

Влияние курения на статус метилирования дезоксирибонуклеиновой кислоты

Киселева А. В., Жарикова А. А., Мешков А. Н.

ФГБУ “Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины” Минздрава России. Москва, Россия

Курение один из главных факторов риска многих заболеваний, таких как ишемическая болезнь сердца, инсульт, хроническая обструктивная болезнь легких. Знание механизмов, через которые курение влияет на развитие этих заболеваний, может помочь найти новые способы профилактики и лечения. Исследования последних лет показали влияние курения на эпигенетические механизмы наследования, в частности на статус метилирования дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Данный обзор посвящен анализу влияния курения на метилирование ДНК. В литературе описаны >60 генов, уровень метилирования которых достоверно ассоциирован

с курением. Выявлена связь уровня метилирования генов *AHRR*, *MMP25*, *PTGDS*, *WWC3*, *SASH1* не только с курением, но и с атеросклерозом.

Ключевые слова: курение, метилирование, EWAS, эпигенетика.

Кардиоваскулярная терапия и профилактика, 2015; 14(6): 73–77
<http://dx.doi.org/10.15829/1728-8800-2015-6-73-77>

Поступила 29/09-2015

Принята к публикации 15/10-2015

Influence of smoking on the methylizing status of desoxyribonucleic acid

Kiseleva A. V., Zharikova A. A., Meshkov A. N.

National Research Center for Preventive Medicine of the Ministry of Health. Moscow, Russia

Smoking is one of the main factors of a wide range of diseases as ischemic heart disease, stroke, chronic obstructive pulmonary disease. To know mechanisms of smoking influence on the course of these diseases might lead to discovery of novel methods of diagnostics and prevention. Recent studies showed the impact of smoking on epigenetic mechanisms of heredity, particularly on the status of DNA methylizing. Current review focuses on the analysis of smoking influence of DNA methylizing. There are >60 genes described, methylizing of which is

related to smoking. There is relation of methylizing level of genes *AHRR*, *MMP25*, *PTGDS*, *WWC3*, *SASH1* not only with smoking but atherosclerosis.

Key words: smoking, methylizing, EWAS, epigenetics.

Cardiovascular Therapy and Prevention, 2015; 14(6): 73–77
<http://dx.doi.org/10.15829/1728-8800-2015-6-73-77>

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания, EWAS — исследование ассоциаций эпигенома (Epigenome-Wide Association Studies), GO — генная онтология (Gene Ontology), HAECS — эндотелиальные клетки аорты человека (Human Aortic Endothelial Cells).

Курение является одной из основных проблем здравоохранения [1]. Несмотря на то, что количество данных о его негативном влиянии на здоровье человека постоянно увеличивается, распространенность курения по-прежнему остается высокой. Сигаретный дым содержит >2500 химических веществ, большинство из которых опасны для человека. Ранее уже было показано, что влияние курения на сердечно-сосудистые [1, 2], органов дыхания [3, 4] и злокачественные [5, 6] заболевания может сохраняться в течение длительных периодов времени после прекращения курения и может включать эпигенетическое перепрограммирование [7]. Эпигенетические исследования выявили достоверные ассоциации между курением и изменением метилирования дезоксири-

бонуклеиновой кислоты (ДНК) отдельных CpG локусов в клетках периферической крови [7-14]. Так, в рамках исследований ассоциаций эпигенома EWAS (Epigenome-Wide Association Studies), локусы >60 генов показали достоверную связь с курением. Кроме того, выявлена связь уровня метилирования генов *AHRR*, *MMP25*, *PTGDS*, *WWC3*, *SASH1* не только с курением, но и с атеросклерозом [15-17].

Данный обзор посвящен анализу влияния курения на метилирование ДНК и развитие частых хронических заболеваний человека.

Влияние курения на эпигенетические изменения в геноме человека

Курение в значительной степени оказывает негативное влияние при таких заболеваниях как

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

Тел.: +7 (901) 512-12-71

e-mail: meshkov@lipidclinic.ru

[Киселева А. В. — к.б.н., н.с. лаборатории, Жарикова А. А. — м.н.с. лаборатории, Мешков А. Н.* — к.м.н., руководитель лаборатории молекулярной генетики].

Таблица 1
Гены, метилирование которых ассоциировано с курением

Ген	Источник
<i>F2RL3</i>	[7-11, 13]
<i>GPR15</i>	[7, 8, 11, 13]
<i>CNTNAP2</i>	[7, 10, 25]
<i>GFI1</i>	[10, 25]
<i>GNG12</i>	[10, 13]
<i>LIM2</i>	[7, 11]
<i>LRP5</i>	[10, 13]
<i>MYO1G</i>	[10, 25]
<i>RARA</i>	[10, 13]
<i>AHRR</i>	[10, 13, 25-27]
<i>ORAI2, FNDC8, NCAPD3, SLAIN1, FAM83A, AMY1A, RBM3, CRLS1, C7orf70, PTPRT</i>	[8]
<i>LRRN3, LIM2, MYLK, ADHFE1, SLAMF1, APBA2, CEBPE, TIPARP, TM4SF19, ARHGAP25, FASLG</i>	[7]
<i>CYP1A1, ENSG00000225718, RUNX1, EXT1, TTC7B, HLA-DPB2</i>	[25]
<i>HNRPUL1, CFBF, LRRC32, OR2B6, ZNF384, AKT3, ABTB1, SPATA12, POU3F1, NCBP1, LOC124220</i>	[11]
<i>HIVEP3, CACNA1D, ALPPL2, TIAM2, ZC3H3, PCDH9, LINGO3</i>	[10]
<i>IER3, ALPP, ZNF385D, PRSS23, AVPR1B, PSEN2, LINC00299, RPS6KA2, KIAA0087</i>	[13]

ишемическая болезнь сердца, инсульт, хроническая обструктивная болезнь легких, сахарный диабет 2 типа и ожирение; понимание механизмов, через которые курение увеличивает уязвимость при этих заболеваниях, может помочь найти новые способы профилактики и лечения [12]. Сравнительно недавние публикации показали, что связанные с курением изменения в метилировании ДНК могут способствовать этим заболеваниям. У млекопитающих метилирование ДНК происходит на 5' углеродном остатке цитозина в CpG динуклеотидах [7, 18] и является весьма пластичным, тканеспецифичным явлением, которое может отражать воздействие внешних стимулов, таких, как курение [7, 8]. Были показаны достоверные ассоциации между курением и гиперметилированием промоторной области генов [13, 19]. Гиперметилирование промотора эпигенетически инактивирует экспрессию гена путем метилирования цитозина в CpG динуклеотидных островках в промотор-энхансерной области гена [13]. Было выявлено, что частота метилирования промотора, значительно выше среди курильщиков, по сравнению с никогда не курившими [20]. Помимо специфичного гиперметилирования генов [21], курение также связано с глобальным гипометилированием [22]. Данные другого исследования показывают, что курение имеет прямое влияние на эпигеном в ткани легких, которое может быть обнару-

жено в ДНК периферической крови и может способствовать риску развития рака [9].

В то же время исследования ассоциаций эпигенома с помощью ДНК, полученной из цельной крови, осложняется неоднородностью типов клеток в крови. ДНК из периферической крови представляет собой смесь из различных подтипов лейкоцитов, а изменение пропорций лейкоцитов может изменять истинные эпигенетические ассоциации между метилированием и зависимой переменной [14]. В работе, посвященной изучению гипометилирования CpG сайта гена *GPR15* в разных подтипах Т клеток, было показано, что гипометилирование ДНК в этом локусе, наблюдающееся в белых клетках крови курильщиков, не возникает путем непосредственного влияния соединений табакокурения на метилирование ДНК, а скорее путем обогащения периферической крови популяцией лимфоцитов, индуцированной курением табака [14]. Однако уже найдены подходы, направленные на устранение этих сложностей, например, использование флуоресцентно-активированной сортировки клеток [23, 24].

Метилирование ДНК является важным медиатором между геном и окружающей средой. Хотя анализ метилирования ДНК генома позволяет определить дифференциально метилированные CpG сайты и гены, есть много информации о том, что гены функционируют не независимо друг от друга, а в сетях [12]. Поэтому очень важно не только выявить отдельные локусы, связанные с курением, но использовать теорию генных сетей для преобразования информации об одном локусе метилирования в более целостное понимание последствий курения на функцию протеома и клетки в целом [12].

В настоящее время уже выявлено большое количество CpG островков различных генов, метилирование которых связано с курением (таблица 1). Из них *AHRR* и *CYP1A1* играют ключевую роль в сигнальном пути арил-углеводородного рецептора, который выступает посредником детоксикации компонентов табачного дыма. *GFI1* участвует в разнообразных процессах развития [25].

Был проведен GO (Gene Ontology — генная онтология) анализ с помощью ресурса DAVID Bioinformatic Database [28, 29]. Выполнена функциональная аннотация (Functional Annotation Clustering) всех генов, метилирование которых ассоциировано с курением (таблица 1). Эта база данных обеспечивает полный набор функциональных инструментов аннотации для понимания биологического смысла большого количества генов. В результате было получено 19 кластеров. При детальном рассмотрении первых трех кластеров, куда попало наибольшее количество генов с наименьшим p value ($p < 0,05$) (таблица 2), стало понятно, что выбранный список

Таблица 2

Кластеризация генов, ассоциированных с курением

№	Функциональная группа	Количество генов	% от общего количества генов	p value	Гены
1	Миелоидная дифференцировка клеток	4	6,7	0,0029	<i>PSEN2, CEBPE, CBFEB, RUNX1</i>
	Гемопоз	5	8,4	0,0060	<i>PSEN2, TIPARP, CEBPE, CBFEB, RUNX1</i>
	Развитие кроветворных или лимфоидных органов	5	8,4	0,0084	<i>PSEN2, TIPARP, CEBPE, CBFEB, RUNX1</i>
	Развитие иммунной системы	5	8,4	0,0103	<i>PSEN2, TIPARP, CEBPE, CBFEB, RUNX1</i>
2	Домен: Ig-like C2-type	4	6,7	0,0036	<i>PTPRT, LRRN3, LINGO3, SLAMF1</i>
	Домен: фибронектин тип-III	3	5,0	0,0134	<i>FNDC8, MYLK, LRRN3</i>
	IPR003961: фибронектин, тип III	4	6,7	0,0225	<i>FNDC8, MYLK, PTPRT, LRRN3</i>
	Sm00060:fn3	4	6,7	0,0361	<i>FNDC8, MYLK, PTPRT, LRRN3</i>
3	Топологический домен: внеклеточный	17	28,8	0,0048	<i>OR2B6, GPR15, PTPRT, CNTNAP2, IER3, AVPR1B, LIM2, TM4SF1, PCDH9, CACNA1D, LRP5, LRRN3, F2RL3, FASLG, LINGO3, SLAMF1, LRRC32</i>
	Топологический домен: цитоплазматический	19	32,2	0,0075	<i>OR2B6, PSEN2, GPR15, PTPRT, CNTNAP2, IER3, AVPR1B, EXT1, LIM2, TM4SF1, PCDH9, CACNA1D, LRP5, LRRN3, F2RL3, FASLG, LINGO3, SLAMF1, LRRC32</i>
	Сайт гликозилирования: N – связанный (glcnac...)	21	35,5	0,0133	<i>LOC124220, OR2B6, PTPRT, PRSS23, CNTNAP2, IER3, AVPR1B, EXT1, LIM2, TM4SF1, ALPP, ALPPL2, PCDH9, CACNA1D, LRP5, LRRN3, F2RL3, FASLG, LINGO3, SLAMF1, LRRC32</i>
	Гликопротеин	21	35,5	0,0243	<i>LOC124220, OR2B6, PTPRT, PRSS23, CNTNAP2, IER3, AVPR1B, EXT1, LIM2, TM4SF1, ALPP, ALPPL2, PCDH9, CACNA1D, LRP5, LRRN3, F2RL3, FASLG, LINGO3, SLAMF1, LRRC32</i>
	Мембрана	27	45,7	0,0335	<i>OR2B6, PSEN2, CNTNAP2, AVPR1B, ALPP, ALPPL2, CYP1A1, LRRN3, CACNA1D, LRP5, F2RL3, LINGO3, SLAMF1, AHRR, AKT3, ORAI2, GPR15, PTPRT, IER3, EXT1, LIM2, GNG12, TM4SF1, PCDH9, FASLG, CRLS1, LRRC32</i>
	Трансмембранный регион	22	37,2	0,0413	<i>OR2B6, PSEN2, GPR15, ORAI2, PTPRT, CNTNAP2, IER3, AVPR1B, EXT1, LIM2, TM4SF1, ALPP, PCDH9, CACNA1D, LRRN3, LRP5, F2RL3, FASLG, LINGO3, SLAMF1, CRLS1, LRRC32</i>
	Дисульфидная связь	15	25,4	0,0492	<i>OR2B6, PTPRT, PRSS23, CNTNAP2, AVPR1B, LIM2, ALPP, ALPPL2, CACNA1D, LRP5, LRRN3, F2RL3, FASLG, LINGO3, SLAMF1</i>

генов невозможно однозначно охарактеризовать одним или несколькими близкими метаболическими путями. Это свидетельствует о том, что гены, ассоциированные с курением, относятся к множеству разнообразных биологических процессов, клеточным компонентам и обладают разными молекулярными функциями.

Генетическая и эпигенетическая связь курения и атеросклероза

Курение является важным фактором риска для многих болезней человека, включая сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) [1, 2]. Поэтому понимание молекулярных механизмов, с помощью которых курение приводит к развитию ССЗ, может помочь в создании как доклинических диагностических биомаркеров, так и лекарственных мишеней для терапии ССЗ [16]. Появляется все больше дока-

зательств в пользу гипотезы, что окислительный стресс и активация иммунной системы обеспечивают патофизиологическую связь между курением и ССЗ [30, 31].

Атеросклероз является ведущей причиной смертности в развитых странах [17]. В возникновении атеросклероза важную роль играют эндотелиальные клетки, т.к. их дисфункция вызывает миграцию лейкоцитов в интиму сосудов, приводящую к образованию пенистых клеток [32], которые являются признаком жировых полос и бляшек [17, 33]. Играя важную роль в неоваскуляризации внутри бляшек, эндотелиальные клетки способствуют кровоизлияниям внутри бляшек и их нестабильности. Среди факторов, влияющих на образования бляшек, было установлено, что курение повышает размер повреждений и их количество [17, 34, 35]. Сига-

ретный дым имеет сложный химический состав и содержит многочисленные канцерогены [16, 36], такие как полициклические ароматические углеводороды, которые могут привести к мутагенным и эпигенетическим изменениям в геноме курильщиков [16]. Воздействие сигаретного дыма на развитие атеросклероза проходит через множество путей, участвующих в широком диапазоне клеточных процессов, таких как воспаление, миграция и пролиферация клеток [17, 37].

На основе большого популяционного исследования была выявлена потенциальная роль *SASH1* в развитии атеросклероза [31]. Ранее было показано, что экспрессия *SASH1* в циркулирующих моноцитах заметно увеличилась у курильщиков по сравнению с некурящими и также положительно коррелировала с количеством бляшек в сонных артериях [38]. *SASH1* принадлежит к семейству сигнальных и адапторных белков SLY [38]. Он содержит один домен SH3, один биспиральный и два домена SAM, которые вовлечены в белок-белковые взаимодействия [39]. Экспрессия *SASH1* подавляется при раке кишечника и молочной железы [38, 40], а избыточная экспрессия *SASH1* уменьшает пролиферацию и инвазивность различных раковых клеточных линий при увеличении скорости их апоптоза [41, 42].

В работе [17] на основе генно-экспрессионного анализа и иммуноокрашивания было показано, что *SASH1* экспрессировался в клетках сосудов (эндотелиальные клетки аорты человека (HAECs — Human Aortic Endothelial Cells), гладкомышечные клетки) и в моноцитах/макрофагах. Его тканевая экспрессия была значительно выше в пораженных атеросклерозом сонных артериях курильщиков по сравнению с некурящими ($p < 0,01$) [17]. В HAECs *SASH1* экспрессировался в основном в цитоплазме, а нокдаун *SASH1* привел к увеличению миграции клеток, пролиферации и ангиогенезу. Транскриптомный и метаболический анализы показали, что *SASH1* сайленсинг приводит к уменьшению экспрессии *CYP1A1*, возможно, через ингибирование активности TP53 [17].

Помимо канцерогенов табачный дым содержит многочисленные агонисты AhR сигналинга [43]. Активация сигнального пути AhR, вероятно, играет роль в атерогенезе [44, 45]. Было выявлено, что *AHRR* транскрипционно регулируется с помощью активации рецептора Ah (AhR) пути [16, 46, 47].

На основании многонационального исследования атеросклероза ($n=1256$) было показано, что метилирование CpG островка гена *AHRR* (cg05575921) достоверно ($p=6,1 \times 10^{-134}$) связано с курением (ныне курящие vs никогда не куривших). Функционально cg05575921 был расположен в предположительно регуляторном элементе экспрессии гена (энхансере) [16]. Эти данные свидетельствуют, что метилирова-

ние *AHRR* может быть функционально связано с экспрессией *AHRR* в моноцитах и является потенциальным биомаркером субклинического атеросклероза у курильщиков [16].

Чтобы получить более полное представление общей изменчивости экспрессии генов, было проведено исследование транскриптома циркулирующих моноцитов, главном типе клеток, участвующих в иммунозависимых заболеваниях и атеросклерозе [15]. В результате исследования 1662 экспрессионных признака (13,0%) были связаны, по меньшей мере, с одним фактором риска. Анализ геномных взаимодействий предполагает, что генетическая изменчивость и факторы риска в основном действуют совокупно на экспрессию генов. Из-за структуры корреляции между экспрессионными признаками, изменчивость факторов риска может быть охарактеризована ограниченным набором экспрессий независимых генов, которые могут иметь биологическое и клиническое значение [15]. Например, экспрессионные признаки, связанные с курением, были более тесно связаны с атеросклерозом сонных артерий, чем с самим курением [15]. Показано, что распространенность атеросклеротических бляшек в правой и левой сонных артериях была сильно увеличена у курильщиков. Из 18 генов, экспрессия которых была достоверно связана с курением, четыре коррелировали с количеством бляшек сонных артерий: *PTGDS* — отрицательно, а *MMP25*, *SASH1* и *WWC3* — положительно. В многомерной модели, включая четыре экспрессионных признака и курение, а также возраст и пол, *PTGDS* и *SASH1* остались достоверно ассоциированы с количеством бляшек, в то время как связь с количеством бляшек сонных артерий для *MMP25*, *WWC3* и курения больше не была достоверной [15]. Это позволило предположить, что связь между курением и атеросклерозом в основном отражается (или опосредуется) по влиянию на экспрессию этих четырех генов. Тот факт, что экспрессия *PTGDS* и *SASH1* осталась ассоциированной с бляшками сонных артерий после корректировки на курение, может указывать на более широкое участие этих генов в атеросклерозе, нежели исключительный эффект от курения. Однако возможно, что экспрессия этих двух генов более точно отражает употребление табака, чем дихотомическая переменная, используемая для определения статуса курения [15]. *PTGDS* кодирует простагландин D синтазу, участвующую в сокращении/расслаблении гладких мышц и в ингибировании агрегации тромбоцитов. Известно, что эти функции подвержены изменениям под воздействием табака [15].

Заключение

Таким образом, в многочисленных исследованиях у курящих по сравнению с некурящими была

показана связь метилирования с локусами >60 генов, причем для некоторых генов эта связь была подтверждена несколькими исследованиями. Помимо этого, была выявлена связь 5 генов (*AHRR*, *MMP25*, *PTGDS*, *WWC3* и *SASH1*) с развитием атеросклероза и с курением [15-17]. С помощью проведенного GO анализа генов EWAS, ассоциированных

с курением, оказалось, невозможно однозначно охарактеризовать их одним или несколькими близкими метаболическими путями. Из чего можно сделать вывод, что гены EWAS, связанные с курением, относятся к множеству разнообразных биологических процессов и обладают разными молекулярными функциями.

Литература

- Breitling LP. Current genetics and epigenetics of smoking/tobacco-related cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33: 1468-72.
- Conen D, Everett BM, Kurth T, et al. Smoking, smoking status, and risk for symptomatic peripheral artery disease in women: a cohort study. *Ann Intern Med* 2011; 154: 719-26.
- Louhelainen N, Stark H, Mazur W, et al. Elevation of sputum matrix metalloproteinase-9 persists up to 6 months after smoking cessation: a research study. *BMC Pulm Med* 2010; 10: 13.
- Bouloukaki I, Tsiligianni IG, Tzoumakidou M, et al. Sputum and nasal lavage lung-specific biomarkers before and after smoking cessation. *BMC Pulm Med* 2011; 11: 35.
- Vineis P, Alavanja M, Buffler P, et al. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 99-106.
- Luo J, Margolis KL, Wactawski-Wende J, et al. Association of active and passive smoking with risk of breast cancer among postmenopausal women: a prospective cohort study. *BMJ* 2011; 342: d1016.
- Wan ES, Qiu W, Baccarelli A, et al. Cigarette smoking behaviors and time since quitting are associated with differential DNA methylation across the human genome. *Hum Mol Genet* 2012; 21(13): 3073-82.
- Breitling LP, Yang R, Korn B, et al. Tobacco-smoking-related differential DNA methylation: 27K discovery and replication. *Am J Hum Genet* 2011; 88(4): 450-7.
- Shenker NS, Polidoro S, van Veldhoven K, et al. Epigenome-wide association study in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Turin) identifies novel genetic loci associated with smoking. *Hum Mol Genet* 2013; 22(5): 843-51.
- Zeilinger S, Kühnel B, Klopp N, et al. Tobacco smoking leads to extensive genome-wide changes in DNA methylation. *PLoS One* 2013; 8(5): e63812.
- Sun YV, Smith AK, Conneely KN, et al. Epigenomic association analysis identifies smoking-related DNA methylation sites in African Americans. *Hum Genet* 2013; 132(9): 1027-37.
- Dogan MV, Shields B, Cutrona C, et al. The effect of smoking on DNA methylation of peripheral blood mononuclear cells from African American women. *BMC Genomics* 2014; 15: 151.
- Tsarprouni LG, Yang TP, Bell J, et al. Cigarette smoking reduces DNA methylation levels at multiple genomic loci but the effect is partially reversible upon cessation. *Epigenetics* 2014; 9(10): 1382-96.
- Bauer M, Linsel G, Fink B, et al. A varying T cell subtype explains apparent tobacco smoking induced single CpG hypomethylation in whole blood. *Clin Epigenetics* 2015; 7(1): 81.
- Zeller T, Wild P, Szymczak S, et al. Genetics and beyond—the transcriptome of human monocytes and disease susceptibility. *PLoS ONE* 2010; 5(5): e10693.
- Reynolds LM, Wan M, Ding J, et al. 2015. DNA Methylation of the Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor Associates with Cigarette Smoking and Subclinical Atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Genet* 2015; pii: CIRCGENETICS.115.001097.
- Weidmann H, Touat-Hamici Z, Durand H, et al. *SASH1*, a new potential link between smoking and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2015; 242(2): 571-9.
- Lister R, Pelizzola M, Downen RH, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenetic differences. *Nature* 2009; 462: 315-22.
- Soma T, Kaganoi J, Kawabe A, et al. Nicotine induces the fragile histidine triad methylation in human esophageal squamous epithelial cells. *Int J Cancer* 2006; 119(5): 1023-7.
- Liu Y, Lan Q, Siegfried JM, et al. Aberrant promoter methylation of p16 and MGMT genes in lung tumors from smoking and never-smoking lung cancer patients. *Neoplasia* 2006; 8: 46-51.
- Kaur J, Demokan S, Tripathi SC, et al. Promoter hypermethylation in Indian primary oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2010; 127(10): 2367-73.
- Hsiung DT, Marsit CJ, Houseman EA, et al. Global DNA methylation level in whole blood as a biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16(1): 108-14.
- Accomando WP, Wiencke JK, Houseman EA, et al. Quantitative reconstruction of leukocyte subsets using DNA methylation. *Genome Biol* 2014; 15(3): R50.
- Reinius LE, Acevedo N, Joerink M, et al. Differential DNA methylation in purified human blood cells: implications for cell lineage and studies on disease susceptibility. *PLoS One* 2012; 7(7): e41361.
- Joubert BR, Håberg SE, Nilsen RM, et al. 450K epigenome-wide scan identifies differential DNA methylation in newborns related to maternal smoking during pregnancy. *Environ Health Perspect* 2012; 120: 1425-31.
- Novakovic B, Ryan J, Pereira N, et al. Postnatal stability, tissue, and time specific effects of AHRR methylation change in response to maternal smoking in pregnancy. *Epigenetics* 2014; 9(3): 377-86.
- Monick MM, Beach SR, Plume J, et al. Coordinated changes in AHRR methylation in lymphoblasts and pulmonary macrophages from smokers. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2012; 159B(2): 141-51.
- DAVID <https://david.ncicrf.gov/> (28 September 2015).
- Sherman BT, Huang da W, Tan Q, et al. DAVID Knowledgebase: a gene-centered database integrating heterogeneous gene annotation resources to facilitate high-throughput gene functional analysis. *BMC Bioinformatics* 2007; 8: 426.
- Sopori M. Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 372-7.
- Verdugo RA, Zeller T, Rotival M, et al. Graphical Modeling of Gene Expression in Monocytes Suggests Molecular Mechanisms Explaining Increased Atherosclerosis in Smokers. *PLoS ONE* 2013; 8(11): e50888.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32(9): 2045-51.
- Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(7): 508-19.
- Redgrave JNE, Lovett JK, Rothwell PM. Histological features of symptomatic carotid plaques in relation to age and smoking: the oxford plaque study. *Stroke J Cereb Circ* 2010; 41(10): 2288-94.
- McEvoy JW, Blaha MJ, DeFilippis AP, et al. Cigarette smoking and cardiovascular events: role of inflammation and subclinical atherosclerosis from the multiethnic study of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; 35(3): 700-9.
- Talhout R, Schulz T, Florek E, et al. Hazardous compounds in tobacco smoke. *Int J Environ Res Public Health* 2011; 8(2): 613-28.
- Messner B, Bernhard D. Smoking and cardiovascular disease: mechanisms of endothelial dysfunction and early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; 34(3): 509-15.
- Zeller C, Hinzmann B, Seitz S, et al. *SASH1*: a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q24.3 is downregulated in breast cancer. *Oncogene* 2003; 22(19): 2972-83.
- Martini M, Gnann A, Scheikl D, et al. The candidate tumor suppressor *SASH1* interacts with the actin cytoskeleton and stimulates cell-matrix adhesion. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43(11): 1630-40.
- Rimkus C, Martini M, Friederichs J, et al. Prognostic significance of downregulated expression of the candidate tumour suppressor gene *SASH1* in colon cancer. *Br J Cancer* 2006; 95(10): 1419-23.
- Chen E, Chen Y, Dong L, et al. Effects of *SASH1* on lung cancer cell proliferation, apoptosis, and invasion in vitro. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* 2012; 33(5): 1393-401.
- Lin S, Zhang J, Xu J, et al. Effects of *SASH1* on melanoma cell proliferation and apoptosis in vitro. *Mol Med Rep* 2012; 6(6): 1243-8.
- Dertinger SD, Silverstone AE, Gasiewicz TA. Influence of aromatic hydrocarbon receptor-mediated events on the genotoxicity of cigarette smoke condensate. *Carcinogenesis* 1998; 19: 2037-42.
- Savouret JF, Berdeaux A, Casper RF. The aryl hydrocarbon receptor and its xenobiotic ligands: a fundamental trigger for cardiovascular diseases. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2003; 13: 104-13.
- Kerley-Hamilton JS, Trask HW, Ridley CJ, et al. Inherent and benzo[a]pyrene-induced differential aryl hydrocarbon receptor signaling greatly affects life span, atherosclerosis, cardiac gene expression, and body and heart growth in mice. *Toxicol Sci* 2012; 126(2): 391-404.
- Kazantseva MG, Highton J, Stamp LK, et al. Dendritic cells provide a potential link between smoking and inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2012; 14(5): R208.
- Awji EG, Chand H, Bruse S, et al. Wood Smoke Enhances Cigarette Smoke-Induced Inflammation by Inducing the Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor in Airway Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2015; 52: 377-86.