Die Bedeutung des WNT5A/ROR2-Signalweges beim duktalen Adenokarzinom des Pankreas

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von:

Lydia Remtisch
geboren am 05.06.1990 in Berlin, Deutschland

angefertigt an der:

Universität Leipzig/Medizinische Fakultät
Klinik und Poliklinik für Viszeral-, Transplantations-, Thorax- und Gefäßchirurgie

Betreuer:

Prof. Dr. med. Ines Gockel
Dr. med. Orestis Lyros

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom:

29.10.2019

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
1 Einleitung	2
1.1 Das Pankreas.....	2
1.2 Das Pankreaskarzinom	3
1.2.1 Epidemiologie.....	3
1.2.2 Risikofaktoren	4
1.2.3 Symptomatik und Diagnostik.....	5
1.2.4 Staging und Grading	6
1.2.5 Therapie.....	8
1.2.5.1 Operative Therapie	8
1.2.5.2 Chemotherapie.....	9
1.3 Die molekulare Pathogenese des Pankreaskarzinoms.....	10
1.3.1 Die Familie der WNT-Proteine und die WNT-Signalwege.....	10
1.3.2 WNT5A	12
1.3.3 ROR2.....	13
1.3.4 Der WNT5A/ROR2-Signalweg	15
1.4 Rationale.....	16
1.5 Fragestellung	17
2 Material und Methoden.....	18
2.1 Patientenkollektiv	18
2.2 Datenerfassung und Datenbank.....	18
2.3 Chemikalien	19
2.4 Verbrauchsmaterialien	19
2.5 Geräte.....	19
2.6 Antikörper Immunhistochemie	20
2.7 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	21
2.8 Immunhistochemie	22
2.8.1 Probenaufbereitung.....	22
2.8.2 Durchführung der Färbung	22
2.8.3 Auswertung und Kontrolle	23
2.9 Statistische Verfahren	24
3 Ergebnisse	25
3.1 Deskription Patientenkollektiv.....	25
3.1.1 Alters- und Geschlechterverteilung.....	25
3.1.2 TNM-Klassifikation und UICC-Stadien.....	25
3.1.3 Rezidive	27
3.1.4 Chemotherapie.....	27

3.2	Deskription immunhistochemische Färbung WNT5A und ROR2	27
3.2.1	Intensity-Percentage-Score	27
3.2.2	Darstellung Expressionsmuster nach negativer und positiver Expression	29
3.3	Korrelationsanalyse mit klinisch-pathologischen Parametern	31
3.3.1	ROR2.....	31
3.3.2	WNT5A	33
3.4	Überlebenszeitanalyse	36
3.4.1	Medianes Gesamtüberleben	36
3.4.2	Überleben in Abhängigkeit von klinisch-pathologischen Parametern.....	37
3.4.3	Überleben in Abhängigkeit der ROR2-Expression.....	40
3.4.4	Überleben in Abhängigkeit der WNT5A-Expression	44
3.4.5	Überleben in Abhängigkeit der ROR2/WNT5A-Expression	48
3.4.6	Univarianz- und Multivarianzanalyse	50
4	Diskussion.....	52
4.1	Prognose.....	52
4.2	Alters- und Geschlechterverteilung.....	52
4.3	Klinisch-pathologische Parameter und ihre prognostische Relevanz.....	53
4.4	Die prognostische Relevanz der ROR2-Expression	57
4.5	Die prognostische Relevanz der WNT5A-Expression.....	62
4.6	Schlussfolgerung.....	64
5	Zusammenfassung.....	66
6	Literaturverzeichnis	69
7	Anhang.....	76
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	76
7.2	Tabellenverzeichnis.....	77
7.3	Eigenständigkeitserklärung	78
7.4	Danksagung.....	79
7.5	Curriculum vitae	80

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°	Grad
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
5-FU	5-Fluoruracil
5-JÜR	5-Jahresüberlebensrate
95%-KI	95%-Konfidenzintervall
A.	Arteria
adj.	adjuvant
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
DAB	1,4-Diaminobenzol
dest.	destilliert
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
Fzd	Frizzled-Rezeptor
g	Gramm
h	Stunde
HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom
IPMN	Intraduktal papillär muzinöse Neoplasie
IPS	Intensity-Percentage-Score
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
LRP	Low-density lipoprotein receptor-related protein
m ²	Quadratmeter
MCN	Muzinös zystische Neoplasie
min	Minute
NGS	Normal-Goat-Serum
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
Pat.	Patient/Patienten
PBS	Phosphate buffered saline
PCP	Planar cell polarity Signalweg
PPPD	Pyloruserhaltende partielle Duodenopankreatektomie
RKI	Robert Koch-Institut
ROR	Rezeptor tyrosine kinase-like orphan receptor
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinasen
s	Sekunde
TBS	Tris buffered saline
TMA	Tissue Microarray
UICC	Union internationale contre le cancer
V.	Vena
vs.	versus

1 Einleitung

1.1 Das Pankreas

Das Pankreas ist eine Drüse mit endokriner und exokriner Funktion, welche im Retroperitonealraum gelegen ist. Es wird in Kopf, Körper und Schwanz eingeteilt. Ventral befindet sich die Bursa omentalis und dorsal wird das Pankreas von der dorsalen Rumpfwand, Wirbelsäule und Aorta begrenzt. Hinter dem Pankreaskopf verlaufen die V. mesenterica inferior, V. splenica und die V. mesenterica superior. Kranial grenzen die A. hepatica communis und A. splenica und nach kaudal die Pars horizontalis des Duodeni an das Pankreas. Nach lateral links befindet sich die Milz und nach rechts das Duodenum (Abbildung 1). Die Drüse wird von einem etwa 2 mm dicken Gang, dem Ductus pancreaticus, durchzogen. Dieser leitet das exokrine Pankreassekret in das Duodenum und mündet dort gemeinsam mit dem Gallengang in die Papilla duodeni major. Der exokrine Anteil produziert pro Tag rund 1,5–2 Liter Verdauungssekret. Dieses enthält Enzyme, die als Vorstufen sezerniert, anschließend im Duodenum aktiviert werden und für die Aufspaltung von Nahrungsbestandteilen wie Proteinen, Lipiden und Kohlenhydraten nötig sind. Der endokrine Anteil setzt sich aus den sogenannten Langerhans-Inseln zusammen. Deren Sekretionsprodukte, Insulin und Glukagon, sind für die Regulation des Glukosestoffwechsels zuständig (Aumüller und Wurzing 2010).

Abbildung 1: Anatomie des Pankreas (bearbeitet aus Henne-Bruns und Barth 2012). Das Pankreas wird in A) Kopf mit Proc. uncinatus, B) Körper und C) Schwanz eingeteilt. Dorsal liegen dorsale Rumpfwand, Wirbelsäule und Aorta; ventral grenzt es an die Bursa omentalis. Kranial wird das Pankreas durch die A. hepatica communis und A. splenica begrenzt. Kaudal und ebenso lateral rechts liegt das Duodenum. Nach lateral links befindet sich die Milz.

1.2 Das Pankreaskarzinom

1.2.1 Epidemiologie

Das Pankreaskarzinom tritt mit einer Inzidenz von etwa 13,9 bzw. 10,4/100.000/Jahr bei Männern bzw. Frauen in Deutschland auf (Stand 2014). Dies entspricht circa 17.130 Neuerkrankungen, wobei die Neuerkrankungsrate von Männern bei rund 8.550 und von Frauen bei rund 8.580 pro Jahr liegt. Die Letalität ist sehr hoch, weshalb fast ebenso viele Personen am Pankreaskarzinom versterben. Als Todesursache liegt es damit an 4. Stelle der Krebserkrankungen hinter Lunge, Darm und Prostata beim Mann bzw. Brustdrüse bei der Frau (Abbildung 2) (Robert Koch-Institut 2016, 2017).

Abbildung 2: Prozentaler Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland Stand 2014 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) (Robert Koch-Institut 2017)

Entsprechend ist die 5-Jahresüberlebensrate mit 9 % für beide Geschlechter sehr niedrig. Das Pankreaskarzinom weist damit die niedrigste Überlebensrate unter allen Krebserkrankungen auf. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 71 Jahren und für Frauen bei 75 Jahren. Langfristig zeigt sich ein steigender Trend für Neuerkrankungs- und Sterberate sowohl für Männer als auch für Frauen. Seit 1970 sind diese Werte kontinuierlich angestiegen und liegen dabei in Deutschland leicht oberhalb des EU-Durchschnitts, dessen Inzidenz bei 12,2/100.000/Jahr für Männer und 9,0/100.000/Jahr für Frauen liegt (Abbildung 3) (Robert Koch-Institut 2016).

Abbildung 3: Altersstandardisierte Neuerkrankungsrate des Pankreaskarzinoms je 100.000 Einwohner in den Mitgliedstaaten der Europäischen Union nach Geschlecht, Grau-Frauen, Blau-Männer, Kreis-Gesamt (Robert Koch-Institut 2016).

Histologisch kann man exokrine von endokrinen Karzinomen unterscheiden. Dabei stellen exokrine Karzinome mit 98 % der Fälle die häufigste Form dar. Unter den exokrinen Formen dominiert das duktales Adenokarzinom, welches seinen Ausgang von den kleinen Pankreasgängen hat. 65 % der Karzinome sind im Pankreaskopf, 15 % im Pankreaskorpus und 10 % im Pankreasschwanz lokalisiert. Etwa 10 % der Tumoren treten multifokal auf. (Henne-Bruns und Barth 2012; Reissfelder et al. 2007).

1.2.2 Risikofaktoren

Es werden zahlreiche Risikofaktoren für die Entstehung des Pankreaskarzinoms in der Forschung und Literatur teilweise kontrovers diskutiert, wobei als einziger sicherer Risikofaktor der Tabakkonsum zu nennen ist (Camara et al. 2016). Dabei kann der Konsum von Tabak das Risiko an einem Pankreaskarzinom zu erkranken verdoppeln. Es wurde selbst zwischen Passivrauchen und dem Auftreten von Pankreaskarzinomen ein Zusammenhang gefunden (Leitlinienprogramm Onkologie 2013; Villeneuve et al. 2004). Die chronische Pankreatitis scheint das Risiko am Pankreaskarzinom zu erkranken zu erhöhen, wobei die dahinter stehenden Mechanismen bisher noch unklar sind (Malka et al. 2002; Camara et al. 2016). Als weitere Faktoren sind Diabetes mellitus (Silverman et al. 1999; Batabyal et al. 2014) und Adipositas zu erwähnen. Dabei zeigten vor allem Personen mit einem BMI größer 30 kg/m² ein signifikant höheres Risiko am Pankreaskarzinom zu erkranken als Personen mit einem

BMI kleiner 23 kg/m² (Berrington de Gonzalez et al. 2003; Larsson et al. 2005). Es gibt weitere auf den Lebensstil bezogene Faktoren, die nicht direkt als Risikofaktoren zu bezeichnen sind, das Risiko ein Pankreaskarzinom zu entwickeln jedoch erhöhen können. Dazu zählen der Alkoholabusus (≥ 40 g Alkohol pro Tag), sowie ein übermäßiger Konsum von verarbeiteten Fleischwaren, gegrillten und geräucherten Speisen (Camara et al. 2016). Außerdem ist das Erkrankungsrisiko bei Personen mit bestimmten Tumorsyndromen, wie zum Beispiel dem hereditären nicht-polypösen Kolonkarzinom (HNPCC) (Win et al. 2012) und dem Peutz-Jeghers-Syndrom (Hearle et al. 2006; van Lier et al. 2011), erhöht. Eine höhere Wahrscheinlichkeit zu erkranken, liegt auch bei Verwandten ersten Grades einer Person mit Pankreaskarzinom vor. Von einem familiären Pankreaskarzinom spricht man, wenn mindestens zwei Verwandte ersten Grades an einem Pankreaskarzinom erkrankt sind und das Vorliegen eines Tumorsyndroms ausgeschlossen ist (Reissfelder et al. 2007).

1.2.3 Symptomatik und Diagnostik

Das Pankreaskarzinom wird häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Patienten präsentieren sich oft mit sehr unspezifischen, heterogenen Symptomen (Neuzillet et al. 2015). In etwa 25 % der Fälle tritt ein schmerzloser Ikterus durch den Verschluss des Ductus choledochus als Frühsymptom auf; im Spätstadium ist er bei 90 % der Patienten vorhanden. Weiterhin kann es zu unspezifischen Beschwerden wie Appetitlosigkeit, Übelkeit, Gewichtsverlust, Oberbauch- und Rückenschmerzen kommen. Teilweise tritt eine Begleitpankreatitis auf, seltener liegt ein neu aufgetretener Diabetes mellitus oder eine erhöhte Thromboseneigung vor (Schmidt-Hansen et al. 2016; Herold 2016; Tannapfel 2010).

Ein aggressives Tumorwachstum mit früher Metastasierung ist charakteristisch für das Pankreaskarzinom. Nur 20–30 % der Tumoren sind bei Diagnosestellung noch resektabel. Unter chirurgischer Exploration zeigen sich häufig Infiltrationen der umliegenden großen Gefäße, perineurale Infiltration, Peritonealkarzinose und Lymphknotenbefall (Reissfelder et al. 2007). Liegt der Verdacht auf ein Pankreaskarzinom auf Grund der oben genannten neu aufgetretenen Symptome vor, wird in einem ersten diagnostischen Schritt eine Sonographie des Abdomens durchgeführt, sowie diverse Laborparameter bestimmt. Dazu zählen unter anderem Lipase, Amylase, Bilirubin, Transaminasen und der Tumormarker CA 19-9 (Reissfelder et al. 2007). Ein hoher präoperativer Tumormarker kann dabei Anlass für eine Staging-Laparoskopie sein, um die Tumormasse besser beurteilen zu können, da diese möglicherweise höher als vorher vermutet ist (Leitlinienprogramm Onkologie 2013; Neuzillet et al. 2015). Im weiteren Verlauf sollte eine Schnittbildgebung zur Beurteilung der Tumorausbreitung und -resektabilität, sowie der Fernmetastasierung durchgeführt werden. Zur genauen Feststellung der lokalen Infiltration kann eine endosonographische Untersuchung

durchgeführt werden. Nur in unklaren Fällen ist eine Darstellung des Gallengang- und Pankreassystems mittels endoskopisch retrograder Cholangiopankreatikographie (ERCP) indiziert. Als pathognomonisch für das Pankreaskarzinom gilt bei der ERCP das sogenannte „Double-duct-Zeichen“, welches den Stau von Kontrastmittel durch die gleichzeitige Stenose vom Ductus pancreaticus und Ductus choledochus bezeichnet (Reissfelder et al. 2007; Herold 2016). Sowohl die ERCP als auch die präoperative Stenteinlage sind jedoch auf Grund hoher Komplikationsraten umstritten (van der Gaag et al. 2010).

Eine präoperative Biopsie wird nur in Fällen empfohlen, bei denen es sich um nicht-resektable Tumoren mit geplanter neoadjuvanter Chemotherapie handelt. Für Patienten mit resektablen Tumor und kurativem Ansatz ist eine Biopsie nicht verpflichtend (Seufferlein et al. 2012).

1.2.4 Staging und Grading

Bereits in den 1950er Jahren entwickelte der Franzose Pierre Denoix ein System zur Einteilung von malignen Tumorerkrankungen, welches seither von der Union internationale contre le cancer (UICC) weitergeführt und von verschiedenen Autoren weiterentwickelt und überarbeitet wurde. Die Klassifikation von Tumoren erfolgt nach der sogenannten TNM-Klassifikation. T bezeichnet dabei die Ausdehnung des Primärtumors, N den Befall von regionären Lymphknoten und M das Vorliegen von Fernmetastasen (Tabelle 1) (Wittekind 2017).

Tabelle 1: TNM: Klinische Klassifikation des Pankreaskarzinoms

Kategorie	Kriterien
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für einen Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor < 2 cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor > 2 cm aber < 4 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor > 4 cm in größter Ausdehnung (schließt Invasion des peripankreatischen Weichgewebes mit ein)
T4	Tumor infiltriert Truncus coeliacus, A. mesenteria superior und/oder A. hepatica communis
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1 bis 3 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Die pathologische Klassifikation (pTNM) orientiert sich an der klinischen Klassifikation. pT- und pN-Kategorie entsprechen den T- und N-Kategorien. Die Bezeichnung pM1 bedeutet, dass mikroskopisch Fernmetastasen bestätigt wurden. pM0 und pMX werden in der neuen Auflage zur TNM-Klassifikation von 2017 als nicht anwendbare Kategorien bezeichnet (Wittekind 2017).

Nach Vorgaben der UICC lassen sich aus der TNM-Klassifikation fünf Stadien ableiten, die zur besseren Therapiefindung und Prognose von Nutzen sein sollen (Tabelle 2).

Tabelle 2: Stadieneinteilung nach UICC 7.0

Stadieneinteilung			
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T1, T2, T3	N1	M0
Stadium III	T1, T2, T3	N2	M0
	T4	Jedes N	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Außer T, N und M gibt es noch weitere fakultative Deskriptoren, wie die Invasion von Lymphgefäßen (L), venösen Gefäßen (V) und Perineuralscheiden (Pn), die betrachtet werden können (Wittekind 2017).

Nach einer Operation wird der sogenannte R-Status nach der Residualtumor-Klassifikation (R-Klassifikation) festgelegt. Dieser beschreibt, ob sich noch Resttumor im OP-Situs oder am Absetzungsrand des OP-Präparates befindet und ist von prognostischer Bedeutung (Tabelle 3) (Neuhaus und Wittekind 2007).

Tabelle 3: Residualtumor-Klassifikation

Kategorie	Kriterien
RX	Vorhandensein des Residualtumors kann nicht beurteilt werden
R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopischer Residualtumor
R2	Makroskopischer Residualtumor
R2a	Makroskopischer Residualtumor, mikroskopisch nicht bestätigt
R2b	Makroskopischer Residualtumor, mikroskopisch bestätigt

Das Grading dient zur Bestimmung des Differenzierungsgrades vom Tumorgewebe und bezeichnet die Abweichung der Differenzierung im Vergleich zum Normalgewebe. Maßgeblich ist dabei der Anteil des Tumors, der aus Drüsen aufgebaut ist (G1 > 95 %, G2 50–95 %, G3 5–49 %, G4 < 5 %). Die Bestimmung ist für die Therapie wegweisend und von Bedeutung für die Prognose (Tabelle 4) (Neuhaus und Wittekind 2007).

Tabelle 4: Histopathologisches Grading

Kategorie	Kriterien
GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert
G4	Undifferenziert

1.2.5 Therapie

Die an einem Pankreaskarzinom erkrankten Patienten teilt man für das klinische Vorgehen in vier Gruppen ein (Tempero 2014):

- Patienten mit primär resektablen Tumor
- Patienten mit grenzwertiger Resektabilität (sogenannte Borderline-Resektabilität), gekennzeichnet durch rekonstruierbaren Gefäßbefall
- Patienten mit nicht-resektablen/lokal fortgeschrittenem Tumor, gekennzeichnet durch nicht rekonstruierbaren Gefäßbefall
- Patienten mit Vorliegen von Fernmetastasen.

Die derzeit einzige Therapie mit kurativem Ansatz bei Vorliegen eines Pankreaskarzinoms stellt die operative Resektion mit anschließender adjuvanter Chemotherapie dar.

1.2.5.1 Operative Therapie

Bei Patienten mit primär resektablen Tumor ist der einzig kurative Therapieansatz eine operative Resektion. Liegt der Tumor im Pankreaskopf strebt man zunächst eine Operation mit R0-Resektion (Tabelle 3) nach Kausch-Whipple (partielle Duodenopankreatektomie) oder eine pyloruserhaltende partielle Duodenopankreatektomie (PPPD) an. Bei letzterer Variante wird, wie der Name sagt, auf die teilweise Entfernung des Magens verzichtet. Beide Eingriffe enthalten die Resektion von Pankreaskopf, Duodenum, Gallenblase und Ductus choledochus. In Bezug auf postoperative Komplikationen und Letalität zeigen sich zwischen beiden Operationsmethoden keine Unterschiede (Diener et al. 2008; Huttner et al. 2016). Wenn der Tumor im Pankreasschwanz liegt, wird eine Pankreaslinksresektion durchgeführt. Dabei muss eine erweiterte Resektion bei Vorliegen von Infiltrationen von Nachbarstrukturen in Betracht gezogen werden. Ein Tumor im Pankreaskorpus wird mittels einer totalen Duodenopankreatektomie (zusätzlich werden noch Milz, Pankreaskorpus und -schwanz entfernt) oder einer subtotalen Linksresektion operiert (Leitlinienprogramm Onkologie 2013). Ein hohes Lebensalter spricht nicht gegen eine Resektion (Turrini et al. 2013), bei schweren Komorbiditäten muss dagegen im Einzelfall abgewogen und entschieden werden, ob ein operativer Eingriff sinnvoll ist (Neuzillet et al. 2015).

Zur operativen Behandlung eines Pankreaskopfkarzinoms gehört auch eine Standard-Lymphadenektomie. Dabei sollten Lymphknoten entlang der A. hepatica communis, des Ductus choledochus, posteriore und anteriore pankreatikoduodenale Lymphknoten, sowie Lymphknoten entlang der V. mesenterica superior und teilweise der A. mesenterica superior entfernt werden (Brunner und Scott-Brown 2010). Je nach Befall eines Lymphknotens lässt sich die Erkrankung entsprechend der TNM-Klassifikation einteilen. Bei der erweiterten Lymphadenektomie werden paraaortale Lymphknoten, um den Truncus coeliacus liegende und komplett die A. mesenterica superior umgebende Lymphknoten entfernt. Studien konnten jedoch zeigen, dass die erweiterte Lymphadenektomie keinen Überlebensvorteil bringt und die postoperative Morbidität erhöht (Dasari et al. 2015; Orci et al. 2015).

1.2.5.2 Chemotherapie

Nach kurativer Resektion sollte eine Chemotherapie etwa sechs Wochen postoperativ für eine Dauer von sechs Monaten eingeleitet werden. Die geläufigsten Chemotherapeutika sind derzeit die Pyrimidin-Antagonisten Gemcitabin und 5-Fluoruracil (5-FU). Zwischen diesen beiden konnte kein Unterschied in Hinsicht auf das progressionsfreie Überleben, sowie Gesamtüberleben und die Lebensqualität nachgewiesen werden (Neoptolemos, John P. et al. 2010). In einer großen multizentrischen Studie konnte zuletzt ein Vorteil im Gesamtüberleben im Vergleich zwischen einer Gemcitabin-Monotherapie und einer Kombinationstherapie von Gemcitabin und Capecitabin gezeigt werden (Neoptolemos et al. 2017). Studien zum Einsatz und Nutzen von FOLFIRINOX (5-FU/Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin) einerseits und Gemcitabin in Kombination mit nab-Paclitaxel andererseits im Vergleich zur Monotherapie mit Gemcitabin werden derzeit durchgeführt (Neuzillet et al. 2015) und sind bisher nicht abgeschlossen (Stand Januar 2019, NCT01526135, NCT01964430). Die Anwendung einer neoadjuvanten Chemotherapie sollte derzeit nur im Rahmen von Studien durchgeführt werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2013). Ob eine zusätzliche Radiotherapie sinnvoll ist, ist Gegenstand derzeitiger Diskussionen. Bisher konnte nur ein Vorteil für Patienten mit R1-Resektion und/oder positivem Lymphknotenstadium nachgewiesen werden (Stocken et al. 2005; Liu et al. 2015; McDonald et al. 2015).

Von einer palliativen Situation und Behandlung spricht man beim Vorliegen von Metastasen oder einem sehr fortgeschrittenem/nicht-resektablen Tumor. Sobald Metastasen nachgewiesen sind, sollte eine palliative Therapie mit Gemcitabin oder auch Gemcitabin in Kombination mit Erlotinib eingeleitet werden (Moore et al. 2007; Neuzillet et al. 2015). Für bestimmte Patientengruppen kann eine Behandlung mit FOLFIRINOX (Conroy et al. 2011) oder eine Kombinationstherapie mit Gemcitabin und nab-Paclitaxel von Vorteil sein (Hoff et al. 2013).

1.3 Die molekulare Pathogenese des Pankreaskarzinoms

Die molekulare Pathogenese des duktales Adenokarzinom des Pankreas gestaltet sich sehr vielseitig und komplex. Eine globale Genomanalyse zeigte, dass mindestens zwölf verschiedene Signalwege dysreguliert sind und genomischen Veränderungen unterliegen (Jones et al. 2008). Mutationen in Onkogenen wie *KRAS* liegen bei etwa 90 % der duktales Adenokarzinome vor (Almoguera et al. 1988). In der Embryonalentwicklung bedeutsame Signalwege wie der Hedgehog-Signalweg und die WNT-Signalwege sind ebenso häufig dysreguliert und abnorm aktiviert (Morris, 4th. et al. 2010; Clevers und Nusse 2012). Präkanzerosen zeigen dabei häufig ähnliche Mutationen wie sie beim duktales Adenokarzinom zu finden sind (Neuzillet et al. 2015). Die drei häufigsten Präkanzerosen sind die pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN), die intraduktal papillär muzinöse Neoplasie (IPMN) und die muzinös zystische Neoplasie (MCN) (Lennon et al. 2014). Diese drei Läsionen folgen einer Adenom-Karzinom-Sequenz ähnlich der des Kolonkarzinoms (Vogelstein et al. 1988). Häufig finden sich im duktales Adenokarzinom des Pankreas ebenso Mutationen von Tumorsuppressorgenen, wie beispielsweise *p53* (Redstone 1994) und *DPC4* (*Smad4*) (Schutte 1996). Auch der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) zeigt sich überexprimiert (Cohenuram und Saif 2007).

1.3.1 Die Familie der WNT-Proteine und die WNT-Signalwege

Die Familie der WNT-Proteine gehört zur Gruppe der Wachstumsfaktoren. Sie werden von Epithelzellen sezerniert, entfalten ihre Wirkung para- oder autokrin und sind an zahlreichen zellulären Prozessen, wie Proliferation, Apoptose, Differenzierung und Migration beteiligt (Miller 2001).

Es handelt sich um lipidmodifizierte, cysteinreiche Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 39–46 kDA, die in Wirbeltieren und Nicht-Wirbeltieren, jedoch nicht in Pflanzen und Bakterien exprimiert werden (Miller 2001). Erste Erwähnung fand die WNT-Familie in den 1970er Jahren, als man herausfand, dass durch eine Mutation des Wingless-Gens (*Wg* = wingless, englisch: flügellos) eine flügellose Variante der Fliegenart *Drosophila melanogaster* entsteht (Nüsslein-Volhard und Wieschaus 1980; Rijsewijk et al. 1987). 1982 wurde das „*Int1*“-Gen (*Int* = Integration site) als Homolog bei Menschen und Mäusen entdeckt, wobei man herausfand, dass es als Proto-Onkogen in viral induziertem Brustkrebs bei Mäusen eine Rolle spielt (Nusse und Varmus 1982). Der Terminus WNT entstand aus einer Verknüpfung der beiden ursprünglichen Bezeichnungen: Das „W“ von *Wg* und „nt“ von *Int*. (Nusse et al. 1991). Die Einteilung der einzelnen Mitglieder der WNT-Familie erfolgt durch eine Nummerierung, wobei sie insgesamt zwölf Mitglieder bei 19 bekannten WNT-Genen umfasst

(Nusse und Varmus 2012, The Wnt homepage: <http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>).

WNT-Proteine binden an verschiedene Rezeptoren; darunter Frizzled-Rezeptoren (Fzd), „receptor tyrosine kinase-like orphan receptors“ (ROR) und „low-density lipoprotein receptor-related protein co-receptors“ (LRP). Je nach WNT-Protein, Rezeptor und Zelltyp kommt es zur Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden (Asem et al. 2016). Es können zwei verschiedene Signalwege unterschieden werden: der kanonische β -Catenin abhängige Signalweg und mehrere nicht-kanonische β -Catenin unabhängige Signalwege. Ursprünglich wurden die WNT-Proteine entsprechend in solche, die den kanonischen und solche, die den nicht-kanonischen Signalweg aktivieren, eingeteilt (McDonald und Silver 2009). Diese Einteilung wird jedoch nach und nach verlassen, da festgestellt wurde, dass einzelne Mitglieder der WNT-Familie, wie bspw. WNT3A und WNT5A, doch in der Lage sind sowohl den kanonischen als auch den nicht-kanonischen Signalweg zu stimulieren (Ford et al. 2013). β -Catenin unterliegt in Abwesenheit von WNT-Proteinen einem permanenten Abbau durch ein Proteasom, welches das Molekül anhand dessen Ubiquitynylierung erkennt. Unabdingbar für die Ubiquitynylierung ist die Phosphorylierung des β -Catenins durch einen „Destruction Complex“ (Zerstörungskomplex), der aus Glykogen-Synthase Kinase 3 β (GSK3 β), Adenomatous polyposis Coli (APC) und Axin gebildet wird. Durch die Aktivierung des kanonischen Signalweges über Bindung von einem der 19 WNT-Proteine an den Fzd-LRP5/6-Rezeptorkomplex kommt es zur Rekrutierung von Axin und Dishevelled-Protein (Dvl) hin zur Plasmamembran. Dies führt zur Destabilisierung des „Destruction Complex“. Auf diese Weise wird der Abbau von β -Catenin verhindert, es akkumuliert und gelangt in den Nukleus, wo es die Transkriptionsfaktoren TCF (T-cell factor) und LEF (lymphoid enhancer factor) aktiviert, die wiederum an der Expression von WNT-Zielgenen beteiligt sind (Abbildung 4) (Asem et al. 2016; Ford et al. 2013). Neben einer tragenden Rolle in der Regulation von Zellzyklus, Wachstum und Proliferation (Clevers und Nusse 2012), trägt dieser Signalweg bei Dysregulation auch zur Entstehung und Progression von Malignomen bei (McDonald und Silver 2009; Giles et al. 2003).

Die nicht-kanonischen Signalwege werden auch als β -Catenin unabhängige Signalwege bezeichnet und sind insgesamt weniger gut erforscht als der kanonische Signalweg. Zu den gut beschriebenen Signalwegen gehören der planar cell polarity-Signalweg (PCP) und der WNT/Ca²⁺-Signalweg. Auch die Interaktion von WNT5A und ROR2 gehört in diese Gruppe. Die nicht-kanonischen Signalwege spielen vor allem bei Zellmigration und -polarität eine wichtige Rolle und können eine antagonisierende Wirkung auf den kanonischen Signalweg ausüben (Abbildung 4) (Miller 2001; Minami et al. 2010).

Abbildung 4: WNT-Signaling (bearbeitet aus Ford et al. 2013). Die WNT-Signalwege werden in kanonisch und nicht-kanonisch eingeteilt. A) Durch die Bindung eines WNT-Proteins an einen der Frizzled-Rezeptoren in Anwesenheit des Korezeptors LRP5 oder 6 kommt es zur Aktivierung des kanonischen Signalweges. Durch Destabilisierung des „Destruction Complex“ bestehend aus APC, GSK3 β und Axin kommt es zur Akkumulation von β -Catenin. Dieses gelangt in den Nucleus, wo es die Transkriptionsfaktoren TCF und LEF aktiviert, die wiederum an der Expression von WNT-Zielgenen beteiligt sind. B) In der Abwesenheit von WNT-Proteinen wird β -Catenin durch den „Destruction Complex“ phosphoryliert, so ubiquitinyliert und durch ein Proteasom abgebaut. C) Der nicht-kanonische Signalweg kann einerseits durch die Bindung von WNT-Proteinen an einen der Frizzled-Rezeptoren zur Aktivierung des PCP-Signalweges oder des WNT/Ca²⁺-Signalweges initiiert werden und führt so zur Inhibition des kanonischen Signalweges. Außerdem kann WNT5A über die Bindung an ROR2 oder an einen Frizzled-Rezeptor den nicht-kanonischen Signalweg aktivieren und ebenso zur Inhibition des kanonischen Signalweges führen.

1.3.2 WNT5A

WNT5A wurde ursprünglich als Ligand, der die nicht-kanonischen Signalwege aktiviert, identifiziert. Mittlerweile ist jedoch klar, dass abhängig vom zellulären Kontext und Rezeptorstatus, auch eine Aktivierung des kanonischen Signalweges möglich ist (Abbildung 4) (McDonald und Silver 2009; Asem et al. 2016). Einerseits führt die Bindung von WNT5A an ROR2 zur Aktivierung des nicht-kanonischen Signalweges und somit zur Inhibition des

kanonischen Signalweges; andererseits konnte gezeigt werden, dass WNT5A ebenso in der Abwesenheit von ROR2 über Frizzled-4/LRP-5 den kanonischen Weg stimulieren kann (Abbildung 4) (Mikels und Nusse 2006; Ford et al. 2013). Die Abhängigkeit der Wirkung von WNT5A vom Rezeptorstatus ist möglicherweise eine Erklärung für seine paradoxe Wirkung als Ligand mit einerseits tumorsupprimierender andererseits onkogenetischer Funktion (McDonald und Silver 2009).

WNT5A weist zudem zwei verschiedene Isoformen auf, da das entsprechende WNT5A-Gen für unterschiedliche Proteine codiert: eine lange Isoform mit 337 Aminosäuren (WNT5A-L) und eine kurze Isoform mit 319 Aminosäuren (WNT5A-S). Während WNT5A-S Zellproliferation fördert, hat WNT5A-L eine inhibierende Wirkung auf diese (Bauer et al. 2013).

Außerdem hat WNT5A eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung inne. So konnte im Experiment mit Mäusen gezeigt werden, dass ein WNT5A-Knockdown zu perinatalem Tod durch mangelnde skelettale Entwicklung führt (Yamaguchi et al. 1999; Minami et al. 2010).

Eine geringe WNT5A-Expression wurde in zahlreichen Tumorentitäten, wie zum Beispiel dem Kolorektalen Karzinom (Dejmek 2005), Neuroblastom (Blanc et al. 2005), Mammakarzinom (Jönsson et al. 2002; Dejmek et al. 2005) und Leukämien (Ying et al. 2007) nachgewiesen und war mit einem geringeren Überleben assoziiert (McDonald und Silver 2009). Im Schilddrüsenkarzinom geht eine geringe Expression von WNT5A mit einem schlecht differenzierten Tumorgrad einher (Kremenevskaja et al. 2005) und im Adenokarzinom des Ösophagus zeigt sich eine geringere WNT5A-Expression bei fortgeschrittenen Tumoren (Lyros et al. 2016). Aus diesen Arbeiten lässt sich schließen, dass eine Suppression von WNT5A, Einfluss auf Karzinogenese und Progression hat und eine erhöhte Expression protektiv zu sein scheint. Zumindest könnte dies für Tumoren mit aktiviertem kanonischen Signalweg gelten, da hier die über WNT5A vermittelte Inhibition von Zellwachstum und -migration wegfiel (McDonald und Silver 2009; Mikels und Nusse 2006).

In anderen Tumorentitäten wurde eine erhöhte WNT5A-Expression mit einem onkogenetischen Potential assoziiert. Dazu gehören unter anderem das Melanom (Da Forno et al. 2008), das Magenkarzinom (Kurayoshi et al. 2006), das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (Huang et al. 2005) und das Prostatakarzinom (Wang et al. 2007). Eine erhöhte Expression konnte in einigen Fällen ebenso mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium assoziiert werden, wie in anderen Fällen eine geringere Expression (Kurayoshi et al. 2006; Da Forno et al. 2008).

1.3.3 ROR2

Der ROR2-Rezeptor („receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2“) gehört zur Gruppe der Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK). RTKs stellen als Oberflächenrezeptoren eine Bindungsstelle

für zahlreiche Wachstumsfaktoren und Hormone dar. Sie sind an der Regulation einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie Wachstum, Differenzierung, Adhäsion, Motilität und Zelltod beteiligt, konnten aber auch in der Tumorgenese als entscheidende Mediatoren identifiziert werden (Robinson et al. 2000). Einige Mitglieder, u. a. der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR), wurden als Zielstrukturen für die Therapie von zahlreichen Tumorentitäten entdeckt und erfolgreich genutzt. Dazu gehören beispielsweise das Mammakarzinom, Gastrointestinale Stromatumore und das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (Gschwind et al. 2004).

Bisher wurden insgesamt 90 Gene für Tyrosinkinasen gefunden. Von diesen kodieren 58 für Rezeptoren, die wiederum in 20 Subgruppen geteilt wurden. Gruppe 12 vereint bei Säugetieren die Mitglieder der ROR-Familie, zu der ROR1 und ROR2 gehören, wobei die ROR-kodierenden Gene auf den Chromosomen 1 und 9 gelegen sind (Robinson et al. 2000). Nach ihrer Entdeckung in Neuroblastom-Zelllinien im Jahr 1992 (Masiakowski und Carroll 1992), bezeichnete man sie zunächst als „orphan receptors“ (englisch: verwaiste Rezeptoren), da man nicht wusste, welche Liganden sie binden (Rebagay et al. 2012).

ROR2 besitzt einen extrazellulären, transmembranären und intrazellulären/zytoplasmatischen Anteil. Die extrazelluläre Region besteht aus einer „cystein-rich domain“ (CRD), einer „membrane-proximal kringle domain“ und einer „immunglobuline (Ig)-like domain“. Intrazellulär setzt sich der Rezeptor aus einer „tyrosin kinase domain“ (TK domain), einer „proline rich domain“ (PRD) und zwei die PRD flankierende „serine/threonine rich domains“ (S/TRD 1 und 2) zusammen (Minami et al. 2010; Debebe und Rathmell 2015). Abhängig vom zellulären Kontext und Rezeptorausstattung fungiert ROR2 vor allem als Rezeptor für WNT5A und führt so zur Aktivierung des nicht-kanonischen Signalweges (Stricker et al. 2017). Es konnte auch gezeigt werden, dass ROR2 möglicherweise in die Aktivierung des kanonischen Signalweges involviert ist (Henry et al. 2015) und bei Bindung von WNT3A an die „cystein rich domain“ (CRD) eben dieser aktiviert wird (Debebe und Rathmell 2015).

ROR2 ist vor allem während der physiologischen Entwicklung hoch exprimiert und im adulten Gewebe supprimiert. Seine Rolle im adulten Gewebe ist bisher wenig verstanden (Debebe und Rathmell 2015). ROR2 hat eine wichtige Rolle in der morphogenetischen Entwicklung inne, vor allem der des Skeletts. Im Mausmodell führt ein Fehlen von ROR2 zu Kleinwuchs, verkürzten Extremitäten, facialen Abnormalitäten, Lungendysfunktion und ventrikulären Septumdefekten mit dem Ergebnis des neonatalen Versterbens (Oishi et al. 2003). Mutationen des Rezeptors beim Menschen führen zu Brachydaktylie Typ B mit Hypoplasie oder Aplasie der distalen Phalangen (Afzal et al. 2000; Afzal und Jeffery 2003). Eine weitere Erkrankung, die mit einer Mutation von ROR2 einhergeht, ist das Robinow-Syndrom, welches durch schwere skelettale Dysplasien und ebenso facialen Abnormalitäten gekennzeichnet ist (van Bokhoven et al. 2000).

Zahlreiche Studien belegen eine Hochregulierung von ROR2, beispielsweise in Osteosarkom (Morioka et al. 2009) und Nierenzellkarzinomzelllinien (Wright et al. 2009). Auch im Melanom (O'Connell et al. 2010) und Prostatakarzinom (Yamamoto et al. 2010) zeigt sich ROR2 hoch exprimiert und geht mit verstärkten Proliferations- und Migrationsverhalten einher. Außerdem ist eine verstärkte Expression beim Leiomyosarkom und Gastrointestinalen Stromatumoren mit einem schlechteren klinischen Ergebnis assoziiert (Edris et al. 2012). Im Gegensatz dazu ist ROR2 im Magenkarzinom verglichen zu gesundem Magengewebe herunterreguliert. Eine hohe Expression geht mit einer Inhibition von Proliferation und verminderter Aktivität des kanonischen Signalweges einher, sodass ROR2 in dieser Tumorentität eine protektive Rolle zugeschrieben wird (Yan et al. 2016). Im Gegensatz dazu ist der Rezeptor im Medulloblastom hoch exprimiert und wurde in diesem Fall als Parameter mit guter Prognose identifiziert (Lee et al. 2013). Es wird deutlich, dass ROR2 scheinbar abhängig von der Tumorentität und auch molekularen Gegebenheiten eine Rolle als Tumorsuppressor, aber eben auch als Rezeptor mit onkogenetischen Potential besitzt.

1.3.4 Der WNT5A/ROR2-Signalweg

WNT5A ist der primäre Ligand von ROR2 und ihre gemeinsame Interaktion führt zur Aktivierung des nicht-kanonischen Signalweges. Dabei bindet WNT5A an die extrazelluläre „cystein rich domain“ (CRD) (Mikels und Nusse 2006; Stricker et al. 2017). Bei Aktivierung dieses Signalweges kommt es zur Inhibition des kanonischen Signalweges (Mikels und Nusse 2006). Ebenso hat dieser Signalweg über Aktivierung von c-Jun N-terminale Kinasen (JNK) und Aktin-bindenden Filamin A (FLNa) einen Einfluss auf Zellmigration. Das Dishevelled-Protein (Dvl) und die atypische Proteinkinase C (aPKC) sind dabei als Regulatoren involviert, allerdings ist bisher nicht genau klar, in welchem Ausmaß (Abbildung 5) (Minami et al. 2010).

Der nicht-kanonische, über WNT5A/ROR2, vermittelte Signalweg wurde bereits in einigen Tumorentitäten untersucht. Davon seien hier zum einen das Adenokarzinom des Ösophagus genannt, in dem sich eine geringe WNT5A-Expression bei gleichzeitig stark exprimierten ROR2 zeigte. Lyros et al. vermuten eine WNT5A unabhängige Aktivierung von ROR2, die mit Zellproliferation und -migration einhergeht und ROR2 somit ein onkogenetisches Potential zusprechen (Lyros et al. 2016). Zum anderen zeigen sich WNT5A und ROR2 im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom hochreguliert und als unabhängige prognostische Parameter, die mit einem schlechten Überleben assoziiert sind (Lu et al. 2015).

Abbildung 5: Model der WNT5A/ROR2-Interaktion (Minami et al. 2010). WNT5A bindet an die CRD von ROR2 und über die Aktivierung von c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) und Aktin-bindenden Filamin A (FLNa) nimmt die Interaktion von WNT5A/ROR2 Einfluss auf die Zellmigration.

1.4 Rationale

Der genaue Mechanismus des WNT5A/ROR2-Signalweges und seine Rollen in der Tumorgenese sind komplex und offensichtlich abhängig von vielen Faktoren. Die klinische Bedeutung im duktalem Adenokarzinom des Pankreas ist bisher insgesamt nur wenig untersucht. Eine Studie aus dem Jahr 2015 zeigt eine Hochregulierung von ROR2 im duktalem Adenokarzinom des Pankreas und fand hierbei hinsichtlich der Expression einen Überlebensvorteil für diejenigen Patienten mit niedriger Expression im Tumor (Huang et al. 2015). Eine Analyse zur Expression von WNT5A im Pankreaskarzinom zeigte bei erhöhter Expression im Tumorgewebe keinen klinisch relevanten Einfluss. *In-vitro*-Experimente belegen jedoch, dass eine WNT5A-Überexpression zu verstärktem Invasions- und Migrationsverhalten sowie einer Induktion von Epithelial-Mesenchymaler Transition, die für eine bedeutende Rolle im Metastasierungsverhalten bekannt ist, führt (Bo et al. 2013).

Der kanonische Signalweg ist im Pankreaskarzinom aktiviert und fördert den Tumorprogress, wobei WNT5A zumindest auf molekularer Ebene eine wichtige Bedeutung zukommt (Ripka et al. 2007). Welche Rolle die Interaktion von WNT5A und ROR2 einnimmt, inwieweit der nicht-kanonische Signalweg aktiv ist und wie sich die Signalwege gegenseitig beeinflussen ist nicht geklärt und die Datenlage für eine abschließende Klärung der Rolle des WNT5A/ROR2-Signalweges nicht ausreichend.

Zum besseren Verständnis der Rollen von WNT5A und ROR2 im duktalem Adenokarzinom des Pankreas sind daher ausführlichere Untersuchungen nötig. Das Ziel dieser Arbeit war einerseits die weitere Analyse der klinischen Relevanz von WNT5A und ROR2 und andererseits die Überprüfung auf Reproduzierbarkeit der bereits existierenden Daten unter Verwendung eines mitteleuropäischen Kollektivs.

1.5 Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Wie ist das Patientenkollektiv im Vergleich zu ähnlichen Studien charakterisiert?
2. Wie stellt sich die Expression von WNT5A und ROR2 immunhistochemisch im duktalem Adenokarzinom des Pankreas in den Kompartimenten Tumor, Stroma und gesundem Gewebe dar?
3. Korrelieren die Expressionsmuster von WNT5A und ROR2 miteinander?
4. Besteht ein Zusammenhang zwischen den Expressionsmustern und klinisch-pathologischen Parametern der Patienten?
5. Wirkt sich das Expressionsmuster auf das Überleben der Patienten aus? Hinsichtlich der Expressionsstärke und in weiteren Subgruppen.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

In der vorliegenden Arbeit wurden Tumorproben von insgesamt 117 Patienten analysiert. Diese wurden im Zeitraum von 2001 bis 2013 im Rahmen chirurgischer Interventionen in der Klinik für Viszeral-, Gefäß-, Thorax-, und Transplantationschirurgie des Universitätsklinikums Leipzig gewonnen und im Institut für Pathologie, ebenso Universitätsklinikum Leipzig, aufbewahrt. Bei allen Tumoren handelt es sich um duktales Adenokarzinome des Pankreas. Das Patientenkollektiv umfasst 72 Männer und 45 Frauen mit einem medianen Alter von 66 Jahren. Alle Proben wurden immunhistochemisch mit Antikörpern gegen ROR2 und WNT5A charakterisiert (Ethikvotum Aktenzeichen 234/14-ek).

2.2 Datenerfassung und Datenbank

Die Daten der Patienten wurden aus den stationären und ambulanten Akten, sowie dem klinikinternen elektronischen Dokumentationssystem entnommen und in eine MS Access Datenbank übertragen (Tabelle 5).

Tabelle 5: Basisdaten der Patienten

Basisdaten
Geschlecht
Alter bei der Operation
Histologie
TNM-Klassifikation
Lymphgefäßinvasion (L)
Veneninvasion (V)
Perineurale Invasion (Pn)
Resektion (R)
Grading (G)
UICC 7.0
Verlauf
Rezidiv Metastase
Rezidiv Lokal
Todesdatum/Datum letzter Kontakt
Adjuvante Chemotherapie

Das Follow-Up wurde in Telefongesprächen mit den behandelnden Hausärzten, den Patienten selbst oder Angehörigen vervollständigt und am 30.09.2016 beendet.

2.3 Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden verwendet (Tabelle 6):

Tabelle 6: Chemikalien

Bezeichnung	Quelle
Bovin Serum Albumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe
1,4-Diaminobenzol (DAB)	Sigma, Taufkirchen
Ethanol 100 %	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
H ₂ O ₂ , 3 %	Carl Roth, Karlsruhe
Hämalaun	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Mountex-Eindeckmedium	Medite, Burgdorf
Normal-Goat-Serum (NGS)	Dianova, Hamburg
Phosphate buffered saline (PBS)	abcam®, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Tris buffered saline (TBS)	abcam®, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Tween®20	Carl Roth, Karlsruhe
Xylol	J. T. Baker, Deventer, Niederlande

2.4 Verbrauchsmaterialien

Folgenden Verbrauchsmaterialien wurden verwendet (Tabelle 7):

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Quelle
Messer/Microtome Blade	ThermoScientific, Braunschweig
Objektträger und Deckgläser/Menzelgläser	ThermoScientific, Braunschweig
Pipetten	Gilson/Pipetman, Villiers Le Bel, Frankreich
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Dako Pen (Fettstift)	Dako, Hamburg

2.5 Geräte

Folgende Geräte wurden verwendet (Tabelle 8):

Tabelle 8: Geräte

Bezeichnung	Quelle
Kamera Mikroskop/AxioCam MRc5	Carl Zeiss, Jena
Laborwaage	Mettler-Toledo, Gießen
Lichtmikroskop/Axio	Carl Zeiss, Jena
Mikrotom/Microm HM355S	ThermoScientific, Braunschweig
pH-Meter	inoLab® WTW, Weilheim
Tischzentrifuge	ThermoScientific, Braunschweig
Vortex	UniEquip, Martinsried bei München
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik (GFL), Burgwedel

2.6 Antikörper Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Untersuchung der Tumoren wurden Primärantikörper zum Nachweis von ROR2 und WNT5A verwendet (Tabelle 9).

Tabelle 9: Herkunft und Verdünnung der Primärantikörper

Primär-antikörper	Klasse	Host	Bestell-nummer	Quelle	Verdün-nung	Substrat
ROR2	Polyklonal	Rabbit	PA5-14727	Thermo Fisher Scientific	1:100	BSA/PBS
WNT5A	Monoklonal (3D10)	Mouse	MA5-15511	Thermo Fisher Scientific	1:200	BSA/PBS

Folgende Positiv- und Negativkontrollen wurden verwendet (Tabelle 10, Abbildung 6):

Tabelle 10: Positiv- und Negativkontrollen

Primärantikörper	Positivkontrolle	Negativkontrolle
ROR2	Nierenzellkarzinom	Fettgewebe
WNT5A	Lymphknoten (Histiozyten)	Fettgewebe

Abbildung 6: Darstellung der Positiv- und Negativkontrollen. A) Nierenzellkarzinom: Positivkontrolle für ROR2. B) Histiozyten im Lymphknoten: Positivkontrolle für WNT5A. C) Fettgewebe: Negativkontrolle für ROR2 und WNT5A. Der Balken entspricht auf allen Aufnahmen 200 µm.

Folgende Sekundärantikörper wurden verwendet (Tabelle 11):

Tabelle 11: Herkunft Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Spezifität	Quelle
Anti-Rabbit IgG	Ziege	Dianova, Hamburg
Anti-Mouse IgG	Ziege	Dianova, Hamburg

2.7 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) stellt eine Routinefärbung in der Histologie dar. Sie dient der Darstellung von Gewebestrukturen im Schnitt durch den Kernfarbstoff Hämatoxylin und Kontrastierung durch den Plasmafarbstoff Eosin. Für jede Probe wurde zur Übersicht eine HE-Färbung angefertigt (Abbildung 7). Dies geschah freundlicherweise im Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Leipzig. Protokoll siehe Tabelle 12.

Abbildung 7: Darstellung der HE-Färbung. A) Gesundes Gewebe Pankreas. B) Tumor und Stroma im duktalem Adenokarzinom des Pankreas. Der Balken entspricht auf allen Aufnahmen 200 µm.

Tabelle 12: Durchführung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Arbeitsschritt	Zeit
Entparaffinieren und Rehydrieren	siehe Tabelle 13
Aqua dest.	5 min
Hämalaun	6 min
Leitungswasser	6 min
Eosin (halb wässrig, halb alkoholisch 70 %)	2 min
Leitungswasser	30 s
Entwässern (aufsteigende Alkoholreihe, umgekehrt Tabelle 13)	siehe Tabelle 13
Eindecken mit Mountex	

2.8 Immunhistochemie

Als Immunhistochemie bezeichnet man eine Methode zur direkten oder indirekten Visualisierung von Zellantigenen. Bei der indirekten Immunhistochemie bindet ein Primärantikörper spezifisch an ein Zellantigen. Ein mit einem Enzym versehener Sekundärantikörper bindet dann an den Primärantikörper und kann durch eine Enzym-Substrat-Reaktion in Gegenwart einer chromogenen Komponente indirekt die Primärantikörperbindung visualisieren.

2.8.1 Probenaufbereitung

Von den entsprechenden in Paraffin eingebetteten Tumorproben wurden mittels eines Schlittenmikrotoms 5 µm dicke Schnitte angefertigt, auf einen Objektträger gezogen und mindestens 6 Stunden in einem 37 °C warmen Inkubator getrocknet. Die Aufbewahrung der geschnittenen Proben erfolgte bei Raumtemperatur.

2.8.2 Durchführung der Färbung

In einem ersten Schritt wurden die Schnitte der Proben in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (Tabelle 13). Nachdem die Proben mit TBS-Tween® gewaschen wurden, folgte die Behandlung mit 3%iger H₂O₂-Lösung. Dieser Schritt ist wichtig, um die Peroxidaseaktivität des Gewebes zu blockieren und eine unerwünschte Hintergrundfärbung zu vermeiden. Im Anschluss daran wurde wieder mit TBS-Tween® gewaschen und jeder einzelne Schnitt mit einem DAKO-Pen umrandet. Nun folgte das Blockieren unspezifischer Bindungen mit 5%igem in PBS verdünntem Normal-Goat-Serum. Nach Abziehen des Normal-Goat-Serums, erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper über Nacht. Dafür wurden die Schnitte in feuchten Kammern gelagert.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte zunächst wieder mit TBS-Tween® gewaschen und anschließend der jeweilige Sekundärantikörper aufgetragen. Danach wurde ein weiterer Waschgang durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit DAB, welches durch das Auslösen einer enzymatischen Reaktion am Ort der Bindung des Primärantikörpers eine bräunliche Färbung hervorrief. Mittels Lichtmikroskop wurde die gewünschte Farbintensität kontrolliert und zum entsprechenden Zeitpunkt je nach Antikörper (5 min für WNT5A und 6 min für ROR2) mit Aqua dest. gestoppt. Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte mit Hämalaun und das nachfolgende Bläuen mit Leitungswasser. Hiernach wurden die Schnitte zum Entwässern in einer aufsteigenden Alkoholreihe (umgekehrte Reihenfolge siehe Tabelle 13) behandelt und abschließend mit Mountex-Eindeckmedium abgedeckt. Die Lagerung erfolgte bei

Raumtemperatur. Pro Durchgang wurden 14 Proben und je ein Schnitt der entsprechenden Positiv- und Negativkontrolle (Tabelle 10) gefärbt.

Die Zeiten der Arbeitsschritte sind Tabelle 14 zu entnehmen. Ist keine Temperatur angegeben, so fanden die Arbeitsschritte bei Raumtemperatur statt.

Tabelle 13: Entparaffinieren und Rehydrieren

Arbeitsschritt	Zeit
Xylol	2 x 3 min
absolut vergälltes Ethanol	1 x 3 min
96 % vergälltes Ethanol	1 x 3 min
80 % vergälltes Ethanol	1 x 3 min
70 % vergälltes Ethanol	1 x 3 min

Tabelle 14: Durchführung der immunhistochemischen Färbung

	Arbeitsschritt	Zeit
1. Tag	Entparaffinieren und Rehydrieren	siehe Tabelle 13
	Waschen mit TBS-Tween®	3 x 2,5 min
	Peroxidblock (3 % H ₂ O ₂ -Lösung)	20 min, 4 °C
	Waschen mit TBS-Tween®	3 x 2,5 min
	Umrandung mit DAKO-Pen	
	Block unspezifischer Bindungen mit Normal-Goat-Serum	20 min
	Primärantikörper (Tabelle 9)	über Nacht, 4 °C
2. Tag	Waschen mit TBS-Tween®	5 x 2,5 min
	Sekundärantikörper (Tabelle 11)	1 h
	Waschen mit TBS-Tween®	5 x 2,5 min
	Entwicklung der Färbung mit DAB	5 bzw. 6 min
	Stoppen der Reaktion mit Aqua dest.	
	Gegenfärbung mit Hämalaun	45 s
	Bläuen mit Leitungswasser	15 min
	Entwässern (aufsteigende Alkoholreihe, umgekehrt Tabelle 13)	siehe Tabelle 13
	Eindecken mit Mountex	

2.8.3 Auswertung und Kontrolle

Die immunhistochemisch angefärbten Schnitte wurden mit den entsprechenden Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitten unter einem Lichtmikroskop ausgewertet. In Rücksprache mit dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Leipzig wurden dabei jeweils Tumor, Stroma und gesundes Gewebe bewertet. Beurteilt wurde zum einen der Anteil der gefärbten Abschnitte von 0 (keine Färbung) über 35 %, 65 % oder 100 % (gesamter Abschnitt gefärbt). Zum anderen wurde die Intensität der gefärbten Abschnitte bewertet von 0 (keine Färbung), 1 (schwach positiv), 2 (mäßig positiv) oder 3 (stark positiv). Jeder Schnitt erhielt demzufolge zwei Werte, welche zu einem sogenannten Intensity-Percentage-Score (IPS) zusammenmultipliziert wurden. Es konnten Werte von 0–300 erreicht werden.

Anschließend wurde eine Einteilung in positive und negative Expression vorgenommen. Schnitte mit einem Wert von 0–65 wurden als negativ und Schnitte mit einem Wert von 66–300 als positiv bezeichnet (Tabelle 15). Wenn eine unzureichende Anfärbung der Positivkontrolle oder eine Anfärbung der Negativkontrolle vorlag, wurde die immunhistochemische Färbung für den entsprechenden Durchgang wiederholt.

Die Auswertung der Schnitte erfolgte durch drei unabhängige Gutachter. Von den Werten des Anteils der Färbung und Intensität wurde jeweils Mittelwerte gebildet und diese dann letztendlich zur Berechnung des Intensity-Percentage-Scores verwendet.

Tabelle 15: Übersicht der immunhistochemischen Auswertung

Intensität	Anteil (%)	IPS	Qualität
0	0	0	negativ
	35	0	negativ
	65	0	negativ
	100	0	negativ
1	0	0	-
	35	35	negativ
	65	65	negativ (Cut-off)
	100	100	positiv
2	0	0	-
	35	70	positiv
	65	130	positiv
	100	200	positiv
3	0	0	-
	35	105	positiv
	65	195	positiv
	100	300	positiv

2.9 Statistische Verfahren

Die statistische Auswertung und die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm IBM® SPSS® Statistics (Version 24.0.0, IBM®, Armonk, USA).

Zunächst wurden die erhobenen Daten quantitativ beschrieben und prozentuale Häufigkeiten, sowie Median, Minimal- und Maximalwerte dargestellt. Für die statistischen Analysen wurden der Pearson- χ^2 - oder der Fisher's-Exact-Test verwendet. Die Überlebenskurven wurden mit der Methode nach Kaplan-Meier erstellt und mittels des Log-Rank-Tests auf ihre Signifikanz geprüft. Für die Multivarianzanalyse wurde die COX-Regressionsanalyse angewandt. Zum Vergleich der Expressionsmuster in den abhängigen Gruppen Tumor, Stroma und gesundem Gewebe wurde der Wilcoxon-Test verwendet und die Korrelation der Expressionsmuster beider Färbungen wurde mittels Korrelationsanalyse nach Spearman überprüft.

Das Signifikanzniveau wurde für alle Analysen auf $p \leq 0,05$ festgesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Deskription Patientenkollektiv

3.1.1 Alters- und Geschlechterverteilung

Das Kollektiv bestand aus insgesamt 117 Patienten, davon waren 45 (38,5 %) Frauen und 72 (61,5 %) Männer mit einem medianen Alter vor der Operation von 66 Jahren (Range 40–84 Jahre, Tabelle 16). Dabei waren 40 (34,2 %) Patienten ≤ 60 Jahre alt und 70 (68,24 %) Patienten > 60 Jahre alt. Frauen erkrankten mit einem medianen Alter von 66 Jahren und Männer mit einem medianen Alter von 65 Jahren.

Tabelle 16: Alters- und Geschlechterverteilung

Charakteristika	Patientenzahl	%
Gesamt	117	100
Alter		
Median	66	
Min./ Max.	40–84	
Geschlecht		
Weiblich	45	38,5
Männlich	72	61,5

Alle Patienten unterzogen sich einer operativen Therapie. Eine Operation nach Kausch-Whipple wurde bei 53 Patienten durchgeführt, einer PPPD unterzogen sich 50 Patienten, zwölf Patienten erhielten eine Pankreaslinksresektion und zwei Patienten eine totale Pankreatektomie. Neun Patienten wurden trotz eines M1-Status operiert. Bei sieben Patienten wurde erst intraoperativ eine Oligometastasierung festgestellt. Bei einem dieser sieben Patienten sollte die Operation auch der effektiven Schmerztherapie dienen. Zwei Patienten wurden auf Grund ihres jungen Alters operiert. Keiner der Patienten erhielt eine neoadjuvante Chemotherapie. 50/117 (42,7 %) Patienten bekamen eine adjuvante Chemotherapie des Primarius und 16/117 (13,7 %) wurden mit einer palliativen Chemotherapie behandelt.

3.1.2 TNM-Klassifikation und UICC-Stadien

Die Verteilung des Patientenkollektives auf die TNM-Klassifikation ist in Tabelle 17 zu sehen. Es ist anzumerken, dass auf Grund kleiner Fallzahlen in der Kategorie pT jeweils pT1 (n=4) und pT2 (n=20) sowie pT3 (n=90) und pT4 (n=3) für weitere Analysen zu einer Gruppe zusammengefasst wurden. Das Gleiche geschah in der Kategorie Grading, wobei G1 (n=1) und G2 (n=55) in einer Gruppe vereint wurden. Es konnten nicht für alle Patienten pM-, L-, V- sowie ein Pn-Status in den Akten gefunden werden.

Tabelle 17: Verteilung Patientenkollektiv auf die TNM-Klassifikation

TNM- Klassifikation	Patientenzahl	%
Gesamt	117	100
pT		
pT1	4	3,4
pT2	20	17,1
pT3	90	76,9
pT4	3	2,6
pN		
pN0	35	29,9
pN1	82	70,1
pM		
pM0	40	34,2
pM1	9	7,7
Fehlend	68	58,1
Lymphgefäßinvasion (L)		
L0	17	14,5
L1	91	77,8
Fehlend	9	7,7
Veneninvasion (V)		
V0	75	64,1
V1	30	25,6
Fehlend	12	10,3
Perineurale Invasion (Pn)		
Pn0	15	12,8
Pn1	78	66,7
Fehlend	24	20,5
Resektion (R)		
R0	91	77,8
R1	24	20,5
R2	2	1,7
Grading (G)		
G1	1	0,9
G2	55	47,0
G3	61	52,1
G4	0	0

Die Verteilung des Patientenkollektives auf UICC-Stadien ist Tabelle 18 zu entnehmen. Es ist anzumerken, dass obwohl laut Tabelle 17 nur neun Patienten eine Fernmetastasierung aufwiesen, in Tabelle 18 zehn Patienten einem UICC-Stadium IV zugewiesen wurden. Laut pathologischem Befund wurde eine Patientin dem Stadium IV zugeordnet, obwohl ihr Metastasen-Status als pMX bezeichnet wurde. Diese Bezeichnung wird in der aktuellen TNM-Klassifikation nicht mehr verwendet.

Weiterhin ist darauf hinzuweisen, dass auf Grund niedriger Fallzahlen in weiteren Analysen nur die UICC-Stadien IIa (n=27) und IIb (n=70) betrachtet wurden.

Tabelle 18: Verteilung Patientenkollektiv auf die UICC-Stadien

UICC 7.0	Patientenzahl	%
Gesamt	117	100
Stadien		
Ia	1	0,9
Ib	5	4,3
IIa	27	23,1
IIb	70	59,8
III	4	3,4
IV	10	8,5

3.1.3 Rezidive

Das Auftreten von Rezidiven wurde eingeteilt in das Rezidivaufreten in Form von Metastasen und das Rezidivaufreten in Form von Lokalrezidiven (Tabelle 19).

Tabelle 19: Rezidive

Rezidiv	Patientenzahl	%
Gesamt	117	100
Rezidiv Metastase		
Ja	41	35,0
Nein	76	65,0
Lokalrezidiv		
Ja	22	18,8
Nein	95	81,2

3.1.4 Chemotherapie

Von 117 Patienten erhielten 50 Patienten eine adjuvante Chemotherapie des Primärtumors (Tabelle 20). Dabei erhielten 47 Patienten Gemcitabin und drei Patienten 5-Fluoruracil in Kombination mit Folinsäure.

Tabelle 20: Adjuvante Chemotherapie des Primärtumors

Chemotherapie	Patientenzahl	%
Gesamt	117	100
Ja	50	42,7
Nein	67	57,3

3.2 Deskription immunhistochemische Färbung WNT5A und ROR2

3.2.1 Intensity-Percentage-Score

Wie im Kapitel 2.8.3 erläutert, wurde aus dem Anteil der gefärbten Abschnitte und der Intensität im jeweiligen Schnitt der sogenannte Intensity-Percentage-Score errechnet. Die Medianwerte

der entsprechenden Kompartimente Tumor, Stroma und gesundes Gewebe für WNT5A und ROR2 sind Tabelle 21 zu entnehmen.

Tabelle 21: Medianwerte Intensity-Percentage-Score

	WNT5A			ROR2		
	Tumor	Stroma	Gesundes Gewebe	Tumor	Stroma	Gesundes Gewebe
Patientenzahl	117		88	117		90
Median (IPS)	195	100	195	130	35	130

Mittels Wilcoxon-Test wurde das Expressionsmuster von ROR2 und WNT5A jeweils von den Paaren Tumor - Stroma, Tumor - gesundes Gewebe und Stroma - gesundes Gewebe verglichen. Dabei zeigte sich bei WNT5A ein signifikanter Unterschied in der Expression zwischen Tumor und Stroma ($p<0,001$) und gesundem Gewebe und Stroma ($p<0,001$). Keinen signifikanten Unterschied zeigte die WNT5A-Expression zwischen Tumor und gesundem Gewebe ($p=0,705$, Abbildung 8 A). Die ROR2-Expression zeigte ebenso einen signifikanten Unterschied zwischen Tumor und Stroma ($p<0,001$) und gesundem Gewebe und Stroma ($p<0,001$). Das Expressionsmuster von ROR2 unterschied sich nicht signifikant zwischen Tumor und gesundem Gewebe ($p=0,378$, Abbildung 8 B).

Abbildung 8: Ergebnisse Wilcoxon-Test. A) WNT5A (n=88): Tumor vs. Stroma $p<0,001$; Tumor vs. gesundes Gewebe $p=0,705$; gesundes Gewebe vs. Stroma $p<0,001$. B) ROR2 (n=90): Tumor vs. Stroma $p<0,001$; Tumor vs. gesundes Gewebe $p=0,378$; gesundes Gewebe vs. Stroma $p<0,001$.

Die Korrelationsanalyse nach Spearman zeigte lediglich einen sehr niedrigen Zusammenhang zwischen dem Expressionsmuster von ROR2 und WNT5A im Tumor ($r=0,184$; $p=0,047$). Ebenso besteht nur ein sehr niedriger Zusammenhang zwischen dem Expressionsmuster von ROR2 und WNT5A im Stroma ($r=0,036$; $p=0,699$).

3.2.2 Darstellung Expressionsmuster nach negativer und positiver Expression

Ausgehend von den Werten des Intensity-Percentage-Scores wurden die Schnitte bei einem Cut-Off-Wert von 65 in solche mit negativer und positiver Expression eingeteilt (Kapitel 2.8.3). Die Auswertung der mit WNT5A charakterisierten Proben zeigte, dass im Tumor 27/117 (23,1 %) eine negative und 90/117 (76,9 %) eine positive Expression hatten. Im Stroma waren 48/117 (41,0 %) negativ und 69/117 (59,0 %) positiv. Nur 88 von 117 Proben wiesen gesundes Pankreasgewebe auf. Von diesen waren 15/88 (17,0 %) negativ und 73/88 (83,0 %) positiv (Abbildung 9 A). Bei den 88 Proben der WNT5A-Färbung wiesen 62/88 (77,3 %) Proben im Tumor und gleichzeitig gesunden Gewebe eine starke Expression auf.

Die ROR2-Expression war im Tumorgewebe bei 40/117 (34,2 %) Proben negativ und bei 77/117 (65,8 %) positiv. Im Stroma zeigten 84/117 (71,8 %) eine negative Expression und 33/117 (28,2 %) eine positive Expression. 90 von 117 Proben wiesen gleichzeitig gesundes Pankreasgewebe auf. Davon waren 26/90 (28,9 %) negativ und 64/90 (71,1 %) positiv (Abbildung 9 B). 49/90 (54,5 %) Proben, bei denen Tumorgewebe und gesundes Gewebe auf dem Objektträger waren, zeigten in diesen beiden Kompartimenten eine starke Expression von ROR2.

Abbildung 9: Prozentualer Anteil von positiven und negativen Schnitten. A) WNT5A und B) ROR2 in jeweils Tumor, Stroma und gesundem Gewebe.

Abbildung 10 zeigt eine beispielhafte Darstellung der immunhistochemischen Untersuchung nach positiver und negativer Expression von WNT5A und ROR2 in jeweils Tumor, Stroma und gesundem Gewebe.

Abbildung 10: Darstellung der immunhistochemischen Auswertung. A) WNT5A und B) ROR2 in Tumor, Stroma und gesundem Gewebe. Der Balken entspricht auf allen Aufnahmen 200 µm.

3.3 Korrelationsanalyse mit klinisch-pathologischen Parametern

Für die Korrelationsanalyse zwischen den Expressionsmustern der immunhistochemischen Auswertung von ROR2 und WNT5A in Tumor, Stroma und gesundem Gewebe mit klinisch-pathologischen Parametern wurde der Pearson- χ^2 - oder der Fisher's-Exact-Test angewandt.

3.3.1 ROR2

In der Korrelationsanalyse der ROR2-Expression im Tumor und Stroma mit klinisch-pathologischen Parametern konnte kein signifikanter Zusammenhang gefunden werden (Tabelle 22).

Tabelle 22: Ergebnisse der Korrelationsanalyse der ROR2-Expression im Tumor und Stroma mit klinisch-pathologischen Parametern

ROR2		Tumor			Stroma		
		Expression		P	Expression		P
		Negativ (%)	Positiv (%)		Negativ (%)	Positiv (%)	
Gesamt	117	40	77		84	33	
Alter				0,491			0,756
≤ 60 Jahre	40	12(30,0)	28(70,0)		28(70,0)	12(30,0)	
> 60 Jahre	77	28(36,4)	49(63,6)		56(72,7)	21(27,3)	
Geschlecht				0,878			0,897
Weiblich	45	15(33,3)	30(66,7)		32(71,1)	13(28,9)	
Männlich	72	25(34,7)	47(65,3)		52(72,2)	20(27,8)	
pT				0,561			0,907
pT1 & pT2	24	7(29,2)	17(70,8)		17(70,8)	7(29,2)	
pT3 & pT4	93	33(35,5)	60(64,5)		67(72,0)	26(28,0)	
pN				0,660			0,954
pN0	35	13(37,1)	22(62,9)		25(71,4)	10(28,6)	
pN1	82	27(32,9)	55(67,1)		59(72,0)	23(28,0)	
pM				0,273			1,000
pM0	40	23(57,5)	17(42,5)		34(85,0)	6(15,0)	
pM1	9	3(33,3)	6(66,7)		8(88,9)	1(11,1)	
Fehlend	68						
L				0,939			0,772
L0	17	6(35,3)	11(64,7)		12(70,6)	5(29,4)	
L1	91	33(36,3)	58(63,7)		67(79,0)	24(29,0)	
Fehlend	9						
V				0,609			0,724
V0	75	29(38,7)	46(61,3)		55(73,3)	20(26,7)	
V1	30	10(33,3)	20(66,7)		23(76,7)	7(23,3)	
Fehlend	12						
Pn				0,836			0,752
Pn0	15	6(40,0)	9(60,0)		12(80,0)	3(20,0)	
Pn1	78	29(37,2)	49(62,8)		57(73,1)	21(26,9)	
Fehlend	24						

		Negativ (%)	Positiv (%)	P	Negativ (%)	Positiv (%)	P
Grading				0,403			0,744
G1 & G2	56	17(30,4)	39(69,6)		41(73,2)	15(26,8)	
G3	61	23(37,7)	38(62,3)		43(70,5)	18(29,5)	
UICC 7.0				0,553			0,918
Ila	27	11(40,7)	16(59,3)		19(70,4)	8(29,6)	
Ilb	70	24(34,3)	46(63,9)		50(71,4)	20(28,9)	
Andere	20						
Rezidiv Metastase				0,688			0,808
Ja	41	15(36,6)	26(63,4)		30(73,2)	11(26,8)	
Nein	76	25(32,9)	51(67,1)		54(71,1)	22(28,9)	
Lokalrezidiv				0,216			0,914
Ja	22	10(45,5)	12(54,5)		16(72,7)	6(27,3)	
Nein	95	30(31,6)	65(68,4)		68(71,6)	27(28,4)	

Die Korrelationsanalyse der Expression von ROR2 im gesunden Gewebe mit klinisch-pathologischen Parametern zeigte keine signifikanten Zusammenhänge (Tabelle 23).

Tabelle 23: Ergebnisse der Korrelationsanalyse der ROR2-Expression im gesunden Gewebe mit klinisch-pathologischen Parametern

ROR2		Gesundes Gewebe		
		Expression		P
		Negativ (%)	Positiv (%)	
Gesamt	90	26	74	
Alter				0,609
≤ 60 Jahre	31	10(32,3)	21(67,7)	
> 60 Jahre	59	16(27,1)	43(72,9)	
Geschlecht				0,849
Weiblich	36	10(27,8)	26(72,2)	
Männlich	54	16(29,6)	38(70,4)	
pT				0,059
pT1 & pT2	14	1(7,1)	13(92,9)	
pT3 & pT4	76	25(32,9)	51(67,1)	
pN				0,451
pN0	27	6(22,2)	21(77,8)	
pN1	63	20(31,7)	43(68,3)	
pM				0,663
pM0	32	12(37,5)	20(62,5)	
pM1	6	3(50,0)	3(50,0)	
Fehlend	52			
L				1,000
L0	13	4(30,8)	9(69,2)	
L1	71	22(31,0)	49(69,0)	
Fehlend	6			
V				0,225
V0	62	17(27,4)	45(72,6)	
V1	19	8(42,1)	11(57,9)	
Fehlend	9			

		Negativ (%)	Positiv (%)	P
Pn				0,262
Pn0	10	1(10,0)	9(90,0)	
Pn1	62	20(32,3)	42(67,7)	
Fehlend	18			
Grading				0,508
G1&G2	43	11(25,6)	33(74,4)	
G3	47	15(31,9)	32(68,1)	
UICC 7.0				0,940
Ila	20	6(30,0)	14(70,0)	
IIb	55	17(30,9)	38(69,1)	
Andere	15			
Rezidiv Metastase				0,394
Ja	32	11(34,4)	21(65,6)	
Nein	58	15(25,9)	43(74,1)	
Lokalrezidiv				0,559
Ja	17	6(35,3)	11(64,7)	
Nein	73	20(27,4)	53(72,6)	

3.3.2 WNT5A

In der Korrelationsanalyse des WNT5A-Expressionsmusters im Tumor und Stroma mit klinisch-pathologischen Parametern konnte kein signifikanter Zusammenhang gefunden werden. Jedoch zeigte sich eine Tendenz zur Signifikanz zwischen den UICC-Stadien Ila und IIb und der Expression von WNT5A im Stroma ($p=0,075$, Tabelle 24).

Tabelle 24: Ergebnisse der Korrelationsanalyse der WNT5A-Expression im Tumor und Stroma mit klinisch-pathologischen Parametern

WNT5A		Tumor			Stroma		
		Expression		P	Expression		P
		Negativ (%)	Positiv (%)		Negativ (%)	Positiv (%)	
Gesamt	117	27	90		48	69	
Alter				0,200			0,815
≤ 60 Jahre	40	12(30,0)	28(70,0)		17(42,5)	23(57,5)	
> 60 Jahre	77	15(19,5)	62(80,5)		31(40,3)	46(59,7)	
Geschlecht				0,862			0,327
Weiblich	45	10(22,2)	35(77,8)		21(46,7)	24(53,3)	
Männlich	72	17(23,6)	55(76,4)		27(37,5)	45(62,5)	
pT				0,060			0,142
pT1 & pT2	24	9(37,5)	15(62,5)		13(54,2)	11(45,8)	
pT3 & pT4	93	18(19,4)	75(80,6)		35(37,6)	58(62,4)	
pN				0,658			0,333
pN0	35	9(25,7)	26(74,3)		12(34,3)	23(65,7)	
pN1	82	18(22,0)	64(78,0)		36(43,9)	46(56,1)	
pM				0,440			1,000
pM0	40	10(25,0)	30(75,0)		15(37,5)	25(62,5)	
pM1	9	1(11,1)	8(88,9)		3(33,3)	6(66,7)	
Fehlend	68						

		Negativ (%)	Positiv (%)	P	Negativ (%)	Positiv (%)	P
L				0,235			0,304
L0	17	6(35,3)	11(64,7)		9(52,9)	8(47,1)	
L1	91	20(22,0)	71(78,0)		36(39,6)	55(60,4)	
Fehlend	9						
V				0,942			0,618
V0	75	18(24,0)	57(76,0)		31(41,3)	44(58,7)	
V1	30	7(23,3)	23(76,7)		14(46,7)	16(53,3)	
Fehlend	12						
Pn				0,499			0,122
Pn0	15	4(26,7)	11(73,3)		9(60,0)	6(40,0)	
Pn1	78	15(19,2)	63(80,8)		30(38,5)	48(61,5)	
Fehlend	24						
Grading				0,177			0,130
G1 & G2	56	16(28,6)	40(71,4)		27(48,2)	29(51,8)	
G3	61	11(18,0)	50(82,0)		21(34,4)	40(65,6)	
UICC 7.0				0,751			0,075
Ila	27	5(18,5)	22(81,5)		7(25,9%)	20(74,1)	
Ilb	70	15(21,4)	55(78,4)		32(45,7%)	38(54,3)	
andere	20						
Rezidiv Metastase				0,111			0,132
Ja	41	6(14,6)	35(85,4)		13(31,7)	28(68,3)	
Nein	76	21(27,6)	55(72,4)		35(46,1)	41(53,9)	
Lokalrezidiv				0,966			0,990
Ja	22	5(22,7)	17(77,3)		9(40,9)	13(59,1)	
Nein	95	22(23,2)	73(76,8)		39(41,1)	56(58,9)	

Die Korrelationsanalyse der Expression von WNT5A im gesunden Gewebe mit klinisch-pathologischen Parametern zeigte eine Signifikanz in der Korrelation zwischen dem Auftreten von Metastasen und der Expression von WNT5A im gesunden Gewebe ($p=0,042$). Weitere Signifikanzen fanden sich nicht (Tabelle 25).

Tabelle 25: Ergebnisse der Korrelationsanalyse der WNT5A-Expression im gesunden Gewebe mit klinisch-pathologischen Parametern

WNT5A		Gesundes Gewebe		
		Expression		P
		Negativ (%)	Positiv (%)	
Gesamt	88	15	73	
Alter				0,596
≤ 60 Jahre	30	6(20,0)	24(80,0)	
> 60 Jahre	58	9(15,5)	49(84,5)	
Geschlecht				0,421
Weiblich	33	7(21,2)	26(78,8)	
Männlich	55	8(14,5)	47(85,5)	
pT				0,700
pT1 & pT2	14	3(21,4)	11(78,6)	
pT3 & pT4	74	12(16,2)	62(83,8)	

		Negativ (%)	Positiv (%)	P
pN				0,538
pN0	26	3(11,5)	23(88,5)	
pN1	62	12(19,4)	50(80,6)	
pM				1,000
pM0	31	4(12,9)	27(87,1)	
pM1	6	1(16,7)	5(83,3)	
Fehlend	51			
L				0,698
L0	13	3(23,1)	10(76,9)	
L1	69	12(17,4)	57(82,6)	
Fehlend	6			
V				1,000
V0	61	11(18,0)	50(82,0)	
V1	19	3(15,8)	16(84,2)	
Fehlend	8			
Pn				1,000
Pn0	11	1(9,1)	10(90,9)	
Pn1	60	10(16,7)	50(83,3)	
Fehlend	17			
Grading				0,995
G1&G2	41	7(17,1)	34(82,9)	
G3	47	8(17,0)	39(83,0)	
UICC 7.0				0,727
Ila	19	2(10,5)	17(89,5)	
Ilb	54	10(18,5)	44(81,5)	
Andere	15			
Rezidiv Metastase				0,042
Ja	32	2(6,2)	30(93,8)	
Nein	56	13(23,2)	43(76,8)	
Lokalrezidiv				0,726
Ja	18	2(11,8)	15(88,2)	
Nein	71	13(18,3)	58(81,7)	

3.4 Überlebenszeitanalyse

Das Ende der Datenerhebung wurde auf den 30.09.2016 festgelegt. Dabei konnte von allen 117 Patienten ein Follow-Up über den Status „verstorben“ oder „lebend“ erstellt werden. Von den 117 Patienten sind bis zum Beobachtungsende 88 (75,2 %) Patienten verstorben und 29 (24,8 %) am Leben oder aus nicht bekannten Gründen früher aus der Studie ausgeschieden. Bei 5 Patienten war der Beobachtungszeitraum besonders kurz, da nur Dokumente bezüglich des Krankenhausaufenthaltes um die Operation vorhanden waren. Sie wurden trotzdem als zensierte Fälle in die Analysen eingeschlossen. Es sind 30 (34,1 %) Frauen und 58 (65,9 %) Männer verstorben. Das mediane Follow-Up betrug 100 Monate (~ 8 Jahre).

3.4.1 Medianes Gesamtüberleben

Das mediane Gesamtüberleben des Patientenkollektivs (n=117) umfasst 19,5 Monate (Abbildung 11 A) bei einem 95%-Konfidenzintervall von 14,4–24,6 Monaten. Die relative 1-Jahres-Überlebensrate beträgt 67 % und die relative 5-Jahres-Überlebensrate 16 %. Die Gabe einer adjuvanten Chemotherapie hat einen signifikanten Einfluss auf das Überleben ($p=0,001$, Abbildung 11 B). Patienten, die eine Chemotherapie erhielten, lebten 17,4 Monate länger als Patienten, die keine Chemotherapie bekamen.

Abbildung 11: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier. A) Medianes Gesamtüberleben 19,5 Monate. B) Überleben in Abhängigkeit einer adjuvanten Chemotherapie $p=0,001$.

3.4.2 Überleben in Abhängigkeit von klinisch-pathologischen Parametern

In den Kategorien Geschlecht und Alter konnten hinsichtlich des Überlebens keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen weiblich/männlich ($p=0,597$) bzw. $\leq 60/> 60$ Jahre ($p=0,287$) festgestellt werden (Abbildung 12).

Abbildung 12: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier. A) Überlebenskurve Geschlecht $p=0,597$. B) Überlebenskurve Alter $p=0,287$.

In den Kategorien T und N sowie UICC-Stadium konnte zwischen den entsprechenden Gruppen pT1&pT2/pT3&pT4 ($p=0,031$), pN0/pN1 ($p<0,001$) und UICC-Stadien IIa und IIb ($p<0,001$) signifikante Unterschiede im Überleben gezeigt werden (Abbildung 13 A, B, D). In der Kategorie M zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen pM0 und pM1 ($p=0,167$, Abbildung 13 C).

Abbildung 13: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier. A) Überlebenskurve T-Kategorie $p=0,031$. B) Überlebenskurve N-Kategorie $p<0,001$. C) Überlebenskurve M-Kategorie $p=0,167$. D) Überlebenskurve UICC-Stadien 7.0 $p<0,001$.

Es konnten ebenso signifikante Unterschiede hinsichtlich des Überlebens zwischen den Gruppen G1&G2/G3 ($p=0,006$) in der Kategorie Grading, L0/L1 ($p=0,009$) in der Kategorie Lymphgefäßinvasion und V0/V1 ($p=0,010$) in der Kategorie Veneninvasion gefunden werden (Abbildung 14 A, B, C). Zwischen den Gruppen Pn0/Pn1 konnte kein signifikanter Unterschied in Bezug auf das Überleben gefunden werden ($p=0,815$, Abbildung 14 D).

Abbildung 14: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier. A) Überlebenskurve Grading $p=0,006$. B) Überlebenskurve Lymphgefäßinvasion $p=0,009$. C) Überlebenskurve Veneninvasion $p=0,010$. D) Überlebenskurve Perineuralinvasion $p=0,815$.

Das Rezidivaufreten in Form von Metastasen zeigte ein signifikant kürzeres Überleben ($p<0,001$, Abbildung 15 A) wohingegen das Auftreten von Lokalrezidiven zu keinem signifikanten Unterschied hinsichtlich des Überlebens führte ($p=0,246$, Abbildung 15 B).

Abbildung 15: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier. A) Überlebenskurve Rezidiv Metastase $p < 0,001$. B) Überlebenskurve Lokalrezidiv $p = 0,246$.

3.4.3 Überleben in Abhängigkeit der ROR2-Expression

Im Folgenden sind die Überlebenskurven in Abhängigkeit der Expression von ROR2 in den Kompartimenten Tumor, Stroma und gesundem Gewebe und für die Patienten, die eine adjuvante Chemotherapie erhalten haben, dargestellt.

Im Tumorgewebe hatte die ROR2-Expression keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben ($p = 0,260$, Abbildung 16 A). Die Gruppe mit negativer Expression zeigte ein medianes Gesamtüberleben von 13,7 Monaten (95%-KI 12,1–15,2) und jene mit positiver Expression ein medianes Gesamtüberleben von 23,9 Monaten (95%-KI 16,6–31,2).

Der Vergleich des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit der ROR2-Expression im Stroma zeigte ebenso keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,820$, Abbildung 16 B). Die Gruppe mit negativer Expression zeigte ein medianes Gesamtüberleben von 16,2 Monaten (95%-KI 10,3–22,2); die Gruppe mit positiver Expression ein medianes Gesamtüberleben von 26,8 Monaten (95%-KI 11,7–41,9).

Der Vergleich des Gesamtüberlebens in Bezug auf das Expressionsmuster von ROR2 im gesunden Gewebe zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,888$, Abbildung 16 C). Die Gruppe mit negativer Expression zeigte ein medianes Gesamtüberleben von 20,4 Monaten (95%-KI 8,6–32,2) und jene mit positiver Expression ein medianes Gesamtüberleben von 20,1 Monaten (95%-KI 11,0–29,2).

Die ROR2-Expression im Tumor hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Ansprechen einer adjuvanten Chemotherapie ($p = 0,072$, Abbildung 16 D). Patienten mit positiver ROR2-Expression wiesen jedoch mit 39,5 Monaten (95%-KI 29,0–50,0) ein deutlich längeres

medianes Überleben auf als Patienten mit negativer Expression, die eine medianes Überleben von 19,5 Monaten hatten (95%-KI 5,6–33,4).

Abbildung 16: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier. Überleben in Abhängigkeit der ROR2-Expression
 A) Tumor $p=0,260$. B) Stroma $p=0,820$. C) gesunden Gewebe $p=0,888$. D) Pat. mit adj. Chemotherapie $p=0,072$.

Außerdem wurden Subgruppen gebildet und analysiert, ob innerhalb dieser Gruppen Unterschiede im Überleben vorhanden sind.

Es wurde der Einfluss des Expressionsmusters von ROR2 im Tumor und Stroma innerhalb der verschiedenen T- sowie N-Kategorien in Bezug auf das Überleben analysiert. Pro Überlebenszeitanalyse wurden folglich vier Gruppen miteinander verglichen:

- ROR2+/pT1&pT2 bzw. pN0
- ROR2+/pT3&pT4 bzw. pN1
- ROR2-/pT1&pT2 bzw. pN0
- ROR2-/pT3&pT4 bzw. pN1.

Die Bezeichnung ROR2+ steht hierbei für die Proben mit positiver Expression. Entsprechend steht die Beschreibung ROR2- für diejenigen Proben mit negativer Expression (Abbildung 17 und Abbildung 18).

Die Überlebensanalyse der ROR2-Expression im Tumor und Stroma in Abhängigkeit der T-Kategorie zeigte in beiden Kompartimenten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p=0,060$ und $p=0,175$, Abbildung 17).

Abbildung 17: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier in Subgruppen. Überlebensanalyse in Abhängigkeit der T-Kategorie und der ROR2-Expression in A) Tumor $p=0,060$ und B) Stroma $p=0,175$.

Im Gegensatz dazu führte die Überlebensanalyse der ROR2-Expression im Tumor und Stroma abhängig von der N-Kategorie zu signifikanten Unterschieden zwischen den Subgruppen in beiden Kompartimenten (jeweils $p<0,001$, Abbildung 18).

Abbildung 18: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier in Subgruppen. Überlebensanalyse in Abhängigkeit der N-Kategorie und der ROR2-Expression in A) Tumor $p < 0,001$ und B) Stroma $p < 0,001$.

Die Ergebnisse des Log-Rank-Tests zum paarweisen Vergleich der unter Abbildung 18 dargestellten Überlebenskurven zur ROR2-Expression im Tumor und Stroma in Abhängigkeit der N-Kategorie sind nachfolgend in den Tabellen 26 und 27 zusammengefasst.

Innerhalb der N1-Kategorie zeigt sich ein signifikanter Unterschied im Überleben zwischen ROR2-positiven und ROR2-negativen Tumoren zugunsten der ROR2-positiven Tumoren, wie die grau hinterlegten Zellen in Tabelle 26 zeigen ($p = 0,009$).

Tabelle 26: Paarweiser Vergleich Log-Rank-Test ROR2-Expression Tumor in Abhängigkeit der N-Kategorie

ROR2 Tumor/ N-Kategorie	ROR2+/N0	ROR2+/N1	ROR2-/N0	ROR2-/N1
	P			
ROR2+/N0 (n=22)	-	0,004	0,365	<0,001
ROR2+/N1 (n=55)	0,004	-	0,010	0,009
ROR2-/N0 (n=13)	0,365	0,010	-	0,001
ROR2-/N1 (n=27)	<0,001	0,009	0,001	-

Ebenso führte eine positive ROR2-Expression im Stroma innerhalb der N-Kategorie zu einem signifikant längeren Überleben ($p = 0,045$, Tabelle 27) im Vergleich zu einer negativen Expression.

Tabelle 27: Paarweiser Vergleich Log-Rank-Test ROR2-Expression Stroma in Abhängigkeit der N-Kategorie

ROR2 Stroma/ N-Kategorie	ROR2+/N0	ROR2+/N1	ROR2-/N0	ROR2-/N1
	P			
ROR2+/N0 (n=10)	-	0,561	0,055	0,053
ROR2+/N1 (n=23)	0,561	-	0,004	0,045
ROR2-/N0 (n=25)	0,055	0,004	-	<0,001
ROR2-/N1 (n=50)	0,053	0,045	<0,001	-

3.4.4 Überleben in Abhängigkeit der WNT5A-Expression

Im Folgenden werden die Überlebenskurven in Abhängigkeit der WNT5A-Expression in den Kompartimenten Tumor, Stroma und gesundem Gewebe gezeigt.

Die WNT5A-Expression zeigte im Tumorgewebe keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben ($p=0,829$, Abbildung 19 A). Die Gruppe mit negativer Expression wies ein medianes Gesamtüberleben von 14,5 Monaten (95%-KI 11,0–18,0) und jene mit positiver Expression ein medianes Gesamtüberleben von 20,4 Monaten (95%-KI 15,5–25,3) auf.

Der Vergleich des Überlebens in Abhängigkeit der WNT5A-Expression im Stroma führte ebenso zu keinem signifikanten Unterschied ($p=0,411$, Abbildung 19 B). Die Gruppe mit negativer Expression zeigte ein medianes Gesamtüberleben von 14,5 Monaten (95%-KI 10,7–18,3) und die Gruppe mit positiver Expression ein medianes Gesamtüberleben von 22,2 Monaten (95%-KI 14,4–24,6).

Der Vergleich des Gesamtüberlebens hinsichtlich der WNT5A-Expression im gesunden Gewebe zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p=0,842$, Abbildung 19 C). Die Gruppe mit negativer Expression zeigte ein medianes Gesamtüberleben von 14,0 Monaten (95%-KI 8,3–19,8) und jene mit positiver Expression ein medianes Gesamtüberleben von 20,4 Monaten (95%-KI 13,0–26,0).

Die WNT5A-Expression im Tumor hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Ansprechen einer adjuvanten Chemotherapie ($p=0,481$, Abbildung 19 D). Patienten mit positiver WNT5A-Expression wiesen mit 27,4 Monaten (95%-KI 14,0–40,7) ein kürzeres medianes Überleben auf als Patienten mit negativer Expression, die ein medianes Überleben von 40,0 Monaten hatten (95%-KI 7,1–71,0).

Abbildung 19: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier. Überleben in Abhängigkeit der WNT5A-Expression
 A) Tumor $p=0,829$. B) Stroma $p=0,411$. C) gesunden Gewebe $p=0,842$. D) Pat. mit adj. Chemotherapie $p=0,481$.

Außerdem wurden Subgruppen gebildet und analysiert, ob innerhalb dieser Gruppen Unterschiede im Überleben vorhanden sind.

Es wurde der Einfluss der WNT5A-Expression im Tumor und Stroma innerhalb der verschiedenen T- sowie N-Kategorien in Bezug auf das Überleben analysiert. Pro Überlebenszeitanalyse wurden folglich vier Gruppen miteinander verglichen:

- WNT5A+/pT1&pT2 bzw. pN0
- WNT5A+/pT3&pT4 bzw. pN1
- WNT5A-/pT1&pT2 bzw. pN0
- WNT5A-/pT3&pT4 bzw. pN1.

Die Bezeichnung WNT5A+ steht hierbei für die Schnitte mit positiver Expression. Entsprechend steht die Beschreibung WNT5A- für diejenigen Schnitte mit negativer Expression (Abbildung 20 und Abbildung 21).

Die Überlebensanalyse der WNT5A-Expression im Tumor und Stroma in Abhängigkeit der T-Kategorie zeigte in beiden Kompartimenten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p=0,177$ und $p=0,098$, Abbildung 20).

Abbildung 20: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier in Subgruppen. Überlebensanalyse in Abhängigkeit der T-Kategorie und der WNT5A-Expression im A) Tumor $p=0,177$ und B) Stroma $p=0,098$.

Die Überlebensanalyse der WNT5A-Expression im Tumor und Stroma abhängig von der N-Kategorie zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Subgruppen in beiden Kompartimenten (jeweils $p<0,001$, Abbildung 21).

Abbildung 21: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier in Subgruppen. Überlebensanalyse in Abhängigkeit der N-Kategorie und der WNT5A-Expression in A) Tumor $p < 0,001$ und B) Stroma $p < 0,001$.

Die Ergebnisse des Log-Rank-Tests zum paarweisen Vergleich der unter Abbildung 21 dargestellten Überlebenskurven zur WNT5A-Expression im Tumor und Stroma in Abhängigkeit der N-Kategorie sind nachfolgend in den Tabellen 28 und 29 zusammengefasst.

Die in Tabelle 28 und 29 zu sehenden Signifikanzen zwischen den entsprechenden Gruppen sind am ehesten auf einen signifikanten Unterschied im Überleben zwischen einem pN0- bzw. pN1-Status (vergleiche Abbildung 13 B) und nicht auf die Expression von WNT5A in Tumor bzw. Stroma zurückzuführen.

Tabelle 28: Paarweiser Vergleich Log-Rank-Test WNT5A-Expression Tumor in Abhängigkeit der N-Kategorie

WNT5A Tumor/ N-Kategorie	WNT5A+/N0	WNT5A+/N1	WNT5A-/N0	WNT5A-/N1
	P-Wert			
WNT5A+/N0 (n=26)	-	<0,001	0,842	0,001
WNT5A+/N1 (n=64)	<0,001	-	0,024	0,656
WNT5A-/N0 (n=9)	0,842	0,024	-	0,017
WNT5A-/N1 (n=18)	0,001	0,656	0,017	-

Tabelle 29: Paarweiser Vergleich Log-Rank-Test WNT5A-Expression Stroma in Abhängigkeit der N-Kategorie

WNT5A Stroma/ N-Kategorie	WNT5A+/N0	WNT5A+/N1	WNT5A-/N0	WNT5A-/N1
	P-Wert			
WNT5A+/N0 (n=23)	-	0,005	0,196	<0,001
WNT5A+/N1 (n=46)	0,005	-	0,006	0,129
WNT5A-/N0 (n=12)	0,196	0,006	-	0,001
WNT5A-/N1 (n=36)	<0,001	0,129	0,001	-

3.4.5 Überleben in Abhängigkeit der ROR2/WNT5A-Expression

In Abbildung 22 sind die Überlebenszeitanalysen für Tumor, Stroma und gesundem Gewebe für folgenden vier Subgruppen zu sehen:

- ROR2+/WNT5A+
- ROR2+/WNT5A-
- ROR2-/WNT5A+
- ROR2-/WNT5A-.

Die Bezeichnung ROR2+ bzw. WNT5A+ stehen hierbei für Proben mit positiver Expression und entsprechend ROR2- bzw. WNT5A- für solche mit negativer Expression.

In keinem der Kompartimente Tumor, Stroma und gesundem Gewebe konnte eine Signifikanz hinsichtlich des Überlebens in den genannten Subgruppen gefunden werden (Abbildung 22).

Abbildung 22: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier in Subgruppen. Überleben in Abhängigkeit der ROR2/WNT5A-Expression in A) Tumor $p=0,609$. B) Stroma $p=0,835$. C) gesundem Gewebe $p=0,194$.

3.4.6 Univarianz- und Multivarianzanalyse

Mittels der Cox-Regressionsanalyse wurden eine Univarianz- und eine Multivarianzanalyse durchgeführt, um aus den vorhandenen klinisch-pathologischen Parametern und den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbungen unabhängige prognostische Faktoren für das Überleben zu finden.

Aus Tabelle 30 geht hervor, dass Patienten mit einem Grading vom Grad 3, T-Kategorie pT3&pT4, pN1-, L1- und V1-Status ein signifikant höheres Risiko zu versterben hatten, als die jeweilige Referenzgruppe (ref). Patienten, die kein Metastasenrezidiv entwickelten, besaßen ein geringeres Risiko zu sterben, als Patienten, die ein solches erlitten.

Tabelle 30: Univarianzanalyse

Parameter	Univarianzanalyse		
	HR	95% KI	P-Wert
ROR2 Tumor			
Negativ (ref) vs. Positiv	0,78	0,50-1,20	0,261
WNT5A Tumor			
Negativ (ref) vs. Positiv	0,95	0,57-1,56	0,829
ROR2 Stroma			
Negativ (ref) vs. Positiv	0,95	0,60-1,50	0,820
WNT5A Stroma			
Negativ (ref) vs. Positiv	0,83	0,54-1,28	0,412
Geschlecht			
Weiblich (ref) vs. Männlich	1,13	0,72-1,61	0,597
Alter			
≤ 60 (ref) vs. > 60	1,28	0,81-2,00	0,288
Grading			
G1 & G2 (ref) vs. G3	1,84	1,18-2,85	0,007
pT			
pT1&pT2 (ref) vs. pT3&pT4	1,79	1,05-3,05	0,033
pN			
N0 (ref) vs. N1	3,16	1,87-5,33	<0,001
pM			
M0 (ref) vs. M1	1,70	0,79-3,67	0,172
L			
L0 (ref) vs. L1	2,47	1,22-4,97	0,012
V			
V0 (ref) vs. V1	1,90	1,15-3,02	0,011
Pn			
Pn0 (ref) vs. Pn1	0,93	0,50-1,73	0,815
Rezidiv Metastase			
ja (ref) vs. nein	0,47	0,30-0,74	0,001
Lokalrezidiv			
ja (ref) vs. nein	0,75	0,45-1,23	0,248

Die Multivarianzanalyse wurde auf die Parameter ROR2- bzw. WNT5A-Expression im Tumor und Stroma sowie Grading, pT- und pN-Kategorie beschränkt.

Als unabhängige prognostische Parameter in der Multivarianzanalyse konnten die pN-Kategorie pN1 ($p < 0,001$) und das Grading ($p \leq 0,050$) identifiziert werden (Tabelle 31).

Tabelle 31: Multivarianzanalyse

Parameter	Multivarianzanalyse		
	HR	95% KI	P-Wert
ROR2 Tumor	0,75	0,45-1,25	0,272
Negativ (ref) vs. Positiv			
ROR2 Stroma	0,83	0,49-1,42	0,500
Negativ (ref) vs. Positiv			
WNT5A Tumor	0,89	0,53-1,49	0,648
Negativ (ref) vs. Positiv			
WNT5A Stroma	0,86	0,55-1,35	0,517
Negativ (ref) vs. Positiv			
Grading	1,58	1,00-2,50	0,050
G1 & G2 (ref) vs. G3			
pT	1,23	0,70-2,18	0,474
pT1&pT2 (ref) vs. pT3&pT4			
pN	3,00	1,70-5,28	<0,001
N0 (ref) vs. N1			

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Expressionsmuster des Rezeptors ROR2 zusammen mit seinem Liganden WNT5A im duktalem Adenokarzinom des Pankreas zu charakterisieren, Zusammenhänge zu klinisch-pathologischen Parametern sowie ihre prognostische Relevanz zu untersuchen und so zur Aufklärung ihrer Rolle im Pankreaskarzinom beizutragen und die Möglichkeit eines diagnostischen und/oder therapeutischen Nutzens zu eruieren.

4.1 Prognose

Das mediane Gesamtüberleben im vorliegenden Kollektiv lag bei 19,5 Monaten (95%-KI 14,4–24,6). In der Literatur wird das mediane Überleben mit 11–23 Monate nach kurativer Resektion angegeben. Bei nicht-resektablen Tumoren beträgt das Überleben im Durchschnitt nur 9–11 Monate (Heinemann 2009). Die 5-JÜR wird je nach Quelle mit 5 %–9 % für alle an einem Pankreaskarzinom erkrankten Patienten angegeben (Reissfelder et al. 2007; Robert Koch-Institut 2016). Studien zeigten dabei auch, dass bei Patienten, die eine kurative Resektion erfahren haben, eine 5-JÜR von bis zu 20 % erreicht werden kann (Reissfelder et al. 2007). Im eigenen Kollektiv betrug die 5-JÜR 16 %. Es gelang bei 77,8 % eine R0-Resektion, bei 20,5 % wurde nur eine R1- und bei 1,7 % eine R2-Resektion erreicht. Faktoren, die das Überleben entscheidend beeinflussen, sind das Erreichen einer kurativen Resektion, die Lymphknoteninfiltration und die Erfahrung des Chirurgen (van Heek et al. 2005). Außerdem ist die Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie prognoseverbessernd (Neoptolemos John P. et al. 2004). Auch im vorliegenden Kollektiv zeigte sich, dass die Gabe einer adjuvanten Chemotherapie nach Resektion des Primärtumors zu einem signifikant längeren Überleben führt ($p=0,001$, Abbildung 11 B).

4.2 Alters- und Geschlechterverteilung

Das mittlere Erkrankungsalter für Krebserkrankungen allgemein liegt laut Robert Koch-Institut für Frauen bei 67,2 und für Männer bei 68,3 Jahren. Bei Patienten, die an einem Pankreaskarzinom erkranken liegt das mittlere Erkrankungsalter höher: Frauen erkranken durchschnittlich mit 74,1 und Männer mit 70,4 Jahren (Robert Koch-Institut 2016). Im vorliegenden Kollektiv lag das Erkrankungsalter deutlich niedriger, Frauen waren bei Diagnosestellung im Mittel 66 und Männer 65 Jahre alt. Im Vergleich zum Kollektiv des RKIs, welches alle an einem Pankreaskarzinom erkrankten Personen einbezieht, wurden in der vorliegenden Analyse nur Patienten mit primär resektablen Tumor betrachtet, was den Unterschied zwischen dem mittleren Erkrankungsalter erklären könnte.

Trotz des höher liegenden medianen Alters wurde zur besseren Vergleichbarkeit mit ähnlichen Studien der Cut-Off-Wert zur Einteilung in zwei Gruppen bei 60 Jahren gelegt. Insgesamt waren so 40 (34,2 %) Patienten ≤ 60 und 77 (68,2 %) Patienten > 60 Jahre alt. In der Studie zur Analyse der ROR2-Expression im Pankreaskarzinom von Huang et al. lag die Verteilung bei einer Patientenanzahl von $n=162$ bei 64 (39,5 %) ≤ 60 Jahren und 98 (60,5 %) > 60 Jahren (Huang et al. 2015). Eine weitere Studie aus Asien mit einem Kollektiv von $n=134$, die mit einer ähnlichen Fragestellung unter anderem die WNT5A-Expression im Pankreaskarzinom untersuchte, waren 70 (52,2 %) Patienten ≤ 60 Jahre und 64 (47,8 %) > 60 Jahren (Bo et al. 2013).

Die Geschlechterverteilung lag im vorliegenden Kollektiv bei 45 (38,5 %) Frauen zu 72 (61,5 %) Männern (1:1,6). In den bereits erwähnten Studien zur ROR2-Expression betrug das Verhältnis Frauen:Männer 1:1,4 (Huang et al. 2015) bzw. 1:1,7 in der Studie zur WNT5A-Expression (Bo et al. 2013). Im Vergleich zu den Daten des RKIs erkrankten im vorliegenden Kollektiv etwas weniger Frauen und mehr Männer am Pankreaskarzinom. Im Bundesdurchschnitt waren im Jahr 2014 von allen Personen mit einem Pankreaskarzinom 50,1 % Frauen und 49,9 % Männer betroffen (Robert Koch-Institut 2017).

Das Geschlecht zeigte im vorliegenden Kollektiv, in Bestätigung der Literatur, keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben (Abbildung 12 A) (Dandona et al. 2011; Hartwig et al. 2011; Tarantino et al. 2017). Auch das Alter hatte im eigenen Kollektiv keinen entscheidenden Einfluss auf das Überleben (Abbildung 12 B), wobei hierfür der recht niedrig gewählte Cut-Off-Wert ein Grund sein könnte, der jedoch zu besserer Vergleichbarkeit mit ähnlichen Kollektiven so gesetzt wurde. Zumindest im Kollektiv von Huang et al. zeigte das Alter ebenso keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben (Huang et al. 2015). In anderen Analysen zum Pankreaskarzinom war ein höheres Lebensalter jedoch mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Hartwig et al. 2011; Luo et al. 2013; Tarantino et al. 2017).

4.3 Klinisch-pathologische Parameter und ihre prognostische Relevanz

Im Folgenden wird das vorliegende Kollektiv zunächst vor allem in Bezug auf die Ergebnisse zweier thematisch als auch methodisch ähnlichen Studien von Bo et al. 2013 und Huang et al. 2015 hinsichtlich der Verteilung ausgewählter klinisch-pathologischer Parameter verglichen. Zur besseren Übersicht wurden die ausgewählten klinisch-pathologischen Parameter in Tabelle 32 zusammengefasst. Im weiteren Verlauf wird auch ein Vergleich bezüglich der Ergebnisse der Expression von WNT5A und ROR2 und deren Einfluss auf das Überleben diskutiert.

Tabelle 32: Vergleich Patientenkollektive (n. a. - nicht analysiert)

Parameter	Patientenanzahl (%)		
	Eigenes Kollektiv	Bo et al.	Huang et al.
Gesamt	117 (%)	134 (%)	162 (%)
pT			
pT1&T2	24(20,5)	56(41,8)	86(53,1)
pT3	90(76,9)	54(40,3)	54(33,3)
pT4	3(2,6)	8(6,0)	20(12,4)
Fehlend	0(0)	16(11,9)	2(1,2)
pN			
pN0	35(29,9)	24(17,9)	116(71,6)
pN1	82(70,1)	83(61,9)	43(26,5)
Fehlend	0(0)	27(20,2)	3(1,9)
Grading			
G1&G2	56(47,9)	113(84,3)	126(77,8)
G3	61(52,1)	21(15,7)	36(22,2)
UICC 7.0			
Ia&Ib	6(5,3)	n. a.	66(40,7)
Ila	27(23,1)	n. a.	36(22,2)
Ilb	70(59,8)	n. a.	37(22,8)
III&IV	14(11,9)	n. a.	20(12,4)
Fehlend	0(0)	n. a.	3(1,9)

Es ist zu erkennen, dass sich das vorliegende Kollektiv hinsichtlich der konstatierten pT-Kategorien stark von den beiden anderen Kollektiven unterscheidet. So wurden im eigenen Kollektiv erheblich mehr Pankreastumore der Kategorie pT3 zugeordnet (76,9 %) als in den Vergleichskollektiven. In letzteren dagegen ist zu erkennen, dass wesentlich mehr Tumore in den Kategorien pT1 und pT2 diagnostiziert wurden. Bei Bo et al. waren es 41,8 % und bei Huang et al. 53,1 % (Bo et al. 2013; Huang et al. 2015). Das sind mehr als doppelt so viele, wie im eigenen Kollektiv (20,5 %). Entsprechend wurden bei Huang et al. mehr Patienten (40,7 %) den UICC-Stadien Ia und Ib zugeordnet, wohingegen es im eigenen Kollektiv nur 5,3 % waren und die meisten Patienten dem Stadium IIb (59,8 %) entsprachen (Tabelle 32). Vor allem in Hinsicht auf die unspezifische Symptomatik und dadurch üblicherweise sehr späte Diagnosestellung wie in Kapitel 1.2.3 beschrieben, sind die Aufteilungen der pT-Kategorien in den asiatischen Kollektiven überraschend. Andere asiatische Arbeitsgruppen berichten über eine Rate von 18,4 % diagnostizierte Tumore in den UICC-Stadien I und II und 81,6 % in Stadien III und IV (Lin et al. 2015). Die Analyse eines weiteren großen US-amerikanischen Kollektivs (n=13131) zeigte wiederum andere Verteilungen. Hier waren 62,9 % der Patienten den UICC-Stadien I (8,9 %) und II (54,0 %) zugeordnet und 37,1 % entsprachen den Stadien III und IV (Yu et al. 2015). Dies steht in Diskrepanz zu der Verteilung auf die UICC-Stadien sowohl hinsichtlich der Ergebnisse von Huang et al. als auch im eigenen Kollektiv, in dem die meisten Patienten einem Stadium Ila und IIb (zusammen 82,9 %) entsprachen.

Wie bereits erwähnt, wird auch deutlich, dass sich die Verteilung auf die pT-Kategorien zwischen den asiatischen Kollektiven und dem eigenen Kollektiv deutlich unterscheiden. Größere Analysen aus den USA bestätigen jedoch die Zahlen des hier vorliegenden Kollektives und beschreiben Raten von 73,0 % (n=355) (Dandona et al. 2011) bzw. 78,6 % (n=5036) (Tarantino et al. 2017) pT3-Tumoren. Des Weiteren zeigte die vorliegende Analyse, dass sowohl eine niedrigere pT-Kategorie (pT1&pT2 vs. pT3&pT4, $p=0,031$, Abbildung 13 A) als auch ein niedrigeres UICC-Stadium (IIa vs. IIb, $p<0,001$, Abbildung 13 D) einen signifikanten Einfluss auf das Überleben haben. Diese Ergebnisse bestätigen bereits vorhandene Daten aus Heidelberg und Shanghai (Hartwig et al. 2011; Luo et al. 2013).

Hinsichtlich des Gradings zeigten sich zwischen den Kollektiven ebenso große Diskrepanzen. Im vorliegenden Kollektiv wurden bei nahezu gleich vielen Patienten ein Grading G1 oder G2 einerseits und G3 andererseits diagnostiziert (47,9 % vs. 52,1 %). In dem bereits erwähnten Kollektiv aus Heidelberg wiesen 69,3 % G1 oder G2 und nur 30,4 % G3 oder G4 auf (Hartwig et al. 2011). Die Analyse eines US-amerikanischen Kollektivs zeigte ähnliche Zahlen: G1 und G2 entsprachen hier 58,1 % und G3 und G4 zusammen 35,1 % (Tarantino et al. 2017). In den asiatischen Vergleichskollektiven ist zu sehen, dass wesentlich mehr Tumore besser differenziert waren. So waren bei Bo et al. 84,3 % der Patienten G1 oder G2 zugeordnet und bei Huang et al. 77,8 % (Bo et al. 2013; Huang et al. 2015) (Tabelle 32). Gründe für diese Diskrepanz können lediglich vermutet werden. Zum einen ist die histopathologische Untersuchung durch den Pathologen, bei der die Einteilung des Tumors zu einem Grad der Differenzierung erfolgt, entscheidend. Trotz internationaler Klassifikationen ist diese Einstufung als subjektiv einzuschätzen und daher möglicherweise ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse der genannten Studien. Analysen kommen zu dem Ergebnis, dass im asiatischen Raum der Tumorgrad nach der vorherrschenden Differenzierung erfolgt, wohingegen die WHO den Grad, nach dem am wenigsten differenzierten auftretenden Grad vergibt (Verbeke 2016). Eine weitere Analyse zur interobservativen Abweichung bei der Vergabe des Gradings zwischen japanischen, europäischen und nordamerikanischen Pathologen ergab, dass die Japaner 41 % der Proben als gut differenziert und nur 5 % als mäßig bis schlecht differenziert bewerteten, wohingegen bei den Europäern und Amerikanern nur 15 % als gut und 45 % als mäßig bis schlecht bezeichnet wurden (Verbeke 2016). Diese Tatsache passt gut zu den oben beschriebenen Ergebnissen und Differenzen. Außerdem tragen Risikofaktoren, wie Rauchen, Übergewicht und Diabetes mellitus maßgeblich zur steigenden Inzidenz des dukalen Adenokarzinoms des Pankreas bei (Camara et al. 2016). Das Auftreten dieser Risikofaktoren schwankt demographisch und zeigt Unterschiede zwischen ethnischen Gruppen. So haben asiatische Frauen den niedrigsten Tabakkonsum und asiatische Männer den zweitniedrigsten im Vergleich zu anderen ethnischen Gruppen und weisen gleichzeitig die niedrigste Inzidenzrate mit 8,9 (Frauen) und 10,7 (Männer) an

Pankreaskarzinomen pro 100.000 Personen pro Jahr auf. Die asiatische Population hat zudem auch eine niedrigere Prävalenz an Adipositas (Gordon-Dseagu et al. 2017). Inwieweit diese Faktoren auch einen Einfluss auf die Tumorbilogie und letztendlich den Differenzierungsgrad haben, ist unklar, aber als Ansatz einer Erklärung in Betracht zu ziehen.

Das Grading hatte im hier vorliegenden Kollektiv einen signifikanten Einfluss auf das Überleben ($p=0,006$, Abbildung 14 A). So überlebten Patienten mit einem Grading vom Grad 1 und 2 signifikant länger als solche mit einem Grad 3. Dieses Ergebnis wird durch andere Studien aus den USA, China und Deutschland bestätigt (Hartwig et al. 2011; Luo et al. 2013; Tarantino et al. 2017). Das Grading zeigte sich in der hier vorliegenden Arbeit in der Multivarianzanalyse außerdem als prognostisch unabhängiger Faktor ($p=0,050$). So besitzen Patienten mit einem Tumor vom Grad 3 ein 1,58-fach höheres Risiko zu versterben als Patienten mit einem Tumor vom Grad 1 oder 2 (Tabelle 31).

Die Rate an befallenen Lymphknoten (pN1) lag im eigenen Kollektiv bei 70,1 %, was mit Kollektiven anderer Arbeiten weitestgehend vergleichbar ist, wobei sich Raten von 61,9 % bis 75,7 % zeigen (Dandona et al. 2011; Hartwig et al. 2011; Bo et al. 2013). Wiederum interessant sind die Daten des Kollektivs von Huang et al., bei denen die pN1-Rate nur 26,5 % beträgt bei einer pN0-Rate von 71,6 % (Huang et al. 2015).

Der Befall von Lymphknoten hatte im eigenen Kollektiv einen signifikanten Einfluss auf das Überleben ($p<0,001$, Abbildung 13 B). Dies steht im Einklang mit der Literatur, in welcher der Lymphknotenbefall ebenso als prognostisch ungünstiger Faktor beschrieben wird (Han et al. 2006; Li et al. 2008; Hartwig et al. 2011; Huang et al. 2015; Tarantino et al. 2017). Der Befall von Lymphknoten konnte darüber hinaus als prognostisch unabhängiger Faktor in der Multivarianzanalyse identifiziert werden ($p<0,001$, Tabelle 31). Patienten, die eine pN1-Kategorie aufweisen, haben ein 3-fach höheres Risiko zu versterben als Patienten mit einer pN0-Kategorie.

Weiterhin zeigte sich in dem hier vorliegenden Kollektiv keine Signifikanz hinsichtlich des Überlebens zwischen den Gruppen pM0 und pM1 ($p=0,167$, Abbildung 13 D). Bei Huang et al. konnte ebenso kein Unterschied im Überleben entdeckt werden (Huang et al. 2015). Dagegen kamen Luo et al. und Hartwig et al. zu hochsignifikanten Ergebnissen bezüglich des Überlebens zwischen diesen zwei Gruppen (Hartwig et al. 2011; Luo et al. 2013). Möglicherweise sind für diese Diskrepanzen die Größe des jeweiligen Kollektivs sowie die unterschiedliche Ereignisanzahl der jeweiligen Gruppe ursächlich.

Auch für die Parameter Lymphgefäßinvasion und Veneninvasion konnten signifikante Ergebnisse in Bezug auf das Überleben im eigenen Kollektiv festgestellt werden ($p=0,009$ und $p=0,010$, Abbildung 14 B und C). Diese Ergebnisse stehen sowohl hinsichtlich der prognostischen Relevanz für die Veneninvasion (Zacharias et al. 2007; Li et al. 2008) als auch

Lymphgefäßinvasion (Cheng et al. 2012) weitestgehend in Einklang mit der Literatur. Bei Huang et al. fand sich wiederum kein signifikanter Zusammenhang (Huang et al. 2015).

Die perineurale Invasion zeigte sich, ebenso wie im Kollektiv von Huang et al. (Huang et al. 2015), als prognostisch nicht signifikant ($p=0,815$, Abbildung 14 D). Andere Arbeitsgruppen berichten jedoch von entscheidender prognostischer Relevanz der perineuralen Invasion beim duktaalen Adenokarzinom des Pankreas (Fouquet et al. 2014; Kondo et al. 2015).

4.4 Die prognostische Relevanz der ROR2-Expression

In den hier analysierten 117 Gewebeproben zeigte sich im Tumor hinsichtlich der ROR2-Expression bei 34,3 % eine negative und bei 65,8 % eine positive Expression. Im Stroma waren mit 71,8 % deutlich mehr Proben negativ und nur 28,2 % waren positiv. Bei 90 Proben (76,9 %) befand sich auch gesundes Pankreasgewebe auf dem Objektträger. Dabei zeigte sich bei 28,9 % der Proben eine negative und bei 71,1 % eine positive Expression. Im Vergleich zum Kollektiv von Huang et al. sind deutliche Unterschiede erkennbar. So waren dort 54,3 % der Tumoren negativ und 45,7 % positiv. Im Stroma waren in diesem Kollektiv mit 56,8 % mehr Proben negativ und nur 43,2 % positiv. Nur 28 Proben wiesen zudem gesundes Gewebe auf und von diesen zeigten 75,0 % eine negative Expression. Positiv waren nur 25 % (Huang et al. 2015) (Tabelle 33).

Tabelle 33: Vergleich ROR2-Expression

ROR2	N	Tumor		Stroma		N	Gesundes Gewebe	
		Negativ (%)	Positiv (%)	Negativ (%)	Positiv (%)		Negativ (%)	Positiv (%)
Eigenes Kollektiv	117	40(34,2)	77(65,8)	84(71,8)	33(28,2)	90	26(28,9)	64(71,1)
Huang et al.	162	88(54,3)	74(45,7)	92(58,8)	70(43,2)	28	21(75,0)	7(25,0)

Gründe für diese teilweise sehr unterschiedlichen Ergebnisse können nur vermutet werden. Denkbar sind ethnische Unterschiede in der Expression des Rezeptors, wobei es hierfür aktuell keine Belege gibt. Außerdem wurden für die Analyse der Gewebeproben unterschiedliche Techniken angewandt. Wie unter 2.8.1 beschrieben, wurden die eigenen Proben in 5 µm dicke Schnitte geschnitten und in ihrer Gesamtheit für die immunhistochemische Analyse genutzt. In der Analyse von Huang et al. wurde die Technik der Tissue Microarrays (TMA-Technik) angewandt, bei der lediglich ein kleiner Zylinder mit einem Durchmesser von 2 mm aus dem Gewebeblock herausgestanzt wurde, mit weiteren Stanzproben auf einem neuen Paraffinblock geordnet und anschließend weiterbearbeitet wurde. Es erscheint daher noch schwieriger einen ganzheitlichen Eindruck des Tumors und seiner Umgebung zu erhalten. Das Thema der intertumoralen und intratumoralen

Heterogenität rückt immer mehr in den Fokus der Wissenschaft und besagt, dass ein Tumor nicht als Einheit, sondern vielmehr aus mehreren Subtumoren besteht (Burrell et al. 2013). Diese Subtumoren weisen dabei unterschiedliche Gen- und Proteinexpressionsmuster auf. Durch genomische Instabilität kommt es zwischen diesen Subtumoren wiederum zu einer interzellulären Heterogenität und so möglicherweise zur Entstehung weiterer Subtumoren (Burrell et al. 2013). Auch für das duktales Adenokarzinom des Pankreas konnten solche Heterogenitäten auf genomischer Ebene festgestellt werden (Yachida et al. 2010; Collisson et al. 2011). Diese Tatsache hat Konsequenzen sowohl in Hinsicht auf die Diagnostik – nicht repräsentative Probeentnahme – als auch auf das Ansprechen auf eine Therapie. So kann es durch Target-Therapie zu einem Selektionsdruck kommen, durch den bereits vorhandene Subtumore einen Vorteil erlangen oder es kommt zur Entstehung neuer Mutationen (Baldus und Röcken 2016). Berücksichtigt man diese Fakten, so erscheint die Analyse eines Tumors mittels TMA-Technik als noch weniger ausreichend, um ihn in seiner Heterogenität zu erfassen, als dass dies mit herkömmlichen Methoden möglicherweise ohnehin der Fall ist.

Huang et al. untersuchten außerdem die mRNA-Expression an zehn Proben mit tumorösem und gesundem Gewebe und konnten einen signifikanten Unterschied ($p=0,016$) im Expressionsverhalten dahingehend feststellen, dass ROR2 im Tumor stärker exprimiert war als im gesunden Gewebe (Huang et al. 2015). In der Analyse zur Proteinexpression im eigenen Kollektiv konnte zwischen der Expression von ROR2 im Tumor und gesundem Gewebe kein signifikanter Unterschied gefunden werden ($p=0,378$, Abbildung 8 B). Im Gegenteil: Die Expression des Rezeptors ist wie oben erwähnt im gesunden Gewebe etwas höher als im Tumor. Von 90 Proben, die sowohl Tumorgewebe als auch gesundes Pankreasgewebe auf dem Objektträger aufwiesen, zeigten 49/90 (54,5 %) in beiden Kompartimenten eine positive Expression von ROR2.

Es wird beschrieben, dass ROR2 vor allem während der embryonalen Entwicklung stark exprimiert und in den meisten adulten Gewebe nur noch zu einem geringen Ausmaß vorhanden ist (Debebe und Rathmell 2015; Rebagay et al. 2012). Einige Studien bestätigen dies und zeigten, dass ROR2 im Tumorgewebe höher exprimiert ist als in entsprechendem gesundem Gewebe. Dazu gehören beispielsweise das Melanom (O'Connell et al. 2010), das Prostatakarzinom (Yamamoto et al. 2010), das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (Lu et al. 2015) und das Adenokarzinom des Ösophagus (Lyros et al. 2016). Im Magenkarzinom ist es jedoch so, dass die Expression von ROR2 im Tumorgewebe im Vergleich zum gesundem Gewebe herunterreguliert ist (Yan et al. 2016). Studien der Gruppe um den sogenannten „Human Protein Atlas“ (www.proteinatlas.org) zeigten darüber hinaus, dass ROR2 doch häufiger auch im gesunden Gewebe exprimiert ist als bisher angenommen. Dazu gehörte auch das gesunde Pankreasgewebe, welches genau, wie im vorliegenden Kollektiv eine mittlere bis starke ROR2-Expression vorwies (Uhlen et al. 2017). Weiterführende Untersuchungen sind

nötig, um die Rolle von ROR2 im gesunden adulten Gewebe zu eruieren, auch um herauszufinden, ob er sich als therapeutisches Target überhaupt eignet.

Signifikante Unterschiede zeigten sich im eigenen Kollektiv zwischen der Expression von ROR2 im Tumor und Stroma ($p < 0,001$, Abbildung 8 B), wobei ROR2 im Tumor stärker exprimiert war als im Stroma. Die ROR2-Expression zwischen gesundem Gewebe und Stroma unterschied sich ebenso signifikant ($p < 0,001$, Abbildung 8 B). Dabei war ROR2 im gesunden Gewebe stärker exprimiert als im Stroma. Auch bei Huang et al. zeigte sich die ROR2-Expression im Stroma überwiegend negativ, aber inwieweit sich diese zu der im Tumor und gesunden Gewebe unterschied, wurde nicht analysiert (Huang et al. 2015).

Weiterhin wurde untersucht, ob es eine Korrelation zwischen der Expression von ROR2 in Tumor und Stroma und klinisch-pathologischen Parametern gibt (Tabelle 22). Zu keinem der untersuchten Parameter Geschlecht, Alter, pT-, pN- und pM-Kategorie, Grading, UICC-Stadium, Lymphgefäßinvasion, Veneninvasion, Invasion von Perineuralscheiden und Rezidivaufreten, konnte eine signifikante Korrelation in Bezug auf die ROR2-Expression in Tumor und Stroma festgestellt werden. Bei Huang et al. fand sich zu den meisten Parametern ebenso kein signifikanter Zusammenhang. Die Gruppe konnte aber zeigen, dass eine hohe Expression im Tumor mit T- und M-Kategorie sowie TNM-Stadium (entspricht UICC-Stadium) korreliert. Außerdem zeigte sich in ihrem Kollektiv eine Korrelation von hoher stromaler Expression zu N-Kategorie und TNM-Stadium (Huang et al. 2015). Bei einer Untersuchung zur ROR2-Expression im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom konnte nur eine Korrelation der ROR2-Expression zum TNM-Stadium jedoch zu keinem weiteren klinisch-pathologischen Parameter gefunden werden (Lu et al. 2015). Wie bereits erwähnt, können Gründe für die bestehenden Diskrepanzen nur vermutet werden.

Da im eigenen Kollektiv die Expression von ROR2 auch im gesunden Gewebe sehr stark war, wurde auch hier eine Korrelationsanalyse mit den entsprechenden klinisch-pathologischen Parametern durchgeführt (Tabelle 23). Die Annahme war, dass bereits eine hohe Expression im gesunden Gewebe Hinweise auf die Karzinogenese und klinische Präsentation liefern könnte, wobei auch hier weiterführende Untersuchungen nötig wären, um diese Annahme zu stützen. Jedoch zeigten sich in dieser Analyse ebenso keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Daraus lässt sich schließen, dass eine Korrelation des Expressionsmusters von ROR2 mit klinisch-pathologischen Parametern eher die Ausnahme als die Regel zu sein scheint. Weitere Studien mit größeren Kollektiven und weiterführenden Experimenten sind nötig, um Klarheit hinsichtlich der Rolle von ROR2 im duktalem Adenokarzinom des Pankreas zu schaffen.

Außerdem wurde der Einfluss des Expressionsmusters in Tumor, Stroma und gesundem Gewebe von ROR2 auf das Überleben geprüft. Es konnte keine statistische Signifikanz für das Überleben bezüglich der Expression im Tumor nachgewiesen werden ($p = 0,260$,

Abbildung 16 A), obwohl sich die medianen Überlebenszeiten der beiden Gruppen stark unterschieden. Patienten mit negativer Expression überlebten im Schnitt nur 13,7 Monate wohingegen diejenigen mit positiver Expression 23,9 Monate lebten, also einen Überlebensvorteil von 10,2 Monaten hatten. Ebenso zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf das Überleben bezüglich der ROR2-Expression im Stroma ($p=0,820$, Abbildung 16 B), wobei auch hier die Patienten mit negativer Expression mit 16,2 Monaten ein deutlich kürzeres Überleben aufzeigten als die Patienten mit positiver Expression, die 26,8 Monate lebten. Es ist hier also ein Überlebensvorteil für die Patienten mit positiver Expression sowohl im Tumor als auch im Stroma, wenngleich nicht signifikant, zu vermerken. Die Überlebensanalyse hinsichtlich der Expression im gesunden Gewebe zeigte ebenso keine Korrelation ($p=0,888$, Abbildung 16 C).

Die Multivarianzanalyse ergab, dass weder die ROR2-Expression im Tumor noch im Stroma als unabhängiger prognostischer Faktor zu sehen ist (Tabelle 31). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Huang et al.. In diesem Kollektiv wurde gezeigt, dass eine hohe Expression von ROR2 in Tumor und Stroma zu einem signifikant kürzeren Überleben führte (Tumor: $p=0,033$, Stroma: $p<0,001$). Auch die Multivarianzanalyse zeigte, dass eine hohe Expression von ROR2 im Tumor und Stroma ein unabhängiger Faktor für das Überleben ist (Huang et al. 2015). Die bereits erwähnte Studie zur Expression von ROR2 im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom kam zu ähnlichen Ergebnissen und zeigte einen klaren Überlebensvorteil für diejenigen Patienten mit negativer Expression im Vergleich zu denen mit positiver Expression ($p<0,001$) (Lu et al. 2015).

Es wurde ebenso eine Überlebensanalyse hinsichtlich der ROR2-Expression im Tumor für diejenigen Patienten im Kollektiv durchgeführt, die eine adjuvante Chemotherapie erhalten hatten ($n=50$). Dabei zeigte sich keine Signifikanz, jedoch eine deutliche Tendenz zum besseren Gesamtüberleben bei Patienten mit positiver ROR2-Expression ($p=0,072$, Abbildung 16 D), welche 20 Monate länger lebten, als Patienten mit negativer ROR2-Expression. Dies könnte möglicherweise ein Hinweis auf ein besseres Ansprechen der Chemotherapie sein. So diskutieren Fujita et al. die Tatsache, dass die Genexpression von Proteinen, die in den Transport und die Metabolisierung von gemcitabin-basierter Chemotherapie involviert sind, maßgebend zur individuellen Sensibilität von Patienten beitragen. Sie zeigen in ihrer Analyse, dass u. a. eine hohe Expression von *hENT1* (Transportmolekül, welches Gemcitabin in Zellen transportiert) mit einem besseren Ansprechen auf die Chemotherapie und verlängertem Gesamtüberleben der Patienten verbunden ist (Fujita et al. 2010). In welchem Ausmaß ROR2 die Metabolisierung von Chemotherapeutika beeinflusst, lässt sich an dieser Stelle jedoch nur vermuten.

Zusätzlich wurden im eigenen Kollektiv Subgruppen für weitere Analysen zum Einfluss der ROR2-Expression gebildet wie unter 3.4.3 beschrieben. Ziel war es, herauszufinden, welchen Einfluss ROR2 im Tumor und Stroma innerhalb der pT- und pN-Kategorien einnimmt.

Hinsichtlich der Analyse zum Einfluss der ROR2-Expression im Tumor innerhalb der pT-Kategorien war kein signifikanter Einfluss zu vermerken ($p=0,060$, Abbildung 17 A). Das bedeutet, dass die Expression des Rezeptors zwischen den erwähnten Gruppen keinerlei Einfluss auf das Überleben hatte. Unterschiede im Überleben können hier im Prinzip nur auf die Höhe der pT-Kategorie zurückgeführt werden, obgleich zwischen den Gruppen ROR2+/pT3&pT4 und ROR2-/pT3&pT4 eine Differenz von 7,5 Monaten zugunsten der Gruppe mit positiver Expression zu finden war. Ähnliches ergab sich für die ROR2-Expression im Stroma in Bezug auf die pT-Kategorie. Auch hier fanden sich keine statistisch signifikanten Ergebnisse hinsichtlich des Überlebens ($p=0,175$, Abbildung 17 B), obwohl ebenso innerhalb der pT1&pT2-Gruppen sowie pT3&pT4-Gruppen immer diejenige Gruppe mit positiver Expression eine bessere Prognose aufwies, als jene mit negativer Expression.

Wie erwähnt, wurde ebenso eine Analyse zum Einfluss der ROR2-Expression innerhalb der pN-Kategorie durchgeführt, sodass sich Subgruppen wie oben beschrieben ergaben. Es zeigte sich, dass bei Lymphknotenbefall (pN1), die Expression von ROR2 sowohl im Tumor als auch im Stroma einen signifikanten Einfluss auf das Überleben hat. Patienten mit positiver Expression im Tumor überlebten im Durchschnitt 3,3 Monate länger (16,1 vs. 12,8 Monate, $p<0,001$, Abbildung 18 A). Ebenfalls führte eine positive Expression im Stroma dazu, dass Patienten 13,1 Monate länger lebten (26,0 vs. 12,9 Monate, $p<0,001$, Abbildung 18 B).

Dies ist möglicherweise ein Hinweis darauf, dass besonders in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung (pT3&pT4, sowie pN1) die Expression von ROR2 eine Bedeutung bekommt und eine positive Expression im Tumor und Stroma protektiv wirkt. Der kanonische Signalweg ist im dukalen Adenokarzinom des Pankreas aktiviert (Al-Aynati et al. 2004; Ripka et al. 2007) und Untersuchungen kommen zu dem Schluss, dass durch eine Aktivierung des nicht-kanonischen Signalweges über ROR2 die Aktivität des kanonischen Signalweges gehemmt wird (Ford et al. 2013; Debebe und Rathmell 2015). Daher könnte man annehmen, dass die Präsenz des Rezeptors ROR2 dazu führt, dass eine verstärkte Aktivierung des nicht-kanonischen Signalweges entsprechend den Tumorprogress hemmt und so zu einem, wenn auch nicht signifikantem, Überlebensvorteil führt. Möglicherweise ist die Präsenz des Rezeptors im gesunden Gewebe bereits ein Hinweis auf seine Präsenz und Wirkung im Tumorgewebe. 54,4 % der Patienten wiesen in der hiesigen Analyse sowohl im gesunden als auch tumorösen Gewebe eine hohe Expression auf. Welche Rolle ROR2 im adulten Gewebe generell einnimmt, ist wie erwähnt nicht abschließend geklärt und muss neben seiner Rolle in der Karzinogenese ebenso weiter untersucht werden.

4.5 Die prognostische Relevanz der WNT5A-Expression

Neben der Expression des Rezeptors ROR2 wurde auch die Expression seines Liganden WNT5A untersucht. Ein positives Expressionsmuster im Tumor zeigte sich bei 76,9 % der Proben und nur 23,1 % waren negativ. Im Stroma war die überwiegende Anzahl mit 59,0 % positiv und 41,0 % negativ gefärbt. Gesundes Gewebe war nur bei 88 (72,2 %) von 117 der Gewebeproben vorhanden. Von diesen zeigten sich mit 83,0 % die meisten mit einer positiven WNT5A-Expression und nur 17,0 % wiesen eine negative Expression auf. Im Vergleich zur Studie von Bo et al. zeigten sich hinsichtlich der Expression im Tumor ähnliche Ergebnisse. 81,3 % der Proben waren positiv und 18,7 % negativ. Im gesunden Gewebe zeigten diese Proben allerdings nur bei 16,4 % eine positive Expression und die überwiegende Anzahl war mit 83,6 % schwach bis gar nicht gefärbt (Bo et al. 2013) (Tabelle 34). Im eigenen Kollektiv war es dagegen so, dass von den 88 Proben, die Tumorgewebe und gesundes Gewebe aufwiesen, bei 62/88 (77,3 %) beide Kompartimente eine positive Expression zeigten. Die Expression von WNT5A im Stroma wurde von Bo et al. nicht untersucht.

Tabelle 34: Vergleich WNT5A-Expression (n. a. - nicht analysiert)

WNT5A	N	Tumor		Stroma		N	Gesundes Gewebe	
		Negativ (%)	Positiv (%)	Negativ (%)	Positiv (%)		Negativ (%)	Positiv (%)
Eigenes Kollektiv	117	27(23,1)	90(76,9)	48(41,0)	69(59,0)	88	15(17,0)	73(83,0)
Bo et al.	134	25(18,7)	109(81,3)	n. a.	n. a.	134	112(83,6)	22(16,4)

Auch die Analyse von Ripka et al. zeigte, dass die Expression von WNT5A auf mRNA- und Proteinebene in der Karzinogenese des Pankreas stetig zunimmt. Die immunhistochemische Analyse des Tumorgewebes dieser Studie zeigte eine hohe WNT5A-Expression in 13/16 (81,3 %) Proben, jedoch nur eine schwache Expression im anliegenden gesundem Gewebe (Ripka et al. 2007). Im Gegensatz dazu, zeigte eine frühere Expressionsprofilanalyse eine geringe WNT5A-Expression im duktalem Adenokarzinom des Pankreas (Crnogorac-Jurcevic et al. 2001).

Es werden hier Diskrepanzen sowohl hinsichtlich der Expression von WNT5A im Tumorgewebe, als auch im gesunden Gewebe zwischen den verschiedenen Studien deutlich. Als Erklärung sind ethnische Unterschiede der Expression von WNT5A im gesunden Gewebe in Erwägung zu ziehen, wobei es hierfür derzeit keinen Beleg gibt und die Frage aufkommt, welche Rolle WNT5A im gesunden Gewebe allgemein einnimmt. Bekannt ist, dass WNT5A vor allem während der Embryogenese eine entscheidende Rolle besitzt und Mutationen zu verschiedenen Anomalien und sogar perinatalem Versterben führen können (Yamaguchi et al. 1999; Oishi et al. 2003b). Im adulten Gewebe sind WNT-Proteine an der Aufrechterhaltung

der Zellhomöostase beteiligt (Miller 2001). Die genaue Bedeutung von WNT5A im gesunden Gewebe ist wenig geklärt und seine Rolle in der Tumorgenese verschiedener Tumorentitäten kontrovers (Minami et al. 2010). Analysen mit größeren Kollektiven sind notwendig, um das Expressionsprofil von WNT5A im pankreatischen Tumorgewebe und normalen Gewebe nochmals zu untersuchen und so Gewissheit hinsichtlich der Tragweite seiner Rolle zu erlangen.

Daten zur Expression von WNT5A im Stroma des Pankreaskarzinoms gibt es bisher nicht. Die Ergebnisse der eigenen Analyse zeigten eine statistisch signifikant geringere Expression verglichen mit der im Tumor und gesundem Gewebe (jeweils $p < 0,001$, Abbildung 8 A). Eine Untersuchung zur stromalen WNT5A-Expression im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom zeigte ebenfalls eine sehr niedrige Expression (Huang et al. 2005).

Ebenso wurde untersucht, ob es eine Korrelation zwischen der Expression von WNT5A im Tumor und Stroma zu klinisch-pathologischen Parametern gibt (Tabelle 24). Zu keinem der Parameter Geschlecht, Alter, pT-, pN- und pM-Kategorie, Grading, UICC-Stadium, Lymphgefäßinvasion, Veneninvasion, Invasion von Perineuralscheiden und Rezidivaufreten konnte eine signifikante Korrelation in Bezug auf die WNT5A-Expression in Tumor und Stroma festgestellt werden, wenngleich eine Tendenz zur Signifikanz zwischen der WNT5A-Expression im Stroma und UICC-Stadien IIa und IIb bestand ($p = 0,075$, Tabelle 24). Auch bei Bo et al. zeigte sich zu den meisten der klinisch-pathologischen Parametern keine signifikante Korrelation. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass die WNT5A-Expression mit abnehmenden Differenzierungsgrad (Grading) abnahm (Bo et al. 2013). Auch in der erwähnten Studie zur WNT5A-Expression im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom konnten keine relevanten Zusammenhänge zu pT- und pN-Kategorien sowie Grading gefunden werden (Huang et al. 2005). Die Korrelationsanalyse der WNT5A-Expression im gesunden Gewebe zu klinisch-pathologischen Parametern ergab lediglich in Bezug auf das Rezidivaufreten in Form von Metastasen eine Signifikanz ($p = 0,042$, Tabelle 25). Allerdings kann hierbei nur spekuliert werden, inwieweit eine positive Expression im gesunden Gewebe einen Einfluss auf das Auftreten von Metastasen hat. In Zusammenschau aller Resultate ist dieses Ergebnis am ehesten als Zufall zu werten.

Es wurde auch der Einfluss der WNT5A-Expression in Tumor, Stroma und gesundem Gewebe auf das Überleben untersucht. Dabei konnte kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expression im Tumor gezeigt werden ($p = 0,829$, Abbildung 19 A), obwohl Patienten mit positiver Expression mit 20,4 Monaten 6 Monate länger lebten als Patienten mit negativer Expression, die nur 14,4 Monate lebten. Bo et al. kamen zu dem gleichen Ergebnis: Auch bei ihnen überlebten Patienten mit positiver WNT5A-Expression länger, ohne dass das Ergebnis signifikant war (Bo et al. 2013). Die Analyse im eigenen Kollektiv zur WNT5A-Expression im Stroma zeigte ebenso keinen signifikanten Unterschied zwischen den

Gruppen ($p=0,411$, Abbildung 19 B), wobei auch hier Patienten mit positiver Expression 7,7 Monate länger lebten als Patienten mit negativer Expression (22,2 vs. 14,5 Monate). Ebenso konnte weder die WNT5A-Expression im Tumor noch im Stroma als unabhängiger prognostischer Faktor in der Multivarianzanalyse identifiziert werden (Tabelle 31). Hinsichtlich des Einflusses der WNT5A-Expression im gesunden Gewebe auf das Überleben zeigte sich auch keine Signifikanz ($p=0,842$, Abbildung 19 C). Die Überlebensanalyse hinsichtlich des Ansprechens auf die Gabe einer adjuvanten Chemotherapie in Abhängigkeit der WNT5A-Expression im Tumor ergab ebenso keine Signifikanz ($p=0,481$, Abbildung 19 D).

Identisch zur Untersuchung der prognostischen Relevanz der ROR2-Expression im Pankreaskarzinom wurden auch für die Analyse der WNT5A-Expression Subgruppen gebildet wie unter 3.4.4 beschrieben. Ziel war es, den Einfluss von WNT5A im Tumor und Stroma in den pT- und pN-Kategorien zu untersuchen.

In der Subgruppenanalyse der WNT5A-Expression im Tumor und Stroma innerhalb der pT-Kategorie konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden ($p=0,177$, Abbildung 20 A und $p=0,098$, Abbildung 20 B). Gleiches ergab sich in der Analyse zum Einfluss der Expression innerhalb der pN-Kategorien. In diesem Fall zeigte sich das Ergebnis der Gesamtanalyse zwar als statistisch signifikant, sowohl hinsichtlich der Expression im Tumor als auch im Stroma (jeweils $p<0,001$, Abbildung 21), jedoch sind diese Signifikanzen nur auf den Einfluss der pN-Kategorie zurückzuführen, wie in Tabelle 28 und Tabelle 29 zu sehen ist. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass das Vorhandensein von WNT5A keinerlei Einfluss auf das Überleben zwischen den pT- und pN-Kategorien nimmt. In Übereinstimmung mit der Studie von Bo et al. scheint WNT5A im Pankreaskarzinom klinisch gesehen keinen entscheidenden Einfluss zu besitzen (Bo et al. 2013). Die *in-vitro*-Untersuchungen eben dieser Studie kommen paradoxerweise jedoch zu dem Schluss, dass WNT5A einen starken Einfluss auf das Metastasierungsverhalten und die sogenannte Epithelial-Mesenchymale Transition hat und somit eine entscheidende Funktion auf molekularer Ebene innehat. Auch Ripka et al. bestätigen einen maßgeblichen Einfluss von WNT5A bei Migration, Proliferation und Invasion in verschiedenen Zelllinien und der Regulation von Markerproteinen der Epithelial-Mesenchymale Transition (Ripka et al. 2007). Weitere Untersuchungen sind daher nötig, um den klinischen Wert von WNT5A besser einschätzen zu können.

4.6 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Untersuchung zeigten sich sowohl WNT5A als auch ROR2 im Tumorgewebe und gesundem Gewebe stark exprimiert. Ein Zusammenhang zwischen Expressionsmuster und klinisch-pathologischen Parametern konnte nicht gefunden werden. Die Analyse zur prognostischen Relevanz der Expressionsmuster von Ligand und Rezeptor

zeigte, dass eine starke Expression von ROR2 im fortgeschrittenen Tumorstadium (pT3&pT4) sowie bei Lymphknotenbefall (pN1) einen signifikanten Einfluss auf das Überleben hatte.

Das genaue Zusammenspiel von WNT5A und ROR2 ist seit einiger Zeit Gegenstand der Forschung, jedoch bis heute nicht vollends aufgeklärt. WNT5A bindet an ROR2 und führt zur Aktivierung des nicht-kanonischen Signalweges. Über bisher ungeklärte Mechanismen kommt es so zur Inhibition des kanonischen Signalweges (Ford et al. 2013; Mikels und Nusse 2006; Grumolato et al. 2010). Der kanonische Signalweg zeigt sich in einigen Tumorentitäten aktiv (Clevers und Nusse 2012), darunter auch das Pankreaskarzinom (Al-Aynati et al. 2004; Ripka et al. 2007). Es kann nur vermutet werden, dass es auch im Pankreaskarzinom zum oben beschriebenen Mechanismus kommt, der über WNT5A und ROR2 zur Hemmung des kanonischen Signalweges führt und es somit in späten Tumorstadien zu einem leichten Überlebensvorteil der Patienten mit besonders starker Expression von ROR2 kommt.

Es ist anzumerken, dass in der vorliegenden Arbeit lediglich die Expressionsmuster auf Proteinebene untersucht wurden und daher zum möglichen Ablauf der Signalkaskaden und genauen Interaktion um WNT5A und ROR2 keine Aussagen gemacht werden können. Der Fokus lag auf der Untersuchung der klinischen Relevanz der beiden Moleküle. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass anhand der gewonnenen Daten dieser Arbeit keine wesentlichen Zusammenhänge zu klinisch-pathologischen Parametern hinsichtlich der Expression von ROR2 und WNT5A zu finden waren. Es zeigte sich außerdem keine prognostische Relevanz hinsichtlich der WNT5A-Expression. Eine hohe Expression von ROR2 hat in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium (pT3&pT4 sowie pN1) einen positiven Einfluss auf die Prognose.

In zukünftigen Experimenten könnte ein Fokus auf die Analyse des kanonischen Signalweges in Abhängigkeit der Expression von WNT5A und ROR2 im duktalem Adenokarzinom des Pankreas gelegt werden. Es sollte überprüft werden, welche Rolle auch andere Rezeptoren von WNT5A spielen und inwieweit der nicht-kanonische Signalweg seine inhibierende Funktion ausübt.

Die dargestellten deutlichen Unterschiede der Expression von WNT5A und ROR2 im duktalem Adenokarzinom des Pankreas im Vergleich zu anderen Kollektiven, sowie die ausgeprägte Expression auch im gesunden Gewebe und die dazukommende beschriebene intra- und intertumorale Heterogenität könnten eine Limitation in Hinsicht auf einen möglichen Therapieansatz darstellen, weshalb für die Bewertung der klinischen Relevanz Analysen mit größeren Patientenzahlen nötig sind, um hier Klarheit zu schaffen.

5 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Die Bedeutung des WNT5A/ROR2-Signalweges beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas

Eingereicht von Lydia Remtisch

Angefertigt an der Universität Leipzig/Medizinische Fakultät

Klinik und Poliklinik für Viszeral-, Transplantations-, Thorax- und Gefäßchirurgie

Betreut von Prof. Dr. med. Ines Gockel und Dr. med. Orestis Lyros

Januar 2019

Das Pankreaskarzinom geht nach wie vor mit einer sehr schlechten Prognose und hohen Letalität einher. Es hat mit 9 % die niedrigste 5-Jahresüberlebensrate unter den Krebserkrankungen und liegt damit an 4. Stelle der durch Krebserkrankungen verursachten Todesfälle. Die häufigste Form stellt das duktales Adenokarzinom mit Ausgang von den kleinen Pankreasgängen dar. Aufgrund einer sehr unspezifischen Frühsymptomatik wird das Pankreaskarzinom häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Aktuell ist der einzig kurative Therapieansatz die operative Resektion mit anschließender Chemotherapie.

Die molekulare Pathogenese gestaltet sich sehr vielseitig und komplex. WNT5A gehört zur Familie der WNT-Proteine, die wiederum zur Gruppe der Wachstumsfaktoren gehören und aktiviert abhängig vom zellulären Kontext und Rezeptorstatus unterschiedliche Signalkaskaden. Einer seiner möglichen Rezeptoren ist ROR2, der zusammen mit ROR1 eine Subgruppe der großen Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen bildet. Die Interaktion von WNT5A und ROR2 führt zur Aktivierung des sogenannten nicht-kanonischen β -Catenin unabhängigen Signalweges. Dieser wiederum hemmt den kanonischen β -Catenin abhängigen Signalweg, der für Tumorprogress bekannt und im Pankreaskarzinom aktiviert ist. Die Rolle von WNT5A und ROR2 in der Karzinogenese verschiedener Tumorentitäten ist kontrovers. In manchen Tumoren wird ihnen eine Rolle als Tumorsuppressor zugeschrieben, in anderen besitzen sie ein onkogenetisches Potential. Die Rolle von WNT5A und ROR2 im duktalem

Adenokarzinom des Pankreas ist insgesamt wenig erforscht, vor allem in Hinsicht auf ihre klinische Relevanz.

Ziel dieser Arbeit war es, die Expressionsmuster von WNT5A und ROR2 im duktalem Adenokarzinom des Pankreas zu beschreiben, das Patientenkollektiv zu charakterisieren und Zusammenhänge mit klinisch-pathologischen Parametern und dem Gesamtüberleben zu finden.

Es standen 117 Tumorproben zur Verfügung, die im Zeitraum vom 2001 bis 2013 am Universitätsklinikum Leipzig chirurgisch gewonnen und im Institut für Pathologie des Klinikums aufbewahrt wurden. Das Patientenkollektiv umfasste 72 Männer und 45 Frauen mit einem medianen Alter von 66 Jahren. Die angefertigten Schnitte wurden immunhistochemisch mit Antikörpern gegen WNT5A und ROR2 charakterisiert. Im Anschluss daran beurteilten drei unabhängige Gutachter den prozentualen Anteil der Färbung im Schnitt und dessen Intensität in jeweils Tumor, Stroma und gesundem Gewebe. Daraus wurde ein Score berechnet, der Werte von 0–300 einnehmen konnte. Ausgehend von einem Cut-off-Wert wurden die Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung in negative und positive Expression eingeteilt und eine statistische Analyse angeschlossen.

Die WNT5A-Färbung zeigte eine starke positive Expression im Tumor und gesundem Gewebe, jedoch nur eine geringe Expression im Stroma. Dabei unterschied sich die WNT5A-Expression von Tumor zu Stroma sowie gesundem Gewebe zu Stroma signifikant. Eine ausgeprägte positive Expression von ROR2 war ebenso im Tumor und gesundem Gewebe zu verzeichnen, wohingegen der Rezeptor im Stroma nur gering exprimiert war. Die ROR2-Expression unterschied sich zwischen Tumor und Stroma und gesundem Gewebe und Stroma ebenfalls signifikant. Die Korrelationsanalyse der Expressionsmuster von WNT5A und ROR2 mit klinisch-pathologischen Parametern zeigte keine Signifikanzen. Die Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit nach klinisch-pathologischen Parametern ergab eine prognostische Relevanz für T- und N-Kategorie, UICC-Stadium, Grading, Lymphgefäß- und Veneninvasion sowie das Rezidivaufreten in Form von Metastasen. In der Multivarianzanalyse konnten der Befall von Lymphknoten (pN1) und ein Grading vom Grad 3 als ungünstige unabhängige prognostische Faktoren identifiziert werden. Die Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit der ROR2-Expression in Tumor, Stroma und gesundem Gewebe zeigte keine Signifikanz. Jedoch ließ sich eine Tendenz für eine bessere Überlebensprognose für die Gruppe mit positiver ROR2-Expression erkennen. Die Subgruppenanalyse zeigte darüber hinaus, dass eine positive Expression von ROR2 im Tumor und Stroma innerhalb der Patientengruppe mit Lymphknotenbefall (pN1) einen signifikanten Überlebensvorteil hatte. In der Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit der WNT5A-Expression in Tumor, Stroma und gesundem Gewebe ließ sich keine Signifikanz nachweisen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen insgesamt nur eine geringe klinische Relevanz von WNT5A, wohingegen *in-vitro*-Untersuchungen ihm einen starken Einfluss in Hinsicht auf Migration, Proliferation und Invasionsverhalten zusprachen. ROR2 scheint vor allem im fortgeschrittenen Tumorstadium (pT3&pT4, sowie pN1) einen Einfluss auf das Überleben zu nehmen und durch eine positive Expression in Tumor und Stroma protektiv zu wirken. Denkbar wäre die durch seine Präsenz verstärkte Aktivierung des nicht-kanonischen Signalweges über WNT5A, die dann zur Hemmung des kanonischen Signalweges führen könnte. Um dieser Hypothese nachzugehen, sind weiterführende Untersuchungen unverzichtbar. Auch um die klinische Relevanz besser einschätzen zu können, sind größere Kollektive und umfassendere Analysen notwendig.

6 Literaturverzeichnis

- Afzal, Ali R.; Jeffery, Steve (2003): One gene, two phenotypes: ROR2 mutations in autosomal recessive Robinow syndrome and autosomal dominant brachydactyly type B. In: *Human mutation* 22 (1), S. 1–11. DOI: 10.1002/humu.10233.
- Afzal, Ali R.; Rajab, Anna; Fenske, Christiane D; Oldrige, Michael; Elanko, Navaratnam; Ternes- Pereira, Eliana et al. (2000): Recessive Robinow syndrome, allelic to dominant brachydactyly type B, is caused by mutation of ROR2. In: *Nature Genetics*, zuletzt geprüft am 24.04.2017.
- Al-Aynati, Maamoun M.; Radulovich, Nikolina; Riddell, Robert H.; Tsao, Ming-Sound (2004): Epithelial-Cadherin and Beta-Catenin Expression Changes in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, S. 1235–1240, zuletzt geprüft am 14.06.2018.
- Almoguera, Concepcion; Shibata, Darryl; Forrester, Kathleen; Martin, John; Arnheim, Norman; Perucho, Manuel (1988): Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. In: *Cell* 53 (4), S. 549–554. DOI: 10.1016/0092-8674(88)90571-5.
- Asem, Marwa S.; Buechler, Steven; Wates, Rebecca Burkhalter; Miller, Daniel L.; Stack, M. Sharon (2016): Wnt5a Signaling in Cancer. In: *Cancers* 8 (9). DOI: 10.3390/cancers8090079.
- Aumüller, Gerhard; Wurzing, Laurenz J. (2010): Anatomie. 2. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).
- Baldus, Claudia; Röcken, Christoph (2016): Tumorheterogenität. In: *Forum* 31 (3), S. 212–215. DOI: 10.1007/s12312-016-0061-5.
- Batabyal, Pikli; Vander Hoorn, Stephen; Christophi, Christopher; Nikfarjam, Mehrdad (2014): Association of diabetes mellitus and pancreatic adenocarcinoma: a meta-analysis of 88 studies. In: *Annals of surgical oncology* 21 (7), S. 2453–2462. DOI: 10.1245/s10434-014-3625-6.
- Bauer, Matthieu; Bénard, Jean; Gaasterland, Terry; Willert, Karl; Cappellen, David (2013): WNT5A encodes two isoforms with distinct functions in cancers. In: *PloS one* 8 (11), e80526. DOI: 10.1371/journal.pone.0080526.
- Berrington de Gonzalez, A.; Sweetland, S.; Spencer, E. (2003): A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer. In: *British journal of cancer* 89 (3), S. 519–523. DOI: 10.1038/sj.bjc.6601140.
- Blanc, Etienne; Le Roux, Gwenaelle; Benard, Jean; Raguenes, Gilda (2005): Low expression of Wnt-5a gene is associated with high-risk neuroblastoma. In: *Oncogene* 24 (7), S. 1277–1283. DOI: 10.1038/sj.onc.1208255.
- Bo, Haiji; Zhang, Shuhui; Gao, Li; Chen, Ying; Zhang, Jing; Chang, Xuejiao; Zhu, Minghua (2013): Upregulation of Wnt5a promotes epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of pancreatic cancer cells. In: *BMC cancer* 13, S. 496. DOI: 10.1186/1471-2407-13-496.
- Brunner, Thomas B.; Scott-Brown, Martin (2010): The role of radiotherapy in multimodal treatment of pancreatic carcinoma. In: *Radiation oncology (London, England)* 5, S. 64. DOI: 10.1186/1748-717X-5-64.
- Burrell, Rebecca A.; McGranahan, Nicholas; Bartek, Jiri; Swanton, Charles (2013): The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. In: *Nature* 501 (7467), S. 338–345. DOI: 10.1038/nature12625.
- Camara, Soriba Naby; Yin, Tao; Yang, Ming; Li, Xiang; Gong, Qiong; Zhou, Jing et al. (2016): High risk factors of pancreatic carcinoma. In: *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]* 36 (3), S. 295–304. DOI: 10.1007/s11596-016-1583-x.
- Cheng, Peng; Jin, Gang; Hu, Xiangui; Shi, Min; Zhang, Yijie; Liu, Rui et al. (2012): Analysis of tumor-induced lymphangiogenesis and lymphatic vessel invasion of pancreatic carcinoma in the peripheral nerve plexus. In: *Cancer science* 103 (10), S. 1756–1763. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02364.x.
- Clevers, Hans; Nusse, Roel (2012): Wnt/beta-catenin signaling and disease. In: *Cell* 149 (6), S. 1192–1205. DOI: 10.1016/j.cell.2012.05.012.
- Cohenuram, Michael; Saif, Muhammad Wasif (2007): Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition Strategies in Pancreatic Cancer: Past, Present and the Future. In: *Journal of the Pancreas*, zuletzt geprüft am 05.04.2017.
- Collisson, Eric A.; Sadanandam, Anguraj; Olson, Peter; Gibb, William J.; Truitt, Morgan; Gu, Shenda et al. (2011): Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. In: *Nature medicine* 17 (4), S. 500–503. DOI: 10.1038/nm.2344.
- Conroy, Thierry; Desseigne, Françoise; Ychou, Marc; Bouché, Olivier; Guimbaud, Rosine; Bécouarn, Yves et al. (2011): FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. In: *The New England journal of medicine* (364), S. 1817–1825, zuletzt geprüft am 27.03.2017.

- Crnogorac-Jurcevic, T.; Efthimiou, E.; Capelli, P.; Blaveri, E.; Baron, A.; Terris, B. et al. (2001): Gene expression profiles of pancreatic cancer and stromal desmoplasia. In: *Oncogene* 20 (50), S. 7437–7446. DOI: 10.1038/sj.onc.1204935.
- Da Forno, Philip D.; Pringle, J. Howard; Hutchinson, Peter; Osborn, Joy; Huang, Qiang; Potter, Linda et al. (2008): WNT5A expression increases during melanoma progression and correlates with outcome. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14 (18), S. 5825–5832. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-5104.
- Dandona, Monica; Linehan, David; Hawkins, William; Strasberg, Steven; Gao, Feng; Wang-Gillam, Andrea (2011): Influence of obesity and other risk factors on survival outcomes in patients undergoing pancreaticoduodenectomy for pancreatic cancer. In: *Pancreas* 40 (6), S. 931–937. DOI: 10.1097/MPA.0b013e318215a9b1.
- Dasari, Bobby V. M.; Pasquali, Sandro; Vohra, Ravinder S.; Smith, Andrew M.; Taylor, Mark A.; Sutcliffe, Robert P. et al. (2015): Extended Versus Standard Lymphadenectomy for Pancreatic Head Cancer: Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. In: *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 19 (9), S. 1725–1732. DOI: 10.1007/s11605-015-2859-3.
- Debebe, Zufan; Rathmell, W. Kimryn (2015): Ror2 as a therapeutic target in cancer. In: *Pharmacology & therapeutics* 150, S. 143–148. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2015.01.010.
- Dejmek, Janna (2005): Expression and Signaling Activity of Wnt5a/Discoidin Domain Receptor-1 and Syk Plays Distinct but Decisive Roles in Breast Cancer Patient Survival. In: *Cancer research* (11), S. 520–528, zuletzt geprüft am 06.04.2017.
- Dejmek, Janna; Dejmek, Annika; Saffholm, Annette; Sjolander, Anita; Andersson, Tommy (2005): Wnt-5a protein expression in primary duodenal colon cancers identifies a subgroup of patients with good prognosis. In: *Cancer research* 65 (20), S. 9142–9146. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1710.
- Diener, M. K.; Heukauf, C.; Schwarzer, G.; Seiler, C. M.; Antes, G.; Buchler, M. W.; Knaebel, H. P. (2008): Pancreaticoduodenectomy (classic Whipple) versus pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy (pp Whipple) for surgical treatment of periampullary and pancreatic carcinoma. In: *The Cochrane database of systematic reviews* (2), CD006053. DOI: 10.1002/14651858.CD006053.pub2.
- Edris, Badreddin; Espinosa, Inigo; Muhlenberg, Thomas; Mikels, Amanda; Lee, Cheng-Han; Steigen, Sonja E. et al. (2012): ROR2 is a novel prognostic biomarker and a potential therapeutic target in leiomyosarcoma and gastrointestinal stromal tumour. In: *The Journal of pathology* 227 (2), S. 223–233. DOI: 10.1002/path.3986.
- Ford, Caroline E.; Qian Ma, Sean Si; Quadir, Ashfaq; Ward, Robyn L. (2013): The dual role of the novel Wnt receptor tyrosine kinase, ROR2, in human carcinogenesis. In: *International journal of cancer* 133 (4), S. 779–787. DOI: 10.1002/ijc.27984.
- Fouquet, Thibaut; Germain, Adeline; Brunaud, Laurent; Bresler, Laurent; Ayav, Ahmet (2014): Is perineural invasion more accurate than other factors to predict early recurrence after pancreaticoduodenectomy for pancreatic head adenocarcinoma? In: *World journal of surgery* 38 (8), S. 2132–2137. DOI: 10.1007/s00268-014-2465-7.
- Fujita, Hayato; Ohuchida, Kenoki; Mizumoti, Kazuhiro; Itaba, Soichi; Ito, Tetsuhide; Nakata, Kohei et al. (2010): Gene Expression Levels as Predictive Markers of Outcome in Pancreatic Cancer after Gemcitabine-Based Adjuvant Chemotherapy. In: *Neoplasia* 12 (10), 807–IN8. DOI: 10.1593/neo.10458.
- Giles, Rachel H.; van Es, Johan H.; Clevers, Hans (2003): Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1653 (1), S. 1–24. DOI: 10.1016/S0304-419X(03)00005-2.
- Gordon-Dseagu, Vanessa L.; Devesa, Susan S.; Goggins, Michael; Stolzenberg-Solomon, Rachael (2017): Pancreatic cancer incidence trends: evidence from the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) population-based data. In: *International journal of epidemiology*. DOI: 10.1093/ije/dyx232.
- Grumolato, Luca; Liu, Guizhong; Mong, Phyllus; Mudbhary, Raksha; Biswas, Romi; Arroyave, Randy et al. (2010): Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. In: *Genes & development* 24 (22), S. 2517–2530. DOI: 10.1101/gad.1957710.
- Gschwind, Andreas; Fischer, Oliver M.; Ullrich, Axel (2004): The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. In: *Nature reviews. Cancer* 4 (5), S. 361–370. DOI: 10.1038/nrc1360.
- Han, Sung-Sik; Jang, Jin-Young; Kim, Sun-Whe; Kim, Woo-Ho; Lee, Kuhn Uk; Park, Yong-Hyun (2006): Analysis of long-term survivors after surgical resection for pancreatic cancer. In: *Pancreas* 32 (3), S. 271–275. DOI: 10.1097/01.mpa.0000202953.87740.93.

- Hartwig, Werner; Hackert, Thilo; Hinz, Ulf; Gluth, Alexander; Bergmann, Frank; Strobel, Oliver et al. (2011): Pancreatic cancer surgery in the new millennium: better prediction of outcome. In: *Annals of surgery* 254 (2), S. 311–319. DOI: 10.1097/SLA.0b013e31821fd334.
- Hearle, Nicholas; Schumacher, Valérie; Menko, Fred H.; Olschwang, Sylviane; Boardman, Lisa A.; Gille, Johan J. P. et al. (2006): Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12 (10), S. 3209–3215. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0083.
- Heinemann, Volker (2009): Aktuelle Standards in der Therapie des Pankreaskarzinoms. In: *Im Focus Onkologie* (5), S. 70–74, zuletzt geprüft am 05.12.2017.
- Henne-Bruns, Doris; Barth, Eberhard (Hg.) (2012): Chirurgie. 4., aktualisierte Aufl. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).
- Henry, C.; Quadir, A.; Hawkins, N. J.; Jary, E.; Llamas, E.; Kumar, D. et al. (2015): Expression of the novel Wnt receptor ROR2 is increased in breast cancer and may regulate both β -catenin dependent and independent Wnt signalling. In: *Journal of cancer research and clinical oncology* 141 (2), S. 243–254. DOI: 10.1007/s00432-014-1824-y.
- Herold, Gerd (2016): Innere Medizin 2017. Köln: Herold, Gerd.
- Hoff, Daniel D. von; Ervin, Thomas; Arena, Francis P.; Chiorean, E. Gabriela; Infante, Jeffrey; Moore, Malcolm et al. (2013): Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. In: *The New England journal of medicine* 369 (18), S. 1691–1703. DOI: 10.1056/NEJMoa1304369.
- <http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>, 21.09.2018
- <https://www.proteinatlas.org/>, 21.09.2018
- Huang, Cheng-Long; Liu, Dage; Nakano, Jun; Ishikawa, Shinya; Kontani, Keiichi; Yokomise, Hiroyasu; Ueno, Masaki (2005): Wnt5a expression is associated with the tumor proliferation and the stromal vascular endothelial growth factor--an expression in non-small-cell lung cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (34), S. 8765–8773. DOI: 10.1200/JCO.2005.02.2871.
- Huang, Jianfei; Fan, Xiangjun; Wang, Xudong; Lu, Yuhua; Zhu, Huijun; Wang, Wei et al. (2015): High ROR2 expression in tumor cells and stroma is correlated with poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. In: *Scientific reports* 5, S. 12991. DOI: 10.1038/srep12991.
- Huttner, Felix J.; Fitzmaurice, Christina; Schwarzer, Guido; Seiler, Christoph M.; Antes, Gerd; Buchler, Markus W.; Diener, Markus K. (2016): Pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy (pp Whipple) versus pancreaticoduodenectomy (classic Whipple) for surgical treatment of periampullary and pancreatic carcinoma. In: *The Cochrane database of systematic reviews* 2, CD006053. DOI: 10.1002/14651858.CD006053.pub6.
- Jones, Sian; Zhang, Xiaosong; Parsons, D. Williams; Lin, Jimmy Cheng-Ho; Leary, Rebecca J.; Angenendt, Philipp et al. (2008): Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. In: *Science (New York, N.Y.)* 321 (5897), S. 1801–1806. DOI: 10.1126/science.1164368.
- Jönsson, Marzieh; Dejmek, Janna; Bendahl, Pär-Ola; Andersson, Tommy (2002): Loss of Wnt5a Protein Is Associated with Early Relapse in Invasive Ductal Breast Cancer. In: *Cancer research*, S. 409–416, zuletzt geprüft am 06.04.2017.
- Kondo, Naru; Murakami, Yoshiaki; Uemura, Kenichiro; Hashimoto, Yasushi; Nakagawa, Naoya; Sasaki, Hayato; Sueda, Taijiro (2015): An Increased Number of Perineural Invasions Is Independently Associated With Poor Survival of Patients With Resectable Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. In: *Pancreas* 44 (8), S. 1345–1351. DOI: 10.1097/MPA.0000000000000413.
- Kremenevskaja, N.; Wasielewski, R. von; Rao, A. S.; Schofl, C.; Andersson, T.; Brabant, G. (2005): Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma. In: *Oncogene* 24 (13), S. 2144–2154. DOI: 10.1038/sj.onc.1208370.
- Kurayoshi, Manabu; Oue, Naohide; Yamamoto, Hideki; Kishida, Michiko; Inoue, Atsuko; Asahara, Toshimasa et al. (2006): Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion. In: *Cancer research* 66 (21), S. 10439–10448. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2359.
- Larsson, S. C.; Permert, J.; Håkansson, N.; Näslund, I.; Bergkvist, L.; Wolk, A. (2005): Overall obesity, abdominal adiposity, diabetes and cigarette smoking in relation to the risk of pancreatic cancer in two Swedish population-based cohorts. In: *British journal of cancer* 93 (11), S. 1310–1315. DOI: 10.1038/sj.bjc.6602868.
- Lee, Seung Eun; Lim, So Dug; Kang, So Young; Suh, Sang Bum; Suh, Yeon-Lim (2013): Prognostic significance of Ror2 and Wnt5a expression in medulloblastoma. In: *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 23 (4), S. 445–453. DOI: 10.1111/bpa.12017.
- Leitlinienprogramm Onkologie (2013): S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, zuletzt geprüft am 25.03.2017.

- Lennon, Anne Marie; Wolfgang, Christopher L.; Canto, Marcia Irene; Klein, Alison P.; Herman, Joseph M.; Goggins, Michael et al. (2014): The early detection of pancreatic cancer: what will it take to diagnose and treat curable pancreatic neoplasia? In: *Cancer research* 74 (13), S. 3381–3389. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0734.
- Li, Qiang; Gao, Chuntao; Li, Huikai; Juzi, Jonathan T.; Chen, Hua; Hao, Xishan (2008): Factors associated with survival after surgical resection in Chinese patients with ductal adenocarcinoma of the pancreatic head. In: *Digestive surgery* 25 (2), S. 87–92. DOI: 10.1159/000121447.
- Lin, Quan-Jun; Yang, Feng; Jin, Chen; Fu, De-Liang (2015): Current status and progress of pancreatic cancer in China. In: *World journal of gastroenterology* 21 (26), S. 7988–8003. DOI: 10.3748/wjg.v21.i26.7988.
- Liu, Zuqiang; Luo, Guopei; Guo, Meng; Jin, Kaizhou; Xiao, Zhiwen; Liu, Liang et al. (2015): Lymph node status predicts the benefit of adjuvant chemoradiotherapy for patients with resected pancreatic cancer. In: *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]* 15 (3), S. 253–258. DOI: 10.1016/j.pan.2015.03.012.
- Lu, Chenlin; Wang, Xudong; Zhu, Huijun; Feng, Jian; Ni, Songshi; Huang, Jianfei (2015): Over-expression of ROR2 and Wnt5a cooperatively correlates with unfavorable prognosis in patients with non-small cell lung cancer. In: *Oncotarget* 6 (28), S. 24912–24921. DOI: 10.18632/oncotarget.4701.
- Luo, Jianfeng; Xiao, Linhai; Wu, Chunxiao; Zheng, Ying; Zhao, Naiqing (2013): The incidence and survival rate of population-based pancreatic cancer patients: Shanghai Cancer Registry 2004-2009. In: *PloS one* 8 (10), e76052. DOI: 10.1371/journal.pone.0076052.
- Lyros, Orestis; Nie, Linghui; Moore, Tami; Medda, Rituparna; Otterson, Mary; Behmaram, Behnaz et al. (2016): Dysregulation of WNT5A/ROR2 Signaling Characterizes the Progression of Barrett-Associated Esophageal Adenocarcinoma. In: *Molecular cancer research : MCR* 14 (7), S. 647–659. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0484.
- Malka, D; Hammel, P; Maire, F; Rufat, P; Madeira, I; Pessione, F et al. (2002): Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. In: *Gut* (51), S. 849–852.
- Masiakowski, Piotr; Carroll, Robert D. (1992): A Novel Family of Cell Surface Receptors with Tyrosine Kinase-like Domain. In: *The Journal of biological chemistry* (36), zuletzt geprüft am 06.11.2017.
- McDonald, Andrew M.; Dulaney, Caleb R.; Lopez-Araujo, Javier; Posey, James A.; Keene, Kimberly S.; Christein, John D. et al. (2015): Patterns of Failure for Lymph Node-Positive Resected Pancreatic Adenocarcinoma After Adjuvant Radiotherapy or Gemcitabine-based Chemotherapy Alone. In: *Journal of gastrointestinal cancer* 46 (2), S. 149–155. DOI: 10.1007/s12029-015-9702-7.
- McDonald, S. L.; Silver, A. (2009): The opposing roles of Wnt-5a in cancer. In: *British journal of cancer* 101 (2), S. 209–214. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605174.
- Mikels, Amanda J.; Nusse, Roel (2006): Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. In: *PLoS biology* 4 (4), e115. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040115.
- Miller, Jeffrey R (2001): The Wnts. In: *Genome Biology*, zuletzt geprüft am 04.04.2017.
- Minami, Yasuhiro; Oishi, Isao; Endo, Mitsuharu; Nishita, Michiru (2010): Ror-family receptor tyrosine kinases in noncanonical Wnt signaling: their implications in developmental morphogenesis and human diseases. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 239 (1), S. 1–15. DOI: 10.1002/dvdy.21991.
- Moore, Malcolm J.; Goldstein, David; Hamm, John; Figer, Arie; Hecht, Joel R.; Gallinger, Steven et al. (2007): Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25 (15), S. 1960–1966. DOI: 10.1200/JCO.2006.07.9525.
- Morioka, Kazuhito; Tanikawa, Chizu; Ochi, Kensuke; Daigo, Yataro; Katagiri, Toyomasa; Kawano, Hirotaka et al. (2009): Orphan receptor tyrosine kinase ROR2 as a potential therapeutic target for osteosarcoma. In: *Cancer science* 100 (7), S. 1227–1233. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01165.x.
- Morris, John P., 4th.; Wang, Sam C.; Hebrok, Matthias (2010): KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. In: *Nature reviews. Cancer* 10 (10), S. 683–695. DOI: 10.1038/nrc2899.
- Neoptolemos, John P. et al. (2010): Adjuvant Chemotherapy With Fluorouracil Plus Filinic Acid vs Gemcitabine Following Pancreatic Cancer Resection. In: *Jama*, zuletzt geprüft am 25.03.2017.

- Neoptolemos, John P.; Palmer, Daniel H.; Ghaneh, Paula; Psarelli, Eftychia E.; Valle, Juan W.; Halloran, Christopher M. et al. (2017): Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4). A multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. In: *The Lancet* 389 (10073), S. 1011–1024. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)32409-6.
- Neoptolemos John P.; Stocken Deborah D.; Friess Helmut; Bassi Claudio; Dunn Janet A.; Hickey Helen et al. (2004): A Randomized Trial of Chemoradiotherapy and Chemotherapy after Resection of Pancreatic Cancer. In: *N Engl J Med* 351 (7), S. 726. DOI: 10.1056/NEJM200408123510725.
- Neuhaus, Peter; Wittekind, Ch (2007): Klassifikation maligner Tumoren des Gastrointestinaltrakts II. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg (Klassifikation maligner Tumoren), zuletzt geprüft am 29.03.2017.
- Neuzillet, Cindy; Tijeras-Raballand, Annemilai; Bourget, Philippe; Cros, Jerome; Couvelard, Anne; Sauvanet, Alain et al. (2015): State of the art and future directions of pancreatic ductal adenocarcinoma therapy. In: *Pharmacology & therapeutics* 155, S. 80–104. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2015.08.006.
- Nusse, R.; Brown, A.; Papkoff, J.; Scambler, P.; Shackleford, G.; McMahon, A. et al. (1991): A New Nomenclature for int-1 and Related Genes: The Wnt Gene Family. In: *Cell*, zuletzt geprüft am 02.05.2018.
- Nusse, Roel; Varmus, Harold (2012): Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed. In: *The EMBO journal* 31 (12), S. 2670–2684. DOI: 10.1038/emboj.2012.146.
- Nusse, Roel; Varmus, Harold E. (1982): Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. In: *Cell* 31 (1), S. 99–109. DOI: 10.1016/0092-8674(82)90409-3.
- Nüsslein-Volhard, Christiane; Wieschaus, Eric (1980): Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. In: *Nature*, S. 795–801, zuletzt geprüft am 02.05.2018.
- O'Connell, M. P.; Fiori, J. L.; Xu, M.; Carter, A. D.; Frank, B. P.; Camilli, T. C. et al. (2010): The orphan tyrosine kinase receptor, ROR2, mediates Wnt5A signaling in metastatic melanoma. In: *Oncogene* 29 (1), S. 34–44. DOI: 10.1038/onc.2009.305.
- Oishi, Isao; Suzuki, Hiroaki; Onishi, Nobuyuki; Takada, Ritsuko; Kani, Shuichi; Ohkawara, Bisei et al. (2003a): Expression and Function of the Ror- Family Receptor Tyrosine Kinases During Development: Lessons from Genetic Analyses of Nematodes, Mice, and Humans. In: *Genes Cells* 8 (7), S. 645–654. DOI: 10.1046/j.1365-2443.2003.00662.x.
- Oishi, Isao; Suzuki, Hiroaki; Onishi, Nobuyuki; Takada, Ritsuko; Kani, Shuichi; Ohkawara, Bisei et al. (2003): The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. In: *Genes Cells* (8), S. 645–654, zuletzt geprüft am 26.04.2017.
- Orci, Lorenzo A.; Meyer, Jeremy; Combescure, Christophe; Buhler, Leo; Berney, Thierry; Morel, Philippe; Toso, Christian (2015): A meta-analysis of extended versus standard lymphadenectomy in patients undergoing pancreatoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma. In: *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 17 (7), S. 565–572. DOI: 10.1111/hpb.12407.
- Rebagay, Guilly; Yan, Su; Liu, Cheng; Cheung, Nai-Kong (2012): ROR1 and ROR2 in Human Malignancies: Potentials for Targeted Therapy. In: *Frontiers in oncology* 2, S. 34. DOI: 10.3389/fonc.2012.00034.
- Redstone, Mark S. (1994): p53 Mutations in Pancreatic Carcinoma and Evidence of Common Involvement of Homocopolymer Tracts in DNA Microdeletions. In: *Cancer research*, zuletzt geprüft am 05.04.2017.
- Reissfelder, C.; Koch, M.; Buchler, M. W.; Weitz, J. (2007): Pankreaskarzinom. In: *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 78 (11), 1059–71; quiz 1072. DOI: 10.1007/s00104-007-1412-7.
- Rijsewijk, Frans; Schuermann, Marcus; Wagenaar, Els; Parren, Paul; Welgel, Detlef; Nusse, Roel (1987): The *Drosophila* Homolog of the Mouse Mammary Oncogene int-1 Is Identical to the Segment Polarity Gene wingless. In: *Cell*, zuletzt geprüft am 02.05.2018.
- Ripka, S.; Konig, A.; Buchholz, M.; Wagner, M.; Sipos, B.; Kloppel, G. et al. (2007): WNT5A--target of CUTL1 and potent modulator of tumor cell migration and invasion in pancreatic cancer. In: *Carcinogenesis* 28 (6), S. 1178–1187. DOI: 10.1093/carcin/bgl255.
- Robert Koch-Institut (2016): Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016, zuletzt geprüft am 21.03.2017.
- Robert Koch-Institut (2017): Krebs in Deutschland | 2013/2014, zuletzt geprüft am 08.05.2018.
- Robinson, D. R.; Wu, Y. M.; Lin, S. F. (2000): The protein tyrosine kinase family of the human genome. In: *Oncogene* 19 (49), S. 5548–5557. DOI: 10.1038/sj.onc.1203957.

- Schmidt- Hansen, Mia; Berendes, Sabine; Hamilton, William (2016): Symptoms of Pancreatic Cancer in Primary Care. A systematic Review. In: *Pancreas* (45), S. 814–818, zuletzt geprüft am 22.03.2017.
- Schutte, Mieke (1996): DPC4 Gene in Various Tumor Types. In: *Cancer research*, zuletzt geprüft am 05.04.2017.
- Seufferlein, T.; Bachet, J. B.; van Cutsem, E.; Rougier, P. (2012): Pancreatic adenocarcinoma: ESMO-ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 23 Suppl 7, vii33-40. DOI: 10.1093/annonc/mds224.
- Silverman, D. T.; Schiffman, M.; Everhart, J.; Goldstein, A.; Lillemoe, K. D.; Swanson, G. M. et al. (1999): Diabetes mellitus, other medical conditions and familial history of cancer as risk factors for pancreatic cancer. In: *British journal of cancer* 80 (11), S. 1830–1837. DOI: 10.1038/sj.bjc.6690607.
- Stocken, D. D.; Buchler, M. W.; Dervenis, C.; Bassi, C.; Jeekel, H.; Klinkenbijn, J. H. G. et al. (2005): Meta-analysis of randomised adjuvant therapy trials for pancreatic cancer. In: *British journal of cancer* 92 (8), S. 1372–1381. DOI: 10.1038/sj.bjc.6602513.
- Stricker, Sigmar; Rauschenberger, Verena; Schambony, Alexandra (2017): ROR-Family Receptor Tyrosine Kinases. In: *Current topics in developmental biology* 123, S. 105–142. DOI: 10.1016/bs.ctdb.2016.09.003.
- Tannapfel, A. (2010): Pankreaskarzinom. Molekulare und chirurgische Pathologie. In: *Der Pathologe* 31 Suppl 2, S. 225–228. DOI: 10.1007/s00292-010-1298-x.
- Tarantino, I.; Warschkow, R.; Hackert, T.; Schmied, B. M.; Büchler, M. W.; Strobil, O.; Ulrich, A. (2017): Staging of pancreatic cancer based on the number of positive lymph nodes. In: *The British journal of surgery* 104 (5), S. 608–618. DOI: 10.1002/bjs.10472.
- Tempero, Margaret A. (2014): Pancreatic Adenocarcinoma, Version 2.2014. Featured Updates to the NCCN Guidelines. In: *JNCCN*, S. 1083–1093, zuletzt geprüft am 25.03.2017.
- Turrini, O.; Paye, F.; Bachellier, P.; Sauvanet, A.; Sa Cunha, A.; Le Treut, Y. P. et al. (2013): Pancreatectomy for adenocarcinoma in elderly patients: postoperative outcomes and long term results: a study of the French Surgical Association. In: *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 39 (2), S. 171–178. DOI: 10.1016/j.ejso.2012.08.017
- van Bokhoven, H.; Celli, J.; Kayserili, H.; van Beusekom, E.; Balci, S.; Brussel, W. et al. (2000): Mutation of the gene encoding the ROR2 tyrosine kinase causes autosomal recessive Robinow syndrome. In: *Nature Genetics* 25 (4), S. 423–426. DOI: 10.1038/78113.
- Uhlen, Mathias; Zhang, Cheng; Lee, Sunjae; Sjöstedt, Evelina; Fagerberg, Linn; Bidkhor, Gholamreza et al. (2017): A pathology atlas of the human cancer transcriptome. In: *Science (New York, N. Y.)* 357 (6352). DOI: 10.1126/science.aan2507.
- van der Gaag, Niels A.; Rauws, Erik A. J.; van Eijck, Casper H. J.; Bruno, Marco J.; van der Harst, Erwin; Kubben, Frank J. G. M. et al. (2010): Preoperative biliary drainage for cancer of the head of the pancreas. In: *The New England journal of medicine* 362 (2), S. 129–137. DOI: 10.1056/NEJMoa0903230.
- van Heek, N. Tjarda; Kuhlmann, Koert F. D.; Scholten, Rob J.; Castro, Steve M. M. de; Busch, Olivier R. C.; van Gulik, Thomas M. et al. (2005): Hospital Volume and Mortality After Pancreatic Resection. In: *Annals of surgery* 242 (6), S. 781–790. DOI: 10.1097/01.sla.0000188462.00249.36.
- van Lier, Margot G. F.; Westerman, Anne Marie; Wagner, Anja; Looman, Caspar W. N.; Wilson, J. H. Paul; Rooij, Felix W. M. de et al. (2011): High cancer risk and increased mortality in patients with Peutz-Jeghers syndrome. In: *Gut* 60 (2), S. 141–147. DOI: 10.1136/gut.2010.223750.
- Verbeke, Caroline (2016): Morphological heterogeneity in ductal adenocarcinoma of the pancreas - Does it matter? In: *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]* 16 (3), S. 295–301. DOI: 10.1016/j.pan.2016.02.004.
- Villeneuve, Paul J.; Johnson, Kenneth C.; Mao, Yang; Hanley, Anthony J. (2004): Environmental tobacco smoke and the risk of pancreatic cancer: findings from a Canadian population-based case-control study. In: *Canadian journal of public health = Revue canadienne de sante publique* 95 (1), S. 32–37.
- Vogelstein, B.; Fearon, E. R.; Hamilton, S. R.; Kern, S. E.; Preisinger, A. C.; Leppert, M. et al. (1988): Genetic alterations during colorectal-tumor development. In: *The New England journal of medicine* 319 (9), S. 525–532. DOI: 10.1056/NEJM198809013190901.
- Wang, Q.; Williamson, M.; Bott, S.; Brookman-Amissah, N.; Freeman, A.; Nariculam, J. et al. (2007): Hypomethylation of WNT5A, CRIP1 and S100P in prostate cancer. In: *Oncogene* 26 (45), S. 6560–6565. DOI: 10.1038/sj.onc.1210472.

- Win, Aung Ko; Young, Joanne P.; Lindor, Noralane M.; Tucker, Katherine M.; Ahnen, Dennis J.; Young, Graeme P. et al. (2012): Colorectal and other cancer risks for carriers and noncarriers from families with a DNA mismatch repair gene mutation: a prospective cohort study. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (9), S. 958–964. DOI: 10.1200/JCO.2011.39.5590.
- Wittekind, Christian (Hg.) (2017): TNM-Klassifikation maligner Tumoren. Union for International Cancer Control; Wiley-VCH. Achte Auflage. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Online verfügbar unter <http://www.wiley-vch.de/publish/dt/books/ISBN978-3-527-34280-8/>.
- Wright, T. M.; Brannon, A. R.; Gordan, J. D.; Mikels, A. J.; Mitchell, C.; Chen, S. et al. (2009): Ror2, a developmentally regulated kinase, promotes tumor growth potential in renal cell carcinoma. In: *Oncogene* 28 (27), S. 2513–2523. DOI: 10.1038/onc.2009.116.
- Yachida, Shinichi; Jones, Siân; Bozic, Ivana; Antal, Tibor; Leary, Rebecca; Fu, Baojin et al. (2010): Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. In: *Nature* 467 (7319), S. 1114–1117. DOI: 10.1038/nature09515.
- Yamaguchi, Terry P.; Bradley, Allan; McMahon, Andrew P.; Jones, Steven (1999): Role of Wnt5a in morphogenesis. In: *The Company of Biologists*, zuletzt geprüft am 05.04.2017.
- Yamamoto, H.; Oue, N.; Sato, A.; Hasegawa, Y.; Matsubara, A.; Yasui, W.; Kikuchi, A. (2010): Wnt5a signaling is involved in the aggressiveness of prostate cancer and expression of metalloproteinase. In: *Oncogene* 29 (14), S. 2036–2046. DOI: 10.1038/onc.2009.496.
- Yan, Likun; Du, Qingguo; Yao, Jianfeng; Liu, Ruiting (2016): ROR2 inhibits the proliferation of gastric carcinoma cells via activation of non-canonical Wnt signaling. In: *Experimental and therapeutic medicine* 12 (6), S. 4128–4134. DOI: 10.3892/etm.2016.3883.
- Ying, Jianming; Li, Hongyu; Chen, Yun-Wen; Srivastava, Gopesh; Gao, Zifen; Tao, Qian (2007): WNT5A is epigenetically silenced in hematologic malignancies and inhibits leukemia cell growth as a tumor suppressor. In: *Blood* (12), zuletzt geprüft am 06.04.2017.
- Yu, Jun; Blackford, Amanda L.; Dal Molin, Marco; Wolfgang, Christopher L.; Goggins, Michael (2015): Time to progression of pancreatic ductal adenocarcinoma from low-to-high tumour stages. In: *Gut* 64 (11), S. 1783–1789. DOI: 10.1136/gutjnl-2014-308653.
- Zacharias, Thomas; Jaeck, Daniel; Oussoultzoglou, Elie; Neuville, Agnes; Bachellier, Philippe (2007): Impact of lymph node involvement on long-term survival after R0 pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreas. In: *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 11 (3), S. 350–356. DOI: 10.1007/s11605-007-0113-3.
- Zwick, E. (2001): Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. In: *Endocrine Related Cancer* 8 (3), S. 161–173. DOI: 10.1677/erc.0.0080161.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie des Pankreas.....	2
Abbildung 2: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen.....	3
Abbildung 3: Altersstandardisierte Neuerkrankungsrate des Pankreaskarzinoms.....	4
Abbildung 4: WNT-Signaling (bearbeitet aus Ford et al. 2013).	12
Abbildung 5: Model der WNT5A/ROR2-Interaktion (Minami et al. 2010).....	16
Abbildung 6: Darstellung der Positiv- und Negativkontrollen.....	20
Abbildung 7: Darstellung der HE-Färbung.	21
Abbildung 8: Ergebnisse Wilcoxon-Test.	28
Abbildung 9: Prozentualer Anteil von positiven und negativen Schnitten.	29
Abbildung 10: Darstellung der immunhistochemischen Auswertung.	30
Abbildung 11: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier.	36
Abbildung 12: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier.	37
Abbildung 13: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier.	38
Abbildung 14: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier.	39
Abbildung 15: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier.	40
Abbildung 16: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier.	41
Abbildung 17: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier in Subgruppen.	42
Abbildung 18: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier in Subgruppen.	43
Abbildung 19: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier.	45
Abbildung 20: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier in Subgruppen.	46
Abbildung 21: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier in Subgruppen.	47
Abbildung 22: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier in Subgruppen.	49

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM: Klinische Klassifikation des Pankreaskarzinoms.....	6
Tabelle 2: Stadieneinteilung nach UICC 7.0	7
Tabelle 3: Residualtumor-Klassifikation	7
Tabelle 4: Histopathologisches Grading	8
Tabelle 5: Basisdaten der Patienten	18
Tabelle 6: Chemikalien	19
Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien	19
Tabelle 8: Geräte.....	19
Tabelle 9: Herkunft und Verdünnung der Primärantikörper	20
Tabelle 10: Positiv- und Negativkontrollen.....	20
Tabelle 11: Herkunft Sekundärantikörper	21
Tabelle 12: Durchführung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung	21
Tabelle 13: Entparaffinieren und Rehydrieren	23
Tabelle 14: Durchführung der immunhistochemischen Färbung	23
Tabelle 15: Übersicht der immunhistochemischen Auswertung	24
Tabelle 16: Alters- und Geschlechterverteilung	25
Tabelle 17: Verteilung Patientenkollektiv auf die TNM-Klassifikation	26
Tabelle 18: Verteilung Patientenkollektiv auf die UICC-Stadien	27
Tabelle 19: Rezidive	27
Tabelle 20: Adjuvante Chemotherapie des Primärtumors.....	27
Tabelle 21: Medianwerte Intensity-Percentage-Score.....	28
Tabelle 22: Ergebnisse der Korrelationsanalyse der ROR2-Expression im Tumor und Stroma mit klinisch-pathologischen Parametern	31
Tabelle 23: Ergebnisse der Korrelationsanalyse der ROR2-Expression im gesunden Gewebe mit klinisch-pathologischen Parametern	32
Tabelle 24: Ergebnisse der Korrelationsanalyse der WNT5A-Expression im Tumor und Stroma mit klinisch-pathologischen Parametern	33
Tabelle 25: Ergebnisse der Korrelationsanalyse der WNT5A-Expression im gesunden Gewebe mit klinisch-pathologischen Parametern	34
Tabelle 26: Paarweiser Vergleich Log-Rank-Test ROR2-Expression Tumor	43
Tabelle 27: Paarweiser Vergleich Log-Rank-Test ROR2-Expression Stroma	44
Tabelle 28: Paarweiser Vergleich Log-Rank-Test WNT5A-Expression Tumor.....	47
Tabelle 29: Paarweiser Vergleich Log-Rank-Test WNT5A-Expression Stroma.....	48
Tabelle 30: Univarianzanalyse.....	50
Tabelle 31: Multivarianzanalyse	51
Tabelle 32: Vergleich Patientenkollektive	54
Tabelle 33: Vergleich ROR2-Expression	57
Tabelle 34: Vergleich WNT5A-Expression.....	62

7.3 Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

Datum

Unterschrift

7.4 Danksagung

7.5 Curriculum vitae