

Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis

Carmen Martha Elinos-Báez,* Vilma Maldonado,** Jorge Meléndez-Zajgla**

Recepción 15 de agosto del 2001; aceptación 26 de noviembre del 2001

Resumen

Las caspasas son proteínas clave en la transducción y ejecución de la señal apoptótica inducida por una diversidad de estímulos. Se encuentran en la célula como precursores inactivos que necesitan ser cortados para iniciar su actividad. Existen dos grandes grupos de caspasas, las denominadas iniciadoras y las ejecutoras. Las caspasas iniciadoras son activadas por autoproteólisis cuando son translocadas a compartimientos específicos o mediante adaptadores/activadores. Las caspasas ejecutoras son activadas mediante el corte específico mediado por las caspasas iniciadoras. Estas proteasas son las encargadas de los cortes finales de sustratos que provocan la morfología típica de la apoptosis. Entre éstos se encuentran proteínas de señal, de reparación de ADN, estructurales, factores de transcripción, etc. Las caspasas representan un nuevo paradigma de la transducción de la señal y se encuentran implicadas en un gran número de procesos fisiológicos y patológicos. En un futuro podrían servir como marcadores de procesos patológicos y como blanco de nuevas terapias.

Palabras clave: Apoptosis, caspasas, IAP

Introducción

En condiciones fisiológicas las células dañadas, las que están sujetas a recambio y las senescentes se eliminan a través de un tipo de muerte celular denominada apoptosis, del griego antiguo apo-TOE-sis, que significa desprendimiento de las hojas del árbol en otoño. Kerr en 1972 retomó el término y lo aplicó a la pérdida de las células por los tejidos para la sobrevivencia del hospedero.¹ Se ha observado que este tipo de muerte celular es vital en la homeostasis tisular porque cuando se altera se producen enfermedades degenerativas como la enfermedad de Alzheimer, Huntington, daño isquémico, desórdenes autoinmunes y varios tipos de cáncer.^{2,3}

Summary

Caspases are key proteins for the transduction and execution of the apoptotic signals induced by several stimuli. These proteins are present within the cell as inactive precursors that need a proteolytic cleavage in order to be active. There are two main caspases group, the initiators and executors. The formers are activated by autoproteolysis when translocated to specific cell compartments or through the coupling of adapters and or activators. The executors caspases are activated by cleavage of an initiator caspase. These proteases are responsible then for the final cleavage of diverse substrates that mediate the morphologic changes during apoptosis. Among these there are signalization, DNA repairing, structure, transcription proteins, etc. Caspases represent a new paradigm in the signal transduction pathway, and are implicated in a large number of physiologic and pathologic processes. In a near future they could be useful pathologic markers and therapeutic targets.

Key words: Apoptosis, caspases, IAP

La apoptosis se presenta en células sometidas a recambio, en la embriogénesis, en la metamorfosis, durante la involución del seno lactante, cuando hay carencia de los factores de crecimiento, por activación de los llamados receptores de muerte; en células sometidas a estrés por radiación ionizante o por compuestos químicos mutagénicos, etc.⁴⁻⁶ Cuando la gravedad del daño es tal que la célula no puede repararse, se activan mecanismos que la dirigen al suicidio a través de un grupo de moléculas, conservadas evolutivamente, que constituyen la maquinaria apoptótica.⁷ Aunque algunas de estas moléculas son ubicuas y generales, otras son específicas de algunos tejidos y utilizan señales también específicas.

* Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México.

** División de Investigación Básica. Instituto Nacional de Cancerología. Secretaría de Salud.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: M. en C. Carmen Martha Elinos-Báez. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas. U.N.A.M. Apartado Postal 70228, C. P. 04510. México, D.F. Tel. 5622 3831, Fax 5622 3855.

La apoptosis presenta características que difieren marcadamente de la muerte celular degenerativa o necrosis la cual tiene mecanismos de inicio específicos para el tipo de daño que recibe la célula, e implica la inducción de genes en la que pueden intervenir mecanismos internos como un reloj bioquímico.⁸ Estos dos tipos de muerte presentan diferencias basadas en su morfología, bioquímica e incidencia.⁹ Las células que entran en apoptosis muestran un estrechamiento rápido del citosol y una pérdida de contacto con las células vecinas por alteraciones en las moléculas de adhesión de la membrana plasmática. En el núcleo hay compactación del material genético y segregación hacia la membrana nuclear e intervención de las desoxirribonucleasas que fragmentan al ADN en segmentos específicos que van de 200 a 100 y 50 kilopares de bases para finalmente cortarse cada 180 pares de bases o sus múltiplos siguiendo los espacios internucleosomales.¹⁰ Asimismo el citoplasma se condensa y se forman vesículas, denominadas cuerpos apoptóticos que contienen restos del núcleo protegido por la membrana nuclear, organelos y retículo endoplásmico.¹¹ Estos cuerpos apoptóticos son fagocitados inmediatamente por las células aledañas o por fagocitos profesionales, impidiendo que moléculas citoplásmicas, organelos y material genético queden libres entre las células.¹² Se ha encontrado que la fagocitosis rápida de los cuerpos apoptóticos se debe al incremento en la membrana celular de la N-acetilglucosamina y de la fosfatidilserina,¹³ que son señales para la fagocitosis.¹⁴ En el caso de la necrosis no existen estos mecanismos, por lo que durante este proceso se presenta disfunción de los organelos antes de la lisis celular y como consecuencia hay una marcada inflamación. Durante la apoptosis participa la transglutaminasa (de tejidos) que provee a los cuerpos apoptóticos de una consistencia rígida y evita que las moléculas del citoplasma se difundan fuera de él.^{15,16} Se presenta elevación de los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} necesarios para la actividad de las endonucleasas.¹⁷ Todos estos cambios estructurales son provocados por la transmisión de señales mediadas por un grupo evolutivamente conservado de cisteín-proteasas denominadas caspasas. Estas proteínas representan un nuevo paradigma de transducción de señales porque en este caso la información es transmitida mediante cortes específicos que inducen la activación de miembros iniciadores de esta familia. Las caspasas iniciadoras finalmente cortan a caspasas ejecutoras las cuales realizan la hidrólisis en sitios específicos de diversos sustratos clave. Un ejemplo de este mecanismo es el producido sobre el citoesqueleto. Durante la apoptosis se presentan profundos cambios en las células que son mediados, en gran parte, por las caspasas. Estas enzimas cortan en sitios específicos a proteínas que reorganizan la estructura del citoesqueleto, como Gas2, fodrina,¹⁸⁻²⁰ β -tubulina y algunos tipos de actina.²¹

Estructura de las procaspasas

Las procaspasas son una familia de cisteín-proteasas que se encuentran como moléculas precursoras inactivas que al recibir la señal apoptogénica sufren un rompimiento proteolítico y dan lugar a dos subunidades que constituyen la enzima activa o caspasa.^{22,23} Las procaspasas constan de un prodominio N-terminal y dos subunidades, una grande p20 y otra pequeña p10. A la fecha las caspasas más estudiadas son la -1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9 y -10. Tomando en cuenta la estructura primaria, determinada por resonancia magnética nuclear (RMN) y cristalografía de Rayos X, se pueden agrupar en dos clases: pertenecen a la clase I las procaspasas que tienen un prodominio N-terminal grande, como las procaspasas-1, -2, -8, -9 y -10. En las procaspasas de clase II el prodominio N-terminal es pequeño o carecen de él, pertenecen a esta clase las procaspasas-3, -6, -7, (Figura 1).²⁴ Los prodominios de las procaspasas de clase I contienen dominios de interacción proteína-proteína que propician la formación de complejos homodiméricos.²⁵ Estos complejos están compuestos por tetrámeros de dos subunidades grandes y dos pequeñas que favorecen su rompimiento autoproteolítico en sitios específicos de residuos de ácido aspártico (D), (Figura 2). Todas estas moléculas constan de 6 alfa hélices anfipáticas y antiparalelas las cuales están muy empaquetadas formando un centro hidrofóbico originando interacciones hidrofóbicas entre los DEDs e interacciones electrostáticas entre los CARDs, (Cuadro I).^{26,27} La autoactivación de las caspasas de clase I las dirige al citoplasma para activar a las procaspasas de clase II, que no tienen la capacidad de autoproteolizarse y durante su activación forman complejos heterodiméricos que favorecen su rompimiento proteolítico.²⁸ En estas condiciones las caspasas activas inician los mecanismos apoptóticos hidrolizando a las diversas proteínas, del citoesqueleto, nucleares, proteínas que intervienen en la división celular, en el control del ciclo celular, reparación, replicación y transcripción del ADN.²⁹⁻³¹ Existen dos cascadas principales para la ejecución de la apoptosis. La primera de ellas, que sucede en la membrana celular, depende de la acción de los denominados factores de muerte que actúan a través de receptores y desencadenan la formación de un DISC (complejo de iniciación de señalización de muerte, por sus siglas en inglés).³² Este DISC genera una señal que recluta caspasas iniciadoras en la membrana de la célula. Una variación de esta cascada es la privación de los factores de crecimiento, que también genera señales a partir de la membrana hacia la mitocondria. La segunda cascada involucra a la mitocondria, organelo que es clave para la integración de señales intra- y extracelulares que inician la apoptosis. El uso de cada una de estas cascadas depende de diversos factores, de los cuales los dos principales son el tipo de

estímulo y el tipo celular. Experimentos con ratones *knockout* han mostrado que células con diferente concentración de caspasa-8 siguen diferentes vías de activación de caspasas de clase II.^{33,34} La vía que no involucra a la mitocondria se presenta en células con alta concentración de caspasa-8 que activa a caspasa-3, iniciando la cascada apoptótica.^{35,36} En células con pequeña cantidad de caspasa-8, esta caspasa fragmenta a BID, un miembro proapoptótico de la familia Bcl-2, generando un fragmento C-terminal de 15 kDa que se transloca a la membrana mitocondrial,³⁷ esto provoca la liberación del citocromo c por apertura de los megaporos mitocondriales llamados PT (transición de poro) regulados por la familia Bcl-2.³⁸ En este caso el citocromo c junto con dATP activa a Apaf-1 (factor 1 que activa a proteasas) para unirse y activar a la caspasa-9.^{39,40} Se ha observado que una vez activadas las caspasas de clase I, los mecanismos apoptóticos son irreversibles.

Estructura general de las procaspasas

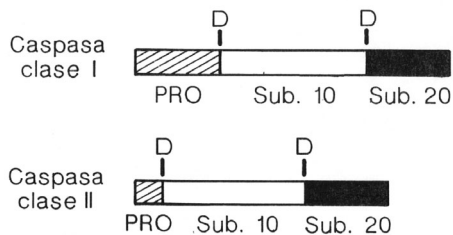


Figura 1. Las caspasas se sintetizan como procaspasas y constan de un dominio N-terminal (PRO) y dos subunidades, una grande p20 y otra menor p10. Se indica la posición de los ácidos aspárticos (D) de escisión de la procaspasa para activarse a caspasa.

Cuadro I. Interacciones entre caspasas de clase I y adaptadores, a través de sus dominios

Caspasas	Adaptador	Interacción	Tipo de interacción
Caspasa-1	CARD	CARD-CARD	Electrostática
Caspasa-2	RAID	CARD-CARD	Electrostática
Caspasa-8	FADD	DED-DED	Hidrofóbica
Caspasa-9	APAF-1	CARD-CARD	Electrostática
Caspasa-10	FADD	DED-DED	Hidrofóbica

Fuente: Chou J. J. et al. Cell 1998;94:171-180.

Reclutamiento, oligomerización y autoproteólisis de las caspasas de clase I para su activación

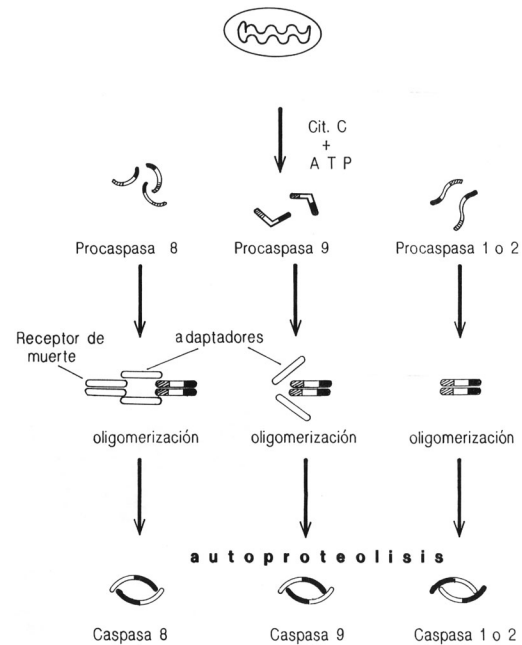


Figura 2. Al recibir la célula una señal de muerte las procaspasas de clase I pueden interaccionar con los adaptadores para su reclutamiento y activación, esto sucede con la caspasa-8. Otras señales liberan citocromo c de mitocondria con dATP que se une a Apaf-1 activando a caspasa-9. Las procaspasas -1 y -2 no necesitan adaptadores para su activación.

Reclutamiento de las caspasas

En el caso de la formación del DISC antes mencionado, los receptores membranales para factores de muerte se caracterizan porque poseen, en el extremo intracelular, una secuencia llamada dominio de muerte (DD) la cual sirve de unión a diversas proteínas adaptadoras que finalmente causan la activación de las caspasas.⁴¹ En todos los casos las interacciones de las procaspasas con los adaptadores que se conocen a la fecha están mediadas por dominios específicos que se repiten en los prodominios de las procaspasas, en las caspasas, en los adaptadores, en las cinasas y en los dominios asociados a los receptores de muerte.⁴²

La activación de los receptores de muerte es consecuencia de la unión de su ligando, que induce la transmisión de una señal, a través del dominio transmembranal, al dominio citoplásmico del receptor. Este sufre un cambio conformacional que favorece su fosforilación por una de las cinasas asociada a ese receptor, que a su vez fosforila al o los adaptadores FADD (dominio de muerte asociado a Fas), TRADD (dominio de

muerte asociado al receptor del factor de necrosis tumoral, TNFR) o TRAFs (factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral), para activar a la procaspasas-8 y -10 y así iniciar la cascada de caspasas activas, (Figura 3).^{43,44} A pesar de que las caspasas son muy similares, existen diferencias en sus mecanismos de activación que se demuestran por el tipo de adaptador. Así, las caspasas-1 y -2 son capaces de oligomerizarse en concentraciones elevadas sin la intervención de un adaptador,⁴⁵ en cambio la caspasa-8 requiere del adaptador FADD y la caspasa-9 de APAF-1.

Resumiendo lo anterior existen 2 vías de activación de la apoptosis: 1. cuando los receptores de muerte son reconocidos por su ligando específico, o en su defecto se presenta una supresión de los factores de crecimiento u hormonales y 2. activación de la vía mitocondrial por daño al citosol o núcleo, los ejemplos más estudiados son la radiación y compuestos químicos que dañan al ADN, en donde la proteína supresora tumoral p53, considerada vigilante de la integridad del genoma, activa la transcripción de varios genes, entre ellos los proapoptóticos de la familia Bcl-2: Bax, Bak, Bid, Bad, (Figura 3).

Inhibidores de la activación de las caspasas

IAPs

Se ha identificado una nueva familia de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) las cuales son clave para la regulación de la apoptosis en diversos fenómenos biológicos, como en la resistencia a las terapias contra el cáncer.⁴⁶ Actualmente se han identificado cinco miembros altamente conservados durante la evolución (IAP-1, IAP-2, XIAP, NIAP, Survivina). El primer miembro se identificó como una molécula con capacidad inhibidora de la

apoptosis inducida durante la infección por baculovirus.⁴⁷ Posteriormente su contraparte, en mamíferos fue identificada por homología y por su habilidad para unirse con los factores asociados al receptor de TNF (TRAFs), (Figura 4). La IAP1 y 2 inhiben la activación de las caspasas efectoras,⁴⁸ también son capaces de inhibir la activación de la procaspasa-9 inducida por el citocromo c. En esta forma protegen a la célula de eventuales activaciones inespecíficas de estímulos por debajo del umbral apoptótico y mantienen en estado latente a las procaspasas.⁴⁹ En algunos casos se ha determinado una participación de estas proteínas en procesos patológicos, este es el caso de la survivina, que se expresa en condiciones fisiológicas en el tejido fetal y no en el tejido adulto diferenciado,⁵⁰ pero existen líneas celulares de tumores malignos que la expresan de novo,^{51,52} como en el caso del cáncer cervicouterino. Estas moléculas podrían convertirse en marcadores moleculares importantes o blancos terapéuticos en terapias contra el cáncer.^{53,54}

Familia Bcl-2

Existen diversos miembros de esta familia con funciones antagónicas. Los miembros proapoptóticos más estudiados son Bax, BID, Bad, Bak, Bcl-Xs, mientras que los antiapoptóticos son bcl-2, bcl-X_L y Mcl-1 bcl-w, BRAG-1.^{55,56} Los miembros de esta familia forman homodímeros o heterodímeros dependiendo de su concentración en las membranas celulares.^{57,58} El balance en la expresión de estas proteínas determina la activación de la transición de poro de la membrana de la mitocondria con la consecuente liberación del citocromo c al citosol y la activación de la caspasa-9.⁵⁹⁻⁶³ Además, algunos de los miembros antiapoptóticos se unen a Apaf-1 e inhiben la activación de esta caspasa.

Cuadro II. Proteínas que son sustratos celulares escindidos en el sitio del ácido aspártico (D) por las caspasas para la ejecución de apoptosis.

Proteína sustrato	Motivo de digestión	Caspas.	Función en la célula normal	Ref.
PARP	DEVD/G	3, 7	Enzima de reparación de ADN	65
U1-70 kDa	DGPD/G	3	Selección el splicing del ARN	66, 67
ADN-PK	DEVD/N	3	Reparación del ADN	68
Gas2	SRVD/G	¿	Componente del citoesqueleto	18
PKC	DMQD/N	3	Rompe actina del citoesqueleto	69
Pro-IL-1β	YVHD/A	1	Activa a citocina pro IL-1β a IL-1β	69, 70
Lamina A	VEID/N	6	Mantiene la forma del núcleo	70, 71
Ribonucleasas	¿	3, 7	Procesamiento de ARN a ARNm	66, 67
SREBP-1 y -2	DEPD/S	¿	Regula unión de esterol a proteína	71, 72
Fodrina	DETD/S	¿	Une citoesqueleto a membrana Cel.	73
Rb	DEAD/G	3	Regula el ciclo celular	77, 78

Diferentes vías de activación de la apoptosis

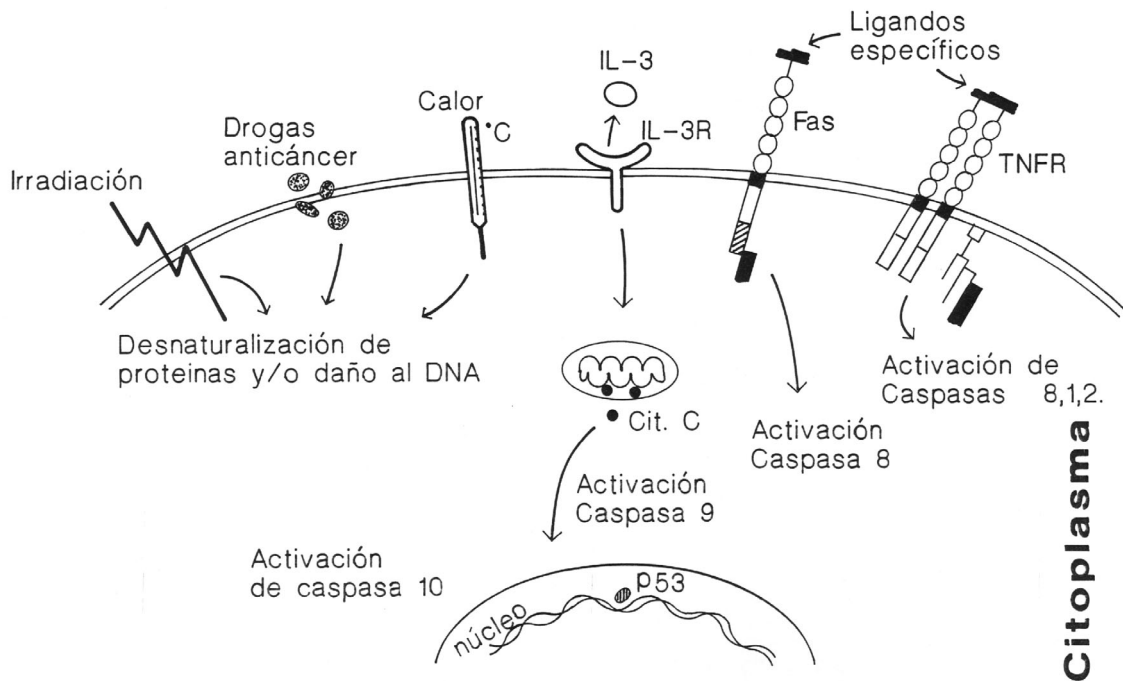


Figura 3. Las señales de activación de las procaspasas de clase I pueden ser: irradiación, drogas anticáncer y calor que inducen daño al ADN nuclear; retiro de factores de crecimiento, activación de los receptores de muerte por su ligando específico, así las caspasas de clase I activan a las procaspasas de clase II y todas intervienen en la hidrólisis específica de sustratos clave para conducir a la célula a apoptosis.

Diferentes vías de inhibición de la apoptosis

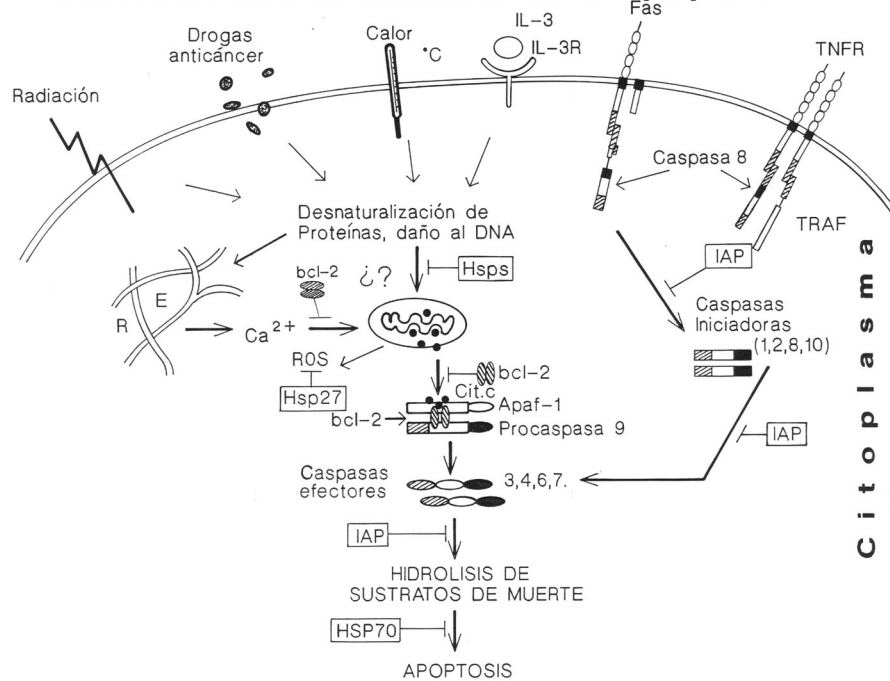


Figura 4. Existen proteínas inhibitoras de la apoptosis (IAPs), proteínas de choque térmico (Hsps), proteínas antiapoptóticas (bcl-2, bcl_X_L) que pueden bloquear la apoptosis en diferentes sitios.

Aven

Se ha descubierto un nuevo inhibidor de caspasas al que se le ha llamado Aven, este inhibidor se une a bcl-X_L y a Apaf-1 e impide la autoproteólisis de la caspasa-9.⁶⁴

Las interacciones de las caspasas activas con las proteínas que son sustratos celulares durante la ejecución de la apoptosis se realizan a través de los sitios de ácido aspártico (D) como se indica en el cuadro II.⁶⁵⁻⁷⁸

En experimentos con líneas celulares de cáncer pulmonar humano: Calu-1, carcinoma epidermoide de tumor central y A427 y adenocarcinoma de tumor periférico cultivadas con compuestos químicos que inducen muerte celular, es necesario determinar si esta muerte es apoptótica, para lo cual se identifica la presencia de caspasas iniciadoras como caspasa-8 o -9 o de caspasas ejecutoras, caspasa-3 o -7. Para esto se realizan Western blots con el anticuerpo anticaspasa específico y se identifica el transcrito por RT-PCR utilizando los oligonucleótidos sentido y antisentido correspondientes que identifican al fragmento de la caspasa de interés y así utilizar los inhibidores de bcl-2, IAPs, Hsps que bloquean la actividad de las caspasas *in vitro*, en animales de laboratorio y en humanos para comprobar que los compuestos químicos utilizados conducen a apoptosis a las células malignas más no así a las células normales de un mismo individuo, éstas se utilizan como control (manuscrito en preparación). Recientemente, se ha suscitado un gran interés en la posibilidad de modificar la actividad de las caspasas con fines terapéuticos. La inhibición de la activación de las caspasas puede tener aplicaciones clínicas, por ejemplo en la hepatitis viral.⁷⁹ Un ejemplo destacado es el cáncer en el que se ha observado que utilizando la tecnología de oligonucleótidos antisentido para los genes inhibidores de las caspasas o posiblemente con anticuerpos específicos para bloquear la activación de Hsps, bcl-2, IAPs, se podía evitar la sobrevivencia de las células malignas.⁸⁰⁻⁸⁴ El conocimiento de los mecanismos apoptóticos y de los factores participantes darán información para mejores tratamientos con agentes farmacológicos que de manera selectiva ataquen a las células malignas y sean poco agresivos para las células normales. Esta es una esperanza renovada en la cura del cáncer.

Agradecimientos: a la Química en Alimentos Marisol Saldaña Cortés por su asesoría en cómputo para realizar este trabajo.

Referencias

1. Touchette N, Fogle S. Apoptosis it chimes with mitosis. *J. NIF. Res* 1991;3:75-78.
2. Thompson CB. Apoptosis in the patogénesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-1462.
3. Cohen P, Eisenberg RA. Lpr and gld: single gene models of systemic

4. autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu Rev Immunol* 1991;9:243-69.
4. Cohen JJ, Duke RC, Fado VA, Sellins KS. Apoptosis and programmed death in immunity. *Ann Rev Immunol* 1992;10:267-293.
5. Thompson EB. Apoptosis. *Ann Rev* 1998;60:533-573.
6. Hetts SW. To die or not to die. *JAMA* 1998;279:300-307.
7. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355-365.
8. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995;146:3-15.
9. Kerr JF, Winterford CM, Brian B. Apoptosis its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994;73:2013-2026.
10. Pittman SM, Geyp M, Tiñan SJ, Gramacho CM, Strickland DH, Fraser MJ. Tubulin in apoptotic cell. In: Lavin M, Watters D. Editors. Programed cell death: the cellular and molecular biology of Apoptosis. Switzerland, Harwood Academic Publishers, 1993, pp 315-323.
11. Kolber MA, Brochat KO, Landa-Gonzales B. Cytochalasin B induces cellular DNA fragmentation. *FASEB J* 1990;4:3021-3027.
12. Seville J, Hogg N, Ren Y, Haslett C. Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophages recognition of neutrophils undergo apoptosis. *J Clin Invest* 1992;90:1513-1522.
13. Fado VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of Apoptotic lymphocytes trigger specific recognition and removal by Macrophages. *J Immunol* 1992;148:2207-2216.
14. Krahling S, Callagen MK, Williamson P, Schlegel RA. Exposure phosphatidylserine is a general feature in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes by macrophages. *Cell Death Differ* 1999;6:183-189.
15. Fesus L, Thomazy V, Falus A. Induction and activation of tissues transglutaminase during programmed cell death. *FEBS Lett* 1987;224:104-108.
16. Piacentini M, Fesus L, Farrace MG, Chibelli L, Pierda L, Melino G. The expresión of "tissue" transglutaminase in two human cancer cell lines is related with programmed cell death (apoptosis). *Eur. J. Cell Biol.* 1991; 54: 246-254.
17. McConkey DJ, Hartzell P, Orrenius. Rapid turnover of endogenous endonuclease activity in thymocytes: effects of inhibitors of macromolecular synthesis. *Arch Biochem Biophys* 1990;278:284-287.
18. Brancolini C, Benedetti M, Schneider C. Microfilament reorganization during apoptosis: the role of Gas2, a possible substrato for ICE-like proteases. *EMBO J* 1995;14:5179-5190.
19. Cryns VL, Bergeron L, Zhu H, Li H, Yuan J. Specific cleavage of a-fodrin during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by an interleukin-1b converting Enzyme/Ced-3 proteasadistinct from the Poly (ADP-ribose) polymerase protease. *J Biol Chem* 1996;271:31277-31282.
20. Vanags DM, Pörn-Ares MI, Coppola S, Burgess DH, Orrenius S. Protease involvement fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J Biol Chem* 1996;31075-31085. Wyllie AH. *Nature (London)* 1980;284:555-556.
21. Cotter TG, Lennon SV, Glynn JM, Green DR. Microfilament-disrupting agents prevent the formation of apoptosis bodies in tumor cells undergoing apoptosis. *Cancer Res* 1992;52:997-1005.
22. Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Black RA. Molecular cloning of the interleukin-1b converting enzyme. *Science* 1992;256:97-100.
23. Kidd VJ. Proteolytic activities mediate apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998;60:533-73.
24. Cryns VL, Yuan J. Proteases to die for. *Genes Dev* 1998;12:1551-1570.
25. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:312-316.
26. Tsao DHH, McDonagh T, Tellez JB, Hsu S, Malakian K, Xu G, Lin II. Solution structure of N-TRADD and characterization of the Interaction of N-TRADD and C-TRAF2 a key step in the TNFR-1 signaling pathway. *Molecular Cell* 2000;5:1051-1057.
27. Chou JJ, Matsuo H, Duan H, Wagner G. Solution structure of the RAIDD CARD and model for CARD/CARD interaction in caspase-2 and caspase-9 recruitment. *Cell* 1998;94:171-180.
28. BUTT AJ, Harvey NL, Parasivam G, Kumar S. Dimerization and autoprocessing of the Nadd2 (caspase-2) precursor requires both the prodomain and the carboxil-terminal regions. *J Biol Chem* 1998;273:6763-6768.
29. Fraser A, Evan G. A licence to kill. *Cell* 1996;85:781-784.
30. Keller JN, Kindy MS, Holtsberg FW, St. Clair DK, Yen HC, Germeyer A, Steiner SM, Bruce-Keller AJ, Hutchins JB, Mattson MP. Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury, supression of peroxynitrite production, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction. *J Neurosci* 1998;18:687-697.
31. Huang B, Eberstadt M, Olejniczak ET, Meadows RP, Fesik SW. NMR Structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) Death domain. *Nature* 1996;384:638-641.
32. Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Kramer PH, Peter ME. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J* 1997;16:2794-2804.

33. **Hakem R, Hakem A, Duncan G, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, Elia A, de la Pompa JL, Kagi D, Khoo W.** Differential requirements for caspase-9 in apoptotic pathways *in vivo*. *Cell* 1998;94:339-352.
34. **Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM.** An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 1998;273:2926-2930.
35. **Debatin KM, Kramer PH, Peter ME.** Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998;17:1674-1687.
36. **Stennicke RH, Jurgensmeier JM, Shin H, Deveraux Q, Wolf BB, Yang X, Zhou Q, Eyerbe LM, Bredeben D.** Pro-caspase-3 in a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem* 1998;273:27084-27090.
37. **Li H, Shu H, Xu CJ, Yuan J.** Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998;94:491-501.
38. **Porter AG.** Protein translocation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 1999;9:394-401.
39. **Yoshida H, Kong YY, Yoshida R, Elia AJ, Hakem A, Hakem R, Penninger JM, Mak TW.** Apaf-1 is required for mitochondrial Pathway of apoptosis and brain development. *Cell* 1998;94:739-750.
40. **Yang J, Liu X, Bhalla K.** Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c mitochondria blocked. *Science* 1997;275:1129-1132.
41. **Asquenazi A, Dixit VM.** Death receptor, signaling. *Science* 1998;281:1305-1308.
42. **Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D.** Involvement of mach, a novel MORT1/FAAD-interactin portease in Fas/APO-1 and TNFRceptor-induced cell death. *Cell* 1996;85:803-815.
43. **Arch RH, Gedrich RW, Thompson CB.** Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)-a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes & Dev* 1998;12:2821-2830.
44. **Evan G, Littlewood T.** A matter of life and cell death. *Science* 1998;281:1317-1322.
45. **Kumar S, Paul A, Colussi PA.** Prodomains-adaptors-oligomerization the pursuit of caspase activation in apoptosis. *TIBS (Trends in Biochemical Science)* 1999;24:1-4.
46. **Bandala E, Espinosa M, Maldonado V, Melendez-Zajgla J.** Inhibitor of apoptosis-1 (IAP-1) expression and apoptosis in non-small-cell lung cancer cells exposed to gemcitabine. *Biochem Pharmacol* 2001;62:13-19.
47. **Bimbaum MJ, Clem RJ, Miller LK.** An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His secuencia motifs. *J Virol* 1994;68:2521-2528.
48. **Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Shou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC.** IAPs block apoptotic events induced caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition distinct caspases. *EMBO J* 1998;17: 2215-2223.
49. **Tamm I, Wang Y, Sausville E, Soudiero DA, Vigna N, Ottersdort T, Reed JC.** IAP-family protein survivin inhibits caspases activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998;58:5315-5320.
50. **Adida C, Crotty PL, McGrath J, Diebold J, Altieri DC.** Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol* 1998;152:43-49.
51. **Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N.** Inhibition of apoptosis by survivin predict shorter survival Rates in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5071-5074.
52. **Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N.** Expresion of a novel anti-apoptosis gene, surviving correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinoma. *Cancer Res* 1998;58:1808-1812.
53. **Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Toning S, Marchisio PC, and Altieri D. C.** Control de apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998;395:580-584.
54. **Jäättelä M.** Escaping cell death: Survival proteins in cancer. *Experimental Cell Research* 1999;248:30-43.
55. **Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G, Brdiczka D, Remy R, Xie ZH, Red JC, Kroemer G.** The permeability Transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med* 1998;187:1261-1271.
56. **Oltvai ZN, and Korsmeyer.** Checkpoint dueling dimers foil death wishers. *Cell* 1994;79:189-172.
57. **Cory S.** Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family. *Ann Rev Immunol* 1995;13:513-543.
58. **Adams JM, Cory S.** The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322-1326.
59. **Orth K, Dixit VM.** Bik and bak induce apoptosis downstream of CrmA but upstream of inhibitor of apoptosis. *J Biol Chem* 1997;272:8841-8844.
60. **Boise LH, Thompson CB.** Bcl-X_L can inhibit apoptosis in cells that have undergone Fas-induced activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3759-3764.
61. **Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD.** The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;275:1132-1136.
62. **Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM et al.** Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997;275:1129-1132.
63. **Reed JC.** Double identity for proteins of the bcl-2 family. *Nature* 1997;387:773-776.
64. **Chau BN, Cheng E, Kerr DA, Hardwich M.** Aven, a novel inhibitor of caspase activation, bind Bcl-x_L and Apaf-1. *Molecular Cell* 2000;6:31-40.
65. **Kaufman SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier G.** Specific proteolytic cleavage of Poly (ADP-ribose) Polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 1993;53:3973-3985.
66. **Tewari M, Beidler DR, Dixit VM.** J. CrmA-imhibitible cleavage of the 70 kD protein component of the U1 small nuclear ribonuclease protein during Fas-and tumor necrosis factor induced apoptosis. *Biol Chem* 1995;270:18738-18741.
67. **Casiola Rosen L, Nicholson DW, Chong T, Rowan KR, Thornberry NA, Miller DK, Rosen A.** Apopain/CCP32 cleaves protein that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death. *J Exp Med* 1996;183:1954-1964.
68. **Song Q, Lees-Miller SP, Kumar S, Zhang N, Chan DW, Smith GC, Jackson SP, Alnemri ES, Litwack G, Khanna KK, Lavin M.** DNA-dependent protein kinase catalyze subunit: a target for an ICE-like protease in apoptosis. *EMBO J* 1996;15:3238-3245.
69. **Ghayur T, Hugunin M, Talanian RV, Ratnofsky S, Quinlan C, Emoto Y, Kharbada S.** Proteolytic activation of protein cinasa Cd an ICE/CE 3-like protease induce characteristics of apoptosis and its role in disease. *J Exp Med* 1996;184:2399-2404.
70. **Orth K, Chinnaiyan AM, Garg M, Froelich CJ, Dxit VM.** The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate Lamina A *J Biol Chem* 1996;271:16443-16446.
71. **Enari M, Hug H, Nagata S.** Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature (London)* 1995;375:78-81.
72. **Wang X, Zelenski NG, Yang J, Sakai J, Brown MS, Goldstein JL.** Cleavage of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) by CPP32 during apoptosis. *EMBO J* 1996;15:1012-1020.
73. **Yeh WC, Shajinian A, Speiser D, Kraunus J, Billia F, Wakeham A, de-la-Pompa H, Ferrick D, Hum B, Iscove N, Mak TW.** Learly lethality funtional NF- κ B activation and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF-2 deficient mice. *Immunity* 1997;7:715-725.
74. **Kouzarides T.** Funtion of pRb and p53: what's the conection. *Trends Cell Biol.* 1995;5:448-450.
75. **Ucker DS, Meyers J, Obermiller PS.** Activation driver T cell death. II quantitative differences alone distinguish stimull triggering no transformed T cell proliferation or death. *J Immunol* 1992;149:1583-1592.
76. **Martin SJ, O'Brien GA, Nishioka WK, McGahon AJ, Mahboubi A, Saido TC, Green DR.** Proteolysis of fodrin (non erithroide spectrin) during apoptosis. *J Biol Chem* 1995;270:6425-6428.
77. **An B, Dou QP.** Cleavage of retinoblastoma protein during apoptosis: an inerleukin 1b-converting enzyme-like protease as candidate. *Cancer Res.* 1996;56:438-442.
78. **Na S, Chuang TH, Cunninham A, Turi TG, Hanke JH, Bockoch GM, Danley DE.** D4-GDI, a substrato of CPP32, is proteolyzed during Fas-induced apoptosis. *J Bio Chem* 1996;271:11209-11213.
79. **Rodríguez I, Matsura K, Ody C, Nagata SY, Vasalli P.** Systemic injections of a tripeptide inhibits the intracellular activation of CPP 32-like proteases *in vivo* and fully protects mice against Fas-mediated fulminant liver destruction and death. *J Exp Med* 1996;184:2067-2072.
80. **Fisher DE.** Apoptosis in cancer therapy: raising the threshold. *Cell* 1994;78:539-542.
81. **Mairesse N, Horman S, Mosselmans R, Galand P.** Antisense inhibition of the 27 kDa heat shock protein production affects growth rate and cytoeskeletal organization in MCF-7 cells. *Cell Biol Int* 1996;20:205-212.
82. **Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, Altieri DC.** Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem* 1998;273:11177-11182.
83. **Reed JC.** Promise and problems of bcl-2 antisense therapy (editorial; comment). *J. Natl. Cancer Inst.* 1997;89:988-990.
84. **Webb A, Cunningham D, Cotter F, Clarke PA, di Stefano F, Ross P, Corbo M, Dzicwanowska Z.** BCL-2 antisense therapy in Patiens with non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 1997;349:1137-1141.

