

CASPASE: REVIEW OF THE OTHER ROLES IN APOPTOSIS, THE CHARACTER OF THE CATALYTIC SITE, AND THE INTERACTIONS WITH SUBSTRATES AND THEIR INHIBITORS

Maryam Hasymia Ishmatullah^{1*}, Sandra Megantara², Jutti Levita³

¹Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran
Jl. Raya Bandung-Sumedang km 21, Sumedang 45363

²Departemen Analisis Farmasi dan Kimia Medisinal,
Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran

Jl. Raya Bandung-Sumedang km 21, Sumedang 45363

³Departemen Farmakologi dan Farmasi Klinik,
Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran

Jl. Raya Bandung-Sumedang km 21, Sumedang 45363

*Corresponding author: Maryam Hasymia Ishmatullah (Ishmatullahmaryam@gmail.com)

ARTICLE HISTORY

Received: 4 May 2021

Revised: 24 July 2021

Accepted: 27 July 2021

Abstract

Recently, many studies about apoptosis related to anticancer activity were carried out. Of those, caspases have been the most interesting target of study. This review aimed to add insights on the roles of caspase-3, -8, and -9 in apoptosis, the character of their catalytic sites, and the interaction between the enzymes and their substrates and inhibitors. The articles were searched by using certain keywords such as "caspase catalytic site", "apoptosis", "amino acid residues", and "substrates and inhibitors of caspase" in Google Scholar. Results revealed that caspase-3 plays a role in enhancing the sensitivity and efficiency of apoptosis, as well as inhibiting the production of ROS, while caspase 9 cleaves pro-apoptosis protein to its active form. The catalytic site of each caspase reveals different characters. Cys285 and His23 residues are detected in caspase-3, while in caspase 8 is Asp374, and in caspase 9 are Cys230, His224, Cys272, His237, Cys239, and Cys287. The substrates of caspase-3 are DEVD and DVLD and the allosteric inhibitors are FICA and DICA. Caspase 8 substrate is IETD and currently, an inhibitor is being developed in the form of c-FLIP. In caspase 9, the substrate is LEHD, and zinc was found to be a selective inhibitor. It could be concluded that besides their major role in apoptosis, caspases also enhance the sensitivity and efficiency of the apoptosis process, the characteristics of each catalytic pocket of caspase are distinctive, and their inhibitors bind to an allosteric site instead of occupying the location where the substrates bind to. This review will be useful for those who dedicate themselves to anticancer drug discovery.

Key words: *anticancer, apoptotic, caspase*

CASPASE: REVIEW TENTANG PERAN LAIN PADA APOPTOSIS, KARAKTER KANTUNG KATALITIK, SERTA INTERAKSI DENGAN SUBSTRAT DAN INHIBITORNYA

Abstrak

Akhir-akhir ini banyak dilakukan penelitian tentang penghambatan pertumbuhan sel kanker atau apoptosis dari ekstrak tanaman. Caspase, enzim protease yang berperan dalam apoptosis, menjadi target menarik untuk ditelaah. Penelusuran artikel ini dilakukan untuk memberi informasi tentang peran lain caspase pada apoptosis, karakter kantung katalitiknya, serta interaksinya dengan substrat dan inhibitor. Metode pencarian artikel dilakukan melalui basis data Google Scholar dengan kata kunci "caspase catalytic site", "apoptosis", "amino acid residues", dan "substrates and inhibitors of caspase". Hasil penelusuran artikel ini menunjukkan bahwa caspase-3 berperan dalam sensitivitas dan efisiensi apoptosis serta menghambat produksi ROS, sedangkan caspase 9 dapat membelah protein pro-apoptosis menjadi bentuk aktifnya. Kantung katalitik masing-masing caspase memiliki residu penting berbeda, yaitu residu Cys285 dan His23 pada caspase-3, Asp374 pada caspase-8, dan pada caspase 9 berupa residu Cys230, His224, Cys272, His237, Cys239, dan Cys287. Substrat caspase-3 adalah DEVD dan DVLD dan inhibitorynya yaitu FICA dan DICA bersifat alosterik. Substrat caspase-8 adalah IETD dan saat ini sedang dikembangkan inhibitorynya yakni c-FLIP. LEHD adalah substrat caspase-9, serta seng merupakan inhibitor selektif caspase-9. Dapat disimpulkan bahwa selain berperan dalam apoptosis, caspase juga meningkatkan sensitivitas dan efisiensi apoptosis serta menghambat produksi ROS. Walaupun secara umum karakter kantung katalitik caspase mirip, namun masing-masing caspase memiliki residu asam amino penting yang berbeda, dan masing-masing caspase memiliki inhibitor yang menempati posisi alosterik (bukan menghambat di tempat substrat terikat). Review ini akan bermanfaat bagi peneliti bidang penemuan obat antikanker.

Kata kunci: antikanker, apoptosis, caspase

Pendahuluan

Telah dilaporkan bahwa prevalensi penyakit kanker di Indonesia mengalami peningkatan dari 1,4% pada 2013 menjadi 1,8% pada 2018.¹ Peningkatan jumlah penderita kanker ini dapat disebabkan oleh pergeseran gaya hidup, misalnya kurang waktu untuk berolahraga, makanan siap saji dengan pengawet atau karbohidrat dan lemak tinggi, stress oksidatif karena polutan, serta belum ditemukannya terapi yang efektif. Oleh karena itu, banyak penelitian diarahkan pada pencarian obat yang efektif menghambat pertumbuhan sel kanker atau obat yang memicu apoptosis.²

Pada apoptosis terdapat dua jalur pengaktifan, yakni intrinsik yang disebabkan oleh disfungsi internal, serta ekstrinsik yang terjadi karena respon dari luar. Kedua jalur ini dapat terjadi melalui aktivasi caspase.³ Caspase, atau *cysteine-aspartyl protease*, merupakan enzim protease yang berperan dalam mekanisme kematian sel seperti apoptosis. Caspase terdiri dari tiga domain yakni ujung amino terminal, domain besar dengan ukuran ~20 kDa, dan domain kecil ~10 kDa yang bersama-sama membentuk domain protease.⁴ Saat ini terdapat dua belas caspase yang ditemukan pada manusia, caspase tersebut adalah caspase-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -12, -14. Caspase sendiri dikelompokkan menjadi caspase inflamasi (caspase -1, -4, -5, -12) dan apoptosis (Caspase -2, -3, -6, -7, -8, -9, -1) berdasarkan fungsinya.⁵ Caspase didesain untuk dapat tepat memotong substratnya secara teratur dan spesifik. Selain

karena protease sistein yang menggunakan atom sulfur dari sistein untuk melakukan pembelahan sel, nama caspases juga diberikan karena pemotongan protein dilakukan pada asam amino aspartat dalam rantai substratnya.⁶

Caspase merupakan target menarik untuk diteliti, terbukti dari banyaknya artikel ilmiah tentang topik tersebut, namun peran lain enzim aspartate protease ini di dalam apoptosis serta karakter kantung katalitiknya, masih jarang diungkapkan. Review ini bertujuan untuk mengkaji caspase-3, -8, dan -9 dari segi karakter kantung katalitik, interaksi dengan substrat dan inhibitorynya, serta peran caspase tersebut dalam apoptosis.

Metode

Penelusuran artikel dilakukan dari basis data Google Scholar dengan kata kunci "caspase catalytic site", "apoptosis", "amino acid residues", dan "substrates and inhibitors of caspase". Kriteria inklusi berupa artikel-artikel yang terbit setelah tahun 2010, menggunakan Bahasa Inggris dan Indonesia, *full text* tidak berbayar, bukan *review article* serta berkaitan dengan topik yang dimaksud.

Hasil

Proses pencarian pustaka dilakukan melalui elektronik *based* berupa Google Scholar (n=293). Pemilihan pustaka dilakukan dengan skrining melalui judul dan abstrak (n=72), kemudian pada keseluruhan artikel (n=14). Tabel 4.1 menunjukkan hasil dari kajian pustaka.

Tabel 1. Hasil Kajian Pustaka

	Caspase-3	Caspase-8	Caspase-9	Referensi
Peran lain dalam apoptosis	Berpengaruh terhadap sensitivitas dan efisiensi	-	Dapat membelah protein tbid jadi bid	7,8
Asam Amino Penting dalam Kantung Katalitik	Cys285 dan His237 (rantai A) serta Cys285 dan Gly238 (rantai B)	Asp374	Cys230, His224, Cys272, His237, Cys239, dan Cys287	9,10,11, 12,13,14
Substrat dan Asam Amino Penting	DEVD Arg64A, Gln161A, Arg207B, Ser205B, Ser209B (ikatan hidrogen) dan Phe256B, Trp206B, Trp214, B (interaksi hidrofobik)	IETD	LEHD	11,15,16, 17,10, 18
	DVLD			16
	DEVE			10
Inhibitor dan Asam Amino	DICA Cys163A, His121A, Ser120A (ikatan	c-FLIP	Seng (H237, C239, dan C287, di	11,15, 19,20

Penting	hidrogen) dan Phe128A, Thr166A (interaksi hidrofobik)	situs aktif dan. C272 jauh dari situs aktif)
	FICA Cys290A, Gly122A, Ser120A, Ser205B (ikatan hidrogen) dan Thr62A, Tyr204B (interaksi hidrofobik).	15
	AC-DEVED-CHO Arg179, Ser236, Gin283, Arg341, Phe 381 (ikatan hidrogen) dan His237, Cys2685, Ser339, Trp340, Arg34 (Interaksi hidrofobik)	9

Pembahasan

Peran Caspase dalam Apoptosis

Caspase dapat secara selektif mengenali substratnya melalui rantai peptida yang spesifik berupa residu asam amino aspartat (Asp) pada posisi P1 (C-terminus). Selain itu, inhibitor selektif caspase-3 dilaporkan mampu menghidrolisis substrat caspase-3 dengan berikatan dengan kantung aktifnya, artinya, artinya inhibitor tersebut bersifat kompetitif terhadap substrat. Penelitian mengenai substrat dan inhibitor caspase memiliki peranan penting dalam pengembangan caspase sebagai target terapeutik.¹⁶ Oleh karena itu, pengontrolan caspase belakangan menjadi target untuk terapi kanker.²¹

Peran caspase dalam apoptosis dapat dibagi menjadi caspase inisiator dan caspase efektor. Di antara caspase inisiator (caspases-8, -9, dan -10), caspase-8 dan caspase-9 merupakan kunci utama pada golongan caspase tersebut. Sedangkan caspase-3 adalah caspase yang dominan di antara caspase efektor (-3, -6, dan -7). Caspase-9 menginduksi apoptosis melalui jalur intrinsik dan caspase-8 melalui jalur ekstrinsik. Kemudian keduanya mengaktifasi caspase efektor seperti caspase-3. Akan tetapi, peran yang lebih jauh dari caspase -3, -8, dan -9 belum sepenuhnya dieksplorasi dan belum secara detail menjelaskan pengaruh lain selain mengaktifasi jalannya apoptosis secara langsung.^{22,23,24}

Peran yang lebih jauh atau peran lain dari caspase-9 dan -3 ketika mengeksekusi terjadinya apoptosis pada jalur intrinsik setelah pelepasan sitokrom c ditemukan oleh Bretnall dkk. Caspase-9 dapat membelah protein Bid menjadi tBid pada asam amino 59 untuk memproduksi ROS, sedangkan di sisi lain caspase-3 juga berperan dalam sensitivitas dari apoptosis dan menghambat produksi ROS serta membuat apoptosis berjalan dengan efisien. Sedangkan pada caspase-8 dan caspase-3 yang merupakan jalur ekstrinsik penelitian dilakukan oleh Kominami dkk dengan mengembangkan metode baru menggunakan FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Besarnya sinyal ekstrinsik yang diterima sel dapat diatur dan kinetika, dinamika, serta selektivitas dari jalur apoptosis yang dimediasi caspase-8 didefinisikan ulang. Berdasarkan hasil tersebut dapat ditemukan konsentrasi dari caspase-8 yang dibutuhkan untuk menyebabkan apoptosis hanya kurang dari 1% dari total seluruh caspase-8. Penelitian ini juga mendemonstrasikan kaskade jalur ekstrinsik oleh caspase-8 hingga ke caspase-3 dengan seksama.^{21,7,8}

Karakteristik Residu Asam Amino Penting dalam Kantung Katalitik

Secara umum, terdapat kemiripan karakter kantung aktif pada semua caspase. Kantung aktif caspase dibentuk oleh residu asam amino arginin (Arg-179, Arg-341) dan glutamin (Gln-283). Kantung ini meskipun jumlahnya hanya sedikit dari volume total enzim tetapi merupakan bagian terpenting dari enzim. Masing-masing caspase memiliki karakter kantung katalitik yang berbeda-beda dimana kantung katalitik dari suatu enzim ditentukan oleh koordinat spasial relatif dari beberapa residu asam amino penting. Residu asam amino ini, sesuai dengan namanya, berperan dalam mengaktifkan kejadian katalitik dari reaksi antara substrat dan enzim.²⁶

Caspase 3

Kantung katalitik caspase-3 (PDB ID: 1PAU) melibatkan gugus sulfhidril Cys285 (rantai A) dan cincin imidazol His237 (rantai A). His-237 menstabilkan gugus karbonil dari residu aspartat, sementara Cys285 menyerang dan akhirnya memutuskan ikatan peptida. Cys285 (rantai B), sedangkan Gly238 (rantai B) bertindak untuk menstabilkan keadaan transisi tetrahedral dari kompleks substrat-enzim melalui ikatan hidrogen.⁹ Penelitian lain mencoba mengeksplorasi residu asam amino kedua terbanyak yang menjadi situs pemotongan caspase-3 selain aspartat. Hasil penelitian menunjukkan asam amino tersebut adalah glutamat. Penelitian ini menunjukkan kekuatan ikatan untuk situs pemotongan aspartat sebenarnya lebih lemah, tetapi proses katalitiknya lebih cepat dibandingkan glutamat. Kemudian caspase-3 juga mampu memotong residu asam amino terfosforilasi yaitu fosfoserin. Artinya terdapat probabilitas terhadap spesifitas yang lebih luas dari caspase 3.¹⁰

Caspase 8

Situs katalitik caspase-8 inaktif ketika dalam bentuk monomer dengan adanya *linker* antar domain dan aktif ketika terjadi dimerisasi. Caspase-8 yang terkompleks dengan *Fas-associated death domain protein* (FADD) adalah komponen kunci dari beberapa kompleks multiprotein yang mengkoordinasikan nasib sel, termasuk *death-inducing signalling complex* (DISC) yang menginduksi apoptosis. Pembelahan caspase-8 nantinya berfungsi sebagai sinyal umpan balik negatif yang memicu pemutusan kompleks.¹¹ Situs katalitik dari caspase-8 terletak di Asp374, dan merupakan yang pertama dari dua situs pembelahan dalam sepuluh penghubung asam amino antara subunit besar dan kecil dari zimogen caspase-8.¹²

Caspase 9

Caspase 9 ada dalam bentuk monomer inaktif. Autokatalitik pada caspase 9 akan terjadi apabila terjadi pemotongan antar-rantai dan caspase 9 berikatan dengan apoptosom.¹³ Situs aktif caspase-9 berisi residu Cys230, His224, Cys272, His237, Cys239, dan Cys287, serta merupakan tempat terikatnya ion Zn (seng).¹⁴

Substrat dan Inhibitor Caspase

Selama dua puluh tahun ke belakang, pemahaman mengenai caspase terus meningkat dari aspek biologi dan kimia melalui pengembangan substrat dan inhibitor sintesis. Substrat dan inhibitor ini digunakan untuk menjelaskan peran caspase dalam mentransmisikan sinyal ketika apoptosis. Prinsip dasar dalam meneliti substrat caspase adalah preferensi khas masing-masing di tiap situs aktif caspase dan dari substrat alaminya.²⁵

Sejumlah substrat caspase telah diidentifikasi dan terdapat ratusan substrat untuk caspase -1, -2, -3, -6, -7, dan -8, sedangkan untuk caspase -4, -5, -9 dan -14 lebih

sedikit jumlahnya. Meskipun terdapat tumpang tindih antara beberapa caspase, tetapi laju pembelahannya cenderung sangat bervariasi. Dalam mengidentifikasi preferensi dari masing-masing caspase, substrat sintetik berbasis peptida terus dikembangkan. Peptida digabungkan dengan molekul reporter dengan tingkat fluoresensi yang tinggi. Substrat sintetik jenis ini berguna untuk mengidentifikasi sekuens dari situs "unprime".²⁵

Metode untuk menentukan substrat alami dari caspase juga terus dikembangkan. Pendekatan dengan memicu caspase endogen (pendekatan *forward*) atau dengan pendekatan *reverse*. Kedua pendekatan ini saling melengkapi kekurangan dari masing-masing.¹⁰

Caspase 3

Substrat sintetik caspase-3 pada daerah P1 dengan situs pemotongan residu aspartat yang terbanyak dipotong adalah DEVD (PDB ID: 2DKO).¹⁶ Substrat peptida lain dari caspase-3 adalah DVLD. Hasil penambatan molekuler antara Caspase 3 (PDB ID:1NME) dengan substratnya (Ac-DEVD-AFC) menunjukkan asam amino penting pada interaksi keduanya adalah Arg64A, Gln161A, Arg207B, Ser205B, Ser209B (Ikatan Hidrogen) dan Phe256B, Trp206B, Trp214, B (interaksi hidrofobik).¹⁵

Substrat caspase-3 di situs pemotongan P1 glutamat (DEVE) memiliki kesamaan yang hampir identik pada daerah P4-P2' dengan situs pemotongan aspartat (PDB ID: 5IC4). Ac-DEVE- AFC hanya dibelah dua kali lebih lambat dibandingkan Ac-DEVD-AFC oleh caspase-3.¹⁰

Inhibitor kompetitif caspase-3 dinilai belum terlalu efektif sehingga dikembangkan inhibitor alosterik seperti DICA (*2-(2,4 dichloro phenoxy)-N-(2-mercapto-ethyl)-acetamide*) dan FICA (*5-fluoro-1Hindole-2 carboxylic acid (2-mercapto-ethyl)-amid*). Keduanya berinteraksi dengan Cys264 untuk menghambat caspase. Hasil penambatan molekuler, menunjukkan asam amino penting yang berperan pada FICA adalah Cys290A, Gly122A, Ser120A, Ser205B (ikatan hidrogen) dan Thr62A, Tyr204B (interaksi hidrofobik). Sedangkan pada DICA adalah Cys163A, His121A, Ser120A (ikatan hidrogen) dan Phe128A, Thr166A (interaksi hidrofobik).¹⁵

Inhibitor yang efektif pada dasarnya adalah peptidil alami, namun peptidil bukan kandidat obat yang baik, maka ada kebutuhan untuk mencari inhibitor caspase-3 non peptidil alami. Caspase-3 (PDB ID: 1PAU) ditambatkan secara molekuler dengan beberapa senyawa alami. Ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik antara asam rosmarinat dengan caspase-3 memperlihatkan hasil yang paling baik dibandingkan senyawa lain dengan AC-DEVED-CHO sebagai inhibitor pembanding (pada AC-DEVED-CHO, ikatan hidrogen: ARG179, SER236, GIN283, ARG341, PHE 381; Interaksi hidrofobik: HIS237, CYS2685, SER339, TRP340, ARG34 dan pada asam rosmarinat, ikatan hidrogen: ARG179, SER236, GIN283, ARG341, SER343, SER339 dan interaksi hidrofobik: HIS237, CYS285, TRP340, ARG341, SER343). Lebih jauh, interaksi hidrofobik asam rosmarinat dengan Cys-285 dan asam amino lainnya menstabilkan konformasi terikat.⁹

Caspase 8

Substrat sintetik bagi caspase-8 adalah Ac-IETD.AFC.¹¹ Sedangkan inhibitor yang saat ini tengah dikembangkan adalah c-FLIP S yang mampu mengubah struktur kompleks FADD-caspase-8 sehingga mencegah pemanjangan filamen caspase-8. c-FLIP memblokir pemanjangan filamen caspase-8 dengan halangan sterik dari situs pengikatan DED tandem kanonik. Pengikatan c-FLIP S mencegah dimerisasi domain katalitik Caspase-8 karena menempati ruang dimana molekul caspase-8 berikutnya akan mengikat untaian yang berdekatan dari filamen. Upaya sedang dilakukan untuk menargetkan c-FLIP S dan c-FLIP L secara terapan menggunakan inhibitor berukuran

molekul kecil, Temuan ini juga memberikan dasar molekuler untuk menargetkan interaksi struktural yang sebelumnya tidak teridentifikasi.¹¹

Caspase 9

Substrat untuk caspase 9 adalah Ac-LEHD-AFC.¹⁷ Seng (Zn) ditemukan sebagai inhibitor caspase 9. Penelitian menunjukkan bahwa *caspase activation and recruitment domains* (CARDs) tidak terlibat dalam mekanisme penghambatan oleh seng. Seng bekerja pada inti katalitik (subunit besar dan kecil) caspase-9. Caspase-9 tampaknya dihambat secara khusus oleh seng tetapi tidak oleh logam lainnya. Hal ini menunjukkan fungsi penghambatan seng alosterik atau mengikat di dekat situs aktif, sehingga mempengaruhi pengikatan substrat. Hasil penambatan molekuler menemukan dua situs pengikatan seng yang berbeda pada caspase-9 (PDB ID: 1JXQ). Situs pertama, terdiri dari H237, C239, dan C287, termasuk situs diad aktif dan terutama bertanggung jawab untuk penghambatan yang dimediasi seng. Situs pengikatan kedua di C272 jauh dari situs aktif.¹⁹

Kesimpulan

Dapat disimpulkan bahwa selain berperan dalam apoptosis, caspase juga meningkatkan sensitivitas dan efisiensi apoptosis serta menghambat produksi ROS. Walaupun secara umum karakter kantung katalitik caspase mirip, namun masing-masing caspase memiliki residu asam amino penting yang berbeda, dan masing-masing caspase memiliki inhibitor yang menempati posisi alosterik (bukan menghambat di tempat substrat terikat). Review ini akan bermanfaat bagi peneliti bidang penemuan obat antikanker.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Rektor Universitas Padjadjaran melalui Direktorat Penelitian dan Pengabdian Masyarakat telah membiayai publikasi artikel ini dengan dana Hibah Riset Academic-Leadership Grant atas nama Prof. Dr. Jutti Levita, M.Si.

Daftar Pustaka

1. Kementerian Kesehatan RI. *Laporan Riskesdas 2018*. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia; 2018. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
2. Islam MT, Ali ES, Uddin SJ, et al. Andrographolide, a diterpene lactone from *Andrographis paniculata* and its therapeutic promises in cancer. *Cancer Lett.* 2018;420(February):129-145. doi:10.1016/j.canlet.2018.01.074
3. Kabel AM, Adwas AA, Elkhoely AA, Abdel-rahman MN. Apoptosis : Insights into Pathways and Role of p53 , Bcl-2 and Sphingosine Kinases. 2016;4(4):69-72. doi:10.12691/jcrt-4-4-3
4. Lamkanfi M, Declercq W, Saelens X, M K, Vandenabeele P. Alice in caspase land. *Cell Death Differ.* 20002;9:358-361.
5. Logue SE, Martin SJ. Mammalian caspase activation pathways in apoptosis and inflammation. in: *design of caspase inhibitors as potential clinical agents.* ; 2009:1.
6. Goodsell D. Imported from \nhttp://pdb101.rcsb.org/motm/206. Published online 2005. doi:10.2210/RCSB_PDB
7. Brentnall M, Menocal L, Guevara R, Cepero E BL. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol.*

- 2013;14(32).
8. Kominami K et al. The molecular mechanism of apoptosis upon caspase-8 activation: Quantitative experimental validation of a mathematical model. *BBA*. 2012;1823:1825-1840.
 9. Khan S, Ahmad K, Alshammari EMA, et al. Implication of caspase-3 as a common therapeutic target for multineurodegenerative disorders and its inhibition using nonpeptidyl natural compounds. *Biomed Res Int*. Published online 2015. doi:10.1155/2015/379817
 10. Seaman JE, Julien O, Lee P, Rettenmaier T, Thomsen N, Wells J. Caspases: Caspases can cleave after aspartate, glutamate and phosphoserine residues. *Cell Death Differ*. 2016;23(10):1717-1726. doi:10.1038/cdd.2016.62
 11. Fox JL, Hughes MA, Meng X, et al. Cryo-EM structural analysis of FADD:Caspase-8 complexes defines the catalytic dimer architecture for coordinated control of cell fate. *Nat Commun*. 2021;12(819):1-17. doi:10.1038/s41467-020-20806-9
 12. Turowec JP, Duncan JS, Gloor GB, Litchfield DW. Regulation of caspase pathways by protein kinase CK2: Identification of proteins with overlapping CK2 and caspase consensus motifs. *Mol Cell Biochem*. 2011;356:159-167. doi:10.1007/s11010-011-0972-5
 13. Li Y, Zhou M, Hu Q, et al. Mechanistic insights into caspase-9 activation by the structure of the apoptosome holoenzyme. *PNAS*. 2017;114(7):1542-1547. doi:10.1073/pnas.1620626114
 14. Dagbay K, Eron SJ, Serrano BP, et al. A multipronged approach for compiling a global map of allosteric regulation in the apoptotic caspases. In: *Methods in Enzymology*. ; 2014. doi:10.1016/B978-0-12-417158-9.00009-1
 15. Megantara S, Mutakin M, Halimah E, Febrina E, Levita J. Molecular interaction of the downstream executioner cysteine aspartyl proteases (Caspase-3 and caspase-7) with corilagin, quercetin, rutin, kaempferol, gallic acid, and geraniin of *acalypha wilkesiana* müll. *Rasayan J Chem*. Published online 2020. doi:10.31788/RJC.2020.1335766
 16. Schroeder T, Barandun J, Flütsch A, Briand C, Mittl PRE, Grütter MG. Specific inhibition of caspase-3 by a competitive DARPIn: Molecular mimicry between native and designed inhibitors. *Structure*. 2013;21:277-289. doi:10.1016/j.str.2012.12.011
 17. Hu Q, Wu D, Chen W, Yan Z, Shi Y. Proteolytic processing of the caspase-9 zymogen is required for apoptosome-mediated activation of caspase-9. *J Biol Chem*. 2013;288(21):15142-15147. doi:10.1074/jbc.M112.441568
 18. Julien O, Zhuang M, Wiita A, et al. Quantitative MS-based enzymology of caspases reveals distinct protein substrate specificities, hierarchies, and cellular roles. *PNAS*. Published online 2016.
 19. Huber KL, Hardy JA. Mechanism of zinc-mediated inhibition of caspase-9. *Protein Sci*. 2012;21:1056-1065. doi:10.1002/pro.2090
 20. Sun S. Understanding the role of the death receptor 5/fadd/caspase-8 death signaling in cancer metastasis. *Mol Cell Pharmacol*. 2011;3(1):31-34.
 21. Boice A, Bouchier-Hayes L. Targeting apoptotic caspases in cancer. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. Published online 2020. doi:10.1016/j.bbamcr.2020.118688
 22. Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5. doi:10.1101/cshperspect.a008672
 23. Julien, O. & Well J. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ*. 2017;24(8):1380–1389.

24. Green D. Apoptotic Pathways: Paper Wraps Stone Blunts Scissors. *Cell*. 2000;102:1-4.
25. Poręba M, Strózyk A, Salvesen GS, Drąg M. Caspase substrates and inhibitors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(8):1-20. doi:10.1101/cshperspect.a008680
26. Kirshner DA, Nilmeier JP, Lightstone FC. Catalytic site identification—a web server to identify catalytic site structural matches throughout PDB. *Nucleic Acids Res*. 2013;41.