stanice epitela. Također, smanjena ekspresija kaspaze-14 povezana je s histološkom progresijom raka grlića maternice te s naprednim kliničkim stadijem kod tumora jajnika.[7,47] Kaspaza-14 često se povezuje i s tumorom žlijezda slinovnica. Za takvu vrstu tumora pokušavaju se naći novi načini liječenja, a jedan od načina je genska terapija. Ekspresijom kaspaze-14 došlo je do inhibicije rasta tumora, stanične smrti i smanjene tumorogeneze *in vivo*, pri čemu je uočeno da kaspaza-14 ima inhibicijsko djelovanje na vaskularizaciju tumora.[7,48]

5. Aktivatori kaspaze

Kaspaze su u stanicama sintetizirane u obliku zimogena, odnosno inaktivnih preteča ili proenzima pa se tijekom apoptoze zahtijeva njihova aktivacija proteolitičkim cijepanjem.[11,16] Trenutne kemoterapijske strategije za cilj imaju indirektno izazivanje apoptoze preko aktivacije prokaspaze-3. Međutim, abnormalne razine nekih apoptotičkih proteina koji se nalaze u tumorskim stanicama mogu zaustaviti apoptozu, a time je smanjena učinkovitost liječenja jer je izbjegnuta aktivacija kaspaze-3. Upravo zbog toga, direktno ciljanje prokaspaze-3, a ne uzvodnih regulatora apoptoze, može voditi prema učinkovitijem liječenju jer je kaspaza-3 terminalna proteaza u apoptotičkoj kaskadi.[5] Trenutni antitumorski lijekovi potiču apoptozu promicanjem stanične toksičnosti i oštećenja DNA čime dolazi do aktivacije kaspaze-3 te na kraju i smrti stanice. Također, neke terapije djeluju aktiviranjem kaspaze-8.[21]

5.1. PAC-1

Spoj 1 aktivator prokaspaze (PAC-1, eng. *procaspase-activating compound 1*) svrstava se u skupinu malih molekula koje aktiviraju kaspaze (Slika 5.). Otkriveno je da PAC-1 aktivira prokaspazu-3 *in vitro.*[5,16,25,49] I PAC-1 i njegovi derivati izazivaju apoptozu te su citotoksični za različite tumorske stanice, što se onda može primijeniti na daljnja istraživanja za liječenje tumorskih bolesti.[12,50] Antitumorsko djelovanje PAC-1 povezano je s orto-hidroksi-*N*-acilhidrazonskom skupinom. Orto-hidroksi-*N*-acilhidrazon može reagirati s različitim metalima, kao što su cink, željezo i bakar, a ti metalni kationi inhibiraju enzime prokaspaze i kaspaze.[5,49] Cink, vezan na benzen, slabim je interakcijamapovezan za određene proteine koji dolaze u interakcije s prokaspazom-3 te se time inhibira enzimska aktivnost i prokaspaze i kaspaze.[5,16,49] Način na koji PAC-1 aktivira kaspaze je da se učinkovito natječe s prokaspazom-3 za slabo vezane ione cinka, time se obnavlja enzimska aktivnost prokaspaze-3 i njezino cijepanje u kaspazu-3.[49] Antitumorsko djelovanje uočeno je u kliničkim ispitivanjima različitih tumorskih stanica miševa i pasa.[16]



PAC-1

Slika 5. Struktura PAC-1, male molekule koja aktivira kaspaze.[5]

5.2. Spoj-42

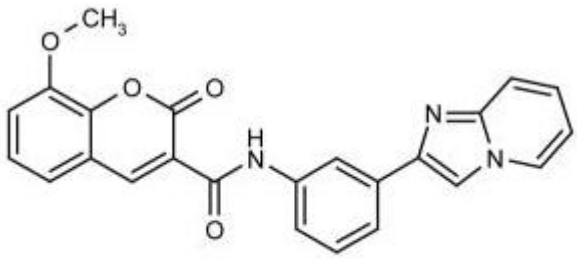
Za otkrivanje spoja korišteno je računalo na kojem su se mogla vidjeti 62 spoja koji su ciljali alosteričko inhibitorsko mjesto smješteno na dimerskom sučelju prokaspaze-3. Pretpostavljeno je da bi stabilizacija sučelja na prokaspazi-3 mogla dovesti do alosteričke aktivacije zimogena. Na temelju vezanja spoja na dimersko sučelje došli su do 13 spojeva kojima se onda ispitivala sposobnost aktivacije prokaspaze-3 in vitro. Istaknuo se spoj-42 koji povećava aktivnost prokaspaze-3 za 27 puta pri 400 uM nakon inkubacije 1 h s proenzimom.[12]

5.3. Spoj-2

Spoj-2 je otkriven pomoću pametnog zaslona koji se temelji na fluorescencijskoj polarizaciji. Korišten je novo osmišljeni kanonski motiv za prepoznavanje peptida DEVD-aldehida i 5(6)-karboksifluoresceina na *N*-kraju koji je povezan s 3 × 6-aminoheksanskom kiselinom. Ta nova sonda ne upotrebljava se kao standarndne sonde koje se temelje na oslobađanju fluorofora. Ona na reverzibilni i kovalentni način veže i inhibira bilo koju kontaminiranu zrelu kaspazu-3 ili -7. Na taj način spoj-2 i njegovi analozi mogu izazvati apoptozu u staničnim kulturama. Stehiometrija i mjesto vezanja, kao i mehanizam induciranja apoptoze, još nisu potvrđeni.[12]

5.4. Spoj-1541

Spoj-1541 dovodi do aktivacije prokaspaze-3 i -6 *in vitro,* ali ne i prokaspaze-7. Otkriveno je da se spoj-1541 (Slika 6.) i njegovi aktivni analozi sami skupljaju u nanofibrile u otopini te da ti nanofibrili kolokaliziraju kaspazu-3 s prokaspazom-3 i potiču aktivaciju *in vitro*, odnosno da aktivacija *in vitro* ovisi o prisutnosti male količine aktivne kaspaze koja pokreće cijepanje proenzima.[12,16] Takvo formiranje fibrila, koje čine ovakvi spojevi, dovodi do inducirane stanične smrti. Sam mehanizam još uvijek nije razjašnjen. Također, istraživanja su pokazala da spoj-1541 u kombinaciji sa PAC-1, u staničnim linijama raka, dovodi do brže aktivacije prokaspaze-3, odnosno pretvorbe u kaspazu.Za istraživanje veze između aktivacije prokaspaze-3 i stanične smrti, uzrokovane kombinacijom ovih lijekova, upotrijebljene su MCF-7 stanice, odnosno stanična linija koja ne dovodi do ekspresije prokaspaze-3 s odgovarajućom staničnom linijom MCF-7 kod koje je prokaspaza-3 eksprimirana pomoću plazmida. Ustanovilo se da kombinacija lijekova ima minimalan učinak kod stanične linije MCF-7, kod koje je prokaspaza-3 eksprimirana pomoću plazmida. Međutim, kombinacija lijekova dramatično inducira apoptozu u stanicama MCF-7 kod kojih dolazi do ekspresije prokaspaze-3, što se u konačnici povezuje s aktivacijom prokaspaze-3 u kaspazu-3.[49]



1541

Slika 6. Struktura spoja-1541.[5]

5.5. Derivati biljke *Justicia procumbens*

Biljka *Justicia procumbens* je tradicionalni kineski lijek koji se koristi za liječenje temperature, oteklog ždrijela i tumora. Koriste se ekstrakti čitave biljke koji su djelotvorni kodleukemije limfocita i tumora ždrijela. Biljka ima citotoksično djelovanje u različitim modelima tumora *in vivo*. Antitumorsko djelovanje se očituje kroz aktivaciju kaspaze-8, a njenim djelovanjem indirektno se aktiviraju i kaspaze-3 i -9. Derivat biljke, JR6 (6'-hidroksi justicidin A), se istražuje zbog svoje potencijalneučinkovitosti kod tumorskih stanica ljudskog mjehura. JR6, kod liječenja tumora, uzrokuje apoptozu putem aktivacije kaspaze-8.[13]

6. Inhibitori kaspaza

Inhibitori kaspaza napredovali su iz prvotnih reverzibilnih peptidnih aldehida u moćnije, reverzibilne i ireverzibilne inhibitore. Postoje neke osnovne značajke kaspaza koje omogućuju formiranje specifičnih inhibitora kaspaze-1, a baziraju se na sastavu aminokiselinskih ostataka u aktivnom mjestu te stvaranju vodikovih veza s tetrapeptidom. Svi inhibitori kaspaze-1 unose asparaginsku kiselinu u P1 mjesto i time oponašaju mjesto cijepanja koje se prirodno pojavljuje. Ostatak te asparaginske kiseline formira vodikove veze sa Arg^{341} i Arg^{179} i time se omogućuje pravilna orijentacija susjednog atoma s manjkom elektrona (eng. *warhead*) koja formira kovalentnu vezu sa Cys^{285} u S1 mjestu enzima. S2 mjesto enzima povezano je vodikovom vezom s P2 ostatkom i to omogućuje formiranje inhibitora koji se vežu na više aktivnih mjesta. S4 mjesto enzima je veliko i hidrofobno te može smjestiti različite funkcionalne skupine. Specifično je da je S4 džep veći kod kaspaze-1 nego kod ostalih kaspaza i upravo to je razlog većeg istraživanja za formiranje inhibitora kaspaza-1.[5]

6.1. IAP proteini

Inhibitori proteina apoptoze ili IAP proteini (eng. inhibitor of apoptosis proteins) pripadaju obitelji apoptoznih inhibitora koji sprječavaju preuranjenu apoptozu.[10] Obilježje većine

karcinoma je suzbijanje apoptoze. Povećana razina IAP proteina nađena je u mnogim vrstama karcinoma, a povećana ekspresija tih proteina povećava otpornost apoptoznog odgovora u mnogim malignim tumorima. Upravo se zbog toga nastoji istražiti njihov potencijal kod liječenja tumora.[14] Jedan od primjera takvih inibitora je XIAP koji se veže na kaspaze inicijatore i kaspaze izvršitelje te ih inhibira kako bi se spriječila prerana apoptoza. Veže se na aktivno mjesto kaspaze-3 i -7 ili na površinu dimernog sučelja kaspaze-9 te na taj način inhibira apoptozu.[10,14,16] Kod ljudi postoji najmanje 8 članova ove obitelji proteina, no XIAP je jedini koji djeluje vezanjem na kaspaze. Još neki od članova su c-IAP1, c-IAP2, ILP-2, NAIP, ML-IAP, survivin i apollon.[10,14,16,20] Zajedno sa survivinom, XIAP ima najveći potencijal za terapijsko liječenje kod tumorskih stanica. Novija istraživanja posvetila su se otkrivanju malih molekula antagonista XIAP-a. Kao primjer mogu se navesti Smac proteini koji su ključni za povezivanje sa IAP , takve molekule povećavaju kaspaznu aktivaciju te tumorske stanice čine osjetljivim na citotoksične lijekove.[10] Međutim, postoje i istraživanja koja pokazuju da IAP proteini mogu negativno utjecati na migraciju tumorskih stanica. Odstupanja u rezultatima pripisuju se korištenju različitih eksperimentalnih pristupa i modela. Upravo zbog toga, potiče se daljnje istraživanje IAP proteina.[17]

Kod IAP postoje domene koje se ponavljaju, nazvane BIR domenama (eng. baculovirus IAP repeat).[10,13,14,16,20] BIR domenevezane su na cink koji imaju približno 80 aminokiselina u lancu.[10,13,16] Svaka domena u proteinu ima različitu inhibicijsku funkciju. Primjer je XIAP koji sadrži 3 BIR domene, pri čemu je njegova BIR-2 domena odgovorna za inhibiciju kaspaze-3 i -7, a BIR-3 domena za inhibiciju kaspaze-9.[10,13] Vezanje domena na sučelje prokaspaze sprječava ihda formiraju homodimer, a samim time i formiranje aktivnog mjesta.[10]

6.2. Survivin

Survivin ili BIRC5 (eng. *baculoviral inhibitor apoptosis protein repeat-containing*) ima 142 aminokiselinska ostatka te je najmanji IAP koji ima samo jednu BIR domenu.[13,14] Istraživanja su pokazala da je BIRC5 rijetko izraženu zdravim, odraslim tkivima dok je njegova ekspresija puno veća u transformiranim stanicama što upućuje na patološku ulogu ovog proteina.[13,14] Povećana ekspresija survivina uočena je kod rakapluća, debelog crijeva,

dojke, prostate, mokraćnog mjehura, ždrijela, maternice, jetre, bubrega, gušterače, štitnjače, neuroblastomate kod hematoloških tumora. Inhibira apoptozu i *in vitro* i *in vivo*[14] tako što se može direktno vezati i inhibirati proteaznu aktivnos tkaspaza-3 i -7.[13] Pokazalo se da potiskuje staničnu smrt induciranu TRAIL-om ili Bax-om. Istraživanja su usmjerena na razvoj strategija u kojima će se BIRC5 koristiti kao cilj terapijskih sredstava kod stanica raka, iako, neki podaci pokazuju da survivin u određenim uvjetima može inhibirati apoptozu bez utjecaja na kaspaze.[14]

LY2181308 jeoligonukleotid koji izaziva proteolitičku aktivnost kaspaze-3, zaustavljanje staničnog ciklusa i inhibiciju citokineze u ljudskim tumorskim stanicama. Pomaže u kemoterapiji te utječe na gubitak ekspresije BIRC5 i time obnavlja kaspazom posredovanu apoptozu kod tumorskih stanica.[13]

YM155 ili sepantronijev bromid je molekula koja inhibira ekspresiju BIRC5. Kontinuirana intravenska infuzija s YM155 dovela je do aktivacije kaspaza, a i time do apoptoze te povlačenja tumora bez sistemske toksičnosti[f]. Dokazano je da čini tumorske stanice osjetljivim na kemoterapiju temeljenu na platini, radijaciju te da regulira apoptozu aktiviranjem kaspaza.[13]

EM-1421 (*teramproecol*) se također ubraja u inhibitore BIRC5. Izaziva apoptozu djelujući na dva gena, Cdo2 i cychin B, te na survivin. Obećavajući je kandidat kod malignih bolesti, ali još uvijek nije detaljno istražen.[13]

6.3. Peptidomimetički inhibitori

Peptidomimetik je spoj čija su sekundarna, strukturna svojstva analogna prirodom peptidu te zbog toga može oponašati njegovu biološku funkciju. Također se definira kao spoj koji kao ligand može oponašati ili blokirati biološki učinak peptidnog receptora.[51] Male molekule peptidomimetika mogu oponašati složene proteinske interakcije te se iz funkcionalno važnih proteina, dobivenih iz prirodnih izvora, mogu razviti terapeutici na bazi njihovih mimetika.[52] Peptidomimetički inhibitori imaju obećavajuću učinkovitost u predkliničkim ispitivanjima, no često pokazuju farmakokinetičke odgovore koji

[f]Sistemska toksičnost nastaje nakon apsorpcije i distribucije toksične tvari na mjestu udaljenom od mjesta njegovog ulaska (pluća, želudac).

ograničavaju njihovu korisnost *in vivo*. Terapijska učinkovitost je ograničena zbog slabe propusnosti stanice, metaboličke nestabilnosti, toksičnosti, poteškoća sa inhibicijom ovisnoj o vremenu, nedostatka specifičnosti unutar obitelji enzima te kompleksnosti struktura peptidomimetika.[5]

Pralnacasan je sintetska molekula i reverzibilni inhibitor kaspaze-1.[1,5,25] Lijek je prošao kroz klinička istraživanja tijekom 12 tjedana u kojima se utvrdilo da je kod pacijenata dobro podnošljiv, da ima velik protuupalni učinak, a bez značajnih nuspojava. Međutim, kod životinja je primijećena toksičnost za jetru u vremenski dužem razdoblju te je lijek povučen iz kliničkih istraživanja.[5,25]

VM-765 je također sintetski, reverzibilni inhibitor kaspaze-1.[1,5] Predklinička istraživanja pokazala su da za inhibiciju upalih odgovora moćniji od Pralnacasana, što je vrlo bitno i kod tumora.[5]

Emricasan je ireverzibilni inhibitor kaspaze koji je istraživan kod liječenja kronične HCV infekcije i reakcije na transplataciju jetre.[5] Dugoročna HCV infekcija uzrokuje cirozu jetre i hepatocelularni karcinom.[53] U predkliničkim istraživanjima pokazano je da VM-765 ublažava fibrozu jetre inhibicijom apoptoze hepatocita. U kliničkim ispitivanjima, kod pacijenata s kroničnom HCV infekcijom, pokazana je izrazita učinkovitost bez ozbiljnih nuspojava. Međutim, Emricasan je povučen iz kliničkih istraživanja zbog složenosti napredovanja inhibitora kroz klinička ispitivanja, odnosno zbog složenosti razvoja i uspostavljanja svojstava potrebnih kako bi se spoj mogao koristiti kao lijek. Razlog tome je što, u nekim uvijetima, liječenje Emricasanom uzrokuje inhibiciju neurofilne apoptoze, time može doći i do stanične smrti koja nije izazvana kaspazom.[5]

6.4. Male molekule inhibitori kaspaza

Smatra se da male molekule mogu biti bolji inhibitori nego peptidomimetici jer lakše zaobilaze ograničenja u terapijskoj učinkovitosti. Korišteno je više strategija za riješavanje problema permeabilnosti stanica. Problem permeabilnosti povezan je sa zahtjevom za asparaginskom kiselinom u P1 mjestu, a to je riješeno korištenjem sulfonamida, kinona, epoksikinona i donora dušikovih oksida (NO). Većina malih molekula inhibitora kaspaza

je još uvijek u ranom stadiju istraživanja pa nisu detaljno razjašnjeni, ali jedna od molekula koje se istražuje je NCX-1000 koja inhibira kaspaze-3, -8 i -9.[5]

6.5. Alosterički inhibitori kaspaze

Peptidomimetički inhibitori i male molekule inhibitori kaspaza vežu se za aktivno mjesto, ali bolja svojstva lijekova će dovesti do ciljanja alosteričkog mjesta u sučelju dimera kaspaze, sa malom molekulom inhibitora.[10] Istraživanja se provode na kaspazama-1, -3 i -7, pomoću takozvanog disulfidnog mosta ili dijeljenja veze. Koriste se mali spojevi koji sadrže tiol i formiraju disulfidne veze sa cisteinskim ostacima koji se nalaze unutar proteina. Pomoću raznih eksperimenata dijeljenja veze otkrivene su 2 grupe spojeva, FICA i DICA. Oba spoja reagiraju sa Cys^{264}, kod kaspaze-3, koji je blizu sučelja dimera i 14 Å od katalitičkog cisteina. Vezanjem alosteričkog inhibitora sprječava se vezanje supstrata u aktivno mjesto. Kod vezanja FICA-e i DICA-e dolazi do istih konformacijskih promjena u aktivnom mjestu, iako se ne vežu na isti način. U kaspazi-7 FICA reagira sa $Tyr^{223´}$ na suprotnom monomeru te zauzima središnji prostor između dva monomera, a DICA reagira sa Tyr^{223} u istom monomeru, na kojeg se onda i veže. Tim reakcijama Arg^{187} je izguran iz središnje šupljine i smješten u položaj koji onemogućava vezanje supstrata u aktivno mjesto. Slični rezultati dobiveni su i za kaspazu-1. Kod kaspaze-1 tienoprazol se veže na Cys^{331} blizu sučelja dimera i time utječe na vezanje supstrata. Još uvijek nisu pronađeni lijekovi koji se vežu na sučelje dimera, bez ciljanja kaspaza, ali dijeljenje veze je dobra metoda za otkrivanje takvih spojeva.[5,10] Također, cink je poznat kao inhibitor kaspaza. Cink cilja alosteričko mjesto kaspaze-6 i na taj način ju inhibira.[25]

7. Zaključak

Kaspaze imaju ulogu u mnogim staničnim procesim. Najviše se istražuje njihova uloga u apoptozi, odnosno izazivanju apoptoze. Apoptoza je oblik stanične smrti koja služi za održavanje homeostaze tkiva. Gubitak kontrole stanične smrti može dovesti do preživljavanja tumorskih stanica, do poticanja tumorske angiogeneze i invazivnosti, a u konačnici i do metastaziranja tumora.

Kaspaze imaju velik potencijal u liječenju raznih bolesti, uključujući i tumore. Ipak, velik je izazov pronaći lijek specifičan za pojedini tumor, bez štetnog utjecaja na zdrave stanice. Svaki pojedini tumor potrebno je dobro istražiti kako bi se odredilo koju kaspazu treba aktivirati ili inhibirati. Pojedine tumore karakterizira visoka ekspresija određene kaspaze, dok se u nekima, terapijski učinak mora postići aktiviranjem kaspaze koja se nalazi u preniskoj koncentraciji. Kaspaze sudjeluju i u drugim procesima, kao što su proliferacija i diferencijacija pa bi nedovoljna specifičnost terapeutika mogla uzrokovati razne štetne učinke.

Pronađeni su pojedini lijekovi, poput Pralnacasana i VM-765, koji djeluju kao inhibitori kaspaza, spoj-2 koji djeluje kao aktivator kaspaza, ali i mnogi drugi lijekovi. Međutim, problem predstavljaju nuspojave koje se mogu javiti odmah ili nakon dugotrajnog korištenja.

Kaspaze kao ciljne molekule kod liječenja tumora su još uvijek nedovoljno istražene, ali sve više se počinje shvaćati njihov terapijski potencijal.

8. Literatura

1. B. Howley, H. O. Feamhead, Caspases as therapeutic targets, *J. Cell. Mol. Med.* **12** (2008), 1502-1516.
2. Z. Li, M. Sheng, Caspases in synaptic plasticity, *Mol. Brain.* **5** (2012), 15.
3. S. H. MacKenzie, A. C. Clark, Death by caspase dimerization, *Adv. Exp. Med. Bio*. **747** (2012) 55-73.
4. D. Živković, Učinak DMAG-a i utišavanje Hsp90 na varijabilnost THP-1 stanica, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb (2017).
5. S. H. Mac Kenzie, J. L. Schipper, A. C. Clark, The potentialfor caspases in drug discovery, *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.* **13** (2010), 568-576.
6. H. Y. Chang, X. Yang, Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65** (2000), 821-846.
7. S. Shalini, L. Dorstyn, S. Dawar, S. Kumar, Old, new and emerging functions of caspases, *Cell Death Differ.* **22** (2015.), 526-539.
8. P. F. Liu, Y. C. Hu, B. H. Kang, Y. K. Tseng, P. C. Wu, C. C. Liang,Y. Y. Hou,T. Y. Fu, H. H. Liou, I. C. Hsieh, L. P. Ger,C. W. Shu, Expression levels of cleaved caspase-3 and caspase-3 in tumorigenesis and prognosis of oral tongue squamous cell carcinoma, *PloS. One*. **12** (2017), e0180620.
9. D. R. McIlwain, T. Berger, T. W. Mak, Caspase functions in cell death and disease, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5** (2013), a008656.
10. S. H. MacKenzie, A. C. Clark, Targeting cell death in tumors by activating caspases, *Curr. Cancer Drug Targets.* **8** (2008), 98-109.
11. I. N. Lavrik, A. Golks, P. H. Krammer, Caspases: pharmacological manipulation of cell death, *J. Clin. Invest.* **115** (2005), 2665-2672.
12. C. W. Morgan, O. Julien, E. K. Unger, N. M. Shah, J. A. Wells, Turning on caspases with genetics and small molecules, *Methods Enzymol.* **544** (2014), 179-213.
13. P. Hensley, M. Mishra, N. Kyprianou, Targeting caspases in cancer therapeutics, *Biol. Chem.* **394** (2013), 831-843.
14. M. Mobahat, A. Narendran, K. Riabowol, Survivan as a preferential target for cancer therapy, *Int. J. Mol. Sci.* **15** (2014), 2494-2516.
15. J. L. Koff, S. Ramachandiran, L. Bernal-Mizrachi, A time to kill: targeting apoptosis in cancer, *Int. J. Mol. Sci.* **16** (2015), 2942-2955.
16. S. Zaman, R. Wang, V. Gandhi, Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies, *Leuk. Lymphoma.* **55** (2014), 1980-1992.

17. L. Bai, D. C. Smith, S. Wang, Small-molecule SMAC mimetics as new cancer therapeutics, *Pharmacol. Ther.* **144** (2014), 82-95.

18. T. Feldman, V. Kabaleeswaran, S. B. Jang, C. Antczak, H. Djaballah, H. Wu, X. Jiang, A class of allosteric, caspase inhibitors identified by high-throughput screening, *Mol. Cell*. **47** (2012), 585-595.

19. D. R. Green, F. Liambi, Cell death signaling, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. **7** (2015), a006080.

20. R. Rathore, J. E. McCallum, E. Varghese, A. M. Florea, D. Büsellberg, Overcoming chemotherapy drug resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs), *Apoptosis.* **22** (2017), 898-919.

21. J. L. Schipper, S. H.. MacKenzie, a. Sharma, A. C. Clark, A bifunctional alloateric site in the dimer interface od procaspase-3, *Biophys. Chem.* **159** (2011), 100-109.

22. P. F. Connolly, R. Jäger, H. O. Fearnhead, New roles for old enzymes: killer caspases as the engine of cell behavior changes, *Front. Physiol.* **5** (2014), 149.

23. J. A. Hardy, J. Lam, J. T. Nguyen, T. O'Brien, J. A. Wells, Discovery of an allosteric site in the caspases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101** (2004), 12461-12466.

24. M. V. Fiandalo, N. Kyprianou, Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis, *Exp. Oncol.* **34** (2012), 165-175.

25. M. Poreba, A. Stróżyk, G. S. Salvesen, M. Drag, Caspase substrates and inhibitors, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5** (2013) a008680.

26. M. Orzáez, A. Gortat, L. Mondragón, E. Pérez-Payá, Peptides and peptide mimics as modulators of apoptotic pathways, *Chem. Med. Chem*. **2** (2009) 146-160.

27. R. Ummanni, U. Lehnigk, U. Zimmermann, C. Woenckhaus,R. Walther, J. Giebel, Immunohistochemical expression of caspase-1 and -9, uncleaved caspase-3 and -6, cleaved caspase-3 and -6 as well as Bcl-2 in benign epithelium and cancer of the prostate, *Exp. Ther. Med*. **1** (2010), 47-52.

28. R. N. Winter, A. Kramer, A. Borkowski, N. Kyprianou, Loss of caspase-1 and caspase-3 protein expression in human prostate cancer, *Cancer Res*. **61** (2001), 1227-1232.

29. J. Puccini, L. Dorstyn,S. Kumar, Caspase-2 as a tumour suppressor, *Cell Death Differ*. **20** (2013), 1133-1139.

30. L. Bouchier-Hayes, D. R. Green, Caspase-2: the orphan caspase, *Cell Death Differ*. **19** (2012), 51-57.

31. M. R. Terry, R Arya, A. Mukhopadhyay, K. C. Berrett,P. M. Clair,B. Witt, M. E. Salama, A. Bhutkar, T. G. Oliver, Caspase-2 impacts lung tumorigenesis and chemotherapy response *in vivo, Cell Death Differ*. **22** (2015), 719-730.

32. M. Olsson, B. Zhivotovsky, Caspases and cancer, *Cell Death Differ*. **18** (2011), 1441-1449.

33. D. L. Chen, J. T. Engle, E. A. Griffin, J. P. Miller, W. Chu, D. Zhou, R. H. Mach, Imaging caspase-3 activation as a marker of apoptosis-targeted treatment response in cancer, *Mol. Imaging Biol*. **17** (2016), 384-393.

34. B. Foveau, L. Kraak, N. Beauchemin, S. Albrecht, A. C. LeBlanc, Inflammation-induced tumorigenesis in mouse colon is caspase-6 independent, *PloS. One*. **9** (2014) e114270.

35. N. J. Yoo, J. W. Lee, Y. J. Kim, Y. H. Soung, S. Y. Kim, S. W. Nam, W. S. Park, J. Y. Lee, S. H. Lee, Loss of caspase-2, -6 and -7 expression in gastric cancers, *APMIS*. **112** (2004), 330-335.

36. M. Lamkanfi, T. D. Kanneganti, Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation, *Int. J. Biochem. Cell Biol*. **42** (2010), 21-24.

37. E. Svandova, H. Lesot, T. V. Berghe, A. S. Tucker, P. T. Sharpe, P. Vandenabeele, E. Matalova, Non-apoptotic functions of caspase-7 during osteogenesis, *Cell Death Dis*. **5** (2014) e1366.

38. Y. H. Soung, J. W. Lee, H. S. Kim, W. S. Park, S. Y. Kim, J. H. Lee, J. Y. Park, Y. G. Cho, C. J. Kim, Y. G. Park, S. W. Nam, S. W. Jeong, S. H. Kim, J. Y. Lee, N. J. Yoo, S. H. Lee, Inactivating mutations of caspase-7 gene in human cancers, *Oncogene*. **22** (2003), 8048-8052.

39. D. G. Stupack, Caspase-8 as a therapeutic target in cancer, *Cancer Lett*. **332** (2013), 133-140.

40. T. Teitz, M. Inoue,M- B. Valentine, K. Zhu, J. E. Rehg, W. Zhao, D. Finkelstein, Y. D. Wang, M. D. Johnson, C. Calabrese, M. Rubinstein, R. Hakem,W. A. Weiss, J. M. Lahti, Th-MYCN mice with caspase-8 deficiency develop advanced neuroblastoma with bone marrow metastasis, *Cancer Res.***73** (2013), 4086-4097.

41. Y. H. Soung, J. W. Lee, S. Y. Kim, J. Jang, Y. G. Park, W. S. Park, S. W. Nam, J. Y. Lee, N. J. Yoo, S. H. Lee, Caspase-8 gene is inactivated by somatic mutations in gastric carcinomas, *Cancer Res*. **65** (2005), 815-821.

42. H. S. Kim, J. W. Lee, Y. H. Soung, W. S. Park, S. Y. Kim, J. H. Lee, J. Y. Park, Y. G. Cho, C. J. Kim, S. W. Jeong, S. W. Nam, S. H. Kim, J. Y. Lee, N. J. Yoo, S. H. Lee, Inactivating mutations of caspase-8 gene in colorectal carcinomas, *Gastroenterology*. **125** (2013), 708-715.

43. J. E. Oh, M. S. Kim, C. H. Ahn, S. S. Kim, J. Y. Han, S. H. Lee, N. J. Yoo, Mutational analysis of CASP10 gene in colon, breast, lung and hepatocellular carcinomas, *Pathology*. **42** (2010), 73-76.

44. M. S. Kim, J. E. Oh, C. K. Min, S. Lee, N. G. Chung, N. J. Yoo, S. H. Lee, Mutational analysis of CASP10 gene in acute leukaemias and multiple myelomas, *Pathology*. **41** (2009), 484-487.

45. W. Guo, A. Dong, X. Pan, X. Lin, Y. Lin, M. He, B. Zhu, L. Jin, R. Yao, Role of caspase-10 in the death of acute leukemia cells, *Oncol Lett*. **12** (2016), 1623–1629.

46. W. S. Park, J. H. Lee, M. S. Shin, J. Y. Park, H. S. Kim, J. H. Lee, Y. S. Kim, S. N. Lee, W. Xiao, C. H. Park, S. H. Lee, N. J. Yoo, J. Y. Lee, Inactivating mutations of the caspase-10 gene in gastric cancer, *Oncogene* **21** (2002), 2919-25.

47. M. Krajewska, H. Kim, E. Shin, S. Kennedy, M. J. Duffy, Y. F. Wong, D. Marr, J. Mikolajczyk, A. Shabaik, I. Meinhold-Heerlein, X. Huang, S. Banares, H. Hedayat, J. C. Reed, S. Krajewski, Tumor-associated alterations in caspase-14 expression in epithelial malignancies, *Clin. Cancer Res*. **11** (2005), 5462-7541.

48. M. Wu, I. Kodani, D. Dickinson, F. Huff, K. U. Ogbureke, H. Qin, S. Arun, R. Dulebohn, M. Al-Shabrawey, A. Tawfik, S. Prater, J. Lewis, J. Wataha, R. Messer, S. Hsu, Exogenous expression of caspase-14 induces tumor suppression in human salivary cancer cells by inhibiting tumor vascularization, *Anticancer Res*. **29** (2009), 3811-3818.

49. R. C. Botham, T. M. Fan, I. Im, L. B. Borst, L. Dirikolu, P. J. Hergenrother, Dual small-molecule targeting of procaspase-3 dramatically enhances zymogen activation and anticancer activity, *J. Am. Chem. Soc.* **136** (2014), 1312-1319.

50. H. S. Roth, P. J. Hergenrother, Derivatives of procaspase-activating compound 1 (PAC-1) and anticancer activities, *Curr. Med. Chem*. **23** (2016), 201-241.

51. B. Studen, Peptidomimetici kao inhibitori HIV-proteaze, Prehrambeno- tehnološki fakultet, Zagreb (2015).

52. I.Radić, Peptidomimetici kao terapeutici, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Zagreb (2016).

53. R. Ostojić, Hepatitis C, *Medicus.***15** (2006), 113-120.