

Aus der Klinik für Gynäkologie mit Brustzentrum
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Rezidiv nach pathologischer Komplettremission beim
Mammakarzinom: Interindividuelle und intraindividuelle Analyse
von Genexpressionsparametern

Relapse after pathologic complete response in breast cancer:
interindividual and intraindividual analysis of gene expression
parameters

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Simona Gipe (geb. Bruzas)

Datum der Promotion: 23. März 2024

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	iii
Abbildungsverzeichnis	iv
Abkürzungsverzeichnis	v
Zusammenfassung	1
Abstract	3
1 Einleitung	4
1.1 Allgemein	4
1.2. Definition der pathologischen Komplettremission	4
1.3. Prädiktive Faktoren für die pathologische Komplettremission	4
1.4. Rezidiv trotz pathologischer Komplettremission	5
2 Methodik	7
2.1. Patientenselektion und Studiendesign	7
2.2. Definition der Subgruppen	9
2.3. Genexpressionsanalyse	10
2.4. Statistische Aufarbeitung	11
3. Ergebnisse	13
3.1 Studienkollektiv	13
3.2. Interindividueller Vergleich	15
3.3. Intraindividueller Vergleich	18
3.4 Intrinsischer Subtyp	22
4. Diskussion	24
4.1 Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse	24
4.2 Interpretation der Ergebnisse und Einbettung der Ergebnisse in den jetzigen Forschungsstand	25
4.3 Stärken und Schwächen der Studie	29
4.4 Implikationen für Praxis und zukünftige Forschung	29

5. Schlussfolgerungen	31
Literaturverzeichnis	32
Eidesstattliche Versicherung	39
Anteilsklärung an den erfolgten Publikationen.....	40
Auszug aus der Journal Summary List	41
Druckexemplar der Publikation	44
Lebenslauf	45
Komplette Publikationsliste.....	47
Danksagung	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Patientencharakteristika.....	14
Tabelle 2: Interindividueller Vergleich der Gensignaturexpression des Primärtumors zwischen den Patientinnen mit und ohne Rezidiv nach pCR in Subgruppen.	17
Tabelle 3: Intraindividueller Vergleich der Genexpression zwischen Primärtumor und Rezidiv/Metastase nach pCR in Subgruppen.	21

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Studienkollektiv	8
Abbildung 2: Immunhistochemische Subgruppen.....	10
Abbildung 3: Interindividueller Vergleich des Primärtumors zwischen den Patientinnen mit Rezidiv nach pCR und Kontrollpatientinnen ohne Rezidiv nach pCR	16
Abbildung 4A: Intraindividueller Vergleich der Expression von ER-Signalisierungssignatur zwischen Primärtumor und Rezidiv/Metastase nach pCR.	19
Abbildung 4B: Intraindividueller Vergleich der Genexpression zwischen Primärtumor und Rezidiv/Metastase nach pCR in der Subgruppe der Fernmetastasierung.	20
Abbildung 5: Verteilung des intrinsischen und des immunhistochemischen Subtyps im Primärtumor und im Rezidivtumor/Metastase.	23

Abkürzungsverzeichnis

BRCA	Brustkrebsgen (Breast Cancer Gene)
CI	Konfidenzintervall
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DFS	Krankheitsfreies Überleben (disease-free survival)
EBC	Frühes Mammakarzinom (early breast cancer)
EFS	Ereignisfreies Überleben (event-free survival)
ER	Östrogen-Rezeptor
FDR	Falscherkennungsrate (false discovery rate)
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
HER2	Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2
HR	Hormonrezeptor
HRD	Homologe Rekombinationsdefizienz
IFN- γ	Interferon-Gamma
KEM	Kliniken Essen-Mitte
logFC	log-2fache Änderung
MHC	Haupthistocompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex)
MYC	V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
NST	Neoadjuvante Systemtherapie
OS	Gesamtüberleben (overall survival)
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
pCR	Pathologische Komplettremission
PD-1	Programmierter Zelltod-Protein 1 (Programmed Cell Death Protein 1)

PD-L1	Programmierter Zelltod-Ligand 1 (Programmed Cell Death Ligand 1)
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PR	Progesteron-Rezeptor
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
RNA	Ribonukleinsäure
TGF β	Transformierender Wachstumsfaktor Beta
TIGIT	T-Zellen Immunrezeptor mit Immunglobulin und Immunrezeptor Tyrosin-basierter Inhibitionsdomäne
TILs	Tumorerfiltrierende Lymphozyten
TNBC	Triple-negatives Mammakarzinom (triple negative breast cancer)
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen

Zusammenfassung

Die pathologische Komplettremission (pCR) gilt als Surrogatmarker für das Überleben bei Mammakarzinom-Patienten. Nur wenige klinisch-pathologische Eigenschaften sind bekannt, die das Rezidivrisiko nach pCR erhöhen. In unserer Arbeit haben wir mithilfe von Genexpressionsanalysen (Nanostring nCounter® Breast Cancer 360 Panel) die genetischen Eigenschaften des Mammakarzinoms der Patientinnen, die ein Rezidiv nach pCR erleiden, und die der Kontrollpatientinnen ohne Rezidiv nach pCR untersucht. Eine 1:3-gematchte Kohorte wurde gebildet von den Patientinnen in der Datenbank des Brustzentrums der Kliniken Essen-Mitte. Von 4616 Mammakarzinom-Patientinnen erhielten 1450 Patientinnen eine neoadjuvante Chemotherapie, 672 davon erreichten pCR, 65 bekamen danach ein Rezidiv. Nach Ausschluss der Fälle mit Fernmetastasierung innerhalb von 12 Monaten ergab sich ein Studienkollektiv von 14 Patientinnen, die weitere Einschlusskriterien erfüllten. Die Genexpressionsanalyse erfolgte an insgesamt 69 Tumorproben mit interindividuellem Vergleich der Genexpressionsparameter des Primärtumors von den Patientinnen mit ($N = 14$) und ohne Rezidiv ($N = 41$) sowie einem intraindividuellen Vergleich des Primärtumors und Rezidivtumors/Metastase der Patientinnen mit Rezidiv ($N = 14$). Der interindividuelle Vergleich ergab eine niedrigere Expression von Haupthistocompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex [MHC]) Klasse II-Gensignatur ($\log_{2}FC = -0,819$, $p = 0,032$) in dem Tumormaterial der Patientinnen mit Rezidiv. In der Gruppe der Fernmetastasierung konnte eine niedrigere Expression von MHC-Klasse-II-Gensignatur ($\log_{2}FC = -1,151$, $p = 0,014$) sowie eine höhere Expression von homologer Rekombinationsdefizienz (HRD)-Gensignatur ($\log_{2}FC = 0,649$, $p = 0,026$) nachgewiesen werden. In der intraindividuellen Analyse wurden niedrigere Expressionslevel der Östrogen-Rezeptor (ER) Signalisierungssignatur ($\log_{2}FC = -0,595$, $p = 0,006$) im Rezidivtumor/Metastase nachgewiesen. In der Subgruppe der Fernmetastasierung konnten zusätzlich geringere Expressionen von Gensignaturen für die Apoptose ($\log_{2}FC = -0,310$, $p = 0,023$), Interferon-Gamma Signalisierung ($\log_{2}FC = -1,114$, $p = 0,047$), Stromazellen ($\log_{2}FC = -0,877$, $p = 0,050$), T-Zellen Immunrezeptor mit Immunglobulin sowie Immunrezeptor Tyrosin-basierter Inhibitionsdomäne ($\log_{2}FC = -1,860$, $p = 0,023$), CD8+ T-Zellen ($\log_{2}FC = -1,237$, $p = 0,042$), und regulatorische T-Zellen ($\log_{2}FC = -1,349$, $p = 0,026$) im Rezidivtumor/Metastase detektiert werden. Diese retrospektive Analyse ergibt Hinweise auf differente immunologische Eigenschaften des Tumors, der später trotz einer pCR

rezidiert, schon am Anfang der Erkrankung und auch die Veränderung der Genexpressionsparameter im Laufe der Erkrankung zeigen spezifische Besonderheiten. Allerdings müssten diese Ergebnisse in prospektiven Studien mit größerer Patientenpopulation evaluiert werden, um daraus die Konsequenzen für die Prädiktion, Prävention und Therapie des Rezidivs nach pCR zu ziehen.

Abstract

Pathologic complete response (pCR) is being used as a surrogate marker of survival in breast cancer patients. Only a few clinicopathological factors that increase the risk of relapse after pCR are known. In our study we performed gene expression analysis (Nanostring nCounter® Breast Cancer 360 Panel) and examined genetic features of tumors from patients with pCR and relapse and from controls without relapse after pCR. Out of 4616 breast cancer patients in our database, 1450 received neoadjuvant chemotherapy and 672 of them achieved pCR, 65 of those relapsed later. A total of 14 patients met the inclusion criteria after discounting the cases with early distant relapse (<12 months). We created a 1:3 cohort from the database of the Breast Cancer Unit, Kliniken Essen-Mitte and conducted transcriptomic analysis on 69 tumor samples using Nanostring nCounter® Breast Cancer 360 Panel. An interindividual comparison between primary tumors of patients with ($N = 14$) and without relapse ($N = 41$) and intraindividual comparison between primary tumors and relapses in patients with post-pCR recurrence ($N = 14$) were performed. Interindividual analysis showed lower expression of major histocompatibility complex (MHC) II signature ($\log_{2}FC = -0.819$, $p = 0.032$) in tumors of patients with relapse. In the subgroup of patients with distant relapse, tumors had lower MHC II signature expression ($\log_{2}FC = -1.151$, $p = 0.014$) and higher homologous recombination deficiency signature ($\log_{2}FC = 0.649$, $p = 0.026$) compared to controls. In intraindividual analysis between primary tumors and relapses after pCR, the latter exhibited lower expression of estrogen receptor signaling signature ($\log_{2}FC = -0.595$, $p = 0.006$). Tumors in distant relapse also showed lower expression of signatures responsible for apoptosis ($\log_{2}FC = -0.310$, $p = 0.023$), interferon gamma signaling ($\log_{2}FC = -1.114$, $p = 0.047$), stroma ($\log_{2}FC = -0.877$, $p = 0.050$), T-cell immunoreceptor with immunoglobulin and immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif domains ($\log_{2}FC = -1.860$, $p = 0.023$), CD8+ T-cells ($\log_{2}FC = -1.237$, $p = 0.042$), and regulatory T-cells ($\log_{2}FC = -1.349$, $p = 0.026$).

This retrospective analysis gives us new information about different immunological features already at the beginning of the disease of tumors that later relapse, as well as changes in their gene expression parameters during the course of disease. However, these results should be evaluated in prospective studies with bigger patient populations in order for them to have a predictive value or consequences in prediction, prevention and therapy of relapse after pCR.

1 Einleitung

1.1 Allgemein

Die pathologische Komplettremission (pathologic complete response [pCR]) nach neoadjuvanter Chemotherapie ist einer der wichtigsten Prognosefaktoren für Mammakarzinom-Patienten. Insbesondere bei Patienten mit einem Humanen Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2) -positiven oder triple-negativen Mammakarzinom (triple negative breast cancer [TNBC]) gilt die pCR als Surrogatmarker für das Überleben. Die Metaanalyse von Cortazar et al. untersuchte die Ergebnisse von 12 internationalen Studien mit 11955 Patientinnen und hat eindeutig gezeigt, dass die pCR in der Brust und in den ipsilateralen axillären Lymphknoten mit einem deutlichen Vorteil in dem krankheitsfreien- (disease-free survival, [DFS]) und Gesamtüberleben (overall survival, [OS]) assoziiert ist [1].

1.2. Definition der pathologischen Komplettremission

In unserer Studie definierten wir, wie international üblich, die pCR als ypT0/ypTis ypN0. Die Komplettremission in der Brust und Axilla (ypT0/ypN0) zeigt eine stärkere Assoziation mit dem verbesserten ereignisfreien- (event-free survival [EFS]) und Gesamtüberleben (overall survival, [OS]) als nur die Komplettremission in der Brust [1].

Der Nachweis eines DCIS (ypTis/ypN0) nach Chemotherapie hat hingegen keinen negativen Einfluss auf das Überleben [2]. Aus diesen Gründen hat sich die pCR-Definition als histologischer Nachweis der pathologischen Komplettremission in der Brust und in den ipsilateralen axillären Lymphknoten mit oder ohne residuales DCIS etabliert.

1.3. Prädiktive Faktoren für die pathologische Komplettremission

Es wurden viele Faktoren beschrieben, die die Wahrscheinlichkeit der pCR beeinflussen. Als einer der wichtigsten gilt der immunhistochemische Tumorsubtyp. Aus bisherigen Studien ist bekannt, dass die Rate der pCR zwischen den unterschiedlichen Subtypen erheblich variiert und dieses mit einer unterschiedlichen Prognose assoziiert ist [1,3].

Die Metaanalysen von Cortazar et al. und Spring et al. zeigten, dass das TNBC und das HER2-positive Mammakarzinom die höchste pCR-Rate nach neoadjuvanter Chemotherapie aufweisen [1,3]. Das Erreichen der pCR hat in diesen Patientengruppen auch den stärksten positiven Einfluss auf die Prognose [1]. Bezogen auf den intrinsischen Tumorsubtyp, ist der Luminal-A Tumor mit der niedrigsten pCR-Rate assoziiert, wobei in basal-like Tumoren die höchste pCR-Rate beobachtet wird [4].

Nennenswert ist es auch, dass junge Frauen mit TNBC und HR-positivem/HER2-negativem Mammakarzinom häufiger eine pCR nach neoadjuvanter Chemotherapie erreichen im Vergleich zu einem älteren Patientenkollektiv [5].

Bei TNBC wird die pCR-Rate durch Hinzunahme von Carboplatin [6] und Pembrolizumab [7] erhöht und bei HER2-positivem Tumor sind schlechte Differenzierung, negativer Progesteronrezeptorstatus, duale HER2-Blockade wichtige Prädiktoren einer pCR [8].

Mammakarzinome mit einem hohen Ki-67 Wert [9], kleinerem cT-Stadium [10], hoher Anzahl tumorinfiltrierender Lymphozyten [11] haben eine höhere pCR-Rate. Der Nachweis einer lymphovaskulären Infiltration [12] und *PIK3CA*-Genmutation [13] verringern die Wahrscheinlichkeit für eine pathologische Komplettremission.

1.4. Rezidiv trotz pathologischer Komplettremission

Wie erwähnt, ist die pCR der Surrogatparameter für das Überleben. Trotzdem erleiden einige Patienten ein Rezidiv, das im Falle einer Fernmetastasierung zu einer palliativen Behandlungssituation führt. Aus diesem Grund ist das Erkennen der Risikofaktoren für ein Rezidiv nach pCR von besonderer Bedeutung. Einige klinisch-pathologische Risikofaktoren konnten in den letzten Jahren bereits identifiziert werden. Die Arbeit von Chaudry et al. zeigte, dass jüngeres Alter das Risiko der Fernmetastasierung nach pCR erhöhte [14]. Höhere T- und N-Stadien bei der Erstdiagnose sind mit höherem Rezidivrisiko nach pCR assoziiert [15]. Auch die HER2-Positivität erhöht trotz pCR die Wahrscheinlichkeit des Rezidivs [16].

Die Patienten, die nach einer pCR weitere zytotoxische Therapien in der Adjuvanz/Post-Neoadjuvanz bekommen, haben keinen EFS-Vorteil gegenüber den Patienten ohne adjuvante/post-neoadjuvante Chemotherapie [3]. Es muss hier betont werden, dass sich diese Daten nur auf die Chemotherapie und nicht auf die Immun- oder Antikörpertherapie

in der Adjuvanz/Post-Neoadjuvanz beziehen. Welche Chemotherapie neoadjuvant gegeben wurde, scheint ebenfalls keinen Einfluss auf die Rezidivrate zu haben, solange pCR erreicht wurde [17].

Es ist jedoch unklar, welche Rolle genetische und immunologische Parameter des Tumors bezüglich des Rezidivrisikos spielen, und ob es möglich wäre, anhand dieser Parameter die Patienten mit erhöhtem Rezidivrisiko trotz pCR zu identifizieren und eventuell anders zu behandeln.

Von 4616 Mammakarzinom-Patientinnen in unserer Datenbank in dem Zeitraum zwischen 2011 und 2020 erhielten 1450 Patientinnen eine neoadjuvante Chemotherapie, 672 davon haben pCR erreicht und 65 von denen bekamen ein Rezidiv nach pCR [18]. In unserer Arbeit haben wir die Genexpressionsparameter des Tumors von Patientinnen mit ($N = 14$) und ohne Rezidiv ($N = 41$) nach pCR bei Erstdiagnose und zu dem Zeitpunkt des Rezidivs verglichen [18], um weitere Risikofaktoren für Rezidiv nach pCR zu identifizieren.

2 Methodik

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden von Bruzas et al. in 09/20 auf dem ESMO-Kongress als Poster-Präsentation und in 03/22 in NPJ Breast Cancer im Rahmen einer Publikation veröffentlicht:

172P Gene expression in early breast cancer (EBC) patients (pts) with relapse despite pathologic complete response (pCR): An intra- and interindividual (matched control) analysis. *Annals of Oncology*. 2020.

Gene signatures in patients with early breast cancer and relapse despite pathologic complete response. *NPJ Breast Cancer*. 2022.

2.1. Patientenselektion und Studiendesign

Die durchgeführte Arbeit ist eine retrospektive monozentrische Studie des interdisziplinären Brustzentrums der Kliniken Essen-Mitte [18]. In die Studie konnten weibliche Patientinnen eingeschlossen werden, die mindestens 18 Jahre alt waren und im Brustzentrum der Kliniken Essen-Mitte in dem Zeitraum von September 2011 bis Januar 2020 behandelt wurden [18]. Abbildung 1 zeigt die Patientenselektion.

Das finale Studienkollektiv bestand aus 14 Patientinnen, die nach Diagnose des Mammakarzinoms eine neoadjuvante Chemotherapie und leitliniengerechte operative Behandlung bei Nachweis einer pCR (ypT0 ypN0 / ypTis ypN0) erhielten [18]. Die Sentinellymphonodektomie konnte auch vor der neoadjuvanten Chemotherapie durchgeführt worden sein. Voraussetzung für die Studienteilnahme war der unauffällige Nodalstatus nach neoadjuvanter Chemotherapie. Es gab keine Beschränkungen der Art der verabreichten Chemotherapeutika. Das Chemotherapie-Schema wurde im Rahmen der interdisziplinären Tumorkonferenz nach Evaluation der Tumorbiologie, des Allgemeinzustands der Patientin und nach geltenden nationalen Leitlinien festgelegt. Die Chemotherapiedauer musste mindestens 12 Wochen betragen [18]. Zusätzlich wurde nun bei den Patientinnen ein stanziobiologisch gesichertes Lokalrezidiv oder eine Fernmetastasierung detektiert.

Fälle mit Fernmetastasierung innerhalb von 12 Monaten nach Abschluss der Chemotherapie wurden ausgeschlossen, um die Wahrscheinlichkeit zu reduzieren, dass

bei diesen Patientinnen möglicherweise eine primäre, nicht erkannte Fernmetastasierung vorgelegen hat [18]. Es wurden nur Daten der Patientinnen ausgewertet, von denen Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe (FFPE) sowohl des Primärtumors als auch des Rezidivs oder Metastase vorhanden waren [18].

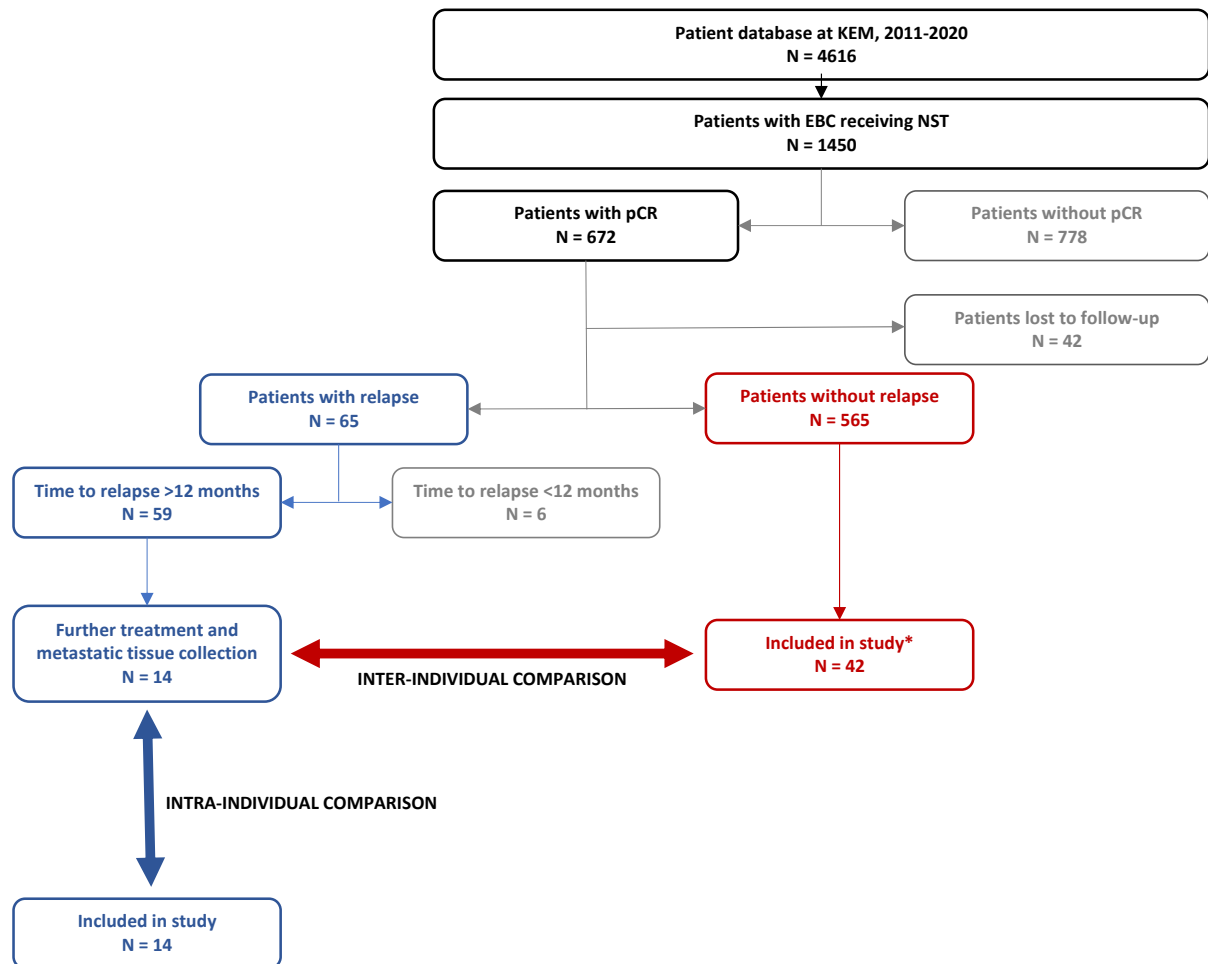


Abbildung 1: Studienkollektiv

* Immunhistochemische Analyse war nicht erfolgreich in einem Tumor

Abkürzungen: EBC frühes Mammakarzinom, KEM Kliniken Essen-Mitte, NST neoadjuvante Chemotherapie, pCR pathologische Komplettremission.

Quelle: Modifiziert nach S. Bruzas et al., 2022

Die Fallzahl berechnet sich aus den in der Tumordatenbank des Frauenkrebszentrums der Kliniken Essen-Mitte registrierten Patientinnen, die die oben genannten Einschlusskriterien erfüllten. Die Kontrollgruppe bildete eine 1:3 gematchte Kohorte von Patientinnen, die nach pCR kein Rezidiv erlitten haben [18]. Die Hauptkriterien für das

Matching waren der Hormonrezeptor- (HR) und HER2-Status, der axilläre Lymphknotenstatus vor neoadjuvanter Chemotherapie, der Differenzierungsgrad, Brustkrebsgen 1 und 2 (Breast Cancer Gene 1 and 2 [*BRCA-1/2*]) Status [18]. Die Tumorgröße war kein Matching-Kriterium, aber die Mehrheit der Patientinnen (>80 %) in beiden Gruppen hatte T1 oder T2 Tumor. Für die Patientinnen mit pathogener *BRCA-1* Keimbahnmutation wurden auch die Kontrollpatientinnen mit dieser Mutation gewählt [18]. Wenn diese nicht vorhanden waren, wurden sie mit Patientinnen mit triple negativer Tumorbiologie aufgrund der klinisch-pathologischen Ähnlichkeiten gematcht [18]. Es gab keine Patientinnen mit pathogener *BRCA-2* Keimbahnmutation in unserer Studie.

Die relevanten Patientendaten lagen in einer passwortgeschützten ACCESS-Datenbank der Klinik für Senologie in Kliniken Essen-Mitte vor. Weitergabe der pseudonymisierten Daten der Studien-Patientinnen erfolgte in Form einer Excel Datei. Das positive Votum der Ethikkommission Nordrhein lag vor Studienstart vor [18].

2.2. Definition der Subgruppen

Unser Ziel war es, die Subgruppen nach den üblichen immunhistochemischen Parametern zu definieren sowie eine separate Subgruppe der Patientinnen mit Fernmetastasierung zu untersuchen. Der Tumor wurde als hormonrezeptorpositiv definiert, wenn mindestens 1 % der Tumorzellkerne Östrogen oder Progesteron exprimierten analog der Empfehlung von American Society of Clinical Oncology (ASCO) [19]. Der Tumor galt als HER2-positiv, wenn er einen Score von 3+ hatte oder 2+ mit positiver in-situ Hybridisierungsreaktion. Nach diesen Kriterien wurden die Patientinnen in drei immunhistochemische Subgruppen eingeteilt: HR-positiv/HER2-negativ (ohne Patientinnen mit *BRCA1*-Keimbahnmutation), HER2-positiv (unabhängig von dem Hormonstatus) und TNBC. In der Subgruppe der Fernmetastasierung wurden Patientinnen untersucht, die an mindestens einer Lokalisation Fernmetastasen hatten unabhängig davon, ob zusätzlich lokales oder regionales Rezidiv vorlag.

In unserem Studienkollektiv gab es zwei Patientinnen mit pathogener *BRCA1*-Keimbahnmutation, die aufgrund geringer Hormonexpression zu der HR-positiven/HER2-negativen Subgruppe gehört hätten. Aufgrund der Besonderheiten der Tumore bei *BRCA1*-Keimbahnmutation und ihrer klinischen Ähnlichkeit zu dem TNBC entschieden

wir uns, diese Patientinnen im Rahmen der separaten Subgruppe zu untersuchen. Unsere Intention war es, die Verzerrung der Ergebnisse in der HR-positiven/HER2-negativen Subgruppe zu vermeiden und gleichzeitig Erkenntnisse über Genexpressionsparameter im Fall der *BRCA1*-Keimbahnmutation und Rezidiv zu gewinnen. Der Ausschluss der *BRCA1*-positiven Patientinnen aus der HR-positiven/HER2-negativen Subgruppe führte zur Entstehung von 2 kleinen Subgruppen (HR-positiv/HER2-negativ und *BRCA1*) mit jeweils 2 Patientinnen. Aufgrund der Größe dieser Subgruppen und wegen ihrer Abweichung von der typischen immunhistochemischen Einteilung müssten diese Ergebnisse zurückhaltend interpretiert werden.

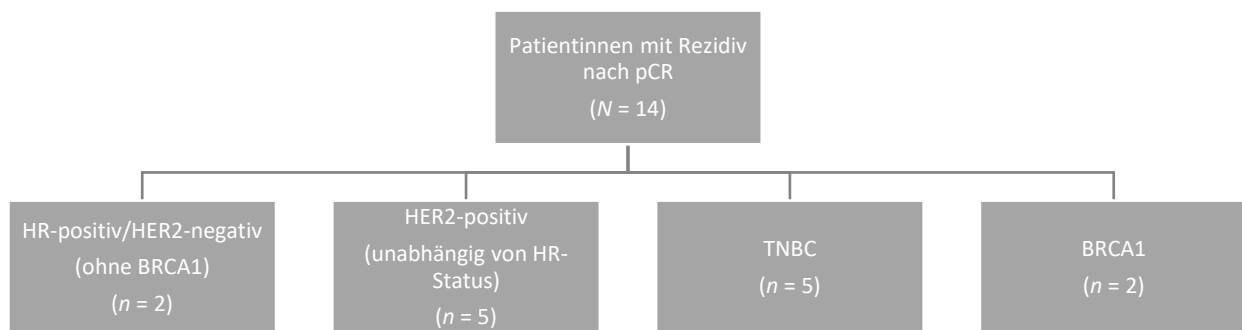


Abbildung 2: Immunhistochemische Subgruppen

Abkürzungen: *BRCA1* Brustkrebsgen 1, *HER2* Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor-2, *HR* Hormonrezeptor, *pCR* pathologische Komplettremission, *TNBC* triple-negatives Mammakarzinom.

Quelle: Eigene Darstellung

2.3. Genexpressionsanalyse

Es wurde eine Ribonukleinsäure- (ribonucleic acid, [RNA]) Analyse von insgesamt 69 Tumorblöcken mittels nCounter® Breast Cancer 360 Panel (NanoString Technologies Inc., Seattle, WA, USA) durchgeführt [18]. In dem nCounter® Breast Cancer 360 Panel

sind insgesamt 776 Gene enthalten, 18 davon sind interne Referenzgene, die für die Signalnormalisierung zuständig sind. Die restlichen 758 Gene umfassen diagnostische und wissenschaftliche Genexpressionssignaturen sowie die wichtigsten Signalwege in der Onkogenese, Immunantwort und Tumormikroumgebung [20].

Die Analyse wurde an RNA durchgeführt, die aus FFPE-Gewebe isoliert wurde [18]. Das FFPE- Gewebe wurde in 10µm große Segmente geschnitten und mithilfe 3%-iger Glycerinarbeitslösung, D-Limonen-Entfernungsmittels und reinen Ethanols vorbereitet und in Mikrozentrifugenröhrchen eingebracht. Nach dem Zellaufschluss führten wir die RNA-Isolierung mit RNA-Isolierungskits. Im Anschluss haben wir die Konzentration und Qualität der isolierten RNA gemessen, die erforderliche Menge der RNA und des Wassers berechnet und für die Hybridisierung vorbereitet. Überschüssige Reporter wurden entfernt. Die hybridisierten Reporter wurden ausgerichtet, immobilisiert sowie gezählt und mit dem Algorithmus verarbeitet. Die Berechnung der Messwerte für Genexpression und Gensignatur-Expression sowie die Bestimmung des PAM50-Subtyps erfolgte durch Nanostring Technologies [18].

PAM50-Signatur umfasst 50 Gene und ist in dem Breast Cancer 360 Panel enthalten. Sie ermöglicht die Definierung des intrinsischen Tumor-Subtyps (Luminal-A, Luminal-B, Basal-like, HER2-enriched) [20].

Die Genexpressionsanalyse war erfolgreich in 68 von 69 Proben [18]. Die Durchführung der Genexpressionstestung des Tumorgewebes mittels des nCounter® Breast Cancer 360 Panels erfolgte in pseudonymisierter Form.

2.4. Statistische Aufarbeitung

Die Expression von den relevanten 42 Genen und Gensignaturen wurde evaluiert in log₂-facher Änderung (log₂FC) [18]. Für die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde Student *t*-test angewendet, Adjustierung für die Falscherkennungsrate (false discovery rate, [FDR]) des *p*-Werts erfolgte mithilfe der Benjamini-Yekutieli Methode [18]. Die statistische Analyse wurde mit den Programmen SPSS Statistics Version 23.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) und Prism Version 9.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) durchgeführt [18].

Die gesamte Studienpopulation und die folgenden Subgruppen wurden interindividuell ausgewertet: Fernmetastasierung, TNBC, HER2-positiv (unabhängig von HR-Status), HR-positiv/HER2-negativ (ohne BRCA1) und BRCA1 [18].

Des Weiteren wurde eine intraindividuelle Analyse der Patientinnen mit Rezidiv durchgeführt, um die Unterschiede zwischen dem Primärtumor und Rezidivtumor zu untersuchen. Auch hier wurde die Analyse von allen Patientinnen mit Rezidiv durchgeführt sowie in den Subgruppen der Fernmetastasierung, TNBC, HER2-positiv (unabhängig von HR-Status), HR-positiv/HER2-negativ (ohne BRCA1) und BRCA1 [18]. Darüber hinaus erfolgte die Bestimmung des intrinsischen Tumorsubtyps mithilfe der PAM50-Signatur des nCounter® Breast Cancer 360 Panels [18].

3. Ergebnisse

3.1 Studienkollektiv

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden von Bruzas et al. in 09/20 auf dem ESMO-Kongress als Poster-Präsentation und in 03/22 in NPJ Breast Cancer im Rahmen einer Publikation veröffentlicht:

172P Gene expression in early breast cancer (EBC) patients (pts) with relapse despite pathologic complete response (pCR): An intra- and interindividual (matched control) analysis. *Annals of Oncology*. 2020.

Gene signatures in patients with early breast cancer and relapse despite pathologic complete response. *NPJ Breast Cancer*. 2022.

Die Patientenselektion nach den in der Abbildung 1 dargestellten Kriterien ergab 14 geeignete Studienpatientinnen und 41 Kontrollpatientinnen, deren Tumormaterial untersucht und ausgewertet werden konnte [18]. Patientencharakteristika sind in der Tabelle 1 zusammengefasst.

In den meisten Fällen handelte es sich um einen T1 oder T2 Tumor mit schlechter Differenzierung (G3) [18]. Acht (57,1 %) von den Studienpatientinnen zeigten eine Fernmetastasierung und sechs (42,9 %) hatten ein Lokalrezidiv nach pCR [18]. Acht Patientinnen (57,1 %) hatten einen klinisch oder pathologisch positiven Nodalstatus vor Start der neoadjuvanten Therapie (NST) [18]. Im Hinblick auf die Tumorbilogie war die Verteilung relativ gleichmäßig: vier (28,6 %) Patientinnen hatten eine HR-positiv/HER2-negative Erkrankung, fünf (35,7 %) waren TNBC und fünf (35,7 %) zeigten eine HER2-Positivität [18]. Die Studienpatientinnen erhielten eine neoadjuvante Chemotherapie mit oder ohne Antikörpertherapie je nach Tumorbilogie, entsprechend dem klinischen Standard zu dem Zeitpunkt der Behandlung. Alle 14 Patientinnen erhielten Taxane, 13 (92,9 %) davon bekamen zusätzlich ein Anthrazyklin, sechs (42,9 %) Carboplatin und fünf (35,7 %) eine anti-HER2 gerichtete Therapie [18].

Tabelle 1: Patientencharakteristika

	Patientinnen mit pCR und Rezidiv (N = 14)	Patientinnen mit pCR, ohne Rezidiv (N = 41)
Axillärer Nodalstatus ^a , n (%)		
Nodal-positiv	8 (57,1)	23 (56,1)
Nodal-negativ	6 (42,9)	18 (43,9)
Tumor-Stadium ^a , n (%)		
T1	7 (50,0)	16 (39,0)
T2	5 (35,7)	20 (48,8)
T3	1 (7,1)	3 (7,3)
T4	1 (7,1)	2 (4,9)
Rezidiv, n (%)		
Lokalrezidiv	6 (42,9)	-
Fernmetastasierung	8 (57,1)	-
Tumorsubtyp, n (%)		
HR-positiv/HER2-negativ	4 (28,6)	12 (29,3)
HER2-positiv ^b	5 (35,7)	15 (36,6)
TNBC ^c	5 (35,7)	14 (34,2) ^d
Differenzierungsgrad (G), n (%)		
1	-	-
2	2 (14,3)	3 (7,3)
3	12 (85,7)	38 (92,7)
Median Ki-67-index, %	60	50
Neoadjuvante Therapie, n (%)		
Anthrazykline	13 (92,9)	37 (90,2)
Taxane	14 (100,0)	41 (100,0)
Carboplatin	6 (42,9)	12 (29,3)
Anti-HER-2-Therapie	5 (35,7)	15 (36,6)
Adjuvante Therapie, n (%)		
Endokrine Therapie	9 (64,3)	19 (46,3)
Anti-HER-2-Therapie	5 (35,7)	15 (36,6)

Quelle: Modifiziert nach S. Bruzas et al., 2022

^a Nodalstatus und Tumorstadium prätherapeutisch

^b Unabhängig von HR-Status

^c Genexpressionsanalyse war nicht erfolgreich für eine Kontrollpatientin mit triple negativem Mammakarzinom

^d Für eine der Studienpatientinnen mit triple negativem Mammakarzinom gab es nur 2 Kontrollpatientinnen

Abkürzungen: ER Östrogen-Rezeptor, HER-2 Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor-2, HR Hormonrezeptor, pCR pathologische Komplettremission, TNBC triple-negatives Mammakarzinom.

3.2. Interindividueller Vergleich

In der interindividuellen Analyse haben wir die Genexpressionsparameter des Primärtumors bei den Patientinnen mit und ohne Rezidiv nach pCR verglichen.

In der Gesamtpopulation wies der Primärtumor der Studienpatientinnen eine signifikant niedrigere Expression der Gensignatur des Haupthistocompatibilitätskomplex-Klasse-II (major histocompatibility complex II, [MHC-II]) auf als der Primärtumor in der Kontrollgruppe [18]. In der Subgruppe der Fernmetastasierung konnte ebenfalls eine niedrigere Expression von MHC-II-Signatur festgestellt werden. Darüber hinaus war in dieser Subgruppe die Interferon-gamma (IFN- γ) -Signaturexpression niedriger (nicht signifikant) und der homologe Rekombinationsdefizienz (HRD) -Score höher im Vergleich zu der Kontrollgruppe [18].

In der Subgruppe von TNBC-Patientinnen mit Rezidiv konnte eine signifikant höhere Expression der Endothelzellsignatur, Bruststammzellen-Signatur (mammary stemness) und Progesteronrezeptor-Gen detektiert werden [18].

Tumore der Frauen mit Rezidiv nach pCR bei HER2-positiver Erkrankung hatten einen signifikant höheren Proliferations-Score im Vergleich zu den Kontrollpatientinnen [18].

Der Primärtumor der Patientinnen mit Rezidiv und *BRCA1*-Mutation zeigte eine signifikant höhere Expression der Zelladhäsion-Signatur im Vergleich zu Kontrollpatientinnen ohne Rezidiv. Diese Signaturexpression war hingegen niedriger im Primärtumor der Subgruppe mit HR-positiver/HER2-negativer Erkrankung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zusätzlich konnte in der HR-positiven/HER2-negativen Subgruppe eine niedrigere Expression des Cyklin-abhängigen Kinase 4-Gens (cyclin-dependent kinase 4 gene, [*CDK4*]) im Vergleich zu Kontrollpatientinnen beobachtet werden.

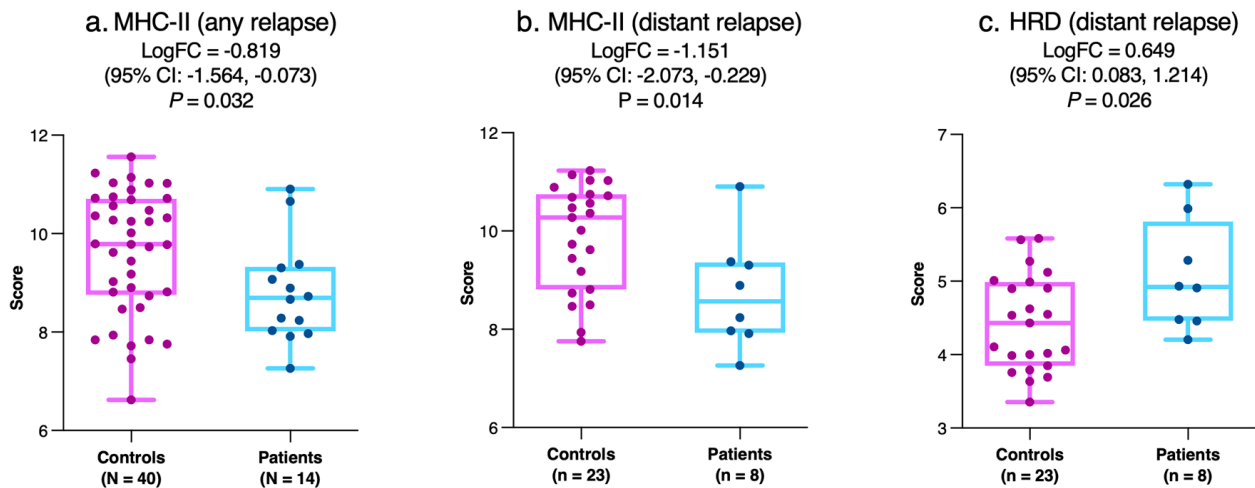


Abbildung 3: Interindividueller Vergleich des Primärtumors zwischen den Patientinnen mit Rezidiv nach pCR (blau) und Kontrollpatientinnen ohne Rezidiv nach pCR (violett).

Unterschiede in der Expression von MHC-Klasse-II-Gensignatur in der Gesamtpopulation (a) und in der Gruppe der Fernmetastasierung (b) sowie HRD-Signaturexpression in der Gruppe der Fernmetastasierung (c). Die zentrale horizontale Linie zeigt den Mittelwert, die obere horizontale Linie das Maximum und die untere horizontale Linie das Minimum, die Kastenabgrenzung zeigt die 25 %- und 75 %- Perzentilen.

Abkürzungen: CI Konfidenzintervall, HRD homologe Rekombinationsdefizienz, logFC log2-fache Änderung, MHC Haupthistocompatibilitätskomplex Klasse II.

Quelle: Aus S. Bruzas et al., 2022

Tabelle 2: Interindividueller Vergleich der Gensignaturexpression des Primärtumors zwischen den Patientinnen mit und ohne Rezidiv nach pCR in Subgruppen.

Gen/ Gensignatur	LogFC, P-Wert			
	HER2-positiv	TNBC	BRCA1	HR-positiv/ HER2-negativ
Proliferation	0,721 p = 0,023	0,148 <i>p</i> = 0,612	-0,273 <i>p</i> = 0,582	0,164 <i>p</i> = 0,806
Endothelzellen	-0,090 <i>p</i> = 0,796	0,827 p = 0,036	0,623 <i>p</i> = 0,479	-0,067 <i>p</i> = 0,796
Mammary stemness	-0,630 <i>p</i> = 0,441	1,716 p = 0,035	0,082 <i>p</i> = 0,963	0,630 <i>p</i> = 0,247
PR	-0,090 <i>p</i> = 0,931	1,027 p = 0,032	-1,027 <i>p</i> = 0,402	-1,438 <i>p</i> = 0,447
Zelladhäsion	0,316 <i>p</i> = 0,767	0,320 <i>p</i> = 0,434	0,401 p = 0,023	-2,370 p = 0,006
CDK4	0,162 <i>p</i> = 0,569	0,122 <i>p</i> = 0,488	-0,451 <i>p</i> = 0,340	-0,527 p = 0,018

Quelle: Modifiziert nach S. Bruzas et al., 2022

Abkürzungen: BRCA1 Brustkrebsgen 1, CDK4 Cyclin-abhängige Kinase 4, HER2 Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2, HR Hormonrezeptor, logFC log2-fache Änderung, pCR pathologische Komplettremission, PR Progesteronrezeptor, TNBC triple-negatives Mammakarzinom.

3.3. Intraindividueller Vergleich

In dem Vergleich des FFPE-Materials aus dem Primärtumor und aus dem Rezidivtumor/Metastase der Studienpatientinnen konnte eine signifikant geringere Expression der ER-Signalisierungssignatur im Rezidivtumor nachgewiesen werden [18]. Im Fall der Fernmetastasierung konnte zusätzlich eine verringerte Expression von Gensignaturen für Apoptose, IFN- γ -Signalisierung, Stromazellen, T-Zellen Immunrezeptor mit Immunglobulin und Immunrezeptor Tyrosin-basierter Inhibitionsdomäne (TIGIT), CD8+ T-Zellen und regulatorische T-Zellen (T_{reg}) im Rezidivtumor/Metastase beobachtet werden [18].

In der Subgruppe der TNBC gab es Unterschiede in der Genexpression von dem transformierenden Wachstumsfaktor-Beta-Gen (*TGF β*) und der Expression der Signatur, die für Stromazellen zuständig ist. Die Expression dieser Signaturen war niedriger im Rezidivtumor/Metastase [18].

Auch in den HER2-positiven Tumoren zum Zeitpunkt des Rezidivs war die *TGF β* -Genexpression geringer. Darüber hinaus wurden in dieser Subgruppe Östrogen-Rezeptor 1 (*ESR1*) und Phosphatase und Tensin Homolog (*PTEN*) -Gene weniger exprimiert [18].

In der HR-positiven/HER2-negativen Subgruppe war die Expression der Zelladhäsion-Signatur geringer und die Expression der Apoptose-Signatur und *B7-H3*-Genexpression höher im Rezidivtumor/Metastase im Vergleich zum Primärtumor.

In der intraindividuellen Analyse der *BRCA1*-mutierten Patientinnen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Primärtumor und Rezidivtumor/Metastase.

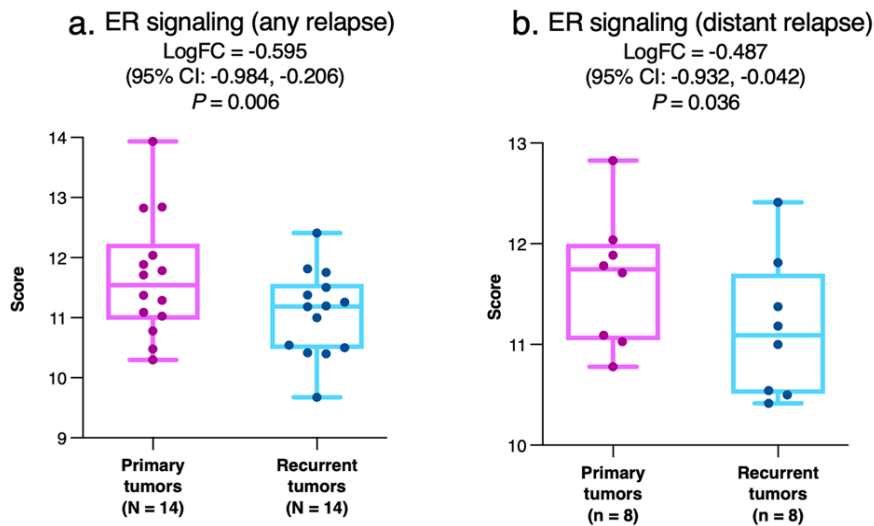


Abbildung 4A: Intraindividuellem Vergleich der Expression von ER-Signalisierungssignatur zwischen Primärtumor (violett) und Rezidiv/Metastase (blau) nach pCR.

Unterschiede in der Expression von ER-Signalisierungssignatur in der Gesamtpopulation (a) und in der Subgruppe der Fernmetastasierung (b). Die zentrale horizontale Linie zeigt den Mittelwert, die obere horizontale Linie das Maximum und die untere horizontale Linie das Minimum, die Kastenabgrenzung zeigt die 25 %- und 75 %-Perzentilen.

Abkürzungen: CI Konfidenzintervall, ER Östrogen-Rezeptor, logFC log₂-fache Änderung.

Quelle: Modifiziert nach S. Bruzas et al., 2022

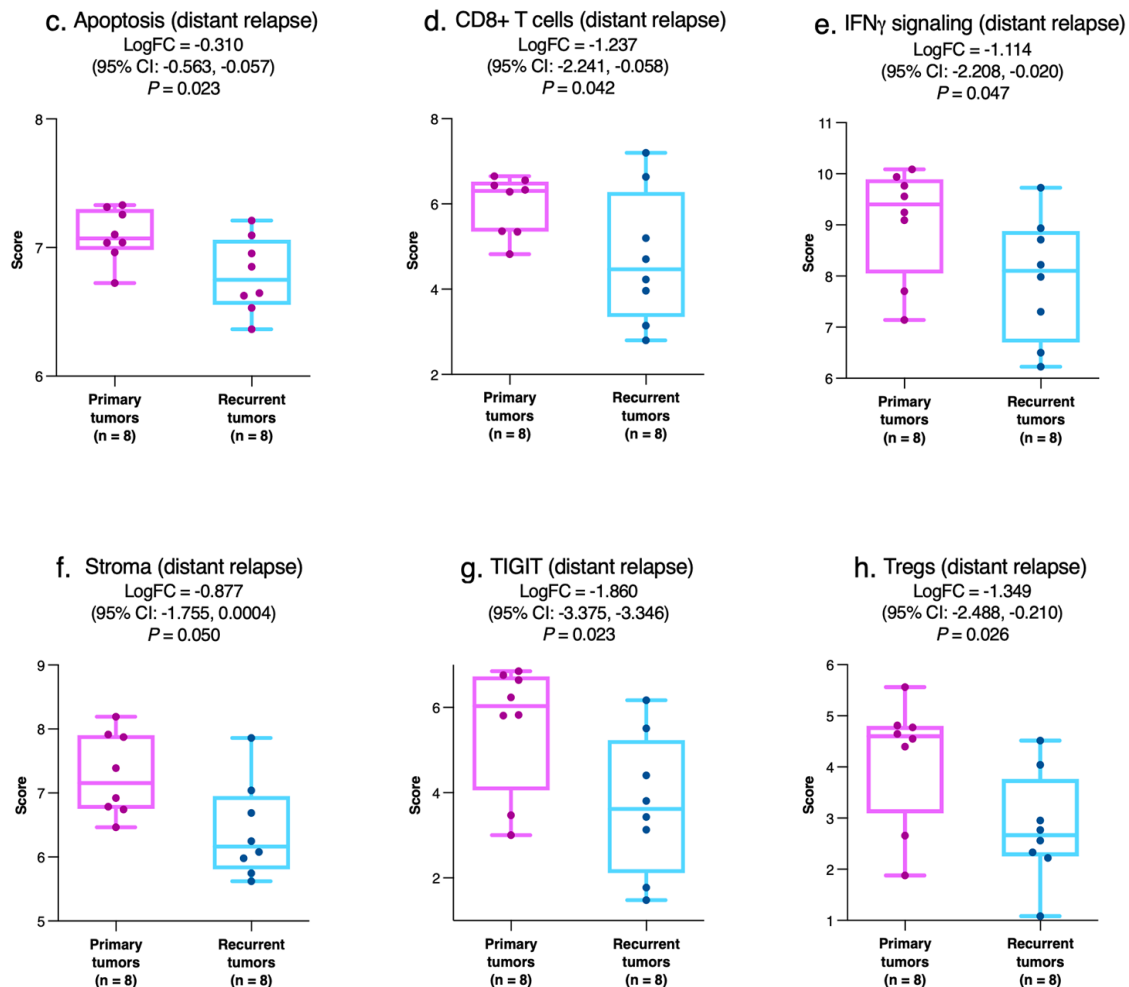


Abbildung 4B: Intraindividuellem Vergleich der Genexpression zwischen Primärtumor (violett) und Rezidiv/Metastase (blau) nach pCR in der Subgruppe der Fernmetastasierung.

Unterschiede in der Expression von Apoptose (c), CD8+ T-Zellen (d), Interferon-gamma-Signalisierung (e), Stromazellen (f), T-Zellen Immunrezeptor mit Immunglobulin und Immunrezeptor Tyrosin-basierter Inhibitionsdomäne (g) und regulatorische T-Zellen (h) in der Subgruppe der Fernmetastasierung. Die zentrale horizontale Linie zeigt den Mittelwert, die obere horizontale Linie das Maximum und die untere horizontale Linie das Minimum, die Kastenabgrenzung zeigt die 25 %- und 75 %-Perzentilen.

Abkürzungen: CI Konfidenzintervall, IFN- γ Interferon-gamma, logFC log2-fache Änderung, TIGIT T-Zellen Immunrezeptor mit Immunglobulin und Immunrezeptor Tyrosin-basierter Inhibitionsdomäne, T_{regs} regulatorische T-Zellen.

Quelle: Modifiziert nach S. Bruzas et al., 2022

Tabelle 3: Intraindividueller Vergleich der Genexpression zwischen Primärtumor und Rezidiv/Metastase nach pCR in Subgruppen.

Gen/ Gensignatur	LogFC, P-Wert			
	HER2-positiv	TNBC	BRCA1	HR-positiv/ HER2-negativ
ESR1	-1,804 P = 0,047	1,596 <i>P</i> = 0,193	0,748 <i>P</i> = 0,671	-1,886 <i>P</i> = 0,235
PTEN	-0,442 P = 0,044	0,269 <i>P</i> = 0,533	0,735 <i>P</i> = 0,252	-0,398 <i>P</i> = 0,562
Stroma	-0,111 <i>P</i> = 0,892	-1,040 P = 0,016	0,724 <i>P</i> = 0,738	0,468 <i>P</i> = 0,701
TGFβ	-0,503 P = 0,031	-0,673 P = 0,005	-0,035 <i>P</i> = 0,987	-0,106 <i>P</i> = 0,946
B7-H3	-0,070 <i>P</i> = 0,878	-0,369 <i>P</i> = 0,177	-0,537 <i>P</i> = 0,516	0,900 P = 0,025
Apoptose	-0,143 <i>P</i> = 0,369	-0,307 <i>P</i> = 0,206	0,147 <i>P</i> = 0,775	0,175 P = 0,009
Zelladhäsion	0,551 <i>P</i> = 0,373	0,627 <i>P</i> = 0,411	-4,133 <i>P</i> = 0,382	-4,580 P = 0,004

Quelle: Modifiziert nach S. Bruzas et al., 2022

Abkürzungen: BRCA1 Brustkrebsgen 1, ESR1 Östrogen-Rezeptor 1, HER2 Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2, HR Hormonrezeptor, logFC log2-fache Änderung, pCR pathologische Komplettremission, PTEN Phosphatase und Tensin Homolog, TGFβ transformierender Wachstumsfaktor-Beta, TNBC triple-negatives Mammakarzinom.

3.4 Intrinsischer Subtyp

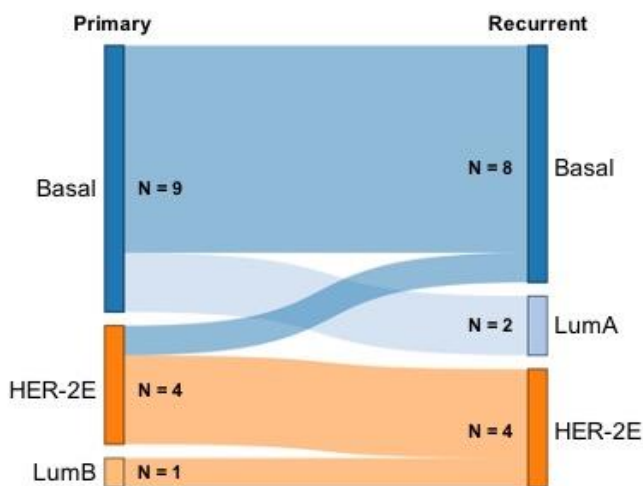
Im Rahmen unserer Arbeit haben wir zusätzlich anhand der PAM50-Analyse des nCounter® Breast Cancer 360 Panels den intrinsischen Subtyp des Primarius und des Rezidivtumors/Metastase bestimmt und die Korrelation mit dem immunhistologischen Subtyp überprüft. Im Laufe der Erkrankung konnte bei einigen Patientinnen der Wechsel sowohl des intrinsischen als auch immunhistochemischen Subtyps beobachtet werden. In vier von 14 Patientinnen veränderte sich der intrinsische und in fünf Patientinnen gab es Veränderungen in dem immunhistochemischen Subtyp bei Rezidiv/Metastasierung [18]. Genauere Darstellung ist in der Abbildung 4 zu sehen.

Insgesamt war der basal-like intrinsische Subtyp der häufigste sowohl im Primärtumor (n=9, 64,3 %) als auch im Rezidiv/Metastase (n=8, 57,1 %), gefolgt von HER2-enriched (n=4, 28,6 %) Subtyp [18]. Unter Primärtumoren gab es nur einen Tumor mit Luminal-B (7,1%) und keinen mit einem Luminal-A Subtyp [18]. Hingegen im Tumorgewebe des Rezidivs/Metastase gab es zwei Tumore mit Luminal-A Kriterien und keinen mit Luminal-B intrinsischem Subtyp [18].

In der Kontrollgruppe war die Verteilung ähnlich mit 20 (50,0 %) Tumoren mit basal-like und 14 (35,0 %) mit HER2-enriched Subtyp. Die restlichen vier (10 %) Kontrollpatientinnen zeigten einen Luminal-B und zwei (5 %) einen Luminal-A intrinsischen Subtyp [18].

Tumorproben von beiden Patientinnen mit pathogener *BRCA-1* Keimbahnmutation hatten einen basal-like Subtyp (Primärtumor und Rezidiv/Metastase) [18].

a.



b.

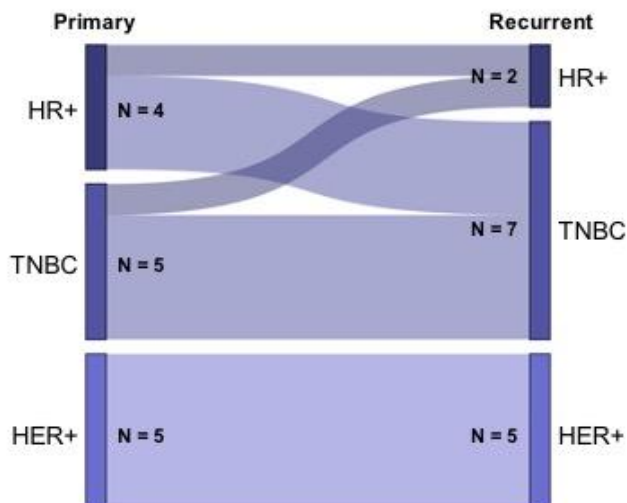


Abbildung 5: Verteilung des intrinsischen (a) und des immunhistochemischen (b) Subtyps im Primärtumor und im Rezidivtumor/Metastase.

Abkürzungen: Basal basal-like, HER2 Humaner Epidermaler Wachstumsrezeptor 2, HER2E HER2 enriched, HR Hormonrezeptor, Lum A Luminal-A, Lum B Luminal-B, TNBC triple-negatives Mammakarzinom.

Quelle: Aus Bruzas et al., 2022

4. Diskussion

4.1 Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse

Prädiktive klinisch-pathologische Eigenschaften für ein Rezidiv nach pCR wie höheres T- und N-Stadium wurden in anderen Analysen bereits beschrieben [15,16]. Es kommt jedoch aufgrund verbesserter Diagnostik und Screeningprogrammen zunehmend häufig zu der Diagnose des Mammakarzinoms in den früheren Stadien (T1-T2, N0), wie es sich in unserer Patientengruppe widerspiegeln lässt. Aus diesem Grund sind die genannten klinischen Kriterien nicht ausreichend, die Patientinnen mit dem Risiko für ein Rezidiv nach pCR zu erkennen. In unserer Arbeit haben wir versucht, anhand der Genexpressionsparameter die genetischen und immunologischen Eigenschaften des Tumors solcher Patientinnen zu beschreiben.

Trotz geringer Patientenanzahl mit gesichertem Rezidivnachweis konnten in unserer Studie relevante Unterschiede in den tumorgenetischen Parametern sowohl im Rahmen der interindividuellen als auch der intraindividuellen Analyse beobachtet werden. Die Expression von MHC-II-Signatur war different zwischen dem Primärtumor der Patientinnen, die später ein Rezidiv erlitten haben und denen, die rezidivfrei geblieben sind [18]. Dieser Effekt konnte auch in der Subgruppe der Fernmetastasierung gesehen werden, zusätzlich war in dieser Subgruppe die Expression von HRD-Signatur höher [18]. Darüber hinaus gab es signifikante Unterschiede in der interindividuellen Analyse in den HER2- (Proliferationssignatur), TNBC- (Endothelzellen, mammary stemness und *PR*) [18], HR-positiven/HER2-negativen (Zelladhäsion, *CDK4*) und BRCA1-Subgruppen (Zelladhäsion).

In dem Vergleich zwischen Primärtumor und Rezidiv/Metastase gab es ebenfalls interessante Ergebnisse: die Expression der ER-Signalisierungssignatur war geringer in dem Rezidivtumor/Metastase [18]. Die Fernmetastasen zeigten zusätzlich Unterschiede in der Expression der Signaturen zuständig für CD8+ Zellen, IFN- γ , Stromazellen, Apoptose, TIGIT und T_{reg} Zellen [18]. Auch hier gab es sowohl in der HER2- (*ESR1*, *PTEN*, *TGF β*) als auch in der TNBC (*TGF β* , Stromazellsignatur) [18] und HR-positiven/HER2-negativen (*B7-H3*, Apoptose, Zelladhäsion) Subgruppen differente Signaturexpression im Rezidivtumor/Metastase, verglichen mit dem Primarius.

Bemerkenswert sind außerdem die Unterschiede zwischen dem intrinsischen und immunhistochemischen Subtyp des gleichen Tumors und die Veränderung des Subtyps im Krankheitsverlauf. Mehr als ein Viertel (28,6 %) der Studienpatientinnen zeigte veränderte intrinsische oder veränderte immunhistochemische Tumorsubtypen zum Zeitpunkt des Rezidivs [18].

4.2 Interpretation der Ergebnisse und Einbettung der Ergebnisse in den jetzigen Forschungsstand

MHC-II spielt eine wichtige Rolle in der Immunantwort bei einer Mammakarzinomkrankung [21]. Es sorgt dafür, dass die exogenen Antigene die CD4+ T-Zellen erreichen, die wiederum andere tumorinfiltrierende Lymphozyten mobilisieren [22]. Niedrige MHC-II-Expression ist somit mit einer schwächeren Immunantwort gegen Tumorzellen in der Tumormikroumgebung verbunden.

MHC-II werden in der Regel in den professionellen antigenpräsentierenden Zellen gefunden, aber auch in manchen Tumorzellen [23]. Interessanterweise kann MHC-II durch IFN- γ -Signalisierung in anderen Zellen wie z.B. Brustkrebszellen aktiviert werden [23]. Es ist bekannt, dass höhere IFN- γ -Signaturexpression mit besserer Prognose in Mammakarzinom assoziiert ist [24]. In unserer Arbeit hatte der Primärtumor der Patientinnen mit Fernmetastasierung niedrigere MHC-II-Werte und nicht statistisch signifikant niedrigere IFN- γ -Signaturexpression im Vergleich zu den Kontrollpatientinnen [18]. Man könnte postulieren, dass IFN- γ in diesen Fällen nur in einem geringeren Ausmaß MHC-II induzieren konnte und, dass reduzierte MHC-II- und IFN- γ -Produktion unter anderem ein Grund für die reduzierte tumorspezifische Immunantwort war, die möglicherweise in einem Tumorrezidiv resultierte.

Der positive Zusammenhang zwischen MHC-II-Expression in den Tumorzellen und tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) sowie IFN- γ -Signalisierung wurde bereits in anderen Studien beobachtet [21]. Darüber hinaus war die MHC-II-Expression mit einem besseren DFS bei TNBC Patientinnen assoziiert [25]. Die Ergebnisse unserer Arbeit sprechen ebenfalls für eine schlechtere Prognose bei niedrigerer MHC-II-Signaturexpression, weil sie in unserer Patientenpopulation mit einem Rezidiv der Erkrankung assoziiert war [18].

Höhere Expression von der HRD-Gensignatur bei Patientinnen mit Fernmetastasen ist ein weiteres bemerkenswertes Ergebnis der interindividuellen Analyse in unserer Studie [18]. Bei den TNBC-Patienten mit homologer Rekombinationsdefizienz wird eine höhere pCR-Rate beschrieben. [26]. Die HRD-Signatur korreliert auch bei hormonrezeptorpositivem Mammakarzinom mit einer höheren pCR-Rate [27]. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei chemotherapieresistenten hormonrezeptorpositiven Karzinomen (Patienten ohne pCR), dass sie mit einem schlechteren DFS verbunden ist [27]. In unserem Patientenkollektiv konnte ein Zusammenhang zwischen einer hohen HRD-Gensignaturexpression und einer Fernmetastasierung trotz pCR gesehen werden. Obwohl es Hinweise gibt, dass HRD mit besserem DFS bei TNBC Patienten assoziiert ist [28], ist ihre Rolle in Hinsicht auf Rezidiv nach pCR unklar und sollte im Rahmen von größeren prospektiven Studien evaluiert werden.

Es ist nicht überraschend, dass unter triple negativen Primärtumoren die mammary stemness-Signatur bei Patientinnen mit Rezidiv höher war als bei Kontrollpatientinnen in unserer Auswertung [18]. Bruststammzellen sind resistent gegen chemotherapieinduzierten Stress, können über langen Zeitraum überleben und die Effekte des Immunsystems umgehen sowie die Angiogenese beeinflussen [29]. Es ist denkbar, dass die Zellen mit Stammzell-Phänotyp den Effekt der Chemotherapie überlebt haben und zu einem anderen Zeitpunkt bei der Bildung der Metastasen mitgewirkt haben. In der Arbeit von Honeth et al. wurde der Phänotyp mit Stammzell-Eigenschaften am häufigsten bei triple negativem und *BRCA-1* mutiertem Mammakarzinom gesehen [30].

In unserer Arbeit war zusätzlich die Expression der Endothelzellsignatur höher bei den Patientinnen mit Rezidiv nach pCR in der TNBC Subgruppe [18]. Die Proliferation der Endothelzellen in der Tumorumgebung ermöglicht den Transport von Sauerstoff und Nährstoffen zu der Tumorzelle [31]. Die Dichte der Mikrogefäße ist bei dem basalen und triple negativem Mammakarzinom am höchsten und spricht für eine schlechtere Prognose [32].

Der Primärtumor der Patientinnen mit Rezidiv in der HER2-positiven Subgruppe zeigte in unserer Arbeit eine höhere Expression der Proliferations-Signatur als der Tumor der Kontrollgruppe [18]. Eine hohe Proliferationsrate spricht in der Regel für die Aggressivität des Tumors und wird bei dem HER2-positiven Tumor häufig gesehen. Insgesamt ist ein

hoher Ki67-Index mit einem schlechteren DFS und OS verbunden, obwohl in diesen Fällen pCR häufiger erreicht werden kann [33].

Im Rahmen der intraindividuellen Analyse konnten wir eine signifikant geringere ER-Signalisierung des Rezidivtumors/Metastase sowohl in der Gesamtgruppe als auch in der Subgruppe der Fernmetastasierung feststellen [18], hindeutend auf eine mögliche endokrine Resistenz. Darüber hinaus war die *ESR1*-Expression im Rezidivtumor/Metastase unter HER2-positiven Patientinnen signifikant geringer [18]. Somatische Mutationen in dem *ESR1*-Gen können auch zu Veränderungen in dem ER-Signalisierungsweg führen und zu der endokrinen Resistenz beitragen [34]. Als Folge der endokrinen Resistenz werden andere Signalwege aktiviert, wie z.B. HER2, Proteinkinase-B (AKT), RAS-Signalisierung, die wiederum zu der erhöhten Proliferation des resistenten Tumors führen [34].

Die Ergebnisse aus der inter- und intraindividuellen Analyse der HR-positiven/HER2-negativen und *BRCA1*-Subgruppen, die wir hier präsentieren, wurden nicht in unserer Publikation in *npj Breast Cancer* [18] veröffentlicht. Die Subgruppen waren mit jeweils 2 Patientinnen sehr klein, zeigten jedoch interessante Ergebnisse. Ein Beispiel ist die geringere Expression der Zelladhäsion-Signatur im Tumor der Patientinnen mit Rezidiv nach pCR, verglichen mit Kontrollen ohne Rezidiv in der HR-positiven/HER2-negativen Subgruppe. Das Ergebnis in der *BRCA1*-Subgruppe war hingegen different – mit höherer Expression dieser Signatur in dem Primärtumor der Patientinnen mit Rezidiv.

Außerdem wurde in der intraindividuellen Analyse der HR-positiven/HER2-negativen Tumore die Zelladhäsion-Signatur weniger exprimiert in dem Rezidivtumor/Metastase im Vergleich zum Primärtumor. Die Verringerung der Zelladhäsion ermöglicht es den malignen Zellen ihre primäre Lokalisation zu verlassen und erhöht das Invasions- und Metastasierungspotenzial [35]. Ein aggressiveres Verhalten des Tumors der Patientinnen, die später Rezidiv nach pCR erleiden, könnte in der HR-positiven/HER2-negativen Subgruppe möglicherweise dadurch erklärt werden. Auch die weitere Abnahme der Zelladhäsion im Krankheitsverlauf erscheint logisch und könnte zum Progress der Erkrankung geführt haben.

Zusätzlich beobachteten wir in der intraindividuellen Analyse eine höhere Expression des *B7-H3*-Gens im HR-positiven/HER2-negativen Rezidivtumor/Metastase. Dieses Gen kodiert einen Immun-Checkpoint. Wiederum eine hohe Expression von *B7-H3* ist mit schlechter Prognose in Mammakarzinom assoziiert und hat den größten Effekt in den Luminal-A und Luminal-B Subtypen [36]. Die höhere Expression des *B7-H3*-Gens im Rezidivtumor/Metastase im Vergleich zum Primärtumor in unserer Analyse könnte zu dem aggressiven Tumorverhalten zum Zeitpunkt des Rezidivs beigetragen haben.

Obwohl eine genaue Ursache für ein Rezidiv nach pCR in unserer Studie nicht erkannt werden konnte, ergaben sich Hinweise auf die veränderte Tumormikroumgebung im Laufe der Erkrankung. Ein solcher Hinweis war die geringere Expression der Signaturen, die für Lymphozytenaktivierung und -funktion (CD8+, TIGIT, T_{reg}) zuständig sind in dem Rezidivtumor/Metastasentumor. Eine scheinbar insuffiziente Tumorimmunantwort, gekennzeichnet durch niedrige Expression von MHC-II- und IFN- γ -Signaturen, unterscheidet in unserer Arbeit die Patientinnen, die einen Tumorrezidiv erlitten haben von den rezidivfreien Kontrollpatientinnen.

Die Rolle der Tumormikroumgebung und der immunologischen Tumoreigenschaften bei Mammakarzinom wird in den letzten Jahren besonders intensiv diskutiert. Mehrere Studien haben gezeigt, dass ein immunologisch aktiver Tumor besser auf eine Chemo- und Immuntherapie anspricht und in der Regel mit einer besseren Prognose assoziiert ist [37,38]. Das primäre Mammakarzinom zeigt üblicherweise eine höhere Expression von Immunmarkern, wie sie beim frühen TNBC zu sehen sind. Gleichzeitig zeigt sich bei der Hinzunahme von Checkpoint-Inhibitoren eine vergleichsweise höhere pCR- und EFS-Rate [39]. Die sekundäre Metastase war hingegen in bisherigen Studien mit einer geringeren Aktivität des lokalen Immunsystems in der Tumormikroumgebung verbunden. Diese konnte mit der niedrigen Expression von tumorinfiltrierenden Lymphozyten, PD-1 und PD-L1, T_{reg}, CD8-Zellen und anderen Immunmarkern nachgewiesen werden [40]. In unserer Studie konnten wir im Rezidivtumor/Metastase ebenfalls eine geringere Expression der Gensignaturen beobachten, die mit einer Immunantwort des Tumors assoziiert sind. Aus den genannten Gründen ist es besonders wichtig, die Effektivität der Tumorimmunantwort bereits am Anfang der Erkrankung mithilfe der personalisierten Systemtherapie auszunutzen. Aktuell fokussieren sich die meisten Therapien der Immunonkologie auf die Checkpoint-Inhibition. Wenn die Rolle weiterer Marker in der

Tumormikroumgebung, wie MHC-II oder IFN- γ in der Entstehung des Rezidivs nach pCR in prospektiven Studien bestätigt werden kann, könnte dies bei der Entwicklung neuer Substanzen oder Behandlungsstrategien für diese Patientengruppe von besonderer Bedeutung sein.

4.3 Stärken und Schwächen der Studie

Die Analyse des Tumormaterials am Anfang der Erkrankung (Primarius) und in fortgeschrittener Situation (Rezidiv/Metastase) ist eine der Hauptstärken unserer Studie [18]. Auf diesem Weg konnte man die Tumorveränderungen auf der molekulargenetischen Ebene im Krankheitsverlauf beobachten und relevante Unterschiede erkennen. Darüber hinaus konnten wir aufgrund der Größe unserer Datenbank Kontrollpatientinnen nach klaren Matching-Kriterien identifizieren und eine 1:3 Kohorte bilden [18]. Dies hat uns ermöglicht, die Genexpressionsdifferenzen in einem sonst tumorbiologisch heterogenen Kollektiv zu erkennen.

Obwohl es in unserer Klinik in dem Zeitraum von 2011 bis 2020 mehr als 4500 Patientinnen behandelt wurden, erfüllten nur wenige Patienten die geforderten Einschlusskriterien [18]. Neben dem kleinen Patientenkollektiv zählen das retrospektive Studiendesign und das kurze Follow-up zu den Schwächen unserer Arbeit [18]. Aufgrund des geringen Anteils der *BRCA-1*-positiven Patientinnen, wurden diese zum Teil mit nicht *BRCA-1*-mutierten Patientinnen gematcht [18]. Zusätzlich führte der Ausschluss der *BRCA-1*-mutierten Patientinnen aus der HR-positiven/HER2-negativen- Subgruppe zur Formierung von noch kleineren HR-positiven/HER2-negativen- und *BRCA1*-Subgruppen.

4.4 Implikationen für Praxis und zukünftige Forschung

Trotz einer geringen Patientenanzahl zeigten sich in unseren Studienergebnissen relevante Hinweise auf Veränderungen in der Tumorummunantwort und Tumormikroumgebung, die im Rahmen der prospektiven Studien an einem größeren Patientenkollektiv weiter evaluiert werden sollten, um gegebenenfalls diagnostische und therapeutische Konsequenzen daraus zu ziehen.

Obwohl eine pCR als Surrogatmarker für das Überleben gilt, ist das Rezidiv nach pCR weiterhin mit einer schlechten Prognose verbunden und bedarf neuer Therapiestrategien, die nicht nur seinem immunhistochemischen, sondern auch tumorgenetischen Profil angepasst werden sollten.

5. Schlussfolgerungen

Die Therapie der Patienten, die Rezidiv nach pCR erleiden, stellt weiterhin eine Herausforderung in der Onkologie dar. Eines der Hauptgründe dafür ist die Tatsache, dass die Mechanismen, die zu einem Rezidiv führen, noch nicht komplett geklärt sind. In unserer Arbeit konnten wir einige Veränderungen in den tumorgenetischen Eigenschaften erkennen, die diese Tumore auszeichnen. Weitere prospektive Studien sind notwendig, um die Ergebnisse in größeren Patientenkollektiven zu evaluieren und individualisierte neoadjuvante sowie post-neoadjuvante Therapiekonzepte entwickeln zu können.

Literaturverzeichnis

1. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, Bonnefoi H, Cameron D, Gianni L, Valagussa P, Swain SM, Prowell T, Loibl S, Wickerham DL, Bogaerts J, Baselga J, Perou C, Blumenthal G, Blohmer J, Mamounas EP, Bergh J, Semiglazov V, Justice R, Eidtmann H, Paik S, Piccart M, Sridhara R, Fasching PA, Slaets L, Tang S, Gerber B, Geyer CE, Pazdur R, Ditsch N, Rastogi P, Eiermann W, von Minckwitz G. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: The CTNeoBC pooled analysis. *The Lancet*. 2014;384(9938).
2. Mazouni C, Peintinger F, Wan-Kau S, Andre F, Gonzalez-Angulo AM, Symmans WF, Meric-Bernstam F, Valero V, Hortobagyi GN, Pusztai L. Residual ductal carcinoma in situ in patients with complete eradication of invasive breast cancer after neoadjuvant chemotherapy does not adversely affect patient outcome. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(19).
3. Spring LM, Fell G, Arfe A, Sharma C, Greenup R, Reynolds KL, Smith BL, Alexander B, Moy B, Isakoff SJ, Parmigiani G, Trippa L, Bardia A. Pathologic Complete Response after Neoadjuvant Chemotherapy and Impact on Breast Cancer Recurrence and Survival: A Comprehensive Meta-analysis. *Clinical Cancer Research*. 2020;26(12).
4. Prat A, Fan C, Fernández A, Hoadley KA, Martinello R, Vidal M, Viladot M, Pineda E, Arance A, Muñoz M, Paré L, Cheang MCU, Adamo B, Perou CM. Response and survival of breast cancer intrinsic subtypes following multi-agent neoadjuvant chemotherapy. *BMC Med*. 2015 Dec 18;13:303.
5. Loibl S, Jackisch C, Lederer B, Untch M, Paepke S, Kümmel S, Schneeweiss A, Huober J, Hilfrich J, Hanusch C, Gerber B, Eidtmann H, Denkert C, Costa SD, Blohmer JU, Nekljudova V, Mehta K, von Minckwitz G. Outcome after neoadjuvant chemotherapy in young breast cancer patients: a pooled analysis of individual patient data from eight prospectively randomized controlled trials. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;152(2).
6. Walsh EM, Shalaby A, O'Loughlin M, Keane N, Webber MJ, Kerin MJ, Keane MM, Glynn SA, Callagy GM. Outcome for triple negative breast cancer in a retrospective cohort with an emphasis on response to platinum-based neoadjuvant therapy. Vol. 174, *Breast Cancer Research and Treatment*. 2019.

7. Schmid P, Cortés J, Dent R, Pusztai L, McArthur HL, Kuemmel S, Bergh J, Denkert C, Park YH, Hui R, Harbeck N, Takahashi M, Foukakis T, Fasching PA, Cardoso F, Jia L, Karantza V, Zhao J, Aktan G, O’Shaughnessy J. KEYNOTE-522: Phase III study of pembrolizumab (pembro) + chemotherapy (chemo) vs placebo (pbo) + chemo as neoadjuvant treatment, followed by pembro vs pbo as adjuvant treatment for early triple-negative breast cancer (TNBC). *Annals of Oncology*. 2019;30.
8. Krystel-Whittemore M, Xu J, Brogi E, Ventura K, Patil S, Ross DS, Dang C, Robson M, Norton L, Morrow M, Wen HY. Pathologic complete response rate according to HER2 detection methods in HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant systemic therapy. Vol. 177, *Breast Cancer Research and Treatment*. 2019.
9. Chen X, He C, Han D, Zhou M, Wang Q, Tian J, Li L, Xu F, Zhou E, Yang K. The predictive value of Ki-67 before neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: A systematic review and meta-analysis. Vol. 13, *Future Oncology*. 2017.
10. Goorts B, van Nijnatten TJA, de Munck L, Moosdorff M, Heuts EM, de Boer M, Lobbes MBI, Smidt ML. Clinical tumor stage is the most important predictor of pathological complete response rate after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2017 May 15;163(1):83–91.
11. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, Budczies J, Huober J, Klauschen F, Furlanetto J, Schmitt WD, Blohmer JU, Karn T, Pfitzner BM, Kümmel S, Engels K, Schneeweiss A, Hartmann A, Noske A, Fasching PA, Jackisch C, van Mackelenbergh M, Sinn P, Schem C, Hanusch C, Untch M, Loibl S. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol*. 2018;19(1).
12. Keskin S, Muslumanoglu M, Saip P, Karanlık H, Guveli M, Pehlivan E, Aydoğan F, Eralp Y, Aydiner A, Yavuz E, Ozmen V, Igci A, Topuz E. Clinical and pathological features of breast cancer associated with the pathological complete response to anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy. *Oncology*. 2011;81(1):30–8.
13. Loibl S, Treue D, Budczies J, Weber K, Stenzinger A, Schmitt WD, Weichert W, Jank P, Furlanetto J, Klauschen F, Karn T, Pfarr N, von Minckwitz G, Möbs M, Jackisch C, Sers C, Schneeweiss A, Fasching PA, Schem C, Hummel M, van Mackelenbergh M, Nekljudova V, Untch M, Denkert C. Mutational diversity and therapy response in breast cancer: A sequencing analysis in the neoadjuvant geparsepto trial. *Clinical Cancer Research*. 2019;25(13).

14. Chaudry M, Lei X, Gonzalez-Angulo AM, Mittendorf EA, Valero V, Tripathy D, Hortobagyi GN, Chavez-MacGregor M. Recurrence and survival among breast cancer patients achieving a pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;153(2).
15. Xie LY, Wang K, Chen HL, Shi YX, Zhang YQ, Lin HY, Liang YK, Xiao YS, Wu ZY, Yuan ZY, Qiu SQ. Markers Associated With Tumor Recurrence in Patients With Breast Cancer Achieving a Pathologic Complete Response After Neoadjuvant Chemotherapy. *Front Oncol.* 2022;12:860475.
16. Asaoka M, Narui K, Suganuma N, Chishima T, Yamada A, Sugae S, Kawai S, Uenaka N, Teraoka S, Miyahara K, Kawate T, Sato E, Nagao T, Matsubara Y, Gandhi S, Takabe K, Ishikawa T. Clinical and pathological predictors of recurrence in breast cancer patients achieving pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy. *European Journal of Surgical Oncology.* 2019;45(12).
17. Weiss A, Bashour SI, Hess K, Thompson AM, Ibrahim NK. Effect of neoadjuvant chemotherapy regimen on relapse-free survival among patients with breast cancer achieving a pathologic complete response: An early step in the de-escalation of neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Research.* 2018;20(1).
18. Bruzas S, Gluz O, Harbeck N, Schmid P, Cortés J, Blohmer J, Seiberling C, Chiari O, Harrach H, Ataseven B, Shenoy S, Dyson MH, Traut E, Theuerkauf I, Gebauer D, Kuemmel S, Reinisch M. Gene signatures in patients with early breast cancer and relapse despite pathologic complete response. *NPJ Breast Cancer.* 2022;8(1).
19. Allison KH, Hammond MEH, Dowsett M, McKernin SE, Carey LA, Fitzgibbons PL, Hayes DF, Lakhani SR, Chavez-MacGregor M, Perlmutter J, Perou CM, Regan MM, Rimm DL, Symmans WF, Torlakovic EE, Varella L, Viale G, Weisberg TF, McShane LM, Wolff AC. Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update. *J Clin Oncol.* 2020;38(12):1346–66.
20. NanoString Technologies, Inc. nCounter breast cancer 360™ panel Internetseite. <https://www.nanostring.com/products/gene-expression-panels/gene-expression-panels-overview/ncounter-breast-cancer-360-panel>.
21. Park IA, Hwang SH, Song IH, Heo SH, Kim YA, Bang WS, Park HS, Lee M, Gong G, Lee HJ. Expression of the MHC class II in triple-negative breast cancer is associated with tumor-infiltrating lymphocytes and interferon signaling. *PLoS One.* 2017;12(8).

22. Mortara L, Castellani P, Meazza R, Tosi G, de Lerma Barbaro A, Procopio FA, Comes A, Zardi L, Ferrini S, Accolla RS. CIITA-induced MHC class II expression in mammary adenocarcinoma leads to a Th1 polarization of the tumor microenvironment, tumor rejection, and specific antitumor memory. *Clinical Cancer Research*. 2006;12(11 I).
23. Axelrod ML, Cook RS, Johnson DB, Balko JM. Biological consequences of MHC-II expression by tumor cells in cancer. Vol. 25, *Clinical Cancer Research*. 2019.
24. Heimes AS, Härtner F, Almstedt K, Krajinak S, Lebrecht A, Battista MJ, Edlund K, Brenner W, Hasenburg A, Sahin U, Gehrman M, Hengstler JG, Schmidt M. Prognostic Significance of Interferon- γ and Its Signaling Pathway in Early Breast Cancer Depends on the Molecular Subtypes. *Int J Mol Sci*. 2020 Sep 29;21(19).
25. Stewart RL, Updike KL, Factor RE, Henry NL, Boucher KM, Bernard PS, Varley KE. A multigene assay determines risk of recurrence in patients with triple-negative breast cancer. *Cancer Res*. 2019;79(13).
26. Telli ML, Hellyer J, Audeh W, Jensen KC, Bose S, Timms KM, Gutin A, Abkevich V, Peterson RN, Neff C, Hughes E, Sangale Z, Jones J, Hartman AR, Chang PJ, Vinayak S, Wenstrup R, Ford JM. Homologous recombination deficiency (HRD) status predicts response to standard neoadjuvant chemotherapy in patients with triple-negative or BRCA1/2 mutation-associated breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2018;168(3).
27. Denkert C, Untch M, Benz S, Schneeweiss A, Weber KE, Schmatloch S, Jackisch C, Sinn HP, Golovato J, Karn T, Marmé F, Link T, Budczies J, Nekljudova V, Schmitt WD, Stickeler E, Müller V, Jank P, Parulkar R, Heinmöller E, Sanborn JZ, Schem C, Sinn B v., Soon-Shiong P, van Mackelenbergh M, Fasching PA, Rabizadeh S, Loibl S. Reconstructing tumor history in breast cancer: signatures of mutational processes and response to neoadjuvant chemotherapy*. *Annals of Oncology*. 2021;32(4).
28. Sharma P, Barlow WE, Godwin AK, Pathak H, Isakova K, Williams D, Timms KM, Hartman AR, Wenstrup RJ, Linden HM, Tripathy D, Hortobagyi GN, Hayes DF. Impact of homologous recombination deficiency biomarkers on outcomes in patients with triple-negative breast cancer treated with adjuvant doxorubicin and cyclophosphamide (SWOG S9313). *Annals of Oncology*. 2018 Mar;29(3):654–60.
29. Kleffel S, Schatton T. Tumor dormancy and cancer stem cells: two sides of the same coin? *Adv Exp Med Biol*. 2013;734.

30. Honeth G, Bendahl PO, Ringnér M, Saal LH, Gruvberger-Saal SK, Lövgren K, Grabau D, Fernö M, Borg Å, Hegardt C. The CD44+/CD24-phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Research*. 2008;10(3).
31. Azzi S, Hebda JK, Gavard J. Vascular permeability and drug delivery in cancers. *Front Oncol*. 2013;3 AUG.
32. Mohammed RAA, Ellis IO, Mahmmud AM, Hawkes EC, Green AR, Rakha EA, Martin SG. Lymphatic and blood vessels in basal and triple-negative breast cancers: Characteristics and prognostic significance. *Modern Pathology*. 2011;24(6).
33. Denkert C, Loibl S, Müller BM, Eidtmann H, Schmitt WD, Eiermann W, Gerber B, Tesch H, Hilfrich J, Huober J, Fehm T, Barinoff J, Jackisch C, Prinzler J, Rüdiger T, Erbstößer E, Blohmer JU, Budczies J, Mehta KM, von Minckwitz G. Ki67 levels as predictive and prognostic parameters in pretherapeutic breast cancer core biopsies: A translational investigation in the neoadjuvant gepartrio trial. *Annals of Oncology*. 2013;24(11).
34. Xia Y, He X, Renshaw L, Martinez-Perez C, Kay C, Gray M, Meehan J, Parker JS, Perou CM, Carey LA, Dixon JM, Turnbull A. Integrated DNA and RNA Sequencing Reveals Drivers of Endocrine Resistance in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2022 Jun 2;
35. Okegawa T, Pong RC, Li Y, Hsieh JT. The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. *Acta Biochim Pol*. 2004;51(2):445–57.
36. Fang J, Chen F, Liu D, Gu F, Chen Z, Wang Y. Prognostic value of immune checkpoint molecules in breast cancer. *Biosci Rep*. 2020 Jul 31;40(7).
37. Cortes J, Cescon DW, Rugo HS, Nowecki Z, Im SA, Yusof MM, Gallardo C, Lipatov O, Barrios CH, Holgado E, Iwata H, Masuda N, Otero MT, Gokmen E, Loi S, Guo Z, Zhao J, Aktan G, Karantza V, Schmid P, Luis F, Gonzalo GA, Diego K, Ruben K, Matias M, Mirta V, Sally BH, Stephen B, Philip C, Sherene L, Dhanusha S, Andrea G, Donatienne T, Carlos B, Leandro B, Fabiano C, Ruffo de FJ, Roberto H, Domicio Carvalho L, Fernando Cezar Toniuzzi L, Roberto Odebrecht R, Antonio Orlando SN, Felipe S, David C, Danielle C, Cristiano F, Xinni S, Joanne Y, Alejandro A, Carlos G, Claudio S, Cesar S, Eduardo Y, Alvaro GD, Jesus S, Petra H, Zdenek K, Bohuslav M, Katarina P, Jana P, Vesna G, Erik J, Jeanette J, Soren L, Tamas L, Herve B, Isabelle D, Anthony G, Anne-Claire HB, Luis T, Jens-Uwe B,

- Peter F, Dirk F, Nadia H, Jens H, Anna KF de S, Christian K, Sibylle L, Diana L, Tjoung-Won PS, Raquel Von S, Pauline W, Louis C, Ava K, Kai Cheong Roger N, Peter A, Tibor C, Zsuzsanna K, Laszlo L, Karoly M, Gabor R, John C, Catherine K, Seamus O, Saverio C, Antonietta Da, Enrico R, Tomoyuki A, Takaaki F, Kenichi I, Takashi I, Yoshinori I, Tsutomu I, Hiroji I, Yoshimasa K, Koji M, Yasuo M, Hirofumi M, Seigo N, Naoki N, Shoichiro O, Akihiko O, Yasuaki S, Eiji S, Masato T, Yuko T, Kenji T, Koichiro T, Junichiro W, Naohito Y, Yutaka Y, Teruo Y, Anita B, Mastura MY, Angel GV, Alejandro JR, Jorge MR, Flavia MV, Jessica RC, Karin B, Vivianne TH, David P, Ewa C, Ewa NZ, Zbigniew N, Barbara R, Joanna S, Cezary S, Rafal T, Bogdan Z, Alexander A, Natalia F, Oleg L, Andrey M, Vladimir M, Guzel M, Jin Hee A, Seock-Ah I, Keun Seok L, Kwong Hwa P, Yeon Hee P, Begona B de las H, Javier C, Josefina CJ, Luis de la CM, Jose GS, Maria G, Esther H, Esther ZA, Chien-Ting L, Mei-Ching L, Chiun-Sheng H, Chao-Jung T, Ling-Ming T, Cagatay A, Gul B, Irfan C, Erhan G, Seyda G, Nil MM, Mustafa O, Ozgur O, Sinan Y, Steve C, Janine G, Iain M, Peter S, Nicholas T, Mark T, Christopher T, Duncan W, Hryhoriy A, Oleksandr B, Igor B, Oleksii K, Olena K, Hanna K, Anna K, Iurii L, Alla N, Natalya O, Olga P, Andrii R, Sergii S, Yaroslav S, Dmytro T, Grygorii U, Ihor V, Sibel B, Madhu C, Michael C, Patrick C, Scott C, Jennifer D, Keerthi G, Jeffrey H, Kent H, William I, Randa L, Janice L, Raul M, Susan M, Rita N, Ira O, Coral O, Timothy P, Amit P, Brian P, Hope R, Irina R, Michael S, Robert S, Michael S, Laura S, Bradley S, Michaela T, Frances VA. Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. *The Lancet*. 2020 Dec;396(10265):1817–28.
38. Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, Diéras V, Hegg R, Im SA, Shaw Wright G, Henschel V, Molinero L, Chui SY, Funke R, Husain A, Winer EP, Loi S, Emens LA. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2018 Nov 29;379(22):2108–21.
39. Schmid P, Cortes J, Dent R, Puzstai L, McArthur H, Kümmel S, Bergh J, Denkert C, Park YH, Hui R, Harbeck N, Takahashi M, Untch M, Fasching PA, Cardoso F, Andersen J, Patt D, Danso M, Ferreira M, Mouret-Reynier MA, Im SA, Ahn JH, Gion M, Baron-Hay S, Boileau JF, Ding Y, Tryfonidis K, Aktan G, Karantza V,

- O'Shaughnessy J. Event-free Survival with Pembrolizumab in Early Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2022 Feb 10;386(6):556–67.
40. Szekely B, Bossuyt V, Li X, Wali VB, Patwardhan GA, Frederick C, Silber A, Park T, Harigopal M, Pelekanou V, Zhang M, Yan Q, Rimm DL, Bianchini G, Hatzis C, Pusztai L. Immunological differences between primary and metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*. 2018 Nov;29(11):2232–9.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Simona Gipe (geb. Bruzas), versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Rezidiv nach pathologischer Komplettremission beim Mammakarzinom: Interindividuelle und intraindividuelle Analyse von Genexpressionsparametern (Relapse after pathologic complete response in breast cancer: interindividual and intraindividual analysis of gene expression parameters) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Simona Gipe (geb. Bruzas) hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation 1: Bruzas S, Gluz O, Harbeck N, Schmid P, Cortés J, Blohmer J, et al. Gene signatures in patients with early breast cancer and relapse despite pathologic complete response, *npj Breast Cancer*, 2022.

Beitrag im Einzelnen:

Entwicklung des Studiendesigns mit Unterstützung von ihrem Erstbetreuer Prof. Dr. med. S. Kümmel und PD Dr. med. M. Reinisch

Erstellung der Patienteneinwilligungserklärung und die Unterlagen für die Ethikkommission

Unterstützung bei der Einreichung der Studienunterlagen bei der Ethikkommission Nordrhein

Definieren der Ein- und Ausschlusskriterien

Aufklärung und Kommunikation mit den Patientinnen über die Teilnahme an der Studie

Bilden der Studienpatientengruppe aus der Datenbank der Kliniken Essen-Mitte

Definieren der Matching-Kriterien und Erstellen der 1:3 gematchten Kohorte aus der Datenbank des Frauenkrebszentrums der Kliniken Essen-Mitte

Definieren der Subgruppen in der inter- und intraindividuellen Analyse

Anforderung der zu untersuchenden FFPE-Proben des Primarius und des Tumors von Rezidiv/Metastase

Teilnahme an der Verarbeitung des Tumormaterials und RNA-Analyse des Tumormaterials mit nCounter® Breast Cancer 360 Panel

Teilnahme an der statistischen Auswertung der Ergebnisse

Schreiben des Manuskripts. Abbildungen 1 und 2 sowie Tabelle 1 hat Frau Gipe selbständig erstellt mit Hilfe von Powerpoint und Excel sowie Online-Generator für Sankey-Diagramm, Abbildungen 3, 4, 5 und 6 wurden unter der Leitung von Frau Gipe erstellt mit Hilfe von Prism-Statistiksoftware nach vorheriger dezidierter Diskussion der Ergebnisse und Beratung über die möglichen Darstellungsoptionen. Hier hat sie Hilfe von Herrn Traut, Koautor des Papers, bekommen. Bei der selbstständigen Interpretation und Beschreibung aller Ergebnisse hat sie Unterstützung von Prof. Dr.med. S. Kümmel, Prof. Dr. med. J.-U. Blohmer und PD Dr. med. M. Reinisch (Koautoren der Publikation) bekommen. Dr. Mark Dyson und Satyendra Shenoy haben sie bei der Erstellung der Entwürfe des Manuskripts und Übertragung ins muttersprachliche Englisch sowie bei der Auswahl der Darstellungsoptionen unterstützt. Alle Autoren haben zu der Durchführung der Studie, Datenanalyse und Erstellung der Entwürfe des Manuskripts mit ihren Einblicken und Kommentaren beigetragen.

Literaturrecherche

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2020** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"ONCOLOGY"** Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 242 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	CA-A CANCER JOURNAL FOR CLINICIANS	55,868	508.702	0.105140
2	Nature Reviews Clinical Oncology	17,973	66.675	0.038760
3	NATURE REVIEWS CANCER	62,391	60.716	0.059170
4	JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY	189,443	44.544	0.249030
5	LANCET ONCOLOGY	72,804	41.316	0.138530
6	Cancer Discovery	27,030	39.397	0.072460
7	ANNALS OF ONCOLOGY	61,542	32.976	0.117180
8	JAMA Oncology	22,382	31.777	0.080430
9	CANCER CELL	50,839	31.743	0.081040
10	Molecular Cancer	24,931	27.401	0.030030
11	Journal of Hematology & Oncology	10,615	17.388	0.018360
12	SEMINARS IN CANCER BIOLOGY	11,552	15.707	0.012110
13	Journal of Thoracic Oncology	24,405	15.609	0.042780
14	Trends in Cancer	4,237	14.226	0.012440
15	Journal for ImmunoTherapy of Cancer	11,042	13.751	0.028830
16	JNCI-Journal of the National Cancer Institute	42,005	13.506	0.038260
17	CANCER RESEARCH	159,236	12.701	0.105150
18	CLINICAL CANCER RESEARCH	105,958	12.531	0.131040
19	NEURO-ONCOLOGY	17,812	12.300	0.029210
20	CANCER TREATMENT REVIEWS	11,834	12.111	0.016910

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
21	Journal of the National Comprehensive Cancer Network	10,050	11.908	0.021920
22	Liver Cancer	1,579	11.740	0.002800
23	LEUKEMIA	34,181	11.528	0.045940
24	Clinical and Translational Medicine	2,201	11.492	0.003110
25	JOURNAL OF EXPERIMENTAL & CLINICAL CANCER RESEARCH	16,717	11.161	0.023310
26	Cancer Immunology Research	11,185	11.151	0.027290
27	Blood Cancer Journal	4,691	11.037	0.011440
28	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-REVIEWS ON CANCER	7,025	10.680	0.007000
29	Cancer Communications	1,307	10.392	0.002530
30	ONCOGENE	77,576	9.867	0.059180
31	Annual Review of Cancer Biology-Series	703	9.391	0.002910
32	CANCER AND METASTASIS REVIEWS	7,809	9.264	0.006010
33	EUROPEAN JOURNAL OF CANCER	40,294	9.162	0.046490
34	CANCER LETTERS	42,174	8.679	0.040130
35	npj Precision Oncology	931	8.254	0.002500
36	Therapeutic Advances in Medical Oncology	3,021	8.168	0.005350
37	Oncolmmunology	14,987	8.110	0.030230
38	JOURNAL OF PATHOLOGY	22,441	7.996	0.017610
39	BRITISH JOURNAL OF CANCER	54,924	7.640	0.042070
40	Oncogenesis	4,065	7.485	0.008320
41	European Urology Oncology	1,413	7.479	0.004350

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
42	INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER	64,014	7.396	0.059180
43	Gastric Cancer	7,698	7.370	0.011490
44	Molecular Therapy-Oncolytics	1,582	7.200	0.002970
45	INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS	50,525	7.038	0.039410
46	CANCER IMMUNOLOGY IMMUNOTHERAPY	11,382	6.968	0.012190
47	npj Breast Cancer	1,236	6.923	0.004060
48	CANCER	79,706	6.860	0.059500
49	CELLULAR ONCOLOGY	2,462	6.730	0.002430
50	CANCER SCIENCE	18,834	6.716	0.020010
51	Cancers	28,128	6.639	0.039860
52	Molecular Oncology	8,378	6.603	0.012250
53	Clinical Epigenetics	5,526	6.551	0.011550
54	ESMO Open	2,452	6.540	0.006880
55	Translational Lung Cancer Research	3,169	6.498	0.006560
56	BREAST CANCER RESEARCH	13,841	6.466	0.013840
57	CRITICAL REVIEWS IN ONCOLOGY HEMATOLOGY	10,934	6.312	0.014090
58	RADIOTHERAPY AND ONCOLOGY	22,462	6.280	0.024940
59	STEM CELLS	23,967	6.277	0.017860
60	MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS	23,832	6.261	0.024000
61	JACC: CardioOncology	267	6.250	0.000230
62	Frontiers in Oncology	24,690	6.244	0.040290
63	Advances in Cancer Research	3,144	6.242	0.002690

Druckexemplar der Publikation

ARTICLE OPEN



Gene signatures in patients with early breast cancer and relapse despite pathologic complete response

Simona Bruzas¹, Oleg Gluz^{2,3}, Nadia Harbeck⁴, Peter Schmid⁵, Javier Cortés^{6,7,8,9}, Jens Blohmer¹⁰, Christine Seiberling¹, Ouafaa Chiari¹, Hakima Harrach¹, Beyhan Ataseven^{1,11}, Satyendra Shenoy¹, Mark H. Dyson¹, Eugen Traut¹, Ingo Theuerkauf¹², Daniel Gebauer¹², Sherko Kuemmel^{1,10} and Mattea Reinisch¹✉

A substantial minority of early breast cancer (EBC) patients relapse despite their tumors achieving pathologic complete response (pCR) after neoadjuvant therapy. We compared gene expression (BC360; nCounter[®] platform; NanoString) between primary tumors of patients with post-pCR relapse ($N = 14$) with: (i) matched recurrent tumors from same patient (intraindividual analysis); and (ii) primary tumors from matched controls with pCR and no relapse ($N = 41$; interindividual analysis). Intraindividual analysis showed lower estrogen receptor signaling signature expression in recurrent tumors versus primaries ($\log_{2}FC = -0.595$; $P = 0.022$). Recurrent tumors in patients with distant metastases also exhibited reduced expression of immune-related expression parameters. In interindividual analyses, primary tumor major histocompatibility complex II expression was lower versus controls in patients with any relapse ($\log_{2}FC = -0.819$; $P = 0.030$) or distant relapse ($\log_{2}FC = -1.151$; $P = 0.013$). Primaries with later distant relapse also had greater homologous recombination deficiency than controls ($\log_{2}FC = 0.649$; $P = 0.026$). Although no associations remained statistically significant following adjustment for false discovery rate, our results show that transcriptomic analyses have potential for prognostic value and may help in selecting optimal treatment regimens for EBC at risk of relapse and warrant further investigation.

npj Breast Cancer (2022)8:42; <https://doi.org/10.1038/s41523-022-00403-3>

INTRODUCTION

The management paradigm for early breast cancer (EBC) is shifting away from adjuvant treatment towards neoadjuvant strategies as a standard of care for patients with more aggressive subtypes¹. Originally used for downstaging locally advanced tumors, neoadjuvant systemic therapy (NST) has established benefits in improving surgical outcomes by increasing operability, facilitating breast-conserving surgery, and reducing the extent of lymph node resection^{2,3}. Furthermore, NST enables in vivo chemosensitivity testing to inform about prognostication and guide subsequent treatment decisions based on individual response⁴. The overall prognosis in patients who attain pathologic complete response (pCR) is exceptional⁵ and the highest pCR rates are observed in patients with triple-negative breast cancer (TNBC) and human epidermal growth factor receptor-2 (HER2)-positive subtypes; in whom the association between pCR and improved outcomes is also strongest^{5,6}. Meanwhile, for patients not achieving pCR, a new model of post-neoadjuvant treatment escalation is emerging⁷, with recent trials demonstrating benefit in this setting for adjuvant capecitabine for TNBC and trastuzumab emtansine for HER2-positive disease^{8,9}.

Despite the positive prognostic impact of invasive disease eradication, a significant minority of patients with pCR following NST ultimately relapse¹⁰. In a large analysis conducted by the German Breast Group on a database which included 2188 patients with pCR from five neoadjuvant trials, the rate of disease-free survival (DFS) at 5 years was reported to be 87%¹¹. Similarly, a recent meta-analysis reported a 5-year event-free survival (EFS) of

88% among 5748 pCR-attaining patients from clinical trials or cohort studies⁵. In that analysis, 5-year EFS in patients with pCR was lower in TNBC (90%) or HER2-positive subtypes (86%) than in hormone receptor (HR)-positive disease (97%). Relapse risk in patients with pCR has been associated with several clinicopathologic and demographic variables, including more advanced primary tumor or nodal stage, HER2-positivity, younger age, and premenopausal status^{10–14}. However, it is not currently possible to reliably predict post-pCR recurrence. Prospective identification of patients remaining at high risk despite pCR could enable targeted use of intensified post-neoadjuvant treatment and/or more stringent monitoring approaches.

It is clear that the molecular and immunologic characteristics of the breast tumor and its microenvironment are important determinants of both treatment response and prognosis⁷. In the neoadjuvant setting, pCR attainment is predicted by the degree of tumor lymphocyte infiltration¹⁵, as well as tumor transcriptomic features including intrinsic subtype and expression of genes involved in proliferation, immune regulation, and cell signaling^{7,16–18}. However, there are only limited data regarding the impact of such parameters on the risk of relapse in the context of pCR¹⁹.

With an intention of identifying transcriptomic changes associated with post-pCR recurrence, we compared the expression of an extensive panel of genes and gene signatures in matched primary and recurrent tumors from the same cohort of patients from our institutional database of >4500 breast cancer patients whose primary tumors had achieved pCR (intraindividual comparison).

¹Interdisciplinary Breast Unit, Kliniken Essen-Mitte, Essen, Germany. ²West German Study Group, Moenchengladbach, Germany. ³Breast Center Niederrhein, Evangelical Hospital Bethesda, Moenchengladbach, Germany. ⁴Breast Center, Dept. OB&GYN and CCCLMU, University of Munich (LMU), Munich, Germany. ⁵Barts Cancer Institute, Queen Mary University London, London, United Kingdom. ⁶International Breast Cancer Centre (IBCC), Quiron Group, Barcelona, Spain. ⁷Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), Barcelona, Spain. ⁸Medica Scientia Innovation Research (MEDSIR), Barcelona, Spain. ⁹Medica Scientia Innovation Research (MEDSIR), Ridgewood, NJ, USA. ¹⁰Klinik für Gynäkologie mit Brustzentrum, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany. ¹¹Clinic for Gynecology and Gynecological Oncology, Kliniken Essen-Mitte, Essen, Germany. ¹²Institut für Pathologie Viersen, Viersen, Germany. ✉email: M.Reinisch@kem-med.com

In addition, we also assessed differential gene expression between the primary tumors from these patients and the primary tumors from matched controls with pCR who did not relapse (interindividual comparison).

RESULTS

Patient population

From a total of 4616 primary breast cancer patients in our database we identified 1450 EBC patients who had received NST prior to surgery (Fig. 1). The tumors in approximately half of these patients ($n = 672$, 46.3%) demonstrated pCR regardless of the breast cancer subtype. The rate of relapse in patients whose tumors experienced pCR was 9.7% ($n/N = 65/672$). After further shortlisting of patients as described in the “Methods” section, tumor samples from a total of 14 patients (primary and recurrent tumor) and 41 matched controls (primary tumor) were sent to NanoString Technologies Germany GmbH (Hamburg, Germany) for transcriptomic analysis using the BC360 panel.

Patient and control characteristics are described in Table 1. In both groups, the majority were node-positive and presented with grade 3, stage T1–T2 tumors at the time of diagnosis. According to immunohistochemical analysis, these tumors were classified as—HR-positive HER2-negative ($n = 4$, 28.6%), HER2-positive ($n = 5$, 35.7%), and TNBC ($n = 5$, 35.7%) (Table 1). In patients whose tumors had *gBRCA1* mt status ($n = 2$), the primary tumors were estrogen receptor (ER)-low positive (<10%)/progesterone receptor (PR)-negative in one case and ER-negative/PR-positive in the other.

Median time from diagnosis to any relapse was 23.5 months (range: 9.0–75.0). The most common sites of recurrence were lymph nodes (regional and distant; $n = 7$; 50.0%), breast ($n = 6$; 42.9%), brain ($n = 4$, 28.6%), liver ($n = 4$, 28.6%), and lung ($n = 4$, 28.6%). A total of eight patients (57.1%) relapsed with distant metastases.

Since only 2 (instead of 3, as was the case for others) matched controls were available for one of the patients with relapse (who had TNBC), the control cohort comprised tumors from 41 patients with pCR and no relapse. Matched controls for the two relapsed

patients whose tumors were *gBRCA1* mt included four patients with tumors that had TNBC/*gBRCA1* wt status, due to limited availability of non-relapsed *gBRCA1* mt controls and the clinical similarity between TNBC and *gBRCA* mt.

Gene expression analysis

A total of 69 RNA samples were analyzed: 14 primary and 14 recurrent tumors from patients with post-pCR relapse, and 41 primary tumors from controls without relapse. Gene expression analysis failed to meet quality control criteria for one sample (a primary tumor from a control matched to a patient with TNBC/*gBRCA1* wt tumor and local recurrence only), providing available data for 68 tumor samples (98.6%). Subgroup assessments for patients with available gene expression data are indicated in Table 1.

Intrinsic subtype analyses

Intrinsic subtype of patients’ tumors ($N = 14$) according to PAM50 analysis of the BC360 panel was—luminal B in one (7.1%) patient, HER2-enriched in four (28.6%) patients, and basal-like in nine (64.3%) patients. Intrinsic subtype differed between primary and recurrent tumors in four (28.6%) patients (Fig. 2a). Of those, two were TNBC which converted from basal-like primaries to luminal A recurrent tumors. One patient with HER2-positive disease had a HER2-enriched primary tumor and a basal-like recurrence, while one patient with HER2-positive tumor had a luminal B primary and HER2-enriched recurrence. The intrinsic subtype was basal-like for both the primary as well as recurrent tumors in the two patients who were *gBRCA* mt indicating that tumors harboring *gBRCA* mutations behave fundamentally similar to TNBC despite some ER or PR expression. In contrast, comparison of the immunohistochemical analysis of the primary tumors to their corresponding recurrent tumors showed an entirely different pattern (Fig. 2b). In this case, while all patients with HER-positive primary tumors presented with HER-positive recurrences, a substantial proportion of patients with HR-positive primary tumors relapsed with TNBC tumors.

In controls with pCR and no relapse, intrinsic subtype of tumors ($N = 40$) was luminal A in two patients (5.0%), luminal B in four

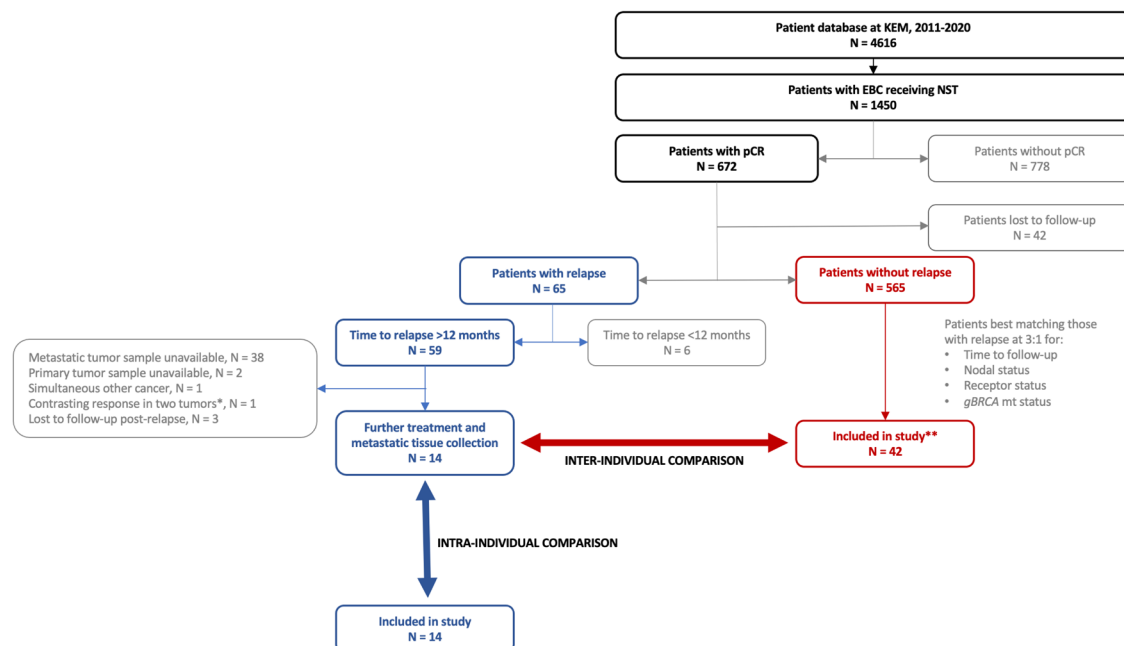


Fig. 1 Flowchart identifying patient and control selection. *Two primaries in the same breast, one relapsed while the other showed continued pCR. **A total of 42 controls were identified but immunohistochemical analysis failed in one control. Abbreviations: EBC early breast cancer, KEM Kliniken Essen-Mitte, NST neoadjuvant systemic therapy, pCR pathologic complete response.

Table 1. Patient characteristics.

	Patients with relapse despite pCR (N = 14)	Controls with pCR and no relapse (N = 41)
Median (range) age, years	47.5 (24–73)	49 (32–78)
<i>Nodal involvement^a, n (%)</i>		
Node-positive	8 (57.1)	23 (56.1)
Node-negative	6 (42.9)	18 (43.9)
<i>Tumor stage^a, n (%)</i>		
T1	7 (50.0)	16 (39.0)
T2	5 (35.7)	20 (48.8)
T3	1 (7.1)	3 (7.3)
T4	1 (7.1)	2 (4.9)
<i>Relapse, n (%)</i>		
Local	6 (42.9)	-
Distant	8 (57.1)	-
<i>Receptor status, n (%)</i>		
HR-positive HER2-negative	4 (28.6) ^b	12 (29.3)
HER2-positive	5 (35.7)	15 (36.6)
TNBC ^{c,d}	5 (35.7)	14 (34.2) ^e
<i>Grade, n (%)</i>		
1	-	-
2	2 (14.3)	3 (7.3)
3	12 (85.7)	38 (92.7)
Median (range) Ki-67 index, %	60 (15–90)	50 (10–90)
<i>Neoadjuvant treatment, n (%)</i>		
Anthracycline	13 (92.9)	37 (90.2)
Taxane	14 (100.0)	41 (100.0)
Carboplatin	6 (42.9)	12 (29.3)
Anti-HER2 directed therapy	5 (35.7)	15 (36.6)
<i>Adjuvant treatment^f, n (%)</i>		
Endocrine therapy	9 (64.3)	19 (46.3)
Anti-HER2-therapy	5 (35.7)	15 (36.6)

^aData on nodal involvement and tumor stage are pre-NST.

^bIncludes two patients with *gBRCA* mt. Primary tumor of one patient was ER-low PR-negative and of the other patient was ER-negative PR-positive and hence assigned HR-positive as per American Society of Clinical Oncology guidelines.

^cOnly two controls were available for a patient with triple-negative breast cancer and distant recurrence.

^dGene expression analysis failed for a control matched to a patient with triple-negative breast cancer and local recurrence.

^eImmunohistochemical evaluation failed for one control matched to a patient with triple-negative breast cancer.

^fGroups not exclusive, i.e., patients could have received both treatment regimens.

Abbreviations: ER estrogen receptor, *gBRCA1* germline *BRCA1*, *HER2* human epidermal growth factor receptor 2, *HR* hormone receptor, *mt* mutation, *pCR* pathologic complete response, *PR* progesterone receptor, *TNBC* triple-negative breast cancer.

patients (10.0%), HER2-enriched in 14 patients (35.0%) and basal-like in 20 patients (50.0%) (Fig. 2c). As matching was done according to immunohistochemistry (IHC) and nodal status, primary tumors from patients and their matched controls had the same IHC. Primary tumor intrinsic subtype in controls was the same as that of their matched patient in 28/40 cases (70.0%). This disparity can be attributed to matching tumors from patients to those in control using classical IHC analyses prior to intrinsic subtyping using the BC360 panel.

Interindividual comparison

Primary tumor expression of major histocompatibility complex-class II (MHC-II) molecules was significantly lower in the tumors of patients who later relapsed despite pCR compared with controls (Fig. 3a). This difference appeared more pronounced in tumors from patients with distant relapse (Fig. 3b). Patients with distant relapse also showed a trend for decreased interferon gamma (IFN γ) signaling (logFC = -0.759; 95% confidence interval (CI): -1.534 to 0.172; *P* = 0.055) and significantly higher homologous recombination deficiency (HRD) signature expression in the primary tumor versus controls (Fig. 3c; Supplementary Table S1).

Several other differences were observed between primary tumors from patients with any relapse despite pCR and controls in subgroup analyses. In patients with HER2-positive tumors, proliferation score was significantly higher versus controls (Fig. 4a). In patients with TNBC and relapse, tumor expression of endothelial cell signature, mammary stemness signature, and PR gene was significantly greater than in controls (Fig. 4b–d). *P* values in interindividual analyses were not significant after false detection rate (FDR) adjustment (Supplementary Tables S1 and S2).

Intraindividual comparison

Compared with primary tumors, post-pCR recurrences had significant downregulation of ER signaling signature expression (Fig. 5a). This effect was also seen when the analysis was restricted to distant recurrences (Fig. 5b), which additionally showed lower expression of genes or signatures for apoptosis, CD8+ T-cells, IFN γ signaling, stromal cells, T-cell immunoreceptor with immunoglobulin and immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif domains (TIGIT), and regulatory T cells (T_{reg}), relative to the primary tumor (Fig. 5c–h; Supplementary Table S3).

Significant differences were also observed in subgroup analyses conducted irrespective of the site(s) of recurrence according to the pathologic classification of the primary tumor. *ESR1* was downregulated in recurrent tumors in the HER2-positive subgroup (Fig. 6a), along with decreases in genes coding the phosphatase and tensin homolog, a tumor suppressor (Fig. 6b) and transforming growth factor- β (TGF β) (Fig. 6c), a multifunctional cytokine. In the TNBC subgroup, expression of both TGF β and the stromal cell signature were downregulated in the recurrent tumor (Fig. 6d, e). *P* values in intraindividual analyses were not significant after FDR adjustment (Supplementary Tables S3 and S4).

DISCUSSION

Despite a strong favorable prognosis following pCR, there is an unmet need for biomarkers to identify the substantial minority of EBC patients who are still at a risk of relapse. To our knowledge, ours is the first such study investigating the association between gene expression with both tumor evolution at relapse (intraindividual analysis) and relapse risk (interindividual analysis). Using a transcriptomic approach, our analysis of >4500 patients with primary breast cancer in our institute's database, of whom approximately 10% experienced relapse post pCR, was able to detect differential expression of several key pathways mediating tumor biology and progression such as antitumor immunity, DNA damage response, stromal factors, hormonal signaling, and tumor regulation.

The interaction between the breast tumor and the immune system plays a key role in shaping the course and outcome of the disease²⁰. MHC-II is an important driver of immune activation which further leads to an increase in tumor response^{21–24}. Various studies have identified a correlation between lowered MHC-II expression and reduced tumor lymphocyte infiltration, greater lymphovascular invasion, and poor outcome in patients with TNBC treated with or without adjuvant chemotherapy^{23–25}. Attenuated MHC-II expression is expected to limit activation of CD4+ T cells,

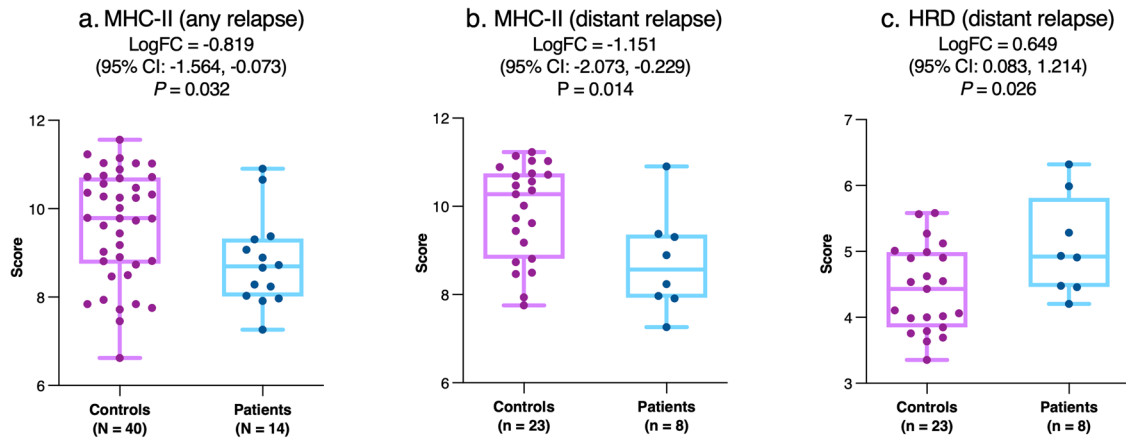


Fig. 3 Interindividual comparison of primary tumor gene expression between patients with relapse despite pCR and controls with pCR and no relapse. Data are shown for MHC-II (a, b) and HRD (c) signature expression for the overall cohort (a) and for the distant relapse subgroup (b, c). The central line indicates the median, the box indicates the 25th and 75th percentiles and the whiskers indicate the range. Circles represent individual data points. Negative values for logFC indicate lower expression in patients with relapse versus controls. Abbreviations: CI confidence interval, HRD homologous recombination deficiency; logFC \log_2 -fold change, MHC-II major histocompatibility complex-class II.

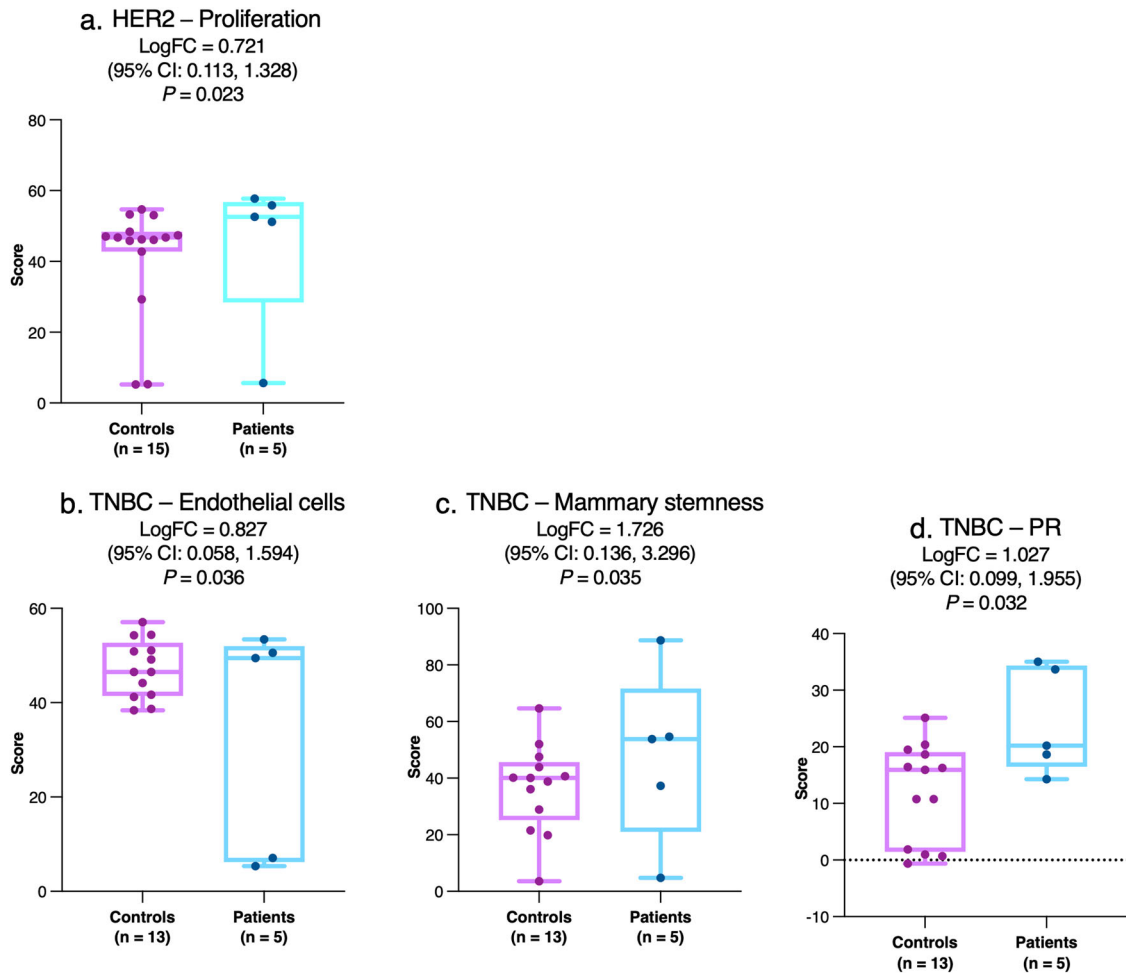


Fig. 4 Interindividual comparison of primary tumor gene expression between patients and matched controls with HER2-positive disease or TNBC. For the HER2 subgroup, data are shown for proliferation (a) while for the TNBC subgroup, data are shown for endothelial cell activation (b), mammary stemness (c), and progesterone receptor (d). The central line indicates the median, the box indicates the 25th and 75th percentiles and the whiskers indicate the range. Circles represent individual data points. Negative values for logFC indicate lower expression in patients with relapse versus controls. Abbreviations: CI confidence interval, HER2 human epidermal growth factor receptor 2, logFC \log_2 -fold change, PR progesterone receptor, TNBC triple-negative breast cancer.

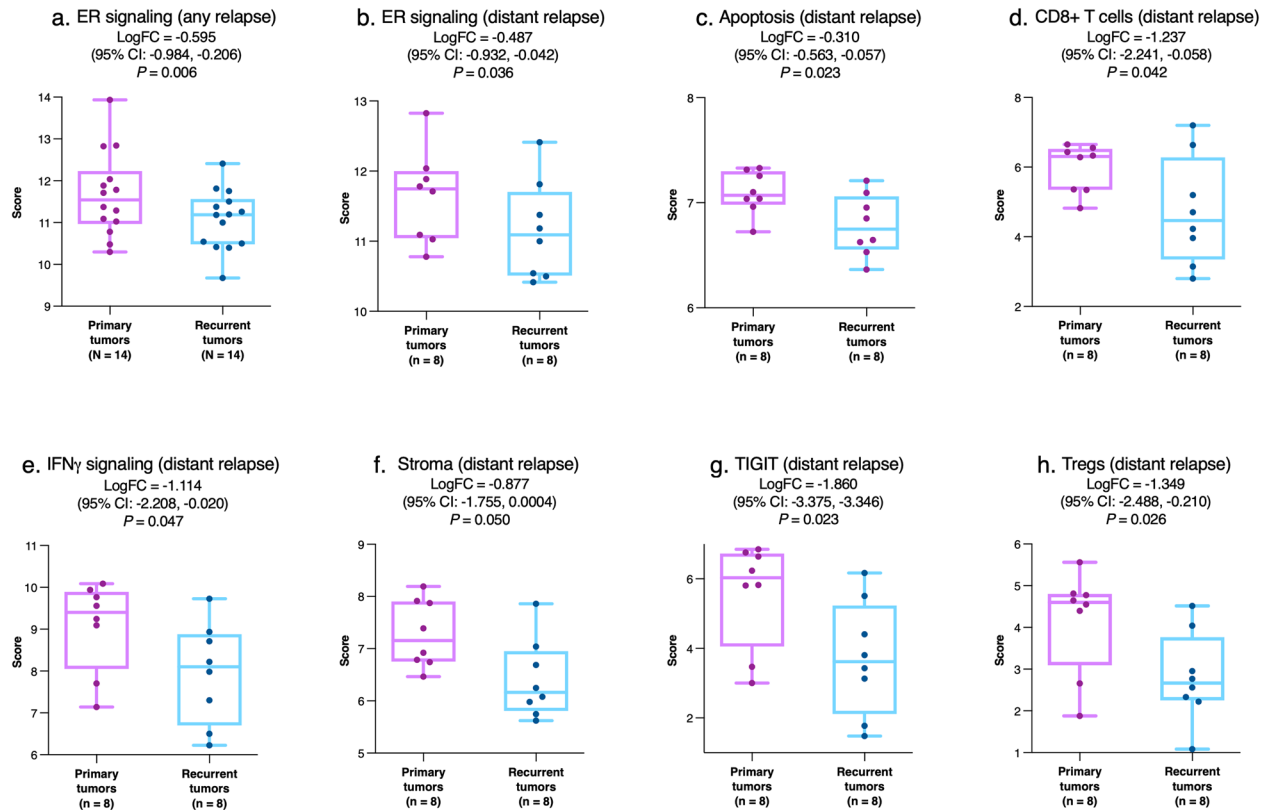


Fig. 5 Intra-individual comparison of gene expression between matched primary tumors and post-pCR recurrences. Data are shown for ER signaling (a, b), apoptosis (c), CD8⁺ T cells (d), IFN γ signaling (e), stroma (f), TIGIT (g), and Treg (h) signature expression for the overall cohort (a) and for the distant relapse subgroup (b–h). The central line indicates the median, the box indicates the 25th and 75th percentiles and the whiskers indicate the range. Circles represent individual data points. Negative values for logFC indicate lower expression in recurrent versus primary tumors. Abbreviations: CI confidence interval, ER estrogen receptor, IFN- γ interferon gamma, logFC log₂-fold change, TIGIT T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains, Tregs regulatory T-cells.

mutations in large proportion of TNBCs, Timms et al were the first to postulate that other breast cancer subtypes could also present defects in this pathway³¹ and hence a metric of HRD could be utilized for clinical assessment of treatment outcomes. A recent comparison of *BRCA*-positive tumors to *BRCA*-negative tumors also showed a higher HRD score in the former³². From a translational perspective, HRD status has also been shown to be predictive of achievement of pCR in patients with TNBC/*BRCA*-positive breast cancer³³ as well as those with HR-positive breast cancer³⁴.

Our interindividual analysis demonstrated higher primary tumor expression of endothelial cell and mammary stemness signatures than controls in patients with TNBC who subsequently relapsed (Fig. 4b, c). Detected by immunohistochemistry, both endothelial cells (reflected in microvessel density) and cancer stem cells are most abundant in TNBC and are poor prognostic factors^{35–37}. Cancer stem cells, in particular, are critical determinants of metastatic dissemination and treatment resistance, as underscored by their enrichment in occult metastatic lesions and residual disease post-therapy³⁸. In HER2-positive tumors we saw an association of higher pretherapeutic proliferation index with post-pCR recurrence. Greater baseline tumor proliferation, as reflected in Ki-67 positivity, has previously been associated with higher pCR rates across breast cancer subtypes, but its prognostic significance in the neoadjuvant setting may be dependent not only on subtype but also on pCR status³⁹.

We observed significant downregulation of ER signaling signature in post-pCR recurrences versus paired primary tumors (Fig. 5a, b), with a reduction in the expression of *ESR1* in HER2-positive subgroups (Fig. 6a). Loss or mitigation of ER signaling is a known mechanism of endocrine resistance occurring in around

one-fifth of initially ER-positive tumors and may be accompanied by the upregulation of alternative growth-stimulating pathways⁴⁰. We also noted a paradoxical association between tumor PR signature and relapse in patients who had TNBC and therefore negative PR expression by immunohistochemistry. This finding likely reflects differences in PR expression at the mRNA and protein level⁴¹, which could be introduced by translational regulation, for example, by microRNAs⁴².

Taken together, the output of our analyses poses two main clinical implications. Firstly, our results appear to suggest that post-pCR recurrence is associated with a change in tumor immune microenvironment from an anti-tumorigenic to a pro-tumorigenic phenotype. Indeed, through interindividual comparison we have shown the altered expression of certain known drivers of anti-tumorigenic immune activity such as MHC-II in tumors of patients who subsequently developed recurrent tumors. Furthermore, through intra-individual comparison we have shown a downregulation of key anti-tumorigenic effectors of the immune system such as CD8⁺ T cells (Fig. 5d), IFN- γ (Fig. 5e), TIGIT (Fig. 5g), and T_{reg} cells (Fig. 5h) in recurrent tumors. A number of recent studies postulate that such alterations in the tumor immune microenvironment are in response to NST and are likely to have predictive value in treatment outcomes^{43–45}. Secondly, our findings suggest that the immunologically quiescent primary tumors which are at risk of post-pCR relapse could benefit from the early use of immune-oncologic agents either alone or in combination with NST. The improvement in pCR achievement rate in early TNBC from the addition of immune checkpoint inhibitors to NST as seen from certain landmark clinical trials such as IMpassion031⁴⁶, Keynote 522⁴⁷, and I-SPY2⁴⁸ indicate a validity in our suggestion.

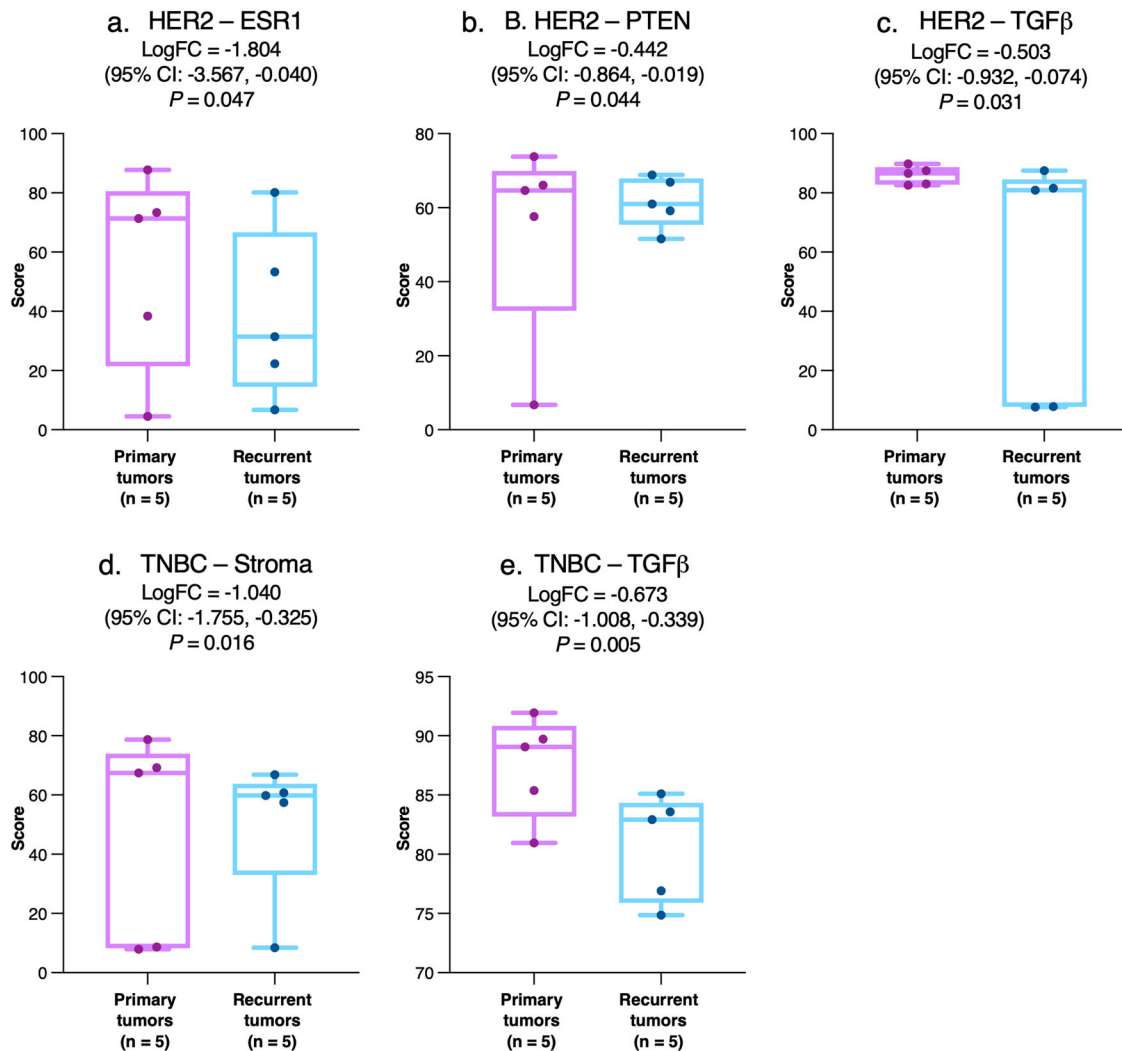


Fig. 6 Intra-individual comparison of tumor gene expression between matched primary tumors and post-pCR recurrences that were HER2-positive or TNBC. For the HER2 subgroup, data are shown for estrogen signaling (a), PTEN (b), and TGF β (c) while for the TNBC subgroup, data are shown for stromal signaling (d), and TGF β (e). The central line indicates the median, the box indicates the 25th and 75th percentiles and the whiskers indicate the range. Circles represent individual data points. Negative values for logFC indicate lower expression in patients with relapse versus controls. Abbreviations: CI confidence interval, ESR1 estrogen receptor 1, logFC log₂-fold change, PTEN phosphatase and tensin homolog, TGF β transforming growth factor beta, TNBC triple-negative breast cancer.

Consequently, it would be interesting to conduct analyses similar to the one we present here on the datasets of these trials to assess whether early use of immunotherapy is effective in patients with immunologically quiescent tumors who achieve pCR. One open question is to what extent the risk factors for relapse after pCR might differ from more general risk factors for recurrence. Many of the variables associated with relapse in the present study have shown negative prognostic significance in wider populations. Previously reported analysis conducted by the German Breast Group evaluated the impact of classical clinical parameters on relapse and concluded that initial tumor size and nodal status were the only prognostic factors associated with long-term survival¹¹. However, it is unclear whether these results are comparable to our findings since the vast majority of patients in our analysis were clinically designated as cT1/2 and clinically node negative thereby representing a relatively early stage breast cancer. In addition, since post-pCR recurrence implies discordant response to NST, mechanisms that increase mutational load and clonal heterogeneity, such as HRD, may be especially expected to drive relapse as seen in this setting.

Our analyses have certain limitations. Due to their nature, we had to retrospectively identify eligible patients and controls from our database and hence had no control over the sample size. Consequently, our subgroup analyses for different breast cancer subtypes were underpowered. Moreover, given the relatively short time to recurrence, we could not gather certain types such as luminal A breast cancers which are known to relapse much later. In addition, our analysis was based on data from a single center, and this could affect generalizability of our findings. Finally, statistical significance did not persist after FDR adjustment.

A key strength of our study was the requirement for time to distant relapse of >12 months, which enabled us to exclude patients with occult primary metastatic disease, who represent a distinct population. In addition, given our institutional practice of collecting tumor tissue for biopsy from the primary as well as relapsed tumor, we could perform paired intra-individual analyses, an advantage not always available to large national and international study groups. We also included both local recurrences and distant metastases since invasive DFS is one of the prime endpoints in breast cancer clinical trials. Taken together, our unique approach of intra- and interindividual analyses allowed us

to identify significant differences in several gene expression variables which may drive relapse after pCR attainment.

In conclusion, we have identified several transcriptomic correlates of relapse despite pCR and changes in tumor gene expression associated with recurrences occurring after pCR attainment, which warrant further investigation in prospective trials. Even in patients whose tumors attain a pCR, insufficiently activated immunogenic pathways may play a key role for relapse. If validated, the identified risk factors and mechanisms of recurrence could inform the design of novel post-neoadjuvant strategies, for patients who are at a risk of recurrence despite their tumors achieving pCR^{8,9}. For example, tumors with HRD may be sensitive to platinum agents and PARP inhibitors^{49,50}. Moreover, the role of immune oncology in the neoadjuvant setting is still under investigation and genomic analysis of patients after NST comprising immuno-oncological agents may play a role in future to identify patients who benefit most from tailored therapy strategies. Conversely, downregulation of immune markers in post-pCR recurrences suggests that immunotherapies may be better deployed earlier in the course of disease⁵¹. Given the absence of tumor in surgical specimens at pCR, liquid biopsy methods for quantifying residual disease burden and tracking tumor evolution after NST particularly holds a promise for the future personalization of therapy in this setting⁵².

PATIENTS AND METHODS

Study design and patients

This study involved a retrospective analysis of female patients diagnosed with early or locally advanced breast cancer at a single center (Kliniken Essen-Mitte [KEM]) in Essen, Germany between September 2011 and January 2020.

In order to identify appropriate study patients and controls, we evaluated the records of breast cancer patients in KEM's database for the aforementioned period (Fig. 1). Data eligible for analysis came from patients who had—received standard of care NST for a minimum of 12 weeks followed by requisite surgery to the breast and the axillary lymph nodes; had subsequently attained pCR, as defined by absence of invasive cancer in the breast and axilla (i.e., ypT0/is and ypN0); had received appropriate treatment and follow-up on relapse; and had biopsy samples from the primary cancer (acquired prior to initiating NST) as well as from the site of recurrence available. Certain patients in whom further treatment was deemed not necessary by the treating physician, e.g., those with TNBC achieving pCR following mastectomy, were also considered eligible for inclusion in our analysis. To exclude occult primary metastatic disease, we discounted patients in whom the time to distant relapse was <12 months.

Eligible controls were patients in our database who were relapse-free following pCR for a period comparable to the corresponding study patient and also matched them for receptor status (HR, HER), nodal status, or *gBRCA* status using baseline immunohistochemical analysis. For patients with *gBRCA1* mutation (mt) status, if no matching *gBRCA1* mt control was available, the patient was instead matched to a control with TNBC and *gBRCA1* wildtype (wt) status. We aimed to identify three controls for every patient who fulfilled the aforementioned criteria.

Ethics committee approval was obtained from the institutional ethics committee (Ethik-Kommission der Ärztekammer Nordrhein, Düsseldorf, Germany) and patients had provided written informed consent previously.

Sample processing and gene expression analysis

Biopsy specimens of patients (primary as well as recurrent tumors) and controls (primary tumors), previously preserved by fixing in formalin and embedding in paraffin according to KEM's standard protocol were retrieved and sent to NanoString Technologies Germany GmbH (Hamburg, Germany) for analysis using the Breast Cancer 360 (BC360) panel on the multiplexed digital nCounter[®] platform (NanoString Technologies Inc., Seattle, WA, USA).

Briefly, RNA from biopsy specimens were isolated and when necessary, amplified, using NanoString's in-house standardized protocol, followed by hybridization with the BC360 panel and a signal readout on the nCounter[®] System.

The BC360 panel consists of 758 genes of interest for breast tumor biology, including the 50-gene prediction analysis of microarray (PAM50) set^{53,54}, and 18 housekeeping control genes⁵⁵. Gene counts were normalized to housekeeping gene expression, as well as either a panel standard (for non-PAM50 genes) or a reference sample (for PAM50 genes). Normalized gene expression data were log₂-transformed and used to derive expression scores for the 42 genes and gene signatures that are a preselected focus of the panel and which reflect tumor biology, the immune response and abundance of different cell populations in the microenvironment. The PAM50 gene set enabled determination of the intrinsic subtype (i.e., luminal A, luminal B, HER2-enriched or basal-like) and risk of recurrence score according to published methods^{53,54}.

Statistics

Since our analysis entailed identifying eligible patients and controls from our institutional database, no formal sample size calculation was performed. The decision to identify three controls to every patient for interindividual analysis was also arbitrary although we attempted to stringently match patients and controls according to their immunohistochemical profile.

Differential gene expression was expressed as log₂-fold change (logFC) with its associated 95% CI. Statistical significance was assessed using Student's *t*-test (paired for intraindividual comparison and unpaired for interindividual comparison). *P* values were corrected for multiplicity using Benjamini–Yekutieli false-discovery rate (FDR) adjustment⁵⁶. Subgroup analyses were performed to analyze differences between any and distant relapse or those between tumor categorized by immunohistochemistry (HR-positive/HER2-negative; HER2-positive [irrespective of HR status]; TNBC); and *gBRCA1* status. For subgroups in interindividual analyses, controls were included based on the characteristics of their matched patient.

Analyses were performed using SPSS Statistics Version 23.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) and Prism Version 9.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

DATA AVAILABILITY

Data supporting the findings in this study in Table 1 and Figs. 2–6 as well as Supplementary Tables S1–S4 are available.

Received: 2 August 2021; Accepted: 16 February 2022;

Published online: 29 March 2022

REFERENCES

- Cardoso, F. et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz173> (2019).
- Hayes, D. F. & Schott, A. F. Neoadjuvant chemotherapy: What are the benefits for the patient and for the investigator? *J. Natl Cancer Inst.* <https://doi.org/10.1093/jncimonographs/lgv004> (2015).
- Mamtani, A. et al. How often does neoadjuvant chemotherapy avoid axillary dissection in patients with histologically confirmed nodal metastases? Results of a prospective study. *Ann. Surg. Oncol.* <https://doi.org/10.1245/s10434-016-5246-8> (2016).
- Colomer, R. et al. Neoadjuvant management of early breast cancer: a clinical and investigational position statement. *Oncologist* <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2018-0228> (2019).
- Spring, L. M. et al. Pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy and impact on breast cancer recurrence and survival: a comprehensive meta-analysis. *Clin. Cancer Res.* **26**, 2838–2848 (2020).
- Cortazar, P. et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: The CTNeoBC pooled analysis. *Lancet* [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62422-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62422-8) (2014).
- Chica-Parrado, M. R. et al. Resistance to neoadjuvant treatment in breast cancer: clinicopathological and molecular predictors. *Cancers* <https://doi.org/10.3390/cancers12082012> (2020).

8. Masuda, N. et al. Adjuvant capecitabine for breast cancer after preoperative chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1612645> (2017).
9. Von Minckwitz, G. et al. Trastuzumab emtansine for residual invasive HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.* <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1814017> (2019).
10. Tanioka, M. et al. Predictors of recurrence in breast cancer patients with a pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy. *Br. J. Cancer* <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605769> (2010).
11. Huober, J. et al. Abstract P2-08-01: Factors predicting relapse in early breast cancer patients with a pathological complete response after neoadjuvant therapy —results of a pooled analysis based on the GBG meta-database. *Cancer Res.* **79**, P2-08-01–P2-08-01 (2019).
12. Chaudry, M. et al. Recurrence and survival among breast cancer patients achieving a pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res. Treat.* **153**, 417–423 (2015).
13. Asaoka, M. et al. Clinical and pathological predictors of recurrence in breast cancer patients achieving pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy. *Eur. J. Surg. Oncol.* **45**, 2289–2294 (2019).
14. Weiss, A., Bashour, S. I., Hess, K., Thompson, A. M. & Ibrahim, N. K. Effect of neoadjuvant chemotherapy regimen on relapse-free survival among patients with breast cancer achieving a pathologic complete response: an early step in the de-escalation of neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res.* <https://doi.org/10.1186/s13058-018-0945-7> (2018).
15. Denkert, C. et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol.* **19**, 40–50 (2018).
16. Prat, A. et al. Prediction of response to neoadjuvant chemotherapy using core needle biopsy samples with the Prosigna assay. *Clin. Cancer Res.* **22**, 560–566 (2016).
17. Callari, M. et al. Subtype-specific metagene-based prediction of outcome after neoadjuvant and adjuvant treatment in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0757> (2016).
18. Esserman, L. J. et al. Chemotherapy response and recurrence-free survival in Neoadjuvant breast cancer depends on biomarker profiles: results from the I-SPY 1 TRIAL (CALGB 150007/150012; ACRIN 6657). *Breast Cancer Res. Treat.* **132**, 1049–1062 (2012).
19. Takeshita, T. et al. Transcriptomic and functional pathway features were associated with survival after pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Am. J. Cancer Res.* **10**, 2555–2569 (2020).
20. Annaratone, L. et al. The multifaceted nature of tumor microenvironment in breast carcinomas. *Pathobiology* **87**, 125–142 (2020).
21. Wulfkühle, J. D. et al. Quantitative MHC II protein expression levels in tumor epithelium to predict response to the PD1 inhibitor pembrolizumab in the I-SPY 2 Trial. *J. Clin. Oncol.* **37**, 2631–2631 (2019).
22. Oldford, S. A. et al. Tumor cell expression of HLA-DM associates with a Th1 profile and predicts improved survival in breast carcinoma patients. *Int. Immunol.* **18**, 1591–1602 (2006).
23. Andres, F. et al. Expression of the MHC class II pathway in triple-negative breast cancer tumor cells is associated with a good prognosis and infiltrating lymphocytes. *Cancer Immunol. Res.* <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0243> (2016).
24. Park, I. A. et al. Expression of the MHC class II in triple-negative breast cancer is associated with tumor-infiltrating lymphocytes and interferon signaling. *PLoS ONE* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182786> (2017).
25. Stewart, R. L. et al. A multigene assay determines risk of recurrence in patients with triple-negative breast cancer. *Cancer Res.* <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3014> (2019).
26. Tay, R. E., Richardson, E. K. & Toh, H. C. Revisiting the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy—new insights into old paradigms. *Cancer Gene Therapy* <https://doi.org/10.1038/s41417-020-0183-x> (2020).
27. Blomberg, O. S., Spagnuolo, L. & De Visser, K. E. Immune regulation of metastasis: mechanistic insights and therapeutic opportunities. *DMM Disease Models and Mechanisms* (2018) <https://doi.org/10.1242/dmm.036236>.
28. Axelrod, M. L., Cook, R. S., Johnson, D. B. & Balko, J. M. Biological consequences of MHC-II expression by tumor cells in cancer. *Clin. Cancer Res.* <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3200> (2019).
29. Loi, S. et al. RAS/MAPK activation is associated with reduced tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer: therapeutic cooperation between MEK and PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors. *Clin. Cancer Res.* <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1125> (2016).
30. Cortesi, L., Rugo, H. S. & Jackisch, C. An overview of PARP inhibitors for the treatment of breast cancer. *Target Oncol.* **16**, 255–282 (2021).
31. Timms, K. M. et al. Association of BRCA1/2 defects with genomic scores predictive of DNA damage repair deficiency among breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res.* **16**, 475 (2014).
32. Force, J. et al. Abstract P3-08-07: distinct biological signatures describe differences in BRCA mutated subgroups. *Cancer Res.* **79**, P3-08-07 (2019).
33. ML, T. et al. Homologous recombination deficiency (HRD) status predicts response to standard neoadjuvant chemotherapy in patients with triple-negative or BRCA1/2 mutation-associated breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **168**, 625–630 (2018).
34. C, D. et al. Reconstructing tumor history in breast cancer: signatures of mutational processes and response to neoadjuvant chemotherapy. *Ann. Oncol.* **32**, 500–511 (2021).
35. Mohammed, R. A. A. et al. Lymphatic and blood vessels in basal and triple-negative breast cancers: characteristics and prognostic significance. *Mod. Pathol.* <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.4> (2011).
36. Uzzan, B., Nicolas, P., Cucherat, M. & Perret, G. Y. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res.* <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-1957> (2004).
37. Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Fiska, A. & Koukourakis, M. I. The CD44+/CD24-phenotype relates to 'triple-negative' state and unfavorable prognosis in breast cancer patients. *Med. Oncol.* <https://doi.org/10.1007/s12032-010-9530-3> (2011).
38. Gooding, A. J. & Schieman, W. P. Epithelial–mesenchymal transition programs and cancer stem cell phenotypes: mediators of breast cancer therapy resistance. *Mol. Cancer Res.* <https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-20-0067> (2020).
39. Denkert, C. et al. Ki67 levels as predictive and prognostic parameters in pre-therapeutic breast cancer core biopsies: a translational investigation in the neoadjuvant gepartrio trial. *Ann. Oncol.* <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt350> (2013).
40. Osborne, C. K. & Schiff, R. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annu. Rev. Med.* <https://doi.org/10.1146/annurev-med-070909-182917> (2011).
41. Tong, D. et al. Messenger RNA determination of estrogen receptor, progesterone receptor, p52, and plasminogen activator inhibitor-1 by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction in human breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **5**, 1497–1502 (1999).
42. Gilam, A. et al. MicroRNA regulation of progesterone receptor in breast cancer. *Oncotarget* <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15657> (2017).
43. Park, Y. H. et al. Chemotherapy induces dynamic immune responses in breast cancers that impact treatment outcome. *Nat. Commun.* **11**, 6175 (2020).
44. Pérez-Pena, J. et al. A Transcriptomic immunologic signature predicts favorable outcome in neoadjuvant chemotherapy treated triple negative breast tumors. *Front. Immunol.* **10**, 2802 (2019).
45. Graeser, M. et al. Original research: Immune cell composition and functional marker dynamics from multiplexed immunohistochemistry to predict response to neoadjuvant chemotherapy in the WSG-ADAPT-TN trial. *J. Immunother. Cancer* **9**, e002198 (2021).
46. Mittendorf, E. A. et al. Neoadjuvant atezolizumab in combination with sequential nab-paclitaxel and anthracycline-based chemotherapy versus placebo and chemotherapy in patients with early-stage triple-negative breast cancer (IMpassion031): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet* **396**, 1090–1100 (2020).
47. Schmid, P. et al. Pembrolizumab for early triple-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **382**, 810–821 (2020).
48. Nanda, R. et al. Effect of pembrolizumab plus neoadjuvant chemotherapy on pathologic complete response in women with early-stage breast cancer: an analysis of the ongoing phase 2 adaptively randomized I-SPY2 trial. *JAMA Oncol.* **6**, 1 (2020).
49. den Brok, W. D. et al. Homologous recombination deficiency in breast cancer: a clinical review. *JCO Precis. Oncol.* <https://doi.org/10.1200/PO.16.00031> (2017).
50. Pellegrino, B. et al. Homologous recombination repair deficiency and the immune response in breast cancer: a literature review. *Transl. Oncol.* **13**, 410 (2020).
51. Szekeley, B. et al. Immunological differences between primary and metastatic breast cancer. *Ann. Oncol.* <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy399> (2018).
52. Alba-Bernal, A. et al. Challenges and achievements of liquid biopsy technologies employed in early breast cancer. *EBioMedicine* **62**, 103100 (2020).
53. Parker, J. S. et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J. Clin. Oncol.* **27**, 1160–1167 (2009).
54. Wallden, B. et al. Development and verification of the PAM50-based Prosigna breast cancer gene signature assay. *BMC Med. Genomics* **8**, 54 (2015).
55. Brauer, H. A., Mashadi-Hosseini, A., Buckingham, W., Danaher, P. & Ferree, S. Gene expression signature development to decode breast cancer heterogeneity. *J. Clin. Oncol.* **36**, e24243 (2018).
56. Benjamini, Y. & Yekutieli, D. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Ann. Stat.* <https://doi.org/10.1214/aos/1013699998> (2001).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank study patients for their participation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.B., S.K., and M.R. were responsible for conceptualization, investigation, methodology, and overview of the study. M.D. and S.S. were responsible for data curation, visualization, and writing of the paper. E.T. was responsible for statistical analysis of study data. All other co-authors provided inputs on study conduct, data analysis, and paper drafting.

COMPETING INTERESTS

S.B. declares no conflicts of interest. S.K. reports consulting fees from F. Hoffmann-La Roche Ltd., Genomic Health, Novartis, Amgen, Celgene, Daiichi Sankyo, AstraZeneca, Somatex, MSD, Pfizer, Puma Biotechnology, PFM Medical, Lilly and SonoScape; leadership roles with Westdeutsche Studiengruppe and Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie; research grant/funding from Somatex and Roche; travel expenses from F. Hoffmann-La Roche Ltd., Daiichi-Sankyo and SonoScape; and partial non-profit ownership of Westdeutsche Studiengruppe. N.H. reports fees for lectures and/or consulting from AstraZeneca, Daiichi Sankyo, MSD, Lilly, Novartis, Pfizer, Roche, and Seattle Genetics; partial non-profit ownership of West German Study Group (WSG). P.S. reports advisory/consultancy fees from AstraZeneca, Bayer, Boehringer Ingelheim, Merck, Novartis, Pfizer, Puma, and Roche; grant/funding to the institution from Astellas, AstraZeneca, Genentech, Novartis, Oncogenex and Roche; and a spouse who is an employee of Roche. J.C. reports advisory role/consultancy for Roche, Celgene, Cellestia, AstraZeneca, Biothera Pharmaceutical, Merus, Seattle Genetics, Daiichi Sankyo, Erytech, Athenex, Polyphor, Lilly, Servier, Merck Sharp&Dohme, GSK, Leuko, Bioasis, Clovis Oncology, and Boehringer Ingelheim; honoraria from Roche, Novartis, Celgene, Eisai, Pfizer, Samsung Bioepis, Lilly, Merck Sharp & Dohme, and Daiichi Sankyo; research funding to the institution from Roche, Ariad Pharmaceuticals, AstraZeneca, Baxalta GMBH/Servier Affaires, Bayer Healthcare, Eisai, F. Hoffman-La Roche, Guardant Health, Merck Sharp & Dohme, Pfizer, Piquar Therapeutics, Puma C, and Queen Mary University of London; stock, patents and intellectual property from MedSIR; and travel, accommodation, expenses from Roche, Novartis, Eisai, Pfizer, and Daiichi Sankyo. C.S. reports travel expenses from Teva. O.C. reports travel expenses from Pfizer. H.H. reports travel expenses from Teva and Pfizer. B.A. reports personal fees and non-financial support from Roche, personal fees from Amgen, personal fees from AstraZeneca, personal fees and non-financial support from Tesaro/GSK, personal fees from Clovis, personal fees from Celgene, non-financial support from PharmaMar, personal fees and non-financial support from MSD, personal fees from Novartis, outside the submitted work. M.H.D. reports personal fees from Boehringer Ingelheim, Merck, Novartis, EUSA Pharma, AbbVie, Janssen, Biogen, Menarini and Norgine (outside the submitted work).

S.S. reports professional fees from Sanofi, Abbvie, Bayer, Cantargia, Celgene, Ferring, Nestle, Servier, Tiburio, and Zentiva on unrelated freelance projects. E.T. has declared no conflicts of interest. I.T. has declared no conflicts of interest. D.G. has declared no conflicts of interest. O.G. reports minority non-profit ownership of WSG Study Group; honoraria from Genomic Health, Roche, Celgene, Pfizer, Novartis, NanoString Technologies, and AstraZeneca; consulting/advisory board roles at Amgen, Roche, Daiichi Sankyo, Genomic Health, Merck Sharp & Dohme, Lilly, Novartis, Astra Zeneca, and Eisai; and travel/accommodation/expenses from Roche, Celgene, Daiichi Sankyo. M.R. reports honoraria (self) and advisory/consultancy fees from Roche, Novartis, Merck Sharp & Dohme, AstraZeneca, Seagen, Somatex and Lilly; and travel expenses from Novartis and Pfizer and Celgene.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41523-022-00403-3>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Mattea Reinisch.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

Bruzas S, Kümmel S, Harrach H, Breit E, Ataseven B, Traut A, Rüländ A, Kostara A, Chiari O, Dittmer-Grabowski C, Reinisch M. Next-generation sequencing-directed therapy in patients with metastatic breast cancer in routine clinical practice. *Cancers (Basel)*. 2021;13(18). Impact factor 6,639.

Reinisch M, Kümmel S, Breit E, Theuerkauf I, Harrach H, Schindowski D, Moka D, Bettstetter M, Bruzas S, Chiari O. Two progressed malignant phyllodes tumors of the breast harbor alterations in genes frequently involved in other advanced cancers. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2021;16(1). Impact factor 3,687.

Bruzas S, Kümmel S, Harbeck N, Schmid P, Cortés J, Seiberling C, Chiari O, Harrach H, Ataseven B, Dyson M, Traut E, Theuerkauf I, Gebauer D, Gluz O, Reinisch M. 172P Gene expression in early breast cancer (EBC) patients (pts) with relapse despite pathologic complete response (pCR): An intra- and interindividual (matched control) analysis. *Annals of Oncology*. 2020;31. Impact factor 18,274.

Bruzas S, Gluz O, Harbeck N, Schmid P, Cortés J, Blohmer J, Seiberling C, Chiari O, Harrach H, Ataseven B, Shenoy S, Dyson M, Traut E, Theuerkauf I, Gebauer D, Kümmel S, Reinisch M. Gene signatures in patients with early breast cancer and relapse despite pathologic complete response. *npj Breast Cancer*. 2022;8(1). Impact factor 6,923.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich bei der Bearbeitung meiner Dissertation unterstützt haben.

Den Patientinnen danke ich für die Teilnahme an unserer Studie.

Besonders danken möchte ich Prof. Dr. med. S. Kümmel und Frau Dr. med. M. Reinisch für die enorme Unterstützung bei der Durchführung der gesamten Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei meiner gesamten Arbeitsgruppe für die tolle Zusammenarbeit bedanken.