



Rapport

# Selectie van genen voor het meten van effecten van polluenten op genexpressie

door

Sam De Coster, Prof. dr. Nik van Larebeke

december 2009

## Selectie van genen voor het meten van effecten van pollutanten op genexpressie

Voor de selectie van genen met betrekking tot het meten van effecten van pollutanten op de genexpressie bij de mens, werd zowel een theoretische als een praktische methode gehanteerd.

Het **theoretische deel** bestond uit 1/ databankopzoeken van relaties tussen genexpressie en geselecteerde pollutanten en 2/ selectie van sleutelgenen van de carcinogenese en van genen geassocieerd met blootstellingen en/of biologische effecten op basis van enkele geselecteerde review-publicaties en PubMed-gene. Tijdens het verloop van het tweede (praktische) deel, werd echter besloten deze theoretische selectie niet verder te gebruiken in de eigenlijke selectie van 20 genen, omwille van het te sterk onvolledige en evoluerende karakter van de data achter deze genselectie.

Het **praktische deel** bestond uit genexpressieanalyses (volledige genoom) van 40 volwassenen (50-65 jaar), waarvan de blootstellingsmerkers van verschillende pollutanten (cadmium, lood, PCBs, dioxines, DDT, hexachlorobenzeen, PAKs en benzeen) gekend waren. Deze personen werden uit een grotere dataset geselecteerd op basis van de grootste resp. laagste cumulatieve blootstelling (som van z-waarden van individuele pollutanten), hetgeen resulteerde in 20 'hoog blootgestelde' en 20 'laag blootgestelde' individuen. In eerste instantie werden genexpressieverschillen tussen beide blootstellingsgroepen geanalyseerd, in combinatie met correlaties tussen individuele blootstellingsmerkers en de expressie van afzonderlijke genen. Door de relatief lage aantallen significante genen die daaruit voortvloeiden, werd ook overgegaan tot afzonderlijke analyses voor mannen en vrouwen. Hieruit bleken bijzonder grote verschillen tussen beide geslachten, waardoor besloten werd om afzonderlijk genen te selecteren voor beide geslachten.

Als eerste selectie criterium werd een maximale ***p-waarde van 0,01 voor de lineaire regressieanalyse*** tussen de expressie van een gen en de een bepaalde blootstellingsmerker gesteld, als tweede de ***aanwezigheid van een gen in een pathway met significantieniveau lager dan 0,05 bij Metacore-pathwayanalyse***, en als derde en laatste criterium ***een verwacht genexpressieverschil van 62% (mannen) en 51% (vrouwen) tussen intensiteiten van blootstelling resp. overeenstemmend met de p10 en de p90 (a.h.v. de regressievergelijkingen)***. Deze selectieprocedure resulteerde in een selectie van de beoogde 20 genen voor elk geslacht (na inclusie van de genen die geselecteerd waren op basis van onderzoek uit het eerste Steunpunt Milieu en Gezondheid).

Overzicht:

1. Inventarisatie genen geassocieerd met blootstelling aan polluenten en/of met biologisch effect (literatuurstudie)
  - 1.1. Databankanalyse: genen geassocieerd met blootstelling aan geselecteerde stoffen
  - 1.2. Selectie van sleutengenen in de carcinogenese en andere aandoeningen op basis van enkele review-publicaties en PubMed-gene
  - 1.3. Gebruik van deze gegevens
  
2. Genexpressie van 40 volwassenen i.f.v. interne blootstelling aan diverse polluenten. Studie in het kader van de selectie van genen voor genexpressieanalyse in het tweede Steunpunt Milieu en Gezondheid
  - 2.1. Doelstellingen
  - 2.2. Methodes
  - 2.3. Resultaten
    - 2.3.1. Populatiekenmerken
    - 2.3.2. Data-analyse over alle stalen (beide geslachten)
    - 2.3.3. Data-analyse gescheiden voor beide geslachten (*eerste selectie criterium: p-waarde correlatie <0.01*)
    - 2.3.4. Pathway-analyses (*tweede selectie criterium: gen in MetaCore pathway met p-waarde <0.05*)
    - 2.3.5. Verwachte genexpressieverschil tussen intensiteiten van blootstelling respectievelijk overeenstemmend met de p10 en de p90 a.h.v. regressievergelijkingen (*derde selectie criterium: verwachte verandering van >62% resp. 51% - mannen resp. vrouwen*): **uiteindelijke selectie**

# 1. Inventarisatie genen geassocieerd met blootstelling aan pollutanten en/of met biologisch effect (literatuurstudie)

Als 'theoretisch' deel van de selectieprocedure, werd een tweeledig literatuur- en databankonderzoek gedaan. Een eerste deel omvatte de inventarisatie van genen uit online databanken en de wetenschappelijke literatuur inzake blootstelling-genexpressie relaties, terwijl een tweede deel bestond uit de selectie van sleutelgenen in de carcinogenese op basis van de wetenschappelijke literatuur.

## 1.1. Databankanalyse: genen geassocieerd met blootstelling aan geselecteerde stoffen

De stoffen in kwestie werden geselecteerd op basis van (mogelijke) metingen van stoffen of hun metabolieten in het kader van het eerste en/of het tweede Steunpunt Milieu en Gezondheid. Een overzicht hiervan wordt gegeven in tabel 1.1.

Als basis voor het inventariseren van blootstelling-genexpressie relaties, werd gebruik gemaakt van de Comparative Toxicogenomics Database (CTD). Dit is een databank die relaties tussen chemische stoffen, genen en aandoeningen inventariseert. De informatie in deze databank heeft betrekking tot zowel de mens als andere soorten, en is afkomstig van een subset van MEDLINE/Pubmed, een databank van de U.S. National Library of Medicine. Deze relaties kunnen zowel direct als indirect zijn (via een tussenliggende stof of aandoening). Voor deze studie werden echter enkel directe relaties beschouwd, en bovendien beperkt tot genexpressie (terwijl ook informatie over eiwitbinding, fosforylering, secretie, etc... beschikbaar is).

Tabel 1.2 geeft systematisch de kenmerken weer van blootstelling-genexpressie relaties, geassocieerd met een bepaalde (groep) stof(fen): het aantal blootstelling-genexpressierelaties (totaal aantal en uniek aantal relaties), afzonderlijk voor UP en DOWN-regulatie van de genexpressie. Tabel 1.3. geeft de over-all top 50 van genen die in verband gebracht worden met de vernoemde blootstellingen.

Tabel 1.1. Overzicht van de stoffen waarvoor een opzoeking gedaan is in de CTD.

Pollutant	
Metals	Cadmium
	Arsene
	Mercury
	Lead
Aromatic compounds	Polyaromatic Hydrocarbons (PAHs) [Naphthalene, Acenaphthylene, Acenaphthene, Fluorene, Phenanthrene, Anthracene, Fluoranthene, Pyrene, Benz(a)anthracene, Chrysene, Benzo(b)fluoranthene, Benzo(k)fluoranthene, Benzo(a)pyrene, Dibenzo(a,h)anthracene, Benzo(g,h,i)perylene, Indeno(1,2,3-c,d)pyrene]
	Benzene

	PCBs TCDD (tetrachlorodibenzodioxin)
Brominated and fluorinated compounds	Polybrominated diphenylethers  Hexabromocyclododecane Tetrabromobisphenol A Perfluoro-compounds [e.g. perfluoro-octaansulfonaat (PFOS), perfluoro-octaanzuur (PFOA), perfluoro-octaansulfonamide (PFOSA), perfluoro-nanoaat (PFNA)]
Pesticides and their metabolites	Hexachlorobenzene DDT, p,p'-DDE Organophosphate pesticides [chlorpyrifos, malathion, dimethoate] Pyrethrine pesticides [e.g. permethrine, cyfluthrin, cypermethrine, phenothrin, deltamethrin, cyhalomethrin, biphentrin] Carbamatepesticides [thiram, mancozeb, maneb] Other pesticides [para-dichlorobenzene, 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid, chloorthalonil, chloorpropham, diuron, linuron, propanil, lprodion, vinclozolin, procymidone, chlozolate]
Plastics compounds	Bisphenol A Phthalates
Cosmetics compounds	Musks – nitromusks Musks- polycyclische musks Parabens UV screens [o.a. benzophenone-3, 2,4-dihydroxybenzophenone, 2,2'-dihydroxy-4-methoxybenzophenone (DHMB), methylbenzylidenecamphor (MBC), octyl methoxycinnamate (OMZ)]
Others	Nicotine

Tabel 1.2. Relaties tussen genexpressie en blootstelling aan diverse (groepen) stoffen uit de Comparative Toxicogenomics Database. UPREG: genexpressie opgeregeerd door pollutent, DOWNREG: genexpressie neergereguleerd. CITATIONS: som van alle referenties (per gen) die modulatie van genexpressie beschrijven (publicaties die modulatie van meerdere genen beschrijven tellen meermaals mee). GENES: totaal aantal genen waarvan modulatie van genexpressie door pollutent beschreven is (UP/DOWN). 'Top 12' van genen die het meest gelinkt worden aan de blootstelling in kwestie (gegevens mei 2008). Vb: cadmium wordt gelinkt aan 112 unieke genen, terwijl een totaal van 256 keer een blootstelling-genexpressie verband beschreven is. Zo zijn voor MT2A en HMOX1 14 resp 12 keer publicaties beschikbaar waarin opregulatie van de genexpressie door cadmium beschreven wordt.

Cadmium		Arsene				Mercury				Lead					
UPREG	DOWNREG	UPREG	DOWNREG	UPREG	DOWNREG	UPREG	DOWNREG	UPREG	DOWNREG	UPREG	DOWNREG	UPREG	DOWNREG		
CITATIONS	256	CITATIONS	110	CITATIONS	1215	CITATIONS	838	CITATIONS	330	CITATIONS	112	CITATIONS	32		
GENES <sup>b</sup>	112	GENES	66	GENES	809	GENES	653	GENES	298	GENES	108	GENES	29		
MT2A	14	CYP1A	4	HMOX1	31	GJA1	6	ABCC1	6	EGFR	2	GSTM1	2	POU4F1	2
HMOX1	12	GPX1	3	NQO1	12	TERT	6	MT2	5	FN1	2	GSTP1	2	BAD	1
MT1A	8	ACOX1	2	ABCC2	10	CCL2	5	ABCC2	4	PDGFRA	2	POU2F2	2	BNIP3	1
HSP70	7	ACTA1	2	GADD45A	10	CYP1B1	4	HMOX1	4	SERPINC1	2	ALDH2	1	CASP3	1
COX1	6	ADH6	2	AFP	9	FLG	4	HSP70	3	A2M	1	ATF4	1	CASP6	1
FOS	5	AKR1B1	2	JUN	9	ID2	4	HSPA1A	3	ACP2	1	BIRC3	1	CASP9	1
HSPA1A	4	ALB	2	TXNRD1	9	IGFBP2	4	MT3	3	ACSL1	1	DDIT3	1	COL4A1	1
MT1	4	ALDH6A1	2	CCND1	8	IVL	4	ATF4	2	AGXT	1	DNAJA1	1	CYP7A1	1
MT2	4	AR	2	GSTP1	8	MMP2	4	CRP	2	AKR1B1	1	DNAJB1	1	DAP	1
SPP1	4	ATP2B1	2	HSPA1A	8	MYC	4	CYP1A1	2	AKT2	1	FOS	1	FADD	1
TXNRD1	4	CD36	2	MT2A	8	TNF	4	DUSP1	2	ALDH6A1	1	FTH1	1	FOS	1
HSP22	3	CEBPA	2	VEGFA	8	ARHGDI	3	GADD45G	2	ANXA6	1	GADD45A	1	GSTA1	1
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
PAHs		Benzene				PCBs				Dioxins					
UPREG	DOWNREG	UPREG	DOWNREG	UPREG	DOWNREG	UPREG	DOWNREG	UPREG	DOWNREG	UPREG	DOWNREG	UPREG	DOWNREG		
CITATIONS	151	CITATIONS	75	CITATIONS	13	CITATIONS	19	CITATIONS	392	CITATIONS	146	CITATIONS	558		
GENES	102	GENES	73	GENES	13	GENES	19	GENES	276	GENES	131	GENES	369		
CYP1A1	16	HBB	3	ACF	1	ATP5I	1	CYP1A1	34	CYP11A1	3	CYP1A1	42	BAX	2
CYP1B1	12	ADAM12	1	APOB	1	CD74	1	CYP11B2	11	ATF3	2	CYP1B1	17	BCL2L1	2
NQO1	8	ADAMTS16	1	DAO1	1	EGFR	1	CYP1A2	10	BCL2	2	CYP1A4	11	CAR3	2
ABCB1	4	AHR	1	EIF4G2	1	EPB4.1L1	1	CYP11B1	9	BTG1	2	CYP1A2	9	CDKN1A	2
ESR1	3	ALPHA GLOBIN	1	ELOVL5	1	FASN	1	CYP1A	8	CDKN1A	2	CYP1A5	8	CYP3A13	2

UGT1A6	3	CDC2	1	HHEX	1	G6PC	1	CYP1A5	8	CYP2E1	2	CYP1A	7	DAO1	2
CYP1A2	2	COL8A1	1	HNF4A	1	HNRPUL1	1	NR1I3	6	ESR2	2	NQO1	7	FADS1	2
ABCG2	2	CUGBP2	1	IL12B	1	IDB4	1	CYP19A1	5	HSD17B1	2	AHRR	6	FASN	2
CYP-35A5	2	DHRS3	1	NR1D2	1	NDUFA5	1	CYP1A4	5	HSD17B3	2	AHR	5	GLUD1	2
CYP-35C1	2	DNMT3L	1	POLDIP2	1	PLA2G6	1	CYP1B1	5	IL2	2	ALDH3A1	5	GLUL	2
CYP1A	2	EGR1	1	PPP2R1A	1	RAP1GAP	1	CYP21A2	5	NEDD9	2	UGT1A6	4	GPT1	2
GSTA1	2	FIGF	1	RGS3	1	RPL35	1	HSD3B2	4	STAR	2	CLDN3	3	HAL	2
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

Hexachlorobenzene				DDT, p,p'-DDE				organofosfaat pesticides				pyrethrine pesticides				carbamaat pesticides				other pesticides			
UPREG		DOWNREG		UPREG		DOWNREG		UPREG		DOWNREG		UPREG		DOWNREG		UPREG		DOWNREG		UPREG		DOWNREG	
CITATIONS	GENES	CITATIONS	GENES	CITATIONS	GENES	CITATIONS	GENES	CITATIONS	GENES	CITATIONS	GENES	CITATIONS	GENES	CITATIONS	GENES	CITATIONS	GENES	CITATIONS	GENES	CITATIONS	GENES	CITATIONS	GENES
93	93	22	22	66	48	31	44	14	13	11	11	25	11	15	11	5	4	3	3	50	43	50	50
ALAS2	1	ART2B	1	NR1I3	5	NOS2	4	HSP70	2	FOS	1	TFF1	6	CHRM1	3	HSP22	2	BCL2	1	CYP1B1	2	ELA2	1
ALOX15	1	CD37	1	PGR	4	IL1B	3	FOS	1	SLC6A4	1	WNT10B	4	ALB	2	SLC5A5	1	FLT1	1	CYP11A1	2	ESR1	1
ANXA1	1	CD3D	1	CYP3A	3	TNF	3	HSP90AA1	1	IGF1	1	CYP2B1	4	APOE	2	TSHB	1	KDR	1	ABCB4	2	ESR2	1
C1QB	1	CD3Z	1	CYP3A4	3	AR	2	HTR1A	1	TGFB1	1	CYB5	3	TH	2	MMP13	1			VEGFA	2	ZIC5	1
C1S	1	CD74	1	ABCB1	2	CLU	2	HTR2A	1	ACP36DE	1	NR1I3	2	CYP11A1	2					CLU	2	CCDC120	1
C4BPA	1	CYP2E1	1	CYP12D1-P	2	HSD17B1	2	SLC6A4	1	ACP70A	1	APOA1	1	HSD17B1	1					CYP17A1	1	CLK1	1
CAPG	1	EPHX2	1	CYP19A1B	2	IL1R1	2	TP53	1	HBA	1	APOB	1	STAR	1					CYP19A1	1	IL1RL1	1
CAT	1	FCER2A	1	IL6	2	IL2	2	IGF1	1	HBB	1	CYP11A1	1	BDNF	1					CYP3A1	1	PTGER3	1
CCBP2	1	FRAP1	1	LTF	2	PGR	2	IL1B	1	CHRM2	1	STAR	1	FOS	1					FSHB	1	VEGFA	1
CCL20	1	GSTM1	1	NOS2	2	TNFRSF1A	2	MX1	1	STAR	1	CYP3A1	1							LHB	1	ACCN3	1
CCND1	1	HLA-DMA	1	TNF	2	ABCB1	2	TGFB1	1	CHRM3	1	S100G	1							PGR	1	ATP2A2	1
CD14	1	HLA-DMB	1	C3	1	ADM	2	HSC70	1											DCLRE1C	1	BCKDK	1
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

perfluoro-compounds				tetrabromobisphenol A				polygebromeerde diphenylethers				Hexabromocyclododecaan			
UPREG		DOWNREG		UPREG		DOWNREG		UPREG		DOWNREG		UPREG		DOWNREG	
CITATIONS	GENES	CITATIONS	GENES	CITATIONS	GENES	CITATIONS	GENES	CITATIONS	GENES	CITATIONS	GENES	CITATIONS	GENES	CITATIONS	GENES
234	191	134	125	7	7	6	7	2	2	0	0	3	3	0	0
ACOT1	3	APOA4	2	ALDH18A1	1	BACTIN2	1	THIBZ-A	1			CYP2B1	1		
ACOT2	3	CYP7A1	2	CYP21A2	1	BHMT	1	THRB	1			CYP3A1	1		
ALDH1A1	3	HSD11B1	2	MMP9	1	BRD8	1					CYP3A23/3	1		
CYP17A1	3	BZRPL1	2	PCNA	1	PCNA	1					A1	1		

DCI	3	CCNG2	2	PGAM1	1	RBP4	1
ECH1	3	CRYBA2	2	THRA	1	WDR1	1
EHHADH	3	HBA2	2	THRB	1		
SCD2	3	HKDC1	2				
DBI	3	NR1D2	2				
ACAA1	2	ATP1A2	1				
CES2	2	CEBPD	1				
HDC	2	CPLX1	1				
...		...					

<b>bisphenol A</b>		<b>Ftalates</b>				<b>Parabens</b>				<b>UV screens</b>		<b>Nicotine</b>					
<b>UPREG</b>	<b>DOWNREG</b>	<b>UPREG</b>	<b>DOWNREG</b>	<b>UPREG</b>	<b>DOWNREG</b>	<b>UPREG</b>	<b>DOWNREG</b>	<b>UPREG</b>	<b>DOWNREG</b>	<b>UPREG</b>	<b>DOWNREG</b>	<b>UPREG</b>	<b>DOWNREG</b>	<b>UPREG</b>	<b>DOWNREG</b>		
<b>CITATIONS</b>	<b>GENES</b>	<b>CITATIONS</b>	<b>GENES</b>	<b>CITATIONS</b>	<b>GENES</b>	<b>CITATIONS</b>	<b>GENES</b>	<b>CITATIONS</b>	<b>GENES</b>	<b>CITATIONS</b>	<b>GENES</b>	<b>CITATIONS</b>	<b>GENES</b>	<b>CITATIONS</b>	<b>GENES</b>		
ESR1	8	APO14KDA	2	SLC5A5	6	NR0B1	6	TFF1	3	TFF1	4	AHR	1	AATK	1	AMHR2	1
S100G	6	APOA1	2	EGR1	4	LHCGR	5			IGF1	2	ESR1	1	APP	1	APP	1
VTG1	4	CYP1B1	2	GRB14	4	HNF1A	4			PGR	2	ESRRA	1	CACNA1F	1	BAD	1
VTG2	3	PIAS3	2	CYP1B1	3	INSIG1	4							CBL	1	BCL2A1	1
HOXA10	3	TGFB2	2	CYP4A1	3	INSL3	4							CCL5	1	BRCA1	1
PGR	3	TIMP3	2	FABP3	3	LDLR	4							CCR5	1	BTF3	1
CYP19A1	2	APOB	1	FOS	3	STAR	4							CD59	1	BTK	1
AURKA	2	CEL	1	JUN	3	SVS5	4							CYP2A3A	1	C5AR1	1
CDC6	2	COX1	1	PPARA	3	CYP17A1	3							CYP2B1	1	CART	1
MCM2	2	CYTB	1	PPARG	3	GALR2	3							EPO	1	CCL16	1
MYB	2	ELOVL2	1	SLC27A1	3	ADORA2A	3							EZR	1	CCR6	1
PCNA	2	METTL1	1	STAR	3	ADRA1A	3							FASLG	1	CD4	1
...		...		...		...						...		...		...	

Tabel 1.3. Over-all top 50 van genen waarvan de expressie beïnvloed wordt door de hoger vermelde blootstellingen.

UPREG				DOWNREG			
Gene	Count	Gene	Count	Gene	Count	Gene	Count
CYP1A1	102	MT2	12	CYP11A1	10	TNFSF10	5
HMOX1	48	CYP19A1	11	STAR	9	CYP1A	5
CYP1B1	42	AHRR	11	BCL2	8	AHR	4
NQO1	31	AHR	11	HBB	8	ALB	4
CYP1A2	24	GSTA1	11	CYP1B1	8	HSD17B1	4
MT2A	23	GSTA2	11	LHCGR	8	FOS	4
ESR1	18	DDIT3	11	IL2	7	IGF1	4
FOS	18	CCND1	10	TNF	7	HBA	4
TXNRD1	18	MYC	10	CDKN1A	6	APOA1	4
HSP70	18	VEGFA	10	TGFB2	6	NEDD9	4
CYP1A	17	PGR	10	AR	6	SOX4	4
JUN	17	ABCB1	10	GJA1	6	GLUL	4
CYP1A4	16	CYP11B1	9	TERT	6	IL18	4
CYP1A5	16	CYP3A1	9	CYP1A1	5	PGR	4
TFF1	16	AFP	9	ID3	5	SCARB1	4
HSPA1A	15	MT1X	9	CYP17A1	5	CYP7A1	4
GSTP1	14	SOD1	9	SVS5	5	HSD11B1	4
MT1A	14	IGFBP1	9	EGR1	5	IER3	4
GADD45A	14	GCLC	9	BAX	5	CYP2E1	4
PCNA	14	IGF1	9	INSIG1	5	HSD3B1	4
NR1I3	13	MT1	9	LDLR	5	RBP1	4
ABCC2	13	CDKN1A	8	NR0B1	5	SULT1A1	4
CYP11B2	12	UGT1A6	8	BAD	5	DHRS3	4
CYP2B1	12	COX1	8	CCL2	5	SERPINE1	4
EGR1	12	HSP22	8	ID2	5	THBS1	4

## 1.2. Selectie van sleutengenen in de carcinogenese en andere aandoeningen op basis van enkele review-publicaties en pubmed-gene

Als tweede deel van de theoretische selectieprocedure, werden enkele review-publicaties gebruikt, alsook de literatuurdatabank PubMed-gene. Een korte toelichting wordt hier gegeven.

1. **“Hallmarks of cancer” (Hanahan & Weinberg 2000):** deze auteurs stellen voorop dat veel of de meeste kankers een aantal gemeenschappelijke eigenschappen kennen: een zelfvoorziening aan groesignalen, ongevoeligheid voor externe groesignalen, omzeilen van de apoptose, ongelimiteerd delingspotentiaal, langdurige vorming van nieuwe bloedvaten en weefselinvasie en metastase. Bij elk van deze factoren zijn genen en eiwitten betrokken die

bepaalde sleutelrollen kunnen vervullen. Daaruit werden een aantal potentieel interessante genen weerhouden, zoals hier wordt verduidelijkt.

- **Positieve/negatieve groeifactoren:**
  - **TGFB:** blokkeert progressie door celcyclus-G1 fase
  - **p15, p21:** blokkeren cycline:CDK-complexen en regelen progressie door G1-fase. Gereguleerd door **p53**
  - **c-MYC:** transcriptiefactor die bij overexpressie differentiatie verhindert en groei promoot
- **(inhibitie van) apoptose:**
  - pro-apoptose: **TNFa, FAS, Bax, Bad, Bid, Bim, caspases**
  - anti-apoptose: **IGF1/2, IL-3, Bcl-2**
- **Angiogenese (bloedvadvorming):**
  - pro-angiogenese: **VEGF, FGF1/2**
  - angiogenese-inhibitoren: **thrombospondin-1**
- **Invasive en metastase: integrines en cadherines linken cellen aan extracellulaire matrix. Deze koppeling resulteert in bepaalde regulatorische signalen:**
  - **E-cadherin:** geeft groei-inhiberende signalen door aan interne cel-signalisatie, zoals de Lef/Tcf transcriptie factoren

## 2. Environmental exposures and gene regulation in disease etiology (Edwards & Meyers 2007)

Deze publicatie gaat in op hoe milieublootstellingen de genexpressie beïnvloedt en hoe dit kan leiden tot bepaalde aandoeningen:

- Non-hodgkin lymphoma en pesticide exposure: **BCL-2** overexpressie (anti-apoptose)
- Luchtvervuiling, activatie van onstekingsgerelateerde genen en ademhalingsstoornissen: inductie van **NF-kB, AP-1, en IL-8** (onstekingsmarker)
- Xeno-oestrogenen, transcriptie en allergieën: verhoging van **IL-4** mRNA niveau

, :

### 3. Pubmed-gene

Via PubMed-gene werden verder nog een aantal genen geselecteerd wegens hun rol i.v.m. bepaalde blootstellingen of pathologische effecten:

- **AHR**: transcription factor involved in the regulation of biological responses to planar **aromatic hydrocarbons**
- **FOS**: has been implicated as regulator of **cell proliferation, differentiation, and transformation**. In some cases, expression of the FOS gene has also been associated with **apoptotic cell death**.
- **STAT1**: The protein encoded by this gene is a member of the STAT protein family. In response to cytokines and growth factors, STAT family members are phosphorylated by the receptor associated kinases, and then form homo- or heterodimers that translocate to the cell nucleus where they act as **transcription activators**. This protein can be activated by various ligands including interferon-alpha, interferon-gamma, EGF, PDGF and IL6. This protein mediates the expression of a variety of genes, which is thought to be important for **cell viability in response to different cell stimuli and pathogens**.
- **BCL-2**: This gene encodes an integral outer mitochondrial membrane protein that **blocks the apoptotic death of some cells such as lymphocytes**. Constitutive expression of BCL2, such as in the case of translocation of BCL2 to Ig heavy chain locus, is thought to be the cause of follicular lymphoma.
- **GADD45A**: This gene is a member of a group of genes whose transcript levels are increased following stressful growth arrest conditions and treatment with DNA-damaging agents. The protein encoded by this gene **responds to environmental stresses** by mediating activation of the p38/JNK pathway via MTK1/MEKK4 kinase. The DNA damage-induced transcription of this gene is mediated by both p53-dependent and -independent mechanisms.
- **ESR1**: This gene encodes an estrogen receptor, a ligand-activated transcription factor composed of several domains important for **hormone binding, DNA binding, and activation of transcription**. The protein localizes to the nucleus where it may form a homodimer or a heterodimer with estrogen receptor 2. Estrogen and its receptors are essential for sexual development and reproductive function, but also play a role in other tissues such as bone. Estrogen receptors are also involved in **pathological processes** including breast cancer, endometrial cancer, and osteoporosis. Alternative splicing results in several transcript variants, which differ in their 5' UTRs and use different promoters.
- **IGF**: The protein encoded by this gene is similar to insulin in function and structure and is a member of a family of proteins involved in **mediating growth and development**. The encoded protein is processed from a precursor, bound by a specific receptor, and secreted. Defects in this gene are a cause of insulin-like growth factor I deficiency. Several transcript variants encoding different isoforms have been found for this gene.

- **BID:** This gene encodes a death agonist that heterodimerizes with either agonist BAX or antagonist BCL2. The encoded protein is a member of the **BCL-2 family of cell death regulators**. It is a mediator of mitochondrial damage induced by caspase-8 (CASP8); CASP8 cleaves this encoded protein, and the COOH-terminal part translocates to mitochondria where it triggers cytochrome c release.

### 1.3. Gebruik van deze gegevens in de selectieprocedure

Na overleg met de partners aan de Universiteit Maastricht (GRAT), werd besloten de uiteindelijke selectie van 20 genen voor het tweede steunpunt Milieu en Gezondheid, niet te baseren op deze literatuur-gegevens. De voornaamste reden hiervoor is het sterk evoluerende (en onvolledige) karakter van genexpressie-data, waardoor het wetenschapsdomein rond genexpressie zeer snel evolueert en data snel verouderd zijn. Het is duidelijk dat de onze inzichten inzake beïnvloeding van de genexpressie door blootstelling aan vervuilende stoffen nog zeer onvolledig zijn. Daarom werd ook besloten de keuze zo pragmatisch mogelijk te maken, gebaseerd op de resultaten van een whole-genome analyse van 40 personen uit de volwassenendataset van het eerste Steunpunt Milieu en Gezondheid.

## **2. Genexpressie van 40 volwassenen i.f.v. interne blootstelling aan diverse polluenten. Studie in het kader van de selectie van genen voor genexpressieanalyse in het tweede Steunpunt Milieu en Gezondheid**

### **2.1. Doelstellingen**

- Meten van verschillen in genexpressie tussen hoog en laag blootgestelde individuen
- Welke polluenten zijn hiervoor verantwoordelijk
- Welke genen komen differentieel tot expressie

### **2.2. Methodes**

- Selectie van 40 volwassenen niet-rokers (50-65j), 20 hoog (H) & 20 laag (L) blootgestelden
- Evenredig verdeelde leeftijdscategorieën: 50-55j (7H,7L), 55-60 (6H,6L), 60-65 (7H,7L)
- Blootstelling aan: cadmium, lood, PCBs (138+153+180), PCB118, dioxines (TEQ), HCB, p,p'-DDE, PAKs (OH-pyreen), benzeen (ttMA)
- Beoordeling en rangschikking van blootstelling via z-score van elke polluent, als een som van 9 individuele z-scores
- Genexpressieanalyse d.m.v. Agilent 4x44k human microarrays (44.000 probes)

### **2.3. Resultaten**

#### **2.3.1. Populatiekenmerken**

- Algemene kenmerken van de populatie, zoals persoonlijke kenmerken en interne blootstelling aan diverse stoffen wordt weergegeven in tabel 2.1.
- Alle blootstellingsmerkers zijn significant hoger bij de hoog blootgestelde groep, behalve Cd ( $p=0.11$  en  $0.08$  voor Cd urine resp. bloed) en ttMa ( $p=0.078$ ).

Tabel 2.1: populatiekenmerken

	Parameter		High exposed	Low exposed
	(p-value of difference high-low)			
<i>Descriptives</i>	Age (0.54)		57.81 ± 0.97	56.94 ± 1.01
	Weight		75.00	77.40
	BMI		27.93	27.87
	Sex (M/F)		6/14	14/6
<i>Internal exposure</i>	Cd urine (0.11)	mg/g crt	0.67 ± 0.07	0.49 ± 0.04
	Cd blood (0.08)	µg/L	0.52 ± 0.06	0.41 ± 0.06
	Pb blood (0.0023)	µg/L	59.23 ± 8.28	32.35 ± 3.40
	HCB fat (4.7*10 <sup>-12</sup> )	ng/g lipid	122.79 ± 10.38	34.29 ± 2.56
	HCB (2.1*10 <sup>-10</sup> )	µg/L	0.72 ± 0.07	0.21 ± 0.01
	PCB 118 fat (1.3*10 <sup>-9</sup> )	ng/g lipid	63.08 ± 7.39	14.55 ± 1.30
	PCB 118 (3.6*10 <sup>-9</sup> )	ng/mL	0.36 ± 0.04	0.09 ± 0.008
	Sum PCBs fat (1.4*10 <sup>-8</sup> )	ng/g lipid	574.75 ± 52.5	214.72 ± 17.6
	Sum PCBs (2.31*10 <sup>-8</sup> )	ng/mL	3.38 ± 0.37	1.28 ± 0.11
	pp_P,P'-DDE fat (6.2*10 <sup>-7</sup> )	ng/g lipid	2224.29 ± 447.5	237.81 ± 44.8
	pp_P,P'-DDE (4.2*10 <sup>-7</sup> )	ng/mL	13.44 ± 2.85	1.35 ± 0.34
	TEQ fat (0.0016)	pg TEQ/g lipid	30.25 ± 4.23	12.81 ± 2.02
	TEQ serum (0.003)	pg TEQ/g serum	0.15 ± 0.021	0.07 ± 0.012
	ttMA (0.078)	mg/g crt	0.10 ± 0.038	0.05 ± 0.020
	OH-pyr (0.044)	µg/g crt	0.23 ± 0.046	0.13 0.030

### 2.3.2. Dataset 20H vs. 20L (alle stalen)

In eerste instantie werd de dataset van 40 personen gebruikt voor de data-analyse (mannen en vrouwen samen). Het aantal genen dat (voor de hele dataset: mannen en vrouwen) differentieel tot expressie komt in beide groepen (per significantieniveau) is weergegeven in tabel 2.2 (analyse: t-test in GEPAS).

Tabel 2.2. Aantal genen waarvan de expressie significant verschilt tussen de groep hoog en laag blootgestelden (per significantieniveau). Totaal aantal genen in de analyse na filtering: 19012<sup>1</sup>

Significance	ALL	
	Up-regulated	Down-regulated
p<0.001	2	9
p<0.01	42	132
p<0.05	308	563

Door het relatief lage aantal significante genen die werden bekomen na het vergelijken van beide groepen (hoge vs. lage blootstelling op basis van een z score van de 9 blootstellingsmerkers), werd overgegaan op Pearson **correlatie-analyses** van de individuele blootstellingsvariabelen met de genexpressie. Het resultaat van deze correlatie-analyses wordt weergegeven in tabel 2.3.

---

<sup>1</sup> Filtering bestaande uit verwijderen van genen met >30% missende waarden, en van genen met een zeer constante expressie overheen de dataset (flat-pattern filtering)

Tabel 2.3. Aantal genen waarvan de expressie positief resp. negatief correleert aan specifieke blootstellingsmerkers (Pearson correlatie  $p < 0.05$ , totaal aantal genen in de analyse na filtering<sup>2</sup>: 19012).

<b>All</b>			
	<b>pos</b>	<b>neg</b>	<b>tot</b>
<b>Cd urine</b>	560	543	<b>1103</b>
<b>Cd blood</b>	229	331	<b>560</b>
<b>Pb blood</b>	282	159	<b>441</b>
<b>ttMA</b>	347	378	<b>725</b>
<b>OH-pyr</b>	404	389	<b>793</b>
<b>PCB 118 fat</b>	370	362	<b>732</b>
<b>Sum PCBs fat</b>	336	385	<b>721</b>
<b>TEQ fat</b>	116	134	<b>250</b>
<b>HCB fat</b>	421	474	<b>895</b>
<b>DDE fat</b>	229	410	<b>639</b>

#### 2.3.4. Afzonderlijke data-analyse voor beide geslachten (eerste selectiecriteria)

Door de vrij lage aantallen significante genen bij data-analyse van de hele groep, en de waarneming van zeer grote verschillen in genexpressie tussen beide geslachten, werd vervolgens overgegaan tot afzonderlijke analyses voor beide geslachten. Deze nieuwe datasets hebben echter een ongelijke verdeling van de hoog/laag blootgestelden: bij de mannen 6H/14L, bij de vrouwen 14H/6L. Gegevens van zowel t-test analyses (hoge vs lage blootstelling) als van correlatie-analyses worden weergegeven in de tabellen 2.4 en 2.5. Zeer grote verschillen tussen beide geslachten worden waargenomen, zowel naar aantallen genen, als naar welke genen significant correleren. Door de schijnbaar verschillende reactie in genexpressie op blootstelling aan diverse stoffen werd besloten om verder te werken met deze afzonderlijke datasets. Deze correlatie-analyses vormen de eerste stap in de selectieprocedure, met als criterium een p-waarde lager dan 0.01.

<sup>2</sup> Filtering bestaande uit verwijderen van genen met >30% missende waarden, en van genen met een zeer constante expressie overheen de dataset (flat-pattern filtering)

Tabel 2.4. Aantal genen waarvan de expressie significant verschilt tussen de groep hoog en laag blootgestelden voor de beide geslachten afzonderlijk (per significantieniveau). Totaal aantal genen in de analyse na filtering: 19117 (M) resp. 18508 (F).

Significance	Male		Female	
	Up-regulated	Down-regulated	Up-regulated	Down-regulated
p<0.001	14	49	8	5
p<0.01	178	326	58	85
p<0.05	854	1062	300	385

Tabel 2.5 Aantal genen waarvan de expressie positief resp. negatief correleert aan specifieke blootstellingsmerkers (Pearson correlatie p<0.05, totaal aantal genen in de analyse na filtering: 19117 (M) resp 18508 (F)).

	Male			Female			All		
	pos	neg	tot	pos	neg	tot	pos	neg	tot
<b>Cd urine</b>	322	322	<b>644</b>	390	354	<b>744</b>	560	543	<b>1103</b>
<b>Cd blood</b>	318	181	<b>399</b>	363	539	<b>902</b>	229	331	<b>560</b>
<b>Pb blood</b>	274	231	<b>505</b>	783	466	<b>1249</b>	282	159	<b>441</b>
<b>ttMA</b>	387	444	<b>831</b>	287	402	<b>689</b>	347	378	<b>725</b>
<b>OH-pyr</b>	436	337	<b>773</b>	271	279	<b>550</b>	404	389	<b>793</b>
<b>PCB 118 fat</b>	403	263	<b>666</b>	534	579	<b>1113</b>	370	362	<b>732</b>
<b>Sum PCBs fat</b>	2152	2070	<b>4222</b>	576	844	<b>1420</b>	336	385	<b>721</b>
<b>TEQ fat</b>	615	371	<b>986</b>	623	611	<b>1234</b>	116	134	<b>250</b>
<b>HCB fat</b>	651	426	<b>1077</b>	621	805	<b>1426</b>	421	474	<b>895</b>
<b>DDE fat</b>	1889	1879	<b>3768</b>	453	890	<b>1343</b>	229	410	<b>639</b>

Er werd nog verder ingegaan op de waargenomen geslachtsverschillen wat betreft genexpressieveranderingen gecorreleerd aan de blootstellingsmerkers, door na te gaan welke genen zowel bij mannen als bij vrouwen significant correleerden met een bepaalde blootstelling, en door de richting van correlaties na te gaan: i.e. bij beide geslachten een gelijk teken dan wel een verschillend teken van de correlatiecoëfficiënt. De aantallen genen die zowel bij mannen als vrouwen positief correleren worden weergegeven in tabel 2.6. Daarin blijken grote verschillen tussen de verschillende blootstellingsmerkers te bestaan. Zo correleren genen geassocieerd met blootstelling aan cadmium en OH-pyreen hoofdzakelijk in de zelfde 'richting' (zelfde teken van de correlatiecoëfficiënt), terwijl dat voor de somPCBs, teq, DDE en HCB hoofdzakelijk in tegengestelde 'richting' is. Dit is met name zeer uitgesproken voor somPCBs, met 235 van de genen (of 95%) met een tegengestelde correlatiecoëfficiënt, tegenover 12 genen met een gelijk teken voor de correlatiecoëfficiënt bij mannen en bij vrouwen. Deze waarneming wijst op verschillen in genexpressieveranderingen onder invloed van blootstelling aan deze polluenten.

Tabel 2.6: Aantal genen met bij beide geslachten eenzelfde, dan wel tegengesteld teken van de correlatiecoëfficiënt, voor elke blootstellingsmerker, voor genen met p-waarde van correlatie bij beide geslachten < 0,05, alsook de binomiale probabiliteit op de verdeling van deze waarden.

	Correlations coefficients when p<0.05				TOT	Binomial probability
	+/+ or -/-		+/- or -/+			
Cd crea	13	68%	6	32%	19	p=0,05
Pb	7	32%	15	68%	22	p=0,041
DDE	10	4%	228	96%	238	p<0,0000001
HCB	8	19%	35	81%	43	p=0.00002
SUMPCB	12	5%	235	95%	247	p<0,0000001
PCB118	10	37%	17	63%	27	p=0,063
TEQ	4	7%	55	93%	59	p<0,0000001
TTMA	11	55%	9	45%	20	p=0,16
hPYR	21	84%	4	16%	25	p=0,0004

### 2.3.4. Pathway-analyses (tweede selectie criterium)

Om ook de biologie en functie van de genen te includeren in de selectieprocedure, werden ook pathway-analyses uitgevoerd – als tweede selectie criterium. Als basis hiervoor werd gebruik gemaakt van alle genen die correleerden met één van zes blootstellingsmerkers (cadmium urine, lood, som PCBs, teq, ttMA, OH-pyr) met een significantie van  $p < 0.01$ . Wegens de sterke overeenkomsten tussen HCB, DDE en PCB118 met somPCBs, werden deze blootstellingsmerkers niet verder gebruikt in de selectieprocedure). Met behulp van het programma MetaCore, werden genen geassocieerd met pathways met een significantieniveau van  $p < 0.05$  weerhouden<sup>3</sup>. De op deze manier bekomen genenlijst vormde de basis van verdere selectiestappen. Aantallen genen die resteerden na deze selectiestappen worden weergegeven in tabel 2.7.

Tabel 2.7 Aantal genen resterend in de selectie: na criterium “p-waarde correlatie  $< 0.01$ ” en na additioneel criterium “gen in Metacore pathway met  $p < 0.05$ ”).

	Correlation $p < 0,01$		MetaCore $p < 0,05$	
	M	F	M	F
<b>Cd crea</b>	<b>86</b>	<b>100</b>	<b>6</b>	<b>6</b>
<b>Pb</b>	<b>81</b>	<b>229</b>	<b>8</b>	<b>4</b>
<b>SUMPCB</b>	<b>1279</b>	<b>245</b>	<b>121</b>	<b>5</b>
<b>TEQ</b>	<b>124</b>	<b>178</b>	<b>0</b>	<b>7</b>
<b>TTMA</b>	<b>127</b>	<b>75</b>	<b>15</b>	<b>9</b>
<b>hPYR</b>	<b>138</b>	<b>53</b>	<b>10</b>	<b>5</b>

### 2.3.5. Verwacht verschil in genexpressie tussen personen met p10 en de p90 waarden van de blootstelling (derde selectie criterium)

Als derde en laatste selectie criterium werd een minimale vereiste genexpressieverandering ingevoegd. Per gen en per pollutant werd de verwachte genexpressieverandering berekend - op basis van de regressievergelijking - tussen de waarde p10 en de waarde p90 voor blootstelling. Om tot een selectie van 20 genen te komen bij mannen en 20 bij vrouwen, werd respectievelijk een genexpressieverandering van 62% (M) en 51% (F) aangehouden als criterium. Voor PCBs bij de mannen, bleef een groot aantal ribosomale genen in de selectie. Hiervoor werd een small en een large ribosomal subunit gerelateerd gen geselecteerd op basis van de laagste p-waarde en grootste waarde voor verwachte genexpressieverandering (zoals beschreven in 2.3.4.). Voor OH-pyreen bij de mannen bleven 4 genen gerelateerd aan ‘histone cluster 1’ over, waaruit twee genen geselecteerd werden, op basis van de laagste p-waarden en grootste waarde voor verwachte genexpressieverandering. Tabel 2.8 geeft de geselecteerde genen weer, met hun kenmerken. Merk op dat via dit onderzoek 16 resp. 17 genen geselecteerd werden (mannen resp. vrouwen), die werden aangevuld met 4 resp. 3 genen waarvan in het onderzoek van D. van Leeuwen (2008) voor

<sup>3</sup> Metacore werkt met over of onder-representatie van bepaalde pathways in een lijst met genen tegenover een achtergrondlijst van genen, en berekent op basis van de mate van over/onderrepresentatie een p-waarde.

het eerste Steunpunt Milieu en Gezondheid correlaties met blootstelling aan milieupolluenten werden waargenomen (Mannen:CYP1B1, MAPK14, SOD2, DGAD2; vrouwen: CYP1B1, CXCL1, DGAT2).

Tabel 2.8. Selectie van 2 keer 20 genen, met de verwachte genexpressieverandering tussen p10 en p90 van de desbetreffende blootstelling op basis van de regressievergelijking, en de p-waarde van de regressie. Cd= cadmium, Pb=lood, PCB=somPCBs, teq=TEQ, ttMA= t,t-muconzuur, hpyr=OH-pyreen.

Male subset				
Exposure	GENE		Change p10-p90	p-value regression
cadmium	AREG	amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)	1,491506	0,001828
	PPP1CB	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	-0,78197	0,004014
lead	APOL6	apolipoprotein L, 6	0,816067	0,00341
	EXOC8	exocyst complex component 8	0,76852	0,008346
PCBs	RPL34	ribosomal protein L34	-1,086	0,000533
	RPS3A	ribosomal protein S3A	-1,0261	0,00096
	HLA-DQA1	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	1,069047	0,001101
	HEY1	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	0,737124	0,0078
	COX7B	cytochrome c oxidase subunit VIIb	-0,87175	0,00143
teq (~dioxins)	-			
ttMA (~benzene)	JAK2	Janus kinase 2 (a protein tyrosine kinase)	-0,79219	0,002726
	ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	0,813199	0,008079
	PPP3R1	protein phosphatase 3 (formerly 2B), regulatory subunit B, alpha isoform	1,089162	0,008207
OH-pyrene (~PAHs)	HIST1H4L	histone cluster 1, H4l	-0,96838	0,002663
	HIST1H4C	histone cluster 1, H4c	-0,97964	0,003383
	IFI6	interferon, alpha-inducible protein 6	0,741961	0,005567
	ARID4A	AT rich interactive domain 4A (RBP1-like)	1,179214	0,005756
Female subset				
Exposure	GENE		Change p10-p90	p-value regression
cadmium	SPHK1	sphingosine kinase 1	0,612384	0,007192
	ASAH1	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase)-like	-0,65911	0,008384
lead	ABCA1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	-0,89602	0,005833
PCBs	TNS1	tensin 1	0,644966	0,003335
	HEY1	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	0,601587	0,003779
teq (~dioxins)	GIT1	G protein-coupled receptor kinase interactor 1	-0,61379	0,001293
	GSTT1	glutathione S-transferase theta 1	-0,82095	0,004542
ttMA (~benzene)	HLA-G	HLA-G histocompatibility antigen, class I, G	-1,42799	0,002898
	GSTM2	glutathione S-transferase M2 (muscle)	1,121489	0,003881
	B4GALT1	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 1	0,644002	0,004408
	G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase	1,011236	0,005927
	HNMT	histamine N-methyltransferase	-1,01757	0,006841
	EIF2S1	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha, 35kDa	-0,60799	0,007212
	HLA-DRB5	major histocompatibility complex, class II, DR beta 5	-1,28894	0,007989
OH-pyrene (~PAHs)	MAN1B1	mannosidase, alpha, class 1B, member 1	0,725309	0,004731

PIAS2	protein inhibitor of activated STAT, 2	-0,64335	0,006881
SMS	spermine synthase	0,6142	0,00995

## 2.4 Discussie en conclusie

A priori kan men verwachten dat de wijziging van de genexpressie bij mannen en vrouwen op blootstelling aan een pollutant in dezelfde richting (ofwel daling ofwel stijging) verloopt. Het feit dat de waargenomen associaties in tegengestelde zin verlopen zou in de eerste plaats verklaard kunnen worden door het feit dat één of beide associaties aan het toeval te wijten zijn. Het feit dat, voor sommige pollutanten, de wijziging in de expressie van een significante meerderheid genen voor mannen en vrouwen in tegengestelde zin verloopt kan echter wijzen op het feit dat het hier gaat om wijzigingen, veroorzaakt door blootstelling aan de betreffende pollutant, die door sex-hormonen of andere specifiek sexgebonden factoren beïnvloedt worden.

Na verschillende statistische analyses en selectiecriteria op basis van p-waarden van regressie-analyses, p-waarden van pathway-analyses en de verwachte genexpressieverandering (op basis van de regressievergelijking en p10 en p90 waarden voor blootstelling), werd een finale selectie van 20 genen per geslacht weerhouden. Voor de mannen: AREG, PP1CB, APOL6, EXOC8, HLA-DQA1, COX7B, HEY1, RPL34, RPS3, JAK2, ACTA2, PPP3R1, HIST1H4L, HIST1H4C, IFI6, ARID4A, CYP1B1\*, MAPK14\*, SOD2\*, DGAT2\*. Voor de vrouwen: SPHK1, ASAH1, ABCA1, TNS1, HEY1, GSTT1, GIT1, HLA-G, GSTM2, G6PD, HNMT, HLA-DRB5, B4GALT1, EIF2S1, MAN1B1, PIAS2, SMS, CYP1B1\*, CXCL1\*, DGAT2\*. Genen met een \* werden geselecteerd op basis van correlaties met blootstellingsmerkers die beschreven werden door D. van Leeuwen (2008) in het kader van het eerste Steunpunt Milieu en Gezondheid.

## Referenties

Edwards TM, Myers JP. Environmental exposures and gene regulation in disease etiology. 2007. Environ Health Perspect. 115(9):1264-70.

Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. Cell. 7;100(1):57-70.

van Leeuwen DM, Gottschalk RW, Schoeters G, van Larebeke NA, Nelen V, Baeyens WF, Kleinjans JC, van Delft JH. 2008. Transcriptome analysis in peripheral blood of humans exposed to environmental carcinogens: a promising new biomarker in environmental health studies. Environ Health Perspect. 116(11):1519-25.

The Comparative Toxicogenomics Database (CTD). <http://ctd.mdibl.org/> accessed june 2008.

**Dit rapport draagt de volledige goedkeuring van het Steunpunt Milieu en Gezondheid.**