

# BÚSQUEDA DE NUEVOS BIOMARCADORES EPIGENÉTICOS EN CANCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO

---

*Máster en Investigación en Ciencias de la Salud UPNA 2015-2016*

*TFM realizado por Ane Ulazia Garmendia*

**Directores: Dr. David Guerrero y Dra. Esperanza Martín  
(Navarrabiomed – Centro de Investigación Biomédica)**

**Tutor: Miguel Ángel Barajas (Universidad Pública de Navarra)**



*Junio-2016*



# **BÚSQUEDA DE NUEVOS BIOMARCADORES EPIGENÉTICOS EN CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO**

**Máster en Investigación en Ciencias de la Salud UPNA 2015-2016**

**TFM presentado por Ane Ulazia Garmendia, realizado en el Grupo de Epigenética del Cáncer de Navarrabiomed**

El presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección y estimamos que puede ser presentado ante el tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, junio 2016

**Dr. David Guerrero**

**Dra. Esperanza Martín**

**Dr. Miguel Ángel Barajas**

## RESUMEN

### Introducción

El estudio de las alteraciones epigenéticas contribuye a la caracterización del subtipo triple negativo (TN) de cáncer de mama (CM).

### Objetivos

Identificar genes diferencialmente metilados entre CM TN y tejido no neoplásico.

### Material y Métodos

El estado de metilación de *DLEU7* y *NKAPL* se estudió mediante pirosecuenciación en tumores TN, su tejido adyacente, tejido no neoplásico y líneas celulares. La expresión proteica se analizó por IHQ en tejidos y por PCR a tiempo real y Western Blot en líneas celulares.

### Resultados

Se encontraron niveles más elevados de metilación de *DLEU7* y *NKAPL* en tejido tumoral comparado con tejido no neoplásico. Esta alteración epigenética, también se encuentra en el tejido adyacente al tumor, estando correlacionada con el grado de expresión proteica. Hay una tendencia hacia un peor pronóstico de las pacientes con hipermetilación.

### Conclusiones

Esta es la primera descripción sobre la hipermetilación de *DLEU7* y la *NKAPL* en CM TN.

**Palabras clave:** Cáncer mama, Epigenética, triple-negativo, pronóstico

## SUMMARY

### Introduction

The study of epigenetic alterations contributes to the characterization of triple negative (TN) breast cancer (BC).

### Aims

To identify genes differentially methylated in TN BC compared to non-neoplastic tissue.

### Methods

The methylation status of *DLEU7* and *NKAPL* was studied by pyrosequencing in TN BC tissues, adjacent-to-tumour tissue, non-neoplastic tissue and cell lines. Protein expression was analysed by IHC in tissues and by real time PCR and Western Blot in cell lines.

### Results

We found that *DLEU7* and *NKAPL* methylation levels are higher in tumour than in non-neoplastic tissue. The adjacent-to-tumour tissue harbours also these epigenetic alterations, and it is associated with a marked reduced mRNA and protein expression. There is a tendency towards a worse prognosis in patients with these epigenetic aberrations.

### Conclusions

This is the first report showing *DLEU7* and *NKAPL* hypermethylation.

**Key words:** Breast cancer, Epigenetics, triple-negative, prognosis

## ÍNDICE

<b>GLOSARIO DE ABREVIATURAS</b> .....	5
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	6
1. Cáncer de mama .....	6
2. Epigenética y cáncer .....	8
2.1 Mecanismo de la metilación .....	8
2.2 Alteraciones epigenéticas en cáncer .....	8
2.3 Valor clínico de las alteraciones epigenéticas .....	9
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	11
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	12
1. Pacientes .....	12
2. Líneas celulares .....	13
3. Análisis bioinformático .....	13
4. Extracción de DNA .....	14
5. Pirosecuenciación .....	14
5.1 Diseño de primers .....	15
5.2 Tratamiento con bisulfito .....	15
5.3 Amplificación por PCR .....	16
5.4 Pirosecuenciación .....	17
6. Extracción de RNA .....	18
7. Retrotranscripción y PCR a tiempo real .....	18
7.1 Retrotranscripción.....	18
7.2 PCR a tiempo real .....	19
7.3 Análisis de los resultados .....	19
8. Inmunohistoquímica .....	19
9. Western Blot .....	20
10. Análisis estadístico .....	21
<b>RESULTADOS</b> .....	22
1. Análisis bioinformático .....	22
2. Análisis de la metilación por pirosecuenciación de <i>DLEU7</i> y <i>NKAPL</i> .....	24
2.1 Metilación en líneas .....	24
2.2 Metilación en tejidos .....	26
3. Expresión de mRNA de <i>NKAPL</i> en líneas celulares .....	30
4. Relación entre expresión y metilación de <i>NKAPL</i> .....	30
5. Expresión proteica de <i>DLEU7</i> y <i>NKAPL</i> .....	31
6. Valoración inmunohistoquímica de <i>DLEU7</i> .....	31
7. Western blot de <i>NKAPL</i> .....	33
8. Valor clínico de la metilación de <i>DLEU7</i> y <i>NKAPL</i> .....	33
<b>DISCUSIÓN</b> .....	35
<b>CONCLUSIONES</b> .....	38
<b>LIMITACIONES</b> .....	35
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	39

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

**CpG/CG:** Citosina-Guanina

**CM:** Cáncer de mama

**DNasa:** Desoxirribonucleasa

**dNTP:** desoxirribonucleótido trifosfato

**DMEM:** *Dubelcco's Modified Eagle Medium*

**EGF:** *Epidermal growth factor*

**FBS:** *Fetal Bovine Serum*

**HER2:** Receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

**MEBM:** *Mammary Epithelial Basal Medium*

**mRNA:** RNA mensajero

**pb:** pares de bases

**PBS:** *Phosphate Buffered Saline*

**PCR:** *Polymerase Chain Reaction*

**PPi:** Pirofosfato

**RE:** Receptor de estrógeno

**qPCR:** PCR cuantitativa

**RNasa:** Ribonucleasa

**RP:** receptor de progesterona

**rpm:** revoluciones por minuto

**RT:** Retrotranscripción

**TBS:** *Tris Buffered Saline*

**TN:** Triple Negativo

**TSS:** *Transcription start site*

## INTRODUCCIÓN

### 1. CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama (CM) es la enfermedad neoplásica más frecuente entre las mujeres y una de las principales causas de muerte por cáncer en todo el mundo (1, 2). En los últimos años se ha descrito un aumento de su incidencia, con una tasa de mortalidad elevada a pesar de su tendencia a la disminución (3), ya que ha habido un aumento en la supervivencia global que se ha atribuido a los avances en los programas de detección precoz de cáncer de mama en los que Navarra ha sido pionera en su implantación así como a la incorporación en clínica de nuevas terapias dirigidas en función de las características de las pacientes.

A nivel mundial, se estima que más de un millón de mujeres son diagnosticadas de CM cada año, y más de 400.000 fallecerán a causa de la enfermedad (4). En el año 2012, la mayor incidencia, mortalidad y prevalencia a 5 años de cáncer en mujeres, fue para el CM con valores del 29%, 15,5% y 40,8%, respectivamente (5).

En el último Registro de Cáncer de Navarra publicado en 2014 por el Servicio de Epidemiología, Prevención y Promoción de la Salud del Gobierno de Navarra, el 27,2% de los tumores malignos diagnosticados en mujeres en los años 2008-9 fueron tumores de mama, con una tasa ajustada a la población mundial de 69,5% (6) .

La edad es el principal factor de riesgo no modificable en el cáncer de mama, con un incremento de la incidencia a partir de los 35 años y una estabilización a partir de los 55, coincidiendo con la menopausia (7). La aparición de cáncer de mama puede explicarse por factores genéticos hereditarios siguiendo un modelo de transmisión autosómica dominante en aproximadamente un 10% de los casos, a diferencia del cáncer de mama familiar sin un modelo de transmisión establecido y cáncer esporádico, en función de criterios previamente establecidos (8, 9). La progresión tumoral se explica como el resultado de la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas en genes supresores de tumores y proto-oncogenes combinada con la existencia de factores ambientales, hormonales, y reproductivos (10). A pesar de que las tasas de incidencia del cáncer de mama se mantienen estables (6), la mortalidad debida a esta enfermedad sigue siendo elevada (11) lo que hace imprescindible el estudio de nuevos biomarcadores con valor diagnóstico, pronóstico y/o predictivo de respuesta al tratamiento oncológico que puedan caracterizar mejor a los pacientes y contribuir a un seguimiento y tratamiento más personalizado de las pacientes.

#### Subtipos de cáncer de mama

El CM se caracteriza por ser uno de los tipos de cáncer más heterogéneo desde el punto de vista patológico y clínico, al agrupar numerosas entidades histológicas con pronóstico clínico variable. Los tumores de mama han sido tradicionalmente clasificados en función de su histología, lo que no llega a explicar estas diferencias en el pronóstico de pacientes, que incluso es variable en pacientes con tumores morfológicamente similares.

De este modo, la heterogeneidad patológica del CM se refleja en la existencia de distintos subtipos moleculares (Luminal A, Luminal B, HER2 y triple negativo) caracterizados por la expresión diferencial de paneles de genes cruciales en el inicio y progresión del cáncer detectada mediante *arrays* de expresión (12). El uso de la Inmunohistoquímica (IHQ) para el análisis de proteínas es una herramienta básica en los servicios hospitalarios de Patología, y ha supuesto un importante avance para la clasificación de los tumores en los subtipos mencionados que reemplaza a la clasificación molecular(12). Ello se debe a la existencia de marcadores IHQ subrogados recomendados por un panel de expertos en la última Conferencia Internacional de Cáncer de mama de *St. Gallen* de 2013 (13). En este sentido se acordó una clasificación del CM basada en la expresión de receptores de expresión nuclear de estrógeno (RE) y progesterona (RP) y receptor de membrana tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). Recientemente, se ha descrito la inclusión del marcador

nuclear de proliferación celular Ki-67 como marcador para la distinción de tumores de bajo y alto grado (14).

Los subtipos anatomopatológicos del CM reconocidos por el panel de expertos de *St Gallen* son los siguientes:

### **Subtipo Luminal**

Constituyen más del 60% de los tumores mamarios y son positivos para los receptores de estrógeno y progesterona. Este hecho les hace hormono-dependientes por lo que responden a la terapia hormonal con Tamoxifeno y a los fármacos inhibidores de aromatasas, y se consideran de buen pronóstico. Este subtipo se divide a su vez en 2 grupos:

- Luminal A: Estos tumores son RE positivos y RP positivos. Además, presentan niveles de expresión de Ki-67 bajos (< 20%). Se considera que tienen un menor riesgo de desarrollar recidiva.
- Luminal B:
  - Luminal B HER2 negativo: Son RE positivos y HER2 negativos y cumplen al menos una de las siguientes premisas: presentar niveles de expresión de Ki-67 altos y/o RP negativo. Tienen un riesgo alto de recidiva.
  - Luminal B HER2 positivo: Son RE positivos y presentan sobreexpresión o amplificación de HER2. Los niveles de expresión tanto de PR como de Ki-67 pueden ser variables. Presentan peor pronóstico que el resto de luminales (14). Las pacientes de este subtipo se benefician, aparte de la terapia hormonal, del tratamiento con el anticuerpo monoclonal dirigido al bloqueo de la actividad de HER2 (Trastuzumab).

### **Subtipo HER2**

Este tipo de tumores presentan sobreexpresión de HER2 por amplificación del gen del mismo nombre, así como ausencia de expresión de RE y RP. Se consideran más agresivos que los anteriores pero responden bien al tratamiento con Trastuzumab.

### **Subtipo triple negativo (TN)**

Su nombre deriva de la ausencia de expresión de RE, RP y HER2 característica de estos casos. Las pacientes con CM TN carecen de tratamientos dirigidos, al no presentar ninguna de las dianas del resto de subtipos (15). El TN es el subtipo más agresivo de CM, caracterizado por la aparición de recidivas viscerales locales y a distancia y muerte de las pacientes a partir de los cinco años tras el diagnóstico (16, 17). Estudios recientes sobre perfiles de expresión génica confirman la heterogeneidad del CM TN y proponen seis subgrupos (18): basal 1, basal 2, inmunomodulador, tipo luminal, receptor de andrógenos positivo y mesenquimal.

Aunque los distintos marcadores inmunohistoquímicos mencionados se consideran el *gold standard* para distinguir los subtipos de CM, el pronóstico de estas pacientes sigue siendo muy heterogéneo aún dentro de cada grupo, por lo que hay una necesidad urgente de identificar nuevos biomarcadores con valor clínico para estratificar a las pacientes de buen y mal pronóstico (19). Además las pacientes con CM TN carecen lamentablemente de un tratamiento dirigido eficaz, lo que contribuye a su mal pronóstico (20). Todo ello junto con la alta incidencia de esta enfermedad hacen imprescindible incorporar nuevos biomarcadores que ayuden a detectar pacientes de peor pronóstico o que contribuyan a la elección de un tratamiento oncológico dirigido más eficaz en combinación con la quimioterapia y radioterapia convencionales, lo que contribuye a refinar el seguimiento clínico de las pacientes (13).



## 2. EPIGENÉTICA Y CÁNCER

La Epigenética estudia los mecanismos que influyen en la expresión de genes heredables pero que ocurren sin cambios en la secuencia de DNA (21). Estos mecanismos incluyen la metilación del DNA, modificaciones post-traduccionales de las proteínas histonas (fosforilación, acetilación, metilación) y el patrón de expresión de microRNAs (22).

El mecanismo epigenético más conocido es la metilación del DNA, que juega un papel crucial y dinámico en la regulación de la expresión génica. Mediante mecanismos epigenéticos las células se especializan y se estabilizan para mantener un patrón de metilación único a lo largo de la vida del organismo, suprimiendo la expresión de genes virales y otros elementos de DNA ajenos al huésped, y proporcionando un mecanismo para la respuesta a estímulos del medio (23). La metilación aberrante del DNA y su impacto en la expresión de genes han sido implicados en la progresión de muchas enfermedades, incluido el cáncer (24).

### 2.1 Mecanismo de metilación

La metilación del DNA es un proceso bioquímico que consiste en la adición de un grupo metilo a la posición 5' de los residuos de citosina en dinucleótidos CG (25). La distribución de CG no es aleatoria a lo largo del genoma, sino que tiende a agruparse en regiones llamadas islas CpG, presentes principalmente en regiones promotoras de genes. Las islas CpG se describen como secuencias de DNA de más de 200 pares de bases de longitud, con un contenido en CG mayor del 50% y una proporción de CG observada/esperada de más del 60%. La metilación también se puede dar en islas CpG no localizadas en promotores, definidas como orillas CpG, ubicadas alrededor de las primeras (26).

La metilación de las islas CpG está típicamente asociada al silenciamiento de genes, mientras que la desmetilación de dichos sitios permite la transcripción. La metilación favorece el silenciamiento mediante el bloqueo de la unión de los complejos de iniciación de la transcripción al DNA, la inhibición de la RNA polimerasa y el reclutamiento de complejos represores de la transcripción (25).

El patrón de metilación en células diferenciadas es sobre todo estable y heredable (27). Sin embargo, unas proteínas específicas, las metiltransferasas de DNA (DNMTs), pueden establecer señales de metilación nuevas en respuesta a factores ambientales. DNMT3A y DNMT3B son responsables de la metilación *de novo*, mientras DNMT1 mantiene el modelo de herencia de silenciamiento por mitosis. Esta última enzima no sólo metila el DNA, sino que además se acopla directamente a proteínas de unión a metil-CpG (MBPs). Las MBPs a su vez, pueden asociarse a enzimas constrictivas de histonas como las histonas deacetilasas, HDAC1 y HDAC2, metiltransferasa H3K9 (Suv39 h1) y la proteína de heterocromatina (HP1), todas componentes sinérgicos del silenciamiento de genes (25).

### 2.2 Alteraciones epigenéticas en cáncer

El cáncer y otras muchas enfermedades humanas muestran una regulación epigenética aberrante (28). Las alteraciones epigenéticas son comunes en cáncer, incluyendo la hiper- e hipometilación del DNA, el perfil aberrante de expresión de microRNAs y modificaciones post-traduccionales de las histonas. Durante la última década, la metilación aberrante del DNA ha sido reconocida como una de las anomalías moleculares más comunes en CM (29, 30). La metilación de ciertos genes se ha relacionado con las características clínicas y patológicas de los tumores de mama, y se considera un biomarcador de diagnóstico (31), del estado del receptor de hormona (32) y HER2 (33), de respuesta al tamoxifeno (32) y quimioterapia (34), de metástasis durante el seguimiento (35), y predictor de la supervivencia (32, 36).

En particular, el Epigenoma del cáncer se caracteriza por los cambios globales en la metilación del DNA y alteración de modificación de histonas. Debido a rasgos típicos como la hipometilación global

de DNA y la hipermetilación específica de promotores, comúnmente observados en neoplasias benignas y en tumores de estadio temprano, es cada vez más evidente que la desregulación epigenética puede preceder a los eventos oncogénicos clásicos: mutaciones en genes supresores de tumores y/o en protooncogenes e inestabilidad genómica (37). Se sabe que la desregulación de la maquinaria epigenética por mutación, delección o alteración de expresión de cualquiera de sus componentes provoca patrones aberrantes de expresión génica que contribuyen a la aparición y progresión del cáncer (38). De hecho, basándonos en el modelo de los eventos (*hits*), estas alteraciones epigenéticas o “epimutaciones” pueden contribuir en ocasiones al inicio del cáncer al metilar el alelo intacto de genes supresores de tumores que están previamente mutados o delecionados en el otro alelo, provocando su silenciamiento (39).

En términos de niveles de metilación global, las células tumorales presentan hipometilación a lo largo de todo el genoma e hipermetilación en las islas CpG de promotores de genes (38). Esta última alteración epigenética es la más característica en tumores humanos y está normalmente asociada a silenciamiento de genes supresores de tumores como *CDKN2A*, *MLH1*, *BRCA1* y *VHL*.

Además, se ha explicado recientemente que gran parte de esta metilación aberrante del DNA en las células transformadas/tumorales se debe a la presencia de mutaciones somáticas en la maquinaria que mantiene el patrón de metilación normal de la célula, como en los genes que codifican para *DNMT3A* en leucemia mieloide aguda (40), y para enzimas desmetilantes en leucemias linfocíticas (41, 42).

En CM es característica la presencia en células tumorales pero no en células normales de la hipermetilación (43) de promotores de genes supresores de tumores y de otros genes relacionados con cáncer implicados en funciones diversas, desde adhesión hasta proliferación celular (44). Algunos ejemplos son los genes supresores de tumores *BRCA1*, implicado en la reparación del DNA, *CDKN2A*, importante en la fase G1 del ciclo celular mitótico y la apoptosis, y *PTEN*, regulador negativo de la proliferación celular por su papel en la vía PI3K-AKT.

### 2.3 Valor clínico de las alteraciones epigenéticas

Las alteraciones epigenéticas que inician la tumorigénesis pueden servir como biomarcadores para la detección precoz del cáncer, ya que pueden estar presentes antes del diagnóstico clínico de la enfermedad y pueden ser detectados mediante técnicas moleculares de alta sensibilidad. Estos marcadores pueden ser también predictivos del pronóstico y de la respuesta al tratamiento oncológico de las pacientes (45). Ejemplos de biomarcadores con valor diagnóstico y predictivo lo constituyen la hipermetilación de *GSTP1* para la detección del cáncer de próstata y la hipermetilación de *RASSF2* en el pronóstico de CM, descrita ésta última por el grupo de Epigenética del Cáncer de Navarrabiomed donde se enmarca el presente Trabajo Fin de Master (46).

Es muy destacable también el hecho de que en CM las alteraciones epigenéticas se distribuyen de forma heterogénea en los subtipos (47), tal y como sucede con *RASSF1*, *BRCA1* y *E-cadherina*, que están hipermetilados en tumores luminales (35), TN y HER2+ (48), respectivamente.

Un ejemplo del valor predictivo de respuesta terapéutica lo constituye en gliomas la hipermetilación del promotor del gen *MGMT*, que codifica para la enzima *O6-methylguanine-DNA methyltransferase* que repara las lesiones generadas en el ADN por fármacos habituales para este tipo de tumores, como carmustina o temozolomida. El silenciamiento del gen favorece que dichas alteraciones generadas por el fármaco no se reparen y la célula tumoral muera (49, 50).

El uso potencial del estado de metilación de las islas CpG para predecir la respuesta a quimioterapia también se ha descrito en otros genes reparadores de DNA como *MLH1* en tratamiento con cisplatino en cáncer de ovario (51).

En el presente trabajo, el grupo de Epigenética del Cáncer de Navarrabiomed, ha realizado un estudio del patrón de metilación global del DNA tumoral para analizar la metilación característica de

cada subtipo tumoral. Este estudio lo ha realizado en un grupo muy homogéneo de 40 pacientes de los distintos subtipos de CM ductal infiltrante, junto con 6 tejidos normales procedentes de mamoplastias de reducción. Dicho estudio se ha realizado en colaboración con el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) de Madrid, uno de los nodos del Centro Nacional de Genotipado (CGEN).

En este estudio se han empleado el *array Infinium HumanMethylation450 BeadChip* (Illumina, Inc. CA, EE.UU.), que se basa en la tecnología *Infinium* y que contiene más de 480.000 sondas cubriendo el 99% de los genes y el 96% de las islas CpG (52, 53).

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### HIPÓTESIS

Las alteraciones epigenéticas de algunos genes presentes en los tumores de mama del subtipo triple negativo (TN) están presentes también en tejido no neoplásico adyacente a tumor y están asociadas con el pronóstico de las pacientes.

### OBJETIVO GENERAL

Identificar nuevos biomarcadores epigenéticos característicos de tumores TN y valorar su posible valor clínico en las pacientes.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar genes diferencialmente metilados entre tumores de CM TN y tejido mamario no neoplásico.
- Analizar la presencia de estas alteraciones epigenéticas en tejido no neoplásico adyacente a tumor.
- Valorar la asociación clínica entre estos cambios epigenéticos y la supervivencia o progresión de la enfermedad.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. PACIENTES

En una serie inicial se recogieron para la realización del *array* de metilación muestras de 5 tejidos no neoplásicos provenientes de mamoplastias de reducción y 8 tumores de cáncer de mama triple negativo (TN). Todos estos casos proceden de tumor congelado conservado a -80°C en los Biobancos de Navarrabiomed-Centro de Investigación Biomédica y Biobanco Vasco de la Fundación Vasca de Investigación e Innovación Sanitaria. Las pacientes incluidas en el estudio dieron su consentimiento para su participación una vez informadas. Este estudio se realizó en el marco de un proyecto de investigación competitivo, aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de Navarra. (Pyto.2015 / 36, con fecha de salida del informe favorable del proyecto de 6 de mayo de 2015 y nº de registro de salida 95.)

Los resultados del *array* se validaron primero en una pequeña serie exploratoria de 10 tumores TN junto con su tejido no neoplásico adyacente a tumor, todos ellos incluidos en parafina. Después se amplió la serie hasta 42 pacientes para completar la validación biológica del *array*. Estos tejidos proceden del archivo del Servicio de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario de Navarra (CHN) y los datos clínicos de las pacientes fueron recogidos por los Servicios de Oncología Médica y Cirugía del CHN. Las características patológicas y clínicas se resumen en la tabla 1.

**Tabla 1.** Características patológicas y clínicas de la serie de pacientes.

Característica	Frecuencia (%)
<b>Grado histológico</b>	
I	1/42 (2,4)
II	10/42 (23,8)
III	31/42 (73,8)
<b>Afectación ganglionar</b>	
Sí	19/42 (45,2)
No	23/42 (54,8)
<b>Edad (años)</b>	Media: 62 Rango: 38-82
<b>Tamaño tumoral (cm)</b>	Media: 2,4 Rango: 0,8-6,0
<b>Supervivencia libre de progresión (meses)</b>	Media: 49 Rango: 0-179
Sí	24/40 (60)
No	16/40 (40)
<b>Supervivencia global (meses)</b>	Media: 52 Rango: 1-179
Exitus	17/41 (41,5)
<b>Quimioterapia</b>	
Sí	32/41 (78,1)
No	9/41 (21,9)
<b>Terapia hormonal</b>	
Sí	6/35 (17,1)
No	29/35 (82,9)

## 2. LÍNEAS CELULARES

Se emplearon 4 líneas celulares humanas derivadas de carcinoma mamario ductal, del subtipo triple negativo (BT-549, Hs 578T, MDA-MB-468 y HCC-1937) y una línea celular mamaria no tumorigénica transformada, 184B5. Además, se usó la línea renal embrionaria 293T como control positivo de expresión de uno de los genes analizados (*NKAPL*).

Las líneas celulares MDA-MB-468 y HCC 1937 fueron obtenidas por *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ, Braunschweig, Alemania). La línea Hs 578T fue proporcionada por el Dr. Javier Benítez del Grupo de Genética Humana del CNIO (Madrid, España). El resto de líneas fueron adquiridas de *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.).

Todas estas líneas celulares se descongelaron y fueron sembradas en frascos de 75cm<sup>2</sup> (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania).

Las líneas BT-549, HCC 1937 se cultivaron en medio RPMI (Gibco Laboratories, Carlsbad, CA, EE.UU.) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, Lonza Biologics, Porriño, España) previamente descomplementado (manteniéndolo a 56°C durante 30 minutos) y 1% de penicilina-estreptomycin (Lonza Biologics, Porriño, España).

Las líneas Hs 578T, MDA-MB-468 y 293T se cultivaron en medio DMEM (Lonza Biologics, Porriño, España) igualmente suplementado.

En el caso de 184B5 se utilizó medio MEMB suplementado con un 5% de suero equino, 10 µg/ml de insulina, 0,5 µg/ml de hidrocortisona, 20 ng/ml de EGF, un 10% de FBS y 1% de penicilina-estreptomycin (Lonza Biologics, Porriño, España); y 100 ng/ml de toxina de cólera (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.).

El cultivo de las células se mantuvo a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. Al 80-90% de confluencia celular se realizó un subcultivo celular: primero, se retiró el medio, tras lo cual se realizó el lavado con 5 ml de PBS 1X (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.). Seguidamente se añadieron 3 ml de tripsina 1X (Lonza Biologics, Porriño, España) y se incubó el frasco durante 5 minutos a 37°C con el fin de degradar la matriz extracelular enzimáticamente y por lo tanto, inhibir la adhesión celular.

Después, una vez comprobado que las células no estaban adheridas al frasco, se neutralizó la acción de la tripsina añadiendo 7 ml de medio suplementado. Todo ello se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente. Tras esto, se retiró el sobrenadante y se realizó el siguiente pase en nuevas botellas con la cantidad correspondiente del precipitado celular obtenido.

## 3. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

El grupo de Epigenética del Cáncer realizó un *array* de metilación con 8 muestras de tejido neoplásico de CM TN y 5 muestras de tejido no neoplásico, mediante la plataforma *Illumina Infinium Human Methylation 450k* (Illumina, San Diego, CA, EE.UU.) en el CNIO-CGEN tal y como se ha comentado anteriormente. Este *array* contiene sondas para 450000 sitios CpG en el genoma humano, y proporciona información sobre el estado metilado (M) o no metilado (U) de cada CpG de cada muestra, genotipando DNA tratado con bisulfito. Este DNA convertido se amplifica, fragmenta e hibrida con sondas del *microarray*. Después de la hibridación, las sondas incorporan un marcador fluorescente (ddNTP) para la detección (54).

El nivel de metilación de un sitio CpG se determina por la señal fluorescente de la relación M/U, y esta relación se utiliza para calcular el valor  $\beta$  ( $\beta$ -value) utilizando el software *GenomeStudio* (Illumina, San Diego, CA, EE.UU.).

Los datos brutos de metilación de estos valores  $\beta$  fueron sometidos a normalización utilizando el software *GenomeStudio* (Illumina, San Diego, CA, EE.UU.). Este paso consistió en la eliminación del ruido de fondo (*background*) y la normalización de los controles internos. A continuación, se realizó

un *t-test* limma (<http://pomelo2.iib.uam.es/>) a partir de estos datos normalizados para obtener sondas diferencialmente metiladas entre tejido tumoral y tejido de mama no neoplásico.

Las sondas diferencialmente metiladas con una tasa de falsos positivos (*False Discovery Rate*, FDR) < 0,05 se filtraron por ubicación (en 5'UTR, 1500-200 pb antes del inicio de transcripción o en el primer exón), por  $\Delta\beta$  ( $|\beta\text{-value en tumor} - \beta\text{-value en el tejido no neoplásico}| > 0,2$ ), y por su localización dentro de una isla CpG.

Por último, se identificaron los genes donde se unían estas sondas del *array*.

#### 4. EXTRACCIÓN DE DNA

Para estudiar el estado de metilación en las líneas celulares y tejido parafinado de cáncer de mama triple negativo, se llevó a cabo la extracción de DNA mediante el *kit QIAamp DNA FFPE Tissue* (Qiagen, Hilden, Alemania).

Para la extracción desde casos de tejido parafinado, se comenzó con un paso de desparafinización de los tejidos. Para ello:

- Se realizaron 4 secciones de 15  $\mu\text{m}$  de grosor de cada muestra de tejido parafinado.
- Se añadió 1 ml de xileno a estos cortes y se agitaron vigorosamente.
- A continuación se realizó su centrifugación durante 2 minutos a 13000 rpm, tras lo cual se retiró el xileno con cuidado de no eliminar el precipitado. Se repitió este paso.
- Después se añadió 1 ml de etanol puro y tras su mezclado se centrifugó durante otros 2 minutos a 13000 rpm. Se retiró el etanol y se repitió este paso.
- Por último se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente hasta la completa evaporación de todo el etanol.

A partir de este punto, se unifica el protocolo para tejido parafinado y líneas celulares:

- Se resuspendió el pellet en el preparado de lisis, constituido por 180  $\mu\text{l}$  de Buffer ATL y 20  $\mu\text{l}$  de Proteinasa K.
- Se incubó 1 hora a 56°C y a continuación, a 90°C durante otra hora.
- Después se realizó una breve centrifugación para recoger las gotas que hubiesen podido quedar en las paredes del eppendorf.
- Se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de Buffer AL y 200  $\mu\text{l}$  de etanol puro y se mezcló en vortex.
- Se pasó toda la mezcla anterior por una microcolumna de purificación de DNA y ésta se centrifugó durante un minuto a 8000 rpm. Se desechó el eluido.
- A continuación, se lavó la columna mediante la adición de 500  $\mu\text{l}$  de AW1 y su centrifugación durante un minuto a 13000 rpm.
- Luego se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de AW2 y se centrifugó durante un minuto a 13000 rpm. Después, tras descartar el eluido se volvió a centrifugar durante 3 minutos a 13000 rpm para secar la membrana de la microcolumna.
- Tras añadir 50  $\mu\text{l}$  de Buffer ATE a la columna y centrifugar ésta durante un minuto a 13000 rpm, se recogió el eluido, que contiene el DNA.
- Finalmente, el DNA fue cuantificado en el NanoDrop (ThermoScientific, Waltham, MA, EE.UU.) y se registró la concentración y la pureza medida como los ratios de A260/A280 y A260/A230.

#### 5. PIROSECUENCIACIÓN

El estudio directo de metilación de los genes seleccionados tras el análisis bioinformático, se realizó en las líneas celulares anteriormente mencionadas, así como en muestras de tejido (aproximadamente 5 casos de tejido no neoplásico y 40 de tejido tumoral y 40 adyacente a tumor de pacientes con cáncer de mama triple negativo) y se realizó mediante pirosecuenciación.

En la pirosecuenciación se amplifica un fragmento de DNA con un *primer reverse* biotinilado obteniendo un producto biotinilado que se hibridará con un *primer* de secuenciación. La DNA polimerasa cataliza la adición de dNTPs al cebador de secuenciación por complementariedad. Cada incorporación está acompañada por la liberación de pirofosfato (PPi) en una cantidad equimolar a la cantidad de nucleótido incorporado. La enzima ATP sulfurilasa convierte PPi en ATP en presencia de adenosina 5' fosfosulfato. Este ATP impulsa la conversión mediada por la luciferasa de luciferina a oxiluciferina que genera luz visible en cantidades que son proporcionales a la cantidad de ATP. La luz producida en la reacción catalizada por la luciferasa es detectada y mostrada como un pico (pirograma). La altura de cada pico (señal de luz) es proporcional al número de nucleótidos incorporados. A medida que el proceso continúa, se construye la cadena de DNA complementaria y la secuencia de nucleótidos se determina a partir de los picos de señal en el pirograma.

### 5.1 Diseño de primers

Se realizó en el software *Pyromark Assay design* (Qiagen, Hilden, Alemania) introduciendo la secuencia FASTA de cada gen reconocido por la sonda del *array*.

**Tabla 2.** *Primers forward, reverse* y de secuenciación utilizados en la pirosecuenciación y sus correspondientes tamaños de amplicón.

Gen	<i>Forward primer</i>	<i>Reverse primer</i>	<i>Primer de secuenciación</i>	Tamaño del amplicón (pb)
<b>ADAM 12</b>	TTGGGTTTAGGTTATGG AATGG	[Btn]ATCCAACCTTTCAAAC AAAACCTA	GAGGGTTTTAGAG AGT	272
<b>DLEU7</b>	GGATTTTAGGAGAAGG TAGAGGTTAGT	[Btn]ACTCCTCCACCTCTAAA TCTCAC	GGGTTATAGATTTA GAGT	96
<b>NKAPL</b>	TATTAGTTAGTTTTGG GTTTGTAGT	[Btn]ACATCTACTCTACCAAA ATAATAAACTCCC	GTTTTGGGTTTGT AGTAA	154
<b>PCDHA13</b>	ATGGAAAATTTGTAGA GGTTTGT	[Btn]ACCTTCTAAAATAAATCT ACAAAATAACA	AGGTGGATGTTGTA TT	137
<b>VWCE</b>	GGGTTTTATAGATAGG GGTTATGTT	[Btn]CTCCACCCACACCCCT ACC	GTTTTGTTTTAGAA GTTTGTTTTT	155

### 5.2 Tratamiento con bisulfito

El tratamiento del DNA con bisulfito sódico permite diferenciar las citosinas metiladas de las no metiladas ya que transforma las citosinas en uracilos, pero mantendrá los residuos de 5-metilcitosina intactos. Esto permitirá diferenciar la metilación durante la amplificación de DNA que se lleva a cabo en la pirosecuenciación.

Este tratamiento se realizó mediante el *kit EZ DNA methylation-gold kit* (Zymo Research, Irvine, CA, EE.UU.) y fue el siguiente:

- Se prepararon las muestras de DNA a una concentración de 100-500 ng (según disponibilidad de tejido) en 20 µl de H<sub>2</sub>O.
- Se añadieron 130 µl de *CT Conversion ReAGENT* a cada muestra en un tubo para PCR. Estos tubos se llevaron al termociclador y se llevó a cabo el siguiente ciclo: 98 °C durante 10 minutos, seguido de 2.30 horas y se mantiene a 4 °C.



- Tras esto se agregaron 600  $\mu\text{l}$  de *M-Binding Buffer* y la muestra obtenida en el paso anterior, en la columna provista en el kit.
- Se centrifugó la columna a máxima velocidad durante 30 segundos.
- Fueron añadidos 100  $\mu\text{l}$  de *M-Wash Buffer* a la columna y esta fue centrifugada a máxima velocidad durante 30 segundos.
- A continuación, se pusieron 200  $\mu\text{l}$  de *M-Desulphonation Buffer* en la columna y se dejó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Tras esto se realizó un centrifugado a máxima velocidad durante 30 segundos.
- Se realizaron 2 lavados añadiendo 200  $\mu\text{l}$  de *M-Wash Buffer* a la columna y centrifugándola a máxima velocidad durante 30 segundos.
- Tras la adición de 25-50  $\mu\text{l}$  de *M-elution Buffer* directamente a la matriz de la columna y su centrifugación, se recogió el eluido.

### 5.3 Amplificación por PCR

Se realizó utilizando *Immolase DNA polymerase* (BioLine, London, Reino Unido) y la mezcla de reactivos especificada en la tabla 3.

**Tabla 3.** Reactivos necesarios para la amplificación por PCR.

Reactivos	Volumen/muestra ( $\mu\text{l}$ )
Buffer Immolase 10x	3
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1,1
dNTPs 2 mM	3
Primer Forward 10 $\mu\text{M}$	0,6
Primer Reverse 10 $\mu\text{M}$	0,6
Taq Immolase	0,2
H <sub>2</sub> O	19,5

Se añadieron 2  $\mu\text{l}$  de DNA modificado con bisulfito a la mezcla y las condiciones de amplificación fueron las especificadas en la tabla 4.

**Tabla 4.** Condiciones de amplificación de los genes analizados.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°	10'	1
95°	30"	50
59°	30"	
72°	30"	
72°	7'	1
4°	$\infty$	$\infty$

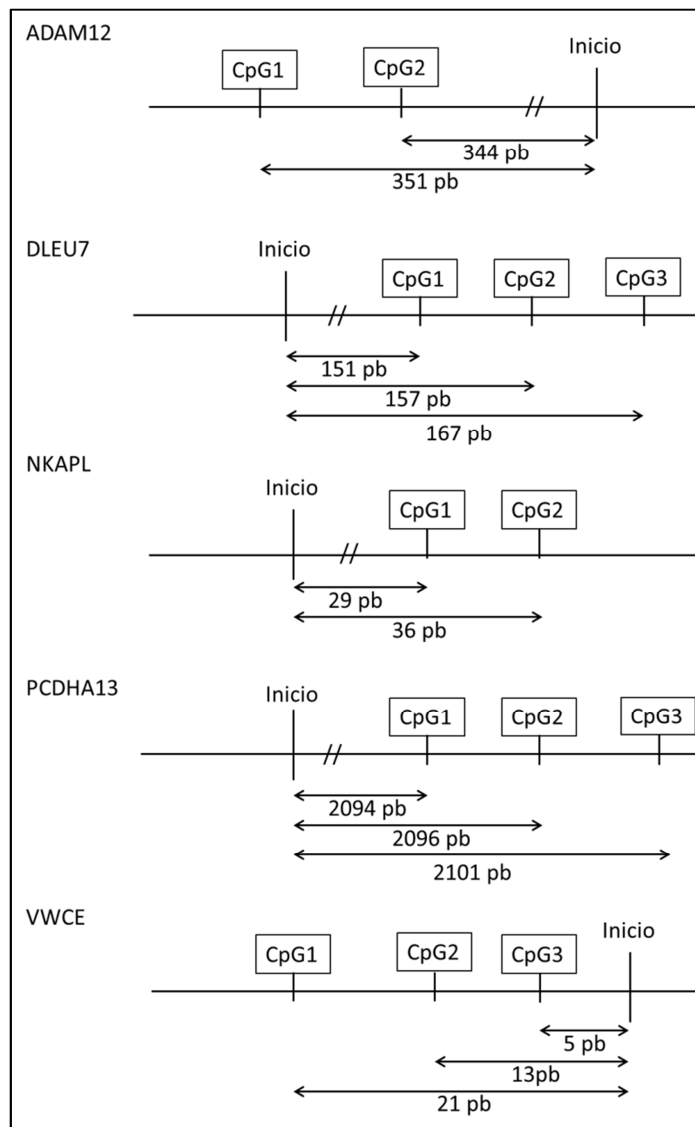
Se realizó una electroforesis con 8  $\mu\text{l}$  del producto de PCR obtenido, en gel de agarosa al 2% teñido con *SYBR Red Safe* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) y se visualizó en un transiluminador (ChemIDoc XRS, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.). El resto del producto de PCR se sometió a pirosecuenciación.

#### 5.4 Pirosecuenciación

Primero se hizo la inmovilización del DNA añadiendo por muestra 60  $\mu\text{l}$  de una mezcla compuesta por 1,5  $\mu\text{l}$  de *Streptavidin sepharose high performance*, 40  $\mu\text{l}$  *Binding Buffer* (Qiagen, Hilden, Alemania) y 18,5  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  a los pocillos de una placa de PCR de 96 pocillos (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania). Después se agregaron 20  $\mu\text{l}$  de producto de PCR biotinilado a cada pocillo.

Esta placa se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente y después se añadieron los primers de secuenciación que se detallan en la tabla 1 (4  $\mu\text{l}$  de primer a 4  $\mu\text{M}$  y 36  $\mu\text{l}$  de *Annealing Buffer* (Qiagen, Hilden, Alemania)).

La figura 1 muestra las posiciones CpG analizadas para cada gen.



**Figura 1.** Posiciones CpG analizadas mediante pirosecuenciación.

La reacción se llevó a cabo en un pirosecuenciador *PyroMark Q96* (Qiagen, Hilden, Alemania) y el análisis se llevó a cabo con el software específico del mismo nombre, con el que se obtuvieron los porcentajes de metilación de cada sitio CG estudiado en cada gen de interés.

## 6. EXTRACCIÓN DE RNA

La extracción de RNA de las líneas celulares se realizó empleando el kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania).

- Primero se hizo un lavado del precipitado celular con PBS 1X y se centrifugaron a 4000 rpm durante un minuto a 4°C, después se retiró el sobrenadante y se mantuvieron las muestras en hielo.
- Se añadieron 350 µl de la mezcla compuesta por buffer RLT y β-mercaptoetanol (10 µl por cada ml de RLT) a cada muestra. Seguidamente también se añadieron 250 µl de etanol puro.
- Después, se hizo pasar esta mezcla por las columnas proporcionadas en el kit mediante 2 centrifugaciones de 1 minuto a 12000 rpm. A continuación, se añadieron 350 µl de RW1 a cada columna y se volvieron a centrifugar.
- El siguiente paso fue el tratamiento con DNasa mediante el kit *Turbo DNA-free* (Life Technologies, Carlsbad, CA): se añadieron 4 µl DNasa, 5 µl de buffer y 44 µl de agua libre de RNAsas a cada muestra y éstas se incubaron a 37°C durante 30 minutos.
- Se añadieron 350 µl de buffer RW1 y se centrifugó. Tras esto se añadieron otros 350 µl de RPE y se volvió a centrifugar.
- Se añadieron 30 µl de agua libre de nucleasas, se procedió a su centrifugación y se recogió el eluido, que contiene el RNA.
- Por último, el RNA se cuantificó mediante NanoDrop (ThermoScientific, Waltham, MA, EE.UU.).

## 7. RETROTRANSCRIPCIÓN Y PCR A TIEMPO REAL

El análisis de expresión de los genes se realizó mediante retrotranscripción y PCR a tiempo real.

En la retrotranscripción, mediante la reacción de la transcriptasa inversa, se obtiene el DNA complementario (cDNA) a partir del RNA. Una vez sintetizado, este cDNA se amplifica mediante PCR a tiempo real, técnica en la cual se mide por fluorescencia la tasa de generación de producto después de cada ciclo de amplificación, gracias a la adición de sondas marcadas que reconocen específicamente el gen a estudiar. A medida que aumenta la cantidad de DNA amplificado la señal fluorescente se va acumulando. Dicha cantidad se cuantifica como Ct (*cycle threshold*) definido como el número de ciclos de amplificación necesarios para que la señal de fluorescencia sobrepase el umbral de la diferencia de la señal fluorescente de fondo.

De esta manera, los niveles de Ct son inversamente proporcionales a la cantidad de cDNA problema en la muestra de partida.

### 7.1 Retrotranscripción

A partir del RNA extraído de las líneas celulares se sintetizó cDNA con el kit *PrimeScript™ RT reagent Kit* (TaKaRa Bio, Otsu, Japan).

Se partió de 500 ng de RNA de cada muestra diluidos en 5 µl de agua libre de nucleasas, que se mezclaron con 5 µl de una mix que contiene: buffer (incluye dNTPs, tampón 10X e inhibidor de RNAsas, enzima *Retrotranscriptase PrimeScript*, y primers (oligodTs y hexámeros aleatorios), siguiendo las cantidades indicadas en la tabla 5. La reacción se realizó en una placa de 96 pocillos (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania), la cual se cubrió con film.

La reacción se llevó a cabo en el termociclador 2720 *Thermal Cycler* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) con el siguiente programa: 15 minutos a 37°C, 5 segundos a 85°C y se mantuvo a 4°C.

**Tabla 5:** Reactivos incluidos en el kit PrimeScript™ RT reagent Kit necesarios para la retrotranscripción.

Reactivos	Volumen/muestra (μl)
5X PrimeScript Buffer	2
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0,5
Oligo dT Primer (50μM)	0,5
Random 6 mers (100)μM	2

## 7.2 PCR a tiempo real

La cuantificación a tiempo real de la expresión de los genes se realizó a partir del cDNA obtenido en la retrotranscripción utilizando los primers y las sondas Hs.PT.58.4109007.g (*NKAPL*) y Hs.PT.58.2788048 (*DLEU7*) de IDT (Coralville, Iowa) y el kit *Premix Ex Taq™* (TaKaRa Bio, Mountain View, CA). Se preparó una mix con los reactivos y cantidades de la tabla 6.

**Tabla 6:** Reactivos incluidos en el kit Premix Ex Taq™ necesarios para la PCR cuantitativa.

Reactivos	Volumen/muestra (μl)
Premix 2X	10
ROX II (50X)	0,2
Sonda	0,5
H2O libre de Rnasas	8,3
Total	19

Así, a cada 19 μl de esta mezcla de reacción se le añadió 1 μl de cDNA. La amplificación y detección se hizo mediante el equipo *QuantStudio 12K Flex* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) bajo las siguientes condiciones: 30 segundos a 95°C y 40 ciclos de 95°C durante 5 segundos y 60°C durante 34 segundos. Todas las reacciones de PCR se realizaron por triplicado tanto para el gen diana como para el gen de control interno (*GAPDH*, Hs.PT.58.40035104 de IDT (Coralville, IA, EE.UU.), además del control negativo (agua) para cada gen.

## 7.3 Análisis de resultados

Para el análisis de expresión en las diferentes líneas celulares, primero se normalizaron los datos respecto al control endógeno *GAPDH*, obteniendo la diferencia de Ct ( $\Delta Ct$ ) medio del gen de estudio respecto al Ct medio de *GAPDH* para cada muestra problema, después se calculó la cantidad relativa (RQ, *relative quantification*) como  $RQ = 2^{-\Delta Ct}$ .

## 8. INMUNOHISTOQUÍMICA

Los niveles de expresión de las proteínas codificadas por los genes seleccionados se evaluaron mediante IHQ en 10 parejas de tejido tumoral y tejido adyacente.

La técnica se llevó a cabo en el Biobanco de Navarrabiomed bajo el siguiente procedimiento:

- Se realizaron cortes de 4 µm de tejido tumoral a partir de los bloques de parafina y se montaron en portaobjetos tratados con imantación, junto con un corte del mismo espesor del control positivo (tejido renal para *DLEU7*).
- Los cortes se desparafinaron con *Dewax Bond Solution* durante 10 minutos a 72°C y se hidrataron en etanol absoluto y agua destilada, durante 5 minutos cada uno. Se realizó en el instrumento BOND Leica (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany).
- La recuperación antigénica se realizó con la Solución 1.
- Se bloqueó la actividad peroxidasa endógena con *Bond Epitope Retrieval* (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) durante 30 minutos a 100°C.
- Se realizó la incubación con el anticuerpo primario (Anti-DLEU7 (ab185446) Abcam, Cambridge, Reino Unido) a una dilución de 1:300 durante 30 minutos. A continuación se realizaron tres lavados en solución tampón PBS durante 5 minutos.
- Se añadió el anticuerpo secundario policlonal biotinilado 1:200 durante 8 minutos a temperatura ambiente suministrado en el kit *Bond Polymer Define Detection* (Vision biosystems, Australia) durante 8 minutos.
- Se realizaron tres nuevos lavados de 5 minutos con PBS.
- La reacción de la peroxidasa se visualizó mediante la solución de 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorada (DAB) y peróxido de hidrógeno como sustrato, durante 8 minutos.
- Se realizaron dos lavados de 5 minutos en agua destilada.
- Por último se contrastaron los cortes de forma manual mediante tinción con hematoxilina durante 3 minutos.
- Se lavaron con agua corriente y se realizó el montaje. Primero, se deshidrataron en etanol al 70% durante 3 minutos, etanol al 96% durante 3 minutos y etanol absoluto durante 5 minutos. Después se realizaron dos lavados con xileno durante 5 minutos.
- Por último, se añadió DPX para el montaje con el cubre.

La valoración de la expresión de proteínas por IHQ se realizó de forma semicuantitativa por un patólogo especialista del área de patología mamaria del CHN. Para ello realizó una valoración a 200 aumentos de la expresión de la proteína en un número máximo de 10 campos en función del tamaño de la sección tisular, elegidos al azar.

Los niveles de expresión de la proteína *DLEU7* se clasifican de 1+ a 3+, siendo:

+: Tumores con poco marcaje (tinción en el 1% al 33% de las células).

++: Tumores con un marcaje intermedio (del 33% al 66% de las células)

+++ : Tumores con marcaje alto (más del 66% de las células teñidas).

## 9. WESTERN BLOT

La expresión proteica de los genes seleccionados se midió mediante Western blot en 4 líneas celulares de CM TN y 2 líneas celulares *normal-like* derivadas de tejido mamario. Para ello, las células se lavaron dos veces con PBS 1X y se lisaron con un tampón de lisis RIPA (150 mM NaCl, 1% de Triton 100x, 0,5% desoxicolato de sodio, 0,1% de SDS, 50 mM de tampón Tris pH 8) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.) e inhibidor de proteasas Complete 1X (Roche Diagnostics, Basel, Suiza). Tras incubar los lisados durante 5 minutos en hielo, se centrifugaron a 8000 x *g* durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante. Las proteínas contenidas en este extracto se cuantificaron por el método Lowry midiendo la absorbancia a 750 nm en el equipo Epoch (BioTek, Winooski, VT, EE.UU.).

Se cargaron 60 µg de proteína de cada línea celular en un gel al 10% de poliacrilamida y se separaron por SDS-PAGE durante 90 minutos a 80 V. Las proteínas contenidas en el gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) durante 1 hora a 350 mA y en frío.

Después se bloqueó en leche desnatada al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente y se incubó con anticuerpo primario (anti-NKAPL (ab107281), Abcam, Cambridge, REINO UNIDO) a una concentración 1:100 durante toda la noche a 4°C y en agitación. A continuación se realizaron 3 lavados de 5 minutos en TBS con Tween 0,1% (TBS-T) y la membrana se incubó con un anticuerpo secundario *anti-rabbit* (Bio Rad, Hercules, CA, EE.UU.), a una concentración 1:3000 durante 1 hora en oscuridad. Tras 3 nuevos lavados de 5 minutos con TBS-T, la señal del anticuerpo se detectó por electroquimioluminiscencia con el kit *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) en un transiluminador ChemiDoc con el software *Image Lab* (ambos de Bio Rad, Hercules, CA, EE.UU.).

Por último, la membrana se lavó de nuevo 3 veces con TBS-T, se incubó con el anticuerpo anti- $\alpha$ -tubulina (T6074, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.) como control de carga, a una concentración de 1:10000 durante 20 minutos a temperatura ambiente, posteriormente con el anticuerpo secundario *anti-mouse* (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) a 1:2000 durante otros 20 minutos y finalmente se reveló de la misma manera.

## 10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el paquete SPSS 20.0. Los datos demográficos, clínicos y patológicos se resumieron como frecuencias (y porcentajes) o medias (con sus desviaciones estándar y rangos).

Para el análisis de metilación y expresión en líneas se realizó un *t-test* bilateral, previa comprobación de distribución normal con la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

En los tejidos no neoplásicos, adyacentes a tumor y tumorales se comparó la metilación de *NKAPL* y *DLEU7* mediante la prueba de Kruskal-Wallis, al no cumplir los requisitos exigidos por la ANOVA. Además, la metilación de *NKAPL* y *DLEU7* se comparó en tumores y su tejido adyacente mediante *t-test* de muestras pareadas.

La correlación entre metilación y expresión de *NKAPL* se determinó por el Coeficiente de correlación de Pearson.

Por último, para examinar la asociación clínica entre el estado de metilación y la progresión o la supervivencia de las pacientes se han utilizado *log-rank tests* y Kaplan Meier.

## RESULTADOS

### 1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Se han obtenido aproximadamente 40 sondas diferencialmente metiladas entre tumores triple negativo y tejido no neoplásico (tablas 7 y 8). Todas ellas con una tasa de falsos positivos  $< 0,05$  y filtrados por ubicación (5'UTR, 1500-200pb antes del inicio de transcripción o en el primer exón), por  $\Delta\beta > 0,2$ , y por su localización dentro de una isla CpG.

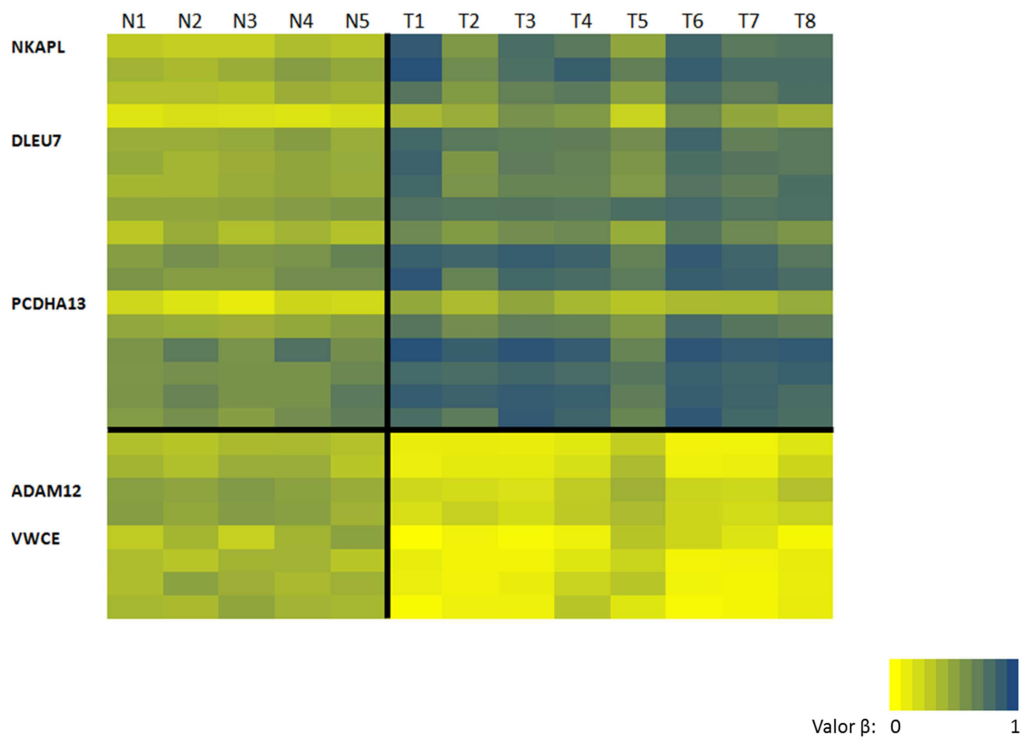
**Tabla 7.** Sondas diferencialmente hipermetiladas entre tumores triple negativo (TN) y tejido normal (N).

Sondas	Gen	Región	$\Delta\beta$ (TN-N)
cg18675097	<i>NKAPL</i>	1stExon	0.44
cg18675097	<i>NKAPL</i>	5'UTR	0.44
cg07496545		TSS200	0.31
cg02852670		5'UTR	0.31
cg10982443		5'UTR	0.30
cg02578944	<i>NKAPL</i>	1stExon	0.30
cg01345315		TSS1500	0.28
cg19635505		5'UTR	0.27
cg14286208		5'UTR	0.27
cg08274637	<i>DLEU7</i>	TSS200	0.27
cg05965387	<i>DLEU7</i>	TSS200	0.26
cg07815836		5'UTR	0.25
cg10359157	<i>DLEU7</i>	TSS200	0.25
cg14621323		1stExon	0.24
cg11002923		5'UTR	0.24
cg27051129	<i>DLEU7</i>	TSS200	0.22
cg00711496		TSS1500	0.22
cg14239592		5'UTR	0.22
cg20400592	<i>DLEU7</i>	TSS200	0.22
cg17288288	<i>DLEU7</i>	TSS1500	0.21
cg22881174		5'UTR	0.21
cg15839431		TSS200	0.21
cg00270625		1stExon	0.21
cg00270625		5'UTR	0.21
cg00270625		TSS1500	0.21
cg00270625		TSS200	0.21
cg18114463		TSS1500	0.21
cg25027798	<i>PCDHA13</i>	1stExon	0.20
cg25416125		5'UTR	0.20
cg07745707		1stExon	0.20
cg07883124		1stExon	0.20

**Tabla 8.** Sondas diferencialmente hipometiladas entre tumores triple negativo (TN) y tejido normal (N).

Sondas	Gen	Región	$\Delta\beta$ (TN-N)
cg01054755		1stExon	-0.28
cg13682095		5'UTR	-0.28
cg24161057		TSS200	-0.27
cg16151451		5'UTR	-0.26
cg06282270	<i>VWCE</i>	TSS200	-0.25
cg06462347		1stExon	-0.25
cg06462347		5'UTR	-0.25
cg01433610		1stExon	-0.25
cg26808747	<i>ADAM12</i>	TSS1500	-0.24
cg19856499		1stExon	-0.23
cg27230784		1stExon	-0.22
cg27230784		5'UTR	-0.22
cg20162381		5'UTR	-0.22
cg16257029	<i>ADAM12</i>	TSS1500	-0.22
cg00886954		TSS200	-0.22
cg05238741		1stExon	-0.21
cg08455275		TSS1500	-0.21
cg01422274		5'UTR	-0.21

Los genes identificados por las sondas del *array* y diferencialmente metiladas se recogen en la figura 2, mostrando sólo el nombre de los seleccionados.



**Figura 2.** Heat-map de genes diferencialmente metilados en tumores triple negativo frente a tejido normal, mostrando sólo los seleccionados.



La selección de candidatos se realizó mediante búsqueda bibliográfica en *Pubmed (US National Library of Medicine National Institutes of Health)* seleccionando aquellos genes regulados epigenéticamente en otros tumores, genes importantes en cáncer de mama, genes relacionados con progresión, supervivencia, respuesta a tratamiento, metástasis... y/o genes que codifican proteínas accionables. Mediante estos criterios se seleccionaron 4 genes: 2 hipermetilados en tumores TN frente a tejido normal (*PCDHA13* y *DLEU7*) y 2 hipometilados (*ADAM12* y *VWCE*).

Además también se escogieron por mayor valor de  $\Delta\beta$  definido como la diferencia entre el valor  $\beta$  en tumor y el valor  $\beta$  del tejido no neoplásico. Mediante este criterio se seleccionó el gen de mayor  $\Delta\beta$  (*NKAPL*) que es un gen hipermetilado en tumores TN frente a tejido normal.

## 2. ANÁLISIS DE LA METILACIÓN POR PIROSECUENCIACIÓN DE *DLEU7* Y *NKAPL*

El análisis directo de metilación de las líneas celulares de mama y de los tejidos que provienen de mamoplastia, tejido tumoral TN y su tejido adyacente se realizó por pirosecuenciación. Mediante esta técnica se midió el porcentaje de metilación de tres CpGs seleccionados para *ADAM12*, *DLEU7*, *PDHA13* y *VWCE* y dos para *NKAPL*. En todos los casos la CpG analizada por el *array* fue la primera que hemos analizado por pirosecuenciación.

### 2.1 Metilación en líneas

No se pudo realizar la pirosecuenciación del gen *PCDHA13* por problemas en su amplificación por PCR.

Para testar la reproducibilidad de la técnica, se triplicó el volumen de PCR para poder realizar la pirosecuenciación del mismo producto 3 veces, obteniendo resultados similares.

Después, también se testaron distintas amplificaciones realizadas con el mismo DNA tratado con bisulfito, permitiendo tener varias medidas de la misma condición para hacer análisis estadísticos.

Las líneas triple negativas, destacan por su alto porcentaje de metilación en la mayoría de los genes, excepto en *ADAM12*.

En el caso de *ADAM12* y *VWCE* no se observan diferencias en la metilación entre la línea mamaria *normal-like* 184B5 y las líneas de CM TN (Figuras 3 y 4).

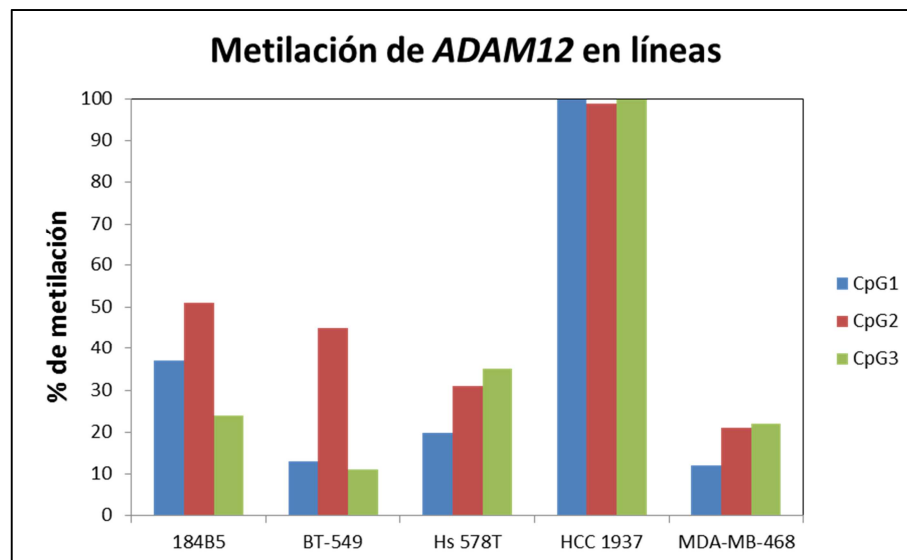


Figura 3. Metilación de *ADAM12* en líneas celulares

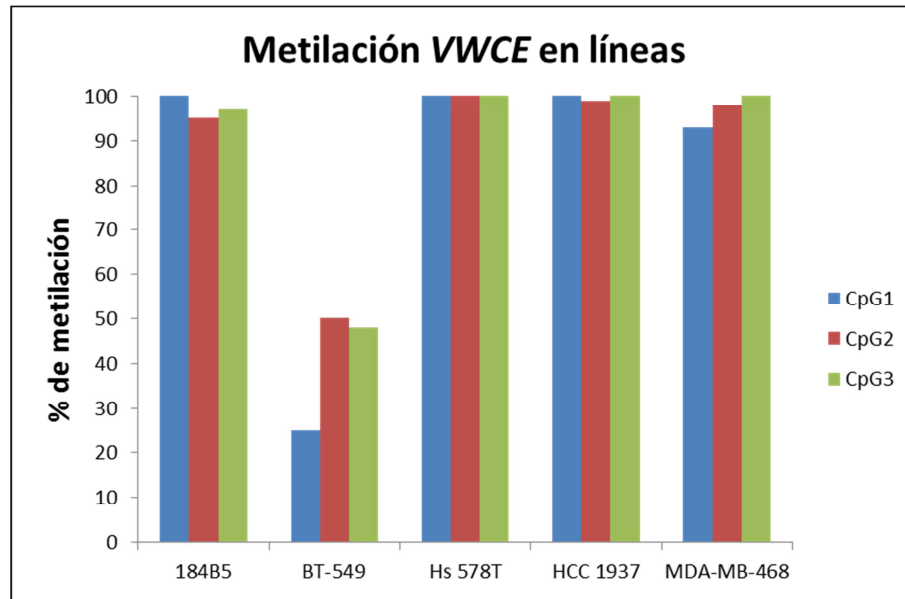


Figura 4. Metilación de *VWCE* en líneas celulares

En el caso de *DLEU7*, sólo la tercera CpG está diferencialmente metilada entre la línea mamaria *normal-like* 184B5 y las líneas de CM TN analizadas ( $p < 0,01$ ) (Figura 5); mientras que para *NKAPL* las dos CpGs analizadas se encuentran diferencialmente metiladas ( $p < 0,01$ ) (Figura 6).

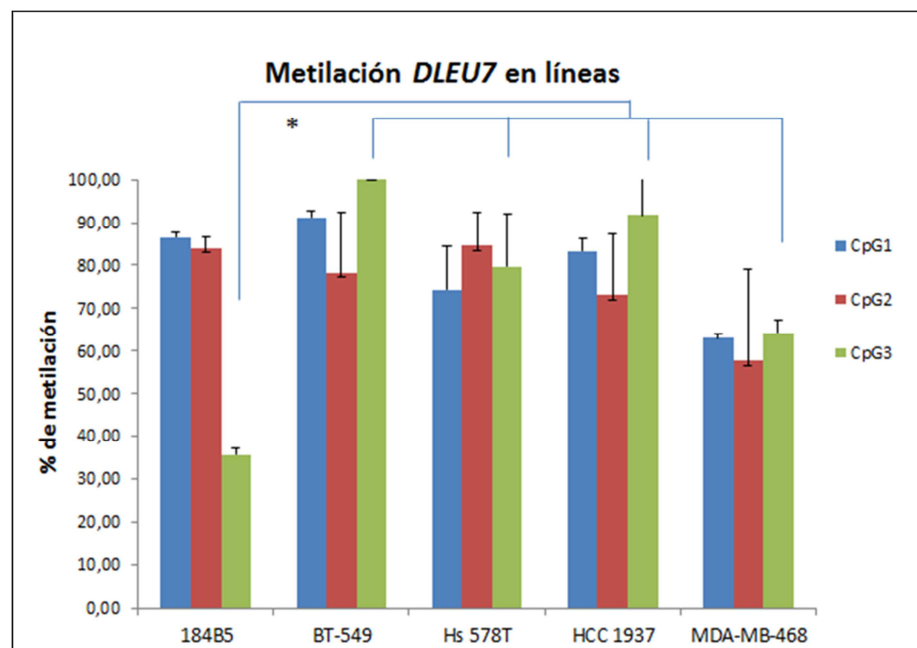


Figura 5. Metilación de *DLEU7* en líneas celulares

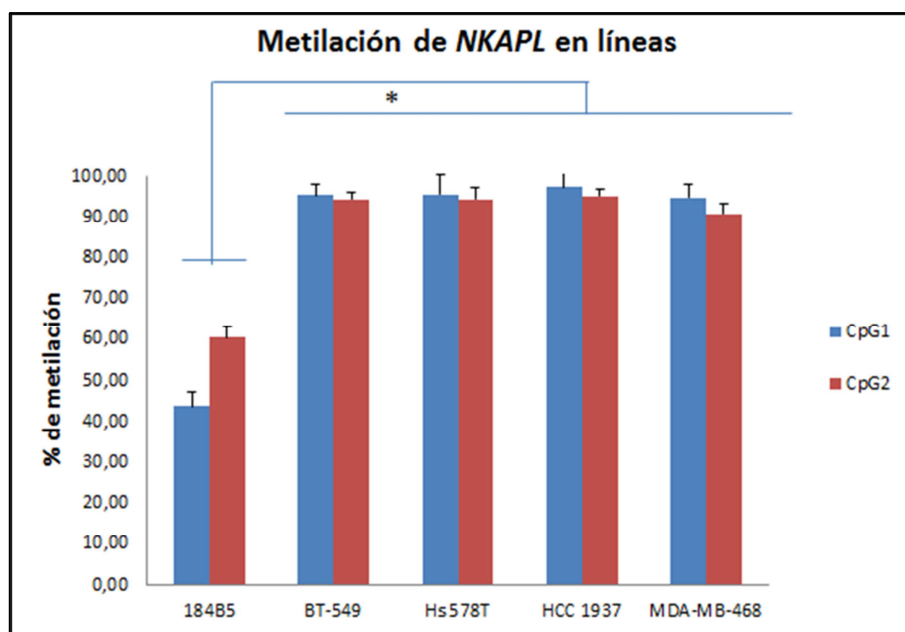


Figura 6. Metilación de *NKAPL* en líneas celulares

## 2.2 Metilación en tejidos

Aunque no se obtuvieron resultados diferencialmente metilados en los genes *ADAM12* y *VWCE* en líneas celulares, se intentó realizar la validación del resultado del *array* en tejidos. Aun así, no se han podido obtener resultados de metilación de los tejidos de *ADAM12* y *VWCE* por problemas con la amplificación por PCR y/o detección por pirosecuenciación de las muestras procedentes de tejido parafinado. En el caso de *ADAM12* por ejemplo, el problema ha podido ser el gran tamaño del amplicón de PCR ya que el fragmento a analizar en muchos de los tejidos parafinados no se ha podido amplificar, como se puede observar en la figura 7, posiblemente por fragmentación del DNA.

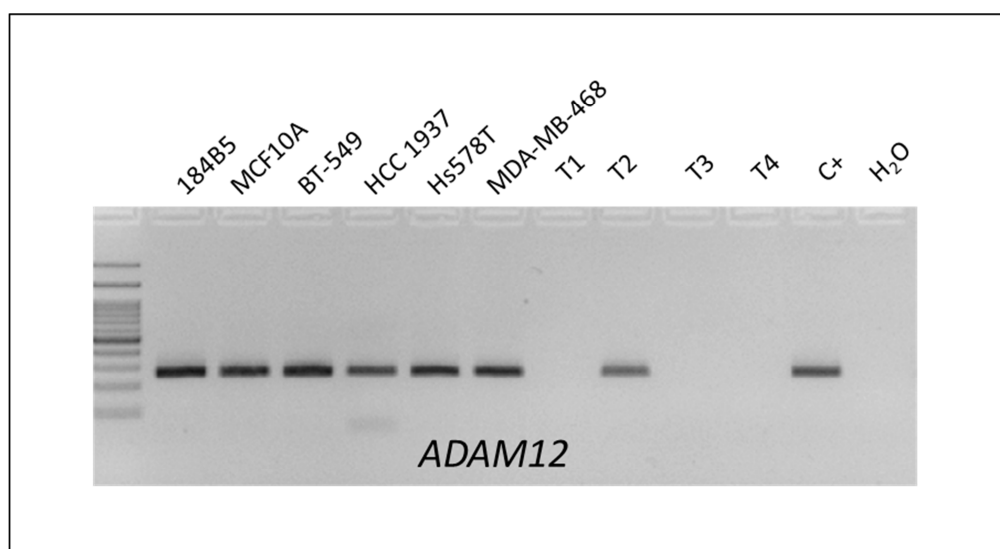
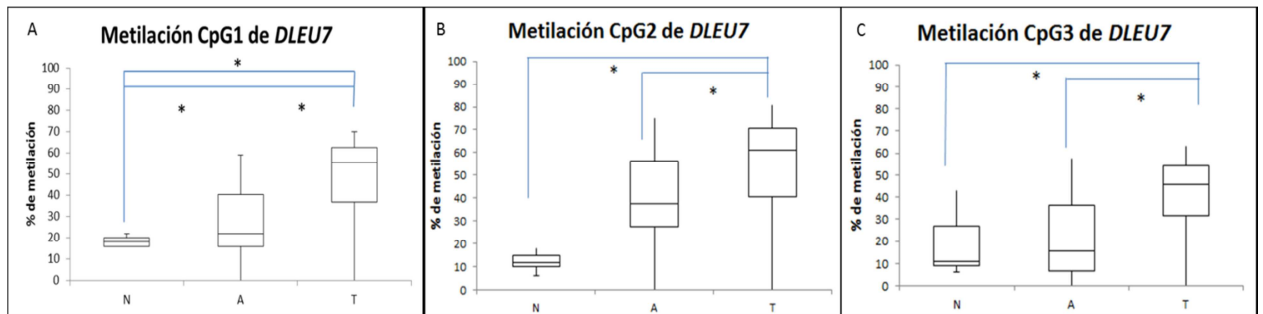


Figura 7. Gel de agarosa mostrando amplificación del gen *ADAM12* en líneas y la falta de amplificación en tejidos identificados como T1, T3 y T4.

Es por ello, que los resultados del *array* no se han podido validar para estos genes.

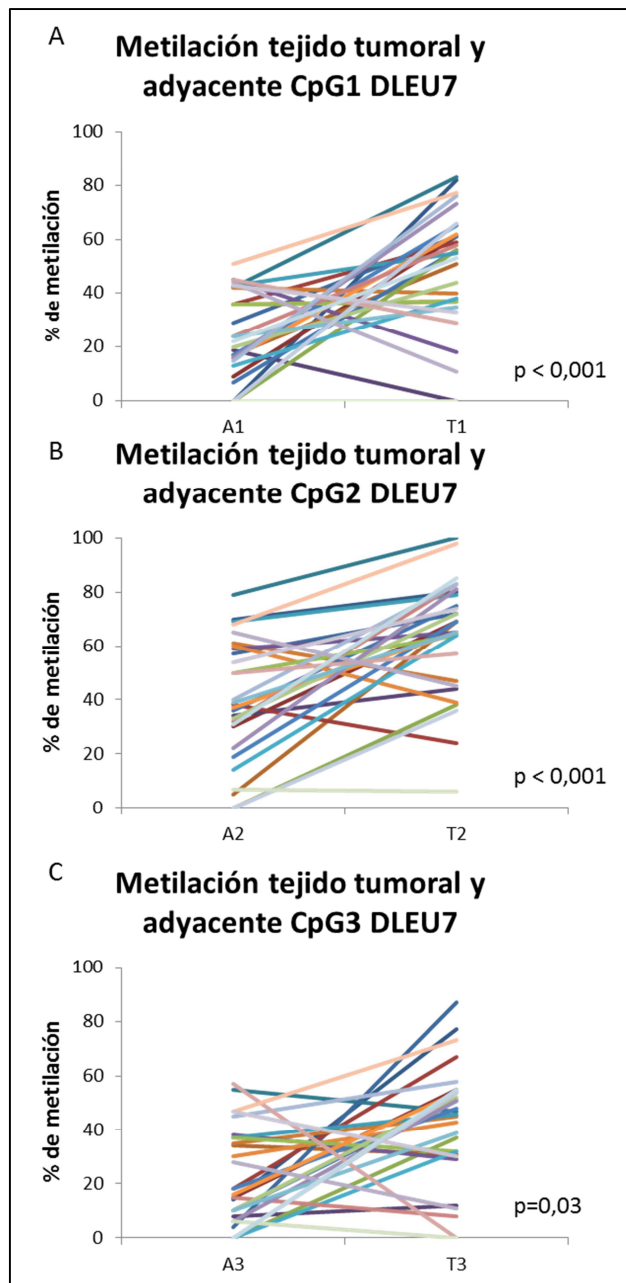
Para determinar el estado de metilación de los genes *DLEU7* y *NKAPL* en los tejidos no neoplásicos que provienen de mamoplastia (N), del tejido anexo al tumor (A) y del tejido tumoral TN (T) se realizó la pirosecuenciación de tres CpGs seleccionados para *DLEU7* y dos CpGs para *NKAPL*.

En el caso de *DLEU7* se ven diferencias significativas entre tejido no neoplásico y adyacente frente al tumor en todas las CpGs analizadas ( $p < 0,05$ ) y en la primera CpG también se observa diferencia significativa entre el nivel de metilación del tejido no neoplásico y el tejido adyacente al tumor ( $p = 0,024$ ). Observándose esta tendencia ascendente de metilación en todas las CpGs analizadas (Figura 8).



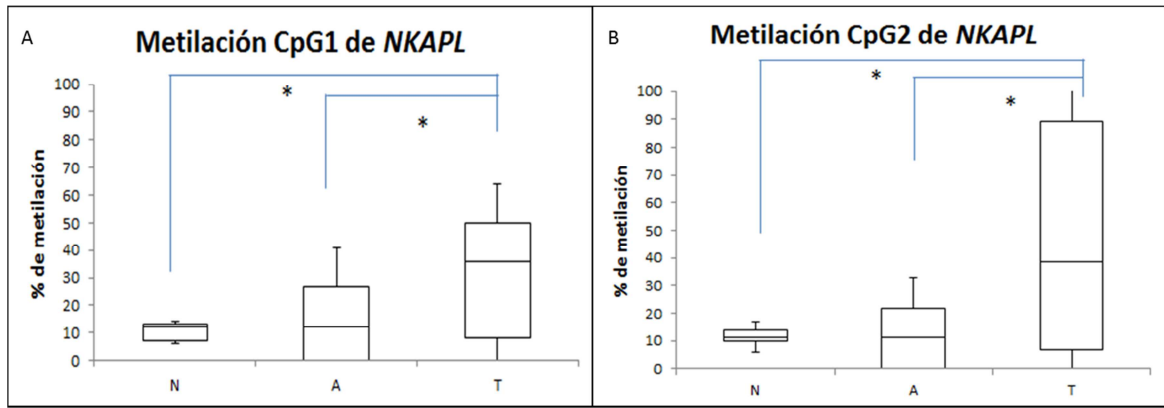
**Figura 8.** Metilación de las distintas CpG analizadas para el gen *DLEU7* en tejido no-neoplásico mamario (N), tejido adyacente a tumor (A) y tejido tumoral TN (T) para las distintas CpGs analizadas.

Al comparar cada valor de metilación del tejido adyacente con su tumor pareado también se observa una diferencia significativa en los niveles de metilación, estando hipermetilado el tejido tumoral (Figura 9).



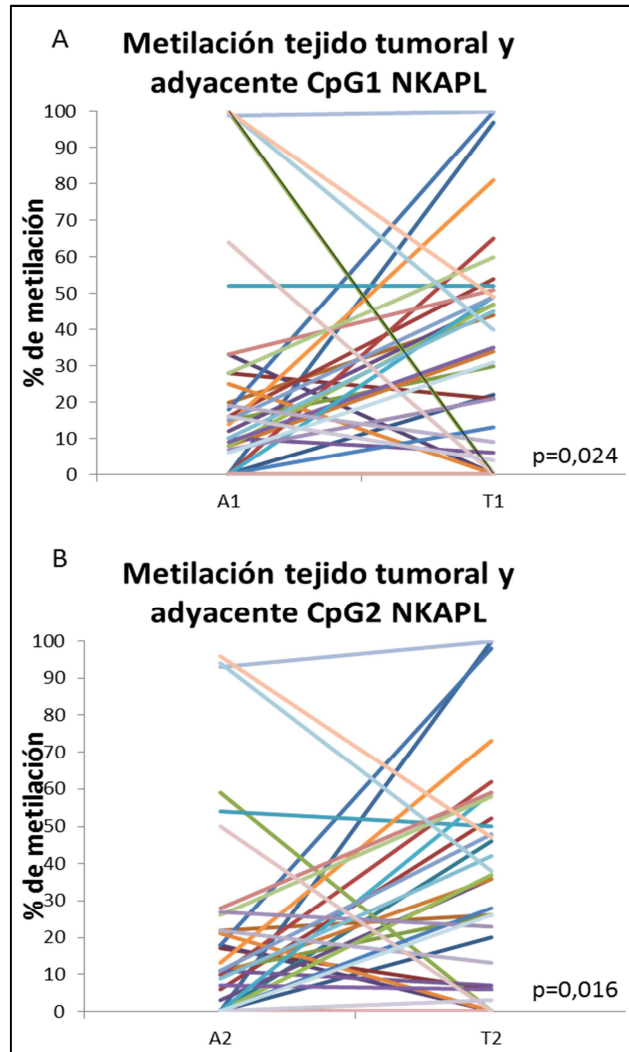
**Figura 9.** Diferencias de metilación entre tejido adyacente (A) y tumoral TN (T) para las distintas CpGs analizadas para el gen *DLEU7*.

En el caso de *NKAPL* no se observan diferencias estadísticamente significativas entre el tejido no neoplásico (N) y el tejido adyacente (A) aunque en nuestra serie se observa una tendencia hacia la hipermetilación del tejido adyacente. Sin embargo, la diferencia es significativa con  $p = 0,014$  entre tejido adyacente y tumoral; y con  $p = 0,037$  entre tejido no neoplásico y tumoral (Figura 10).



**Figura 10.** Metilación de las distintas CpG analizadas para el gen *NKAPL* en tejido no-neoplásico mamario (N), tejido adyacente a tumor (A) y tejido tumoral TN (T) para las distintas CpGs analizadas.

Al comparar cada valor de metilación del tejido adyacente con su tumor pareado también se observa una diferencia significativa en los niveles de metilación, estando hipermetilado el tejido tumoral (Figura 11).



**Figura 11.** Diferencias de metilación entre tejido adyacente (A) y tumoral TN (T) para las distintas CpGs analizadas para el gen *NKAPL*.

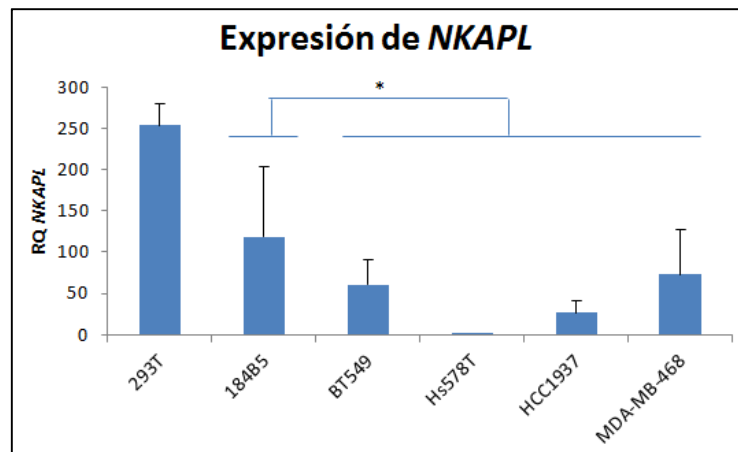
Estos resultados indican, por primera vez, que los tumores de mama triple negativo tienen niveles más altos de metilación en los genes *DLEU7* y *NKAPL*, que las muestras no neoplásicas, lo que sugiere que estos genes podrían actuar como genes supresores de tumores en CM.

### 3. EXPRESIÓN DE mRNA DE *NKAPL* EN LÍNEAS CELULARES

El nivel de expresión de *DLEU7* a nivel de mRNA en líneas celulares no se ha podido establecer ya que con la sonda utilizada no se han podido detectar niveles de expresión en ninguna línea de las que disponemos.

Sin embargo, el nivel de expresión de *NKAPL* se analizó en líneas de cáncer de mama del subtipo TN mediante qPCR, utilizando la línea 293T como control positivo. En todas las líneas de cáncer de mama TN encontramos unos niveles de *NKAPL* más bajos que en la línea *normal-like* 184B5, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) (Figura 12).

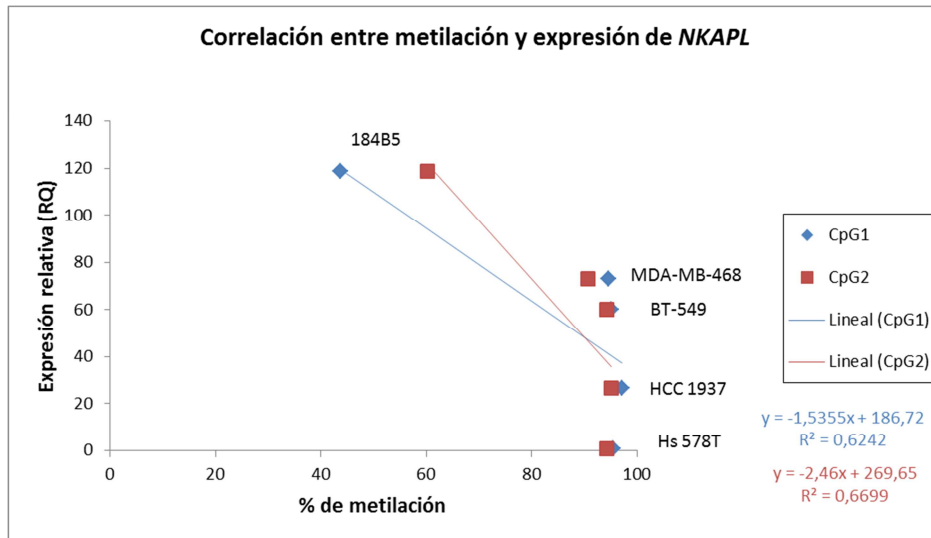
Estos resultados van unidos a los observados con la metilación de este gen por pirosecuenciación.



**Figura 12.** Valores de expresión de *NKAPL* normalizados respecto a la expresión de GAPDH ( $RQ=2^{-\Delta CT}$ ) en diferentes líneas celulares.

### 4. RELACIÓN ENTRE EXPRESIÓN Y METILACIÓN DE *NKAPL*

Tal y como muestra el gráfico (figura 13), se evidencia una correlación negativa entre ambas variables en las líneas celulares. Es decir, a mayor proporción de metilación, se observa una menor expresión, con un coeficiente de correlación de Pearson de -0,82 con un valor de  $p$  de 0,09 para la CpG1 y CpG2. Es decir, una correlación negativa moderada.



**Figura 13.** Relación entre nivel de expresión ( $RQ=2^{-\Delta Ct}$ ) de *NKAPL* y su porcentaje de metilación en líneas celulares.

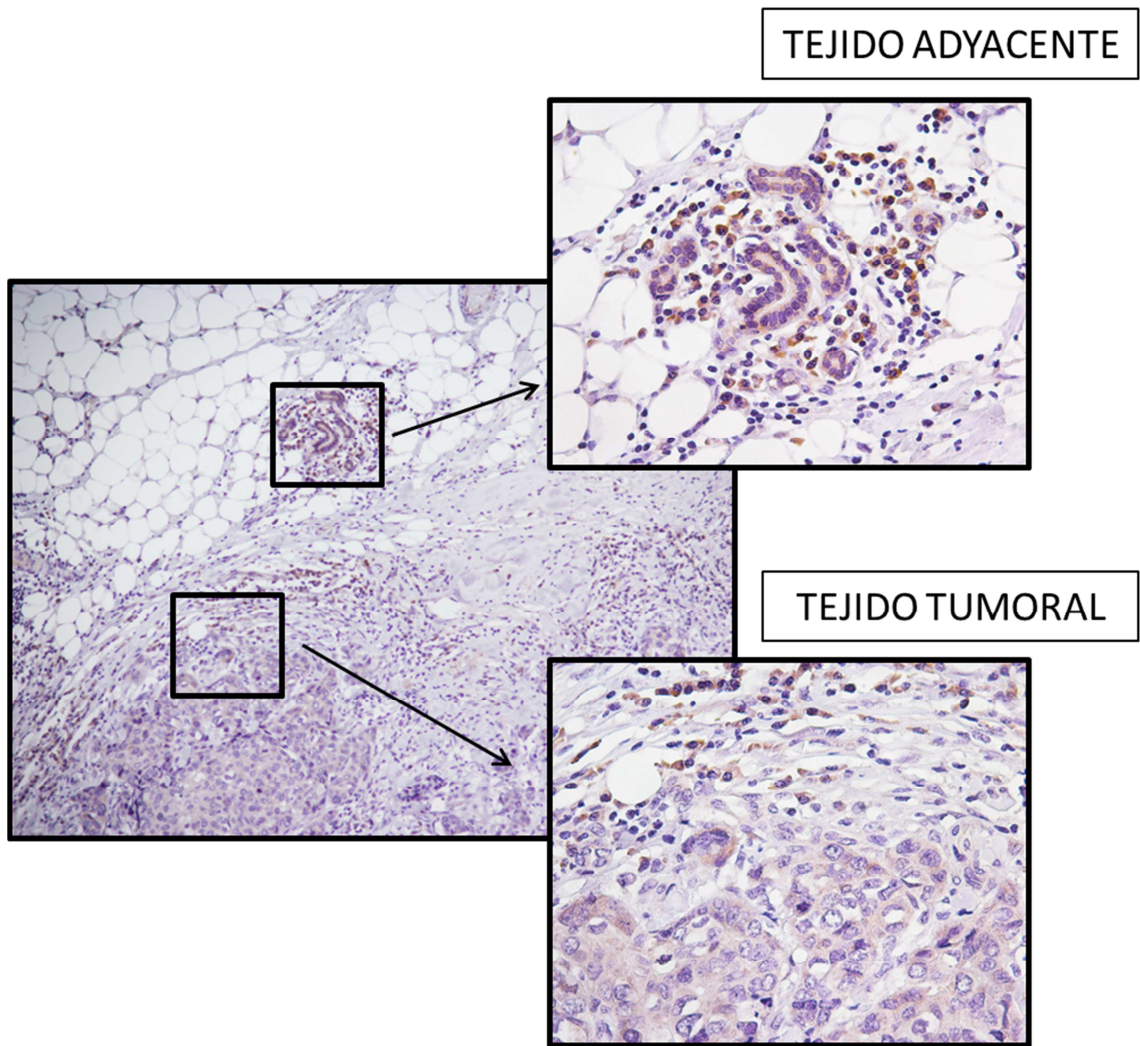
## 5. EXPRESIÓN PROTEICA DE DLEU7 Y NKAPL

### 5.1 Valoración inmunohistoquímica de DLEU7

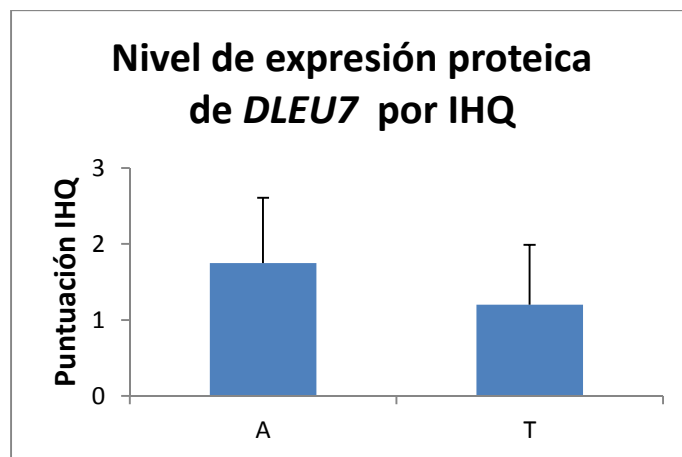
Con respecto al marcaje IHQ de la proteína DLEU7 se ha valorado el patrón (nuclear, citoplasmático o ambas) e intensidad de expresión tanto en áreas tumorales como en tejido no neoplásico adyacente a tumor, seleccionada por el patólogo. El patrón observado ha sido citoplasmático con intensidad variable (+, ++, +++), en las células epiteliales tanto luminales como basales de los ductos mamarios (Figura 14).

Hemos observado que la expresión tumoral es inferior o igual al tejido no neoplásico adyacente (Figura 15). Se ha detectado asimismo expresión de esta proteína en linfocitos, presentes en distinto grado junto a las áreas tumorales, que nos sirve como control endógeno de expresión de la proteína.





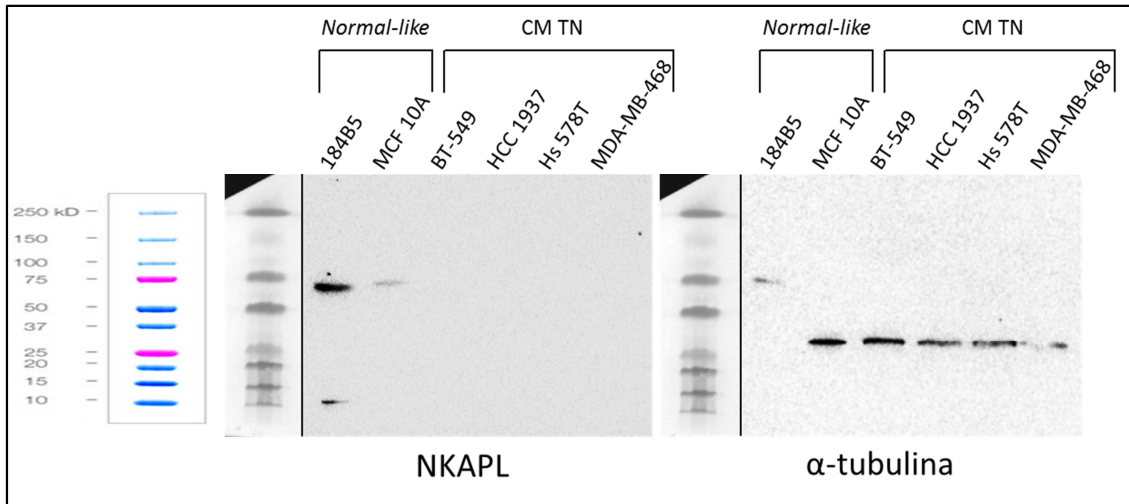
**Figura 14.** Imagen de un tejido mamario (aumento 10x), con una zona de tejido no-neoplásico adyacente a tumor representada en la imagen de arriba a la derecha y otra zona con tejido tumoral abajo a la derecha a un aumento 40x.



**Figura 15.** Nivel de expresión proteica de *DLEU7* por IHQ en tejido adyacente y tejido tumoral TN.

## 5.2 Western Blot de NKAPL

A nivel de proteína encontramos que NKAPL se expresaba a niveles no detectables por Western blot en las líneas celulares de CM TN; mientras que sí pudo detectarse en las líneas celulares *normal-like* (Figura 16). Estos resultados concuerdan con la expresión de mRNA mostrada en la figura 12.



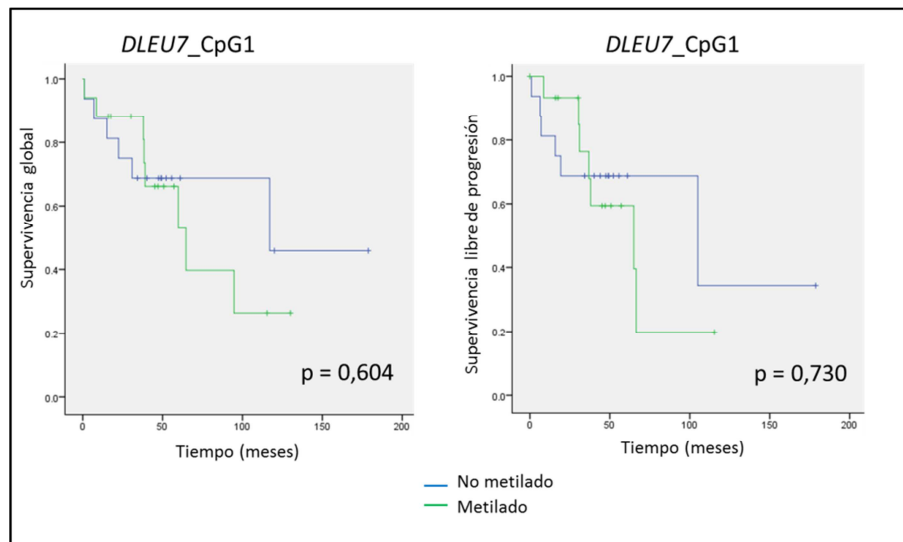
**Figura 16.** Expresión proteica de NKAPL en líneas celulares derivadas de tejido mamario *normal-like* y derivadas de CM TN. Se utilizó α-tubulina como control de carga.

## 6. VALOR CLÍNICO DE LA METILACIÓN DE *DLEU7* Y *NKAPL*

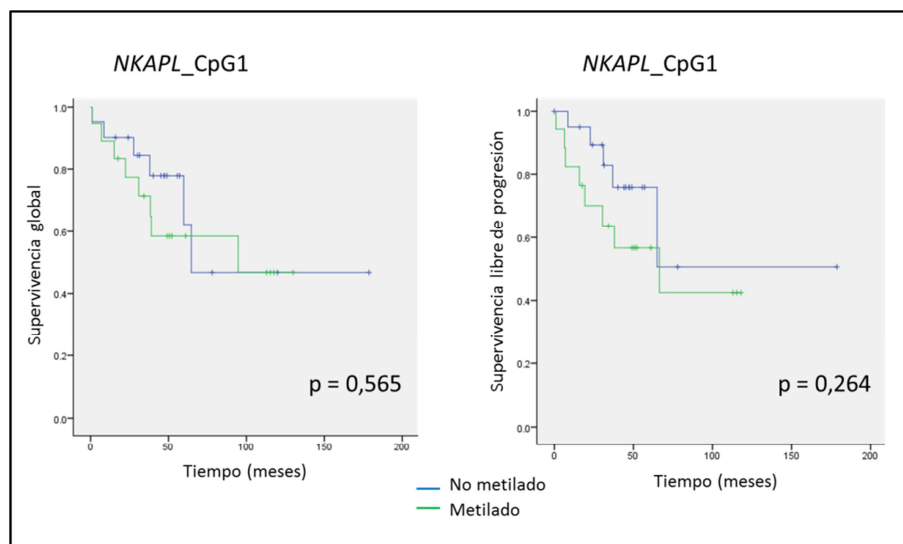
Por último, se ha examinado el valor clínico de la hipermetilación de estos genes en nuestra serie de pacientes con CM TN.

Como valor de corte para distinguir estadísticamente entre el estado metilado y no metilado de cada una de las islas CpG se escogió el valor máximo de metilación de las muestras no neoplásicas en la primera CpG (CpG del *array*) siendo para *DLEU7* un valor de metilación del 22% y para *NKAPL* del 14%.

Utilizando estos valores de corte, se ha observado una tendencia a la progresión y a una peor supervivencia, aunque sin significación estadística, asociada a tumores que presentan hipermetilación. Esta tendencia se puede observar en las siguientes figuras 17 y 18.



**Figura 17.** Representación de supervivencia y progresión para *DLEU7*.



**Figura 18.** Representación de supervivencia y progresión para *NKAPL*.

## DISCUSIÓN

Los distintos tipos de CM se clasifican desde el punto de vista clínico en casos de peor y mejor pronóstico en función de su morfología histológica, tamaño del tumor, grado histológico, afectación ganglionar, etc (55). Sin embargo, estos parámetros no explican del todo la heterogeneidad clínica característica de este tipo de cáncer (56).

La descripción de perfiles de expresión molecular obtenidos mediante *arrays* de expresión supuso un enorme avance en la clasificación de las pacientes en grupos de mejor y peor pronóstico (12). Este enfoque molecular añadió valor diagnóstico, pronóstico y predictivo para la identificación de marcadores moleculares con importancia clínica (15). Sin embargo, el uso de esta tecnología en la rutina asistencial quedó limitado por la inestabilidad molecular del mRNA en tejido parafinado y el alto coste económico de la obtención de estos perfiles de expresión. Actualmente contamos con marcadores inmunohistoquímicos subrogados que permiten estratificar los tumores en subgrupos diferentes clínicamente, sobre la base de biomarcadores predictivos de respuesta al tratamiento (expresión de RE, RP, HER2 y Ki-67) (13). Sin embargo, estos marcadores inmunohistoquímicos tampoco explican del todo la heterogeneidad en el pronóstico y la respuesta al tratamiento de las pacientes dentro de un mismo subtipo de CM, por lo que es necesario identificar nuevos candidatos moleculares. Esta búsqueda es aún más prioritaria en aquellos tipos tumorales que carecen de tratamientos dirigidos, como es el caso del CM TN.

El TN es el subtipo de CM más agresivo con frecuentes recidivas locales y a distancia (metástasis) que conllevan una mayor mortalidad de estas pacientes (16). Este hecho, unido a que las pacientes con CM TN carecen de un tratamiento dirigido eficaz, hace muy necesaria la identificación de nuevas alteraciones moleculares que puedan convertirse en biomarcadores con valor predictivo y/o pronóstico. Entre ellas se encuentra la metilación alterada de genes supresores de tumores, que conllevan la inhibición de su expresión, y que tienen un gran impacto en la progresión de la enfermedad. El silenciamiento de la expresión génica mediante mecanismos epigenéticos anómalos como la hipermetilación y la acetilación de histonas ha sido ampliamente descrito en cáncer (57).

En este sentido el empleo de nuevas tecnologías de alto rendimiento tiene una importancia crucial para este tipo de estudios, puesto que permite obtener una gran cantidad de información a partir de una única muestra. Su empleo está siendo cada vez más extendido en campos como el de la Epigenómica para el estudio global del perfil epigenético de todo el genoma (58). Derivados de estos estudios se están describiendo nuevos perfiles de metilación de DNA asociados a los distintos tipos tumorales (59), al pronóstico y a la sensibilidad al tratamiento quimioterápico (60).

El presente trabajo se ha centrado en los resultados del *Human methylation array 450K* en tumores de CM TN, lo que ha proporcionado un estudio completo del metiloma de estas pacientes. Cabe destacar que el empleo de *arrays* de metilación ha generado resultados con importancia clínica en CM. De esta manera se ha demostrado que los perfiles de metilación pueden predecir el riesgo de padecer CM a partir de un análisis realizado en sangre (61, 62), y puede asociarse a una mayor tendencia a la progresión de carcinoma ductal *in situ* a carcinoma ductal infiltrante (63). También se ha descrito que los CM HER2+ tienen una firma epigenómica que los diferencia del resto de subtipos (64). En un trabajo reciente se ha puesto en evidencia que el epigenoma no sólo varía entre tipos tumorales, sino también entre estados preneoplásicos y tumorales (65). El modelo de transformación celular desde tejido no neoplásico a lesión tumoral se basa en la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas descritas en CM (66, 67) y otros tipos de cáncer, como gástrico (68) y colorectal (69).

Las ventajas del empleo de técnicas de alto rendimiento se contrarrestan con la necesidad de considerar análisis bioinformáticos robustos para obtener conclusiones más fundamentadas. En ese

sentido, en nuestro estudio hemos empleado herramientas bioinformáticas para identificar nuevos genes con metilación (hipo- e hipermetilación) diferencial en los distintos subtipos de CM, que no habían sido previamente descritos. En concreto para el subtipo TN hemos detectado posibles marcadores específicamente metilados de forma aberrante en CM TN con respecto a tejido mamario no neoplásico. Entre los genes más diferencialmente metilados, hemos seleccionado dos genes significativamente hipometilados (*ADAM12* y *VWCE*) y tres hipermetilados (*PCDHA13*, *DLEU7* y *NKAPL*), por haberse descrito como regulados epigenéticamente en otros tumores.

Entre los genes encontrados como hipometilados en CM TN con respecto a tejido no neoplásico, *ADAM12* (*ADAM Metallopeptidase Domain 12*) es un gen que codifica para una proteína implicada en procesos biológicos de adhesión celular participando en interacciones célula-célula y célula-matriz, así como procesos tan dispares como la fertilización, el desarrollo muscular y la neurogénesis. Está descrito su papel como biomarcador diagnóstico en cáncer gástrico (70), así como su papel en la transición epitelio-mesénquima, mecanismo por el cual las células epiteliales pasan a adquirir capacidades migratorias e invasivas (71, 72). Cabe destacar que este gen podría tener valor clínico en CM TN, por ser diana de los microRNAs miR-29 y miR-200, con implicación pronóstica y quimiopredictiva (73) y porque tiene valor pronóstico en CM RE+ (74). Su hipometilación no ha sido descrita previamente y aún no ha sido posible validar los resultados del *array* técnicamente. Los problemas de amplificación mediante PCR en tejido parafinado han sido ampliamente descritos por la degradación que sufren los ácido nucleicos por la utilización de distintos fijadores (75),(76).

Otro gen seleccionado como hipometilado en CM TN, *VWCE* (*Von Willebrand Factor C and EGF Domains*), también conocido como *URG11*, es un importante elemento regulador en la vía de señalización de la beta-catenina, siendo por tanto relevante como mediador de adhesión y activador del crecimiento y la tumorigénesis hepatocelular (77) y gástrica (78). Se ha demostrado que su expresión está aumentada en carcinoma hepatocelular (79), donde parece ser una diana terapéutica (80). En tumores de páncreas su expresión también está aumentada con respecto a tejido normal, lo que favorece la transición epitelio-mesénquima y predice un peor pronóstico(77). Su implicación en CM no ha sido aún descrita.

Por otro lado, entre los genes hipermetilados en CM TN, *PCDHA13* (*Protocadherin Alpha 13*) es miembro de un grupo de genes que codifican para la superfamilia de moléculas de adhesión con una organización genómica similar a la de los genes del receptor de células B y receptor de células T. Su metilación ha sido descrita en glioma (81) y cáncer de cérvix, donde se ha visto que ocurre en bloque junto con otros miembros de la superfamilia (82).

Uno de los genes cuya hipermetilación hemos encontrado y validado en CM TN es *NKAPL* (*NFKB Activating Protein-Like*). Su función está sin describir todavía, aunque tiene varios rasgos característicos de un gen muy conservado de retrotransposición de NKAP (proteína activadora de NFkB) (83). NKAP fue identificado como una proteína de interacción con el receptor (RIP), que potencialmente puede activar NFkB, así como otras RIPs (84). Posteriormente se ha demostrado su papel represor en la transcripción de mediadores de la ruta de señalización de Notch así como su papel esencial para el desarrollo de las células T (85). Esta importante función, junto con la elevada expresión de Notch-1 descrita para las pacientes con CM de peor pronóstico (86), podría explicar que la hipermetilación de *NKAPL* que hemos observado por primera vez en nuestro estudio podría contribuir a la progresión tumoral mediada por Notch.

El otro gen que hemos validado como hipermetilado en CM TN es *DLEU7* (*Deleted In Lymphocytic Leukemia, 7*), que ha sido identificado como un posible gen supresor tumoral, localizado en la región cromosómica *13q14*, muy importante en la progresión de la leucemia linfocítica crónica (LLC) (87). Recientemente, mediante la tecnología de *microarrays* se ha demostrado que la región *13q14*, suprimida en LLC, contiene el gen *DLEU7* (88) y los miR-15/16, que actúan como supresor de tumores

(89). Además un estudio mostró que la hipermetilación del promotor de *DLEU7* con el consiguiente silenciamiento del gen está presente en el 61% de los casos de LLC (87), lo que contribuye a la idea de que la inactivación de este gen cumple la hipótesis propuesta por Knudson relativa a la inactivación de genes supresores de tumores por la combinación de alteraciones genéticas (deleciones) y epigenéticas (metilación) en los dos alelos de cada gen (90). En carcinoma hepatocelular también se ha descrito *DLEU7* como posible gen supresor de tumores (91). Estos hechos, junto con la descripción de la existencia de deleciones en *13q14* asociada a resistencia al tratamiento en CM (92) contribuye a mantener nuestra hipótesis de que *DLEU7* juega un papel importante como gen supresor de tumores en tejido mamario y que su hipermetilación está implicada en la progresión del CM TN.

Además, es muy importante resaltar que los resultados obtenidos mediante pirosecuenciación indican, por primera vez, que los CM TN tienen niveles más altos de metilación en los genes *DLEU7* y *NKAPL* que las muestras no neoplásicas. Esto sugiere que podrían actuar como genes supresores de tumores en CM TN. Además, para el gen *DLEU7* hemos descrito que su silenciamiento por metilación podría desempeñar un papel fundamental en la transformación del tejido, ya que se muestra un gradiente de metilación entre tejido no neoplásico procedente de reducción mamaria, tejido adyacente al tumor y tejido tumoral. Estas alteraciones epigenéticas se han analizado por primera vez en este trabajo, y para ello hemos utilizado la técnica de pirosecuenciación, que permite realizar mediciones cuantitativas de metilación en comparación con la PCR específica de metilación, que es una técnica no cuantitativa que únicamente pone en evidencia la presencia o ausencia de metilación (93-97).

En nuestro trabajo, los distintos porcentajes de metilación parecen correlacionarse de forma inversa con distintos niveles de expresión de mRNA y proteínas, al presentar menor expresión los casos y las líneas celulares de mayor metilación; aunque es necesario abordar un estudio con mayor número de muestras.

También hay que destacar, que es la primera vez que se describe el patrón inmunohistoquímico de *DLEU7* en CM TN, caracterizado por una disminución de la expresión en tumor con respecto a tejido no neoplásico. Este resultado es coherente con una mayor metilación del primero en relación al último, aunque debemos ampliar la población de estudio para comprobar que existe dicha asociación.

Como se ha mencionado anteriormente, nuestro grupo y otros han descrito alteraciones epigenéticas que se distribuyen de forma heterogénea en los subtipos de CM (47), como la hipermetilación preferente de los genes *RASSF1A* (35) y *RASSF2* (46) en el subtipo luminal, *BRCA1* en TN (98) y E-cadherina en HER2+ (48). Es muy importante destacar que muchas de estas alteraciones tienen valor predictivo de respuesta al tratamiento, como la hipermetilación de *MGMT* asociada a una mejor respuesta a temozolomida en glioblastoma multiforme (99), y/o valor pronóstico, como la hipermetilación de los genes *EPB41L3* y *TSP-1* en gliomas difusos (100), y *RASSF2* en cáncer de cérvix (101) y en CM (93).

Por este motivo, se ha estudiado también el papel clínico de la hipermetilación de *DLEU7* y *NKAPL* en CM TN. Estableciendo un valor de metilación para estratificar nuestra serie de pacientes con CM TN en metilados y no metilados, hemos observado una tendencia, aunque no significativa, por la que la hipermetilación de los genes *DLEU7* y *NKAPL* podría tener valor pronóstico, prediciendo progresión y/o peor supervivencia de las pacientes. Para comprobar esta hipótesis precisamos de un grupo más numeroso de pacientes.

## CONCLUSIONES

1. Los *arrays* de metilación son herramientas útiles para identificar genes diferencialmente metilados en CM TN con respecto al tejido no neoplásico.
2. Los genes *DLEU7* y *NKAPL* están hipermetilados en CM TN. Esta alteración epigenética, aunque a niveles más bajos, también se encuentra en el tejido adyacente al tumor
3. La hipermetilación de estos genes muestra una tendencia, aunque no significativa, a tener valor pronóstico, prediciendo progresión y/o peor supervivencia de las pacientes.

## LIMITACIONES

La principal limitación de este estudio es el tamaño muestral del que disponemos. En la realización de las biopsias se procura eliminar la menor cantidad de tejido posible, por la implicación estética y psicológica que tiene esta extirpación de tejido mamario en las mujeres. Es por ello, que se dispone de muy poco tejido adyacente a tumor. Tejidos provenientes de mamoplastias de reducción, no neoplásicas, son muy difíciles de obtener. Además la frecuencia dentro del CM del subtipo TN no es tan alta. Por todo ello, el *array* fue realizado con muy pocas muestras (8 TN y 5 tejido no neoplásicos).

Por otro lado, la calidad de la muestra de los bloques de parafina es muy limitante en el estudio molecular (a nivel de metilación y expresión) de algunos genes.

Por último, es muy importante destacar el aspecto económico y de falta de personal investigador.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Stefansson OA, Moran S, Gomez A, Sayols S, Arribas-Jorba C, Sandoval J, et al. A DNA methylation-based definition of biologically distinct breast cancer subtypes. *Mol Oncol*. 2015;9(3):555-68.
2. Smith RA, Andrews K, Brooks D, DeSantis CE, Fedewa SA, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer screening in the United States, 2016: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening. *CA Cancer J Clin*. 2016;66(2):95-114.
3. Ardanaz E, Moreno-Iribas C, de Rada MEP, Ezponda C, Floristan Y, Nava-ridas N, et al. Incidence and mortality due to cancer in Navarre, 1998-2002. Trends in the last 30 years. *Anales Del Sistema Sanitario De Navarra*. 2007;30(2):245-70.
4. Tabarestani S, Ghaderian SM, Rezvani H, Mirfakhraie R, Ebrahimi A, Attarian H, et al. Prognostic and predictive value of copy number alterations in invasive breast cancer as determined by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Cell Oncol (Dordr)*. 2014;37(2):107-18.
5. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.
6. Navarra IdSPd. Incidencia del cáncer en Navarra 2008-2009 2014 [Available from: [http://www.navarra.es/NR/rdonlyres/C0018A47-D51A-4F32-807A-58039F245AAF/294701/Notransmisibles\\_Cancer.pdf](http://www.navarra.es/NR/rdonlyres/C0018A47-D51A-4F32-807A-58039F245AAF/294701/Notransmisibles_Cancer.pdf)].
7. Reeves GK, Pirie K, Green J, Bull D, Beral V, Collaborators MWS. Reproductive factors and specific histological types of breast cancer: prospective study and meta-analysis. *Br J Cancer*. 2009;100(3):538-44.
8. Stuckey AR, Onstad MA. Hereditary breast cancer: an update on risk assessment and genetic testing in 2015. *Am J Obstet Gynecol*. 2015;213(2):161-5.
9. Tumour of the breast and female genital organs. Lyon: IARC Press; 2003.
10. Böcker W. [WHO classification of breast tumors and tumors of the female genital organs: pathology and genetics]. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 2002;86:116-9.
11. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*. 2013;132(5):1133-45.
12. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(19):10869-74.
13. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thuerlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Annals of Oncology*. 2013;24(9):2206-23.
14. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao DX, Leung S, Snider J, et al. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009;101(10):736-50.
15. Tomao F, Papa A, Zaccarelli E, Rossi L, Caruso D, Minozzi M, et al. Triple-negative breast cancer: new perspectives for targeted therapies. *Oncotargets and Therapy*. 2015;8:177-93.
16. Anders CK, Carey LA. Biology, Metastatic Patterns, and Treatment of Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*. 2009;9:S73-S81.
17. Abramson VG, Lehmann BD, Ballinger TJ, Pietenpol JA. Subtyping of triple-negative breast cancer: implications for therapy. *Cancer*. 2015;121(1):8-16.
18. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(7):2750-67.
19. Bediaga NG, Acha-Sagredo A, Guerra I, Viguri A, Albaina C, Ruiz Diaz I, et al. DNA methylation epigenotypes in breast cancer molecular subtypes. *Breast Cancer Res*. 2010;12(5):R77.



20. Palma G, Frasci G, Chirico A, Esposito E, Siani C, Saturnino C, et al. Triple negative breast cancer: looking for the missing link between biology and treatments. *Oncotarget*. 2015;6(29):26560-74.
21. Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes & Development*. 2009;23(7):781-3.
22. Brooks J, Cairns P, Zeleniuch-Jacquotte A. Promoter methylation and the detection of breast cancer. *Cancer Causes & Control*. 2009;20(9):1539-50.
23. Zoghbi HY, Beaudet AL. Epigenetics and Human Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(2):a019497.
24. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*. 2010;28(10):1057-68.
25. Mazzi EA, Soliman KFA. Basic concepts of epigenetics Impact of environmental signals on gene expression. *Epigenetics*. 2012;7(2):119-30.
26. Sandoval J, Esteller M. Cancer epigenomics: beyond genomics. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2012;22(1):50-5.
27. Kim JK, Samaranyake M, Pradhan S. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009;66(4):596-612.
28. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature Reviews Genetics*. 2007;8(4):286-98.
29. Feng W, Shen L, Wen S, Rosen DG, Jelinek J, Hu X, et al. Correlation between CpG methylation profiles and hormone receptor status in breast cancers. *Breast Cancer Res*. 2007;9(4):R57.
30. Karsli-Ceppioglu S, Dagdemir A, Judes G, Ngollo M, Penault-Llorca F, Pajon A, et al. Epigenetic mechanisms of breast cancer: an update of the current knowledge. *Epigenomics*. 2014;6(6):651-64.
31. Fang C, Wei XM, Zeng XT, Wang FB, Weng H, Long X. Aberrant GSTP1 promoter methylation is associated with increased risk and advanced stage of breast cancer: a meta-analysis of 19 case-control studies. *BMC Cancer*. 2015;15:920.
32. Widschwendter M, Siegmund KD, Müller HM, Fiegl H, Marth C, Müller-Holzner E, et al. Association of breast cancer DNA methylation profiles with hormone receptor status and response to tamoxifen. *Cancer Res*. 2004;64(11):3807-13.
33. Fiegl H, Millinger S, Goebel G, Müller-Holzner E, Marth C, Laird PW, et al. Breast cancer DNA methylation profiles in cancer cells and tumor stroma: association with HER-2/neu status in primary breast cancer. *Cancer Res*. 2006;66(1):29-33.
34. Wang L, Zeng H, Wang Q, Zhao Z, Boyer TG, Bian X, et al. MED12 methylation by CARM1 sensitizes human breast cancer cells to chemotherapy drugs. *Sci Adv*. 2015;1(9):e1500463.
35. Feng W, Shen L, Wen S, Rosen DG, Jelinek J, Hu X, et al. Correlation between CpG methylation profiles and hormone receptor status in breast cancers. *Breast Cancer Research*. 2007;9(4).
36. Shen Y, Wang Z, Loo LW, Ni Y, Jia W, Fei P, et al. LINC00472 expression is regulated by promoter methylation and associated with disease-free survival in patients with grade 2 breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;154(3):473-82.
37. Feinberg AP. Cancer epigenetics is no Mickey Mouse. *Cancer Cell*. 2005;8(4):267-8.
38. Esteller M. Molecular origins of cancer: Epigenetics in cancer. *New England Journal of Medicine*. 2008;358(11):1148-59.
39. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nature Genetics*. 1999;21(2):163-7.
40. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, et al. DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(25):2424-33.
41. Burmeister T, Meyer C, Schwartz S, Hofmann J, Molkentin M, Kowarz E, et al. The MLL recombinome of adult CD10-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results from the GMALL study group. *Blood*. 2009;113(17):4011-5.
42. Meyer C, Kowarz E, Hofmann J, Renneville A, Zuna J, Trka J, et al. New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia*. 2009;23(8):1490-9.

43. de Groot JS, Pan X, Meeldijk J, van der Wall E, van Diest PJ, Moelans CB. Validation of DNA promoter hypermethylation biomarkers in breast cancer - a short report. *Cellular Oncology*. 2014;37(4):297-303.
44. Stefansson OA, Esteller M. Epigenetic Modifications in Breast Cancer and Their Role in Personalized Medicine. *American Journal of Pathology*. 2013;183(4):1052-63.
45. Geurts van Kessel A. The cancer genome: from structure to function. *Cellular oncology (Dordrecht)*. 2014;37(3):155-65.
46. Panizo A, Perez Janices N, Blanco Luquin I, Torrea N, Cordoba A, Vicente Garcia F, et al. Different clinical involvement of RASSF hypermethylation in breast cancer subtypes. *Virchows Archiv*. 2015;467:S65-S.
47. Klijn C, Durinck S, Stawiski EW, Haverty PM, Jiang Z, Liu H, et al. A comprehensive transcriptional portrait of human cancer cell lines. *Nature Biotechnology*. 2015;33(3):306-+.
48. Bertolo C, Guerrero D, Vicente F, Cordoba A, Esteller M, Roperio S, et al. Differences and molecular immunohistochemical parameters in the subtypes of infiltrating ductal breast cancer. *American Journal of Clinical Pathology*. 2008;130(3):414-24.
49. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *New England Journal of Medicine*. 2000;343(19):1350-4.
50. Esteller M. Epigenetic Changes in Cancer. *Scientist*. 2011;25(3):34-9.
51. Plumb JA, Strathdee G, Sludden J, Kaye SB, Brown R. Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter. *Cancer Research*. 2000;60(21):6039-44.
52. Bibikova M, Fan JB. Genome-wide DNA methylation profiling. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2010;2(2):210-23.
53. Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, et al. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*. 2011;98(4):288-95.
54. Pidsley R, Y Wong CC, Volta M, Lunnon K, Mill J, Schalkwyk LC. A data-driven approach to preprocessing Illumina 450K methylation array data. *BMC Genomics*. 2013;14:293.
55. Wells M ea. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. Lyon: IARC; 2003.
56. Guiu S, Michiels S, André F, Cortes J, Denkert C, Di Leo A, et al. Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. *Ann Oncol*. 2012;23(12):2997-3006.
57. Rajkumar T, Vijayalakshmi N, Gopal G, Sabitha K, Shirley S, Raja UM, et al. Identification and validation of genes involved in gastric tumorigenesis. *Cancer Cell International*. 2010;10.
58. Laird PW. Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. *Nature Reviews Genetics*. 2010;11(3):191-203.
59. Gabriel AS, Lafta FM, Schwalbe EC, Nakjang S, Cockell SJ, Iliasova A, et al. Epigenetic landscape correlates with genetic subtype but does not predict outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Epigenetics*. 2015;10(8):717-26.
60. Li M, Balch C, Montgomery JS, Jeong M, Chung JH, Yan P, et al. Integrated analysis of DNA methylation and gene expression reveals specific signaling pathways associated with platinum resistance in ovarian cancer. *Bmc Medical Genomics*. 2009;2.
61. van Veldhoven K, Polidoro S, Baglietto L, Severi G, Sacerdote C, Panico S, et al. Epigenome-wide association study reveals decreased average methylation levels years before breast cancer diagnosis. *Clin Epigenetics*. 2015;7(1):67.
62. Severi G, Southey MC, English DR, Jung CH, Lonie A, McLean C, et al. Epigenome-wide methylation in DNA from peripheral blood as a marker of risk for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;148(3):665-73.
63. Johnson KC, Koestler DC, Fleischer T, Chen P, Jenson EG, Marotti JD, et al. DNA methylation in ductal carcinoma in situ related with future development of invasive breast cancer. *Clin Epigenetics*. 2015;7(1):75.

64. Lindqvist BM, Wingren S, Motlagh PB, Nilsson TK. Whole genome DNA methylation signature of HER2-positive breast cancer. *Epigenetics*. 2014;9(8):1149-62.
65. Holm K, Staaf J, Lauss M, Aine M, Lindgren D, Bendahl PO, et al. An integrated genomics analysis of epigenetic subtypes in human breast tumors links DNA methylation patterns to chromatin states in normal mammary cells. *Breast Cancer Res*. 2016;18(1):27.
66. Locke WJ, Clark SJ. Epigenome remodelling in breast cancer: insights from an early in vitro model of carcinogenesis. *Breast Cancer Res*. 2012;14(6):215.
67. Bombonati A, Sgroi DC. The molecular pathology of breast cancer progression. *J Pathol*. 2011;223(2):307-17.
68. Pontes TB, Chen ES, Gigeck CO, Calcagno DQ, Wisnieski F, Leal MF, et al. Reduced mRNA expression levels of MBD2 and MBD3 in gastric carcinogenesis. *Tumour Biol*. 2014;35(4):3447-53.
69. Azuara D, Rodriguez-Moranta F, de Oca J, Sanjuan X, Guardiola J, Lobaton T, et al. Novel methylation panel for the early detection of neoplasia in high-risk ulcerative colitis and Crohn's colitis patients. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(1):165-73.
70. Shimura T, Dagher A, Sachdev M, Ebi M, Yamada T, Joh T, et al. Urinary ADAM12 and MMP-9/NGAL complex detect the presence of gastric cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2015;8(3):240-8.
71. De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(2):97-110.
72. Ruff M, Leyme A, Le Cann F, Bonnier D, Le Seyec J, Chesnel F, et al. The Disintegrin and Metalloprotease ADAM12 Is Associated with TGF- $\beta$ -Induced Epithelial to Mesenchymal Transition. *PLoS One*. 2015;10(9):e0139179.
73. Duhachek-Muggy S, Zolkiewska A. ADAM12-L is a direct target of the miR-29 and miR-200 families in breast cancer. *BMC Cancer*. 2015;15:93.
74. Ma B, Ma Q, Jin C, Wang X, Zhang G, Zhang H, et al. ADAM12 expression predicts clinical outcome in estrogen receptor-positive breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(10):13279-83.
75. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol*. 2002;161(6):1961-71.
76. Gilbert MT, Haselkorn T, Bunce M, Sanchez JJ, Lucas SB, Jewell LD, et al. The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when? *PLoS One*. 2007;2(6):e537.
77. Peng W, Zhang J, Liu J. URG11 predicts poor prognosis of pancreatic cancer by enhancing epithelial-mesenchymal transition-driven invasion. *Med Oncol*. 2014;31(7):64.
78. Du R, Xia L, Sun S, Lian Z, Zou X, Gao J, et al. URG11 promotes gastric cancer growth and invasion by activation of beta-catenin signalling pathway. *J Cell Mol Med*. 2010;14(3):621-35.
79. Xie H, Liu J. [Increased expression URG11 in hepatocellular carcinoma tissues promotes the growth of hepatocellular carcinoma cells]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2015;31(11):1523-7.
80. Zou X, Li X, Liu J, Lian Z, Fan R, Du R, et al. Preparation and characterization of a specific monoclonal antibody against a new gene product: URG11. *Hybridoma (Larchmt)*. 2006;25(6):378-81.
81. Zhang Z, Tang H, Wang Z, Zhang B, Liu W, Lu H, et al. MiR-185 targets the DNA methyltransferases 1 and regulates global DNA methylation in human glioma. *Mol Cancer*. 2011;10:124.
82. Wang KH, Lin CJ, Liu CJ, Liu DW, Huang RL, Ding DC, et al. Global methylation silencing of clustered proto-cadherin genes in cervical cancer: serving as diagnostic markers comparable to HPV. *Cancer Med*. 2015;4(1):43-55.
83. Okuda H, Kiuchi H, Takao T, Miyagawa Y, Tsujimura A, Nonomura N, et al. A novel transcriptional factor Nkapl is a germ cell-specific suppressor of Notch signaling and is indispensable for spermatogenesis. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124293.
84. Chen D, Li Z, Yang Q, Zhang J, Zhai Z, Shu HB. Identification of a nuclear protein that promotes NF-kappaB activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;310(3):720-4.
85. Pajerowski AG, Nguyen C, Aghajanian H, Shapiro MJ, Shapiro VS. NKAP is a transcriptional repressor of notch signaling and is required for T cell development. *Immunity*. 2009;30(5):696-707.

86. Li L, Zhang J, Xiong N, Li S, Chen Y, Yang H, et al. Notch-1 signaling activates NF- $\kappa$ B in human breast carcinoma MDA-MB-231 cells via PP2A-dependent AKT pathway. *Med Oncol*. 2016;33(4):33.
87. Hammarsund M, Corcoran MM, Wilson W, Zhu C, Einhorn S, Sangfelt O, et al. Characterization of a novel B-CLL candidate gene--DLEU7--located in the 13q14 tumor suppressor locus. *FEBS Lett*. 2004;556(1-3):75-80.
88. Ouillette P, Erba H, Kujawski L, Kaminski M, Shedden K, Malek SN. Integrated genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14. *Cancer Res*. 2008;68(4):1012-21.
89. Palamarchuk A, Efanov A, Nazaryan N, Santanam U, Alder H, Rassenti L, et al. 13q14 deletions in CLL involve cooperating tumor suppressors. *Blood*. 2010;115(19):3916-22.
90. Garinis GA, Patrinos GP, Spanakis NE, Menounos PG. DNA hypermethylation: when tumour suppressor genes go silent. *Hum Genet*. 2002;111(2):115-27.
91. Malouf GG, Tahara T, Paradis V, Fabre M, Guettier C, Yamazaki J, et al. Methylome sequencing for fibrolamellar hepatocellular carcinoma depicts distinctive features. *Epigenetics*. 2015;10(9):872-81.
92. Litviakov NV, Cherdyntseva NV, Tsyganov MM, Slonimskaya EM, Ibragimova MK, Kazantseva PV, et al. Deletions of multidrug resistance gene loci in breast cancer leads to the down-regulation of its expression and predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy. *Oncotarget*. 2016;7(7):7829-41.
93. Perez-Janices N, Blanco-Luquin I, Torrea N, Liechtenstein T, Escors D, Cordoba A, et al. Differential involvement of RASSF2 hypermethylation in breast cancer subtypes and their prognosis. *Oncotarget*. 2015;6(27):23944-58.
94. Buchegger K, Ili C, Riquelme I, Letelier P, Corvalán AH, Brebi P, et al. Reprimo as a modulator of cell migration and invasion in the MDA-MB-231 breast cancer cell line. *Biol Res*. 2016;49:5.
95. Labbozzetta M, Poma P, Vivona N, Gulino A, D'Alessandro N, Notarbartolo M. Epigenetic changes and nuclear factor- $\kappa$ B activation, but not microRNA-224, downregulate Raf-1 kinase inhibitor protein in triple-negative breast cancer SUM 159 cells. *Oncol Lett*. 2015;10(6):3807-15.
96. Minatani N, Waraya M, Yamashita K, Kikuchi M, Ushiku H, Kojo K, et al. Prognostic Significance of Promoter DNA Hypermethylation of cysteine dioxygenase 1 (CDO1) Gene in Primary Breast Cancer. *PLoS One*. 2016;11(1):e0144862.
97. Yari K, Payandeh M, Rahimi Z. Association of the hypermethylation status of PTEN tumor suppressor gene with the risk of breast cancer among Kurdish population from Western Iran. *Tumour Biol*. 2016;37(6):8145-52.
98. Stefansson OA, Jonasson JG, Olafsdottir K, Hilmarsdottir H, Olafsdottir G, Esteller M, et al. CpG island hypermethylation of BRCA1 and loss of pRb as co-occurring events in basal/triple-negative breast cancer. *Epigenetics*. 2011;6(5):638-49.
99. Villani V, Casini B, Pace A, Prosperini L, Carapella CM, Vidiri A, et al. The Prognostic Value of Pyrosequencing-Detected MGMT Promoter Hypermethylation in Newly Diagnosed Patients with Glioblastoma. *Dis Markers*. 2015;2015:604719.
100. Perez-Janices N, Blanco-Luquin I, Teresa Tunon M, Barba-Ramos E, Ibanez B, Zazpe-Cenoz I, et al. EPB41L3, TSP-1 and RASSF2 as new clinically relevant prognostic biomarkers in diffuse gliomas. *Oncotarget*. 2015;6(1):368-80.
101. Guerrero-Setas D, Pérez-Janices N, Blanco-Fernandez L, Ojer A, Cambra K, Berdasco M, et al. RASSF2 hypermethylation is present and related to shorter survival in squamous cervical cancer. *Mod Pathol*. 2013;26(8):1111-22.

1 **Epigenetic aberrations are present in non-neoplastic adjacent to triple negative**  
2 **breast tumour tissue**

3 Ane Ulazia-Garmendia<sup>1</sup>, Esperanza Martín-Sánchez<sup>1</sup>, Saioa Mendaza<sup>1</sup>, Alicia Córdoba<sup>2</sup>, Iñaki  
4 Monreal-Santesteban<sup>1</sup>, Francisco Vicente-García<sup>3</sup>, Valle Coca<sup>4</sup>, Susana De La Cruz<sup>5</sup>, David  
5 Guerrero-Setas<sup>1</sup>

6 <sup>1</sup> Cancer Epigenetics Group, Navarrabiomed – Biomedical Research Centre, Pamplona, Spain

7 <sup>2</sup> Department of Pathology, Complejo Hospitalario de Navarra, Navarra Health Service,  
8 Pamplona, Spain

9 <sup>3</sup> Department of Surgery, Complejo Hospitalario de Navarra, Navarra Health Service,  
10 Pamplona, Spain

11 <sup>4</sup> Biobank in Navarrabiomed - Biomedical Research Centre, Pamplona, Spain

12 <sup>5</sup> Department of Medical Oncology, Complejo Hospitalario de Navarra, Navarra Health Service,  
13 Pamplona, Spain

14

15 **Running title:** Epigenetics in triple negative breast cancer

16 **Keywords:** Triple-negative, Breast cancer, DNA methylation, Epigenetics, Biomarker

17

18 **Corresponding author:**

19 Dr David Guerrero-Setas

20 Cancer Epigenetics Group, Navarrabiomed - Biomedical Research Centre

21 Irunlarrea Road, 3, Pamplona 31008 Spain

22 Phone: +34 848 422186 Fax: +34 848 422200 E-mail: [dguerres@navarra.es](mailto:dguerres@navarra.es)

23

24 **Number of text pages:** 13 pages

25 **Abstract word count:** 225 words

26 **Text word count:** 3,734 words

27 **Number of figures and tables:** 7 figures, 3 tables and 1 supplementary figure

28 **Number of references:** 59 references

**1 Abstract**

2 Breast cancer (BC) is the most common neoplasia among women and one of the leading  
3 causes of cancer-related death worldwide. It is a clinically heterogeneous disease, with the  
4 triple negative (TN) as the most aggressive subtype. In this report the presence and clinical  
5 value of aberrant methylation has been analysed in ductal TN BC patients. A 450k-methylation  
6 array was performed to identify genes differentially methylated between 8 TN BC samples and  
7 5 non-neoplastic tissues from mammoplasties. Among them, hypermethylation of *DLEU7* and  
8 *NKAPL* was validated by pyrosequencing in 42 ductal TN tumours and their paired non-  
9 neoplastic tissues, along with 4 TN-derived and one normal-like cell lines. We found that  
10 *DLEU7* and *NKAPL* methylation levels were higher in tumour compared to non-neoplastic  
11 tissue. The adjacent-to-tumour tissue harboured also these epigenetic alterations, although in  
12 a lower proportion. *DLEU7* and *NKAPL* hypermethylation was associated with a marked  
13 reduced mRNA and protein expression in TN BC cell lines, and in 10 pairs of TN BC and  
14 adjacent-to-tumour tissues. There was a tendency, although not significant, towards a worse  
15 prognosis in patients with these epigenetic aberrations. This is the first report showing *DLEU7*  
16 and *NKAPL* hypermethylation, not only in TN BC, but also in the adjacent-to-tumour tissue,  
17 suggesting that this non-neoplastic sample harbours some epigenetic alterations  
18 characteristics of the tumour, and hence, these could be involved in breast cell transformation.  
19

## 1 **Introduction**

2 Breast cancer (BC) is the most common neoplasia among women and one of the leading  
3 causes of cancer death worldwide (1, 2). Globally, it is estimated that over one million women  
4 are diagnosed with BC each year, and 400,000 patients die from the disease (3). In recent years  
5 an increase in its incidence has been described despite its decreasing trend in mortality, due to  
6 advances in early detection programs and the incorporation of new targeted therapies  
7 depending on the molecular characteristics of the tumour (4).

8 Traditionally breast tumours have been classified according to their histological features, but  
9 this classification does not explain the differences in the prognosis of patients, variable even in  
10 patients with morphologically similar tumours. Thus, a molecular classification arose based on  
11 differential expression of crucial immunohistochemical markers in the onset and progression  
12 of BC (5), and recommended by the panel of experts at the last International Breast Cancer  
13 Conference in St. Gallen: nuclear expression of oestrogen receptor (ER), progesterone receptor  
14 (PR) cell proliferation marker (Ki-67) and the membrane expression of human epidermal  
15 growth factor receptor type 2 (HER2) (6) were able to classify BC into Luminal A, Luminal B,  
16 Luminal HER2, HER2 and triple negative subtypes.

17 Epigenetic alterations are common in cancer, including DNA hyper- and hypomethylation,  
18 aberrant expression profile of microRNAs and posttranslational modifications of histones. Over  
19 the past decade, aberrant DNA methylation has been recognized as one of the most common  
20 molecular abnormalities in BC (7-9). BC progression can be explained by the accumulation of  
21 genetic and epigenetic alterations in tumour suppressor genes and/or oncogenes, combined  
22 with hormonal and environmental factors (10). Since BC mortality remains high (11), it is  
23 essential to study new biomarkers with diagnostic, prognostic and/or predictive value that can  
24 better characterize tumours and contribute to a more personalized monitoring and treatment  
25 of the patients.

26

1 In this paper, our group aimed to deep in the epigenome of TN BC to find new epigenetic  
2 biomarkers. Aberrant methylation of two new candidates (*DLEU7* and *NKAPL*) identified  
3 through a 450K methylation array has been validated by pyrosequencing in tumour and non-  
4 neoplastic adjacent-to-tumour tissue. The effects of these alterations on gene expression have  
5 been examined in cases and cell lines. The clinical value of *DLEU7* and *NKAPL* hypermethylation  
6 in TN BC has also been explored.

7

8

## 9 **Results**

### 10 *Methylome of TN BC*

11 The methylome of a small series of 8 TN BC was compared to that of 5 non-neoplastic breast  
12 tissues with a methylation array. We found approximately 40 differentially probes (FDR <  
13 0.05), with a  $\Delta\beta$ -value > 0.2, and located within CpG islands in 5'UTR, 1500-200 bp upstream  
14 the transcription start site or within the first exon. Specifically we found 27 and 16 probes that  
15 were hypermethylated and hypomethylated, respectively, in TN BC compared to non-  
16 neoplastic tissue (Table 1). These probes recognized 17 and 10 hypermethylated and  
17 hypomethylated genes, respectively (Figure 1).

18 These results suggest that TN BC has a different pattern of methylation in comparison with the  
19 non-neoplastic breast tissue.

20

### 21 *Methylation levels of DLEU7 and NKAPL are higher in tumour than in adjacent-to-tumour and* 22 *non-neoplastic breast tissues*

23 To validate the results derived from the methylation array, *DLEU7* and *NKAPL* genes were  
24 selected because their increased number of significant probes with high  $\Delta\beta$ -values (Table 1 and  
25 Figure 1). Their methylation status was explored firstly in cell lines by pyrosequencing through  
26 examination of 3 and 2 CpG sites, respectively (Supplementary Figure S1). Both genes were



1 found to have significantly higher methylation levels in TN BC cell lines than in the normal-like  
2 184B5 cell line ( $p < 0.01$ ) (Figure 2). Then, *DLEU7* and *NKAPL* methylation was examined in a  
3 second series of 42 TN BC samples and their matched non-neoplastic adjacent-to-tumour  
4 tissue, and compared to non-neoplastic breast tissues from mammoplasties. We found that TN  
5 tumours had significantly higher methylation levels of all studied CpG sites in *DLEU7* and  
6 *NKAPL* genes than the non-neoplastic tissue ( $p < 0.05$ ) (Figure 3). These results validated our  
7 data from the array. Interestingly, we observed that the adjacent-to-tumour tissue, which  
8 apparently had non-neoplastic cell morphology, harboured some degree of methylation:  
9 significantly lower than the tumour, but tended to be higher than the non-neoplastic tissue  
10 from mammoplasties. Even regarding the CpG1 in the *DLEU7* gene, the differences between  
11 these two types of non-neoplastic tissues was statistically significant ( $p < 0.05$ ) (Figure 3).  
12 Additionally, we confirmed that *DLEU7* and *NKAPL* methylation levels were significantly higher  
13 in tumour samples than in their matched adjacent-to-tumour samples ( $p < 0.05$ ) (Figure 4).  
14 These results suggest that the epigenetic alterations common in TN BC can be already present  
15 in the non-neoplastic adjacent-to-tumour tissue, indicating that they could be involved in the  
16 cell transformation process.

17

#### 18 *DLEU7 and NKAPL expression is reduced in TN BC*

19 In order to examine whether *NKAPL* methylation had an impact on gene expression, a  
20 quantitative PCR was performed in TN BC cell lines and the normal-like 184B5. As expected, we  
21 found that TN BC cell lines had significantly lower mRNA levels than the 184B5 cells ( $p < 0.05$ )  
22 (Figure 5A). Interestingly, we observed that there was an inverse correlation (Pearson's  
23 coefficient = - 0.82) between *NKAPL* expression and methylation in either of the 2 CpG sites  
24 studied (Figure 5B).

25 To explore whether increased methylation of *DLEU7* and *NKAPL* affected protein expression,  
26 immunohistochemistry and Western blot were performed respectively, based on the

1 recommended applications of the commercially available antibodies. We observed that DLEU7  
2 protein levels, with a cytoplasmic pattern of expression (Figure 6A) were slightly, although not  
3 significant, lower in TN BC compared to adjacent-to-tumour tissues (Figure 6B). Similarly,  
4 NKAPL protein levels were lower in TN BC cell lines (undetectable levels by Western blot)  
5 compared to the normal-like cell lines (Figure 6C), in accordance with mRNA expression (Figure  
6 5A).

7 These results indicate that *DLEU7* and *NKAPL* methylation diminishes mRNA and protein  
8 expression in both cell lines and tissues.

9

#### 10 *Potential clinical value of DLEU7 and NKAPL hypermethylation in TN BC*

11 Finally, we explored the clinical value of *DLEU7* and *NKAPL* methylation in our series of 42 TN  
12 BC patients (Table 2). Since pyrosequencing provides a quantitative measure of methylation, a  
13 cut-off value distinguishing between unmethylated and methylated status was established for  
14 each gene using the maximum percentage of methylation observed in its first CpG (the one  
15 contained in the array) in our non-neoplastic breast tissues: 22% for *DLEU7* and 14% for *NKAPL*  
16 (Figure 3). Based on this, patients were stratified according to their unmethylated or  
17 methylated status. We found that methylation status had no significant impact either on  
18 progression-free survival or on overall survival in our series of 42 TN BC, although there is a  
19 clear tendency showing that *DLEU7* or *NKAPL* methylation could be associated with worse  
20 outcome (Figure 7).

21

22

#### 23 **Discussion**

24 BC is a heterogeneous disease with variable pathological (12, 13) and immunohistochemical  
25 features, which do not entirely explain the differences in clinical response in patients  
26 diagnosed with the same BC subtype (14). Thus, the identification of new molecular alterations

1 is necessary to discover biomarkers able to predict the clinical outcome of these patients,  
2 especially those with TN subtype, which is the most aggressive one and lacks efficient targeted  
3 therapy (15).

4

5 In this study, we have identified two genes (*DLEU7* and *NKAPL*) differentially methylated in TN  
6 BC compared to non-neoplastic breast tissue by using a 450K methylation array. These high-  
7 throughput techniques have revealed new methylation profiles associated with tumour types  
8 (16), prognosis and response to treatment (17). Specifically in BC, methylation profiles have  
9 been shown to predict the risk of BC (18, 19), to help ductal *in situ* carcinoma progress to  
10 ductal infiltrating carcinoma (20), and to be characteristic of a given subtype, such as HER2+  
11 (21). Recently, it has been reported that epigenome varies not only among subtypes, but also  
12 between pre-neoplastic and tumoral stages (22). The model of cellular transformation from a  
13 non-neoplastic tissue to a tumoral lesion is based on the accumulation of genetic and  
14 epigenetic alterations described in BC (23, 24), and other tumour types, such as gastric (25)  
15 and colorectal cancer (26). Here, we have identified and validated by pyrosequencing potential  
16 markers differentially hypermethylated in TN BC compared to non-neoplastic breast tissue. In  
17 BC, methylation of certain genes has been linked to some clinical and pathological features,  
18 and is considered a biomarker for diagnosis (27), the status of hormone receptor (28) and  
19 HER2 (29), the response to tamoxifen (28) and chemotherapy (30), the onset of metastasis  
20 during follow-up (7) and is also considered a predictor of survival (28, 31).

21

22 Among the differentially hypermethylated genes we found in TN BC for the first time, *DLEU7*  
23 (Deleted In Lymphocytic Leukemia, 7) has been previously described as a putative tumour  
24 suppressor gene in hepatocellular carcinoma (32) and chronic lymphocytic leukaemia (33).  
25 *DLEU7* is located in the 13q14 chromosomal region, which is essential for progression of this  
26 haematological neoplasia (33), since is deleted (34) and harbours the tumour suppressor miR-

1 15/16 (35). Moreover, the *DLEU7* gene promoter has been reported to be hypermethylated in  
2 61% of chronic lymphocytic leukaemia cases (33). This data adds to the hypothesis that cancer  
3 cells get rid of tumour suppressor genes by deleting one allele and methylating the other one  
4 (36). In BC, 13q14 deletions have been associated with resistance to treatment (37), which  
5 would support that *DLEU7* plays an important role as a tumour-suppressor gene in BC and its  
6 hypermethylation is involved in TN BC progression. Other hypermethylated gene we identified  
7 and validated in TN BC is *NKAPL* (NFKB Activating Protein-Like). Very little is known about it,  
8 although it seems to share similarities with *NKAP* (38), a potential activator of NF- $\kappa$ B (39).  
9 *NKAPL* has been demonstrated to repress the transcription of Notch signalling mediators (40).  
10 In poor prognosis BC patients, an increased expression of Notch-1 has been reported (41),  
11 which could explain the hypermethylation of *NKAPL* we observed here for the first time, and  
12 could contribute to the Notch-mediated tumour progression.

13

14 Importantly, we have shown for the first time that TN BC cases harbour higher methylation  
15 levels of *DLEU7* and *NKAPL* than non-neoplastic breast samples, suggesting that these genes  
16 might act as tumour-suppressor genes in TN BC. Furthermore, *DLEU7* hypermethylation could  
17 play an important role in breast cell transformation, since there is a gradient of methylation  
18 between non-neoplastic, adjacent-to-tumour and tumoral tissue. Moreover, we demonstrated  
19 for the first time that this DNA methylation pattern seemed to inversely correlate to protein  
20 expression in both cell lines and cases, being this one the first report showing the  
21 immunohistochemical pattern of *DLEU7*.

22

23 As above mentioned, our group and others have described epigenetic abnormalities specific in  
24 BC subtypes (42), such as preferential hypermethylation of *RASSF1A* (43) and *RASSF2* (44) in  
25 luminal subtype, *BRCA1* in TN (45) and E-cadherin in HER2+ (46). Interestingly, some of these  
26 alterations have an important clinical value: i) in response to treatment, as *MGMT*

1 hypermethylation which was associated with a better response to temozolomide in  
2 glioblastoma multiforme (47); and/or ii) as prognostic markers, such as *EPB41L3* and *TSP-1* in  
3 diffuse gliomas (48), and *RASSF2* in cervical carcinoma (49) and BC (50). That is why in our  
4 study, the clinical value of *DLEU7* and *NKAPL* hypermethylation has been examined in TN BC. It  
5 is important to note that these alterations have been analysed by pyrosequencing, a technique  
6 that yields quantitative measurements of methylation in contrast to methylation-specific PCR  
7 (50-54). Therefore, a cut-off was established to stratify our TN BC patient series between  
8 unmethylated and methylated cases. A clear trend was observed, although not significant,  
9 showing that *DLEU7* and *NKAPL* hypermethylation could have a prognostic value by predicting  
10 poorer progression-free survival and outcome. To further confirm this hypothesis, a larger  
11 series of TN BC would be needed.

12

13 In conclusion, methylation arrays are useful tools to identify differentially methylated genes in  
14 TN BC in comparison with non-neoplastic breast tissue. Thus, *DLEU7* and *NKAPL*  
15 hypermethylation has been observed in TN BC. Moreover, these epigenetic alterations have  
16 been found in non-neoplastic adjacent-to-tumour tissue, although at a lesser extent,  
17 suggesting that they could be involved in breast cell transformation.

18

19

## 20 **Materials and Methods**

### 21 *Tissue samples*

22 An initial small series of 8 frozen TN breast tumours and 5 frozen non-neoplastic breast tissues  
23 from reduction mammoplasties was used to analyse the epigenome of TN BC. Then, a second  
24 series of formalin fixed and paraffin embedded samples was employed to validate the results  
25 derived from the methylation array, consisting of 42 TN breast tumours and their non-  
26 neoplastic adjacent-to-tumour tissue. All patients were diagnosed with infiltrating duct triple

1 negative breast carcinoma in the Department of Pathology (Complejo Hospitalario de Navarra,  
2 Pamplona, Spain) in accordance with the recommended criteria of the St Gallen International  
3 Expert Consensus 2013 (6), considering a Ki-67 threshold of 14% (55), grading according of  
4 Nottingham system (56) and staging with AJCC system (57). All samples were ensured to  
5 harbour at least 70% tumour cells. None of the patients had received radiotherapy or  
6 chemotherapy before surgery. Their pathological and clinical characteristics are summarised in  
7 Table 2. The study was approved by the Regional Clinical Research Ethics Committee and  
8 samples were obtained in accordance with the current Spanish legislation regarding written  
9 informed consent.

10

#### 11 *Cell lines*

12 A panel of four human TN BC cell lines was used in this study: BT-549, Hs 578T, MDA-MB-468  
13 and HCC 1937. Moreover, the immortalized but non-tumorigenic human mammary cell line  
14 184B5 was employed. Additionally, the human embryonic kidney 293T cells were used as  
15 positive control of *NKAPL* expression. MDA-MB-468 and HCC 1937 cell lines were obtained  
16 from the Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures  
17 (Braunschweig, Germany). BT-549 and 293T cells were purchased from the American Type Cell  
18 Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). The Hs 578T cell line was kindly provided by Dr Javier  
19 Benítez, from the Human Genetics Group in the Spanish National Cancer Research Centre  
20 (Madrid, Spain). All these tumour cell lines were grown in RPMI-1640 or DMEM, supplemented  
21 with 10% foetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin (all from Lonza Biologics,  
22 Porriño, Spain), at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. 184B5 cells were cultured in  
23 MEM (mammary epithelial basal medium) supplemented with 5% horse serum, 10 µg/ml  
24 insulin, 0.5 µg/ml hydrocortisone, 20 ng/ml epithelial growth factor, 10% foetal bovine serum  
25 and 1% penicillin/streptomycin (all from Lonza Biologics, Porriño, Spain), and 100 ng/ml  
26 cholera toxin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

1 All cell lines were authenticated by STR analysis in February 2016.

2

### 3 *DNA extraction and bisulphite conversion*

4 To analyse the methylome of TN BC, DNA was extracted from cell lines and samples in our two  
5 tissue series using the QIAamp DNA FFPE Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the  
6 manufacturer's instructions. Bisulphite conversion of DNA was performed to transform non-  
7 methyl cytosines into thymidines, while methyl cytosines remained intact. Five hundred ng of  
8 DNA were treated with freshly prepared bisulphite using an EZ DNA Methylation-Gold kit  
9 (Zymo Research, Irvine, CA, USA).

10

### 11 *Methylation array and bioinformatics analysis*

12 Bisulphite-converted DNA samples in the initial series of 8 frozen TN BC and 5 non-neoplastic  
13 mammary tissues were subjected to the Illumina Infinium Methylation 450K array (Illumina,  
14 San Diego, CA, USA) following the manufacturer's recommendations. This array contained over  
15 480,000 probes covering 99% of the genes and 96% of CpG islands (58, 59). The methylation  
16 level of each of the 450,000 CpG sites interrogated in the array was estimated as normalized  
17  $\beta$ -values using the GenomeStudio program (Illumina, San Diego, CA, USA). Then, a limma t-test  
18 (<http://pomelo2.iib.uam.es>) was performed to find differentially methylated probes between  
19 tumour and non-neoplastic samples (false discovery rate, FDR < 0.05). Among these probes we  
20 selected those with a  $\Delta\beta$ -value ( $|\beta$ -value in tumour –  $\beta$ -value in non-neoplastic tissue| > 0.2,  
21 within a CpG island in 5'UTR, 1500-200 bp upstream the transcription start site and within the  
22 first exon.

23

### 24 *Pyrosequencing*

25 To validate the methylation status of two selected genes fulfilling the abovementioned  
26 requirements (*DLEU7* and *NKAPL*), pyrosequencing was carried out in bisulphite-converted

1 DNA from cell lines and formalin fixed and paraffin embedded tissues from our second series  
2 of 42 matched tumour and adjacent-to-tumour samples, and 5 non-neoplastic mammary  
3 tissues. First, PCR amplification was performed using Immolase DNA polymerase (BioLine,  
4 London, UK) in a final volume of 30  $\mu$ l containing 2  $\mu$ l of bisulphite modified DNA and the  
5 primers indicated in Table 3, which amplified the same region recognized by the selected  
6 probe contained in the array (Supplementary Figure S1). Amplification conditions were: initial  
7 DNA polymerase activation at 95°C for 10 min, followed by 50 cycles at 95°C for 30 s, 59°C for  
8 30 s and 72°C for 30 s, and a final extension at 72°C for 7 min. PCRs were performed in  
9 triplicated reactions. The amplicon was resolved by electrophoresis using 2% (w/v) agarose gel  
10 in 1x Tris-borate-EDTA buffer, stained using SYBR Red Safe (Life Technologies, Carlsbad, CA,  
11 USA) and visualized in a standard transilluminator (ChemiDoc XRS, Bio-Rad Laboratories,  
12 Hercules, CA, USA). DNA methylation analysis was quantified as follows: 20  $\mu$ l of PCR products  
13 were immobilized with Streptavidin Sepharose HP Beads (GE Healthcare Bio-Sciences,  
14 Pittsburgh, PA, USA) using a Vacuum Prep Workstation. This was followed by annealing (80°C  
15 for 2 min) the sequencing primers (Table 3) and pyrosequencing in a PyroMark Q96 using  
16 PyroMark Gold Q96 reagents and the PyroMark software (all from Qiagen, Hilden, Germany).  
17 Only methylation values assessed as being of high quality were considered.

18

#### 19 *RNA extraction and quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR)*

20 qRT-PCR was performed to measure the levels of *DLEU7* and *NKAPL* expression in TN BC  
21 derived- and non-neoplastic mammary cell lines. First, total RNA was extracted and purified  
22 using an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions.  
23 Five hundred ng of total RNA were retrotranscribed using a PrimeScript™ RT Reagent Kit  
24 (TaKaRa, Otsu, Japan) under conditions of 37°C for 15 min and 85°C for 5 s. One  $\mu$ l of the  
25 resulting cDNA was placed in a 96-well plate with 0.5  $\mu$ l TaqMan probes (*NKAPL*:  
26 Hs.PT.58.4109007.g; *DLEU7*: Hs.PT.58.2788048; *GAPDH*: Hs.PT.58.40035104), all from IDT



1 (Coralville, Iowa) and 19 µl of mix included in the Premix Ex Taq™ kit (TaKaRa, Otsu, Japan).  
2 PCR amplification was performed in triplicate using the Quant Studio 12K Flex (Life  
3 Technologies, Carlsbad, CA, USA) under thermal cycler conditions of 95°C for 30 s and 40 cycles  
4 at 95°C for 5 sec and 60°C for 34 s. The cycle threshold (Ct) values were calculated using Quant  
5 Studio software (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), and the relative quantification (RQ) was  
6 calculated by the  $\Delta Ct$  method ( $RQ = 2^{-\Delta Ct}$ ), using *GAPDH* as the endogenous control gene.

7

### 8 *Immunohistochemistry*

9 To measure DLEU7 protein levels in breast tissues immunohistochemistry was performed.  
10 Three µm sections of 12 TN BC tumours and their non-neoplastic adjacent-to-tumour  
11 counterparts were placed on slides and then deparaffinized, hydrated and treated to block  
12 endogenous peroxidase activity. After incubating with the primary rabbit polyclonal anti-  
13 DLEU7 antibody (ab185446, Abcam, Cambridge, UK) at 1:300 dilution for 30 min (antigen  
14 retrieval at 100°C for 30 min, pH = 6.0), the antibody was developed using a Bond Polymer  
15 Refine Detection kit (Leica, Wetzlar, Germany) and visualized with diaminobenzidine. The  
16 pattern of expression was evaluated blind by two independent observers. The intensity of  
17 expression was ascribed to one of four categories: 0, no expression; 1, weakly expressed; 2,  
18 intermediate expression; 3, strongly expressed. Images were acquired with a Leica DMD 108  
19 digital microscope (Leica, Wetzlar, Germany).

20

### 21 *Western blot*

22 To measure NKAPL protein expression levels in breast derived cell lines Western blot was  
23 carried out. Protein was extracted from 4 TN BC cell lines (BT-549, HCC 1937, Hs 578T and  
24 MDA-MB-468) and 2 immortalized but non-neoplastic mammary cell lines (184B5 and MCF  
25 10A) with RIPA buffer (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and protease inhibitor Complete 1X  
26 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). After a 5 minutes incubation and centrifugation,

1 proteins contained in the supernatants were quantified using the DC protein assay (Bio-Rad  
2 Laboratories, Hercules, CA, USA) in an Epoch multi-plate reader (BioTek, Winooski, VT, USA).  
3 Sixty µg of proteins were separated by SDS-PAGE in a 10 % polyacrylamide gel and transferred  
4 into a nitrocellulose membrane (Millipore, Billerica, MA, USA). The membrane was blocked  
5 with 5% non-fat milk and incubated with the primary rabbit polyclonal anti-NKAPL antibody  
6 (ab107281, Abcam, Cambridge, UK) at a 1:100 dilution, overnight and at 4°C. Then it was  
7 incubated with a secondary anti-rabbit antibody (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) at a  
8 dilution 1:3000 for 1 h and at room temperature. Its signal was detected using the Amersham  
9 ECL prime western blotting detection reagent kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) in a  
10 ChemiDoc transilluminator with the Image Lab software (both from Bio-Rad Laboratories,  
11 Hercules, CA, USA). Finally, membranes were incubated with the anti  $\alpha$ -tubulin antibody  
12 (T6074, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) at a 1:10000 dilution for 20 minutes, and with the  
13 secondary anti-mouse antibody (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) at 1:2000 for 20 minutes,  
14 as a loading control.

15

### 16 *Statistical analysis*

17 Demographic, clinical and pathological data were summarised as frequencies (and  
18 percentages) or means-medians (and ranges), as appropriate. Medians of methylation of  
19 *DLEU7* and *NKAPL* in tumour, adjacent-to-tumour and non-neoplastic tissues were compared  
20 using the Kruskal-Wallis test. Methylation of *DLEU7* and *NKAPL* genes was compared in tumour  
21 and its matched adjacent-to-tumour tissue by a paired t-test. Additionally, correlation  
22 between *NKAPL* methylation and mRNA expression was determined by Pearson's correlation  
23 coefficient. Finally, Kaplan-Meier plots and log-rank tests were used to examine the  
24 association of *DLEU7* or *NKAPL* methylation status with progression-free and overall survival.

25

26

**1 Authors' contributions**

2 AUG performed the experiments, analysed the data and wrote the manuscript; EMS  
3 performed the experiments and the bioinformatics analysis, analysed the data and revised the  
4 manuscript; SM, IMS and VC performed the experiments; AC and DGS evaluated the  
5 immunohistochemistry; FVG and SDLC provided clinical data; DGS conceived and designed the  
6 research and revised the manuscript.

7

8

**9 Acknowledgments**

10 The authors wish to thank Ana Aramendía (Biobank in Navarrabiomed Biomedical Research  
11 Centre, Pamplona, Spain) for their excellent technical assistance with immunohistochemical  
12 stainings. We thank Dr Berta Ibáñez (Methodology Unit, Navarrabiomed Biomedical Research  
13 Centre, Pamplona, Spain) for her exceptional help with statistical analysis. We are also  
14 indebted to Dr Agustín Fernández and Dr Gustavo Fernández Bayón (Cancer Epigenetics  
15 Group, University Institute of Oncology in Asturias, IUOPA, Oviedo, Spain) for their assistance  
16 and training in pyrosequencing and bioinformatic techniques. We also thank the Breast Cancer  
17 Patients' Association in Navarra (SARAY) for their support.

18

19

**20 Disclosure of potential conflicts of interest**

21 The authors disclose no potential conflicts of interest.

22

23

**24 Grant support**

25 This work has been funded by the Basque Foundation of Healthcare Research and Innovation,  
26 La Caixa Foundation, the Spanish Ministry of Health and the Breast Cancer Patients'  
27 Association of Navarra (SARAY).

1 **References**

- 2 1. Stefansson OA, Moran S, Gomez A, *et al.* A DNA methylation-based definition of  
3 biologically distinct breast cancer subtypes. *Mol Oncol* 2015;9:555-68.
- 4
- 5 2. Smith RA, Andrews K, Brooks D, *et al.* Cancer screening in the United States, 2016: A  
6 review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer  
7 screening. *CA Cancer J Clin* 2016.
- 8
- 9 3. Tabarestani S, Ghaderian SM, Rezvani H, *et al.* Prognostic and predictive value of copy  
10 number alterations in invasive breast cancer as determined by multiplex ligation-  
11 dependent probe amplification. *Cell Oncol (Dordr)* 2014;37:107-18.
- 12
- 13 4. Ardanaz E, Moreno-Iribas C, Pérez de Rada ME, *et al.* [Incidence and mortality due to  
14 cancer in Navarre, 1998-2002. Trends in the last 30 years]. *An Sist Sanit Navar*  
15 2007;30:245-70.
- 16
- 17 5. Sørliie T, Wang Y, Xiao C, *et al.* Distinct molecular mechanisms underlying clinically  
18 relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different  
19 platforms. *BMC Genomics* 2006;7:127.
- 20
- 21 6. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, *et al.* Personalizing the treatment of women with  
22 early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the  
23 Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol* 2013;24:2206-23.
- 24
- 25 7. Feng W, Shen L, Wen S, *et al.* Correlation between CpG methylation profiles and  
26 hormone receptor status in breast cancers. *Breast Cancer Res* 2007;9:R57.
- 27
- 28 8. Karsli-Ceppioglu S, Dagdemir A, Judes G, *et al.* Epigenetic mechanisms of breast  
29 cancer: an update of the current knowledge. *Epigenomics* 2014;6:651-64.
- 30
- 31 9. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps.  
32 *Nature Reviews Genetics* 2007;8:286-98.
- 33
- 34 10. Böcker W. [WHO classification of breast tumors and tumors of the female genital  
35 organs: pathology and genetics]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2002;86:116-9.
- 36
- 37 11. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites  
38 in the adult population in 2008. *Int J Cancer* 2013;132:1133-45.
- 39
- 40 12. Wells M *ea.* World Health Organization classification of tumours. Pathology and  
41 genetics of tumours of the breast and female genital organs. IARC: Lyon, 2003.

42

- 1 13. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, *et al.* Personalizing the treatment of women with  
2 early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the  
3 Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Annals of Oncology* 2013;24:2206-23.
- 4
- 5 14. Guiu S, Michiels S, André F, *et al.* Molecular subclasses of breast cancer: how do we  
6 define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. *Ann Oncol* 2012;23:2997-  
7 3006.
- 8
- 9 15. Anders CK, Carey LA. Biology, Metastatic Patterns, and Treatment of Patients with  
10 Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer* 2009;9:S73-S81.
- 11
- 12 16. Gabriel AS, Lafta FM, Schwalbe EC, *et al.* Epigenetic landscape correlates with genetic  
13 subtype but does not predict outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia.  
14 *Epigenetics* 2015;10:717-26.
- 15
- 16 17. Li M, Balch C, Montgomery JS, *et al.* Integrated analysis of DNA methylation and gene  
17 expression reveals specific signaling pathways associated with platinum resistance in  
18 ovarian cancer. *Bmc Medical Genomics* 2009;2.
- 19
- 20 18. van Veldhoven K, Polidoro S, Baglietto L, *et al.* Epigenome-wide association study  
21 reveals decreased average methylation levels years before breast cancer diagnosis.  
22 *Clin Epigenetics* 2015;7:67.
- 23
- 24 19. Severi G, Southey MC, English DR, *et al.* Epigenome-wide methylation in DNA from  
25 peripheral blood as a marker of risk for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*  
26 2014;148:665-73.
- 27
- 28 20. Johnson KC, Koestler DC, Fleischer T, *et al.* DNA methylation in ductal carcinoma in situ  
29 related with future development of invasive breast cancer. *Clin Epigenetics* 2015;7:75.
- 30
- 31 21. Lindqvist BM, Wingren S, Motlagh PB, Nilsson TK. Whole genome DNA methylation  
32 signature of HER2-positive breast cancer. *Epigenetics* 2014;9:1149-62.
- 33
- 34 22. Holm K, Staaf J, Lauss M, *et al.* An integrated genomics analysis of epigenetic subtypes  
35 in human breast tumors links DNA methylation patterns to chromatin states in normal  
36 mammary cells. *Breast Cancer Res* 2016;18:27.
- 37
- 38 23. Locke WJ, Clark SJ. Epigenome remodelling in breast cancer: insights from an early in  
39 vitro model of carcinogenesis. *Breast Cancer Res* 2012;14:215.
- 40
- 41 24. Bombonati A, Sgroi DC. The molecular pathology of breast cancer progression. *J Pathol*  
42 2011;223:307-17.
- 43

- 1 25. Pontes TB, Chen ES, Gigek CO, *et al.* Reduced mRNA expression levels of MBD2 and  
2 MBD3 in gastric carcinogenesis. *Tumour Biol* 2014;35:3447-53.
- 3
- 4 26. Azuara D, Rodriguez-Moranta F, de Oca J, *et al.* Novel methylation panel for the early  
5 detection of neoplasia in high-risk ulcerative colitis and Crohn's colitis patients.  
6 *Inflamm Bowel Dis* 2013;19:165-73.
- 7
- 8 27. Fang C, Wei XM, Zeng XT, *et al.* Aberrant GSTP1 promoter methylation is associated  
9 with increased risk and advanced stage of breast cancer: a meta-analysis of 19 case-  
10 control studies. *BMC Cancer* 2015;15:920.
- 11
- 12 28. Widschwendter M, Siegmund KD, Müller HM, *et al.* Association of breast cancer DNA  
13 methylation profiles with hormone receptor status and response to tamoxifen. *Cancer*  
14 *Res* 2004;64:3807-13.
- 15
- 16 29. Fiegl H, Millinger S, Goebel G, *et al.* Breast cancer DNA methylation profiles in cancer  
17 cells and tumor stroma: association with HER-2/neu status in primary breast cancer.  
18 *Cancer Res* 2006;66:29-33.
- 19
- 20 30. Wang L, Zeng H, Wang Q, *et al.* MED12 methylation by CARM1 sensitizes human breast  
21 cancer cells to chemotherapy drugs. *Sci Adv* 2015;1:e1500463.
- 22
- 23 31. Shen Y, Wang Z, Loo LW, *et al.* LINC00472 expression is regulated by promoter  
24 methylation and associated with disease-free survival in patients with grade 2 breast  
25 cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2015.
- 26
- 27 32. Malouf GG, Tahara T, Paradis V, *et al.* Methylome sequencing for fibrolamellar  
28 hepatocellular carcinoma depicts distinctive features. *Epigenetics* 2015;10:872-81.
- 29
- 30 33. Hammarsund M, Corcoran MM, Wilson W, *et al.* Characterization of a novel B-CLL  
31 candidate gene--DLEU7--located in the 13q14 tumor suppressor locus. *FEBS Lett*  
32 2004;556:75-80.
- 33
- 34 34. Ouillette P, Erba H, Kujawski L, *et al.* Integrated genomic profiling of chronic  
35 lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14. *Cancer Res* 2008;68:1012-  
36 21.
- 37
- 38 35. Palamarchuk A, Efanov A, Nazaryan N, *et al.* 13q14 deletions in CLL involve cooperating  
39 tumor suppressors. *Blood* 2010;115:3916-22.
- 40
- 41 36. Garinis GA, Patrinos GP, Spanakis NE, Menounos PG. DNA hypermethylation: when  
42 tumour suppressor genes go silent. *Hum Genet* 2002;111:115-27.
- 43

- 1 37. Litviakov NV, Cherdyntseva NV, Tsyganov MM, *et al.* Deletions of multidrug resistance  
2 gene loci in breast cancer leads to the down-regulation of its expression and predict  
3 tumor response to neoadjuvant chemotherapy. *Oncotarget* 2016;7:7829-41.
- 4
- 5 38. Okuda H, Kiuchi H, Takao T, *et al.* A novel transcriptional factor Nkapl is a germ cell-  
6 specific suppressor of Notch signaling and is indispensable for spermatogenesis. *PLoS*  
7 *One* 2015;10:e0124293.
- 8
- 9 39. Chen D, Li Z, Yang Q, *et al.* Identification of a nuclear protein that promotes NF-kappaB  
10 activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310:720-4.
- 11
- 12 40. Pajerowski AG, Nguyen C, Aghajanian H, Shapiro MJ, Shapiro VS. NKAP is a  
13 transcriptional repressor of notch signaling and is required for T cell development.  
14 *Immunity* 2009;30:696-707.
- 15
- 16 41. Li L, Zhang J, Xiong N, *et al.* Notch-1 signaling activates NF-kB in human breast  
17 carcinoma MDA-MB-231 cells via PP2A-dependent AKT pathway. *Med Oncol*  
18 2016;33:33.
- 19
- 20 42. Klijn C, Durinck S, Stawiski EW, *et al.* A comprehensive transcriptional portrait of  
21 human cancer cell lines. *Nature Biotechnology* 2015;33:306-+.
- 22
- 23 43. Feng W, Shen L, Wen S, *et al.* Correlation between CpG methylation profiles and  
24 hormone receptor status in breast cancers. *Breast Cancer Research* 2007;9.
- 25
- 26 44. Panizo A, Perez Janices N, Blanco Luquin I, *et al.* Different clinical involvement of RASSF  
27 hypermethylation in breast cancer subtypes. *Virchows Archiv* 2015;467:S65-S.
- 28
- 29 45. Stefansson OA, Jonasson JG, Olafsdottir K, *et al.* CpG island hypermethylation of BRCA1  
30 and loss of pRb as co-occurring events in basal/triple-negative breast cancer.  
31 *Epigenetics* 2011;6:638-49.
- 32
- 33 46. Bertolo C, Guerrero D, Vicente F, *et al.* Differences and molecular  
34 immunohistochemical parameters in the subtypes of infiltrating ductal breast cancer.  
35 *American Journal of Clinical Pathology* 2008;130:414-24.
- 36
- 37 47. Villani V, Casini B, Pace A, *et al.* The Prognostic Value of Pyrosequencing-Detected  
38 MGMT Promoter Hypermethylation in Newly Diagnosed Patients with Glioblastoma.  
39 *Dis Markers* 2015;2015:604719.
- 40
- 41 48. Perez-Janices N, Blanco-Luquin I, Teresa Tunon M, *et al.* EPB41L3, TSP-1 and RASSF2 as  
42 new clinically relevant prognostic biomarkers in diffuse gliomas. *Oncotarget*  
43 2015;6:368-80.

- 1  
2 49. Guerrero-Setas D, Pérez-Janices N, Blanco-Fernandez L, *et al.* RASSF2  
3 hypermethylation is present and related to shorter survival in squamous cervical  
4 cancer. *Mod Pathol* 2013;26:1111-22.
- 5  
6 50. Perez-Janices N, Blanco-Luquin I, Torrea N, *et al.* Differential involvement of RASSF2  
7 hypermethylation in breast cancer subtypes and their prognosis. *Oncotarget*  
8 2015;6:23944-58.
- 9  
10 51. Buchegger K, Ili C, Riquelme I, *et al.* Reprimo as a modulator of cell migration and  
11 invasion in the MDA-MB-231 breast cancer cell line. *Biol Res* 2016;49:5.
- 12  
13 52. Labbozzetta M, Poma P, Vivona N, *et al.* Epigenetic changes and nuclear factor- $\kappa$ B  
14 activation, but not microRNA-224, downregulate Raf-1 kinase inhibitor protein in  
15 triple-negative breast cancer SUM 159 cells. *Oncol Lett* 2015;10:3807-15.
- 16  
17 53. Minatani N, Waraya M, Yamashita K, *et al.* Prognostic Significance of Promoter DNA  
18 Hypermethylation of cysteine dioxygenase 1 (CDO1) Gene in Primary Breast Cancer.  
19 *PLoS One* 2016;11:e0144862.
- 20  
21 54. Yari K, Payandeh M, Rahimi Z. Association of the hypermethylation status of PTEN  
22 tumor suppressor gene with the risk of breast cancer among Kurdish population from  
23 Western Iran. *Tumour Biol* 2016;37:8145-52.
- 24  
25 55. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, *et al.* Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients  
26 with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:736-50.
- 27  
28 56. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of  
29 histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term  
30 follow-up. *Histopathology* 1991;19:403-10.
- 31  
32 57. Edge S, Byrd D, Compton C, *et al.* *AJCC cancer staging manual*. Springer-verlag: New  
33 York, 2010.
- 34  
35 58. Bibikova M, Fan JB. Genome-wide DNA methylation profiling. *Wiley Interdiscip Rev*  
36 *Syst Biol Med* 2010;2:210-23.
- 37  
38 59. Bibikova M, Barnes B, Tsan C, *et al.* High density DNA methylation array with single  
39 CpG site resolution. *Genomics* 2011;98:288-95.
- 40  
41



1 **Tables**

2 **Table 1.** Differentially methylated probes between TN BC and non-neoplastic breast tissue.  $\Delta\beta$ -  
 3 values > 0 indicate hypermethylation and  $\Delta\beta$ -values < 0 represent hypomethylation in TN BC  
 4 compared to non-neoplastic samples.

5

Probe	Gene	Region	$\Delta\beta$ -value
cg18675097	<i>NKAPL</i>	1 <sup>st</sup> Exon	0.44
cg18675097	<i>NKAPL</i>	5'UTR	0.44
cg07496545		TSS200	0.31
cg02852670		5'UTR	0.31
cg10982443		5'UTR	0.30
cg02578944	<i>NKAPL</i>	1 <sup>st</sup> Exon	0.30
cg01345315		TSS1500	0.28
cg19635505		5'UTR	0.27
cg14286208		5'UTR	0.27
cg08274637	<i>DLEU7</i>	TSS200	0.27
cg05965387	<i>DLEU7</i>	TSS200	0.26
cg07815836		5'UTR	0.25
cg10359157	<i>DLEU7</i>	TSS200	0.25
cg14621323		1 <sup>st</sup> Exon	0.24
cg11002923		5'UTR	0.24
cg27051129	<i>DLEU7</i>	TSS200	0.22
cg00711496		TSS1500	0.22
cg14239592		5'UTR	0.22
cg20400592	<i>DLEU7</i>	TSS200	0.22
cg17288288	<i>DLEU7</i>	TSS1500	0.21
cg22881174		5'UTR	0.21
cg15839431		TSS200	0.21
cg00270625		1 <sup>st</sup> Exon	0.21
cg00270625		5'UTR	0.21
cg00270625		TSS1500	0.21
cg00270625		TSS200	0.21
cg18114463		TSS1500	0.21
cg25027798		1 <sup>st</sup> Exon	0.20
cg25416125		5'UTR	0.20
cg07745707		1 <sup>st</sup> Exon	0.20
cg07883124		1 <sup>st</sup> Exon	0.20
cg01054755		1 <sup>st</sup> Exon	-0.28
cg13682095		5'UTR	-0.28
cg24161057		TSS200	-0.27
cg16151451		5'UTR	-0.26
cg06282270		TSS200	-0.25
cg06462347		1 <sup>st</sup> Exon	-0.25

<b>cg06462347</b>	5'UTR	-0.25
<b>cg01433610</b>	1 <sup>st</sup> Exon	-0.25
<b>cg26808747</b>	TSS1500	-0.24
<b>cg19856499</b>	1 <sup>st</sup> Exon	-0.23
<b>cg27230784</b>	1 <sup>st</sup> Exon	-0.22
<b>cg27230784</b>	5'UTR	-0.22
<b>cg20162381</b>	5'UTR	-0.22
<b>cg16257029</b>	TSS1500	-0.22
<b>cg00886954</b>	TSS200	-0.22
<b>cg05238741</b>	1 <sup>st</sup> Exon	-0.21
<b>cg08455275</b>	TSS1500	-0.21
<b>cg01422274</b>	5'UTR	-0.21

1

2

3

4

1 **Table 2.** Pathological and clinical characteristics of TN BC patient series.

Feature	Frequency (%)
<b>Histological grade</b>	
I	1/42 (2.4)
II	10/42 (23.8)
III	31/42 (73.8)
<b>Lymph node involvement</b>	
Yes	19/42 (45.2)
No	23/42 (54.8)
<b>Age (years)</b>	Mean: 62 Range: 38-82
<b>Tumour size (cm)</b>	Mean: 2.4 Range: 0.8-6.0
<b>Progression-free survival (months)</b>	Mean: 49 Range: 0-179
Yes	24/40 (60)
No	16/40 (40)
<b>Overall survival (months)</b>	Mean: 52 Range: 1-179
Exitus	17/41 (41.5)
<b>Chemotherapy</b>	
Yes	32/41 (78.1)
No	9/41 (21.9)
<b>Hormone therapy</b>	
Yes	6/35 (17.1)
No	29/35 (82.9)

2

3

4

5

6 **Table 3.** Primers used to pyrosequence *DLEU7* and *NKAPL* genes. They were designed using

7 PyroMark Assay Design software from Qiagen (Hilden, Germany).

8

Gene	Forward primer	Reverse primer	Sequencing primer	Amplicon size (bp)
<b><i>DLEU7</i></b>	GGATTTTAGGAGAA GGTAGAGGTTAGT	[Bt <sub>n</sub> ]ACTCCTCCAC CTCTAAATCTCAC	GGGTTATAGATT AGAGT	96
<b><i>NKAPL</i></b>	TATTAGTTAGTTTT GGGTTTGTAGT	[Bt <sub>n</sub> ]ACATCTACTC TACCAAATAATA AACTCCC	GTTTTTGGGTTTGT AGTAA	154

9

10

1 **Figure legends**

2 **Figure 1. Methylome of TN BC.** *Heat-map* showing top differentially methylated genes in TN  
3 BC (T) tissues compared to non-neoplastic (N) breast tissues (FDR < 0.05,  $\Delta\beta$ -value > 0.2).  
4 Selected genes for further validation are written in bold.

5

6 **Figure 2. Methylation of *DLEU7* and *NKAPL* genes in TN BC cell lines.** Pyrosequencing showed  
7 methylation levels of 3 and 2 CpG sites in *DLEU7* and *NKAPL* genes, respectively, in 4 TN BC cell  
8 lines and the non-neoplastic cell line 184B5. \* indicates  $p < 0.05$ ).

9

10 **Figure 3. Methylation of *DLEU7* and *NKAPL* genes in breast tissues.** Pyrosequencing showed  
11 methylation levels of 3 and 2 CpG sites in *DLEU7* and *NKAPL* genes, respectively, in 5 non-  
12 neoplastic breast tissues (N,  $n = 5$ ), 42 adjacent-to-tumour tissues (A,  $n = 42$ ), and 42 TN BC  
13 tissues (T,  $n = 42$ ). (\*,  $p < 0.05$ ).

14

15 **Figure 4. Methylation of *DLEU7* and *NKAPL* genes in paired breast tumour and adjacent to-**  
16 **tumour tissue.** Methylation levels 3 and 2 CpG sites in *DLEU7* and *NKAPL* genes, respectively,  
17 were significantly higher in TN BC tissues (T) than their matched non-neoplastic adjacent-to-  
18 tumour tissue (A).

19

20 **Figure 5. *NKAPL* mRNA expression in TN BC cell lines.** (A) *NKAPL* expression levels were  
21 significantly lower in TN BC cell lines than in the non-neoplastic breast cell line 184B5 (\*,  $p <$   
22 0.05). Data were measured by quantitative PCR using *GAPDH* as the endogenous control and  
23 293T as positive control (+C) of *NKAPL* expression. RQ, relative quantification ( $RQ=2^{-\Delta Ct}$ ). (B)  
24 *NKAPL* methylation percentages and mRNA expression levels were inversely correlated in TN  
25 BC cell lines ( $r = -0.82$ ).

26

1 **Figure 6. DLEU7 and NKAPL protein expression in TN BC.** (A) Immunohistochemical DLEU7  
2 expression in a representative TN BC tissue at 10X magnification showing a set of non-  
3 neoplastic ducts within the adipose tissue. Details of each area are magnified at 40X. DLEU7 is  
4 less expressed in tumoral cells than in the non-neoplastic adjacent-to-tumour tissue. (B) DLEU7  
5 protein expression was measured in 10 paired TN BC and adjacent-to-tumour samples, and  
6 scored as follows: 0, no expression; 1 weak expression; 2, intermediate expression; 3, strong  
7 expression. (C) NKAPL protein expression levels were lower in four TN BC cell lines than in two  
8 immortalized but non-neoplastic breast, measured by Western blot and using  $\alpha$ -tubulin as the  
9 loading control.

10

11 **Figure 7. Potential clinical value of DLEU7 and NKAPL hypermethylation in TN BC.** High  
12 methylation percentages of *DLEU7* and *NKAPL* genes tended to be associated with worse  
13 overall and progression-free survival in our series of 42 TN BC patients, although this  
14 association was not significant.

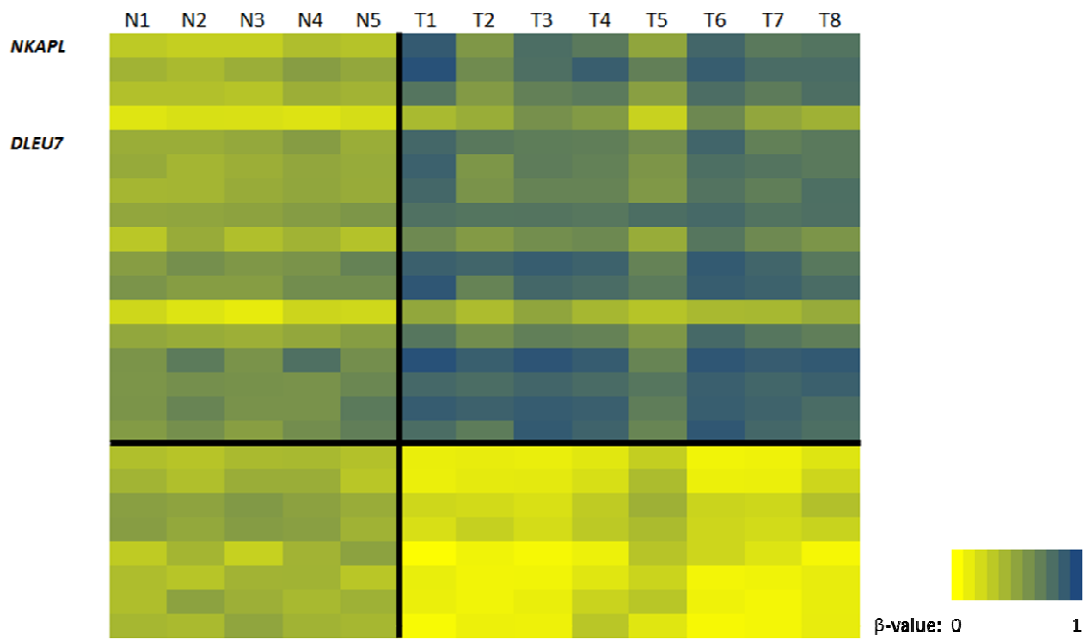
15

16

1 **Figures**

**Figure 1**

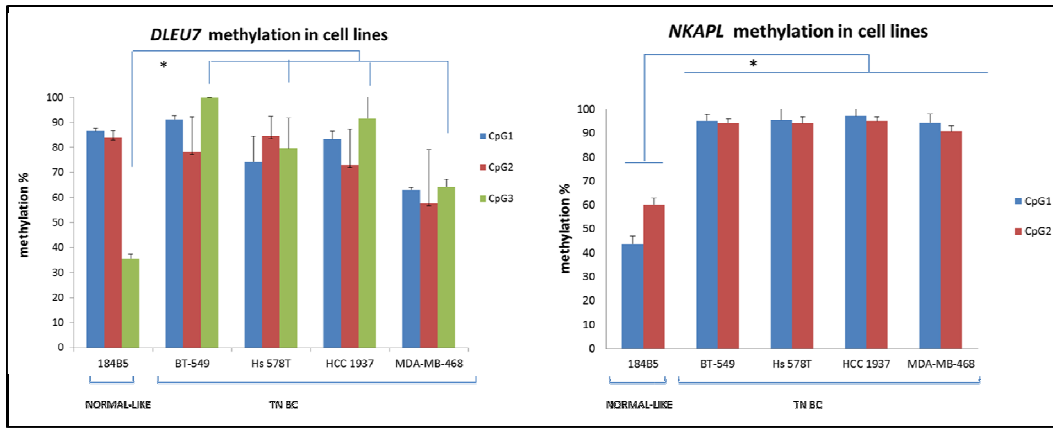
Ulazia-Garmendia A., *et al.*



2

Figure 2

Ulazia-Garmendia A., et al.

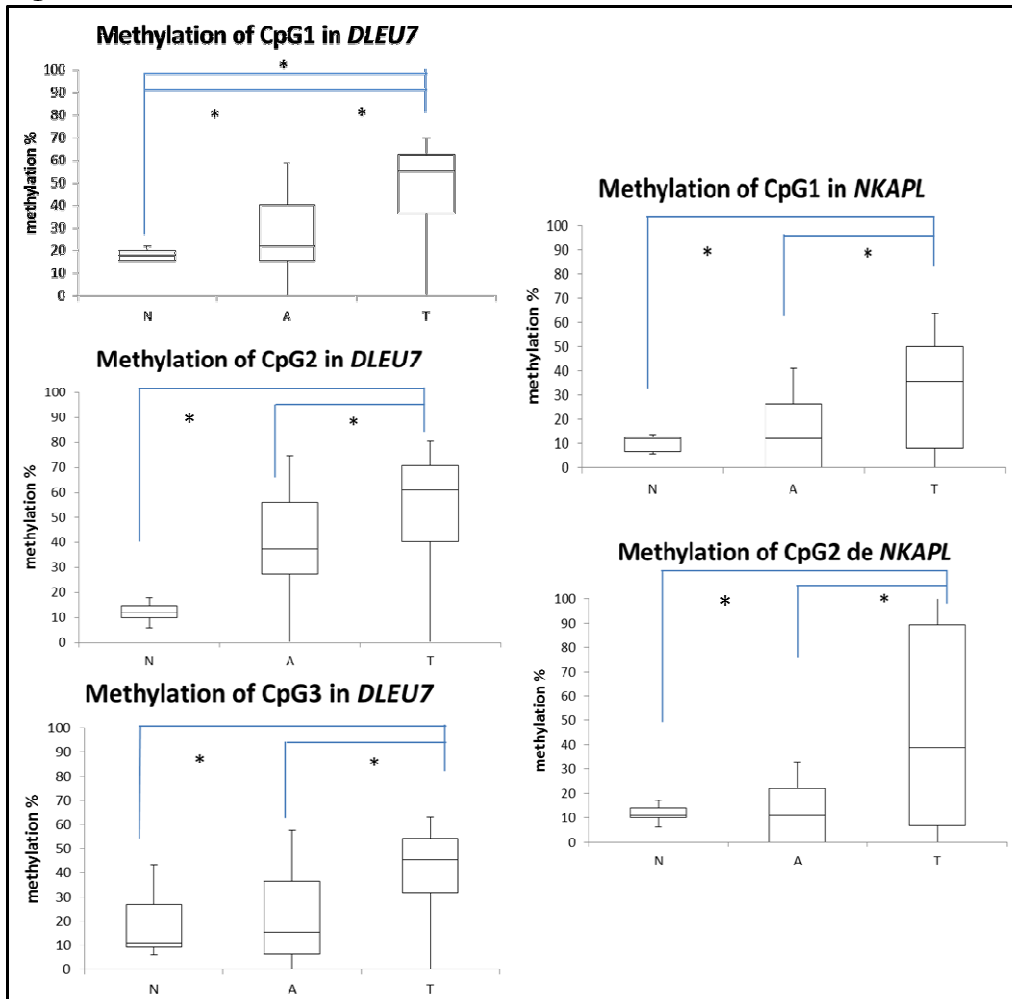


1

2

Figure 3

Ulazia-Garmendia A., et al.



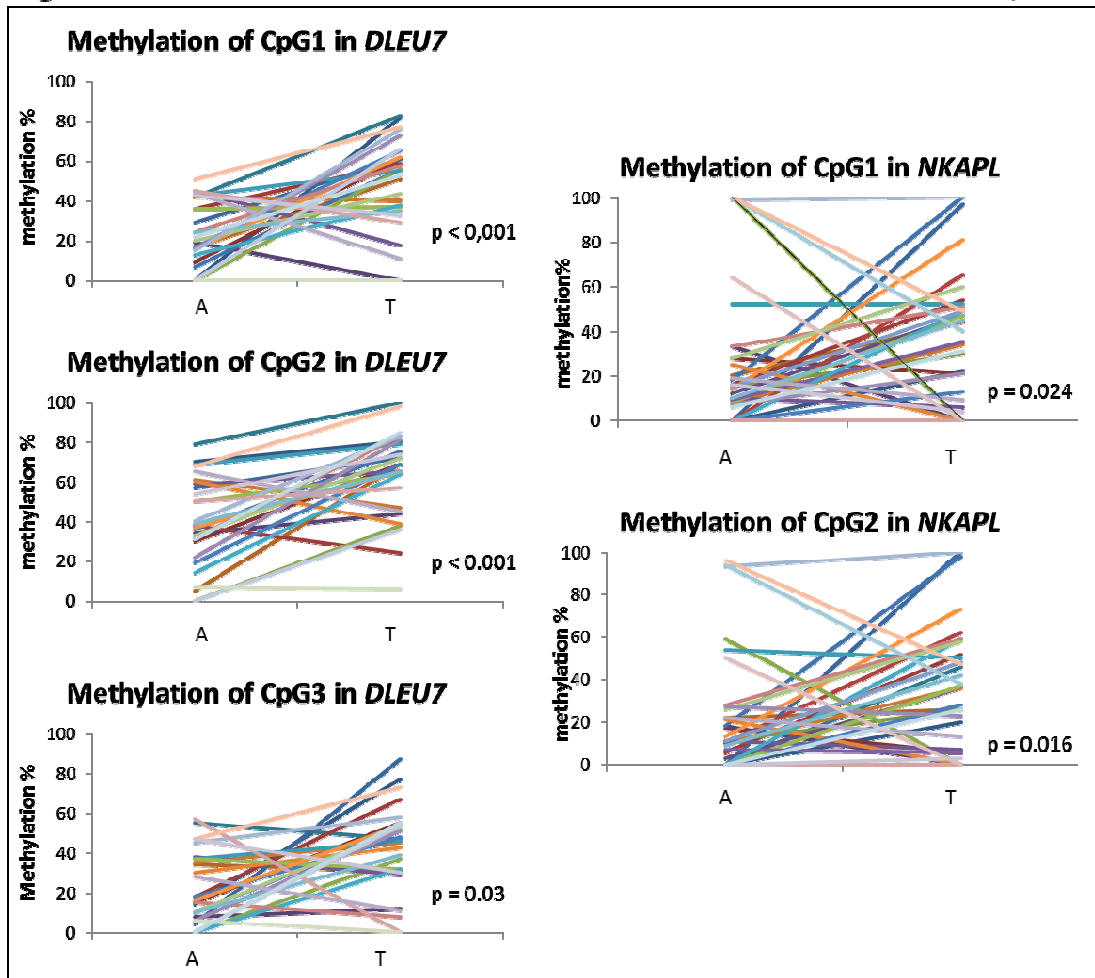
1

2



Figure 4

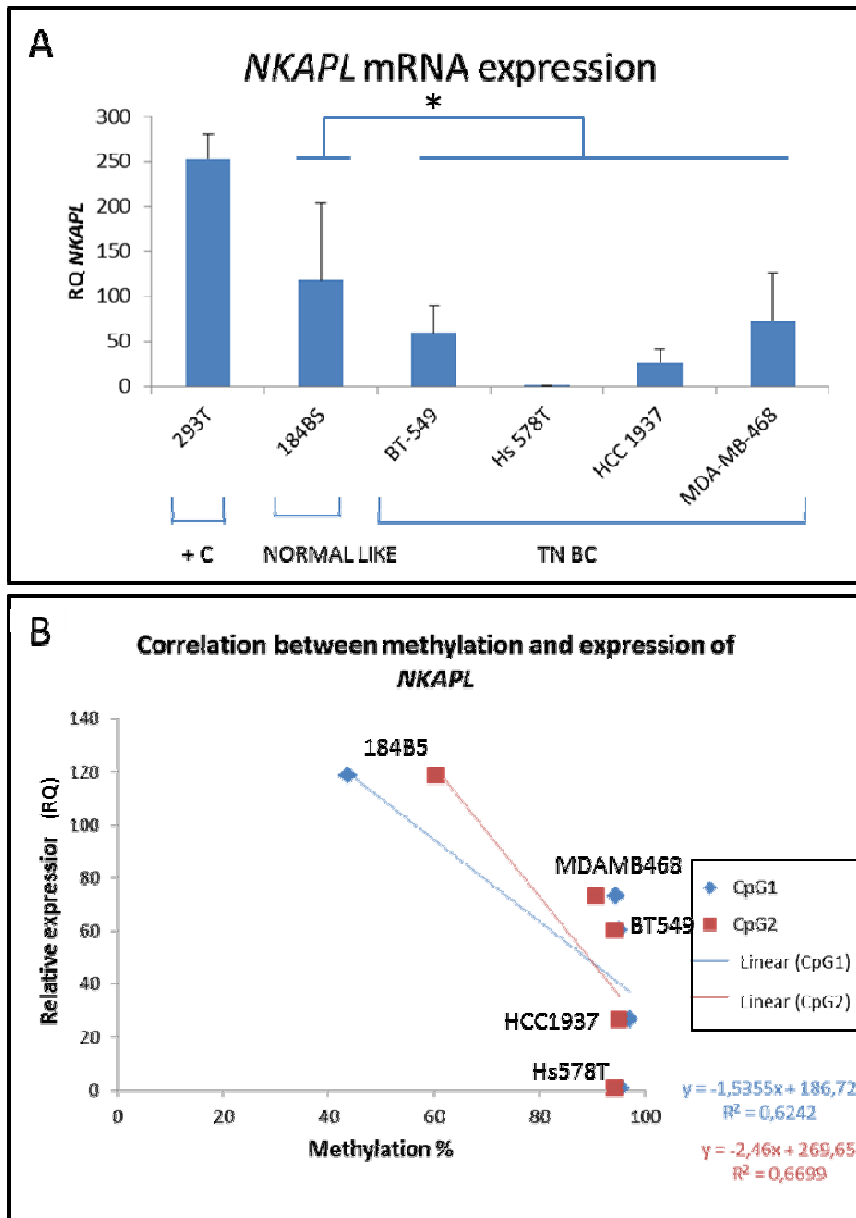
Ulazia-Garmendia A., et al.



1

2

Figure 5 Ulazia-Garmendia A., et al.

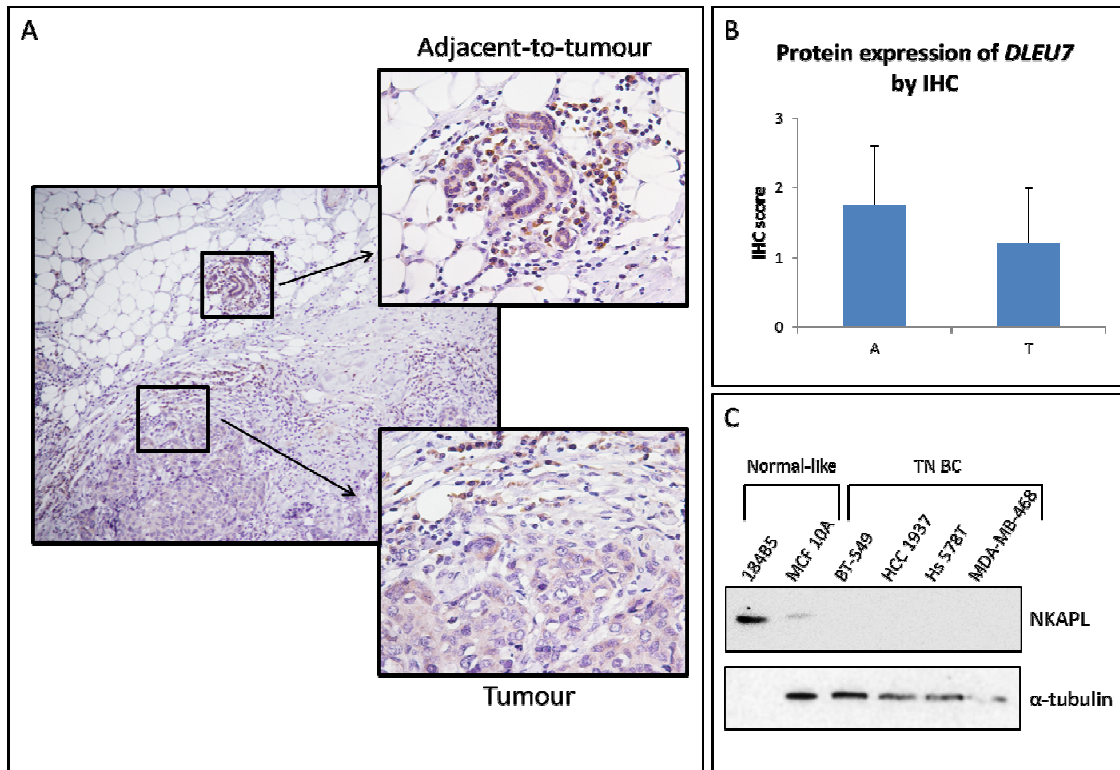


1

2

Figure 6

Ulazia-Garmendia A., et al.

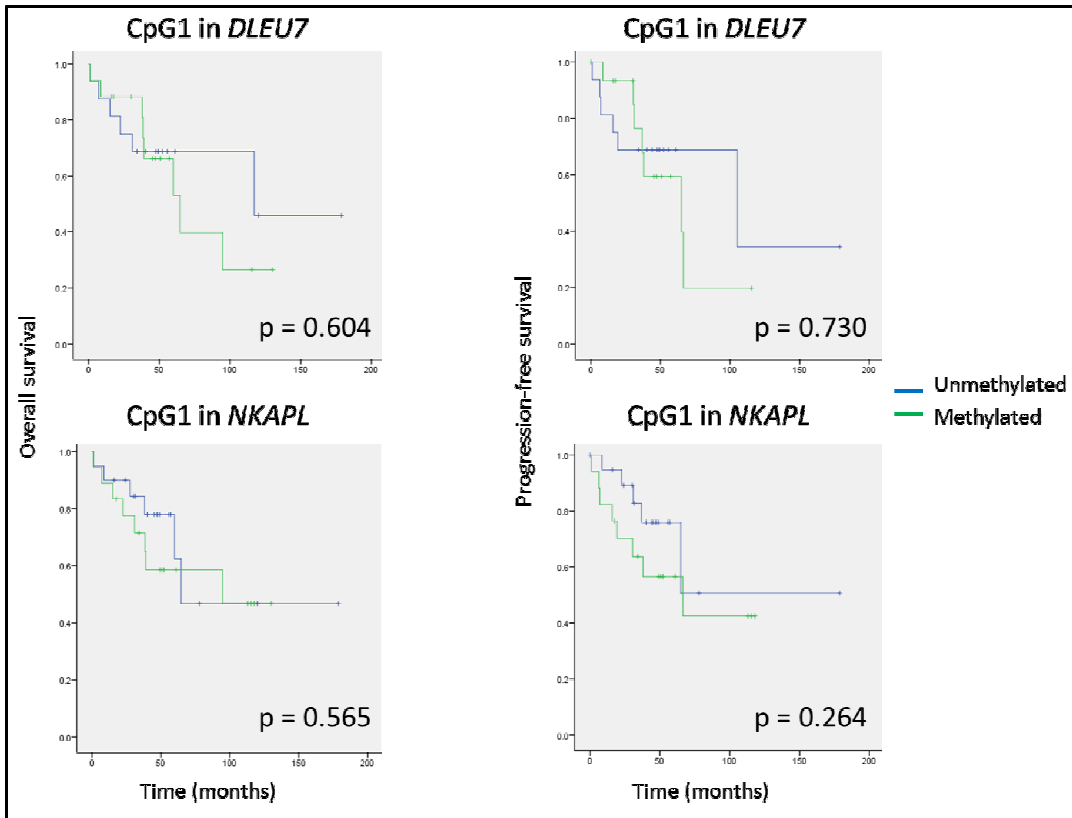


1

2

Figure 7

Ulazia-Garmendia A., et al.



1

2

1 **Supplementary Information**

2 The supplementary information contains a supplemental figure.

3

4

5 **Supplementary Figure legends**

6

7 **Supplementary Figure S1. Scheme of the CpG sites analysed in *DLEU7* and *NKAPL* genes.**8 Three and two CpG sites in *DLEU7* and *NKAPL* were examined by pyrosequencing in TN BC.

9 CpG1 in each gene was recognized by a probe contained in the methylation array, which was

10 found to be differentially methylated between TN BC and non-neoplastic breast samples. TSS,

11 transcription start site; bp, base pairs.

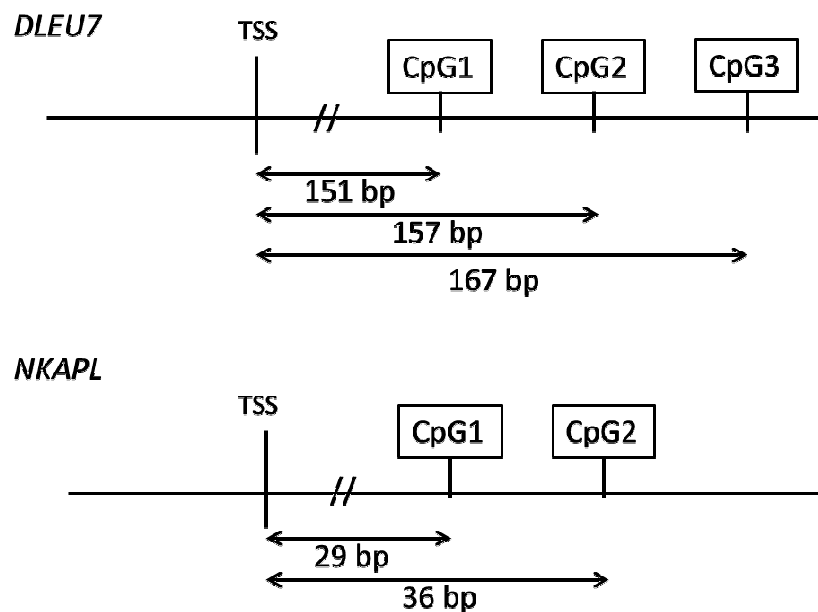
12

13

14 **Supplementary Figures**

Supplementary Figure S1

Ulazia-Garmendia A., et al.



15