



FACULTEIT GENEESKUNDE EN
GEZONDHEIDSWETENSCHAPPEN

Onderzoeksstage

*De rol van intercellulaire communicatie in
cardiovasculaire aandoeningen na blootstelling
aan lage stralingsdosis*

Hannah DOBBELAERE

1^{ste} Master in de Biomedische wetenschappen

Promoter : *Dr Elke Decrock, UGent*

Co-promoter : *Dr An Aerts, SCK•CEN*



Academiejaar 2013-2014

1. Probleemstelling

Hart- en vaatziekten (CVD) zoals pericarditis, coronaire aandoeningen en congestief hartfalen vormen de grootste doodsoorzaak in de huidige Westerse samenleving. De invloed van straling op het ontstaan van CVD is reeds aangetoond bij hoge dosissen (> 5 Gy) [1]. Zoals gezien in de Mayak cohortstudie, is er echter toenemende epidemiologische evidentie dat CVD ook kan optreden in respons op lagere dosissen. Hierbij werden 12 585 werknemers van het nucleaire centrum 'Mayak Plutonium Association' in Rusland opgevolgd van 1948 tot december 2010. De gemiddelde cumulatieve externe dosis voor mannen en vrouwen was respectievelijk 0.91 ± 0.95 Gy en 0.65 ± 0.75 Gy. Een significante stijging in coronaire aandoeningen werd waargenomen ($ERR/Gy = 0.11$; 00049 - 0.168) [2]. Ook bij 2168 borstkankerpatiënten in Zweden en Denemarken die tussen 1958 en 2001 behandeld werden met radiotherapie (gemiddelde dosis hart 4.9 Gy; 0.03 - 27.72 Gy), steeg de kans op het krijgen van CVD met 7.4%/Gy. Er werd hierbij geen duidelijke grens waargenomen waaronder geen risico werd geobserveerd [3]. Het huidige systeem voor radioprotectie gaat er echter van uit dat onder een bepaalde grenswaarde (0.5 Gy) ioniserende straling geen significante (niet-kanker) effecten teweeg brengt. Bijkomend radiobiologisch onderzoek is dus noodzakelijk om meer duidelijkheid te scheppen.

Er dient onderscheid gemaakt te worden tussen de stralings-geïnduceerde effecten waargenomen op grote en kleine bloedvaten. Macrovasculaire schade zou immers vooral leiden tot een versnelling van de leeftijdsgebonden atherosclerose. Dit in tegenstelling tot microvasculaire beschadiging die hoofdzakelijk een reductie van de capillaire densiteit als gevolg heeft, wat kan resulteren in congestief hartfalen. Waarschijnlijk werken beide effecten samen om CVD te veroorzaken [4]. Er is evidentie dat het endotheel, dat de binnenste laag vormt van het cardiovasculair systeem, betrokken is bij de ontwikkeling van deze stralings-geïnduceerde CVD bij hoge dosissen [5].

Onderzoek van de co-promoter toonde aan dat de moleculaire en cellulaire processen zoals DNA schade en apoptose echter ook al bij lage dosissen (< 0.5 Gy) optreden in endotheelculturen. Hierbij werden bij lage dosissen (0.05, 0.1 en 0.5 Gy) relatief meer dubbelstrengige breuken geobserveerd dan bij hoge dosis (5 Gy) [6]. Dit kan mogelijk verklaard worden door het zogenaamde 'bystander effect', wat vooral bij lage dosis een relatief grote rol speelt. Het bystander effect houdt de intercellulaire propagatie in van schadelijke biologische effecten van rechtstreeks bestraalde naar naburige niet-bestraalde cellen. Bystander effecten manifesteren zich als een verscheidenheid aan biologische eindpunten waaronder DNA schade [7], transformaties [8,9] en celdood [10]. Intercellulaire communicatie wordt ondermeer bewerkstelligd via gap junctiekanalen, die opgebouwd zijn uit twee tegenoverstaande hemikanalen. Hemikanalen zijn op hun beurt samengesteld uit zes transmembranaire connexine (Cx) eiwitten. Momenteel zijn er 21 humane connexine eiwitten bekend, die benoemd zijn volgens hun moleculair gewicht. Endotheelcellen bevatten Cx37, Cx40 en Cx43 [11]. Gap juncties laten de passieve diffusie toe van ionen en kleine (< 1.2 kDa), hydrofiele moleculen zoals adenosine trifosfaat (ATP), glucose en secundaire boodschappermoleculen waaronder inositol trifosfaat (IP_3) [12]. Enkelvoudige hemikanalen daarentegen laten de uitwisseling toe van kleine moleculen tussen het cytoplasma en het extracellulaire milieu. Hemikanalen dragen bij tot paracrine communicatie door het loslaten van kleine moleculen zoals ATP, nicotinamide adenine dinucleotide, glutamaat, glutathion en prostaglandine E2. In normale fysiologische omstandigheden zijn hemikanalen meestal aanwezig in de plasmamembraan in de gesloten toestand. Via verschillende stimuli zoals membraandepolarisatie, een stijging in $[Ca^{2+}]_{intracellulair}$, een afname in $[Ca^{2+}]_{extracellulair}$,... kunnen ze geopend worden [13]. Recent werd aangetoond dat γ -rays tevens hemikanalen kunnen openen [14]. Naast gap junctionele communicatie, draagt ook paracrine communicatie bij tot het bystander effect. De bestraalde cellen kunnen immers factoren

loslaten die naar naburige cellen gaan diffunderen en ook daar deze effecten kunnen induceren [15].

De signaalmoleculen die bystander effecten teweeg brengen zijn echter nog niet gekend. De hypothese heerst dat reactieve zuurstofradicalen (ROS) die geproduceerd worden door blootstelling aan ioniserende straling, bijdragen tot de bystander effecten [15]. ROS hebben echter een kort halfleven en kunnen slechts over beperkte afstand diffunderen, waardoor hun rol als bystander boodschapper gelimiteerd is. Aangezien ROS apoptose kunnen induceren [16], werden deze als belangrijke spelers in de ontwikkeling van atherosclerose geïdentificeerd [17]. De apoptotische celdood zal ervoor zorgen dat de membraan van de endotheliale cellen vesikels en uitstulpingen vertonen die geoxideerde fosfolipiden bevatten. Deze bevorderen adhesie van monocytten aan het endotheel, wat de eerste stap is in het ontstaan van een atherosclerotische plaque [18]. Daarnaast kunnen ROS heel wat pathways beïnvloeden die kunnen gelinkt worden aan de ontwikkeling van CVD waaronder mitochondriale dysfunctie en senescentie [19, 20].

Onderzoek van de promotor heeft aangetoond dat zowel gap juncties als hemikanalen een belangrijke rol spelen in bystander celdood, geïnduceerd door een lokale toediening van de pro-apoptotische molecule Cytochroom C, met hierin een essentiële rol voor IP_3 [21]. IP_3 is een gap junctie-permeabele molecule die bindt op zijn receptor ter hoogte van het endoplasmatisch reticulum. Dit resulteert in een vrijstelling van Ca^{2+} in het cytoplasma, waarbij het onmiddellijk wordt opgenomen in de mitochondriën. Hoge mitochondriale accumulatie van Ca^{2+} kan uiteindelijk resulteren in een toename van de ROS productie en tot apoptose leiden, wat ondermeer werd aangetoond in de context van ioniserende straling [22, 23]. In dit onderzoek wordt dan ook de hypothese getest dat IP_3/Ca^{2+} signalisatie aan de basis ligt van de bystander effecten en dat dit kan resulteren in een amplificatie van ROS in de bystander cellen.

2. Vraagstelling

Het doel van deze studie is bystander responsen (DNA schade en celdood) te bestuderen in endotheelcellen blootgesteld aan lage dosissen van ioniserende straling. Hierbij zal de rol van gap juncties en hemikanalen uitvoerig worden onderzocht, alsook de IP_3/Ca^{2+} signalisatiepathway. Onderzoek dat inzicht kan bieden in de aard van de signaalmoleculen en de onderliggende mechanismen waarmee bystander effecten optreden, kan leiden tot de ontwikkeling van preventieve maatregelen om de nadelige effecten van ioniserende straling te reduceren.

3. Projectbeschrijving

3.1 Algemene beschrijving

Het onderzoek zal uitgevoerd worden op de primaire *human umbilical vein* endotheelcellen (HUVEC) en de hiervan afgeleide geïmmortaliseerde EA.hy926 celculturen. Er wordt gekozen voor dit type endotheelcellen daar deze karakteristieken van zowel grote bloedvaten als capillairen vertonen. Rechtstreekse DNA schade en apoptose werd reeds door de co-promotor gekarakteriseerd na bestraling met 0.05, 0.1 en 0.5 Gy [4].

Eerst zal de aanwezigheid van de endotheliale Cxs (Cx37, Cx40 en Cx43) nagaan worden via immunocytochemie en Western Blot. Vervolgens wordt de gap junctionele koppeling (GJIC) onderzocht aan de hand van de diffusie van een fluorescente kleurstof (< 1.5 kDa) doorheen gap juncties via de techniek *scrape loading and dye transfer* (SLDT). Functionele hemikanalen worden onderzocht via de opname van een fluorescente kleurstof (< 1.5 kDa) uit het extracellulair milieu doorheen open hemikanalen. De celculturen zullen vervolgens blootgesteld worden aan lage dosissen X-rays (0.1, 0.2 en 0.5 Gy). Hierbij zal enkel een kleine zone van de cultuur rechtstreeks bestraald worden, waarna DNA schade en celdood in de bestraalde en aanpalende niet-bestraalde zone zal bestudeerd worden op verschillende

tijdstpunten na bestraling. De DNA schade, in de vorm van dubbelstrengige DNA breuken, zal via immunocytochemie van de gefosforyleerde H2AX histonen (γ H2AX) gevisualiseerd worden. Celdood zal worden onderzocht via caspase 3 en Annexine V/ Propidium Iodide (PI) kleuring. Door de vergelijking tussen de bestraalde en niet-bestraalde cellen kan het bystander effect worden geëvalueerd. In aan- en afwezigheid van connexine blokkers zoals de farmacologische blokker Carbenoxolone of Cx mimetische peptides kan worden nagegaan of Cxs een rol spelen in een mogelijk bystander effect. Cx mimetische peptides bootsen een sequentie na van het Cx eiwit. Peptides die een deel van de extracellulaire lussen nabootsen (bv Gap 26 en 27) inhiberen hemikanalen na korte blootstelling (enkele min-6u), maar ook gap juncties na een langere blootstelling (24u). Voor Cx43 zijn peptides voorhanden die een deel van de intracellulaire lus nabootsen (bv Gap 19) die enkel hemikanalen inhiberen en geen gap juncties [24]. Ook de rol van de IP_3/Ca^{2+} signaaltransductieweg en de invloed van vrije zuurstofradicalen op de bystander effecten zullen worden bestudeerd. Dit zal worden verricht door het toepassen van moleculen die interfereren met de $IP_3/Ca^{2+}/ROS$ pathway: Xestospongin B (IP_3 receptor inhibitor), BAPTA-AM (intracellulaire Ca^{2+} chelator) en N-Acetyl-L-Cysteïne (ROS scavenger) [25].

3.2 Technische specificaties

3.2.1 Celcultuur

Ea.hy926 endotheliale cellen (ATCC, Molsheim Cedex, France) worden gegroeid in een 5% CO_2 incubator bij $37^\circ C$ in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), gesupplementeerd met 10% *foetal bovine serum* (FBS) en 1% penicilline/streptomycine (pen/strep). Cellen worden gezaaid in T25 flessen met een dichtheid van 500 000 cellen in 3 ml medium. HUVEC (ATCC) worden in cultuur gebracht in Medium 200, gesupplementeerd met 2% *Low serum growth supplement* (LSGS) en 1% pen/strep. Cellen worden gezaaid in T25 flessen met een dichtheid van 100 000 cellen in 3 ml medium. Het medium wordt om de twee dagen vervangen. Alle celcultuur benodigdheden worden aangekocht bij Life Technologies (Gent, België).

3.2.2 Studie van endotheliale connexines 37, 40 en 43 via immunofluorescentie

EA.hy926 cellen en HUVEC worden uitgezaaid op glazen coverslips (13 mm diameter) in 4-well platen, met een dichtheid van respectievelijk 50 000 en 35 000 cellen per coverslip, en gegroeid tot confluentie wordt bereikt. Cellen worden vervolgens gefixeerd in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, Bornem, België) gedurende 25 min op kamertemperatuur. Nadien worden de cellen gepermeabiliseerd in 0.2 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in *phosphate buffered saline* gesupplementeerd met Ca^{2+} en Mg^{2+} (PBSD+; Life Technologies) voor 10 min en vervolgens gedurende 30 min geïncubeerd met blokbuffer (2% Gelatine in PBSD+ + 0.05% Natriumazide (Sigma-Aldrich)). Hierna worden de cellen overnacht geïncubeerd bij $4^\circ C$ met het primaire konijn anti-Cx37 (Alpha Diagnostic, Texas, USA), geit anti-Cx40 (Santa Cruz, Heidelberg, Duitsland) en konijn anti-Cx43 (Sigma-Aldrich) antilichaam (Cx37 en Cx40: 1/50 en Cx 43: 1/2000 verdund in blokbuffer), gevolgd door 1u bij kamertemperatuur met een secundair geit anti-konijn (Cx37 en Cx43) of aap anti-geit (Cx40) antilichaam, gekoppeld aan Alexa 488 (1/500 verdund in blokbuffer, Life Technologies). In de laatste stap worden de nuclei gekleurd met $1 \mu g/ml$ 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich) in PBSD+ voor 10 min bij kamertemperatuur. De cellen worden vervolgens op draagglasjes ingebed met Vectashield inbedmiddel (VWR, Leuven, België). Na elke incubatiestap wordt 3 maal gewassen met PBSD+. Met behulp van het geautomatiseerde *BD pathway 435 imaging* toestel (40x objectief; Becton Dickinson Benelux, Erembodegem, België) worden microscopische beelden opgenomen.

3.2.3 Studie van endotheliale conexines 37, 40 en 43 via Western Blot

De cellen worden gegroeid in T75 flessen. Proteïnes worden geëxtraheerd met behulp van de *radioimmune precipitation assay* (RIPA) buffer (25 mM Tris pH 8.2, 0.5% NP-40, 0.5%

deoxycholaat, 5.5% β -glycerofosfaat, 1 mM dithiothreitol, 1% fosfatase-inhibitor cocktail 1, 1% fosfatase-inhibitor cocktail 2, 1% protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich); 50 mM NaCl (VWR); 0.1% sodiumdodecylsulfaat (SDS; Bio-Rad, Nazareth, België); 2% Mini EDTA-vrije protease-inhibitor cocktail-tablet (Roche, Vilvoorde, België)). Vervolgens worden de cellysaten 3x 10s bij een energie van 54 Hz gesoniceerd. De eiwitconcentratie wordt bepaald via de *Bio-Rad DC protein assay* (Bio-Rad) aan de hand van een *Bovine Serum Albumine* standaardcurve. Lysaten worden hierna gescheiden via elektroforese over een 4-15% *Criterion™ TGX Stain-Free™ Precast Gel* (Bio-Rad) en getransfereerd naar een nitrocellulose membraan (Sigma-Aldrich). Membranen worden nadien geïncubeerd gedurende 1u in blokbuffer (5% mager melkpoeder (Nestlé, Vevey, Zwitserland); 0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich) in Tris Buffered Saline (5 mM Tris (Sigma-Aldrich), 15 mM NaCl, pH 7.6)) en vervolgens overnacht bij 4°C met volgende antilichamen: konijn anti-Cx37 (1/250 in blokbuffer), geit anti-Cx40 (1/500 in blokbuffer), konijn anti-Cx-43 antilichamen (1/1000 in blokbuffer) of konijn anti- β -tubuline antilichaam als ladingscontrole (1/5000 in blokbuffer; Abcam, Cambridge, UK). Na 3 maal 5 min wassen in blokbuffer, wordt het corresponderende secundair alkalisch fosfatase-geconjugeerd anti-konijn of anti-geit IgG antilichaam (1/8000 in blokbuffer; Sigma-Aldrich) aangebracht gedurende minimaal 1u. Na 3 maal 5 min wassen met blokbuffer zonder melkpoeder, vindt de detectie plaats met behulp van de *nitro blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate* kit (Life Technologies), dat een substraat bevat voor alkalisch fosfatase.

3.2.4 Studie van de gap junctionele intercellulaire communicatie via SLDT

Cellen worden gezaaid in 4-well platen en gekweekt tot confluentie wordt bereikt. Ze worden eerst twee maal gewassen met Ca^{2+} -vrij *scrape loading and dye transfer* (SLDT) buffer (137 mM NaCl, 0.81 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5.55 mM D-glucose, 5.36 mM KCl (VWR); 25mM Hepes (Sigma-Aldrich), pH 7.4). Vervolgens wordt aan elke well SLDT buffer met Dextran-Rhodamine (100 μM ; 10 kDa, gap junctie-impermeabel; Life Technologies) en Lucifer Yellow (1mM; 457.25 Da, gap junctie-permeabel; Life Technologies) toegevoegd. Na 1 min incubatie wordt met behulp van een naald een lineaire scrape in de celcultuur aangebracht. Cellen beschadigd door de scrape nemen hierbij onmiddellijk de kleurstof op. Na opnieuw 3 min incubatie worden de cellen met *Hank's buffered salt solution-Hepes* (HBSS-Hepes; Life Technologies) gewassen. Na 15 min incubatie met Hoechst (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in HBSS-Hepes; 33342; Life Technologies) om de celkernen aan te kleuren wordt de verspreiding van de kleurstoffen nagegaan met behulp van een Nikon TE300 epifluorescentiemicroscoop (x10 objectief) uitgerust met een Nikon DS-Ri1 camera (Nikon Belux, Zaventem, België). Microscopische beeldjes (14 in totaal) worden opgenomen langs beide zijden van de scrape. Indien de cellen via GJIC gekoppeld zijn, zal men verspreiding van Lucifer Yellow vanuit de beschadigde naar naburige cellen kunnen detecteren. Deze volgt een exponentieel verloop, waaruit dan de spatiale constante ($1/K$), een maat voor de verspreiding en dus voor de GJIC, met behulp van het programma Prism 3.0 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA) kan worden afgeleid. Alle stappen gebeuren bij kamertemperatuur.

3.2.5 Studie van de activiteit van de hemikanalen via dye uptake

Cellen worden gezaaid in 4-well platen met een densiteit van 25 000 cellen per cm^2 . Ze worden eerst 3 maal gewassen met HBSS-Hepes buffer en vervolgens in Ca^{2+} en Mg^{2+} -vrije HBSS-Hepes gesupplementeerd met EGTA (137 mM NaCl, 5.55 mM D-glucose, 0.44 mM KH_2PO_4 , 0.18 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (VWR); 25 mM Hepes, 4.0 mM EGTA (Sigma-Aldrich); 5.36 mM KCl, pH 7.4). Vervolgens wordt aan elke well PI (2 mM) (Life Technologies) toegevoegd, opgelost in Ca^{2+} en Mg^{2+} -vrije buffer. Na 10 min incubatie worden de cellen 3 maal gewassen met HBSS-Hepes. Hierna wordt de kleurstof Hoechst toegevoegd (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), opgelost in HBSS-Hepes. Na 10 min wordt met behulp van het *BD pathway 435 imaging* toestel de opname van PI nagegaan. Hierbij worden 9 beeldjes (10x objectief) opgenomen op

verschillende posities in de well. Indien de cellen open hemikanalen bevatten, zal men de opname van PI kunnen detecteren. Dit wordt gekwantificeerd als het % PI positieve cellen ten opzichte van het totaal aantal cellen. Alle stappen gebeuren bij kamertemperatuur.

3.2.6 Bestraling

De endotheelcellen worden uitgezaaid in 4-well platen en zijn confluent op het tijdstip van bestraling. Bestraling wordt uitgevoerd met X-rays (220 kV, 13 mA, 57.44 mGy/s, 0.15 mm Cu filtratie) door middel van een Small Animal Radiation Research Platform (SARRP; samenwerking met Innovative Flemish in vivo Imaging Technology Lab, UGent). Een gelokaliseerde zone wordt bestraald met behulp van een 3x3 mm collimator. Een radiografische film (Gafchromic RTQA2; PEO Radiation Technology, Hoogstraten, België), gepositioneerd in de bodem van de 4-well plaat, wordt gebruikt om de exacte locatie van de bestraling te bevestigen.

3.2.7 Studie naar DNA schade en apoptose via respectievelijk γ H2AX en caspase 3 analyse

Cellen worden op verschillende tijdstippen (1u, 3u, 5u en 24u) na bestraling gefixeerd in 4% paraformaldehyde gedurende 25 min op kamertemperatuur. Nadien worden cellen geïncubeerd met blokbuffer (5% normal goat serum (Life Technologies); 1% BSA, 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS⁺) gedurende 30 min. Vervolgens wordt het konijn anti-caspase 3 (1/400; Cell Signaling, België) en het muis anti- γ H2AX antilichaam (Millipore, Billerica, US) toegevoegd (1/400 in dilutiebuffer (1/10 blokbuffer)) en overnacht bij 4°C. De volgende dag worden de cellen gekleurd met een secundair anti-konijn-Alexa 594 gelabeld IgG antilichaam en een anti-muis antilichaam gekoppeld aan biotine (1/400 in dilutiebuffer; Life Technologies). Streptavidine gekoppeld aan Alexa 488 (1/400 in PBS⁺) wordt vervolgens gedurende 1 u op kamertemperatuur aangebracht. Ten slotte wordt gedurende 10 min een DAPI kleuring (1 μ g/ml in PBS⁺) toegepast om de celkernen aan te kleuren. Na elke incubatiestap wordt 3 maal gewassen met PBS⁺. Via een *BD pathway 435 imaging* toestel worden per well beelden genomen (10x objectief; 10x10 montage; 8.58x6.31 mm zone). De beelden worden geanalyseerd via ImageJ software (National Institutes of Health, USA; <http://imagej.nih.gov/ij/>) om het % γ H2AX foci/caspase3-positieve cellen ten opzichte van het totaal aantal cellen te berekenen. Overlays tussen de γ H2AX foci/caspase3 immunokleuringen en de radiografische film (opgenomen met licht microscopie) laten toe om deze analyses uit te voeren in de bestraalde en aangrenzende niet-bestraalde regio.

3.2.8 Studie naar vroege apoptose via Annexine V/PI kleuring

Cellen worden op verschillende tijdstippen na bestraling gewassen met PBS⁺ en vervolgens gedurende 15 min geïncubeerd met Annexine V-Alexa 488 (1/10; Life Technologies), PI (30 μ M) en Hoechst (1 μ g/ml) in buffer (140 mM NaCl (VWR); 2.5 mM CaCl₂, 10 mM HEPES (Sigma), pH 7.4). De culturen worden vervolgens gewassen met PBS⁺. Microscopische beeldjes worden opgenomen zoals hierboven (3.2.7) beschreven. Het aantal vroeg apoptotische (Annexine V positief, PI negatief) en laat apoptotische/necrotische (Annexine V positief, PI positief) cellen wordt uitgedrukt als een percentage op het totale aantal cellen. Overlays tussen de Annexine V/PI kleuring en de radiografische film laten toe om deze analyses uit te voeren in de bestraalde en aangrenzende niet-bestraalde regio.

4. Planning

Oktober	November	December	Januari	Februari	Maart	April	Mei
Cx expressie, GJIC, hemikanaalactiviteit	Bestraling, celdoodkleuring, DNA schade, Cx-kanaalinhibitoren				Ca ²⁺ /IP ₃ /ROS, verzamelen data en statistische analyse		
Schrijven: Introductie + Materialen en methoden					Resultaten + Discussie		

5. Referenties

- [1] Schultz-Hector S, Trott K (2007). Radiation-induced cardiovascular diseases: is the epidemiologic evidence compatible with the radiobiologic data? *International journal of radiation biology* 67 (1): 10-18.
- [2] Azizova T, Muirhead C et al. (2010). Cardiovascular diseases in the cohort of workers first employed at Mayak PA in 1948-1958. *Radiation research* 174 (2): 155-168.
- [3] Darby S, Ewertz M et al. (2013). Risk of ischemic heart disease in women after radiotherapy for breast cancer. *The new England journal of medicine* 368 (11): 987-998.
- [4] Darby S, Cutter D et al. (2010). Radiation-related heart disease: current knowledge and future prospects. *International journal for radiation oncology, biology, physics* 76 (3): 656-665.
- [5] Little M, Tawn E (2008). A systematic review of epidemiological associations between low and moderate doses of ionizing radiation and late cardiovascular effects and their possible mechanisms. *Radiation research* 169: 99-109.
- [6] Rombouts C, Aerts A et al. (2013). Differential response to acute low dose radiation in primary and immortalized endothelial cells. *International journal of radiation biology* 89 (10): 841-850.
- [7] Prise K, Belyakov O et al. (1998). Studies of bystander effects in human fibroblasts using a charged particle microbeam. *International journal of radiation biology* 74: 793-798.
- [8] Sawant S, Randers-Pehrson G et al. (2001). The bystander effect in radiation oncogenesis: I. Transformation in C3H10T1/2 cells in vitro can be initiated in the unirradiated neighbours of irradiated cells. *Radiation research* 155: 397-401.
- [9] Nagasawa H, Little J (1999). Unexpected sensitivity to the induction of mutations by very low doses of alpha-particle radiation: evidence for a bystander effect. *Radiation research* 152: 552-557.
- [10] Mothersill C, Seymour C (1998). Cell-cell contact during gamma irradiation is not required to induce a bystander effect in normal human keratinocytes: evidence for release during irradiation of a signal controlling survival into the medium. *Radiation research* 149: 256-262.
- [11] Meens M, Pfenniger A (2013). Regulation of cardiovascular connexins by mechanical forces and junctions. *Cardiovascular research* 99 (2): 304-314.
- [12] Mese G, Richard G et al. (2007). Gap junctions: basic structure and function. *Journal of investigative dermatology* 127 (11): 2516-2524.
- [13] Wang N, De Bock M et al. (2013). Paracrine signaling through plasma membrane hemichannels. *Biochimica et biophysica Acta* 1828 (1): 35-50.
- [14] Oshima Y, Tsukimoto M et al. (2012). Involvement of connexin 43 hemichannel in ATP release after γ -irradiation. *Journal of radiation research* 53 (4): 551-557.
- [15] Hamada N, Maeda M et al. (2011). Signaling pathways underpinning the manifestations of ionizing radiation-induced bystander effects. *Current molecular pharmacology* 4: 79-95.
- [16] Lesauskaitė V, Ivanovienė L et al. (2003). Programmed cellular death and atherogenesis: from molecular mechanisms to clinical aspects. *Medicina* 39 (6): 529-534.
- [17] Landmesser U, Burkhard H et al. (2004). Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis?. *Circulation* 109: 27-33.
- [18] Huber J, Vales A et al. (2002). Oxidized membrane vesicles and blebs from apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induced monocyte-endothelial interactions. *Atherosclerosis, thrombosis and vascular biology* 22: 101-107.
- [19] Rombouts C, Aerts A et al. (2014). Transcriptomic profiling suggests a role for IGFBP5 in premature senescence of endothelial cells after chronic low dose rate irradiation. *International journal of radiation biology*. [Epub ahead of print].
- [20] Balinger S (2005). Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. *Free radical biology & medicine* 38 (10): 1278-1295.
- [21] Decrock E, De Bock M et al. (2012). IP3, a small molecule with a powerful message. *Biochimica et biophysica Acta* 1833 (7): 1772-1786.
- [22] Yamamori T, Yasui H et al. (2012). Ionizing radiation induced mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free radical biological & medicine* 53 (2): 260-270.
- [23] Leach J, Van Tuyle G et al. (2001). Ionizing radiation-induced mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer research* 61 (10): 3894-3901.
- [24] Evans W, Bultynck G et al. (2012). Manipulating Connexin Communication Channels: Use of Peptidomimetics and the Translational Output. *The journal of membrane biology* 245 (8): 437-449.
- [25] Lyng F, Howe O et al. (2011). Reactive oxygen species induced release of signalling factors in irradiated cells triggers membrane signalling and calcium influx in bystander cells. *International journal of radiation biology* 87 (7): 683-695.