

Cytoskeletal and nuclear changes during apoptosis

Citation for published version (APA):

van Engeland, M. (1999). *Cytoskeletal and nuclear changes during apoptosis*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19991119me>

Document status and date:

Published: 01/01/1999

DOI:

[10.26481/dis.19991119me](https://doi.org/10.26481/dis.19991119me)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

8

Summary & general discussion

Contents

- 8.1 Working hypothesis
- 8.2 Cytoskeletal changes
- 8.3 Nucleoskeletal alterations
- 8.4 DNA degradation
- 8.5 Implications for the understanding and treatment of diseases
- 8.6 References

Apoptosis is a physiological mechanism of cell death used by multicellular organisms to control cell number during development and morphogenesis, and to eliminate infected, mutated or damaged cells during adulthood (Steller, 1995; Vaux and Korsmeyer, 1999). When a cell receives a 'death signal', an intracellular death program is activated, which leads to coordinated proteolysis of cyto- and nucleoskeletal proteins, DNA degradation and membrane alterations. Subsequently, the dying cell is eliminated by phagocytes. In **chapter 1** of this thesis, the concept of apoptosis is reviewed, while **chapter 2** provides an overview of the molecular mechanisms of apoptosis. In the studies described in **chapters 5, 6** and **7**, cytoskeletal and nuclear changes during apoptosis in human tumor cell lines are examined. For reliable detection of apoptotic cells, the annexin V-affinity assay was used and optimized for detection of apoptosis in adherent cells (**chapters 3** and **4**).

8.1 Working hypothesis

The working hypothesis of this study was that cleavage and reorganization of cyto- and nucleoskeletal proteins and DNA during apoptosis is not only dependent on activation of enzymes that act on specific cleavage sites in these constituents, but also on the supramolecular organization of the cytoplasm and the nucleus.

The studies described in this thesis show the behavior of cyto- and nucleoskeletal changes during apoptosis in relation to alterations in the plasma membrane and the genome, respectively. These studies indicate that cleavage of specific cyto- and nucleoskeletal proteins and specific DNA sequences during apoptosis is dependent on cellular and nuclear organization, but also that different apoptosis events are not causally related to each other.

8.2 Cytoskeletal changes

In **chapter 5** we show that of the cytoskeletal proteins, the intermediate filament proteins cytokeratin and vimentin are clustered into dot-like aggregates in the cytoplasm and are proteolytically cleaved during apoptosis. However, only a part of the cytokeratin and vimentin proteins is proteolytically cleaved, pointing to a differential cleavage of these proteins. This can be explained by protection of the cleavage site for proteolysis or limited enzyme activity. Actin and tubulin proteins on the other hand are present as aggregated filaments in the apoptotic bodies. In contrast to other studies (Mashima et al., 1995; Mashima et al., 1997; Kayalar et al., 1996; Brown et al., 1997; Guénal et al., 1997) we could not detect proteolytic degradation of actin by western blotting, possibly because the antibody we used cannot detect cleaved actin fragments because of modification or destruction of the epitope.

This phenomenon is also observed using different lamin antibodies (**chapter 6**). Another plausible explanation may be that actin cleavage during apoptosis is a differentiation-related, cell type-dependent process.

During differentiation, the supramolecular organization of a cell changes significantly, which may lead to protection of substrates for caspase cleavage by interactions with other cellular constituents or by post-translational modifications. This is in agreement with recent observations that poly(ADP-ribose)polymerase (PARP), a protein which is extensively cleaved in most cell types, is not cleaved during hepatocyte apoptosis, despite high levels of caspase-3 like activity (Jones et al., 1999). Thus, our results and reports in literature indicate that cleavage of caspase substrates is dependent on the supramolecular organization of the cell, which changes during cellular differentiation.

Because it was speculated that disintegration of cytoskeletal filaments, which interact with the plasma membrane, results in loss of plasma membrane asymmetry (Buja et al., 1993; Verhallen et al., 1987), we investigated whether the interactions between the plasma membrane and the cytoskeleton influence each others reorganization during apoptosis. We show that cytoskeletal reorganization and PS exposure are not causally related. Cytokeratin rearrangement does not per se lead to PS exposure, while PS exposure does not cause cytoskeleton reorganization (**chapter 5**). These observations indicate that different events of the apoptotic cascade can be uncoupled, which is confirmed by other studies. Hampton et al. (1996) reported that PS exposure in cell lines can be inhibited, while other apoptotic events, such as budding, cell shrinkage, nuclear fragmentation and fodrin cleavage, do occur. Uncoupling of apoptotic events indicates that these can be used independently from each other, for example during processes such as cellular remodeling, when only part of the apoptotic cascade is used. This is consistent with the observation that blood platelets and erythrocytes, which are derived from precursor cells undergoing (part of) the apoptotic cascade (Zauli et al., 1997; Vanags et al., 1997), do not expose PS during the maturation process.

8.3 Nucleoskeletal alterations

In addition to a partial degradation of cytoskeletal proteins, we also observed differential breakdown of nuclear lamins during apoptosis (**chapter 6**). A- and B-type lamins form a nuclear lamina underlying the inner nuclear membrane. While B-type lamins are almost completely cleaved, part of the A-type lamins remains uncleaved, at least until 6 hours after induction of apoptosis by roscovitine. Different timing of cleavage of A- and B-type lamins can be explained by the differential activation of two lamin cleaving enzymes, i.e. caspase-6 and the nuclear scaffold associated protease (Zhivotovsky et al., 1997). However, partial degradation of A- type lamins themselves, points to a limited accessibility of A-type lamins for caspase-6.

A population of apoptotic cells with an intranuclear A-type lamin scaffold structure is observed, most probably representing the lamin-skeleton that is observed by Hozak et al. (1995) by immuno-electron microscopy. We speculate that the intranuclear lamin A-network is not available for cleavage by proteases due to strong interactions with chromatin and/or other constituents of the nuclear matrix. Post-translational modifications of intranuclear A-type lamins, which might determine if a lamin molecule is

located at the nuclear periphery or in the nuclear matrix (Hozak et al., 1995), may also explain resistance of A-type lamins for caspase cleavage.

8.4 DNA degradation

In analogy with resistance of part of the nuclear matrix proteins to proteolysis during apoptosis, also DNA sequences, which are thought to be associated with the nuclear matrix, are resistant to the apoptotic nuclease during apoptosis (**chapter 7**). Although the majority of unique and repetitive DNA sequences is fragmented during apoptosis, the telomere repeat sequence TTAGGG is still detectable using a fluorescent in situ hybridization assay. To explain this phenomenon it must be kept in mind that this DNA sequence is a component of the nuclear matrix and is thus tightly connected with other nuclear matrix constituents, amongst which intranuclear A-type lamins, protecting this sequence from the apoptotic endonuclease. This implicates that other DNA sequences, which are present in the nuclear matrix and have interactions with matrix proteins, e.g. transcriptionally active DNA and replicating DNA, might also be protected.

8.5 Implications for the understanding and treatment of diseases

The studies described in this thesis suggest a differential degradation of cytoskeletal and nuclear constituents during apoptosis, indicating that the degradation phase of apoptosis is completed in a tightly controlled manner. Furthermore, these studies suggest that different events of the apoptotic machinery, such as cytoskeleton reorganization and PS exposure can be uncoupled. These observations indicate that parts of the apoptotic cascade can be used independently from each other during cellular and nuclear remodeling. It is recently reported that downstream caspases play a role in cytoskeletal and nuclear remodeling during differentiation, cell migration (Weil et al., 1999; Braun et al., 1999; Watanabe et al., 1999) and presumably also during cell division.

The observations that caspases play a role in cellular processes, other than apoptosis, has implications for the treatment of neurodegenerative diseases, stroke, bacterial meningitis, cardiovascular disorders and cancer.

The use of caspase-inhibitors for the prevention and treatment of neurodegenerative and cardiovascular diseases is examined in animal studies.

Although some studies show a positive effect of these inhibitors in preventing cellular damage (Schierle et al., 1999), it is still to be established whether the rescued cells are functional. Since not only apoptosis is inhibited by the application of such drugs, but also remodeling processes may be hindered, processes such as cell migration (Braun et al., 1999), cell differentiation and cell division may be influenced.

On the other hand, the majority of the cancer therapies is based on killing tumor cells by apoptosis. However, many tumor cells have become resistant for induction of apoptosis in response to chemotherapeutic agents due to modifications or overexpression of apoptosis inhibitors that act upstream in the apoptotic cascade. This explains the failure of therapies based on induction of apoptosis by DNA damage. Nowadays, ways to restore the ability of tumor cells to undergo apoptosis in response to chemotherapeutic agents

are being investigated. Furthermore, activation of caspases leads directly to apoptosis and circumvents the need for upstream caspase activators. However, caspase activation may lead to changes in the cell's interior (the cytoskeleton) which may then increase the flexibility and migratory potential of the cells, i.e. characteristics of metastasizing cells. Metastasizing cells escape from primary tumors and transverse basal membranes and blood vessels, thereby often changing shape. Furthermore, tumors are often vascularized, which involves migration of endothelial cells. Immobilization of tumor cells and endothelial cells by means of inhibition of downstream caspases may prevent tumor vascularization and metastasizing of the tumor. The drawback of this intervention, namely inhibition of tumor cell apoptosis, may be circumvented by inducing cell death in tumor cells via caspase-independent routes.

In addition, massive induction of apoptosis, as a response to chemotherapeutic agents, without effective elimination of the 'apoptotic waste' by phagocytosing cells exposes the immune system to apoptosis generated self-antigens (Piacentini and Collizi, 1999). As a result, autoimmune responses are often directed against proteins located in the apoptotic bodies, which often represent nucleoskeletal proteins. Furthermore, antibodies directed against DNA and PS are generated (Casiola-Rosen et al., 1994; Casiola-Rosen et al., 1996; Utz et al., 1998).

Thus, during treatment of neurodegenerative diseases, cardiovascular disorders and cancer by means of caspase activation or caspase inhibition, one should be cautious for side effects involving remodeling.

8.6 References

- Braun, J.S., Novak, R., Herzog, K.H., Bodner, S.M., Cleveland, J.L. and Tuomanen, E.I. 1999. Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis. *Nat. Med.* 5:298-302.
- Brown, S.B., Bailey, K. and Savill, J. 1997. Actin is cleaved during constitutive apoptosis. *Biochem. J.* 323:233-237.
- Buja, L.M., Eigenbrodt, M.L. and Eigenbrodt, E.H. 1993. Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1993: 117:1208-1214.
- Casciola-Rosen, L.A., Anhalt, G. and Rosen, A. 1994. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J. Exp. Med.* 179:1317-1330.
- Casciola-Rosen, L., Rosen, A., Petri, M. and Schliessel, M. 1996. Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:1624-1629.
- Guéna, I., Risler, Y. and Mignotte, B. 1997. Down-regulation of actin genes precedes microfilament network disruption and actin cleavage during p53-mediated apoptosis. *J. Cell Sci.* 110:489-495.
- Hampton, M.B., Vanags, D.M., Porn-Ares, M.I. and Orrenius, S. 1996. Involvement of extracellular calcium in phosphatidylserine exposure during apoptosis. *FEBS Lett.* 399:277-282.
- Hozak, P., Sasseville, A.M., Raymond, Y. and Cook, P.R. 1995. Lamin proteins form an internal nucleoskeleton as well as a peripheral lamina in human cells. *J. Cell Sci.* 108:635-644.
- Jones, R.A., Johnson, V.L., Hinton, R.H., Poirier, G.G., Chow, S.C. and Kass, G.E. 1999. Liver poly(ADP-ribose)polymerase is resistant to cleavage by caspases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256:436-441.

- Kayalar, C., Ord, T., Testa, M.P., Zhong, L.T. and Bredesen, D.E. 1996. Cleavage of actin by interleukin 1 β -converting enzyme to reverse DNase I inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:2234-2238.
- Mashima, T., Naito, M., Fujita, N., Noguchi, K. and Tsuruo, T. 1995. Identification of actin as a substrate of ICE and ICE-like protease and involvement of an ICE-like protease but not ICE in VP-16-induced U937 apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 217:1185-1192.
- Mashima, T., Naito, M., Noguchi, K., Miller, D.K., Nicholson D.W. and Tsuruo, T. 1997. Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis. *Oncogene.* 14:1007-1012.
- Piacentini, M. and Colizzi, V. 1999. Tissue transglutaminase: apoptosis versus autoimmunity. *Immunology Today.* 20:130-134.
- Schierle, G.S., Hansson, O., Leist, M., Nicotera, P., Widner, H. and Brundin, P. 1999. Caspase inhibition reduces apoptosis and increases survival of nigral transplants. *Nat. Med.* 5:97-100.
- Steller, H. 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science.* 267:1445-1449.
- Utz, P.J. and Anderson, P. 1998. Post-translational protein modifications, apoptosis and the bypass of tolerance to autoantigens. *Arthritis Rheum.* 41: 1152-1160.
- Vanags, D.M., Orrenius, S. and Aguilar-Santelises, M. 1997. Alterations in Bcl-2/Bax protein levels in platelets form part of an ionomycin-induced process that resembles apoptosis. *Br. J. Haematol.* 99:824-831.
- Vaux, D.L. and Korsmeyer, S.J. 1999. Cell death in development. *Cell.* 96:245-254.
- Verhallen, P.F.J., Bevers, E.M., Confurius, P. and Zwaal, R.F.A. 1987. Correlation between calpain-mediated cytoskeletal degradation and expression of platelet procoagulant activity. A role for the platelet membrane skeleton in the regulation of membrane lipid asymmetry. *Biochim. Biophys. Acta* 903:206-217.
- Watanabe, Y. and Akaike, T. 1999. Possible involvement of caspase-like family in maintenance of cytoskeletal integrity. *J. Cell. Physiol.* 179:45-51.
- Weil, M., Raff, M.C. and Braga, V.M. 1999. Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Curr. Biol.* 9:361-364.
- Zauli, G., Vitale, M., Falcieri, E., Gibellini, D., Bassini, A., Celeghini, C., Columbaro, M and Capitani, S. 1997. In vitro senescence and apoptotic cell death of human megakaryocytes. *Blood* 90:2234-2243.
- Zhivotovsky, B., Gahm, A. and Orrenius, S. 1997. Two different proteases are involved in the proteolysis of lamin during apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233:96-101.

Samenvatting

In gezonde weefsels van meercellige organismen bestaat een nagenoeg perfecte balans tussen celproliferatie en celdood. Celdood kan plaatsvinden via twee verschillende routes, te weten apoptose en necrose. Necrose is een vorm van celdood die veroorzaakt wordt door acute beschadiging van de cel, bijvoorbeeld als gevolg van ischemie of chemische agentia. Deze beschadiging interfereert met de ATP synthese van de cel, waardoor de cel opzwelt en de celmembraan lek raakt. De daaropvolgende desintegratie van de cel veroorzaakt een ontstekingsreactie in het omliggende weefsel. Als reactie op specifieke interne en externe signalen kan een cel 'zelfmoord plegen'. Dit proces van geprogrammeerde celdood wordt apoptose genoemd en wordt beschouwd als een fysiologisch fenomeen omdat deze vorm van celdood een belangrijke rol speelt tijdens de embryonale ontwikkeling, het elimineren van beschadigde cellen, de verdediging tegen virale infecties en het in stand houden van de organisatie van een weefsel. Tijdens apoptose wordt een cel stapsgewijs 'gedemonteerd' en verpakt als kleine celfragmenten omgeven door een celmembraan.

In **hoofdstuk 1** worden de verschillen tussen apoptose en necrose besproken en wordt uitgelegd dat het proces van apoptose in 3 fasen verloopt, nl. 1) de inductiefase waarin de cel het signaal krijgt om in apoptose te gaan, 2) de executiefase waarin de enzymen worden geactiveerd die de cel 'demonteren' en 3) de degradatiefase waarin structurele eiwitten, apoptose-inhiberende eiwitten, stress respons eiwitten en DNA worden afgebroken. Het resultaat van bovengenoemde processen is een gestructureerde afbraak en verpakking van de apoptotische cel zodat deze uiteindelijk gefagocyteerd kan worden door naburige cellen of door fagocyten. Verder wordt in hoofdstuk 1 de werkhypothese van deze studie geponeerd, nl. dat de supramoleculaire organisatie van het cytoskelet en het kernskelet als ook die van het DNA invloed heeft op de afbraak van deze componenten tijdens apoptose.

In **hoofdstuk 2** worden de recente inzichten omtrent de inductie van apoptose, de signaal transductie routes en de degradatie fase van apoptose op een rij gezet. Verder worden de eiwitten die een belangrijke rol spelen in het proces van apoptose, zoals caspases en caspase-regulerende eiwitten besproken. De gevolgen van caspase-activatie voor het cytoskelet, de kern en de celmembraan van de individuele cel komen tevens aan de orde.

Om het proces van apoptose goed te kunnen bestuderen is het van belang om apoptotische cellen specifiek en gevoelig te kunnen identificeren. Apoptotische cellen kunnen worden herkend aan de hand van karakteristieke morfologische veranderingen, zoals chromatine aggregatie en de vorming van apoptotische celfragmenten. Verder kunnen ze worden geïdentificeerd aan de hand van apoptose-specifieke, biochemische veranderingen zoals expressie van apoptose geassocieerde eiwitten, proteolyse van specifieke substraten en de vorming van specifieke neo-epitopen.

In **hoofdstuk 3** wordt een overzicht gegeven van de annexine V methode om apoptose te detecteren aan de hand van veranderingen in de verdeling van verschillende fosfolipiden over de celmembraan. In niet-apoptotische cellen zijn de fosfolipiden van de celmembraan asymmetrisch verdeeld over de dubbele lipidenlaag. Fosfatidylcholine en sphingomyeline zijn voornamelijk aanwezig aan de buitenzijde van de dubbellaag, terwijl fosfatidylserine (PS) voornamelijk aan de cytoplasmatische zijde van de bilaag is gelokaliseerd.

Deze asymmetrie wordt in stand gehouden door een aminofosfolipiden translocase, die de aminofosfolipiden, en in het bijzonder PS van buiten naar binnen transporteert. Verder wordt de lokalisatie van PS in de cytoplasmatische zijde van de bilaag ook gehandhaafd door associaties van PS met annexines, polyamines en membraanskelet-eiwitten zoals fodrine. Tijdens het proces van apoptose komt PS al vroeg voor op de buitenkant van de bilaag. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door remming van de translocase en activatie van een scramblase. Verder is het tevens mogelijk dat proteolyse van fodrine door caspase-3 bijdraagt aan de externalisatie van PS. Expositie van PS op de buitenkant van de celmembraan is een teken voor specifieke cellen, die op hun beurt een PS-receptor op hun celmembraan bezitten, om de apoptotische cel te fagocyteren. PS externalisatie tijdens apoptose is een mechanisme dat door de evolutie heen behouden is gebleven en dat is aangetoond in planten-, insecten-, en zoogdiercellen. PS expositie kan *in vivo* en *in vitro* gedetecteerd worden met behulp van annexine V. Annexine V is een eiwit dat zeer specifiek aan PS kan binden in aanwezigheid van calcium. Door een label te koppelen aan annexine V kan PS expositie in apoptotische cellen bestudeerd worden. Dit gelabelde annexine V bindt aan geëxternaliseerd PS op de apoptotische cel. Het kan niet binden aan niet-apoptotische cellen, waar PS alleen aan de cytoplasmatische kant van de bilaag is gelokaliseerd, omdat de fosfolipiden bilaag niet permeabel is voor annexine V. Echter, in necrotische cellen is de cytoplasmatische kant van de bilaag wel bereikbaar voor annexine V omdat de celmembraan permeabel is geworden. Een cel membraan impermeabele DNA kleurstof, zoals propidium jodide (PI) dient derhalve gebruikt te worden in combinatie met annexine V om onderscheid te maken tussen necrotische en apoptotische cellen. Voor cellen die gekweekt worden in suspensie is het relatief gemakkelijk om PS expositie te detecteren met annexine V. Echter, het detecteren van PS expositie in hechtende cellen is complexer. Deze hechtende cellen kunnen onmiddellijk na binding van fluorochroom-gelabeld annexine V worden geanalyseerd met behulp van een fluorescentie microscoop. Om een celsuspensie te verkrijgen, bijvoorbeeld voor het analyseren van cellen met behulp van de flow cytometer, moeten deze cellen los gemaakt worden van de kweekfles worden, waarbij het gebruik van enzymen zoals trypsine en EDTA kan interfereren met het betrouwbaar detecteren van PS expositie. Om dit probleem te omzeilen is een methode ontwikkeld om PS expositie te detecteren in hechtende cellen, door de kweek eerst te labelen met annexine V en daarna de cellen te oogsten door ze van de bodem van de kweekfles te schrapen (**hoofdstuk 4**). Hierdoor worden echter wel een aantal cellen beschadigd. Door een combinatie van annexine V en PI te gebruiken wordt het technisch mogelijk om vitale, apoptotische, necrotische en beschadigde cellen van elkaar te onderscheiden en te kwantificeren via flow cytometrie. Omdat in de literatuur gespeculeerd werd dat expositie van PS aan de buitenzijde van de bilaag veroorzaakt zou kunnen worden door afbraak van cytoskelet eiwitten tijdens apoptose is een methode ontwikkeld om PS expositie en cytoskelet veranderingen gelijktijdig te detecteren in cellen, zodat deze hypothese getest kon worden (**hoofdstuk 5**). Na inductie van apoptose werden cellen in kweek gelabeld met annexine V, vervolgens gefixeerd met methanol en tenslotte de cytoskelet eiwitten gedetecteerd met behulp van antilichamen. Er werd gevonden dat de intermediaire filament eiwitten (cytokeratines en vimentine) uit elkaar vallen tot kleine fragmenten

tijdens apoptose, terwijl actine en tubuline opgeslagen worden als geaggregeerde filamenten in de apoptotische celfragmenten. Verder hebben we laten zien dat cytokeratines en vimentine proteolytisch worden geknipt tijdens apoptose, terwijl actine en tubuline intact blijven. Dit in tegenstelling tot enkele artikelen in de literatuur die rapporteren dat actine wel gedegradeerd wordt tijdens apoptose. Deze experimenten lieten ook zien dat aggregatie van cytokeratin filamenten en PS expositie gelijktijdig plaatsvinden tijdens apoptose, maar dat deze gebeurtenissen niet causaal aan elkaar gerelateerd zijn.

Om veranderingen in het kernskelet te bestuderen tijdens apoptose werd gekozen voor de lamine-eiwitten, die een lamina vormen onder de kernmembraan. In zoogdiercellen komen twee soorten lamines voor, nl. de A-type lamines, waar lamine A en lamine C onder vallen, en B-type lamines, waar lamine B1 en lamine B2 toe behoren. Tijdens apoptose worden A- en B-type lamines geknipt door caspase-6. In **hoofdstuk 6** is het gedrag van de verschillende lamine-eiwitten tijdens apoptose bestudeerd door gebruik te maken van immunocytochemie, flow cytometrie en western blotting. In een apoptotische cel blijken A-type lamines minder extraheerbaar te zijn dan B-type lamines. Verder hebben we gezien dat een deel van de A-type lamines niet geknipt wordt, dit in tegenstelling tot B-type lamines die bijna geheel geknipt worden tijdens apoptose. Ook werd een populatie apoptotische cellen aangetroffen die een A-type lamine netwerk vertoonden dat gelokaliseerd was tussen het gecondenseerde DNA. Deze resultaten kunnen verklaard worden door het verschil in lokalisatie van A- en B-type lamines in de kern. B-type lamines bevinden zich voornamelijk aan de periferie van de kern en zijn dus gemakkelijk toegankelijk voor caspase-6. A-type lamines vormen naast een lamina ook nog een intranucleair netwerk, dat onderdeel is van de kernmatrix. Deze intranucleaire A-type lamines zijn door hun lokalisatie waarschijnlijk onbereikbaar voor caspase-6 en blijven hierdoor intact.

Deze resultaten wijzen dus op een differentiële afbraak van lamine-eiwitten tijdens apoptose, veroorzaakt door een verschil in de lokalisatie van deze eiwitten in de kern.

In **hoofdstuk 7** wordt gerapporteerd dat ook verschillende chromosomale regio's differentiële worden afgebroken tijdens apoptose. Door gebruik te maken van de in situ hybridisatie techniek kon worden aangetoond dat tijdens apoptose totale chromosoom territoria worden afgebroken, evenals de centromeer, sub-centromeer en subtelomeer DNA sequenties. Deze worden egaal verdeeld over het gecondenseerde DNA. Telomeer DNA daarentegen blijft intact en is detecteerbaar als geclusterde signalen aan het oppervlak of in het centrum van het gecondenseerde DNA. Een verklaring voor deze differentiële DNA degradatie kan zijn dat het telomeer DNA, dat interacties aangaat met de kernmatrix, hierdoor beschermd is tegen afbraak door nucleases terwijl de andere bestudeerde chromosoom regio's beter bereikbaar zijn voor nucleases.

Concluderend kan worden gezegd dat de resultaten van deze studie wijzen in de richting van een differentiële afbraak van cyto- en kernskelet eiwitten, alsook van DNA tijdens apoptose en dat er aanwijzingen zijn verkregen dat deze differentiële afbraak veroorzaakt wordt door de supramoleculaire organisatie van de cel (**hoofdstuk8**).