

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. H. K. Müller-Hermelink

**Immunhistologische und morphometrische
Untersuchung der Ependymome im Kindesalter
in Korrelation zu den klinischen Befunden**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Georg Martin Stettner
aus Holzkirchen/Oberbayern

Würzburg, Januar 2003

Referent: Professor Dr. med. Wolfgang Roggendorf
Koreferent: Professor Dr. med. Andreas Krone
Dekan: Professor Dr. med. Stefan Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 02. Juli 2003

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Häufigkeit, Ursprung, Verteilung und Symptomatik der Ependymome im Kindesalter	1
1.2	WHO-Klassifikation der ependymalen Tumoren	2
1.3	Prognose von Ependymomen im Kindesalter	3
1.4	p53 – ein Tumorsuppressor	5
1.5	MIB-1 – ein Proliferationsmarker	9
1.6	EMA – das Epitheliale Membran Antigen	10
1.7	Ki-M1P, anti-HLA-DR und KP1 – Marker des Mikroglia-/Makrophagen-Systems	12
1.8	Zielsetzung der Arbeit	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Untersuchungsgut und klinische Daten	18
2.2	Vorbereitung der Präparate	18
2.3	Immunhistochemische Untersuchungen an Paraffinschnitten	20
2.4	Antikörper, Verdünnungen und Antigen-Demaskierung	22
2.5	Auswertung der Präparate	23
2.6	Statistische Analyse	25
3	Ergebnisse	33
3.1	Klinische Daten	33
3.2	p53-Akkumulation	37
3.3	Der MIB-1 Labeling Index	40
3.4	EMA-Expression	42
3.5	Das Mikroglia-/Makrophagen-System	45
3.5.1	Mikroglia-/Makrophagen-Verteilung	45
3.5.2	Mikroglia-/Makrophagen-Proliferation	48
3.5.3	HLA-DR Expression in Mikroglia/Makrophagen und Tumorzellen	50

3.6	Statistische Analyse.....	52
3.6.1	Rangkorrelationen	52
3.6.2	Überlebenszeitberechnungen.....	62
4	Diskussion.....	75
5	Zusammenfassung.....	87
6	Literaturverzeichnis	90
7	Anhang.....	106
7.1	Pufferlösungen, Reagenzien, Detektionskit	106
7.2	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen (Tabellen)	108
7.2.1	p53-Akkumulation, HLA-DR Expression, MIB-1 LI, MG/Makrophagen-Proliferation, prozentualer Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtzellzahl.....	108
7.2.2	MG/Makrophagen-Verteilung.....	110
7.2.3	EMA-Expression	113

1 Einleitung

1.1 Häufigkeit, Ursprung, Verteilung und Symptomatik der Ependymome im Kindesalter

Tumoren des Zentralnervensystems stellen mit 20% aller Malignome die größte Gruppe solider Neoplasien im Kindesalter dar, nur maligne Erkrankungen des lymphohämatopoetischen Systems sind in dieser Altersgruppe häufiger (Miller et al. 1995). Mit 6-12% sind Ependymome im Kindesalter nach Astrozytomen und Medulloblastomen die dritthäufigsten intrakraniellen Tumoren. In den ersten drei Lebensjahren erreichen sie sogar eine Häufigkeit von bis zu 30% (Staneczek und Jänisch 1994, Duncan und Hoffman 1995). Ependymome weisen bei Kindern im Alter unter 15 Jahren eine jährliche Inzidenz von 2,2 bis 2,5/1.000.000 auf (Robinson 1997).

Ursprung der ependymalen Tumoren, die zu den neuroektodermalen Neoplasien gehören, sind das Ependym, das Ventrikel und Zentralkanal auskleidet, sowie seltener embryonale ependymale Residuen im zerebralen Parenchym. Ependymome finden sich im Kindesalter insbesondere in der hinteren Schädelgrube, wo sie meist aus dem Boden des vierten Ventrikels hervorgehen. Während supratentorielle Ependymome Kinder und Erwachsene gleichermaßen betreffen, sind spinale Ependymome im Kindesalter selten. Sie treten jedoch mit zunehmendem Lebensalter vermehrt auf und stellen schließlich mit einem Altersgipfel zwischen 30 und 40 Jahren spinal die häufigsten neuroepithelialen Neoplasien dar (Ferrante et al. 1992, Schiffer 1997). Der Unterschied in der Häufigkeit spinaler Ependymome im Kindes- und Erwachsenenalter lässt sich auf ein mit dem Alter zunehmendes Auftreten myxopapilläarer Ependymome (Grad I nach WHO) zurückführen. Diese finden sich beinahe ausschließlich in der Conus-Cauda-Filum terminale-Region. Extraneuronale Ependymome stellen absolute Raritäten dar. Eine Geschlechtspräferenz besteht nicht (Schiffer et al. 1991).

Entsprechend der im Kindesalter bevorzugten Lokalisation im vierten Ventrikel manifestieren sich Ependymome häufig durch Hirndruckzeichen infolge einer Liquorzirkulationsstörung. Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen stehen hierbei im Vordergrund, zerebelläre Störungen können zusätzlich in Erscheinung treten. Fokale neurologische Ausfälle und fokale Krampfanfälle sind typische Symptome supratentorieller Ependymome. Spinale Ependymome verursachen häufig starke

Rückenschmerzen, außerdem können in Abhängigkeit von der Lokalisation sensorische und motorische Defizite sowie Sphinkterdysfunktionen auftreten.

1.2 WHO-Klassifikation der ependymalen Tumoren

Auf der Basis histologischer Merkmale lassen sich ependymale Tumoren in Ependymome (Grad II nach WHO), anaplastische Ependymome (Grad III nach WHO) und myxopapilläre Ependymome (Grad I nach WHO) unterteilen. Auf die ebenfalls zu den ependymalen Tumoren zählenden Subependymome (Grad I nach WHO) wird in der vorliegenden Arbeit nicht eingegangen, da sie Tumoren des höheren Lebensalters sind und sich nach meist asymptomatischem Verlauf als autoptische Zufallsbefunde darstellen. Die ependymalen Tumoren sind entsprechend der Klassifikation von Tumoren der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wie folgt charakterisiert (Kleihues und Cavenee 2000):

Ependymome (Grad II nach WHO) sind meist gut abgegrenzte, langsam wachsende und mäßig zeldichte Tumoren mit monomorphen, rundovalen Zellkernen. Histologisches Hauptcharakteristikum ist die Ausbildung von Rosetten, entweder in Form sogenannter Pseudorosetten mit radiär um ein zentral gelegenes Gefäß angeordneten Tumorzellen oder in Form echter ependymaler Rosetten, bei denen sich zentral ein imaginäres Lumen findet. Echte ependymale Rosetten sind seltener als Pseudorosetten und werden als Imitation ependymaler Strukturen interpretiert. Vereinzelt können Mitosen und gelegentlich fokale Nekrosen sowie andere regressive Veränderungen wie myxoide Degeneration, intratumorale Hämorrhagie und Kalzifikationen beobachtet werden. Eine weitere Differenzierung in zelluläre, papilläre, klarzellige und tanizytische Ependymome wird gelegentlich vorgenommen, ist aber nicht von klinischer Relevanz.

Anaplastische Ependymome (Grad III nach WHO) weisen histologische Malignitätskriterien wie gesteigerte Zelldichte, erhöhte Mitoserate, Nekrosen, pathologische Gefäße und Gefäßproliferate, Kernpolymorphie und eine histologische Dedifferenzierung auf. Häufiger als Grad II Ependymome präsentieren anaplastische Ependymome ein invasives Wachstum. Auch für anaplastische Ependymome sind Pseudorosetten kennzeichnend. Die Tendenz, echte ependymale Rosetten zu bilden, ist

jedoch gering. Die klinische Bedeutung der histologischen Malignität ist nicht gesichert und die Relevanz der einzelnen Malignitätskriterien wird konträr diskutiert.

Myxopapilläre Ependymome (Grad I nach WHO) zeigen eine niedrige Zelldichte, vakuoläre Zytoplasmata der kuboiden Tumorzellen und eine myxoide Struktur aufgrund mikrozystischer Degeneration und muzinöser Sekretion der Tumorzellen. Einzelne Mitosen und Kernatypien können auftreten, sind bei myxopapillären Ependymomen aber nicht Zeichen von Malignität. Die Tumorzellen sind (pseudo)papillär um Bindegewebe angeordnet, das proliferierte, weitlumige und hyalinisierte Gefäße enthält. Zwischen Tumorzellen und Gefäßen akkumuliert mukoides Matrixmaterial.

1.3 Prognose von Ependymomen im Kindesalter

Mit Ausnahme der myxopapillären Ependymome (WHO Grad I), die nur selten rezidivieren oder metastasieren, ist die Prognose von Ependymomen im Kindesalter mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 45-65% und der Wahrscheinlichkeit eines progressionsfreien Überlebens in einem 5-Jahres-Intervall von 25-50% schlecht (Robertson et al. 1998, Horn et al. 1999, Figarella-Branger et al. 2000). Zu einem Tumorrezidiv kommt es in 50-70%, in der Regel am Ort des Primärtumors und meist innerhalb der ersten drei Jahre nach dem Primärereignis (Pollack et al. 1995, Foreman et al. 1996, Bouffet et al. 1998, McLaughlin et al. 1998, Horn et al. 1999, Figarella-Branger et al. 2000). Das Risiko einer meningealen Dissemination kindlicher Ependymome wird mit 2-30% angegeben und ist besonders hoch bei infratentorieller Lage des Primärtumors (Pollack et al. 1995, Bouffet et al. 1998). Liegt eine meningeale Dissemination bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose vor, so verschlechtert dies die Prognose signifikant (Horn et al. 1999, Timmermann et al. 2000).

Die klinische Relevanz der histomorphologischen Differenzierung von Ependymomen (WHO Grad II) und anaplastischen Ependymomen (WHO Grad III) wurde immer wieder in Frage gestellt und konträr diskutiert, da zahlreiche Studien bezüglich des prognostischen Wertes der histologischen Anaplasie- bzw. Malignitätskriterien wie Hyperzellularität, Kernpleomorphie, endothelialer Proliferation, Nekrosen und Mitosen widersprüchliche Ergebnisse lieferten. So konnten Papadopoulos et al. 1990, Ernestus et al. 1991, 1996 und 1997, Chiu et al. 1992, Kovalic et al. 1993, Perilongo et al. 1997, Horn et al. 1999, Figarella-Branger et al. 2000 und Korshunov et al. 2000 eine

Korrelation des Tumorgrades mit dem klinischen Verlauf nachweisen und anaplastischen Ependymomen (WHO Grad III) eine ungünstigere Prognose bescheinigen, teilweise allerdings nur für supratentorielle Ependymome (Ernestus et al. 1991, Chiu et al. 1992). In anderen Studien fand sich kein signifikanter, prognostischer Unterschied zwischen Ependymomen (WHO Grad II) und anaplastischen Ependymomen (WHO Grad III) (Lyons und Kelly 1991, Schiffer et al. 1991a, 1991b, Rousseau et al. 1994, Pollack et al. 1995, Foreman et al. 1996, Gerszten et al., 1996, Duffner et al. 1998, Robertson et al. 1998, Sala et al. 1998, Spagnoli et al. 2000). Neben dem Auftreten von Nekrosen und dem Vorliegen einer Hyperzellularität nimmt unter den Malignitätskriterien der WHO für den Tumorgrad III insbesondere die Anzahl der vorhandenen Mitosen bzw. die Proliferationsaktivität des Tumors eine zentrale Stellung ein und erreicht in einigen Studien alleine prognostische Signifikanz (Nazar et al. 1990, Schiffer 1991a und 1991b, Figarella-Branger et al. 2000, Spagnoli et al. 2000). Siehe hierzu auch Kapitel 1.5.

Als prognostisch bedeutende Faktoren werden weiterhin insbesondere das Alter der Patienten sowie das Resektionsausmaß der als Therapie der Wahl angesehenen operativen Entfernung des Tumors gewertet. Entsprechend sehen die meisten Studien, die einen Vergleich des klinischen Verlaufs bei Kindern und Erwachsenen vornehmen, eine schlechtere Prognose für Kinder und Jugendliche (Papadopoulos et al. 1990, Lyons und Kelly 1991, Ferrante et al. 1994, Stüben et al. 1997, McLaughlin et al. 1998, Korshunov et al. 2000). Besonders ungünstig erscheint eine Erkrankung in den ersten Lebensjahren (Healey et al. 1991, Nazar et al. 1990, Schiffer 1991b, Chiu et al. 1992, Rousseau et al. 1994, Pollack et al. 1995, Perilongo et al. 1997, Duffner et al. 1998, Sala et al. 1998, Horn et al. 1999, Figarella-Branger et al. 2000, Spagnoli et al. 2000). Es liegen jedoch auch Studien vor, in denen Ependymome im Kindesalter keine schlechtere Prognose besitzen (Vanuytsel et al. 1992, Kovalic et al. 1993) und eine Erkrankung in den ersten Lebensjahren keinen besonders ungünstigen Verlauf nimmt (Foreman et al. 1996, Robertson et al. 1998, Timmermann et al. 2000).

Die prognostischen Einschätzung des Resektionsausmaßes wird einheitlich vorgenommen und einer totalen Resektion eine Verbesserung der Prognose im Vergleich zu einer inkompletten Resektion zugesprochen (Papadopoulos et al. 1990, Nazar et al. 1990, Healey et al. 1991, Chiu et al. 1992, Rousseau et al. 1994,

Jayawickreme et al. 1995, Pollack et al. 1995, Perilongo et al. 1997, Duffner et al. 1998, Sala et al. 1998, Horn et al. 1999, Figarella-Branger et al. 2000, Spagnoli et al. 2000, Timmermann et al. 2000). Lediglich Needle et al. 1997 und Autoren älterer Studien wie Salazar 1983 sehen in einer kompletten Resektion keinen prognostischen Vorteil.

Von Bedeutung ist, dass das Resektionsausmaß teilweise von der Lokalisation des Tumors abhängt. Bei infratentoriellen Ependymomen, die im Kindesalter gehäuft auftreten, ist eine totale Resektion wegen der engen Nachbarschaftsbeziehungen zu funktionell wichtigen anatomischen Strukturen häufig nicht erreichbar (Ikezaki et al. 1993, Horn et al. 1999). Lokalisation, Resektionsausmaß und Alter stellen somit voneinander teilweise abhängige Variablen dar. Infratentorielle Ependymome nehmen wohl auch aus diesen Gründen einen ungünstigeren Verlauf als supratentorielle (Salazar 1983, Chiu et al. 1992, Pollack et al. 1995, Foreman et al. 1996, Needle et al. 1997, Perilongo et al. 1997, Bouffet et al. 1998, Sala et al. 1998, Figarella-Branger et al. 2000). In den meisten der genannten Untersuchungen ist die Assoziation zwischen Lokalisation und Prognose jedoch nicht statistisch signifikant, sondern zeigt lediglich einen Trend an. Außerdem existieren auch Studien, die keine oder entgegengesetzte Beziehungen auffinden (Schiffer et al. 1991b, Rousseau et al. 1994, Jayawickreme et al. 1995, McLaughlin et al. 1998). Eindeutig ist dagegen eine signifikant günstigere Prognose spinaler Ependymome (Schiffer et al. 1991b, McLaughlin et al. 1998).

1.4 p53 – ein Tumorsuppressor

Mutationen des Tumorsuppressorgens TP53 kommen in 50–55% in menschlichen Tumoren vor und gehören damit zu den häufigsten genetischen Alterationen. Sie finden sich nicht nur bei Kolon-, Mamma-, Lungen-, Ösophagus- und Lebertumoren, sondern auch bei Tumoren des ZNS, insbesondere bei Neoplasien astrozytären Ursprungs (Hollstein et al. 1994). Aufgrund dieser großen Bedeutung war und ist p53 zentraler Gegenstand der Tumorforschung.

Verantwortlich für die p53-Funktionen ist das Tetramer des Wildtyp-p53-Proteins (wt p53), welches mit anderen Proteinen interagieren und als Transkriptionsfaktor fungieren kann. Wt p53 ist ein 53 kDa schweres und 393 Aminosäuren umfassendes Phosphoprotein, es wird durch das Gen TP53 auf dem kurzen Arm des Chromosom 17 (17p13.1) kodiert (Lamb und Crawford 1986).

p53 besitzt äußerst vielfältige und bedeutende Funktionen, wie z.B. die Überwachung der genetischen Stabilität und Integrität, die Regulation des Zellzyklus, sowie die Einleitung der Apoptose und hat Einfluss auf die Zelldifferenzierung und Vaskularisation. Auch als „Genomwächter“ bezeichnet ist eine der Hauptfunktionen von p53 die DNA-Reparatur bzw. die Elimination von Zellen mit genetischen Schäden durch Einleitung der Apoptose. Ebenso wie die Kontrolle des Zellzyklus sind dies wichtige Mechanismen zur Verhinderung der Initiation und Progression von Tumoren. Die Regulation der p53-Aktivität ist komplex, von zentraler Bedeutung ist hierbei die kurze Halbwertszeit von nur 20-30 Minuten. p53-Funktionen und die Regulation der p53-Aktivität sind in den Abbildungen Nr. 1 und 2 schematisch dargestellt.

Genetische Alterationen wie Punktmutationen, Insertionen und Deletionen führen häufig zu nonsense- und missense-Proteinen. Sie können aber auch eine Konformationsänderung des Tetramers und damit eine Beeinträchtigung oder den Verlust der p53-Funktion hervorrufen (Greenblatt et al. 1994). Eine Interaktion mit anderen Proteinen oder eine spezifische DNA-Bindung ist dann nicht mehr möglich. Auch Heterooligomere aus Wildtyp- und mutantern p53 können über eine Konformationsänderung zum Funktionsverlust führen. Man spricht bei dieser funktionellen Gen-Inaktivierung von einer dominant negativen Mutation (Milner und Medcalf 1991, Srivastava et al. 1993). Eine weitere Folge der aus einer Mutation resultierenden Konformationsänderung ist eine Verlängerung der Halbwertszeit und damit die Akkumulation von mutantern p53, welches dadurch im Gegensatz zu wt p53 mit immunhistochemischen Methoden nachweisbar wird (Hinds et al. 1990, Iggo et al. 1990, Levine et al. 1991).

p53-Mutationen kommt bei einigen Malignomen eine negative prognostische Bedeutung zu. Tumoren mit p53-Mutationen weisen dabei oftmals ein aggressiveres Verhalten mit kürzerem progressionsfreiem Intervall, kürzerer Überlebenszeit und höherer Metastasierungsrate auf (Gasparini et al. 1993, Soini et al. 1994, Aas et al. 1996, Pollack et al. 1997, Fulci et al. 1998). Bedeutung besitzt der p53-Status auch bezüglich der Tumorthherapie. Tumoren mit TP53-Alterationen zeigen eine geringe Ansprechrate auf Strahlen- und Chemotherapie, da eine Einleitung der p53-abhängigen Apoptose von Tumorzellen infolge der therapieinduzierten DNA-Schädigung nicht mehr erfolgt (Aas et al. 1996, Levine 1997).

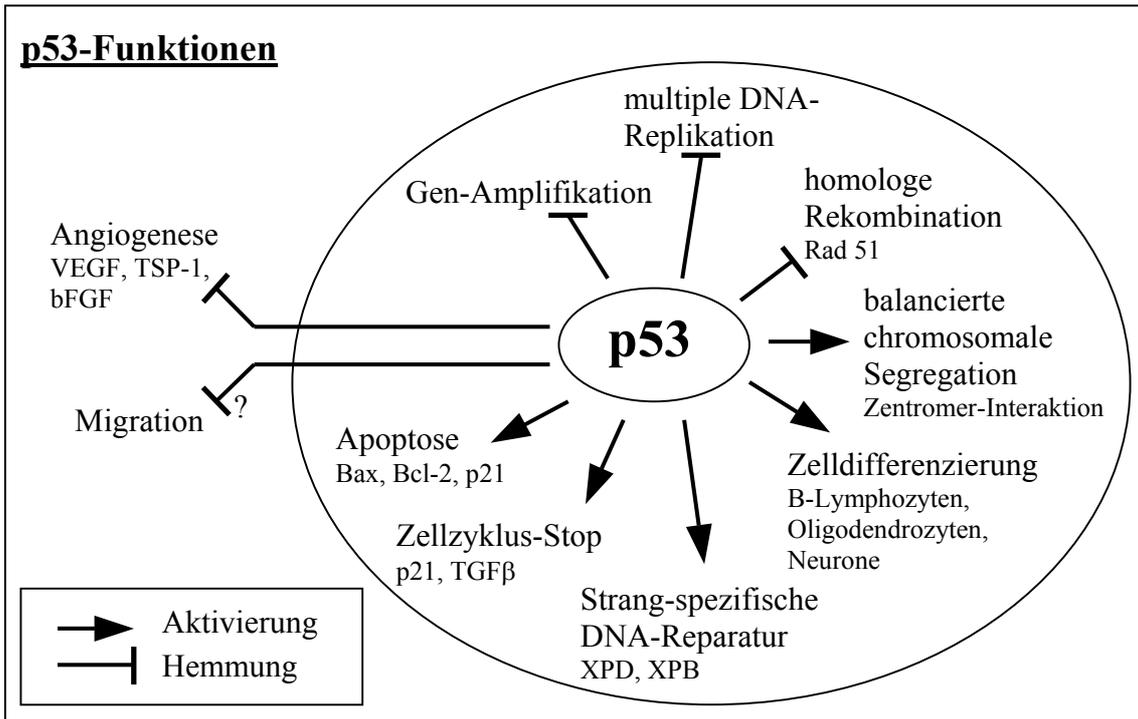


Abbildung Nr. 1: p53-Funktionen, nach Fulci und Van Meir 1999

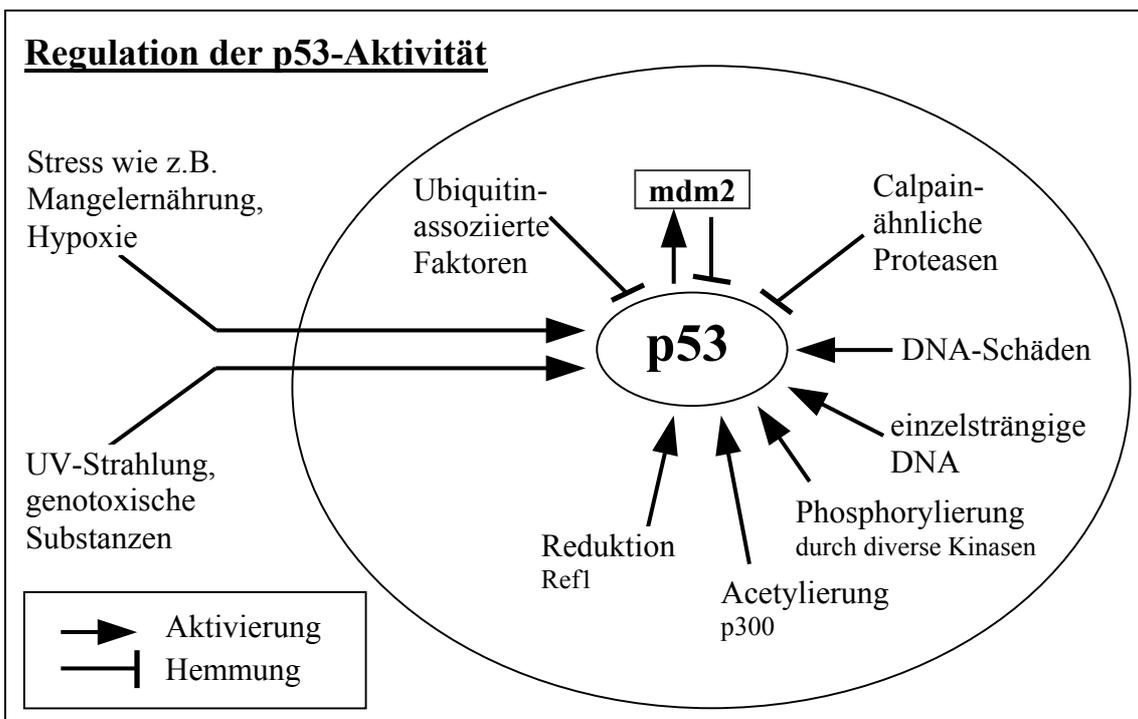


Abbildung Nr. 2: Regulation der p53-Aktivität, nach Fulci und Van Meir 1999

Die Beobachtung, dass der Nachweis von p53-Mutationen bei vielen Neoplasien mit einem höheren Tumorgrad korreliert und bei der Tumorprogression und clonalen Dedifferenzierung eine Rolle spielt (Greenblatt et al. 1994), trifft auch auf astrozytäre Tumoren zu (Sidransky et al. 1992), welche besonders häufig p53-Mutationen aufweisen. Bei anderen Tumoren des ZNS wie Oligodendrogliomen, Medulloblastomen und Meningeomen treten TP53-Mutationen dagegen eher selten auf (Ohgaki et al. 1991, Tada et al. 1997, Nozaki et al. 1998).

Ependymome wurden bisher nur wenig und mit meist geringen Fallzahlen hinsichtlich ihres p53-Status untersucht. Der Nachweis von Mutationen auf DNA-Ebene mittels PCR-SSCP-(single-strand conformational polymorphism)Analyse verlief meist negativ (Ohgaki et al. 1991, Wu et al. 1993, Felix et al. 1995, Tominaga et al. 1995, Fink et al. 1996, Orellana et al. 1998, Tong et al. 1999, Zhou et al. 1999). In immunhistochemischen p53-Untersuchungen zeigten sich nur vereinzelt positive Fälle, die sich auf myxopapilläre Ependymome (WHO Grad I) und anaplastische Ependymome (WHO Grad III) verteilten (Bruner et al. 1991, Barbareschi et al. 1992, Karamitopoulou et al. 1993, Soini et al. 1994, Ng et al. 1994, Kuchelmeister et al. 1995, Prayson 1997, Suzuki und Iwaki 2000). Die genannten Autoren sind weitgehend der Meinung, dass TP53-Mutationen in der Tumorgenese von Ependymomen wenn überhaupt nur eine untergeordnete Rolle spielen. Rushing et al. 1998 und Korshunov et al. 2000 fanden dagegen bei einer Gesamtzahl von 115 untersuchten Ependymomen zahlreiche p53-immunpositive Fälle und konnten darüber hinaus eine Korrelation der p53-Immunreaktivität mit dem Tumorgrad III nach WHO feststellen.

Wenn auch die Interpretation der Ergebnisse immunhistochemischer Untersuchungen und insbesondere die Validität von Rückschlüssen auf Mutationen im TP53-Gen konträr diskutiert werden (Wynford-Thomas 1992, Hall und Lane 1994, Rubio et al. 1993, Louis et al. 1993, Louis 1994), so wurde dem immunhistochemischen Nachweis einer p53-Akkumulation bei astrozytären Tumoren (Soini et al. 1994, Pollack 1997, Korkolopoulou et al. 1997) und neuerdings auch bei Ependymomen (Korshunov et al. 2000) ein prognostischer Stellenwert eingeräumt.

Mit Ausnahme der Publikation von Orellana et al. 1998, in der sechs kindliche Ependymome (WHO Grad II) hinsichtlich ihres p53-Status untersucht wurden, gingen in alle genannten Studien Kinder und Erwachsene ohne weitere Differenzierung ein

oder es wurden keine Angaben über das Alter der Patienten gemacht. Neben der Tatsache, dass bisher nur eine geringe Anzahl von Ependymomen hinsichtlich des p53-Status untersucht wurde, ist es insbesondere deshalb misslich, dass die Gruppe kindlicher Ependymome bis jetzt weitgehend vernachlässigt wurde, weil diese sich in ihrem biologischen Verhalten von Ependymomen des Erwachsenenalters unterscheiden und sich p53 mehrfach als entscheidender Faktor des biologischen Tumorverhaltens erwiesen hat.

1.5 MIB-1 – ein Proliferationsmarker

Der Untersuchung der Proliferationsaktivität kommt in der Tumorforschung und -diagnostik eine große Bedeutung zu. Eine Bestimmung der Wachstumsfraktion erlaubt in vielen Fällen eine Einschätzung des biologischen Verhaltens des Tumors und damit der Prognose und spielt im Prozess der Entscheidungsfindung bezüglich verschiedener Alternativen im therapeutischen Procedere eine Rolle (Karamitopoulou et al. 1994).

Eine einfache Methode zur Abschätzung der Proliferationsaktivität ist die Bestimmung von Mitosefiguren. Die Mitose repräsentiert jedoch nur einen zeitlich sehr kurzen Abschnitt der gesamten Proliferationsphase des Zellzyklus, die M-Phase. Für den immunhistochemischen Nachweis proliferierender Zellen stehen verschiedene Antikörper zur Verfügung, so z.B. Antikörper gegen das PCNA (proliferating cell nuclear antigen), Ki-S1 und Ki-67. Besondere Bedeutung erlangte der erstmals 1983 von Gerdes et al. beschriebene Antikörper Ki-67, der ein nukleäres, eng mit dem Zellzyklus assoziiertes 345 und 395kDa schweres Protein nachweist, das durch ein Gen auf Chromosom 10 kodiert wird. Dieses Protein, dessen Funktion nicht bekannt ist, wird in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G₁, S, G₂, M) exprimiert, nicht jedoch in ruhenden Zellen (G₀) (Gerdes et al. 1984). Vorteile im Nachweis des Ki-67-Proteins sind dessen kurze Halbwertszeit sowie die Tatsache, dass es nicht wie PCNA oder Ki-S1 in bestimmten Zellzyklus-unabhängigen Situationen (beispielsweise der DNA-Reparatur) exprimiert wird (McCormick et al. 1993).

Im Gegensatz zum Antikörper Ki-67, welcher nur an Gefriermaterial anwendbar ist, kann mit dem Antikörper MIB-1 auch archivierte, formalinfixierte und paraffineingebettete Gewebe untersucht werden. MIB-1 erkennt ein durch den Fixationsprozess nicht zerstörbares und durch eine thermische Antigen-Demaskierung

wiederherstellbares Epitop des Ki-67-Antigens. In Bezug auf die Ergebnisse werden die Antikörper Ki-67 und MIB-1 als äquivalent betrachtet (Cattoretti et al. 1992).

In zahlreichen Arbeiten wurde die Proliferationsaktivität auch in Ependymomen untersucht (Schröder et al. 1993, Schiffer et al. 1995, Rezai et al. 1996, Rushing et al. 1997 und 1998, Prayson 1997, 1998 und 1999, Ritter et al. 1998, Bennetto et al. 1998, Bouvier-Labit et al. 1999, Korshunov et al. 2000, Figarella-Branger et al. 2000, Spagnoli et al. 2000). Meist gingen in diese Untersuchungen Ependymome des Kindes- und Erwachsenenalters ein, ohne eine Differenzierung nach den unterschiedlichen Altersgruppen vorzunehmen. Einigkeit herrscht bei den genannten Autoren darüber, dass der Proliferationsindex mit dem Malignitätsgrad nach WHO korreliert.

Eine hohe Proliferationsaktivität wird bei vielen Malignomen, einschließlich der Tumoren des ZNS, mit einem aggressiven Verhalten und damit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht (Brown und Gatter 1990, Karamitopoulou et al. 1994). Erst in den letzten Jahren wurde der klinische Verlauf von Ependymomen im Zusammenhang mit der Proliferationsaktivität untersucht, um die prognostische Aussage von Proliferationsindices an Ependymomen zu überprüfen. Eine große Proliferationsfraktion stellt sich in diesen Studien ebenso wie die Erkrankung an einem Ependymom im Kindesalter als unabhängiger und sich negativ auf die Prognose auswirkender Faktor dar (Rezai et al. 1996, Ritter et al. 1998, Bennetto et al. 1998, Prayson 1999, Figarella-Branger et al. 2000, Spagnoli et al. 2000 und Korshunov et al. 2000). Darüber hinaus beobachteten Ritter et al. 1998 und Korshunov et al. 2000, dass sich kindliche Ependymome durch eine wesentlich stärkere durchschnittliche Proliferationsaktivität von Ependymomen des Erwachsenenalters abgrenzen.

1.6 EMA – das Epitheliale Membran Antigen

1979 stellten Heyderman et al. Antiseren gegen menschliches Brustdrüsengewebe her und zeigten in nachfolgenden Untersuchungen, dass die gewonnenen Antikörper keine Spezifität für das Brustdrüsengewebe aufwiesen, sondern für sekretorisch aktive Epithelien im Allgemeinen. Damit wurde die Grundlage für die Beschreibung des Epithelialen Membran Antigens (EMA) geschaffen, einem weit verbreiteten und hoch selektiv auf sekretorisch aktiven Membranen verteilten Glykoprotein mit einem vom Kohlenhydratanteil abhängigen Molekulargewicht zwischen 265 und 400kDa. EMA

fand sich in den meisten Organen mit glandulärer Differenzierung (u.a. Mamma, Speicheldrüsen, Pankreas, Gallengänge, Prostata) sowie in vielen Adenokarzinomen. Die damit verbundene Bedeutung des Nachweises dieses Antigens in der Tumordiagnostik wurde schon in der Erstpublikation erkannt und bereits kurze Zeit nach der Erstbeschreibung wurde dem Nachweis von EMA beim Auffinden und Zuordnen von Leber-, Lymphknoten- oder Knochenmarksmetastasen von Mammakarzinomen und anderen Adenokarzinomen ein großer Stellenwert eingeräumt. Entsprechend des Verteilungsmusters wurde auch über einen prognostischen Stellenwert spekuliert, da hochdifferenzierte Tumoren ähnlich dem Ursprungsgewebe eine starke EMA-Expression an luminalen Membranen aufwiesen, während mit zunehmendem Grad der Anaplasie häufig eine zytoplasmatische EMA-Expression in den Vordergrund rückte (Sloane et al. 1980, Sloane und Ormerod 1981).

Die Ergebnisse immunhistochemischer Untersuchungen ependymaler Neoplasien sowie des normalen Ependyms bezüglich der EMA-Expression sind äußerst widersprüchlich. Während Sloane und Ormerod 1981 im normalen Ependym keine EMA-Expression nachweisen konnten, wird in anderen Publikationen (Uematsu et al. 1989, Figarella-Branger et al. 1991) eine charakteristische EMA-Expression beschrieben. Entsprechend dem Verteilungsmuster in glandulären Organen findet sich eine EMA-Immunpositivität zum einen auf den luminalen Oberflächenmembranen des Ependyms, zum anderen intrazytoplasmatisch in subependymalen Zellen in Form von irregulär begrenzten Punkten und glatt begrenzten Ringen.

Ähnlich divergent sind die Ergebnisse der wenigen Studien an Ependymomen. Cruz-Sanchez et al. 1988 und Uematsu et al. 1989 halten eine EMA-Expression für einen Marker einer hohen Differenzierung. Sie konnten EMA in einem dem oben beschriebenen ähnlichen Verteilungsmuster für normales Ependym in benignen, nicht jedoch in malignen Ependymomen nachweisen. In der Studie von Kaneko et al. 1990 erwiesen sich jedoch anaplastische Ependymome in einem wesentlich höheren Prozentsatz immunpositiv für EMA als die ebenfalls untersuchten klassischen/benigen Ependymome. Figarella-Branger et al. 1991 fanden zwar eine EMA-Expression in sechs von 16 kindlichen infratentoriellen Ependymomen, jedoch keine Korrelation mit dem Malignitätsgrad. Entsprechend unterschiedlich fallen auch die aus den genannten Studien gezogenen Rückschlüsse aus. Cruz-Sanchez et al. 1988 und Uematsu et al. 1989

sehen EMA den Ergebnissen ihrer Studien zufolge als Marker für niedrigmaligne Ependymome, Figarella-Branger et al. 1991 dagegen vermuten gestützt auf ihre follow-up-Daten in einer EMA-Expression einen möglichen negativen Prognosefaktor.

1.7 Ki-M1P, anti-HLA-DR und KP1

– Marker des Mikroglia-/Makrophagen-Systems

Das Mikroglia-/Makrophagen-System

Das sogenannte „dritte Element“ (Cajal 1952) neben Nerven- und Gliazellen im zentralen Nervensystem bezeichnet die von Nissl 1899 als „Stäbchenzellen“ entdeckte und 1932 von del Rio-Hortega erstmals detailliert beschriebene Mikroglia (MG).

Über den Ursprung der MG existierten über Jahrzehnte verschiedene Auffassungen. Inzwischen ist weitgehend akzeptiert, dass die MG von Knochenmarksvorläuferzellen der myelomonozytären Zelllinie abstammt. Dies wurde schon 1933 von Santha und Juba vermutet, da MG erst nach Auftreten der Vaskularisation des ZNS nachgewiesen werden konnte. Kurz darauf beschrieben Dunning und Furth (1935) außerdem die Transformation von kultivierten Monozyten zu Zellen, die von ramifizierter MG morphologisch nicht unterschieden werden konnten.

Monozyten wandern ab der zweiten Hälfte der Fetalzeit in das Nervengewebe ein und konvertieren zur residenten MG. Im Rahmen dieser Konversion wird über ein Zwischenstadium, die amöboide MG, der Endzustand, die ruhende/residente MG, erreicht, welche aufgrund ihres charakteristischen morphologischen Erscheinungsbildes als ramifizierte MG bezeichnet wird (Ling und Wong 1993, Sievers et al. 1994). Gut differenzierte, ramifizierte MG findet sich schließlich ab der 35. Gestationswoche (Esiri et al. 1991). Diese Zuwanderung von Monozyten ist auf ein recht kleines Zeitfenster begrenzt (zweite Hälfte der Fetalzeit bis zur frühen Postnatalperiode), die spätere Zunahme der MG mit der Entwicklung und Reifung des ZNS sowie im Rahmen pathologischer Prozesse wird durch die Proliferationsfähigkeit der MG erklärt (Graeber et al. 1988, Alliott et al. 1991).

Morphologisch ist amöboide MG durch einen plumpen Zellkörper mit pseudopodienartigen Fortsätzen gekennzeichnet. Sie besitzt die volle Funktion aktiver Makrophagen und gleicht diesen auch durch ein gemeinsam exprimiertes Antigenespektrum (Ling und Wong 1993, Davis et al. 1994).

Ramifizierte MG dagegen besitzt einen kleinen, ovalen bis spindelförmigen Zellkörper, von dem multipel verzweigte Zellfortsätze ausgehen. Während des Reifungsprozesses vom Monozyten zur ramifizierten MG erfolgt eine Downregulation sowohl der von beiden Zellarten gemeinsam exprimierten Oberflächenantigene, die auf die Verwandtschaft von Monozyten und MG hinweisen, als auch der phagozytischen Aktivität (Perry und Gordon 1988, Davis et al. 1994). Die weiterbestehende Expression von Fc- und Komplement-Rezeptoren an der Zelloberfläche ramifizierter MG weist jedoch darauf hin, dass auch „ruhende“ MG bei der Antikörper-vermittelten Immunabwehr und der Komplement-abhängigen Zytolyse eine Rolle spielt (Perry und Gordon 1988, Streit et al. 1988a).

Sehr sensibel reagiert MG auf pathologische Veränderungen im ZNS dem Konzept der funktionellen Plastizität der MG folgend mit einer Rekonversion ramifizierter MG zur phagozytisch aktiven amöboiden MG und eventuell weiter zu Hirnmakrophagen (Kreutzberg 1996, Streit et al. 1999). Zu diesen Stimuli gehören neben infektiösen und inflammatorische Erkrankungen des ZNS auch neuronale Re- und Degeneration (Cuzner et al. 1988, Dickson et al. 1993, McGeer et al. 1993), Traumen und ischämische Prozesse (Streit et al. 1988b und 1989), sowie Hirntumoren (Rossi et al. 1987, Morioka et al. 1992a, 1992b und 1992c, Roggendorf et al. 1996). In vitro konnte der MG nach einer Immunstimulation mit LPS/INF Tumorzytotoxizität nachgewiesen werden (Frei et al. 1987, Sutter et al. 1991, Murata et al. 1997). Möglicherweise ist MG auch in vivo an der Tumorbekämpfung beteiligt oder könnte im Rahmen einer immunstimulatorischen Therapie tumorzytotoxische Potenz erhalten.

Von der amöboiden und ramifizierten MG wird seit einigen Jahren die perivaskuläre Mikroglia (auch perivascular cells (PVC) genannt) aufgrund morphologischer und immunphänotypischer Unterschiede abgegrenzt. Im perivaskulären Raum übernimmt diese ebenfalls die Aufgabe der Antigenpräsentation und der Phagozytose. Zusätzlich spielen PVC eine Rolle in der Drainage von Flüssigkeit und gelösten Substanzen aus dem Hirnparenchym (Hickey und Kimura 1988, Kida et al. 1993 und 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Zellpopulationen unterschieden:

1. Makrophagen
2. amöboide Mikroglia
3. ramifizierte Mikroglia

Hierzu kamen folgende Antikörper zur Anwendung:

1. Ki-M1P/anti-CD11c

Der Antikörper Ki-M1P erkennt ein Formalin-/Paraffin-resistentes Epitop auf Monozyten und deren Makrophagenderivaten, das Oberflächenprotein CD11c. Er wird als Panmakrophagenmarker bezeichnet (Radzun et al. 1991) und markiert im Mikroglia-/Makrophagen-System des ZNS alle oben besprochenen Zelltypen (Paulus et al. 1992, Roggendorf et al. 1996).

2. Anti-Human HLA-DP, DQ, DR Antigen

Die HLA-D-Region auf Chromosom 6p codiert mit den Genloci HLA-DP, -DQ und -DR den humanen „major histocompatibility complex (MHC) class II“, welcher als nicht kovalent verbundenes Heterooligomer einer α - und β -Polypeptidkette an der Zelloberfläche antigenpräsentierender Zellen erscheint. Der Clone CR3/43 des Anti-Human HLA-DP, DQ, DR Antigen-Antikörpers (im folgenden anti-HLA-DR genannt) reagiert mit der β -Untereinheit aller Genprodukte der Genregionen DP, DQ und DR (Gosh et al. 1984). Im MG/Makrophagen-System markiert er die amöboide/aktivierte Mikroglia, Makrophagen und PVCs (Sasaki und Nakazato 1992, Graeber et al. 1994, Roggendorf et al. 1996).

3. KP1/anti-CD68

Der Antikörper KP1 bindet an ein 110kDa schweres Transmembran-Glykoprotein, das Oberflächenantigen CD68. Im ZNS werden mit diesem Antikörper ausschließlich Makrophagen, nicht jedoch PVC, ramifizierte und amöboide MG markiert (Pulford et al. 1989, Roggendorf et al. 1996). Die Funktion des CD68 ist nicht bekannt.

Von den möglichen Ansätzen bei der Untersuchung der MG wurden für diese Arbeit Verteilung und Proliferationsverhalten der MG, sowie die HLA-DR Expression in kindlichen Ependymomen aufgegriffen.

Mikroglia-/Makrophagen-Verteilung

Die fortschreitende Entwicklung monoklonaler Antikörper in den vergangenen Jahren ermöglichte es, die verschiedenen Zellpopulationen des MG/Makrophagen-Systems exakt zu differenzieren. Während die MG-Forschung dadurch insbesondere im

Zusammenhang infektiöser, inflammatorischer und degenerativer Erkrankungen des ZNS einen Aufschwung erhielt, wurde dem MG/Makrophagen-System bei Hirntumoren weiterhin vergleichsweise wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Nur einzelne Forschungsgruppen untersuchten die Infiltration zerebraler Neoplasien durch inflammatorische bzw. immunologische Zellen, ein Schwerpunkt lag hier eindeutig bei glialen Tumoren (Brooks et al. 1978, Stevens et al. 1988, Esiri und Morris 1991, Rossi et al. 1987, 1988a und b, 1989, 1991a, b, c und d, Morimura et al. 1990, Morioka et al. 1992a).

Eine erste differenzierte immunhistochemische Untersuchung des MG/Makrophagen-Systems in Hirntumoren unter besonderer Berücksichtigung auch der ramifizierten und amöboiden MG legten Roggendorf et al. 1996 vor. Die Autoren beschrieben eine für manche Hirntumoren charakteristische Verteilung der MG/Makrophagen. Während Glioblastome und anaplastische Gliome wie bei Rossi et al. 1987 und Morimura et al. 1990 eine besonders hohe Anzahl von MG und insbesondere von Makrophagen aufwiesen, fand sich in glialen Tumoren niedriger Malignität bei insgesamt geringerer MG/Makrophagenzellzahl hauptsächlich amöboide MG. Für Ependymome erwies sich ein septales MG/Makrophagen-Verteilungsmuster als charakteristisch, und in anaplastischen Ependymomen (WHO Grad III) zeigte sich im Vergleich zu Ependymomen (WHO Grad II) vermehrt amöboide MG.

Mikroglia-/Makrophagen-Proliferation

Obwohl bekannt ist, dass MG durch bestimmte pathologische Situationen aktiviert wird (s.o.) und im Rahmen dieser Aktivierung beispielsweise bei traumatischer Schädigung (Graeber et al. 1988, Streit und Kreutzberg 1988b, Amat et al. 1996) und Demyelinisierung (Ohno et al. 1993, Schönrock et al. 1998) eine Proliferation der MG nachgewiesen werden konnte, wurde das Proliferationsverhalten der MG in Hirntumoren bisher kaum untersucht. Entsprechend wenig weiß man über den Anteil der MG an einer beispielsweise mit dem Proliferationsmarker MIB-1 bestimmten Proliferationsfraktion von Hirntumoren.

Abgesehen von Penfield, der 1925 erstmals MG in Hirntumoren beschrieb und schon damals einen Teil der proliferierenden Zellen als MG interpretierte, beschäftigten sich bisher soweit bekannt nur Klein und Roggendorf (2001) mit dieser Fragestellung und untersuchten das Proliferationsverhalten der MG in Astrozytomen. Es konnte

nachgewiesen werden, dass sich pilozytische Astrozytome durch eine signifikant höhere MG-Proliferationsaktivität von den anderen astrozytären Tumoren abgrenzen. Entsprechende Untersuchungen weiterer Hirntumoren liegen bisher nicht vor.

HLA-DR Expression in Mikroglia/Makrophagen und Tumorzellen

Immunhistochemische Untersuchungen des MG/Makrophagen-Systems in pathologisch verändertem sowie normalen Hirngewebe bedienen sich meist eines Panels verschiedener Antikörper, um einerseits zwischen ramifizierter, amöboider und perivaskulärer MG sowie Makrophagen unterscheiden zu können, andererseits um Hinweise auf das Aktivierungsniveau der genannten Zellen zu erhalten. Hierbei wird der Nachweis einer HLA-DR Expression durch MG einer Aktivierung derselben gleichgesetzt (McGeer et al. 1988, Sasaki und Nakazato 1992, Graeber et al. 1994).

Einige der Studien über die MG-Verteilung und Makrophagen-Infiltration in Hirntumoren berichteten auch von einer HLA-DR Expression durch Tumorzellen. Rossi und seine Mitarbeiter führten diesbezüglich umfangreiche Untersuchungen durch. Es zeigte sich, dass eine HLA-DR Expression in Astrozytomen, Meningeomen, Hypophysenadenomen, Akustikusneurinomen und extra- sowie intraduralen sekundären Karzinomen ein häufiger Befund ist (Rossi et al. 1987, 1988a und b, 1990a und b, 1991c und d), in Oligodendrogliomen jedoch nicht vorkommt (Rossi et al. 1991b). Auch Saito et al. 1988 wies HLA-DR positive Tumorzellen in Gliomen und Hirnmetastasen nach. Andere Forschungsgruppen berichteten nebenbefundlich über eine HLA-DR Expression insbesondere in glialen Tumoren (Sasaki und Nakazato 1992, Schneider et al. 1992, Roggendorf et al. 1996). Ependymome wurden bezüglich einer HLA-DR Expression durch Tumorzellen bisher nicht untersucht.

Das Phänomen der Neuexpression von MHC II Molekülen ist auch bei anderen Tumoren wie Lungen-, Kolon-, Magen-, Cervix- und Mammakarzinomen sowie Melanomen bekannt. Die Bedeutung der HLA-DR Expression bezüglich der Prognose wird für die verschiedenen Tumoren unterschiedlich bewertet (van Duinen et al. 1988, Hilton und West 1990, Concha et al. 1991, Redondo et al. 1991, Möller et al. 1991a und 1991b, Passlick et al. 1994, Raju et al. 1994).

In Hirntumoren wird ein Zusammenhang zwischen einer HLA-DR Expression und einer schlechteren Prognose vermutet (Tran et al. 1998), auch wenn die Bedeutung einer

HLA-DR Expression bezüglich des biologischen Tumorverhaltens alles andere als klar ist. Bekannt ist, dass für eine Aktivierung von CD4⁺-T_H-Zellen im Rahmen der Antigenpräsentation bestimmte Co-Stimulatoren (u.a. B7) notwendig sind (Pieters 1997). Fehlen diese Costimulatoren, wie dies bei den HLA-DR exprimierenden Tumorzellen in den von Tran et al. 1998 untersuchten Astrozytomen der Fall ist, resultiert eine T-Zell-Anergie (Gimmi et al. 1993). Dies könnte zur Folge haben, dass HLA-DR exprimierende Hirntumoren der gegen Tumoren gerichteten Immunabwehr entkommen (Chaux et al. 1996) und einen Überlebensvorteil aufweisen.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die widersprüchliche Bewertung der histomorphologischen Merkmale bezüglich des klinischen Verlaufs und die prognostische Uneindeutigkeit in der Bewertung klinischer Variablen unterstreicht die Notwendigkeit, ependymale Tumoren mit dem Ziel zu untersuchen, Faktoren aufzufinden, welche Rückschlüsse auf das biologische Tumorverhalten erlauben. Das offensichtlich divergente Verhalten von Ependymomen des Kindes- und Erwachsenenalters erfordert darüber hinaus deren getrennte Untersuchung. Während in den vergangenen Jahren eine zunehmende Anzahl von Studien erschien, die sich mit dem klinischen Verlauf von Ependymomen im Kindesalter in Abhängigkeit von Therapiestrategien sowie der klinischen Variablen wie Alter, Tumorlokalisation und Graduierung beschäftigten, blieben die Anstrengungen bei kindlichen Ependymomen begrenzt, den prognostischen Wert immunhistochemisch nachweisbarer Proteinexpressionen zu ermitteln.

In der vorliegenden Arbeit soll daher nicht nur der klinische Verlauf der Tumorerkrankung von 40 Patienten, die im Kindesalter an einem Ependymom erkrankten, retrospektiv beurteilt werden, sondern vielmehr auch die prognostische Aussagekraft von Faktoren überprüft werden, von denen bekannt ist oder wenigstens vermutet wird, dass sie das Tumorverhalten beeinflussen. Der Tumorsuppressor p53, der Proliferationsmarker MIB-1 und die Neuexpression von HLA-DR durch Tumorzellen stehen in diesem Sinne im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Zusätzlich wird die EMA-Expression in kindlichen Ependymomen untersucht und ein weiterer Schwerpunkt auf die Analyse der Verteilung und der Proliferationsaktivität der Zellen des Mikroglia-/Makrophagen-Systems in Ependymomen des Kindesalters gelegt.

2 Material und Methode

Eine Übersicht der im Folgenden genannten Pufferlösungen und Reagenzien findet sich im Anhang (Kapitel 7.1).

2.1 Untersuchungsgut und klinische Daten

Untersucht wurden Gewebeproben von 58 Ependymomen, die in den Jahren 1986 mit 1999 im Rahmen einer neurochirurgischen Operation in der Abteilung für pädiatrische Neurochirurgie der Neurochirurgischen Universitätsklinik Würzburg gewonnen wurden. Die histologische Typisierung und Graduierung erfolgte entsprechend der Klassifikation von Tumoren der WHO (Kleihues und Cavenee 2000). Die klinischen Daten der insgesamt 40 Patienten sind in Tabelle Nr. 1 auf den Seiten 26 mit 32 zusammengefasst. Sie wurden den Patientenakten der Abteilung für pädiatrische Neurochirurgie der Neurochirurgischen Universitätsklinik Würzburg und der Universitätskinderklinik Würzburg entnommen.

2.2 Vorbereitung der Präparate

Fixierung des Gewebes

Die Fixierung erfolgte in 10%-iger Formalinlösung oder in Somogyi-Fixationslösung pH 7,2-7,4 über mindestens 24 Stunden. Anschließend wurde das Gewebe zur weiteren Bearbeitung in Paraffin eingebettet. 4-5µm dicke Schnitte wurden auf Super-Frost Objektträger aufgebracht und mindestens 12 Stunden bei 37°C getrocknet. Um eine bessere Haftung der Schnitte auf den Objektträgern zu erzielen, wurden die Objektträger zuvor mit 3-Aminopropyltriethoxy-Silane (APES) beschichtet.

Entparaffinierung

- | | | |
|----|---------------------------------|-------------|
| 1. | Xylol | 2 x 10 Min. |
| 2. | Ethanol 100% | 5 Min. |
| 3. | Ethanol 96% | 5 Min. |
| 4. | Ethanol 70% | 5 Min. |
| 5. | Aqua dest. | 5 Min. |
| 6. | Trocknen auf der Heizplatte für | 15 Min. |

Thermische Antigen-Demaskierung

Infolge der Gewebefixierung mit Aldehyd-haltigen Fixativa kommt es insbesondere bei Verwendung von Formalin zu einer Vernetzung von Proteinen. Im Gewebe eventuell vorhandene Antigene sind infolgedessen dem Nachweis durch immunhistochemische Methoden teilweise unzugänglich. Shi et al. beschrieben 1991 die Mikrowellenvorbehandlung als „Antigen-retrieval-Methode“, durch die die Anwendung vieler Antikörper an formalinfixiertem, paraffineingebetteten Material erst ermöglicht wurde. Fixationsbedingte Quervernetzungen können durch dieses thermischen Antigen-Demaskierungsverfahren durch hohe Temperaturen gelöst und damit verborgene Bindungsstellen freigelegt werden. Diesem Prinzip folgend wurden die Präparate in Citratpuffer bei pH 6,0 in einem Mikrowellenofen für 3 x 5 Minuten bei 600 Watt gekocht. Nach dem Kochen lässt man die Schnitte im Citratpuffer abkühlen und überführt sie in TBS-Puffer pH 7,6.

Enzymatische Antigen-Demaskierung

Die Fixations-bedingten Quervernetzungen von Proteinen können auch mit proteolytischen Enzymen angedaut werden, wodurch eventuell verborgene Bindungsstellen ebenfalls freigelegt werden. Antikörper, die ohne Demaskierungsverfahren zu einem falsch negativen Resultat führen würden, können somit zur Anwendung gelangen. Hierzu werden die Präparate 20 Minuten in TBS-Puffer inkubiert, der 0,05% Trypsin und 0,1% Calciumchlorid-Dihydrat enthält, nachdem der pH auf 7,8 eingestellt und die Lösung auf eine Temperatur von 37°C erwärmt wurde. Die Reaktion wird anschließend in fließendem Leitungswasser gestoppt und die Präparate in TBS-Puffer pH 7,6 überführt.

Blocken der endogenen Peroxidase

Da die Detektion des nachzuweisenden Antigens durch die Umwandlung eines Farbstoffes durch Antikörper-gekoppelte Peroxidase erfolgt, muss die möglicherweise im Gewebeschnitt enthaltene endogene Peroxidase geblockt werden. Dies erfolgt durch Inkubation der Präparate in 250ml Aqua dest. mit 6ml H₂O₂ für 15 Minuten. Anschließend wird mehrmals gründlich mit Aqua dest. gespült.

2.3 Immunhistochemische Untersuchungen an Paraffinschnitten

Allgemeines zur Immunperoxidase-Färbung

Die Immunperoxidase-Färbung, für die eine Vielzahl von Färbetechniken zur Verfügung steht, macht sich die selektive Erkennung eines Antigens mittels eines spezifischen Antikörpers zunutze. Zur Durchführung der vorliegenden Arbeit wurde eine indirekte Nachweismethode gewählt, die eine Modifikation des Avidin-Biotin-Komplex-Systems, das Biotin-Streptavidin amplifizierte (B-SA) System, verwendet (Hsu et al. 1981). Vorteil der indirekten gegenüber einer direkten Methode ist die höhere Sensitivität. Beim B-SA System wird außerdem die extrem hohe Affinität von Streptavidin zu Biotin mit einer Dissoziationskonstante von 10^{-19}M genutzt. Die Immunperoxidase-Färbung mit dem B-SA System läuft folgendermaßen ab:

Nach Applikation des Primärantikörpers, der gegen das nachzuweisende Antigen gerichtet ist, bindet ein mit Biotin konjugierter Sekundärantikörper (Link-Antikörper) an den Primärantikörper. Nun wird ein Peroxidase-Streptavidin-Konjugat (Label-Enzym) zugefügt, das hochaffin an das Biotin des Sekundärantikörpers bindet. Die Aktivität des Enzyms Peroxidase führt in Anwesenheit eines Elektronendonors zur Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes mit H_2O_2 und anschließend zur Oxidation des Elektronendonors, welcher auch Chromogen genannt wird. Die bei Immunperoxidase-Färbungen verwendeten Chromogene wandeln sich durch die Oxidation in unlösliche, farbige Verbindungen um, die am Ort der Bildung präzipitieren und dann lichtmikroskopisch nachgewiesen werden können.

Durchführung der Immunperoxidase-Färbung

Um ein Austrocknen der Schritte zu verhindern, erfolgten alle Inkubationsschritte in feuchten Kammern. Wenn nicht anders vermerkt, wurde bei Raumtemperatur gearbeitet.

1. Inkubation der Schnitte mit Ziegen Serum für 20 Minuten
2. Abklopfen des Ziegen Serums
3. Inkubation mit dem Primärantikörper (verdünnt in TBS/BSA) für 12-24 Stunden bei 4°C
4. Spülen in TBS-Puffer (3 x 5 Minuten)
5. Inkubation mit dem Link-Antikörper für 5 Minuten bei 37°C
6. Spülen in TBS-Puffer (3 x 5 Minuten)

7. Inkubation mit Label-Enzym für 5 Minuten bei 37°C
8. Spülen in TBS-Puffer (3 x 5 Minuten)
9. Darstellen der Peroxidase-markierten Antikörper mit:
 - a. 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB): 50mg/ml DAB werden in eine Küvette mit 250ml Tris-HCl-Puffer pH 7,2 gegeben. Die Reaktion wird mit 200µl H₂O₂ gestartet.
 - b. 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC): 1 Tropfen Chromogen auf 2,5ml gebrauchsfertigen Substratpuffer/H₂O₂
 - c. VektorVIP Substrate Kit: Verwendung laut Gebrauchsanweisung des Herstellers

Die Dauer der Färbung wird mit dem Lichtmikroskop kontrolliert.

10. Spülen in TBS-Puffer (1 x 5 Minuten)
11. Kerngegenfärbung in Hämalaun (20-40 Sekunden)
12. Bläuen in fließendem Leitungswasser für 10 Minuten
13. Entwässern in der aufsteigenden Alkoholreihe und Eindecken mit Eukitt

Ethanol 70%	5 Min.
Ethanol 80%	2 Min.
Ethanol 90%	5 Min.
Ethanol 96%	5 Min.
Ethanol 100%	2 x 5 Min.
Xylol	2 x 10 Min.

Da AEC alkohollöslich ist, entfällt die Entwässerung und eine Eindeckung mittels eines wässrigen Mediums wird notwendig. Hierfür gelangt Aquatex zur Anwendung.

Bei der Durchführung einer Doppelmarkierung eines Präparates mit zwei Antikörpern wird nach der Darstellung des ersten Antikörpers mit DAB und Spülung in TBS-Puffer der Vorgang abgebrochen und mit der Inkubation des zweiten Primärantikörper wieder mit der Durchführung der immunhistochemischen Untersuchung begonnen. Die Darstellung des zweiten Antikörpers erfolgt dann mit einem anderen Chromogen, beispielsweise Vektor VIP oder AEC. Dadurch wird der Nachweis zweier Antigene mittels unterschiedlicher Farbreaktionen in ein und demselben Präparat möglich.

Kontrollen

Bei jedem Färbedurchgang wurden je ein Präparat mit einer vorab bekannten, für den jeweiligen Antikörper charakteristischen Immunreaktivität als Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt, um die Zuverlässigkeit der Färbetechnik zu sichern und unspezifische Bindungen der Antikörper auszuschließen. Während die Positivkontrolle wie alle anderen Präparate mit dem Primärantikörper beschickt wurde, wurde die Negativkontrolle lediglich mit TBS/BSA inkubiert. Die Negativkontrolle darf keine Immunreaktivität aufweisen.

2.4 Antikörper, Verdünnungen und Antigen-Demaskierung

a) Anti-Human p53 Protein

Clone DO-7, monoklonaler Maus-Antikörper (Best.-Nr.: M 7001, DAKO A/S, Dänemark), Verdünnung 1:100, Mikrowellenvorbehandlung

b) Ki-67

Clone MIB-1, monoklonaler Maus-Antikörper (Best.-Nr.: dia 505, dianova GmbH, Deutschland), Verdünnung 1:100, Mikrowellenvorbehandlung

c) Ki-M1P/anti-CD11c

Dieser monoklonale Maus-Antikörper wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. R. Parwaresch, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, zur Verfügung gestellt. Verdünnung 1:20.000, Mikrowellenvorbehandlung

d) Anti-Human HLA-DP, DQ, DR Antigen

Clone CR3/43, monoklonaler Maus-Antikörper (Best.-Nr.: M 0775, DAKO A/S, Dänemark), Verdünnung 1:200, Mikrowellenvorbehandlung

e) Anti-Human Macrophage, anti-CD68

Clone KP1, monoklonaler Maus-Antikörper (Best.-Nr.: M 0814, DAKO A/S, Dänemark), Verdünnung 1:100, Trypsinisierung

f) Anti-Human Epithelial Membrane Antigen (EMA)

Clone GP1,4, monoklonaler Maus-Antikörper (Best.-Nr.: NCL-EMA, Novocastra Laboratories Ltd., UK), Verdünnung 1:100, Mikrowellenvorbehandlung

2.5 Auswertung der Präparate

Die Schnitte wurden an einem Olympus BH2 Mikroskop untersucht und an einem Zeiss Photomikroskop III mit Agfachrom CTprecisa 100 Filmen dokumentiert. Auszählungen von Zellen erfolgte immer mit Hilfe eines mit einem Gitternetz versehenen Zählkular sowie eines Counters. Für die Bewertung der Färbungen mit den verschiedenen Antikörpern wurden folgende Auswertungskriterien festgelegt:

p53: Die p53-Immunreaktivität erfasst die Zellkerne in einem diffusen oder granulären Muster, wobei die Färbeintensität von einer Tumorzelle zur anderen in beträchtlichem Maße variiert. Bei der Auswertung werden fraglich oder sehr schwach positive Zellen vernachlässigt. Sie wird am Ort höchster Immunreaktivität in fünf verschiedenen Gesichtsfeldern bei 400-facher Vergrößerung durchgeführt und das Ergebnis entsprechend Karamitopoulou et al. 1993 und Soini et al. 1994 bewertet:

- 0 keine oder nur sehr vereinzelt positive Zellen (<1%)
- + <5% positive Zellen
- ++ 5-10% positive Zellen
- +++ >10% positive Zellen

MIB-1: Bei 400-facher Vergrößerung werden im Bereich höchster MIB-1-Immunpositivität 1000 Zellen ausgezählt. Positivität findet sich in den Zellkernen in leicht unterschiedlicher Intensität, was bei der Auswertung nicht berücksichtigt wird. Zellen der Tumolvaskularisation sowie Blutzellen gehen nicht in die Auswertung mit ein. Der Prozentsatz positiver Zellen wird als MIB-1 Labeling Index (MIB-1 LI) angegeben (Prayson 1999).

EMA: Bei 200-facher Vergrößerung wird das gesamte Präparat auf Immunpositivität für EMA durchgemustert. Entsprechend des in der Literatur beschriebenen Verteilungsmusters für EMA in Ependym und ependymalen Tumoren (Uematsu et al. 1989, Figarella-Branger et al. 1991) erfolgt eine Bewertung des Vorhandenseins bzw. Fehlens folgender Expressionsmuster mit + bzw. 0: Immunpositivität auf Zellmembranen und intrazytoplasmatische Immunreaktivität in Punkt- sowie Ringform.

Wegen des Auftretens einer diffusen intrazytoplasmatischen Immunreaktivität in den untersuchten Präparaten wird diese in gleicher Weise gewertet.

Die **Mikroglia/Makrophagen-Verteilung** wird anhand der Markierung mit Ki-M1P bei 200-facher Vergrößerung bewertet. In drei Gesichtsfelder mit einer Größe von jeweils $0,25\text{mm}^2$ werden alle Zellen des Mikroglia-/Makrophagen-Systems gezählt, wobei entsprechend des morphologischen Erscheinungsbildes zwischen ramifizierter und amöboider MG sowie Makrophagen unterschieden wird (Paulus et al. 1993). Die Auswertung erfolgt

1. im Tumor, im Falle unterschiedlicher Mikroglia-dichte an einem Ort hoher und geringer Dichte (nekrotisches und perinekrotisches Gewebe werden dabei nicht bewertet),
2. im an den Tumor angrenzenden Hirngewebe (falls vorhanden) und
3. im Tumor-entfernten Hirngewebe (falls vorhanden).

Mikroglia-Proliferation (Doppelmarkierung MIB-1/Ki-M1P): Bei 400-facher Vergrößerung wurden im Bereich höchster Immunpositivität für den Antikörper MIB-1 1000 Zellen gezählt. Durch die Doppelmarkierung mit Ki-M1P (Entwicklung mit VektorVIP = violett) und MIB-1 (Entwicklung mit DAB = braun) ist eine Differenzierung der MG und der Tumorzellen möglich, außerdem die Zuordnung der durch den Proliferationsmarker MIB-1 erfassten Zellkerne zu den entsprechenden Zellpopulationen. Die MIB-1 positiven MG-Zellen werden zum MIB-1 Labeling Index (s.o.) in Relation gesetzt und es resultiert der prozentuale Anteil der MG an der Gesamtproliferation.

Als rechnerisches Nebenergebnis erhält man bei dieser Auswertung zusätzlich den Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtzellzahl am Ort der höchsten Proliferation.

HLA-DR: Bei 200-facher Vergrößerung werden die mit anti-HLA-DR markierten Präparate vollständig durchgemustert. Von Fällen, bei denen aufgrund der Morphologie der markierten Zellen vermutet werden konnte, dass HLA-DR exprimierende Tumorzellen vorhanden sind, wird zur Evaluierung ein zweites Präparat mit einer Doppelmarkierung für Ki-M1P (Entwicklung mit DAB = braun) und HLA-DR

(Entwicklung mit AEC = rot) angefertigt. Hierdurch wird eine Zuordnung der Positivität für HLA-DR zum MG/Makrophagen-System bzw. zu Tumorzellen möglich, da MG/Makrophagen entweder nur mit Ki-M1P oder mit Ki-M1P und anti-HLA-DR markiert werden, während HLA-DR exprimierende Tumorzellen negativ für Ki-M1P sind. Aufgrund der Bewertung der genannten Immunfärbungen werden die Tumoren in zwei Kategorien eingeteilt:

1. Tumoren ohne HLA-DR Expression durch Tumorzellen
2. Tumoren mit HLA-DR Expression durch Tumorzellen

2.6 Statistische Auswertung

Um den Grad der linearen Assoziation zwischen den Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchungen und/oder den klinischen Variablen zu ermitteln, gelangte der nichtparametrische Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (Spearman 1904) zur Anwendung, da die Mehrheit der Daten ordinales Niveau aufweist. Basierend auf dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman wurde der Test auf Unabhängigkeit durchgeführt (p-Wert). Für die Schätzung der Überlebensfunktion wurde die Methode nach Kaplan-Meier (Kaplan und Meier 1958) verwendet und der Median der Überlebenszeit bzw. des progressionsfreien Intervalls berechnet. Der Vergleich der ermittelten Überlebenswahrscheinlichkeit verschiedener Patientengruppen erfolgte mittels des Log-Rank-Testes (Kalbfleisch und Prentice 1980), außerdem wurde die Teststatistik T ermittelt. Ein p-Wert <0.05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. Damit wurde für die signifikante Korrelation zweier Parameter ein Signifikanzniveau von 5% festgelegt. Alle Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Programmes SAS für Windows 6.1 (SAS Institute, Cary, NC).

Tabelle 1: klinische Daten

Nr. ¹	Tumorart ²	Geschlecht	Alter ³	Lokalisation ⁴	präoperativer Verlauf, Symptomatik	Ausmaß der Resektion ⁵	adjuvante Therapie ⁶ , postoperativer Verlauf ⁷
1P*	aE	w	23	infra	innerhalb weniger Tage sich entwickelnde Hirndrucksymptomatik	inkomplett	R+C, unter der adjuvanten Therapie ist der Resttumor deutlich größtenregredient
1R	aE	w	56	infra	in NMR-Kontrolluntersuchung deutliche Größenzunahme des Resttumors	inkomplett	6 Wochen postoperativ Exitus, Follow up 34 Monate
2P	aE	w	66	supra	seit 2-3 Mo. Kopfschmerzen und Erbrechen, seit 2 Wochen zunehmende Nackensteife	inkomplett	R+C, Follow up 32 Monate (rezidiv-/progressionsfrei)
3P	aE	m	15	infra	seit 3 Wochen zunehmend Erbrechen	inkomplett	nicht bekannt
4P	aE	m	15	infra	akut auftretender Meningismus und Bewusstseinsseintrübung	inkomplett	Postoperativ wird eine ausgeprägte Hirnhypoxie festgestellt, das Kind verstirbt 2 Wochen später infolge einer zentralen Atemlähmung.
5PM*	mE	w	136	spinal	seit 14 Monaten Rückenschmerzen	inkomplett	Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose lag bereits eine multiple spinale Filialisierung vor.
5R1	mE	w	148	spinal	in NMR-Kontrolluntersuchung leicht größtenprogredivente Filiae	inkomplett	
5R2	mE	w	160	spinal	in NMR-Kontrolluntersuchung größtenprogredivente Filiae	inkomplett	nach der 2. Rezidivoperation keine weitere Progression, Follow up 66 Monate
6P	aE	m	46	infra	Schwindel und Gleichgewichtsstörungen seit mindestens 3 Monaten	inkomplett	R+C, Follow up 163 Monate (rezidiv-/progressionsfrei)
7P	aE	m	45	supra	zerebraler Krampfanfall	total	R+C, Follow up 100 Monate (rezidiv-/progressionsfrei)
8PM	aE	m	71	supra	akute Entwicklung einer Hirndrucksymptomatik, massive Stauungspapille, es liegt bereits eine spinale Metastasierung vor	inkomplett	R+C, die spinalen Metastasen sind nach Abschluß der Chemotherapie nicht mehr nachweisbar, 14 Monate postoperativ Gedächtnisstörungen, Sprachverfall, Bewusstseinsstörungen und Nachweis einer Meningeosis carcinomatosa, Exitus 16 Monate nach der Primärtumoroperation

9P	Ep	w	32	infra	langsam progrediente Ataxie und Hirndrucksymptomatik	inkomplett	R
9R1	aE	w	61	infra	seit 6 Wochen zunehmende Nackenschmerzen und Ataxie	inkomplett	R+C
9R2	aE	w	77	infra	zerebelläre Symptomatik	inkomplett	Diagnose eines 3. Rezidiv im Alter von 84 Monaten, Exitus 1 Monat später, Follow up insgesamt 53 Monate
10P	aE	m	110	infra	seit 2 Monaten Erbrechen und Kopfschmerzen	total	R+C, Follow up 19 Monate (rezidiv-/progressionsfrei)
11P*	Ep	w	90	infra	seit wenigen Wochen zerebelläre Symptome	inkomplett	R+C
11R1	aE	w	111	infra	seit wenigen Wochen verstärkt Müdigkeit und zunehmende Hirndrucksymptomatik	inkomplett	
11R2	aE	w	120	infra	seit 3 bis 4 Monaten zunehmende Verschlechterung mit Gehunfähigkeit, Atemrhythmus- und Blasenentleerungsstörungen, Fazialis- und Trigeminiusparesen	inkomplett	Exitus 3 Wochen nach der Operation, Follow up insgesamt 30 Monate
12P	aE	w	10	infra	seit 1 Monat zunehmende Hirndrucksymptomatik	inkomplett	postoperativ keine weiteren therapeutischen Maßnahmen, 4 Monate nach der Operation klinische Verschlechterung mit Gang- und Schluckstörungen, später linksseitige Hemiparese, Exitus 6 Monate postoperativ
13P*	aE	m	120	spinal	seit mehreren Wochen Schmerzen, Gang- und Blasenentleerungsstörung	inkomplett	R+C
13R1	aE	m	150	spinal	Rezidiv in NMR-Kontrolluntersuchung (3 Monate vor der Operation)	inkomplett	C
13R2	aE	m	165	infra + spinal	zerebelläre Symptome und Nüchternerebrechen, in der NMR-Untersuchung zeigen sich eine zerebelläre Metastase sowie multiple kleine Herde im Bereich des Primärtumor	inkomplett	die Kleinhirnmastase wird total reseziert, die multiplen Herde im Bereich des Primärtumors werden belassen
13R3	aE	m	168	spinal	in NMR-Kontrolluntersuchung zeigen sich neben einer spinale Metastase mehrere große Rezidivtumoren im Bereich des Primärtumors	inkomplett	5 Monate nach der 3. Rezidivoperation massive Größenzunahme der multiplen Herde im Bereich des Primärtumors, Exitus nach weiteren 10 Monate, Follow up insgesamt 64 Monate

14P*	aE	w	11	supra	nicht bekannt	inkomplett ⁸	postoperativ erfolgt keine Chemo-/Radiotherapie, der größtenkonstante Resttumor wird im Alter von 23 Monate total entfernt und anschließend eine Chemotherapie durchgeführt, Follow up 74 Monate (rezidiv-/progressionsfrei)
15P*	aE	w	82	supra	seit 6 bis 8 Wochen vermehrt Müdigkeit und Erbrechen	inkomplett	R
15R1*	aE	w	93	supra	Druckgefühl über dem linken Auge, fokale EEG-Verlangsamung	inkomplett	C
15R2*	aE	w	101	supra	in CT-Kontrolluntersuchung fällt ein großer Rezidivtumor auf	inkomplett	
15R3*	aE	w	109	supra	vermehrt Kopfschmerzen, daraufhin Kontroll-CT mit Nachweis eines erneuten Rezidivs	inkomplett	der Tumor wird im Abstand von 3 Wochen in 2 Sitzungen entfernt, es resultiert eine Frontallappenresektion
15R4	aE	w	118	supra	Rezidivtumor in CT-Kontrolluntersuchung	inkomplett	3 Monate später wird infolge einer akute Hirndrucksymptomatik neuroradiologisch (CT, MRT) eine diffuse Tumoraussaat, ein großer Rezidivtumor supratentoriell, sowie infratentoriell mehrere kleine Tumorknoten diagnostiziert, Exitus 4 Monate nach der Operation des 4. Rezidivs, Follow up insgesamt 40 Monate
16P	Ep	m	20	infra	seit 2 Wochen Erbrechen	total	C, Follow up 93 Monate (rezidiv-/progressionsfrei)
17P*	Ep	m	20	infra	nicht bekannt	total	
17R	Ep	m	30	infra + spinal	seit 2 bis 3 Wochen Wesensveränderung und Erbrechen, in MRT-Untersuchung findet sich ein Rezidivtumor, außerdem Verdacht auf zwei spinale Metastasen	inkomplett	Exitus 6 Monate später, Follow up 16 Monate
18P*	aE	m	30	supra	hemianopische Störungen nach rechts	inkomplett	R+C
18R	aE	m	42	supra	in MRT-Kontrolluntersuchung fällt 8 Monate nach der Operation des Primärtumors ein großer Rezidivtumor auf	inkomplett ⁹	Vor der Durchführung einer Erhaltungstherapie wird der verbliebene Tumorrest in einer dritten Operation total reseziert, Follow up insgesamt 28 Monate
19P	Ep	w	45	infra	seit 4 Wochen Nüchternbrechen, Gewichtsverlust, Gang- und Gleichgewichtsstörungen	total	

19R1*	Ep	w	81	infra	in NMR-Kontrolle zeigt sich ein Rezidivtumor	inkomplett	
19R2	Ep	w	100	infra	in NMR-Kontrolle zeigt sich ein Rezidivtumor	inkomplett	
19R3*	aE	w	107	infra	seit 10 Tagen erneut Nüchternbrechen	total	R+C. 23 Monate nach der Operation des 3. Rezidivs zeigt sich in einer MRT-Kontrolluntersuchung erneut ein Rezidiv, das unmittelbar darauf einer Gamma-Knife-Therapie unterzogen wird.
19R4	aE	w	137	infra	seit 1 Woche neurologisch Verschlechterung, im darauf durchgeführten MRT findet sich wieder ein großes Rezidiv	total	9 Monate später erneutes Rezidiv, es wird wieder eine Gamma-Knife-Therapie durchgeführt
19R5	aE	w	153	infra	seit 1 Woche, Erbrechen und Kopfschmerzen, in der Bildgebung zeigt sich ein Rezidivtumor	inkomplett	Unmittelbar nach der subtotalen Resektion findet eine Progression des Tumorstes statt, der nochmals fokal bestrahlt wird. 2 Monate nach der letzten Operation verstirbt das Kind. Follow up insgesamt 110 Monate
20P	Ep	m	12	infra	seit 1 Monat Erbrechen, seit 1 Woche zunehmende Bewusstseinstörung	inkomplett	C
20R1	aE	m	35	infra	2 Monate vor der Operation zeigt sich in einer MRT-Kontrolluntersuchung eine Tumor-Progression	inkomplett	R+C
20R2	aE	m	57	infra	2 Monate vor der Operation erneute Tumor-Progression	total	anschließend stereotaktische Bestrahlung und Erhaltungskemotherapie
20R3	aE	m	83	infra	nach Absetzen der Erhaltungskemotherapie rasche Tumor-Progression	inkomplett	anschließend palliative Chemotherapie, 6 Monate nach der Operation des 3. Rezidivs zeigt sich in NMR-Kontrolluntersuchung ein lokales Rezidiv sowie mindestens 1 neu aufgetretener Herd, Exitus 1 Monat später, Follow up insgesamt 77 Monate
21P	aE	w	90	infra	seit einigen Tagen Kopfschmerzen, seit 2 Monaten Nüchternbrechen	inkomplett	R+C, im Kontroll-CT 17 Monate nach der Operation subependymale Aussaat, 3 Monate später ein großer Rezidivtumor, außer einer Shunt-Implantation keine weiteren therapeutischen Maßnahmen, Exitus 24 Monate nach der Operation des Primärtumors

22P*	aE	m	26	infra	vermehrt Müdigkeit, Gleichgewichtsstörungen, Nüchternerebrechen	nicht bekannt	R
22R1	aE	m	118	infra	8 Monate vor der Operation fällt in der MRT-Untersuchung ein kleiner asymptomatischer Rezidivtumor auf	total	C, Follow up insgesamt 120 Monate (rezidiv-/progressionsfrei)
23P	aE	m	14	infra	seit 2 Wochen Erbrechen, zunehmende Müdigkeit, Gewichtsverlust und verminderte Spontanmotorik	inkomplett	nicht bekannt
24P	aE	m	28	supra	seit 10 Tagen linksseitige fokalmotorische Anfälle und Hemiparese links	inkomplett	C
24R	aE	m	41	supra	3 Monate vor der Operation wird ein Rezidiv festgestellt. Es folgt eine Chemotherapie, worauf sich der Rezidivtumor größenregredient zeigt.	total	R. 3 Monate nach der Operation des Rezidivs führt eine spinale Metastasierung mit Tumorknoten im gesamten Spinalkanal zu Blasenentleerungs- und anderen neurologischen Störungen und wenige Tage später zum Exitus. Follow up insgesamt 16 Monate
25P*	Ep	m	77	infra	in den letzten Wochen Kopfschmerzen und Erbrechen	inkomplett	R+C
25R	aE	m	113	infra	in MRT-Kontrolluntersuchung zeigt sich 3 Monate vor der Operation ein Rezidiv	inkomplett	4 Monate nach der Operation des Rezidivs finden sich in der Kontroll-Bildgebung neu aufgetretene zystische Raumforderungen. Mit zunehmender Tumorprogression kommt es zu klinischer Verschlechterung und schließlich zum Exitus. Follow up insgesamt 44 Monate
26P	Ep	m	24	infra	Kopfschiefhaltung und Gangunsicherheit seit 2-3 Wochen	inkomplett	R+C, in MRT-Kontrolle 20 Monate postoperativ Progression, welche im weiteren Verlauf aber rückläufig ist
26R	Ep	m	62	infra	neu aufgetretene Kontrastmittel anreichernde Struktur wird als Rezidiv gewertet	inkomplett	Erhaltungstherapie, 10 Monate postoperativ Tumorprogression, die durch eine individuelle Chemotherapie an einem weiteren Wachstum gehindert werden kann, dann aber wieder eine Größenprogression zeigt, Follow up insgesamt 56 Monate

27P	Ep	w	37	infra	seit 8 Monaten zunehmende Gangunsicherheit und morgendliches Erbrechen	total	R+C
27R	aE	w	65	infra	seit 2 Wochen ataktische Gangstörungen	total	7 Monate später wird ein neu aufgetretenes Rezidiv stereotaktisch bestrahlt. Der Befund ändert sich darauf nicht und zeigt sogar nach 7 weiteren Monaten eine massive Rezidivtumorvergrößerung. Der Tumor führt nach insgesamt 48 Monaten ab der Erstdiagnose zum Tod
28P	Ep	w	100	spinal	nächtliche Rückenschmerzen	total	Follow up 53 Monate (rezidiv-/progressionsfrei)
29P	mE	w	144	spinal	ischialgiforme Beschwerden seit 6 Mo.	inkomplett	Follow up 9 Monate (rezidiv-/progressionsfrei)
30P	Ep	m	83	infra	Kopfschmerzen seit 9 Monaten, seit 3 Wochen Gleichgewichtsstörungen und Nüchternbrechen	inkomplett	Das Kind verstirbt 1 Woche postoperativ an einer unstillbaren Duodenalblutung.
31PM	aE	w	173	spinal	links betonte Beinschwäche seit 1 Jahr, seit 2 Wochen massive Rückenschmerzen und ataktisches Gangbild, es liegt eine multiple spinale Metastasierung vor	inkomplett	R+C. 2 Jahre nach der Operation Progression einzelner Metastasen, welche sich auf eine individuelle Chemotherapie rückläufig zeigt. Follow up 35 Monate
32P	mE	w	184	spinal	Lumboischialgien seit 6 Monaten, seit einigen Wochen Blasenentleerungsstörungen	total	Follow up 35 Monate (rezidiv-/progressionsfrei)
33P	Ep	m	36	infra	seit 1 Monat starke Kopfschmerzen	inkomplett	R+C
33R1	Ep	m	44	infra	trotz Chemo- und Radiotherapie zeigt sich der Resttumor großenprogredivent	inkomplett	
33R2	Ep	m	47	infra	Ataxie und Schwindel infolge Rezidivwachstum	inkomplett	6 Monate später erneutes Rezidivwachstum und Exitus 11 Monate nach der Operation des 2. Rezidivs, Follow up insgesamt 22 Monate
34P	Ep	m	78	supra	seit 2 Jahren wiederholt Kopfschmerzen, seit 2 Wochen vermehrt Müdigkeit und Erbrechen	total	
34R	aE	m	88	supra	in der Wand der Resektionshöhle findet sich eine leicht großenprogredivente Schrankenstörung	total	R+C, Follow up 34 Monate (rezidiv-/progressionsfrei)
35P	Ep	w	21	infra	seit 4 Wochen Gangunsicherheit und Fallneigung	inkomplett	R, Follow up 113 Monate (rezidiv-/progressionsfrei)

36P	aE	w	8	supra	seit 2 Monaten Erbrechen, zuletzt ist der Säugling zunehmend apathisch	inkomplett	C. 14 Monate postoperativ zeigt sich in der MRT-Kontrolle ein Rezidivtumor, unter Fortführung der Chemotherapie ist dieser leicht größtenprogreredient.
36R	aE	w	27	supra		inkomplett ⁹	Postoperativ zeigt sich eine kleine als Resttumor zu wertende Kontrastmittel aufnehmende Struktur, die 9 Monate später total entfernt wird, anschließend Radiotherapie. Follow up insgesamt 56 Monate (rezidiv-/progressionsfrei)
37P	Ep	m	160	spinal	seit 2 Wochen starkes radikuläres Schmerzsyndrom	total	nicht bekannt
38P	aE	w	12	infra	seit 2 Wochen Erbrechen, Spielunlust	inkomplett	nicht bekannt
39P	Ep	w	14	infra	Kopfschiefhaltung nach rechts seit 1 Monat	inkomplett	nicht bekannt
40P	aE	m	144	infra	seit 1 Monat Kopfschmerzen, Erbrechen und Gleichgewichtsstörungen	inkomplett ⁹	R+C. 12 Monate postoperativ erfolgt die totale Entfernung des verbliebenen Resttumors. Follow up insgesamt 24 Monate (rezidiv-/progressionsfrei)

¹ P = Primärtumor, R = Lokalrezidiv, M = Metastase, PM = zum Zeitpunkt der Erstdiagnose lag bereits eine Metastasierung vor, * = wegen Mangels an Material bzw. auswärtiger Operation konnten nur die klinischen Daten ausgewertet werden

² mE = myxopapilläres Ependynom (Grad I nach WHO), Ep = Ependynom (Grad II nach WHO), aE = anaplastisches Ependynom (III)

³ Alter in Monaten zum Zeitpunkt der Operation

⁴ supra = supratentoriell, infra = infratentoriell

⁵ Unterscheidung nur in total und inkomplett (umfasst folgende Sachverhalte: subtotale und partielle Resektion, Biopsie, Operation bei bereits erfolgter Disseminierung). Die Einteilung erfolgt aufgrund des Operationsberichtes sowie der postoperativen Bildgebung (CT, NMR)

⁶ R = Radiotherapie, C = Chemotherapie

⁷ Follow up = Zeitraum zwischen Primärtumoroperation und DLS (date last seen) bzw. Exitus

⁸ zu Patient 14: Nur das durch die Nachresektion gewonnene Gewebe konnte histologisch untersucht werden. Da nach der partiellen Operation des Primärtumors keine Chemo-/Radiotherapie erfolgte und der Resttumor klinisch keine Veränderung aufwies, wurden die Ergebnisse der histologischen Untersuchung auf den Primärtumor angewandt. Im Rahmen der Follow-up-Untersuchung wurde das Resektionsausmaß des Primärtumor wegen der erfolgten Nachresektion als total angesehen.

⁹ zu Patient 18R, 36R und 40P: Im Rahmen der Follow-up-Untersuchung wurde das Resektionsausmaß des Rezidivtumors (18R, 36R) und des Primärtumors (40P) wegen der erfolgten Nachresektion als total angesehen.

3 Ergebnisse

Die klinischen Daten der insgesamt 40 Patienten sind in Tabelle Nr. 1 auf den Seiten 26 mit 32, die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen in tabellarischer Form im Anhang (Kapitel 7.2) zusammengefasst.

3.1 Klinische Daten

Dieser Arbeit liegen die klinischen Daten sowie 58 operativ gewonnene Tumorproben von 40 Patienten (19 weiblich, 21 männlich) zugrunde, die im Kindesalter (1. bis einschließlich 16. Lebensjahr) an einem Ependyom erkrankten. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose lag zwischen 8 Monaten und 15 4/12 Jahren (Mittelwert: 61,3 Monate, Median: 41 Monate). Die histologische Typisierung und Graduierung entsprechend der Klassifikation von Tumoren der WHO (Kleihues und Cavenee 2000) ergab für die Primärtumoren 3 (7,5%) myxopapilläre Ependymome (Grad I nach WHO), 16 (40%) Ependymome (Grad II nach WHO), sowie 21 (52,5%) anaplastische Ependymome (Grad III nach WHO) (Abbildung Nr. 3).

Die Altersverteilung weist einen Häufigkeitsgipfel im 2. Lebensjahr auf. Ependymome (WHO Grad II) (E (II)) und anaplastische Ependymome (WHO Grad III) (aE (III)) kommen insbesondere in den ersten 7 Lebensjahren vor, myxopapilläre Ependymome (WHO Grad I) (mE (I)) treten erst ab dem 12. Lebensjahr auf (Abbildung Nr. 6). 45% (18/40) der Ependymome werden in den ersten 3 Lebensjahren, 57,5% (23/40) in den ersten 4 Lebensjahren diagnostiziert.

Die Primärtumoren zeigen folgende Lokalisationsverteilung: 9 (22,5%) supratentoriell, 24 (60,0%) infratentoriell, 7 (17,5%) spinal (Abbildung Nr. 4). Alle supratentoriellen Ependymome kommen in den ersten 7 Lebensjahren vor, infratentorielle Ependymome während des gesamten Kindesalters, sie weisen jedoch eine deutliche Häufung im 2.-4. Lebensjahr auf. Spinale Ependymome treten erst ab dem 8. Lebensjahr auf (Abbildung Nr. 7). 8 der 9 supratentoriellen Ependymome sind aE (III), aE (III) überwiegen folglich im supratentoriellen Kompartiment deutlich. 13 der 24 infratentoriellen Ependymome besitzen den Tumorgrad II, 11 den Tumorgrad III nach WHO. Die nach dem Tumorgrad differenzierte Lokalisationsverteilung ist in Abbildung Nr. 5 dargestellt.

In 30,8% (12/39) konnte der Primärtumor total entfernt werden, entsprechend erfolgte in 69,2% (27/39) eine inkomplette Resektion. Das Resektionsausmaß des Primärtumors

eine Patienten (Nr. 22) ist nicht bekannt. Eine totale Resektion war bei mE (I) in 33,3% (1/3) und bei E (II) in 43,8% (7/16) möglich, bei aE (III) in 20,0% (4/20). Eine totale Resektion erfolgte bei supratentoriellen Ependymomen in 33,3% (3/9), bei infratentoriellen Ependymomen in 26,1% (6/23), bei spinalen Ependymomen in 42,9% (3/7). 31 der 40 Primärtumoren (2 mE (I), 13 E (II), 16 aE (III)) konnten immunhistochemisch untersucht werden.

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose wiesen 3 Patienten eine multiple spinale Metastasierung auf (Patient Nr. 5: mE (I), Patient Nr. 8: supratentorielles aE (III), Patient Nr. 31: spinales aE (III)).

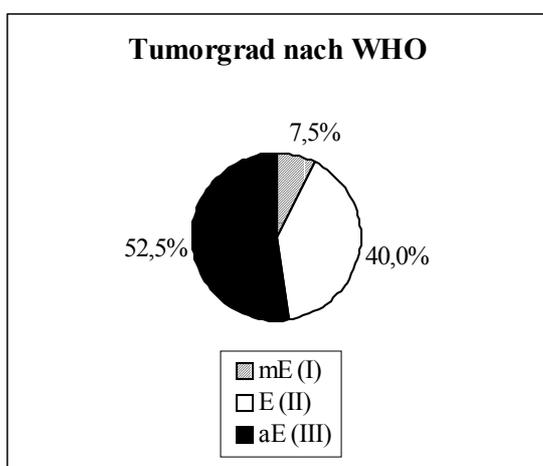


Abbildung Nr. 3: Häufigkeitsverteilung der Tumorgrade nach WHO (Primärtumoren)

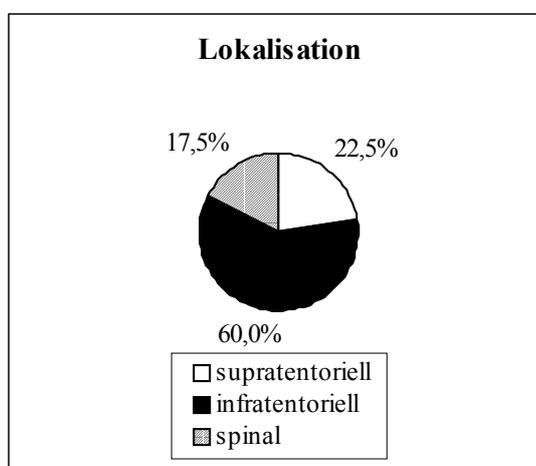


Abbildung Nr. 4: Häufigkeitsverteilung der Lokalisationen der Primärtumoren

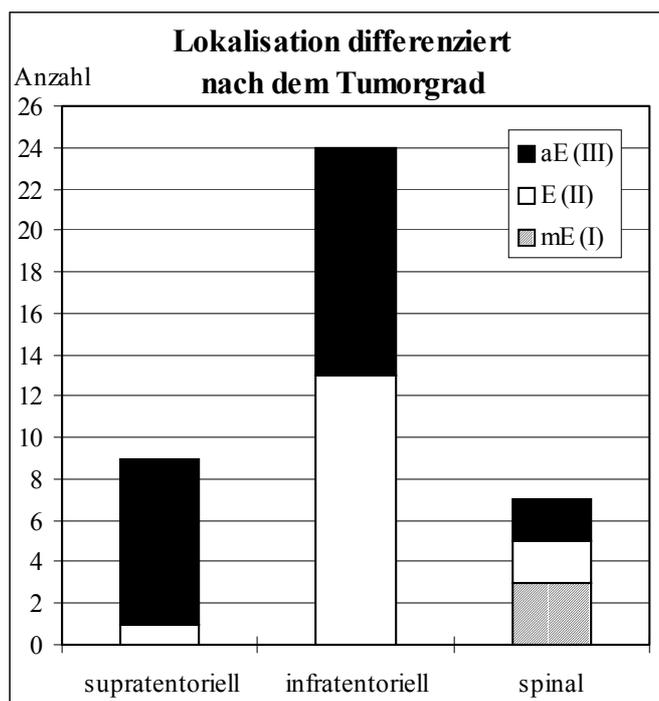


Abbildung Nr. 5: Lokalisationsverteilung der Primärtumoren differenziert nach dem Tumorgrad nach WHO

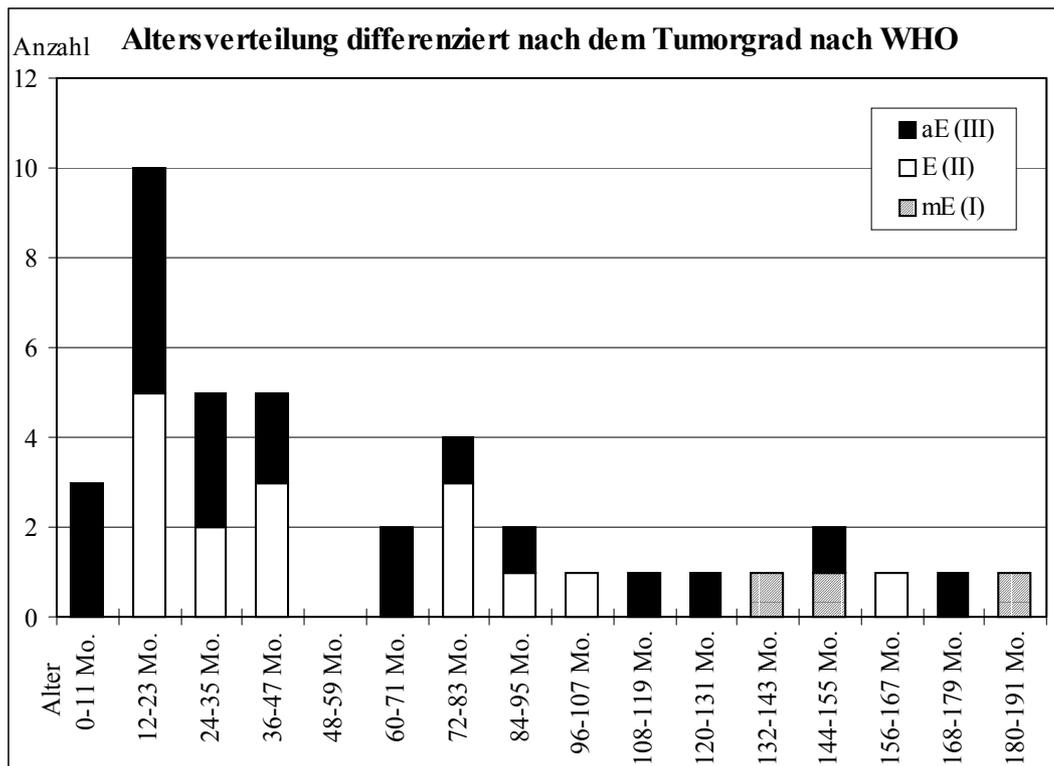


Abbildung Nr. 6: Altersverteilung der kindlichen Ependymome (Primärtumoren) differenziert nach dem Tumorgrad nach WHO

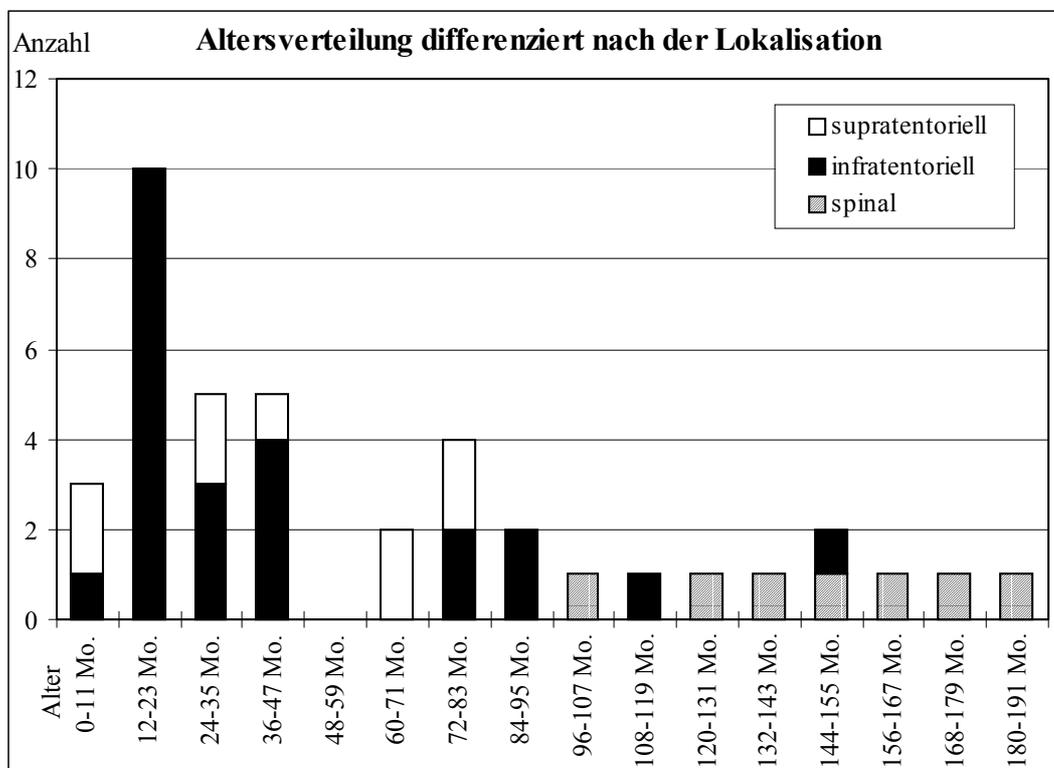


Abbildung Nr. 7: Altersverteilung der kindlichen Ependymome (Primärtumoren) differenziert nach der Lokalisation

Der postoperative Verlauf der Tumorerkrankung konnte von 5 Patienten (Patienten Nr. 3, 23, 37, 38 und 39) nicht in Erfahrung gebracht werden. 2 Kinder (Patienten Nr. 4 und 32) verstarben eine bzw. zwei Wochen nach der Operation des Primärtumors. Das Schicksal der verbleibenden 33 Patienten konnte über 6 bis 163 Monate verfolgt werden (Mittelwert: 51,8 Monate, Median: 40 Monate).

21 Patienten erkrankten im Beobachtungszeitraum an insgesamt 48 Rezidivereignissen. Das mittlere Intervall zwischen Primärtumor und dem ersten Rezidivereignis lag bei 22,5 Monaten (Median: 20 Monate, Minimum: 8 Monate, Maximum: 84 Monate). Das erste Rezidiv trat bei fast allen Patienten innerhalb von 36 Monaten nach dem Primärtumor auf. Lediglich bei Patient Nr. 22 lag ein Intervall von 84 Monaten vor. Graduierung und Lokalisation der Primärtumoren dieser 21 Patienten verteilen sich folgendermaßen: 1 mE (I), 10 E (II), 10 aE (III) – 6 supratentoriell, 12 infratentoriell, 3 spinal.

38 der 48 (79,2%) Rezidivereignisse stellten sich als Lokalrezidiv dar, in 3 weiteren Fällen (6,3%) lag eine Metastasierung vor, 7 Patienten (14,6%) wiesen sowohl ein Lokalrezidiv als auch eine Metastasierung auf. Die Patienten-bezogene Zuteilung der Anzahl der Rezidivereignisse geht aus der Tabelle Nr. 2 hervor.

Anzahl der Rezidivereignisse	Anzahl der Patienten	Patienten-Nr.
1	9	1, 8, 17, 18, 21, 22, 31, 34, 36
2	6	5, 11, 24, 25, 26, 27
3	2	9, 33
4	2	13, 20
5	1	15
6	0	
7	0	
8	1	19

Tabelle Nr. 2: Zuteilung der Anzahl der Rezidivereignisse zu den Patienten

In 15 Fällen konnte keine Graduierung des Rezidivtumors durchgeführt werden, da entweder keine oder chemo-/strahlentherapeutische Maßnahmen erfolgten und der Rezidivtumor nicht operativ entfernt wurde. Die Graduierung nach WHO der verbleibenden 33 operativ therapierten Rezidivtumoren verteilt sich wie folgt: 2 (6,1%) mE (I), 6 (18,2%) E (II), 25 (75,8%) aE (III). Im Vergleich zur Häufigkeitsverteilung

der Tumorgrade bei Primärtumoren nimmt der Tumorgrad III bei Rezidivtumoren zu (52,5% bei Primärtumoren, 75,8% bei Rezidivtumoren), während E (II) weniger häufig erscheinen (40,0% bei Primärtumoren, 18,2% bei Rezidivtumoren). 27 der 33 operativ entfernten Rezidivtumoren konnten immunhistochemisch untersucht werden: 2 mE (I), 5 E (II), 20 aE (III).

Die Rezidivtumoren unterscheiden sich in der Häufigkeitsverteilung der Lokalisation (18,7% (9/48) supratentoriell, 66,7% infratentoriell (32/48), 14,6% (7/48) spinal) sowie im erzielten Resektionsausmaß (27,3% (9/33) total, 72,7% (24/33) inkomplett) nicht wesentlich von den Primärtumoren.

15 der 33 Patienten, bei denen der klinische Verlauf der Tumorerkrankung verfolgt werden konnte, verstarben im Beobachtungszeitraum. Die Überlebenszeit dieser Patienten beträgt im Mittel 40 Monate (Median: 34 Monate, Minimum: 6 Monate, Maximum: 110 Monate).

3.2 p53-Akkumulation

Der immunhistochemische Nachweis einer p53-Akkumulation gelang in 56,9% (33/58) der untersuchten kindlichen Ependymome. Die p53-Immunreaktivität erfasst die Zellkerne in einem diffusen, teils granulären Muster, wobei die Intensität der Anfärbung von einer Tumorzelle zur anderen in beträchtlichem Maße variiert (siehe Abbildung Nr. 9 a+b). Bei der Auswertung wurden fraglich oder sehr schwach positive Zellen nicht berücksichtigt. Fälle mit nur vereinzelt positiven Zellen (<1%) werden als negativ bewertet. p53-positive Zellen finden sich meist regelmäßig über den gesamten Tumor verteilt, in wenigen Fällen kommt eine Anhäufung immunpositiver Zellen insbesondere in zelldichten Arealen vor.

Während mit + (<5% positive Zellen) bewertete Tumoren in allen Tumorgraden vorkommen, finden sich stärker positive Fälle (++ = 5-10% und +++ = >10% positive Tumorzellen) nur in aE (III). Eine p53-Akkumulation findet sich in 22,2% in E (II) und in 75,0% in aE (III), außerdem in 2 der 4 untersuchten mE (I). In Rezidivtumoren lässt sich eine p53-Akkumulation mit 63,0% (17/27) etwas häufiger als in Primärtumoren mit 51,6% (16/31) nachweisen. Dies spiegelt das vermehrte Auftreten von aE (III) und deren eben geschilderte häufigere Immunpositivität für p53 in der Gruppe der Rezidivtumoren wider. Die Verteilung p53-positiver Fälle differenziert nach dem

Tumorgrad nach WHO sowie dem Tumorstatus (Primär- bzw. Rezidivtumor) geht aus Abbildung Nr. 8 und Tabelle Nr. 3 hervor.

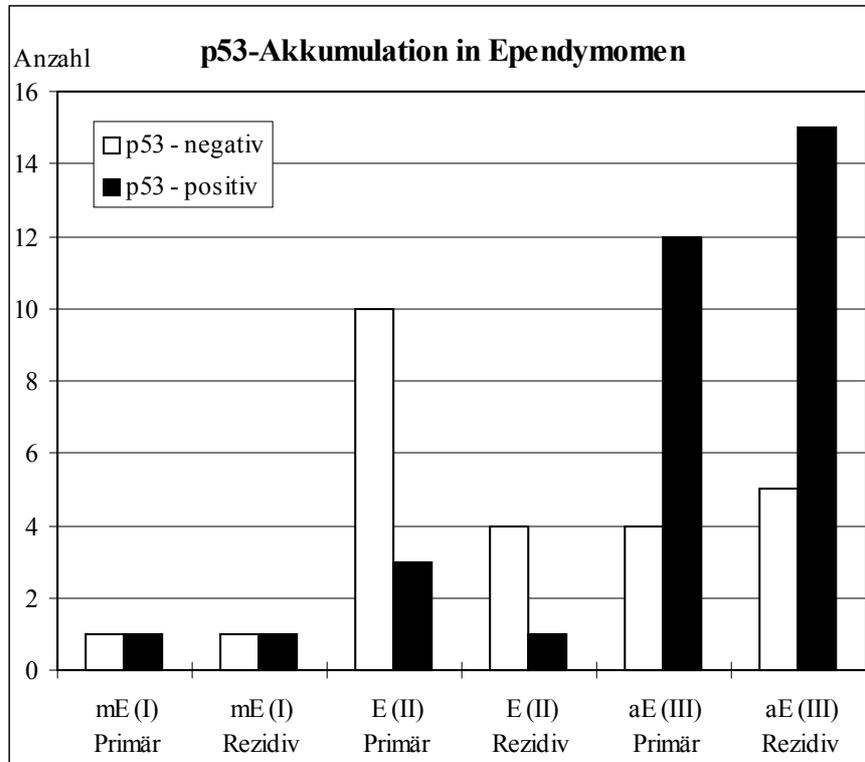


Abbildung Nr. 8: p53-Akkumulation in Ependymomen des Kindesalters

Tumorgrad nach WHO		p53-negativ	p53-positiv				
			gesamt	in %	+	++	+++
mE (I) Primär	n=2	1	1	50,0%	1	0	0
mE (I) Rezidiv	n=2	1	1	50,0%	1	0	0
E (II) Primär	n=13	10	3	23,1%	3	0	0
E (II) Rezidiv	n=5	4	1	20,0%	1	0	0
aE (III) Primär	n=16	4	12	75,0%	6	2	4
aE (III) Rezidiv	n=20	5	15	75,0%	8	4	3
gesamt	n=58	25	33	56,9%	20	6	7

Tabelle Nr. 3: Verteilung der p53-Immunpositivität

+ = <5%, ++ = 5-10%, +++ = >10% der Tumorzellen sind positiv für p53

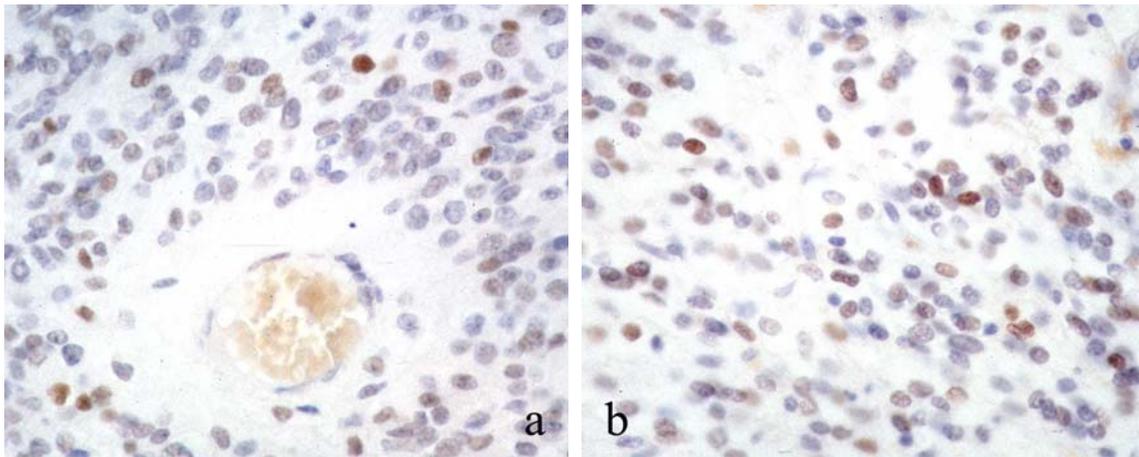


Abbildung Nr. 9: p53-Akkumulation in Ependymomen des Kindesalters
9a Patient Nr. 9R2, p53-Positivität: ++ (5-10%), 400-fache Vergrößerung
9b Patient Nr. 24P, p53-Positivität: +++ (>10%), 400-fache Vergrößerung

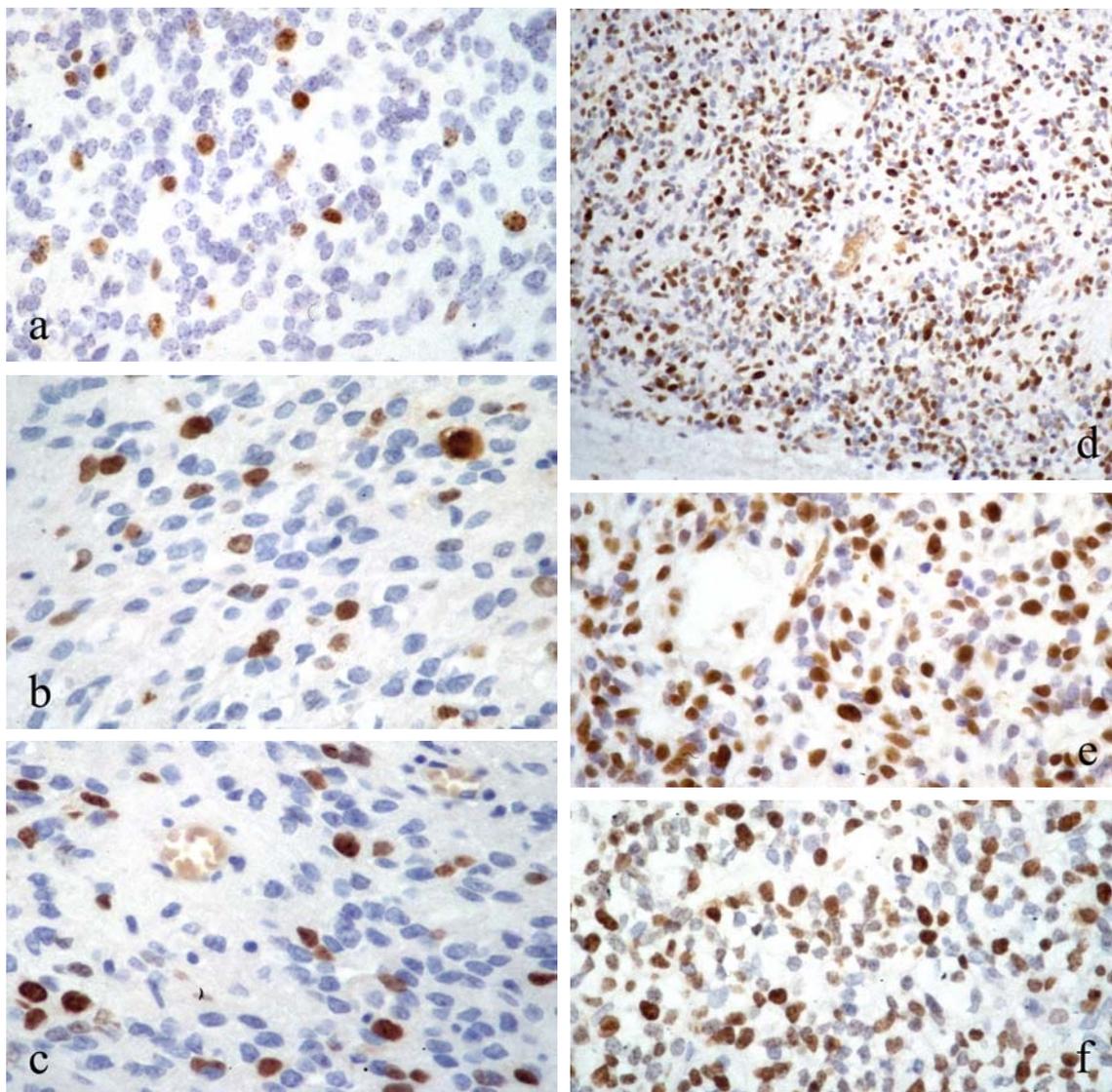


Abbildung Nr. 10: Der Proliferationsmarker MIB-1 (Erläuterungen siehe nachfolgende Seite Nr. 40)

3.3 Der MIB-1 Labeling Index

Die Immunpositivität MIB-1 markierter Zellen erfasst die Zellkerne in leicht unterschiedlicher Intensität, was bei der Auswertung nicht berücksichtigt wird. Der prozentuale Anteil MIB-1 positiver Zellen an der Gesamtheit der 1000 bewerteten Zellen am Ort der höchsten Immunpositivität wird als MIB-1 Labeling Index (MIB-1 LI) angegeben. Es finden sich meist im gesamten Tumor diffus verstreut MIB-1 positive Zellen. Durch Verdichtungen markierter Zellen zeigen sich in der Regel zusätzlich im Vergleich zum Tumorrestgewebe Areale mit fokal stark erhöhter Proliferationsaktivität. In diesen Arealen ist häufig auch eine Zunahme der Zelldichte anzutreffen. Tumorproben mit einer hohen Proliferationsaktivität (MIB-1 LI >20%) zeigen oft bei insgesamt erhöhter Zelldichte ein weniger fokal betontes, sondern mehr homogen verteiltes Auftreten MIB-1 immunpositiver Zellen (siehe Abbildung Nr. 10 a-f).

In allen 57 mit dem Antikörper MIB-1 untersuchten Tumorproben ependymaler Neoplasien des Kindesalters sind positive Zellen anzutreffen. Der MIB-1 LI variiert innerhalb einer weiten Streubreite von 1,4% bis 63,3% (Mittelwert: 21,8%, Median: 19,8%, Standardabweichung: 15,4%). In nur 26,3% (15/57) der Fälle findet sich ein MIB-1 LI unter einem Wert von 10%, wogegen 73,7% der ependymalen Tumoren einen MIB-1 LI $\geq 10\%$ zeigen. aE (III) weisen einen höheren mittleren MIB-1 LI als E (II) auf (27,8% bei aE (III) und 12,8% bei E (II)). Dies wird auch bei Anwendung der Grenze des MIB-1 LI von 10% deutlich. Während Tumoren des Tumorgrades II in 47,1% (8/17) der Fälle einen MIB-1 LI unterhalb dieser Grenze aufweisen, sind es bei aE (III) nur 8,3% (3/36). Aus der Abbildung Nr. 11, die die Verteilung der MIB-1 LI Einzelwerte veranschaulicht, geht hervor, dass neben der bereits erwähnten weiten Streubreite der Einzelwerte auch ein großer Überschneidungsbereich der Indices von E (II) und aE (III) besteht.

Eine Auflistung von Mittelwert, Median, Minimum, Maximum sowie der Standardabweichung differenziert nach Tumorgrad und Tumorstatus (Primär-/Rezidivtumor) erfolgt in Tabelle Nr. 4.

Erläuterungen zu **Abbildung Nr. 10** (siehe vorangehende Seite Nr. 39):

Darstellung proliferierender Zellen mit dem Antikörper MIB-1

10a Patient Nr. 14P, MIB-1 Labeling Index 16,4%, 400-fache Vergrößerung

10b + 10c Patient Nr. 10P, MIB-1 Labeling Index 19,1%, 400-fache Vergrößerung

10d + 10e Patient Nr. 36P, MIB-1 Labeling Index 38,8%, d: 200-fache, e: 400-fache Vergrößerung

10f Patient Nr. 13R2, MIB-1 Labeling Index 38,9%, 400-fache Vergrößerung

Tumorgrad nach WHO		Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standardabweichung
mE (I) alle	n=4	5,9%	5,5%	2,9%	9,7%	2,8%
mE (I) Primär	n=2	7,8%	7,8%	5,9%	9,7%	2,7%
mE (I) Rezidiv	n=2	4,0%	4,0%	2,9%	5,0%	1,5%
E (II) alle	n=17	12,8%	10,3%	1,4%	32,9%	10,4%
E (II) Primär	n=12	12,4%	9,1%	1,6%	32,9%	11,1%
E (II) Rezidiv	n=5	13,6%	18,3%	1,4%	21,9%	9,9%
aE (III) alle	n=36	27,8%	26,5%	2,3%	64,3%	14,9%
aE (III) Primär	n=16	26,0%	26,5%	4,2%	57,7%	11,9%
aE (III) Rezidiv	n=20	29,3%	27,4%	2,3%	64,3%	17,1%
alle (I, II, III)	n=57	21,8%	19,8%	1,4%	64,3%	15,4%

Tabelle 4: MIB-1 Labeling Index bei Ependymomen des Kindesalters differenziert nach dem Tumorgrad nach WHO und dem Tumorstatus (Primär- bzw. Rezidivtumor)

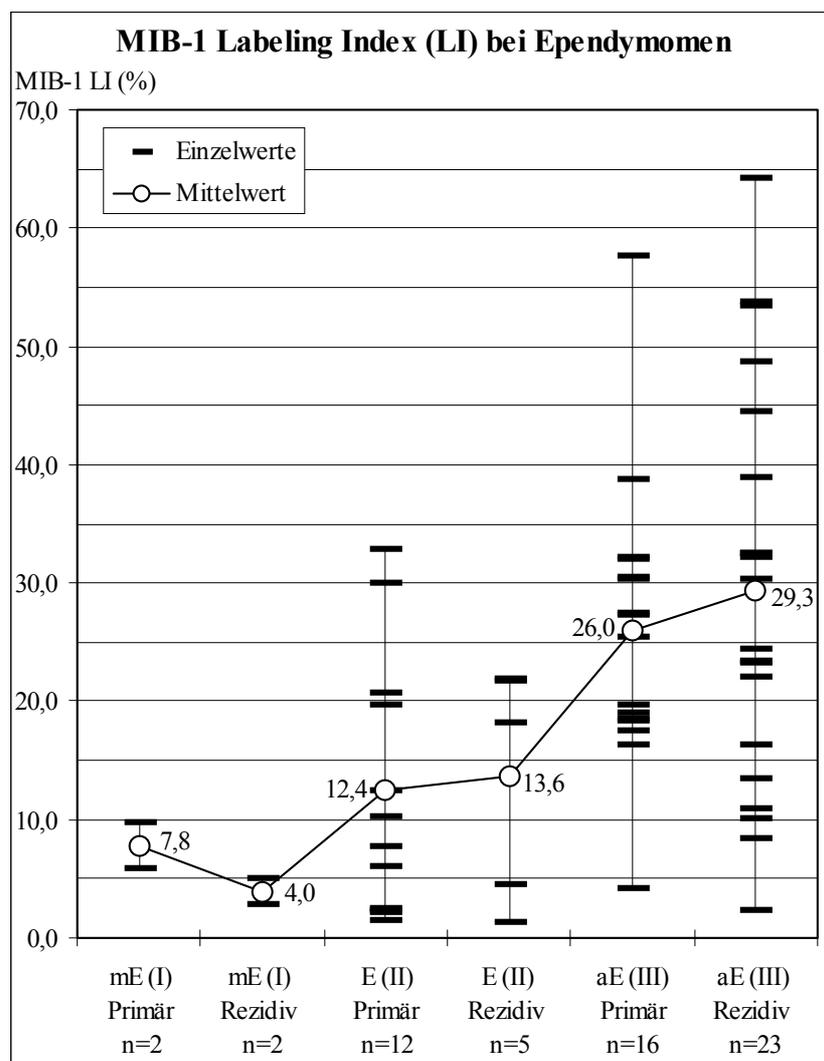


Abbildung Nr. 11: Darstellung der Einzelwerte des MIB-1 Labeling Index bei Ependymomen des Kindesalters differenziert nach Tumorgrad und Tumorstatus (Primär- bzw. Rezidivtumor)

3.4 EMA-Expression

In den untersuchten Gewebeproben ependymaler Tumoren des Kindesalters liegt in 84,5% (49/58) eine EMA-Expression vor. Die wenigen negativen Fälle verteilen sich bei den Primärtumoren wie folgt:

1 von 2 (50%) mE (I): Patient Nr. 29P

3 von 13 (23,1%) E (II): Patient Nr. 27P, 28P, 39P

3 von 16 (18,6%) aE (III):..... Patient Nr. 2P, 8P, 10P

In der Gruppe der Rezidivtumoren sind negativ:

0 von 2 (0%) mE (I)

1 von 5 (20%) E (II):..... Patient Nr. 26R

1 von 20 (5%) aE (III):..... Patient Nr. 24R

Die EMA-Expression weist ein charakteristisches Verteilungsmuster auf. Zum einen findet sich eine kräftige Immunreaktivität an der luminalen Oberfläche von Zellmembranen. Dies betrifft echte ependymale Rosetten ebenso wie eine möglicherweise vorhandene ependymal gestaltete Tumoroberfläche (Abbildung 12a und b), sowie die den myxoiden Hohlräumen zugewandten Zellmembranen myxopapillärer Ependymome (WHO Grad I). Selten exprimieren auch Zellen solider Tumoranteile an ihrer Zellmembran EMA (Abbildung 12f). Zum anderen ist oft eine intrazytoplasmatische EMA-Expression anzutreffen. Diese zeigt sich am häufigsten in Form unregelmäßig begrenzter, perinukleär lokalisierter Punkte (Abbildung 12c), seltener als großflächige diffuse Immunpositivität (Abbildung 12e) oder in Vakuolenartiger Ringform (Abbildung 12d). Zwischen den genannten intrazytoplasmatischen Expressionsmustern existieren nicht selten fließende Übergänge.

Die intrazytoplasmatische Immunreaktivität ist in der Regel nicht homogen über den gesamten Tumor verteilt. Es existieren meist Areale mit verminderter und vermehrter Immunpositivität, letztere insbesondere in Tumoranteilen mittlerer und niedriger Zelldichte. Zu ependymalen Strukturen zählende Zellen weisen keine intrazytoplasmatische, häufig jedoch die bereits erwähnte luminal Membranpositivität auf.

Das Vorliegen einer EMA-Expression weist eine Graduierungsgrad überschreitende Regelmäßigkeit auf, jedoch ergeben sich vom Tumorgrad abhängige Unterschiede im Expressionsmuster. Während sich bei E (II) in 44,4% (8/18) eine Oberflächenpositivität

findet, liegt sie bei aE (III) in 66,7% (24/36) vor. Auch eine intrazytoplasmatischen Expression kommt in aE (III) mit 80,6% (29/36) häufiger als in E (II) mit 66,7% (12/18) vor. Unterschiede ergeben sich hierbei insbesondere in der ringförmigen Erscheinungsform, die bei aE (III) in 25,0% (9/36), bei E (II) nur in 5,6% (1/18) anzutreffen ist. Punktförmige sowie diffus intrazytoplasmatische Expression treten bei aE (III) ebenfalls häufiger auf, jedoch stellt sich der Unterschied zwischen E (II) und aE (III) weniger deutlich dar. Primär- und Rezidivtumoren zeigen keine Unterschiede sowohl in der Häufigkeit als auch im Verteilungsmuster der EMA-Expression.

Die vier untersuchten mE (I) sind durch das Fehlen einer intrazytoplasmatischen EMA-Expression gekennzeichnet.

Die Verteilung der EMA-Expression geht aus der Tabelle Nr. 5 hervor.

Tumorgrad nach WHO	EMA-Expression		Expressionsmuster der Positivität				
	negativ	positiv	Zell- oberfläche	intrazytoplasmatisch			gesamt
			punktuell	diffus	ringförmig		
mE (I) Primär n=2	1	1	1	0	0	0	0
mE (I) Rezidiv n=2	0	2	2	0	0	0	0
E (II) Primär n=13	3	10	6	5	6	1	9
E (II) Rezidiv n=5	1	4	2	1	3	0	3
aE (III) Primär n=16	3	13	9	7	8	4	13
aE (III) Rezidiv n=20	1	19	15	7	15	5	16
gesamt n=58	9	49	35	20	32	10	41

Tabelle Nr. 5: EMA-Expression in Ependymomen des Kindesalters. In den Spalten, die dem Expressionsmuster der Positivität zugeordnet sind, sind Mehrfachnennungen möglich. In der letzten Spalte („gesamt“) wird das Vorliegen einer intrazytoplasmatischen Expression allgemein beurteilt.

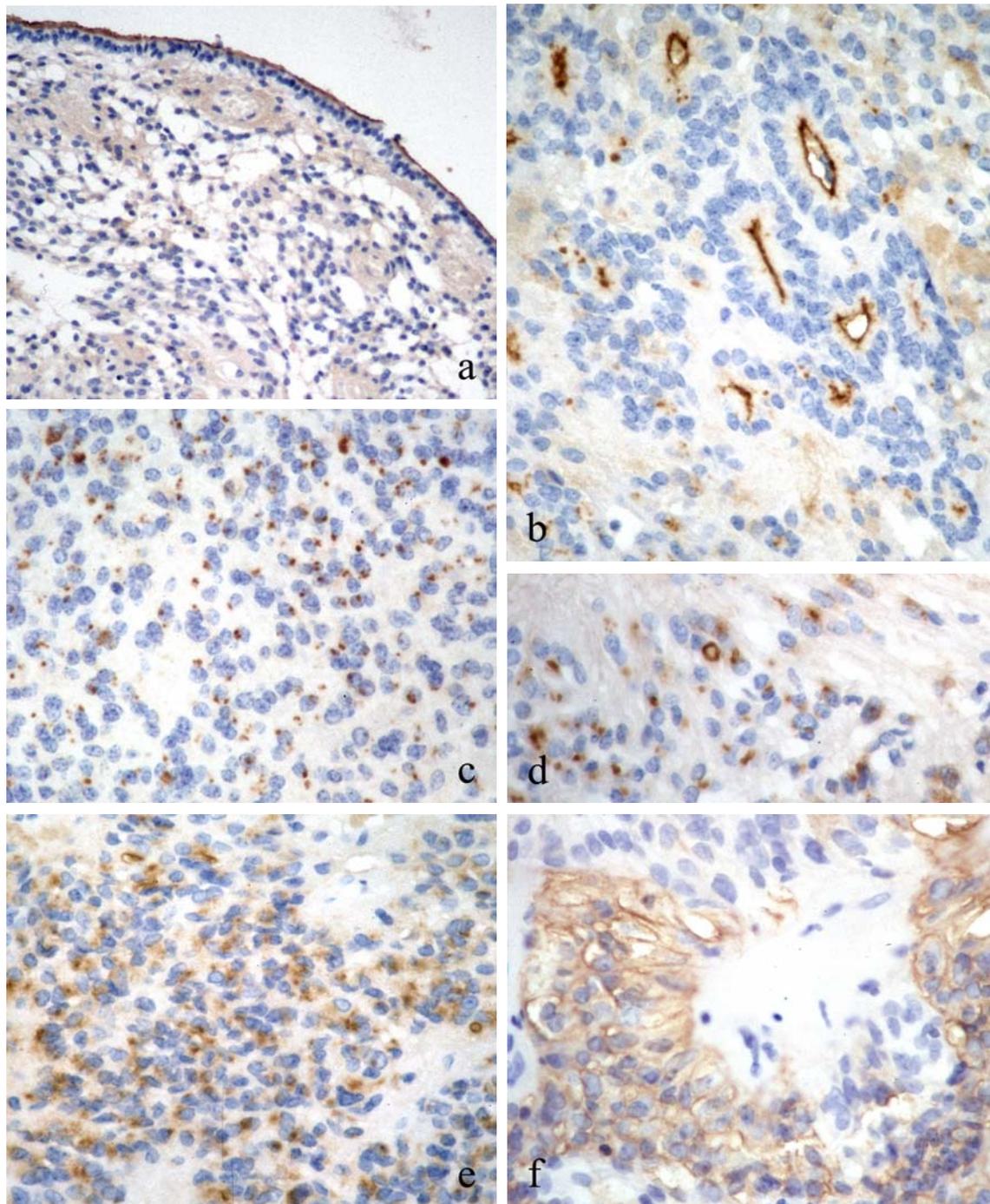


Abbildung Nr. 12: EMA-Expression in Ependymomen:

12a an ependymalen Oberflächen von Ependymomen (Patient Nr. 17R, 200-fache Vergrößerung),

12b an der luminalen Oberfläche von echten ependymalen Rosetten (Patient Nr. 22R, 400-fache Vergrößerung),

12c intrazytoplasmatisch in Form unregelmäßig begrenzter Punkte (Patient Nr. 14P, 400-fache Vergrößerung) sowie

12d in Ringform (Patient Nr. 22R, 400-fache Vergrößerung).

12e Fließende Übergänge von der Punktform zu einem eher diffus großflächigen intrazytoplasmatischen Expressionsmusters (Patient Nr. 9R2, 400-fache Vergrößerung).

12f Oberflächenexpression von EMA auch in soliden Tumorseiten (Patient Nr. 13R1, 400-fache Vergrößerung).

3.5 Das Mikroglia-/Makrophagen-System

Die Zellen des Mikroglia-/Makrophagen-Systems werden mit den in dieser Arbeit verwendeten Antikörpern folgendermaßen markiert: **Ki-M1P**/anti-CD11c erfasst als Panmakrophagenmarker ramifizierte, amöboide und perivaskuläre MG sowie Makrophagen gleichermaßen. **Anti-HLA-DR** markiert insbesondere amöboide MG und Makrophagen, ramifizierte MG wird zuweilen schwach angefärbt. Mit dem Antikörper **KP1**/anti-CD68 werden besonders kräftig Makrophagen, mit geringerer Sensitivität auch amöboide und ramifizierte MG dargestellt.

3.5.1 Mikroglia-/Makrophagen-Verteilung

Die MG/Makrophagen-Verteilung ist sowohl innerhalb eines Tumors wie auch im Vergleich der bewerteten Tumoren eines Tumorgades nach WHO sehr heterogen. In ein und demselben Tumor liegen meist Areale mit hoher und Areale mit geringer MG/Makrophagen-Zelldichte vor. Diese Areale lassen sich Parametern wie Tumorzelldichte und Differenzierung des Tumors oder fokal erhöhtem Proliferationsverhalten nicht zuordnen.

Häufig anzutreffen ist eine septale Anordnung insbesondere der amöboiden MG und der Makrophagen, hervorgerufen durch die offensichtlich bevorzugte Lokalisation dieser Zellen in der Nähe von Gefäßen. Besonders deutlich tritt dies durch die Markierung mit anti-HLA-DR in Erscheinung. Ebenso sind in Gefäßnähe gelegentlich größere Ansammlungen von Makrophagen vorzufinden. Ramifizierte MG scheint Ependymome oftmals wie ein feines Netzwerk zu durchziehen. Obligat ist die Abgrenzung nekrotischer Areale durch Makrophagen, in geringerem Umfang auch durch amöboide MG.

Die differenzierte Betrachtung der verschiedenen Zellpopulationen des MG/Makrophagen-Systems ergibt eine für die Primärtumoren einheitliche Zusammensetzung in den erwähnten Arealen hoher bzw. niedriger MG/Makrophagen-Zelldichte. Während in Arealen niedriger MG/Makrophagen-Zelldichte ramifizierte MG das Bild beherrscht, nimmt der Anteil amöboider MG und der Makrophagen in Arealen hoher Dichte zu. Der prozentuale Anteil ramifizierter und amöboider MG sowie der Makrophagen in Primärtumoren in Arealen hoher und niedriger MG/Makrophagen-Zelldichte ist in Abbildung Nr. 13 a-d für E (II) und aE (III) getrennt dargestellt, ein

Unterschied in der MG/Makrophagen-Verteilung zwischen den Tumorgraden II und III bei Primärtumoren besteht jedoch nicht. In Hinblick auf die ermittelte Zellanzahl in Arealen niedriger und hoher MG/Makrophagen-Dichte existiert in E (II) und aE (III) jeweils ein Überschneidungsbereich von etwa 60 MG/Makrophagen pro 3 HPF (high power fields). In diesem Überschneidungsbereich wurden die morphometrisch erzielten Ergebnisse entsprechend der prozentualen Verhältnisse der Gruppe hoher bzw. niedriger MG/Makrophagen-Dichte zugeordnet.

In 9 Gewebeproben (1 E (II), 8 aE (III)) waren größere, nicht durch den Tumor infiltrierte Anteile von Hirngewebe enthalten. Dem Verteilungsmuster in Arealen niedriger MG/Makrophagen-Dichte in Tumoren entsprechende Verhältnisse findet man auch im Tumor-entfernten Hirngewebe dieser Gewebeproben. In 3 Gewebeproben anaplastischer Ependymome (WHO Grad III) zeigte sich im unmittelbar an den Tumor angrenzenden Hirngewebe eine auffällige Verdichtung von MG/Makrophagen. Das hier vorliegende Verteilungsmuster entspricht dem in Arealen hoher MG/Makrophagen-Dichte in Primärtumoren (siehe Abbildung Nr. 13 e+f).

Auch in Rezidivtumoren liegt eine beträchtliche Heterogenität bezüglich der MG/Makrophagen-Zelldichte vor. Auch wenn wiederum die beiden beschriebenen Verteilungsmuster (1. Prädominanz der ramifizierten MG, 2. Überwiegen der amöboiden MG und der Makrophagen) anzutreffen sind, lassen sich diese nicht wie bei Primärtumoren den unterschiedlichen Dichteverhältnissen der MG/Makrophagen zuordnen.

In der Gesamtzahl aller MG/Makrophagen unterscheiden sich Primärtumoren der Tumorgrade II und III in den Arealen hoher MG/Makrophagen-Dichte nicht (durchschnittlich 311,9 Zellen/3HPF in E (II) und 317,4 Zellen/3HPF in aE (III)). In den Arealen niedriger Dichte sind in E (II) mehr Zellen des MG/Makrophagen-Systems anzutreffen als in aE (III) (180,3/3HPF in E (II), 135,9/3HPF in aE (III)). In der Gruppe der Rezidivtumoren existiert kein Unterschied bezüglich der MG/Makrophagen-Gesamtzellzahl in Arealen niedriger Dichte (durchschnittlich 225,6/3HPF in E (II), 209,3/3HPF in aE (III)), in Arealen hoher Dichte finden sich mehr MG/Makrophagen in aE (III) (durchschnittlich 210,7/3HPF in E (II), 333,0/3HPF bei aE (III)).

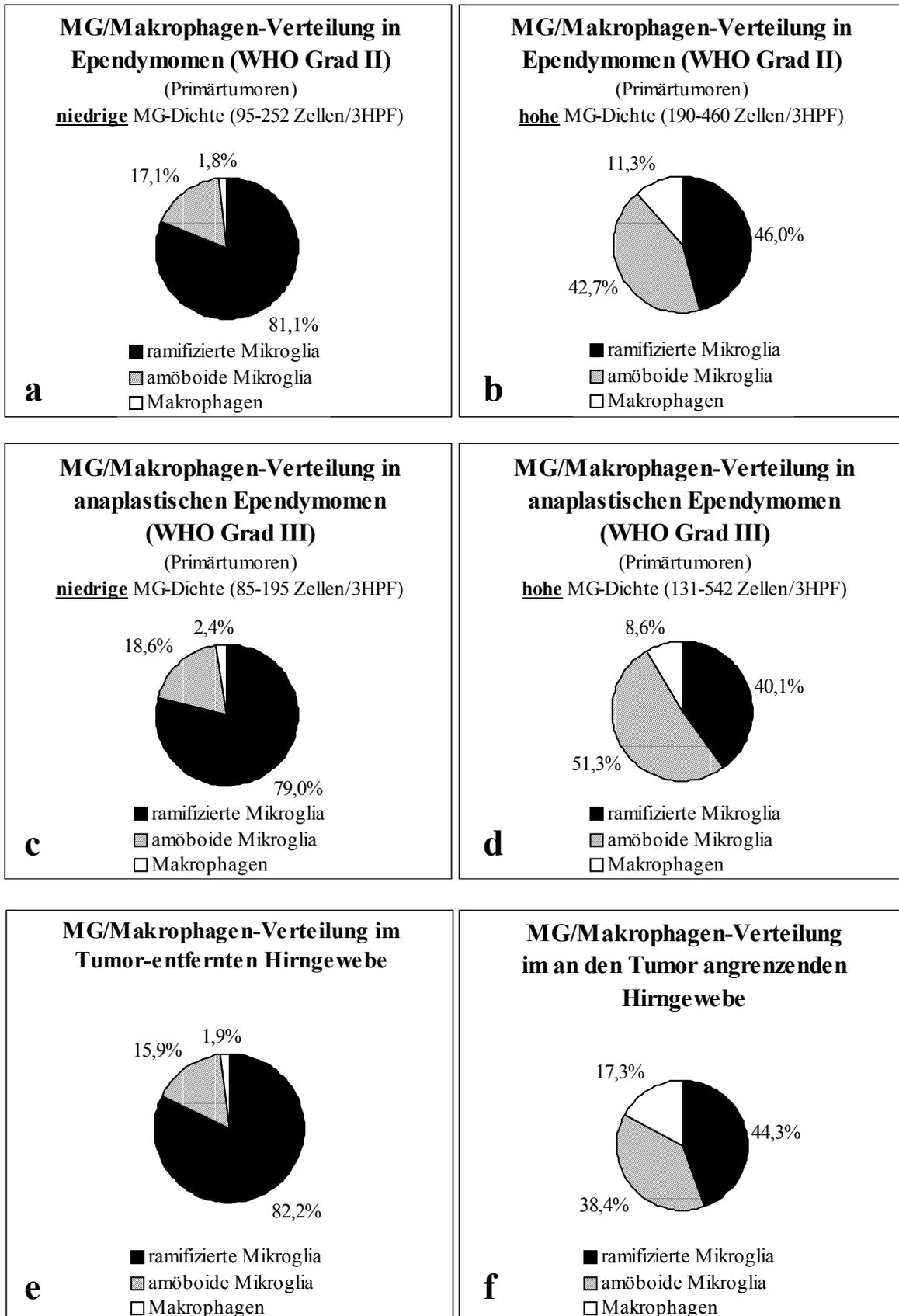


Abbildung Nr. 13: Mikroglia/Makrophagen-Verteilung in Ependymomen (WHO Grad II) in Arealen niedriger (**13a**) und hoher (**13b**) MG/Makrophagen-Dichte, in anaplastischen Ependymomen (WHO Grad III) in Arealen niedriger (**13c**) und hoher (**13d**) MG/Makrophagen-Dichte sowie im Tumor-entfernten (**13e**) und im an den Tumor angrenzenden (**13f**) Hirngewebe.

Im Rahmen der Bestimmung der MG-Proliferation (s.u.) erhält man als rechnerisches Nebenprodukt auch den Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtzellzahl am Ort der höchsten Proliferationsaktivität des Tumors. Es zeigt sich, dass am Ort der höchsten Proliferationsaktivität in E (II) mehr Zellen des MG/Makrophagen-Systems als in aE (III) vorhanden sind (durchschnittlich 85/1000 Zellen in E (II) und 55/1000 Zellen in aE (III)). Primärtumoren und Rezidivtumoren unterscheiden sich hierbei nicht.

3.5.2 Mikroglia-/Makrophagen-Proliferation

Anhand einer Doppelmarkierung mit dem Proliferationsmarker MIB-1 (Entwicklung mit DAB = braun) und dem Panmakrophagenmarker Ki-M1P (Entwicklung mit VektorVIP = violett) wird die Proliferationsaktivität der MG/Makrophagen untersucht. Diese Doppelfärbung erlaubt eine eindeutige Zuordnung proliferierender Zellen zum Pool der Tumorzellen bzw. zum MG/Makrophagen-System. Proliferierende MG erscheint violett markiert mit einem braunen Zellkern (Ki-M1P⁺/MIB-1⁺), nicht proliferierende MG weist durch die Kerngegenfärbung mit Hämalaun einen blauen Zellkern auf (Ki-M1P⁺/MIB-1⁻). Tumorzellen werden durch den Antikörper Ki-M1P nicht markiert (siehe Abbildung 14 a-c).

Es lässt sich nachweisen, dass in 45 (80,4%) der auf diese Weise untersuchten 56 ependymalen Tumoren am Ort der höchsten Proliferationsaktivität einzelne proliferierende Zellen des MG/Makrophagen-Systems vorhanden sind. In den meisten Fällen gehören die proliferierenden Zellen des MG/Makrophagen-Systems vom morphologischen Aspekt her zur amöboiden MG, vereinzelt wird auch mit MIB-1 und Ki-M1P doppelt markierte ramifizierte MG gesichtet. Die proliferierenden Zellen des MG/Makrophagen-Systems sind recht regelmäßig im Tumor verteilt mit wenigen Ausnahmen, in denen sich auch Ansammlungen mehrerer proliferierender Zellen des MG/Makrophagen-Systems finden (Abbildung 14a). Die Anzahl der proliferierenden Zellen des MG/Makrophagen-Systems übersteigt in dieser Doppelmarkierung nur in 6 Fällen (4 E (II) und 2 aE (III)) die Grenze von 10 bei insgesamt 1000 bewerteten Zellen am Ort der höchsten Tumorproliferation. Infolge dieser Extremwerte liegt in E (II) mit 7,7 ein höherer Mittelwert proliferierender Zellen als in aE (III) mit 3,7 vor. Der weniger von Extremwerten abhängige Median liegt bei 2,5 in E (II) und bei 3 in aE (III).

Wesentliche Unterschiede in der absoluten Anzahl proliferierender Zellen des MG/Makrophagen-Systems ergeben sich folglich nicht.

Der prozentuale Anteil proliferierender Zellen des MG/Makrophagen-Systems an der Gesamtproliferation am Ort der höchsten Proliferationsaktivität liegt in E (II) bei 14,0% und in aE (III) bei 3,1%. Bei weitgehend identischer absoluter Anzahl proliferierender Zellen des MG/Makrophagen-Systems in E (II) und aE (III) wird dieser Unterschied durch die höhere Proliferationsaktivität der Tumorzellen in aE (III) (siehe Kapitel 3.3) begründet.

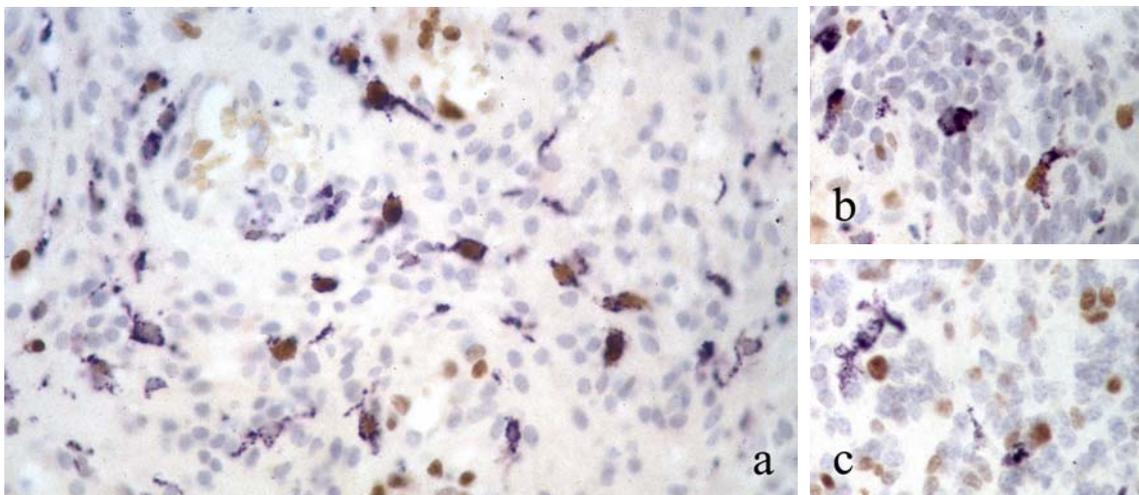


Abbildung Nr. 14: Mikroglia-Proliferation

Eine Doppelmarkierung mit den Antikörpern MIB-1 (Entwicklung mit DAB = braun) und Ki-M1P (Entwicklung mit Vector VIP = violett) erlaubt die Zuordnung proliferierender Zellen zum Pool der Tumorzellen bzw. zum Mikroglia-/Makrophagen-System. Proliferierende Mikroglia erscheint violett markiert mit einem braunen Zellkern (Ki-M1P⁺/MIB-1⁺), nicht proliferierende Mikroglia weist einen blauen Zellkern auf (Ki-M1P⁻/MIB-1⁻).

14a + 14b Patient Nr. 38P: proliferierende und nicht proliferierende Mikroglia neben ruhenden und proliferierenden Tumorzellen (jeweils 400-fache Vergrößerung)

14c Patient Nr. 36P nicht proliferierende Mikroglia neben ruhenden und proliferierenden Tumorzellen (400-fache Vergrößerung)

3.5.3 HLA-DR Expression in Mikroglia/Makrophagen und Tumorzellen

Durch den Antikörper anti-HLA-DR werden insbesondere amöboide MG und Makrophagen markiert. In einigen der untersuchten Ependymome kann aufgrund der Morphologie und Lokalisation der markierten Zellen davon ausgegangen werden, dass auch Tumorzellen HLA-DR exprimieren. Von diesen und weiteren weniger eindeutigen Fällen wird zur Evaluierung ein zweites Präparat mit einer Doppelmarkierung für Ki-M1P (Entwicklung mit DAB = braun) und anti-HLA-DR (Entwicklung mit AEC = rot) angefertigt. Hierdurch lassen sich HLA-DR exprimierende Tumorzellen eindeutig von Zellen des MG/Makrophagen-Systems unterscheiden. HLA-DR exprimierende Tumorzellen werden rot ($\text{Ki-M1P}^-/\text{HLA-DR}^+$), Zellen des MG/Makrophagen-Systems dagegen braunrot ($\text{Ki-M1P}^+/\text{HLA-DR}^+$) oder braun ($\text{Ki-M1P}^+/\text{HLA-DR}^-$) dargestellt.

HLA-DR exprimierende Tumorzellen finden sich insbesondere im Zellverband von Pseudorosetten und echten ependymalen Rosetten (siehe Abbildung Nr. 15 a-c), in einigen Fällen jedoch auch diffus verteilt in soliden Tumoranteilen (siehe Abbildung Nr. 15 d+e). Sie zeigen eine meist deutliche, großflächig intrazytoplasmatische Markierung und kommen zum Teil im gesamten Tumor vor, sind jedoch häufig in Tumorarealen mit höherer Differenzierung (Vorliegen von (Pseudo-)Rosetten) konzentriert.

In 52,6% der untersuchten Tumorproben kindlicher Ependymome findet sich eine HLA-DR Expression. In E (II) liegt der Anteil HLA-DR exprimierender Tumoren bei 52,9% (9/17), Primärtumoren und Rezidivtumoren des Tumorgrades II unterscheiden sich diesbezüglich nicht wesentlich (Positivität in 53,8% bzw. 50,0%). In aE (III) finden sich in 58,3% (21/36) der Fälle HLA-DR exprimierende Tumorzellen, Rezidivtumoren des Tumorgrades III weisen in 65,0%, Primärtumoren jedoch nur in 50,0% Immunpositivität für HLA-DR auf. In mE (I) finden sich keine für HLA-DR positiven Tumorzellen. Die Verteilung der HLA-DR Expression ist in Abbildung Nr. 16 und Tabelle Nr. 5 differenziert nach dem Tumorgrad und Tumorstatus (Primär-/Rezidivtumor) dargestellt.

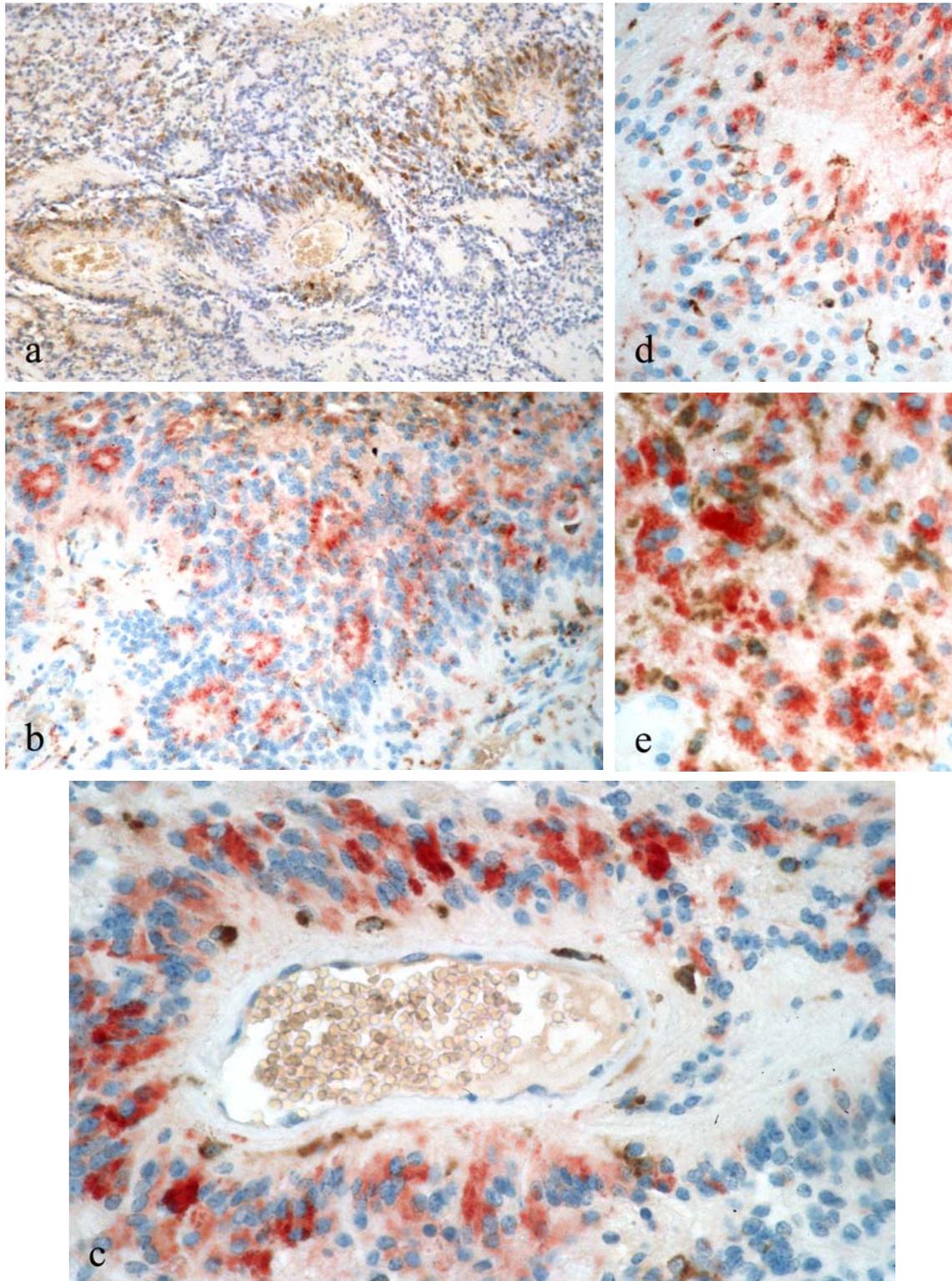


Abbildung Nr. 15: HLA-DR Expression in ependymalen Tumorzellen tritt v.a. im Zellverband von echten ependymalen Rosetten (**15b** Patient Nr. 22R, 200-fache Vergrößerung) und Pseudorosetten (**15a + 15c** Patient Nr. 25R, a: 100-fache, c: 400-fache Vergrößerung) auf.

15a zeigt eine Markierung mit dem Antikörper anti-HLA-DR (Entwicklung mit DAB = braun),

15b - 15e Doppelmarkierungen mit den Antikörpern anti-HLA-DR (Entwicklung AEC = rot) und Ki-M1P (Entwicklung mit DAB = braun). Zellen des Mikroglia-/Makrophagen-Systems werden dabei in den Farbtönen braun (Ki-M1P⁺/HLA-DR⁻) oder braunrot (Ki-M1P⁺/HLA-DR⁺) dargestellt, HLA-DR exprimierende Tumorzellen nur in der Farbe rot (Ki-M1P⁻/HLA-DR⁺).

HLA-DR exprimierende Tumorzellen finden sich auch in soliden Tumoranteilen (**15d + 15e** Patient Nr. 9P, d: 200-fache, e: 400-fache Vergrößerung).

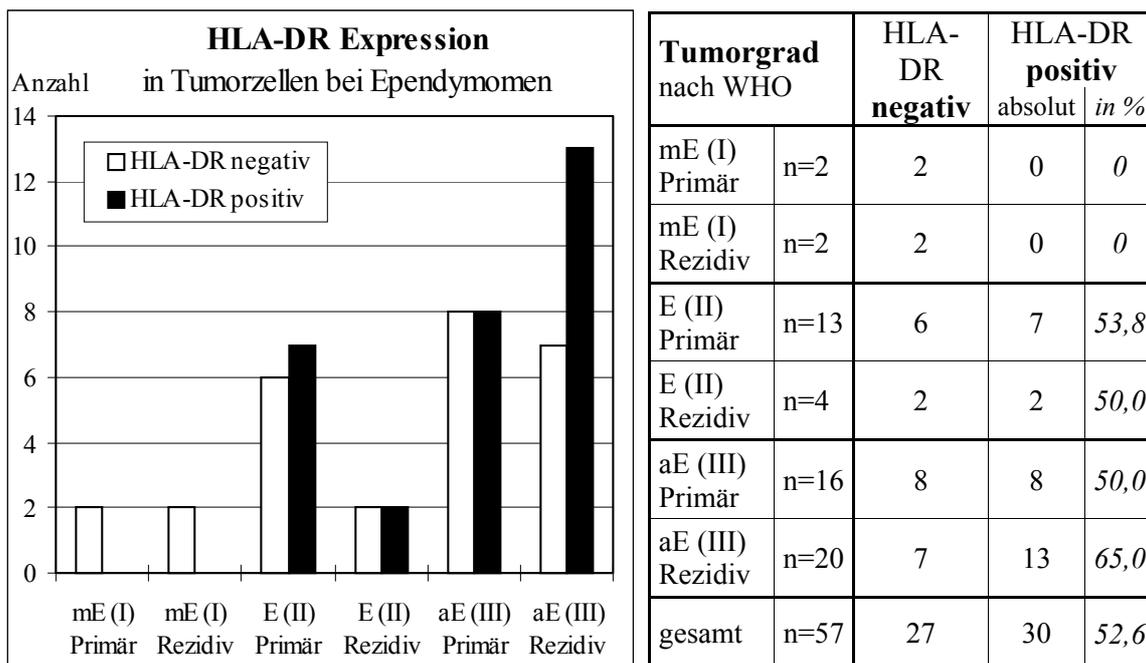


Abbildung Nr. 16 und Tabelle Nr. 6: HLA-DR Expression in Tumorzellen in Ependymomen des Kindesalters differenziert nach Tumorgrad und Tumorstatus (Primär- bzw. Rezidivtumor)

3.6 Statistische Analyse

3.6.1 Rangkorrelationen

Rangkorrelationen wurden für folgende Variablen ermittelt:

- a) **Klinische Daten:** Geschlecht, Tumorgrad nach WHO, Lokalisation, Alter, Resektionsausmaß.
- b) **Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen:** p53-Akkumulation, MIB-1 LI, EMA-Expression in den verschiedenen Expressionsformen, prozentualer Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtproliferation, prozentualer Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtzellzahl am Ort der höchsten Proliferation, HLA-DR Expression.

Die Ergebnisse der statistischen Analyse werden nachfolgend mit Schwerpunkt auf den statistisch signifikanten Korrelationen (ausgehend von einem Niveau von 5%, $p < 0.05$) tabellarisch wiedergegeben und im Text erläutert. In den Tabellen werden zuerst der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman, in der zweiten Zeile der p-Wert und weiterhin die Größe der Stichprobe (n) angegeben. Abkürzungen und Rangzuweisungen können der nachstehenden Tabelle Nr. 7 entnommen werden.

Geschlecht	1 = weiblich, 2 = männlich
Tumorgrad nach WHO	I, II, III
Lokalisation	1 = spinal, 2 = infratentoriell, 3 = supratentoriell
Lokalisation*	1 = spinal, 2 = intrakraniell
Alter	in Monaten zum Zeitpunkt der Operation
Alter*	1 = Alter zum Zeitpunkt der Operation <36 Monate, 2 = Alter ≥36 Monate
Resektion	1 = total, 2 = inkomplett
p53	p53-Akkumulation 0 = negativ, + = <5%, ++ = 5-10%, +++ = >10% der Tumorzellen positiv
p53*	p53-Akkumulation 0 = negativ, 1 = positiv (umfasst +, ++ und +++)
HLA-DR	HLA-DR Expression durch Tumorzellen 0 = negativ, 1 = positiv
MIB-1 LI	in %
MIB-1 LI10	MIB-1 LI <10%, MIB-1 LI ≥10%
MG Proliferation	prozentualer Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtproliferation
MG gesamt	prozentualer Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtzellzahl am Ort der höchsten Proliferation
EMA Oberfläche	EMA-Expression an der Oberfläche von Tumorzellen 0 = negativ, 1 = positiv
EMA punktförmig	punktförmige intrazytoplasmatische EMA-Expression 0 = negativ, 1 = positiv
EMA diffus	diffuse intrazytoplasmatische EMA-Expression 0 = negativ, 1 = positiv
EMA ringförmig	ringförmige intrazytoplasmatische EMA-Expression 0 = negativ, 1 = positiv
EMA intra-gesamt	intrazytoplasmatische EMA-Expression ohne weitere Differenzierung der verschiedenen Expressionsformen 0 = negativ, 1 = positiv

Tabelle Nr. 7: Verwendete Abkürzungen und Rangzuweisungen bei der Berechnung der Rangkorrelationen.

Tumorgrad nach WHO **und klinische Daten**

Korrelationen zwischen dem Tumorgrad nach WHO und anderen klinischen Variablen konnten nur für die Tumorlokalisierung ermittelt werden (siehe Tabelle Nr. 8). Unabhängig vom

	Tumorgrad nach WHO		
	Primärtumoren	Rezidivtumoren	Primär + Rezidiv
Lokalisation	0.47 0.0022 n=40	0.39 0.023 n=33	0.44 0.0001 n=73
Lokalisation*	0.35 0.027 n=40	0.30 0.090 n=33	0.34 0.0037 n=73
Alter	-0.26 0.10 n=40	0.087 0.63 n=33	-0.032 0.79 n=73

Tabelle Nr. 8: Korrelationen des Tumorgrades nach WHO mit der Lokalisation, der Lokalisation* und dem Alter. Signifikante Ergebnisse sind fett hervorgehoben.

Tumorstatus (Primär- bzw. Rezidivtumor) erreicht dieser Zusammenhang statistische

Signifikanz ($p=0.0022$ in der Gruppe der Primär-, $p=0.023$ in der Gruppe der Rezidivtumoren, $p=0.0001$ bei allen untersuchten Tumoren). Mit einer von spinal über infratentoriell nach supratentoriell aufsteigenden Lokalisation nimmt demzufolge der Tumorgrad nach WHO zu. Bei Differenzierung in spinale und intrakranielle Ependymome (Lokalisation*) bleibt dieser Zusammenhang bestehen.

Korrelationen zwischen Tumorgrad und Geschlecht, Alter sowie Resektionsausmaß liegen nicht vor. Allenfalls zeigt sich bei einer Ersterkrankung in den ersten drei Lebensjahren ein Trend zu höhergradigen Ependymomen (-0.26 , $p=0.10$).

Tabelle Nr. 9: Korrelationen des Tumorgrades nach WHO mit den Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchungen: p53, p53*, MIB-1 LI, MIB-1 LI10, MG Proliferation, MG gesamt, EMA ringförmig, EMA diffus, EMA intra-gesamt. Signifikante Ergebnisse sind fett hervorgehoben.

Wie in Tabelle Nr. 9 dargestellt ergeben sich folgende Korrelationen des Tumorgrades nach WHO mit Ergebnissen der immunhistochemischen Färbungen: Besonders deutliche Zusammenhänge liegen zwischen dem Tumorgrad und der

	Tumorgrad nach WHO		
	Primärtumoren	Rezidivtumoren	Primär + Rezidiv
p53	0.51 0.0032 n=31	0.44 0.023 n=27	0.49 <.0001 n=58
p53*	0.44 0.013 n=31	0.40 0.040 n=27	0.44 0.0006 n=58
MIB-1 LI	0.54 0.0022 n=30	0.54 0.0034 n=27	0.55 <.0001 n=57
MIB-1 LI10	0.60 0.0005 n=30	0.54 0.0039 n=27	0.58 <.0001 n=57
MG Proliferation	-0.087 0.66 n=29	-0.36 0.064 n=27	-0.23 0.086 n=56
MG gesamt	-0.28 0.14 n=29	-0.45 0.019 n=27	-0.37 0.0046 n=56
EMA ringförmig	0.25 0.17 n=31	0.28 0.16 n=27	0.26 0.045 n=58
EMA diffus	0.15 0.43 n=31	0.34 0.087 n=27	0.26 0.045 n=58
EMA intra-gesamt	0.31 0.091 n=31	0.39 0.042 n=27	0.34 0.0099 n=58

p53-Akkumulation sowie dem MIB-1 LI vor. Mit ansteigendem Tumorgrad finden sich vermehrt Tumoren mit einer immunhistochemisch nachweisbaren p53-Akkumulation (p53*: Differenzierung in negative und positive Fälle). Außerdem nimmt die Anzahl der

für p53 immunpositiven Zellen in einem Tumor mit ansteigendem Tumorgrad zu (p53: 0, +, ++, +++). Desgleichen korreliert ein ansteigender Tumorgrad mit höheren MIB-1 Labeling Indices, sowohl bei einer Betrachtung der Einzelwerte, als auch bei einer Einteilung der Indices in die beiden Gruppen MIB-1 LI <10% und MIB-1 LI ≥10% (Korrelationskoeffizienten und p-Werte siehe Tabelle Nr. 9).

Ein Zusammenhang zwischen Tumorgrad und der MG-Proliferation (prozentualer Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtproliferation) besteht bei Primärtumoren nicht (-0.087, p=0.66). Auch bei Rezidivtumoren und bei Betrachtung aller untersuchten Tumoren wird die 5%-Signifikanzgrenze knapp verfehlt.

Der prozentuale Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtzellzahl am Ort der höchsten Proliferation weist bei Rezidivtumoren und in der Gruppe aller untersuchten Tumoren einen umgekehrten Zusammenhang mit dem Tumorgrad nach WHO auf (Rezidivtumoren: -0.45, p=0.019, alle untersuchten Tumoren: -0.37, p=0.0046). In der Gruppe der Primärtumoren wird keine Signifikanz erreicht (-0.28, p=0.14).

Kein Zusammenhang besteht bei Primärtumoren zwischen dem Tumorgrad nach WHO und einer EMA-Expression in den diversen Expressionsformen. Bei Betrachtung aller untersuchten Tumoren korreliert das Vorliegen einer ringförmigen sowie diffusen intrazytoplasmatischen EMA-Expression mit einem ansteigenden Tumorgrad (ringförmig: 0.26, p=0.045; diffus: 0.26, p=0.045). Wegen der fließenden Übergänge und der dadurch oft willkürlichen Zuteilung der diversen intrazytoplasmatischen Expressionsmuster scheint dem Vorliegen einer intrazytoplasmatischen EMA-Expression im Allgemeinen (EMA intra-gesamt) eine größere Bedeutung als den unterschiedlichen intrazytoplasmatischen Expressionsformen zuzukommen. Ein deutlicher Zusammenhang zwischen EMA intra-gesamt und dem Tumorgrad nach WHO liegt dabei in der Gruppe der Rezidivtumoren sowie bei Betrachtung aller untersuchten Tumoren vor (0.34, p=0.0099 bzw. 0.39, p=0.042 bei Rezidivtumoren). Für eine Oberflächenexpression von EMA sowie eine punktuelle intrazytoplasmatische EMA-Expression konnten keine Korrelationen mit dem Tumorgrad nach WHO ermittelt werden.

Zwischen dem Tumorgrad nach WHO und einer HLA-DR Expression durch Tumorzellen existiert kein Zusammenhang.

Unter den klinischen Variablen stehen Lokalisation und Alter in einem inversen Zusammenhang (siehe Tabelle Nr. 10). Besonders ausgeprägt ist diese Korrelation bei Differenzierung der Tumorlokalisation in intrakraniell und spinal (Lokalisation*: $p < 0.0001$ in der Gruppe der Primärtumoren und bei allen untersuchten Tumoren, $p = 0.0021$ bei Rezidivtumoren). Mit zunehmendem Alter nehmen spinale Ependymome zu.

	Primärtumoren		Rezidivtumoren		Primär + Rezidiv	
	Lokalisation	Lokalisation*	Lokalisation	Lokalisation*	Lokalisation	Lokalisation*
Alter	-0.45 0.0039 n=40	-0.63 <.0001 n=40	-0.42 0.015 n=33	-0.52 0.0021 n=33	-0.41 0.0004 n=73	-0.56 <.0001 n=73

Tabelle Nr. 10: Korrelationen der Lokalisation und der Lokalisation* mit dem Alter. Signifikante Ergebnisse sind fett hervorgehoben.

Im untersuchten Patientenkollektiv ist das Resektionsausmaß von der Lokalisation des Tumors unabhängig.

Weitere Korrelationen klinischer Variablen mit Ergebnissen aus den immunhistochemischen Untersuchungen werden in den folgenden Unterkapiteln vorgestellt.

p53-Akkumulation

Ein signifikanter Zusammenhang besteht bei Primärtumoren der untersuchten Ependymome

	Primärtumoren		Rezidivtumoren		Primär + Rezidiv	
	p53	p53*	p53	p53*	p53	p53*
Lokalisation	0.44 0.014 n=31	0.32 0.075 n=31	0.046 0.82 n=27	0.053 0.79 n=27	0.27 0.044 n=58	0.20 0.13 n=58

Tabelle Nr. 11: Korrelationen des p53- bzw. p53*-Status mit der Lokalisation. Signifikante Ergebnisse sind fett hervorgehoben.

zwischen einer p53-Akkumulation und der Lokalisation (siehe Tabelle Nr. 11). Bei aufsteigender Tumorlokalisation korrelieren für p53 stärker positive Fälle mit einer supratentoriellen Lage (0.44, $p = 0.014$). Bei Differenzierung der p53-Immunpositivität in negative und positive (umfasst +, ++ und +++) Fälle (p53*) erreicht diese Korrelation nur grenzwertige Signifikanz (0.32, $p = 0.075$). Diese Assoziation findet sich auch bei allen untersuchten Tumorproben (Primär- und Rezidivtumoren; 0.27, $p = 0.044$), aber nicht in der Gruppe der Rezidivtumoren. Korrelationen des p53-Status mit anderen klinischen Variablen ausgenommen der schon beschriebenen Zusammenhänge zwischen p53-Akkumulation und Tumorgrad nach WHO bestehen nicht.

Bei einem Vergleich der Ergebnisse des immunhistochemischen p53-Nachweises mit den Ergebnissen der anderen Markierungen (s. Tabelle Nr. 12) stellt sich eine Korrelation des Ausmaßes einer p53-Akkumulation mit dem MIB-1 LI dar (für die Primärtumoren: 0.45,

	Primärtumoren		Rezidivtumor		Primär + Rezidiv	
	p53	p53*	p53	p53*	p53	p53*
MIB-1 LI	0.45 0.012 n=30	0.43 0.017 n=30	0.49 0.0091 n=27	0.41 0.032 n=27	0.49 0.0001 n=57	0.44 0.0007 n=57
MIB-1 LI10	0.44 0.016 n=30	0.41 0.025 n=30	0.0061 0.98 n=27	-0.041 0.84 n=27	0.25 0.063 n=57	0.22 0.11 n=57
MG gesamt	-0.39 0.038 n=29	-0.39 0.037 n=29	-0.21 0.30 n=27	-0.074 0.71 n=27	-0.28 0.037 n=56	-0.23 0.094 n=56

Tabelle Nr. 12: Korrelationen des p53- bzw. p53*-Status mit dem MIB-1 LI und dem Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtzellzahl am Ort der höchsten Proliferation. Signifikante Ergebnisse sind fett hervorgehoben.

p=0.012; für die Rezidivtumoren: 0.49, p=0.0091; für Primär- und Rezidivtumoren gemeinsam: 0.49, p=0.0001). Diese Korrelation besteht auch bei Unterscheidung in p53 negative und p53 positive Fälle (p53*). In der Gruppe der Primärtumoren korreliert ein p53-Nachweis außerdem mit einem MIB-1 LI >10% (0.44, p=0.016).

Ferner besteht bei Primärtumoren ein inverser Zusammenhang zwischen einer p53-Expression und dem prozentualen Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtzellzahl am Ort der höchsten Proliferation (-0.39, p=0.038). Diese Korrelation ist außerdem für alle untersuchten Tumoren (Primär- und Rezidivtumoren) gültig (-0.28, p=0.037).

Keine Korrelationen bestehen zwischen dem p53-Status und einer HLA-DR- oder EMA-Expression sowie dem prozentualen Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtproliferation.

MIB-1 LI

	Primärtumoren		Rezidivtumoren		Primär + Rezidiv	
	MIB-1 LI	MIB-1 LI10	MIB-1 LI	MIB-1 LI10	MIB-1 LI	MIB-1 LI10
Lokalisation	0.39 0.033 n=30	0.53 0.0027 n=30	0.081 0.69 n=27	0.027 0.89 n=27	0.18 0.18 n=57	0.31 0.019 n=57
Lokalisation*	0.30 0.10 n=30	0.49 0.0062 n=30	0.17 0.39 n=27	0.28 0.16 n=27	0.25 0.061 n=57	0.40 0.0022 n=57
Alter	-0.29 0.13 n=30	-0.35 0.059 n=30	0.36 0.066 n=27	0.092 0.65 n=27	0.031 0.82 n=57	-0.15 0.26 n=57

Tabelle Nr. 13: Korrelationen des MIB-1 LI bzw. MIB-1 LI10 mit der Lokalisation und dem Alter. Signifikante Ergebnisse sind fett hervorgehoben.

Der MIB-1 LI der untersuchten Primärtumoren korreliert signifikant mit der Lokalisation (siehe Tabelle Nr. 13). Es besteht wie bei der p53-Akkumulation ein Zusammenhang zwischen hohen Labeling Indices und einer von spinal über infratentoriell nach supratentoriell aufsteigenden Lage des Tumors (0.39, $p=0.033$). Besonders deutlich wird diese Korrelation, wenn die einzelnen Indices den beiden Gruppen MIB-1 LI $<10\%$ und MIB-1 LI $\geq 10\%$ zugeteilt werden (0.53, $p=0.0027$). Mit dieser Einteilung des MIB-1 LI (MIB-1 LI10) besteht auch ein signifikanter Zusammenhang zwischen Indices $\geq 10\%$ und einer intrakraniellen Tumorlokalisation (Lokalisation*: 0.49, $p=0.0062$).

Zusätzlich besteht eine umgekehrte Beziehung zwischen MIB-1 LI $\geq 10\%$ und dem Alter zum Zeitpunkt der Ersterkrankung. Diese Korrelation erreicht jedoch nur grenzwertige Signifikanz (-0.35, $p=0.059$). Alle erwähnten Korrelationen bestehen in der Gruppe der Rezidivtumoren nicht.

Korrelationen der Proliferationsaktivität mit dem Geschlecht der Patienten und dem erzielten Resektionsausmaß liegen nicht vor. Auf die Korrelationen des MIB-1 LI mit dem Graduierungssystem der WHO wurde schon eingegangen.

	Primärtumoren		Rezidivtumoren		Primär + Rezidiv	
	MIB-1 LI	MIB-1 LI10	MIB-1 LI	MIB-1 LI10	MIB-1 LI	MIB-1 LI10
MG Proliferation	-0.35 0.064 n=29	-0.29 0.13 n=29	-0.69 <.0001 n=27	-0.69 <.0001 n=27	-0.53 <.0001 n=56	-0.49 0.0001 n=56
MG gesamt	-0.30 0.12 n=29	-0.018 0.92 n=29	-0.52 0.0056 n=27	-0.58 0.0016 n=27	-0.43 0.0008 n=56	-0.30 0.022 n=56
HLA-DR	0.12 0.52 n=30	0.32 0.084 n=30	0.35 0.082 n=26	0.27 0.18 n=26	0.24 0.076 n=56	0.30 0.023 n=56
EMA diffus	0.28 0.14 n=30	0.43 0.019 n=30	0.030 0.88 n=27	0.19 0.35 n=27	0.16 0.23 n=57	0.33 0.012 n=57
EMA intra-gesamt	0.21 0.28 n=30	0.37 0.047 n=30	0.17 0.41 n=27	0.24 0.23 n=27	0.16 0.24 n=57	0.31 0.020 n=57

Tabelle Nr. 14: Korrelationen des MIB-1 LI bzw. MIB-1 LI10 mit dem prozentualen Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtproliferation (MG Proliferation), dem prozentualen Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtzellzahl am Ort der höchsten Proliferation (MG gesamt), der HLA-DR Expression durch Tumorzellen, der EMA-Expression im diffusen intrazytoplasmatischen Verteilungsmuster und der intrazytoplasmatischen EMA-Expression im Allgemeinen. Signifikante Ergebnisse sind fett hervorgehoben.

Korrelationen des MIB-1 LI mit Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchungen (siehe Tabelle Nr. 14) liegen in der Gruppe der Primärtumoren abgesehen von dem bereits dargestellten Zusammenhang zwischen MIB-1 LI und p53-Akkumulation lediglich für EMA vor. Demnach geht ein MIB-1 LI $\geq 10\%$ statistisch signifikant mit einer EMA-Expression im diffusen intrazytoplasmatischen Verteilungsmuster einher (0.43, $p=0.019$), ebenso mit einem nicht näher differenzierten Vorliegen einer intrazytoplasmatischen EMA-Expression (EMA intra-gesamt: 0.37, $p=0.047$). Diese Korrelationen können auch in der Gruppe aller untersuchten Tumoren (Primär- und Rezidivtumoren) beobachtet werden, nicht jedoch bei Rezidivtumoren.

Der MIB-1 LI korreliert außerdem invers mit dem prozentualen Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtproliferation. Stark ausgeprägt ist dieser Zusammenhang, wenn alle untersuchten Tumoren (Primär- und Rezidivtumoren) bzw. die Gruppe der Rezidivtumoren der Korrelationsberechnung zugrunde liegen (p -Wert jeweils <0.0001), bei Primärtumoren wird keine Signifikanz erreicht (-0.35 , $p=0.064$). Auf die bestehende Abhängigkeit des prozentualen Anteils der MG/Makrophagen an der Gesamtproliferation vom MIB-1 LI wurde schon im Kapitel 3.4.2 hingewiesen.

Bei Rezidivtumoren (-0.52 , $p=0.0056$) sowie in der Gruppe der Primär- und Rezidivtumoren (-0.43 , $p=0.0008$) liegt ferner eine inverse Korrelation des MIB-1 LI mit dem prozentualen Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtzellzahl am Ort der höchsten Proliferation vor.

Ein MIB-1 LI $>10\%$ geht außerdem mit einer HLA-DR-Expression durch Tumorzellen einher, statistische Signifikanz wird jedoch nur bei Betrachtung aller untersuchten Tumoren erreicht (0.30, $p=0.023$). Die Ergebnisse der Primärtumoren diesbezüglich liefern allenfalls eine grenzwertige Korrelation (0.32, $p=0.084$).

EMA-Expression

Korrelationen der EMA-Expression mit dem MIB-1 LI sowie dem Graduierungssystem der WHO wurden schon in den entsprechenden Abschnitten abgehandelt. Zum Zusammenhang zwischen HLA-DR- und EMA-Expression siehe unten.

Korrelationen zwischen EMA und klinischen Variablen bestehen für die Tumorlokalisation und das Alter der Patienten (siehe Tabelle Nr. 15). Während bei Rezidivtumoren und in der Gruppe aller untersuchten Tumoren (nicht jedoch in der

	Primärtumoren			Rezidivtumoren			Primär + Rezidiv		
	EMA Oberfläche	EMA diffus	EMA intra-gesamt	EMA Oberfläche	EMA diffus	EMA intra-gesamt	EMA Oberfläche	EMA diffus	EMA intra-gesamt
Lokalisation	-0.22 0.24 n=31	0.10 0.59 n=31	0.28 0.12 n=31	-0.38 0.049 n=27	0.18 0.38 n=27	0.17 0.38 n=27	-0.29 0.030 n=58	0.13 0.35 n=58	0.23 0.076 n=58
Lokalisation*	-0.074 0.69 n=31	0.40 0.027 n=31	0.49 0.0049 n=31	-0.27 0.17 n=27	0.37 0.059 n=27	0.41 0.032 n=27	-0.15 0.25 n=58	0.38 0.0033 n=58	0.46 0.0003 n=58
Alter	0.12 0.54 n=31	-0.25 0.18 n=31	-0.46 0.0090 n=31	0.28 0.16 n=27	-0.061 0.76 n=27	-0.073 0.72 n=27	0.25 0.062 n=58	-0.083 0.54 n=58	-0.28 0.033 n=58

Tabelle Nr. 15: Korrelation der EMA Expression mit der Lokalisation und dem Alter. Signifikante Ergebnisse sind fett hervorgehoben.

Gruppe der Primärtumoren) eine Oberflächenexpression von EMA von spinal über infratentoriell nach supratentoriell abnimmt (Lokalisation: -0.38, $p=0.049$ bei Rezidivtumoren), findet sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer diffusen intrazytoplasmatischen EMA-Expression und einer intrakraniellen Lage (Lokalisation*: 0.40, $p=0.027$). Dies trifft auch bei nicht differenzierter Bewertung der intrazytoplasmatischen EMA-Expression im Allgemeinen zu (EMA intra-gesamt: 0.49, $p=0.0049$). Eine intrazytoplasmatische EMA-Expression kommt außerdem gehäuft in Primärtumoren jüngerer Patienten vor (-0.46, $p=0.0090$).

Prozentualer Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtproliferation

Ein signifikanter Zusammenhang besteht zwischen der MG/Makrophagen-Proliferation und der MG/Makrophagen-Anzahl (siehe Tabelle Nr. 16). Je größer der prozentuale Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtproliferation, desto größer ist auch der prozentuale Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtzellzahl am Ort der höchsten Proliferation. Diese Korrelation ist besonders

	MG Proliferation		
	Primärtumoren	Rezidivtumoren	Primär + Rezidiv
MG gesamt	0.37 0.049 n=29	0.74 <.0001 n=27	0.56 <.0001 n=56

Tabelle Nr. 16: Korrelation des prozentualen Anteils der MG/Makrophagen an der Gesamtproliferation (MG Proliferation) mit dem prozentualen Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtzellzahl am Ort der höchsten Proliferation (MG gesamt). Signifikante Ergebnisse sind fett hervorgehoben.

deutlich in der Gruppe der untersuchten Rezidivtumoren ausgeprägt (0.74, $p < .0001$) und geringer bei den Primärtumoren (0.37, $p = 0.049$).

Die Korrelationen des prozentualen Anteils der MG/Makrophagen an der Gesamtproliferation mit dem Graduierungssystem der WHO sowie mit dem MIB-1 LI wurden bereits vorgestellt. Keine Korrelationen bestehen zwischen prozentualem Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtproliferation und Geschlecht, Tumorlokalisation, Alter, Resektionsausmaß sowie p53-Status, HLA-DR Expression und EMA-Expression.

HLA-DR Expression

in Tumorzellen

Die HLA-DR Expression durch Tumorzellen korreliert bei Primärtumoren mit dem männlichen

	HLA-DR		
	Primärtumoren	Rezidivtumoren	Primär + Rezidiv
Geschlecht	0.42 0.018 n=31	-0.078 0.71 n=26	0.19 0.15 n=57
Lokalisation*	0.42 0.017 n=31	0.50 0.0096 n=26	0.46 0.0004 n=57

Tabelle Nr. 17: Korrelationen der HLA-DR Expression mit dem Geschlecht und der Lokalisation*. Signifikante Ergebnisse sind fett hervorgehoben.

Geschlecht (0.42, $p = 0.018$), außerdem mit einer intrakraniellen Lokalisation (0.42, $p = 0.017$) (siehe Tabelle Nr. 17). Für die Lokalisation besteht dieser Zusammenhang auch in der Gruppe der Rezidivtumoren und bei allen untersuchten Tumoren (Primär- und Rezidivtumoren).

Keine Korrelationen bestehen zwischen HLA-DR Expression und Tumorgrad nach WHO, Alter und Resektionsausmaß.

Mit einer HLA-DR Expression geht in Primärtumoren außerdem ein höherer prozentualer Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtzellzahl am

	HLA-DR		
	Primärtumoren	Rezidivtumoren	Primär + Rezidiv
MG gesamt	0.42 0.024 n=29	0.031 0.88 n=26	0.22 0.11 n=55
EMA Oberfläche	0.29 0.11 n=31	0.18 0.37 n=26	0.26 0.052 n=57
EMA diffus	0.68 <.0001 n=31	0.27 0.18 n=26	0.51 <.0001 n=57
EMA intra-gesamt	0.48 0.0067 n=31	0.36 0.073 n=26	0.42 0.0010 n=57

Tabelle Nr. 18: Korrelationen der HLA-DR Expression durch Tumorzellen mit dem prozentualen Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtzellzahl am Ort der höchsten Proliferation (MG gesamt), der EMA-Expression im diffusen intrazytoplasmatischen Verteilungsmuster und der intrazytoplasmatischen EMA-Expression im Allgemeinen.

Ort der höchsten Proliferation einher (0.42, $p=0.024$). In der Gruppe der Primärtumoren bestehen weiterhin deutliche Korrelationen der HLA-DR Expression mit einer diffusen intrazytoplasmatischen EMA-Expression (0.68, $p<.0001$) und einer intrazytoplasmatischen EMA-Expression ohne weitere Unterscheidung der verschiedenen Expressionsformen (EMA intra-gesamt: 0.48, $p=0.0067$). In der Gruppe aller untersuchten Tumoren (Primär- und Rezidivtumoren) bestehen diese Korrelationen ebenfalls, nicht jedoch bei Betrachtung der Rezidivtumoren. Siehe Tabelle Nr. 18.

Korrelationen der HLA-DR Expression mit dem MIB-1 LI wurden bereits vorgestellt.

3.6.2 Überlebenszeitberechnungen

Von den Berechnungen des progressionsfreien Intervalls (PFI) und der Überlebenszeit (OS = overall survival) nach Kaplan-Meier wurden folgende Patienten ausgeschlossen: Patienten Nr. 5, 29, 32: mE (I); Patienten Nr. 4, 30: Tod der Patienten innerhalb eines Monats nach der Operation des Primärtumors; Patienten Nr. 3, 23, 37, 38, 39: keine Follow-up-Daten erhältlich. Damit stehen klinische Daten von 30 Patienten zur Überlebenszeitberechnung zur Verfügung. Der Beobachtungszeitraum dieser Patienten umfasst im Mittelwert 53,3 Monate, der Median beträgt 42 Monate (Minimum: 6 Monate, Maximum 163 Monate). Das nach Kaplan-Meier geschätzte mittlere PFI und OS beträgt 28 Monate bzw. 64 Monate (siehe Abbildungen Nr. 17 und 18). Mittleres PFI bzw. OS geben den Zeitpunkt an, an dem 50% der Patienten eine Progression aufwiesen bzw. verstarben.

Einen statistisch signifikanten Einfluss auf den Verlauf der Tumorerkrankung zeigt von den klinischen Variablen (Geschlecht, Tumorgrad nach WHO, Tumorlokalisation, Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Operation, Resektionsausmaß) im untersuchten Patientenkollektiv lediglich das Resektionsausmaß und dies auch nur bei Berechnung des PFI ($p=0.035$). Das mittlere PFI beträgt bei den Kindern, bei denen das Ependyom nicht total entfernt werden konnte, 21 Monate. In der Gruppe der Patienten mit einer totalen Resektion des Primärtumors liegt das mittlere PFI jenseits des Beobachtungszeitraumes dieser Patienten (siehe Abbildung Nr. 20). Trotz des deutlichen Unterschiedes des mittleren OS bei totaler (110 Monate) und inkompletter Resektion (44 Monate) wird keine Signifikanz erreicht ($p=0.12$) (Siehe Abbildung Nr.

19). Weder das Geschlecht, der Tumorgrad nach WHO, die Tumorlokalisation noch das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation haben einen Einfluss auf das mittlere PFI bzw. OS. (siehe Abbildungen Nr. 21 bis 28).

In die Berechnungen des mittleren PFI und OS differenziert nach den Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchungen können weitere 8 Patienten nicht aufgenommen werden, da kein archiviertes Tumormaterial zur immunhistochemischen Untersuchung zur Verfügung stand. Die Bestimmung des MIB-1 LI eines weiteren Falles war wegen einer nicht auswertbaren Färbung unmöglich. Damit reduziert sich die Anzahl der untersuchten Fälle in den einzelnen Gruppen, was die Aussagekraft der Ergebnisse einschränkt. Lediglich der MIB-1 LI scheint bei Anwendung des Cut-off-Punktes von 10% (MIB-1 LI <10% versus \geq 10%) eine gewisse prognostische Relevanz aufzuweisen. Es deutet sich ein günstigerer Verlauf der Tumorerkrankung bezüglich des PFI für Ependymome mit einem MIB-1 LI <10% an, Signifikanz wird jedoch nicht erreicht (mittleres PFI bei MIB-1 LI 10%: 25 Monate, bei MIB-1 LI <10% liegt das mittlere PFI jenseits des Beobachtungszeitraumes der entsprechenden Patienten, $p=0.17$). Das mittlere OS bei einem MIB-1 LI \geq 10% beträgt 77 Monate, bei MIB-1 LI <10 liegt es wiederum jenseits des Beobachtungszeitraumes ($p=0.39$) (siehe Abbildungen Nr. 29 und 30). Alle anderen, in den immunhistochemischen Untersuchungen ermittelten Variablen (p53-Status, HLA-DR Expression, intrazytoplasmatische EMA Expression) zeigen bei dem dieser Arbeit zugrunde liegenden Patientenkollektiv keinen Einfluss auf den klinischen Verlauf der Tumorerkrankung (siehe Abbildungen Nr. 31 bis 36). Die PFI- und OS-Berechnungen sowie die Ergebnisse des Log-Rank-Tests sind in Tabelle Nr. 19 zusammengefasst.

		n	mittleres PFI in Monaten	Teststatistik p-Wert	mittleres OS in Monaten	Teststatistik p-Wert
alle		30	28,0		64,0	
Geschlecht	männlich	16	21,0	0.072 p=0.79	77,0	0.27 p=0.61
	weiblich	14	28,5		53,0	
Tumorgrad nach WHO	Grad II	13	28,0	0.027 p=0.87	77,0	0.054 p=0.82
	Grad III	17	30,0		64,0	
Tumorlokalisation	supratentoriell	9	14,0	0.43 p=0.81	*	0.54 p=0.77
	infratentoriell	18	29,0		53,0	
	spinal	3	30,0		64,0	
Alter	bis 35 Monate	13	21,0	0.20 p=0.65	77,0	0.43 p=0.51
	ab 36 Monate	17	28,0		48,0	
Resektionsausmaß	total	10	*	4.43 p=0.035	110,0	2.38 p=0.12
	inkomplett	19	21,0		44,0	
p53-Status	negativ	12	29,0	0.26 p=0.61	77,0	0.64 p=0.42
	positiv	10	20,0		*	
MIB-1 LI	<10%	4	*	1.89 p=0.17	*	0.75 p=0.39
	≥10%	17	25,0		77,0	
HLA-DR Expression durch Tumorzellen	negativ	12	26,5	0.013 p=0.91	*	0.17 p=0.68
	positiv	10	29,0		110,0	
intrazytoplasmatische EMA-Expression	negativ	5	*	0.58 p=0.45	48,0	0.47 p=0.49
	positiv	17	25,0		110,0	

Tabelle Nr. 19: Mittlere PFI und OS sowie Ergebnisse des Log-Rank-Tests. Das einzige signifikante Ergebnis ist fett hervorgehoben. * = das mittlere PFI bzw. OS liegt jenseits des Beobachtungszeitraumes der Patienten dieser Gruppe.

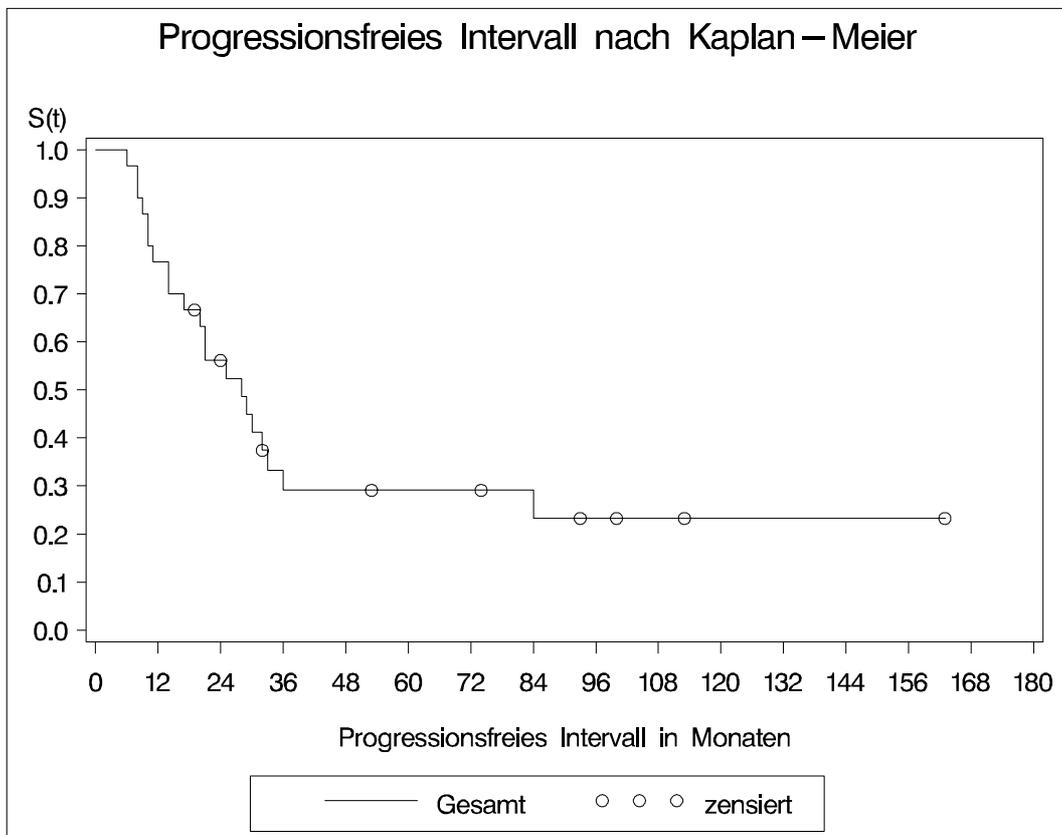
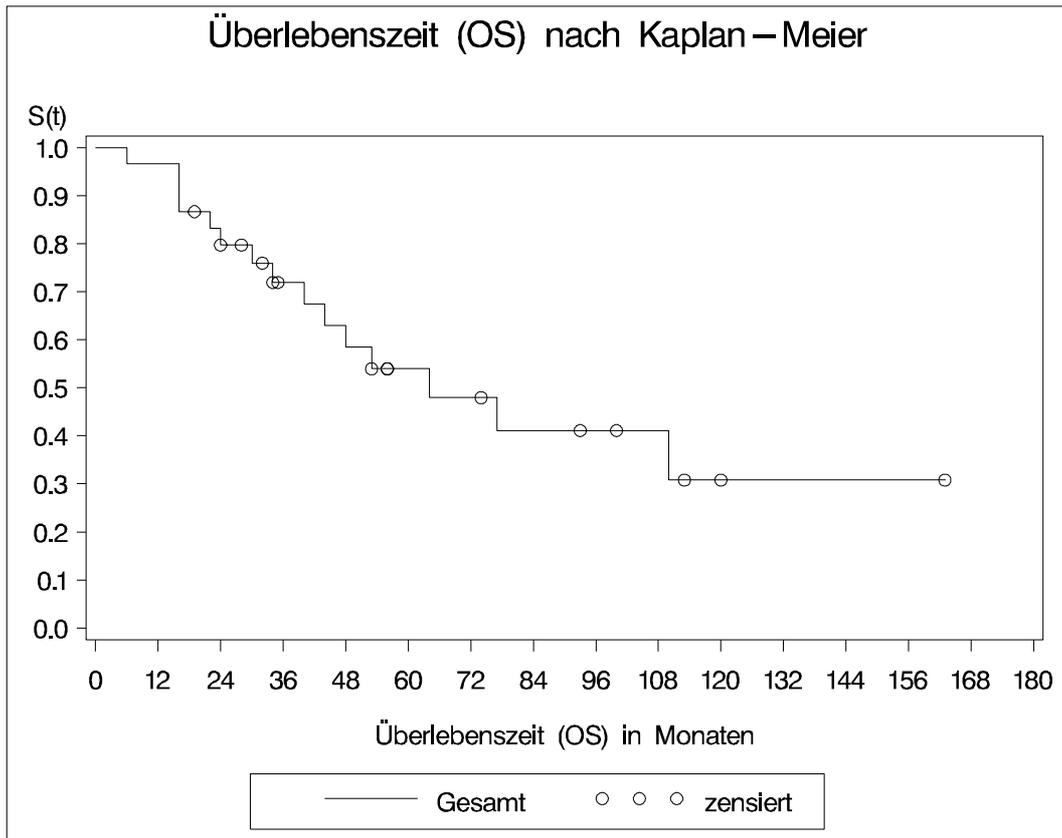


Abbildung Nr. 17 + 18: Schätzung des OS und PFI nach Kaplan-Meier.
 Mittleres OS: 64 Monate, mittleres PFI: 28 Monate

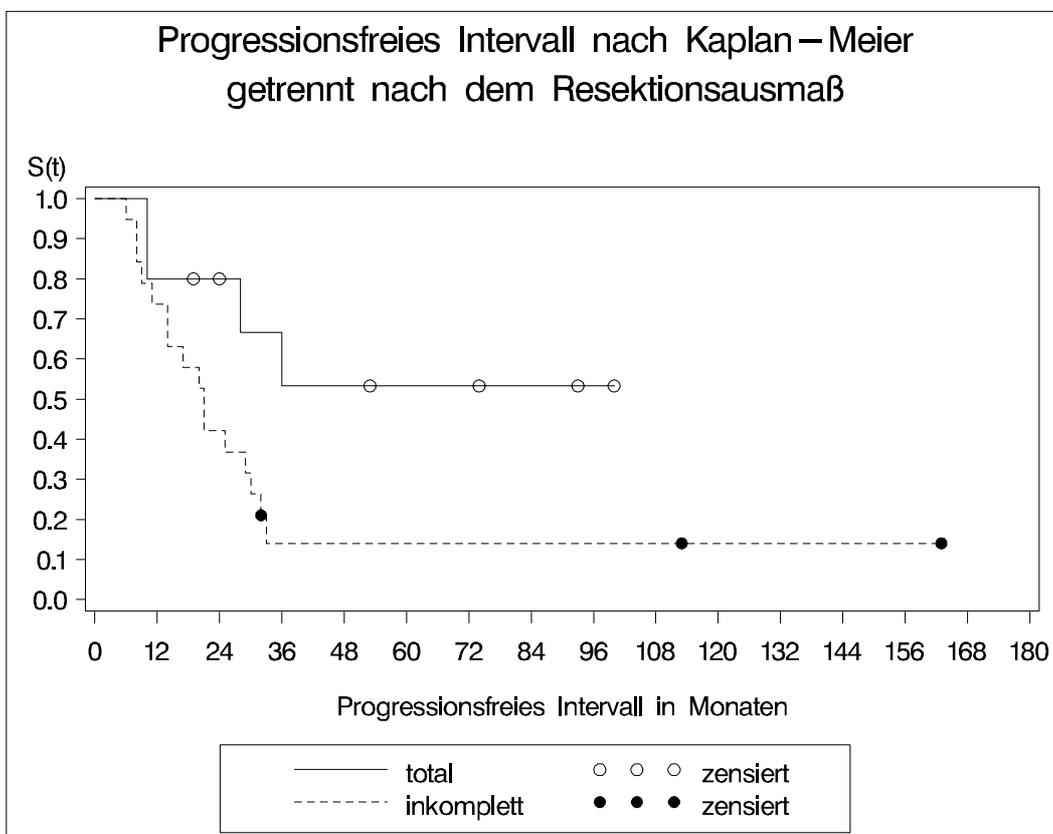
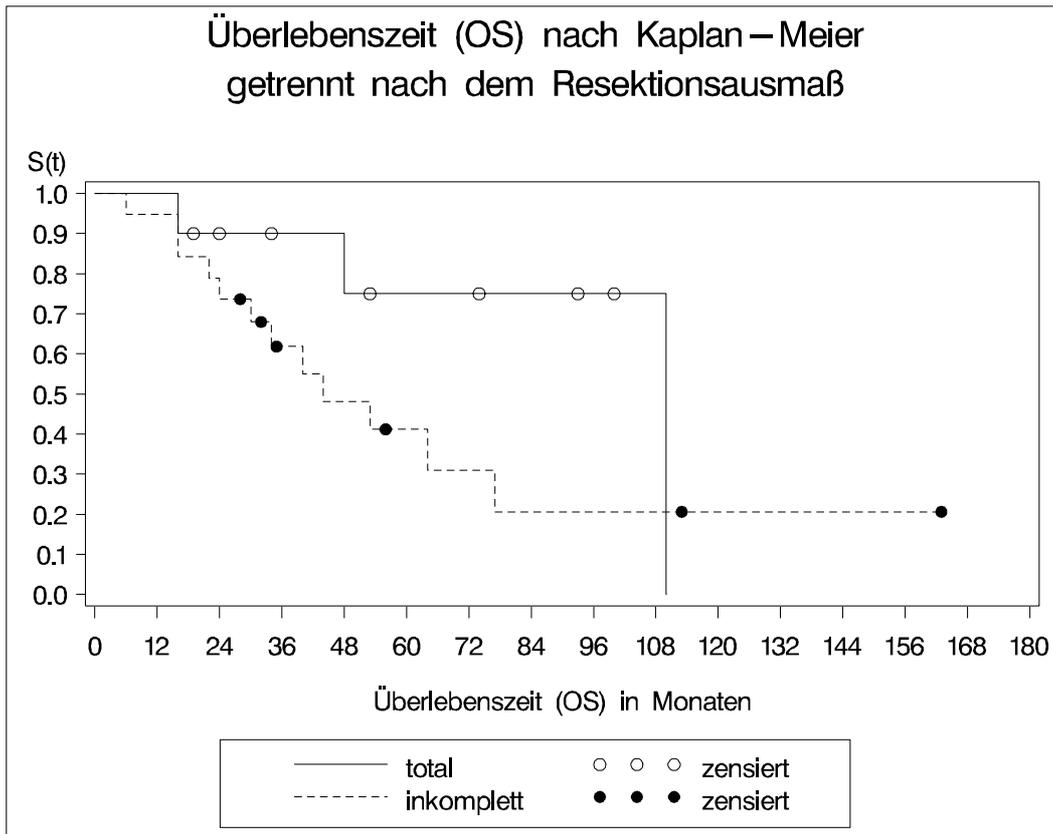


Abbildung Nr. 19 + 20: Beziehung zwischen dem Resektionsausmaß und dem nach Kaplan-Meier geschätzten OS bzw. PFI.

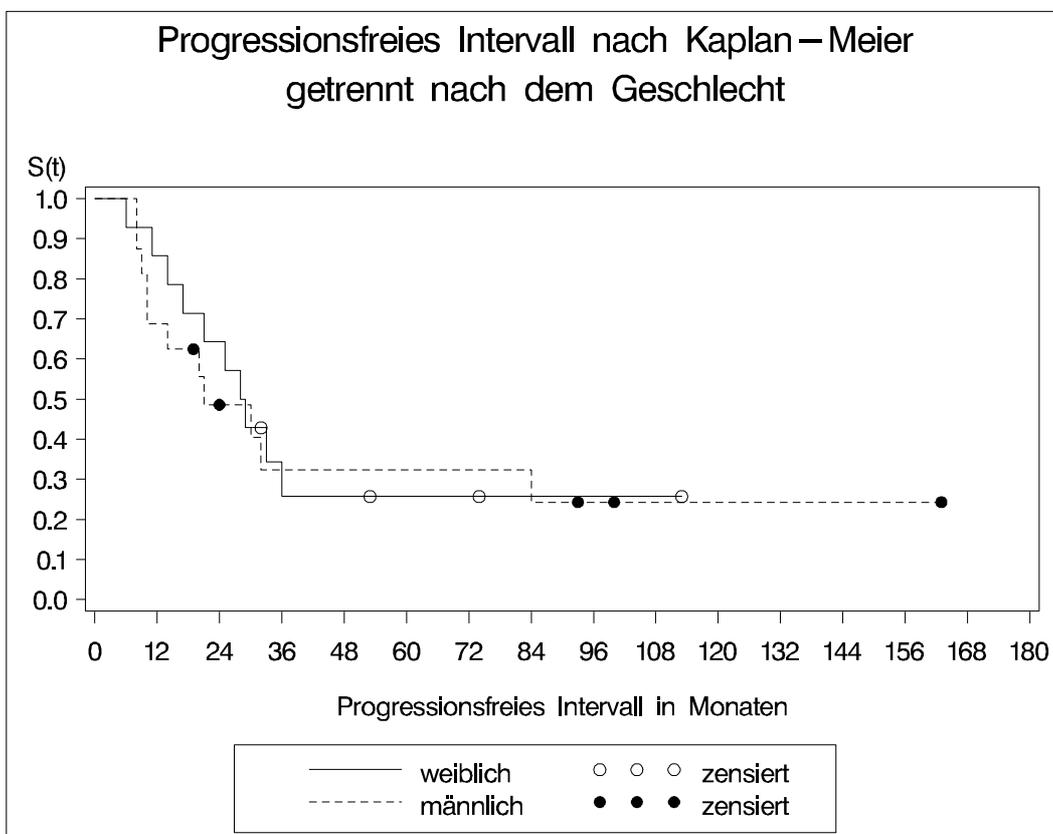
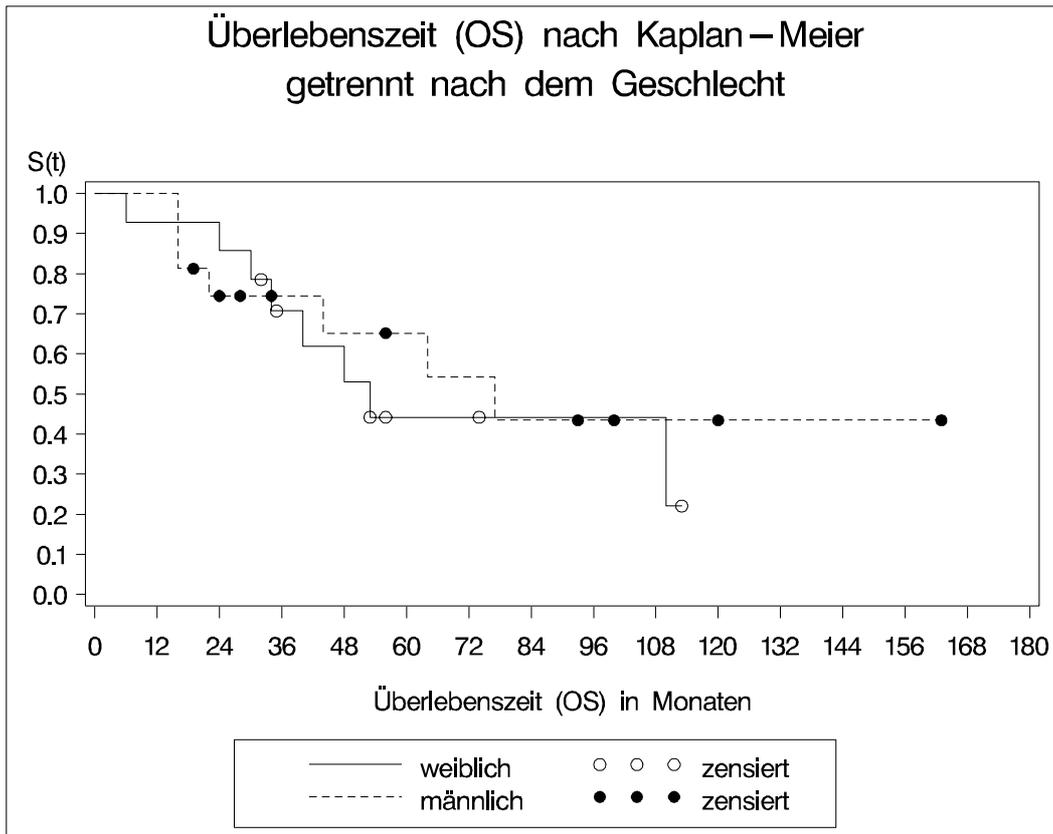


Abbildung Nr. 21 + 22: Beziehung zwischen dem Geschlecht und dem nach Kaplan-Meier geschätzten OS bzw. PFI.

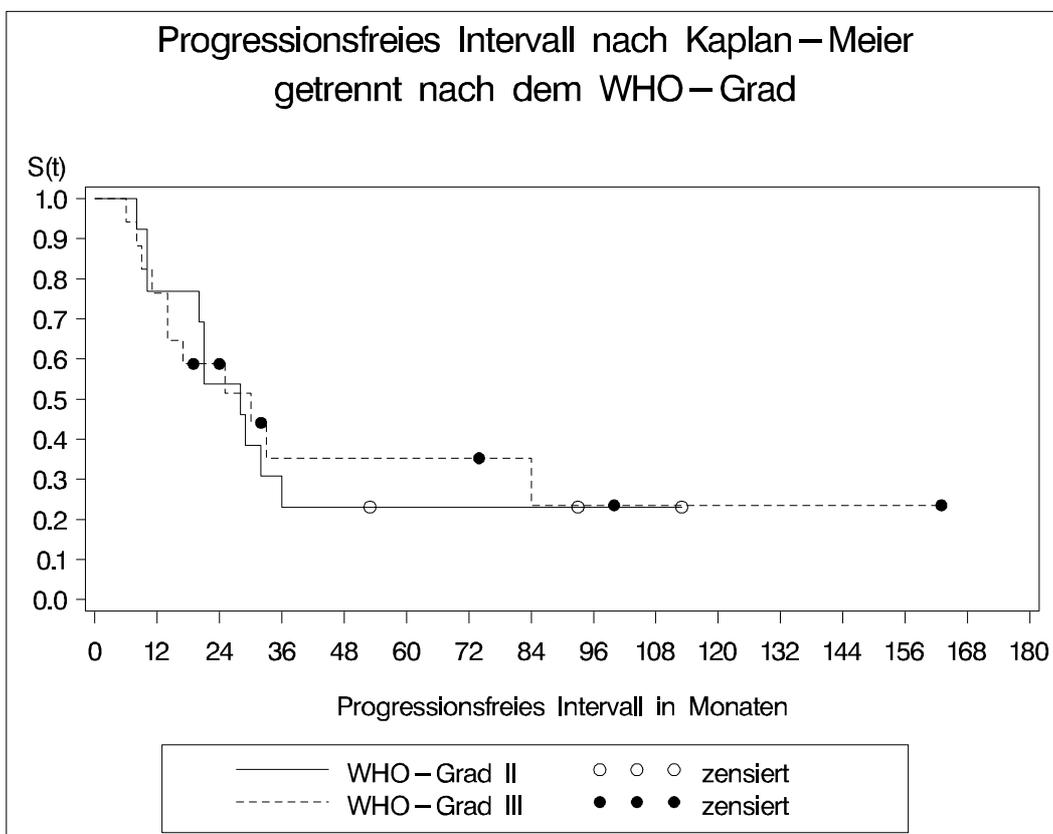
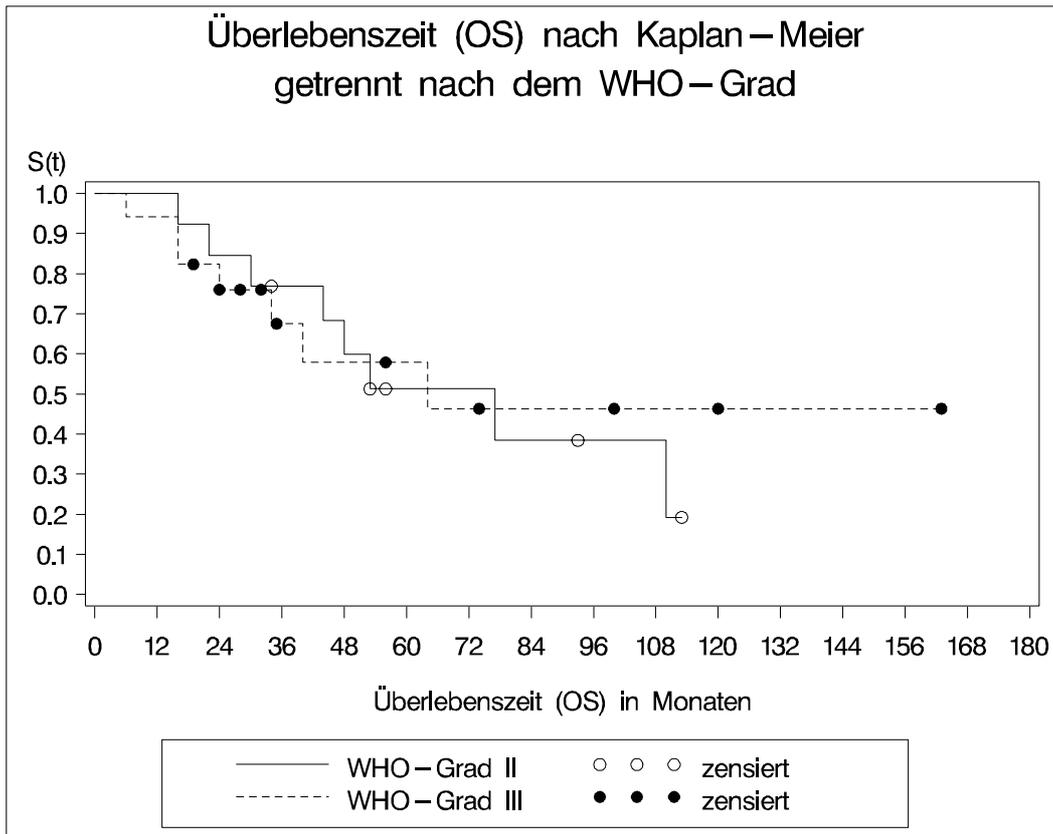


Abbildung Nr. 23 + 24: Beziehung zwischen dem Tumorgrad nach WHO und dem nach Kaplan-Meier geschätzten OS bzw. PFI.

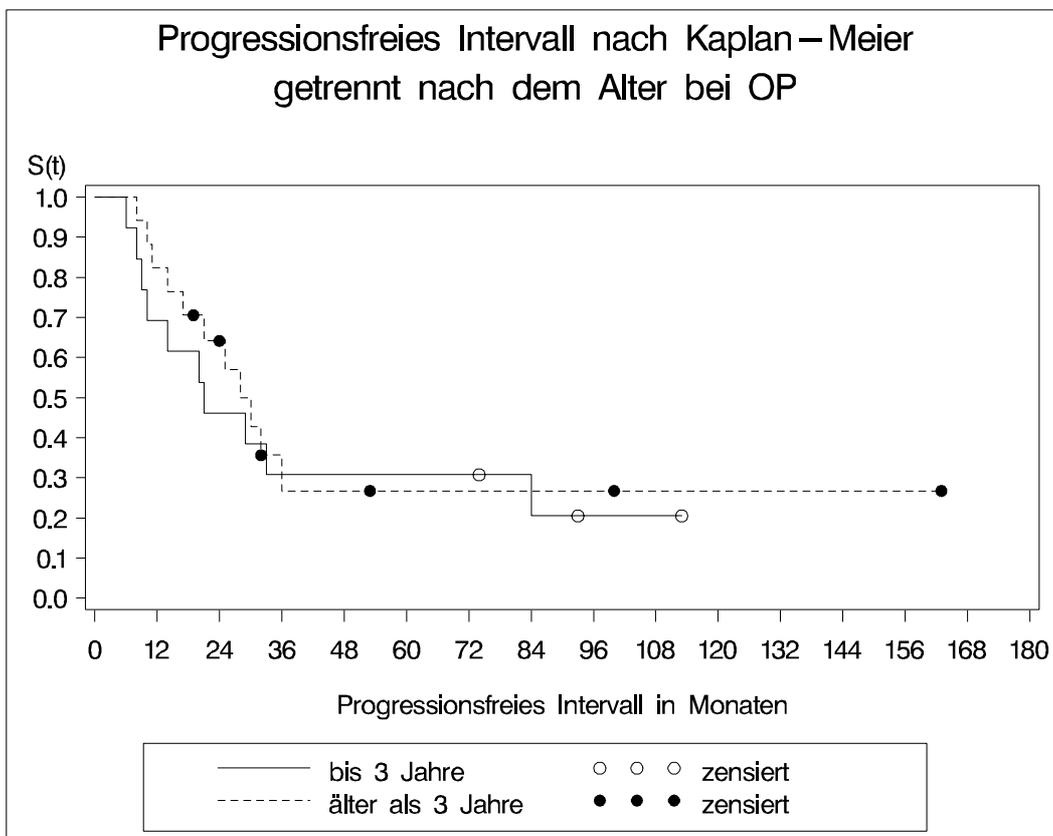
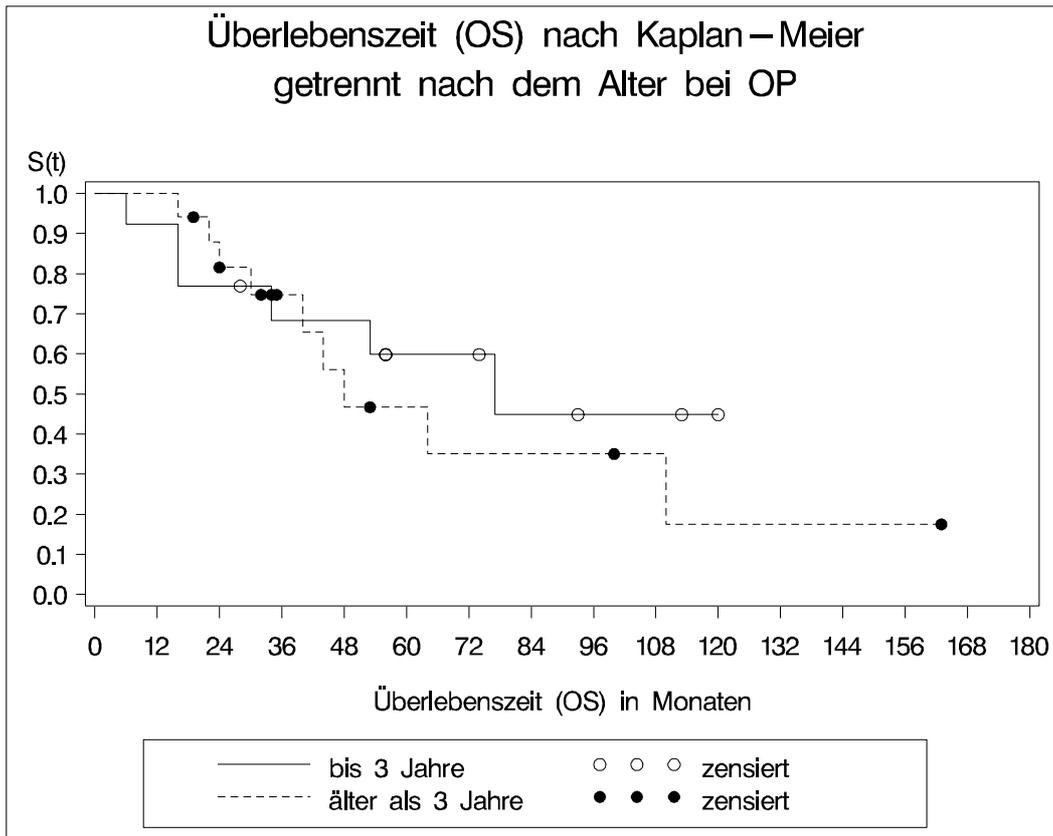


Abbildung Nr. 25 + 26: Beziehung zwischen dem Alter zum Zeitpunkt der Operation des Primärtumors und dem nach Kaplan-Meier geschätzten OS bzw. PFI.

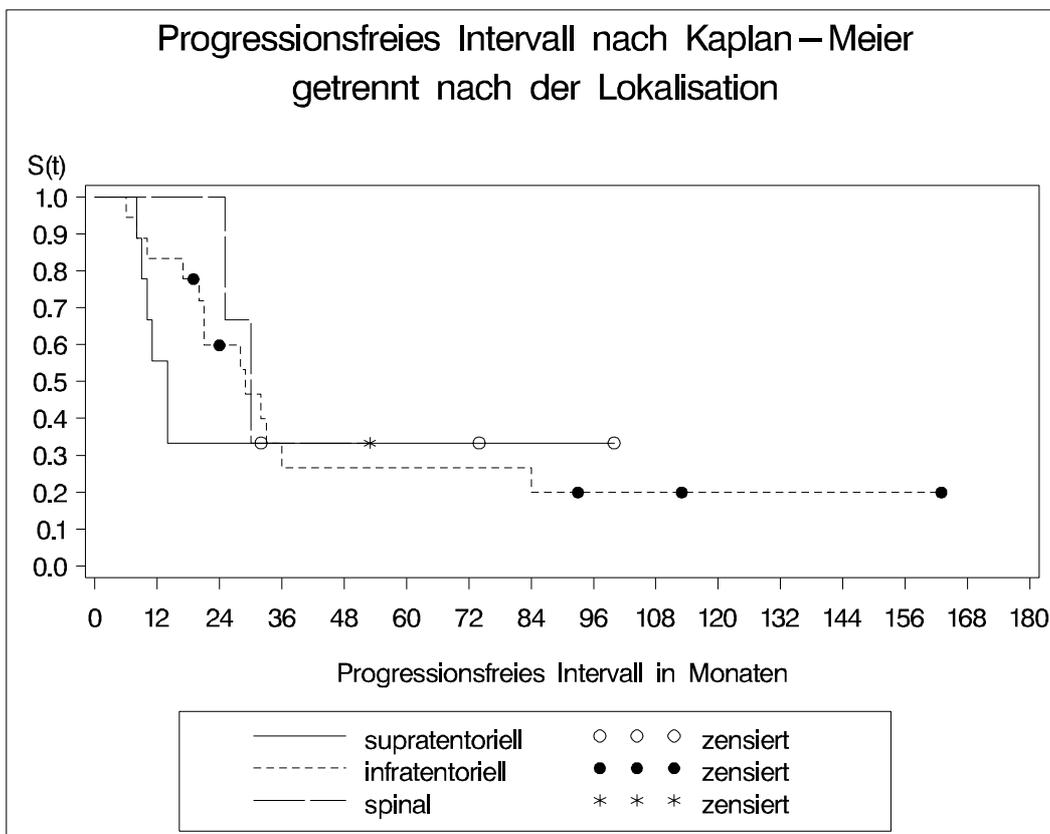
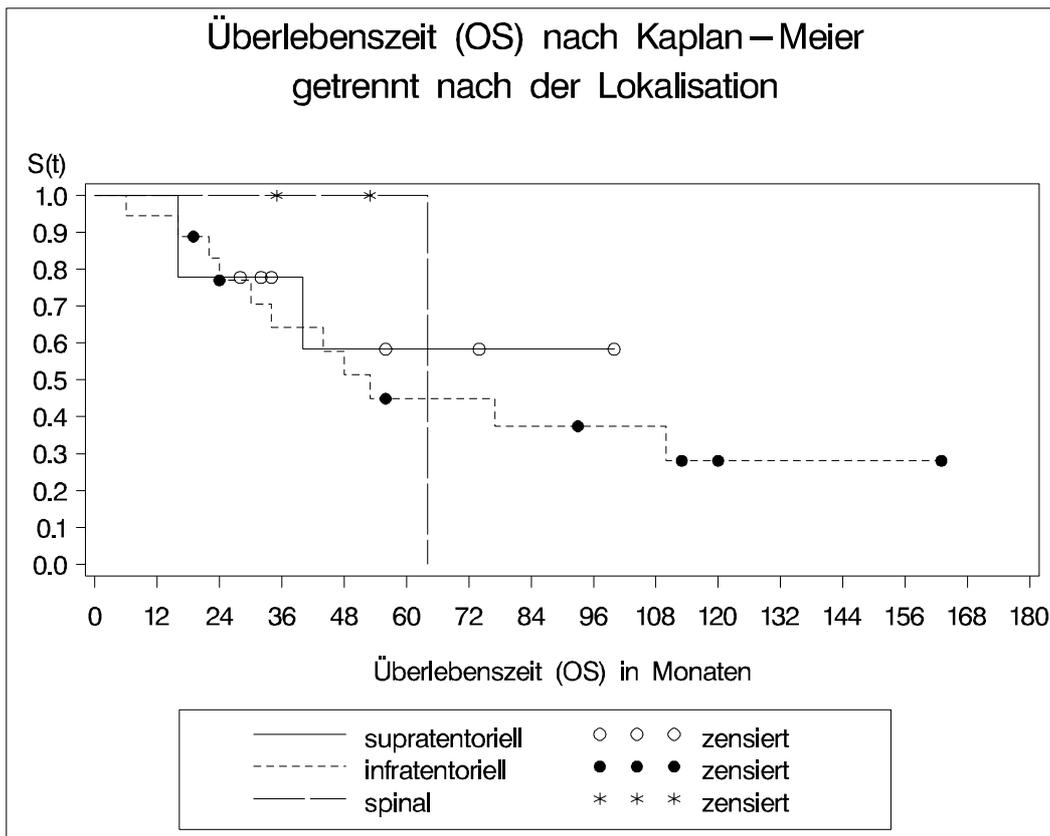


Abbildung Nr. 27 + 28: Beziehung zwischen der Tumorlokalisation und dem nach Kaplan-Meier geschätzten OS bzw. PFI.

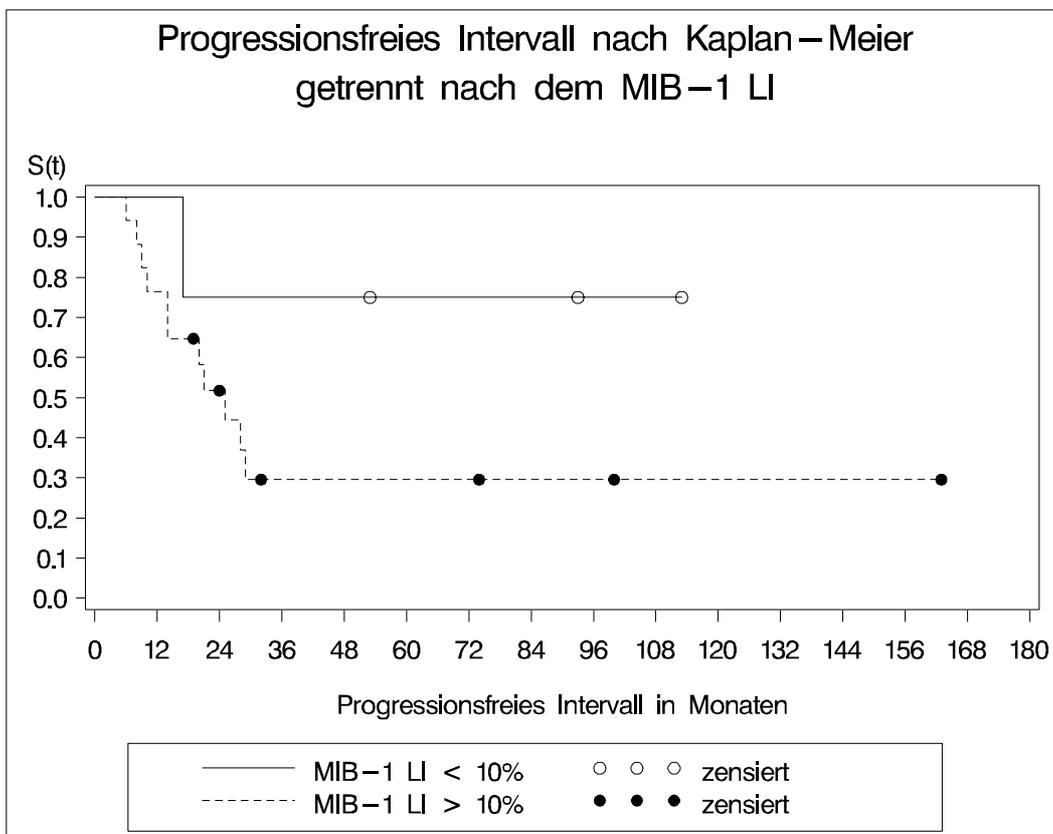
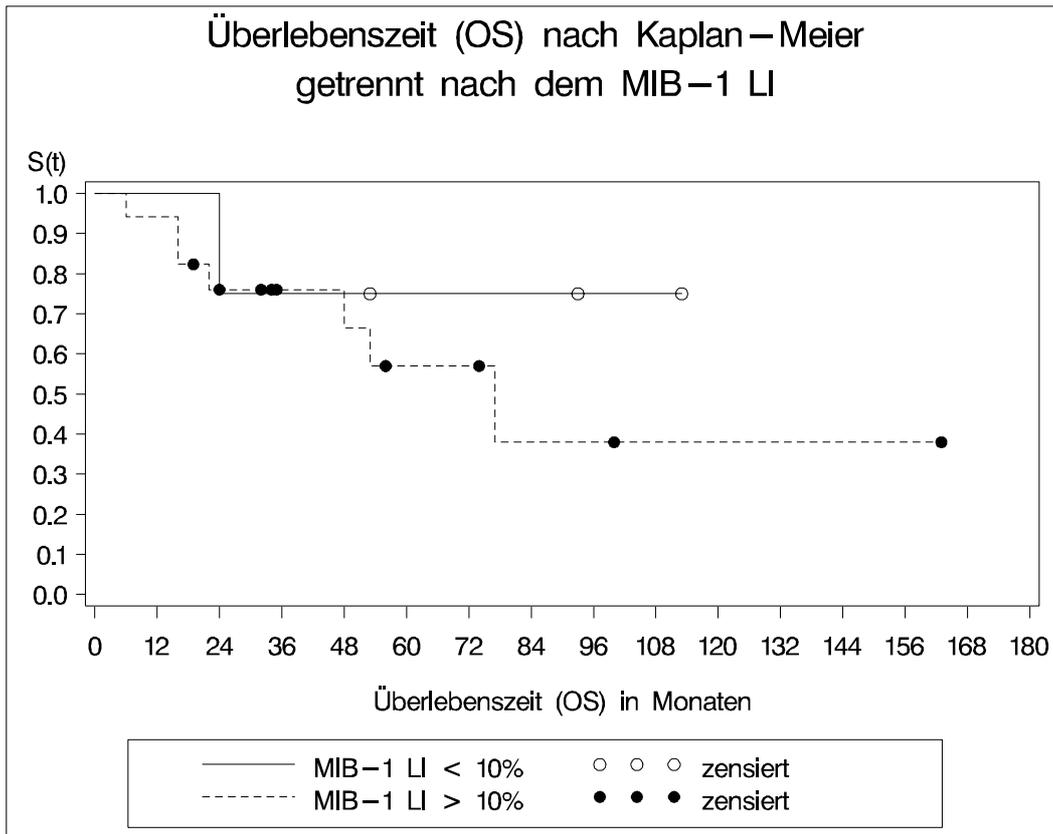


Abbildung Nr. 29 + 30: Beziehung zwischen dem MIB-1 LI und dem nach Kaplan-Meier geschätzten OS bzw. PFI.

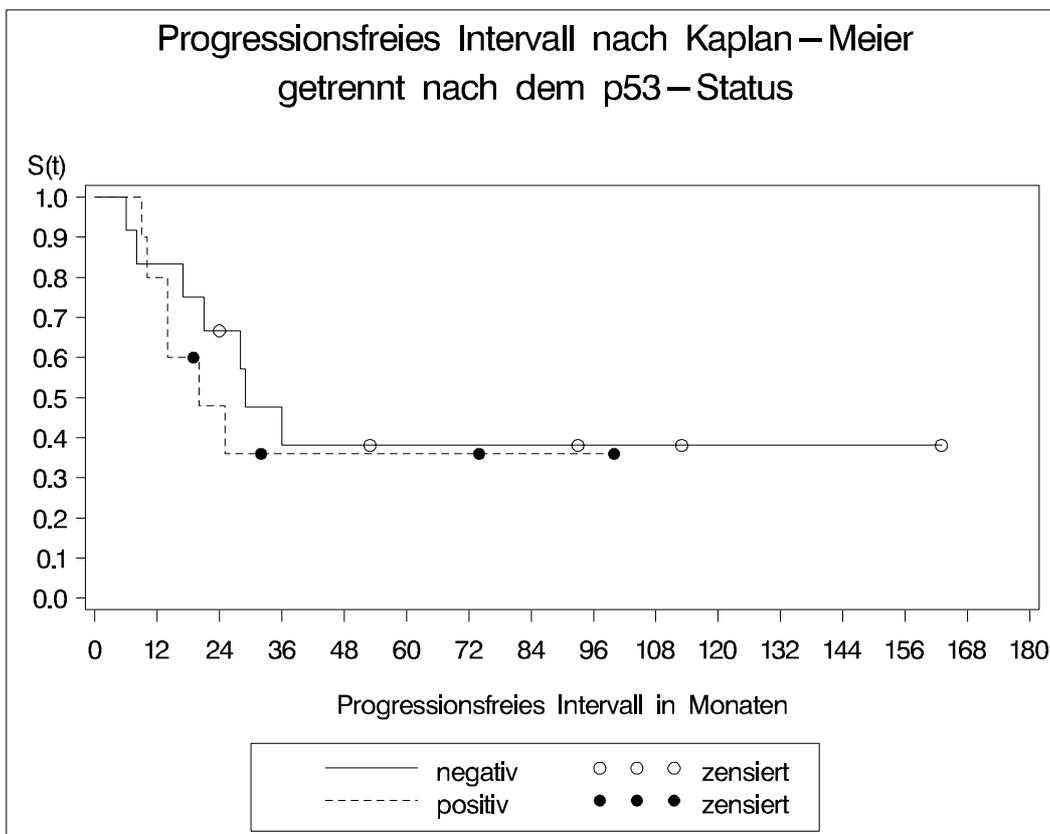
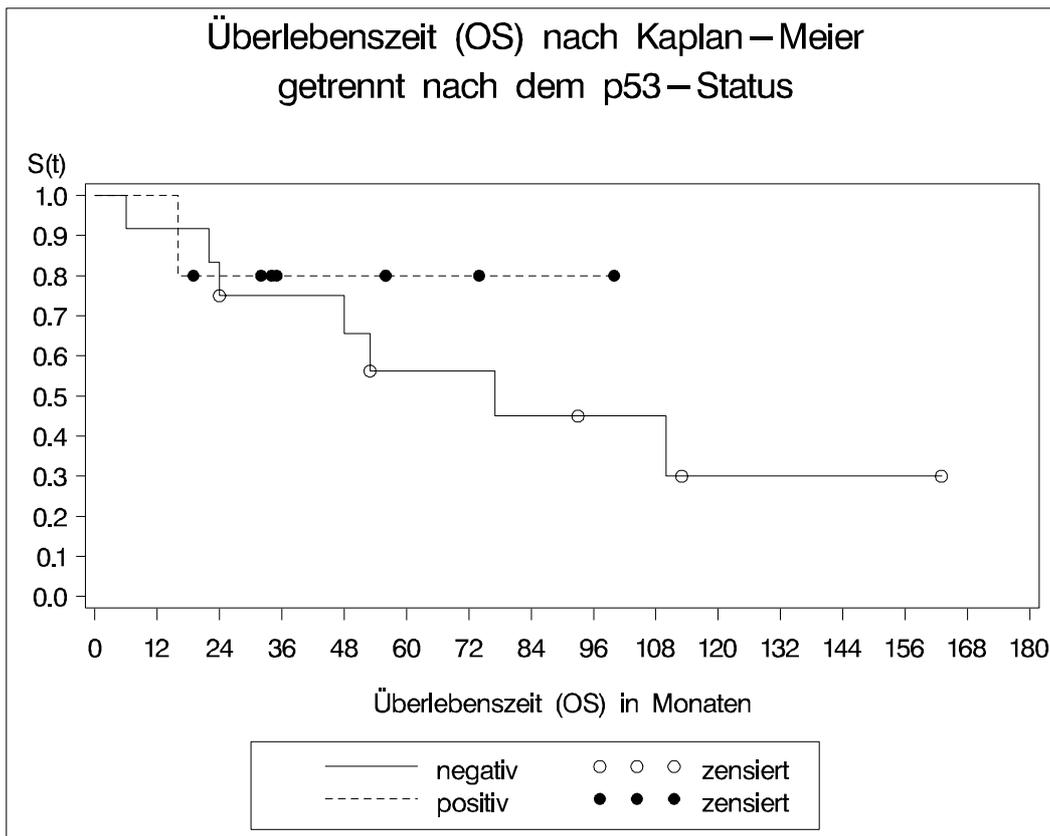


Abbildung Nr. 31 + 32: Beziehung zwischen dem p53-Akkumulation und dem nach Kaplan-Meier geschätzten OS bzw. PFI.

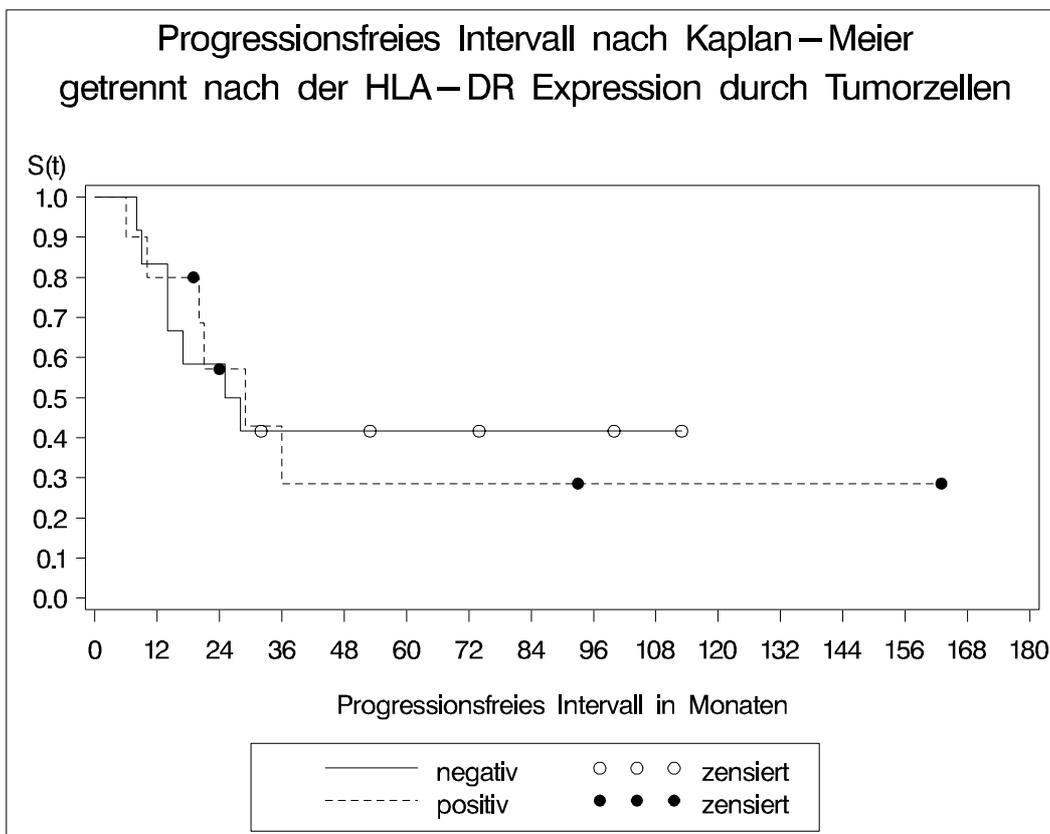
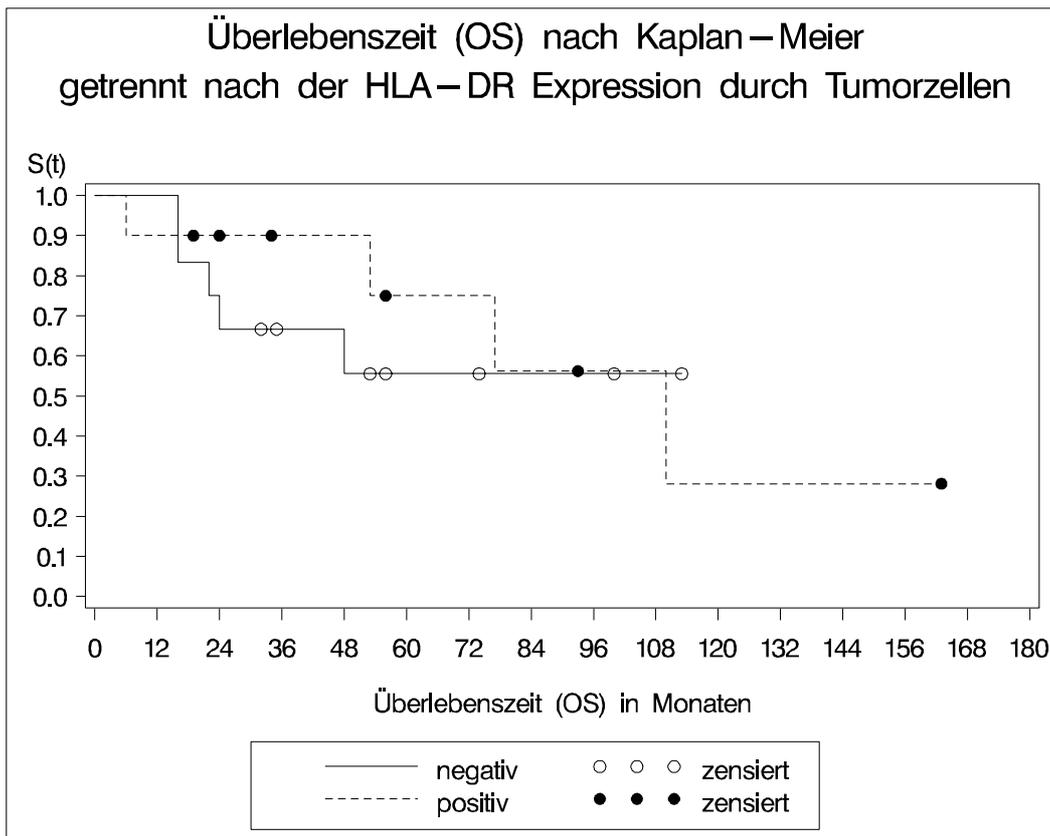


Abbildung Nr. 33 + 34: Beziehung zwischen der HLA-DR Expression und dem nach Kaplan-Meier geschätzten OS bzw. PFI.

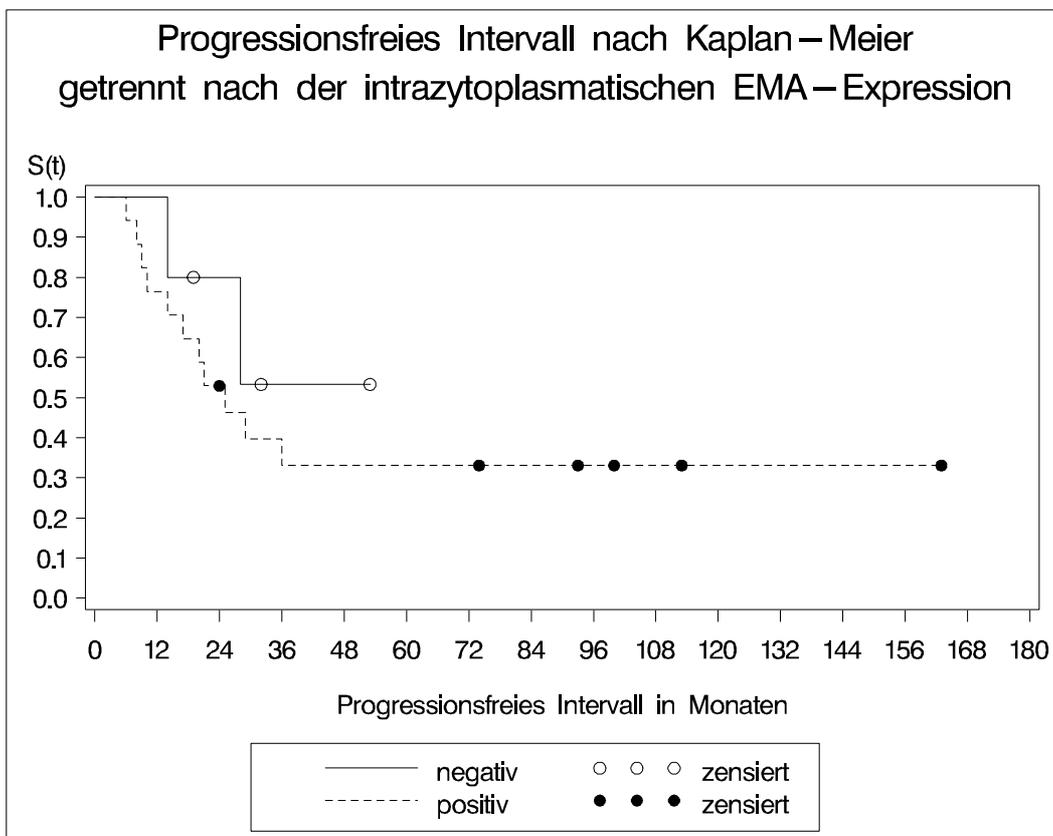
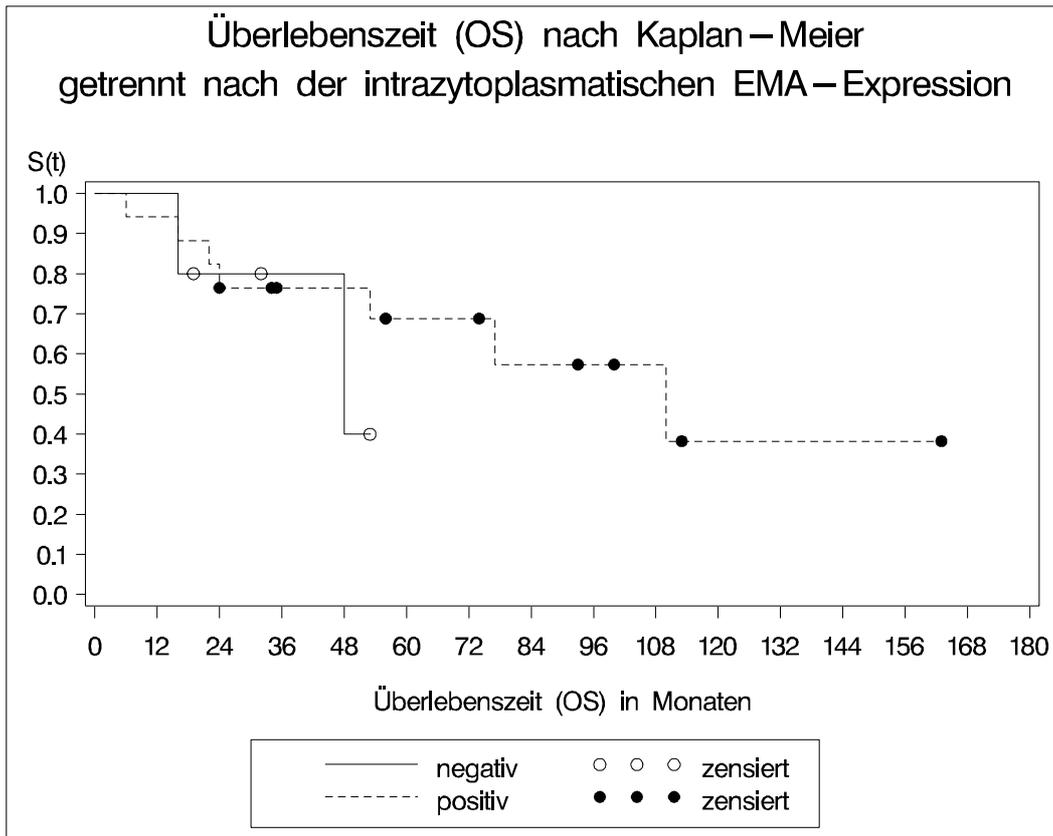


Abbildung Nr. 35 + 36: Beziehung zwischen der intrazytoplasmatischen EMA-Expression und dem nach Kaplan-Meier geschätzten OS bzw. PFI.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden der klinische Verlauf sowie 58 operativ gewonnene Tumorproben von 40 Patienten, die im Kindesalter an einem Ependyom erkrankten, untersucht. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen wurden sowohl untereinander als auch mit den klinischen Befunden korreliert, um eventuelle Assoziationen aufzudecken. Dabei wurde aufgrund der allgemein schlechten und schwer einschätzbaren Prognose von Ependyomen im Kindesalter sowie der umstrittenen klinischen Relevanz des WHO-Graduierungssystems ein Schwerpunkt auf mögliche Zusammenhänge von klinisch-pathologischen Faktoren mit dem WHO-Graduierungssystem einerseits und mit dem Krankheitsverlauf andererseits gelegt. Bei der Berechnung des PFI und des OS sind nach Ausschluss der Patienten mit mE (I), der Operationsletalität und der Fälle, zu denen keine Nachbetreuungsdaten vorliegen, die Fallzahlen jedoch gering und die Aussagekraft der Ergebnisse dadurch einschränkt.

Klinische Daten: Das Geschlechtsverhältnis der dieser Arbeit zugrunde liegenden Patienten ist annähernd gleich verteilt (19 weiblich, 21 männlich) und entspricht Ergebnissen von Schiffer et al. 1991b an insgesamt 298 Ependyomen.

Die Altersverteilung ist mit einem Mittelwert von 61,3 Monaten und einem Median von 41 Monaten mit anderen Untersuchungen vergleichbar: Nazar et al. 1990 (Mittelwert: 70,5 Monate), Perilongo et al. 1997 (Mittelwert: 72 Monate, Median: 63 Monate), Rousseau et al. 1994 (Median: 36 Monate), Horn et al. 1999 (Median: 51,5 Monate), Figarella-Branger et al. 2000 (Median: 48 Monate).

Der Anteil der Ependyome, die operativ total entfernt werden konnten, reiht sich mit 30,8% in der Gruppe der Primärtumoren und 27,3% bei Rezidivtumoren ebenfalls in die Ergebnisse anderer Publikationen ein, in welchen eine totale Resektion in 13% - 50% der Fälle erzielt wurde (Lyons und Kelly 1991, Kovalic et al. 1993, Rousseau et al. 1994, Ferrante et al. 1994, Foreman et al. 1996, Perilongo et al. 1997, McLaughlin et al. 1998, Horn et al. 1999, Prayson 1999). Nur Studien, die lediglich spinale Ependyome untersuchten, berichten von einer totalen Resektion in bis zu 70% der Fälle (Ferrante et al. 1992, Lonjon et al. 1998).

Abweichungen von anderen Studien ergeben sich in der Häufigkeitsverteilung der Lokalisation und des Tumorgrades. Während die Primärtumoren in der vorliegenden

Arbeit zu 22,5% supratentoriell, zu 60,0% infratentoriell und zu 17,5% spinal lokalisiert sind, findet sich bei Schiffer et al. 1991b ein größerer Anteil der insgesamt 108 pädiatrischen Tumoren im supratentoriellen Kompartiment (33,3%) und ein geringerer Anteil spinal (10,2%). Infratentoriell treten in der genannten Publikation 56,5% der Ependymome auf. Der größere spinale Anteil in der vorliegenden Arbeit lässt sich darauf zurückführen, dass im Gegensatz zu Schiffer et al. 1991b in der vorliegenden Arbeit auch mE (I) untersucht wurden. Für das geringere Auftreten supratentorieller Ependymome ist kein Grund ersichtlich. Auch andere Studien, die in der Regel lediglich intrakranielle Ependymome untersuchten, geben die Häufigkeit supratentorieller Ependymome mit 32,4% - 42,1% an (Needle et al. 1997, Perilongo et al. 1997, Robertson et al. 1998, Sala et al. 1998, Figarella-Branger et al. 2000). Der Unterschied zu den eigenen Ergebnissen lässt sich nur teilweise damit begründen, dass auch spinale Ependymome berücksichtigt wurden.

Weiterhin fällt das im Vergleich zu den meisten Studien annähernd umgekehrte Häufigkeitsverhältnis der Tumorgrade II und III nach WHO auf. Während in der vorliegenden Arbeit E (II) in einer Häufigkeit von nur 40,0% und aE (III) in einer Häufigkeit von 52,5% auftreten, liegen die Angaben der meist nur an intrakraniellen Ependymomen durchgeführten Studien zwischen 52,6% und 66% für E (II) und zwischen 34% und 47,4% für aE (III) (Needle et al. 1997, Perilongo et al. 1997, Robertson et al. 1998, Sala et al. 1998, Horn et al. 1999).

Ependymome weisen mit 50% - 70% eine hohe Rezidivwahrscheinlichkeit auf (Pollack et al. 1995, Foreman et al. 1996, Bouffet et al. 1998, McLaughlin et al. 1998, Horn et al. 1999, Figarella-Branger et al. 2000). Auch in der vorliegenden Arbeit erkrankten 21 der 33 (63,6%) Patienten, deren klinischer Verlauf nachverfolgt werden konnte, im Beobachtungszeitraum an einem oder mehreren Rezidiven. Das mittlere Intervall zwischen Primärtumor und dem erstem Rezidivereignis liegt bei diesen Patienten bei 22,5 Monaten (Median: 20 Monate). In anderen Studien wird das mediane Intervall mit Werten zwischen 13 und 25 Monaten angegeben (Healey et al. 1991, Chiu et al. 1992, Rousseau et al. 1993, Pollack et al. 1995, Foreman et al. 1996). Der zeitliche Abstand zwischen Primärtumor und erstem Rezidiv ist, wie von Pollack et al. 1995 und Foreman et al. 1996 beschrieben, in beinahe allen Fällen \leq 36 Monate. Lediglich Patient 22 (infratentorielles aE (III)) erkrankte erst nach 84 Monaten an einem Rezidiv. Viele der

Primärtumoren mit dem Tumorgrad II konvertieren im Rahmen einer Progression zu einem maligneren histomorphologischen Erscheinungsbild. So stellt sich die Verteilung des Tumorgrades nach WHO in der Gruppe der Rezidivtumoren wie folgt dar: 6,1% mE (I), 18,2% E (II) und 75,8% aE (III).

Statistisch signifikante Korrelationen ergeben sich zwischen der Lokalisation des Tumors und dem Tumorgrad nach WHO sowie dem Alter. Demnach kommen aE (III) von spinal über infratentoriell nach supratentoriell mit zunehmender Häufigkeit vor ($p=0.0001$ bei allen untersuchten Tumoren). In der Gruppe der Primärtumoren ist dieser Zusammenhang mit $p=0.0022$ stärker ausgeprägt als bei Rezidivtumoren ($p=0.023$). Ähnliche Zusammenhänge konnten auch Rousseau et al. 1993, Ernestus et al. 1996 und Korshunov et al. 2000 an intrakraniellen Ependymomen feststellen. Mit zunehmendem Alter verschiebt sich außerdem das Häufigkeitsverhältnis von intrakraniell nach spinal ($p<.0001$ in der Gruppe aller untersuchten Tumoren sowie bei Primärtumoren, $p=0.0021$ bei Rezidivtumoren). Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Tumorgrad und Alter zum Zeitpunkt der Tumorerkrankung liegt nicht vor ($p=0.10$).

Eine prognostische Bedeutung kommt von den klinischen Variablen in der dieser Arbeit zugrunde liegenden Patientengruppe lediglich dem Resektionsausmaß zu. Ein signifikanter Unterschied ergibt sich hierbei im mittleren PFI, das in der Gruppe der Patienten mit totaler Resektion des Primärtumors jenseits des Beobachtungszeitraumes dieser Patienten liegt, bei Patienten mit inkompletter Resektion bei 21 Monaten ($p=0.035$). Auch das OS unterscheidet sich in den beiden Gruppen deutlich (110 Monate nach totaler Resektion, 44 Monate nach inkompletter Resektion), Signifikanz wird hier jedoch nicht erreicht ($p=0.12$). Dies bestätigt den ausgesprochen wichtigen prognostischen Stellenwert einer totalen Resektion, wie bereits in zahlreichen Studien gezeigt wurde (Nazar et al. 1990, Healey et al. 1991, Rousseau et al. 1994, Pollack et al. 1995, Ernestus et al. 1997, Perilongo et al. 1997, Sala et al. 1998, Horn et al. 1999, Figarella-Branger et al. 2000, Spagnoli et al. 2000, Timmermann et al. 2000).

Die Erkrankung an einem Ependymom in den ersten Lebensjahren nimmt im Vergleich zu älteren Kindern in einigen Studien bei nicht einheitlicher Altersgrenze zwischen 2 und 5 Jahren einen zumindest grenzwertig signifikant schlechteren Verlauf (Nazar et al. 1990, Chiu et al. 1992, Rousseau et al. 1994, Pollack et al. 1995, Perilongo et al. 1997, Sala et al. 1998, Horn et al. 1999, Figarella-Branger et al. 2000). Die häufigste

Altersgrenze (Patienten bis 3 Jahre versus Kinder älter als 3 Jahre) wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet und es zeigt sich im Gegensatz zu den genannten Studien kein vom Alter der Patienten abhängiger Krankheitsverlauf. Nur einzelne Publikationen berichten ebenfalls, dass jüngere Patienten keine schlechtere Prognose als ältere aufweisen (Foreman et al. 1996, Robertson et al. 1998, Timmermann et al. 2000). Zwischen dem Tumorgrad nach WHO und der Prognose besteht im untersuchten Kollektiv keine Assoziation. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen anderer Studien (Lyons und Kelly 1991, Foreman et al. 1996, Needle et al. 1997, Duffner et al. 1998, Robertson et al. 1998, Sala et al. 1998). Allerdings konnte in weiteren Publikationen von einem statistisch signifikanten Einfluss des Tumorgrades auf den Krankheitsverlauf berichtet werden (Kovalic et al. 1993, Ernestus et al. 1997, Perilongo et al. 1997, Horn et al. 1999, Korshunov et al. 2000). Die Frage der klinischen Relevanz der WHO-Graduierung bleibt damit ungelöst.

Eine Abhängigkeit des klinischen Verlaufs von der Tumorlokalisation zeigt sich ebenfalls nicht. Demgegenüber steht die in einigen Untersuchungen festgestellte, schlechtere prognostische Einschätzung infratentorieller Ependymome. Die von der Lokalisation abhängigen Unterschiede im klinischen Verlauf erreichen jedoch meist keine statistische Signifikanz (Chiu et al. 1992, Pollack et al. 1995, Foreman et al. 1996, Needle et al. 1997, Perilongo et al. 1997, Sala et al. 1998, Figarella-Branger et al. 2000).

p53-Akkumulation: Die meisten Studien, die sich der Untersuchung des p53-Status von Ependymomen widmeten, konnten lediglich einzelne Fälle mit einer TP53-Mutation (Ohgaki et al. 1991, Wu et al. 1993, Felix et al. 1995, Tominaga et al. 1995, Fink et al. 1996, Orellana et al. 1998, Tong et al. 1999, Zhou et al. 1999) bzw. einer p53-Akkumulation nachweisen (Barbareschi et al. 1992, Karamitopoulou et al. 1993, Soini et al. 1994, Ng et al. 1994, Kuchelmeister et al. 1995, Prayson 1997, Suzuki und Iwaki 2000). TP53-Mutationen spielen abweichend von vielen anderen Neoplasien bei Ependymomen der Meinung der genannten Autoren nach wenn überhaupt nur eine untergeordnete Rolle. Einzig zwei neuere Studien (Rushing et al. 1998 und Korshunov et al. 2000) konnten in 27,3% bzw. 25,9% eine p53-Akkumulation in ependymalen Tumoren aufzeigen. Weit über diesen Ergebnissen liegt die mit 56,9% ermittelte Immunpositivität in den Tumorproben, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

Übereinstimmungen zeigen sich in der Verteilung der immunpositiven Fälle. Sowohl in den Untersuchungen von Rushing et al. 1998 und Korshunov et al. 2000 als auch in der vorliegenden Arbeit besteht eine Korrelation mit dem WHO-Graduierungssystem. Eine p53-Akkumulation findet sich gehäuft (p53* = Unterscheidung in negative und positive Fälle) und in zunehmendem Ausmaß (p53 = Differenzierung der positiven Fälle in +, ++, +++) in aE (III) (p53*: $p=0.0006$, p53: $p<.0001$ in der Gruppe aller untersuchten Tumorproben). Im Einklang mit den genannten Studien steht außerdem die Korrelation der p53-Akkumulation mit dem Proliferationsverhalten. Mit zunehmender p53-Immunpositivität (p53) geht ein steigender MIB-1 LI einher ($p=0.0001$ in der Gruppe aller untersuchten Tumorproben). Die Korrelation der p53-Akkumulation mit dem MIB-1 LI könnte Korshunov et al. 2000 zufolge ein aggressiveres biologisches Verhalten von p53-immunpositiven Ependymomen durch das gleichzeitig vorliegende, intensivere Wachstumsverhalten hochmaligner Zellklone erklären. Rushing et al. 1998 halten aufgrund dieser Zusammenhänge den MIB-1 LI und eine p53-Immunpositivität als objektive Indikatoren anaplastischer Ependymome (WHO Grad III).

Der Zusammenhang von p53-Akkumulation und MIB-1 LI könnte auch die Diskrepanz in der Häufigkeit der p53-Akkumulation erklären. In beiden erwähnten Studien wurden Ependymome des Kindes- und Erwachsenenalters untersucht. In Ependymomen des Kindesalters liegt jedoch eine höhere Proliferationsaktivität als in Ependymomen des Erwachsenenalters vor (Ritter et al. 1998, Korshunov et al. 2000). Bei einer Untersuchung ausschließlich kindlicher Ependymome könnte daher die Korrelation von MIB-1 LI und p53-Akkumulation zu einer vermehrten p53-Akkumulation führen.

Eine statistisch signifikante, negative Korrelation besteht zwischen dem Ausmaß der p53-Akkumulation und dem prozentualen Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtzellzahl am Ort der höchsten Proliferation ($p=0.038$ bei Primärtumoren, $p=0.037$ in der Gruppe aller untersuchten Tumoren, jedoch keine Korrelation bei Rezidivtumoren). Dies bedeutet, dass mit zunehmender p53-Akkumulation ein geringerer prozentualer Anteil von MG/Makrophagen an der Gesamtzellzahl am Ort der höchsten Proliferation und damit möglicherweise eine verminderte immunologische Tumorabwehr vorliegt. Von diesem Zusammenhang wird erstmals berichtet.

Die außerdem beobachtete Korrelation zwischen dem Ausmaß einer p53-Akkumulation und der Lokalisation, derzufolge stärker p53-positive Fälle von spinal über

infratentoriell nach supratentoriell in ihrer Häufigkeit zunehmen ($p=0.014$ bei Primärtumoren, $p=0.044$ in der Gruppe aller untersuchten Tumoren, keine Korrelation bei Rezidivtumoren), kann im Zusammenhang mit dem in gleicher Weise supratentoriell vermehrt auftretenden Tumorgrad III nach WHO (s.o.) und der Korrelation der p53-Immunpositivität mit dem Tumorgrad gesehen werden.

Die Frage der Ursache und die Bedeutung einer p53-Akkumulation in Tumorzellen sowie insbesondere die Gültigkeit von Rückschlüssen auf Mutationen im TP53-Gen sind bisher nicht geklärt. Ungeachtet dessen nimmt eine p53-Akkumulation v.a. in astrozytären (Soini et al. 1994, Pollack 1997, Korkolopoulou et al. 1997), aber auch in ependymalen Neoplasien (Korshunov et al. 2000) einen prognostische Stellenwert ein. Korshunov et al. 2000 erklären dies durch den dargestellten Zusammenhang zwischen p53-Akkumulation und dem Proliferationsverhalten. Allerdings konnte in dieser Arbeit trotz der vorliegenden Korrelationen zwischen der p53-Akkumulation und der Proliferationsaktivität sowie dem WHO-Graduierungssystem und trotz Hinweisen auf eine möglicherweise eingeschränkte immunologische Tumorabwehr in Verbindung mit einer p53-Akkumulation kein Zusammenhang zwischen dem p53-Status und dem klinischen Verlauf festgestellt werden.

Proliferationsaktivität (MIB-1 LI und MG/Makrophagen-Proliferation): Die in einem Tumor vorliegende Proliferationsaktivität wird allgemein als wichtiger Faktor für die Einschätzung des biologischen Verhaltens und damit der Prognose angesehen. Dies trifft, wie Follow-up-Studien von Rezai et al. 1996, Ritter et al. 1998, Bennetto et al. 1998, Prayson 1999, Figarella-Branger et al. 2000, Spagnoli et al. 2000 und Korshunov et al. 2000 belegen, auch auf Ependymome zu. Eine höhere Proliferationsaktivität geht demnach mit einer schlechteren Prognose einher.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Proliferationsaktivität mit Hilfe des Antikörpers MIB-1 bestimmt. Die ermittelten Labeling Indices liegen in einem Bereich zwischen 1,4% und 63,3% (Mittelwert: 21,8%, Median: 19,8%). Beinahe identische Werte finden sich in einer Studie an 74 infratentoriellen Ependymomen des Kindesalters von Bennetto et al. 1998. Ähnlich weit gestreut zeigen sich die Labeling Indices auch bei Rushing et al. 1997 und 1998, Ritter et al. 1998 und Bouvier-Labit et al. 1999. Die letztgenannten Studien untersuchten jedoch Ependymome sowohl des Kindes- als auch

des Erwachsenenalters, was zu einem niedrigeren Mittelwert bzw. Median führte, da entsprechend Ritter et al. 1998 und Korshunov et al. 2000 bei kindlichen Ependymomen höhere Proliferationsindices vorliegen. Entsprechend lassen sich deutlich niedrigere Labeling Indices in Studien von Schröder et al. 1993, Prayson 1998 und 1999 erklären.

Ein deutlicher Zusammenhang besteht zwischen MIB-1 LI und dem Tumorgrad nach WHO ($p < .0001$ in der Gruppe aller untersuchten Tumoren), signifikant häufiger kommen hohe Labeling Indices in aE (III) vor. Dies wurde in der Vergangenheit mehrfach beobachtet (Schröder et al. 1993, Rezai et al. 1996, Rushing et al. 1997 und 1998, Prayson 1998). Die Korrelation des MIB-1 LI mit dem Tumorgrad und die Korrelation des Tumorgrades mit der Lokalisation können auch den Zusammenhang zwischen MIB-1 LI und der Lokalisation ($p = 0.033$ bei Primärtumoren) erklären.

Das inzwischen mehrfach angesprochene unterschiedliche Proliferationsverhalten von Ependymomen des Kindes- und Erwachsenenalters setzt sich auch innerhalb der Gruppe kindlicher Ependymome fort. So besteht ein die Signifikanzgrenze knapp verfehlender negativer Zusammenhang zwischen dem Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und einem MIB-1 LI $< 10\%$ bzw. $\geq 10\%$ ($p = 0.059$). Dies bedeutet, dass MIB-1 Labeling Indices $\geq 10\%$ mit zunehmendem Alter auch bei Kindern seltener vorkommen.

Unter den Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen nimmt lediglich der MIB-1 LI eine prognostische, jedoch nicht signifikante Rolle ein. Während bei Vorliegen eines MIB-1 LI $\geq 10\%$ das mittlere PFI 25 Monaten beträgt, liegt es bei MIB-1 LI $< 10\%$ jenseits des Beobachtungszeitraumes der entsprechenden Patienten ($p = 0.17$). Der Unterschied im mittleren OS ist wenngleich klinisch bedeutend statistisch von geringer Relevanz (MIB-1 LI $\geq 10\%$: 77 Monate, MIB-1 LI $< 10\%$: jenseits des Beobachtungszeitraumes, $p = 0.39$). Die besondere Bedeutung der Proliferationsaktivität in der prognostischen Einschätzung und für das therapeutische Procedere bei Ependymomen wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstrichen.

In dieser Arbeit wurde auch das Proliferationsverhalten von Zellen des MG/Makrophagen-Systems in Ependymomen untersucht. Soweit bekannt liegen hierzu bisher keine Mitteilungen vor. In 80,4% der untersuchten Ependymome fanden sich am Ort der höchsten Proliferation einzelne proliferierende Zellen des MG/Makrophagen-Systems. Der prozentuale Anteil dieser Zellen an der Gesamtproliferation korreliert negativ mit dem MIB-1 LI ($p < .0001$ bei Rezidivtumoren und in der Gruppe aller

untersuchten Tumoren). Je höher der MIB-1 LI, desto geringer ist demnach der Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtproliferation. In der Gruppe der Primärtumoren wird die Signifikanzgrenze jedoch nicht erreicht ($p=0.064$). Die absolute Anzahl proliferierender Zellen des MG/Makrophagen-Systems ist jedoch von einzelnen Extremwerten abgesehen weitgehend konstant gering und der prozentuale Anteil damit naturgemäß stark von der Gesamtproliferation abhängig. Ein Zusammenhang zwischen dem Tumorgrad nach WHO und dem prozentualen Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtproliferation existiert nicht. Proliferierende MG kann demzufolge in ependymalen Tumoren nicht wie dies bei astrozytären Neoplasien durch Klein und Roggendorf 2001 nachgewiesen wurde als weiteres Differenzierungskriterium der Tumorgrade nach WHO angesehen werden.

Ein weiterer Zusammenhang konnte für die MG/Makrophagen-Proliferation und den prozentualen Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtzellzahl am Ort der höchsten Proliferation aufgedeckt werden ($p<.0001$ bei Rezidivtumoren und in der Gruppe aller untersuchten Tumoren, $p=0.049$ bei Primärtumoren). Diese Korrelation stützt die mehrheitlich akzeptierte These, dass im Rahmen pathologischer Prozesse, speziell auch bei Tumorerkrankungen, eine Aktivierung der MG erfolgt und die Zunahme der MG im Rahmen der Aktivierung durch eine Rekonversion und Proliferation ortständiger MG hervorgerufen wird (Graeber et al. 1988, Kreutzberg 1996, Streit et al. 1999).

Negativ hängen der MIB-1 LI und der prozentuale Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtzellzahl am Ort der höchsten Proliferation zusammen ($p=0.0008$ bei allen untersuchten Tumoren, $p=0.0056$ bei Rezidivtumoren, nicht signifikant bei Primärtumoren: $p=0.12$). Dies bedeutet, dass am Ort der höchsten Proliferation mit zunehmendem MIB-1 LI ein geringerer Anteil der Gesamtzellzahl durch MG/Makrophagen gestellt wird. Möglicherweise liegen in Tumoren mit hoher Proliferationsaktivität Umstände vor, die zu einer Unterdrückung der MG/Makrophagen bzw. der immunologischen Tumorabwehr führen und eventuell daraus resultierend ein starkes Tumorwachstum erlauben.

EMA-Expression: Die Expression des Epithelialen Membran Antigens (EMA) wird von Cruz-Sanchez et al. 1988 und Uematsu et al. 1989 als Kriterium einer hohen Differenzierung von Ependymomen angesehen. Entsprechend der dieser Arbeit

zugrunde liegenden Ergebnisse kann dies für die luminale Membranpositivität bestätigt werden. Eine Korrelation der luminale Membranpositivität mit Ependymomen (WHO Grad II) lässt sich jedoch nicht feststellen. Als Grund hierfür ist insbesondere die heterogene Zytoarchitektur ependymaler Neoplasien anzuführen. Auch aE (III) weisen häufig Areale mit hohem Differenzierungsniveau auf, in welchen epitheliale Strukturen wie echte ependymale Rosetten mit einer entsprechenden EMA-Expression vorkommen können. Auch die verschiedenen intrazytoplasmatischen Expressionsformen, deren Auftreten nicht an das Vorhandensein ependymaler Strukturen gebunden ist, liegen sowohl in E (II) als auch in aE (III) vor.

Das in der vorliegenden Arbeit beobachtete Expressionsmuster entspricht weitgehend dem einheitlich publizierten Muster in glandulären Organen sowie im nicht pathologisch veränderten Ependym (Uematsu et al. 1989). Zusätzlich wurde intrazytoplasmatisch eine eher diffuse, großflächige Expression aufgefunden. Die häufig fließenden Übergänge zwischen den einzelnen intrazytoplasmatischen Expressionsformen und die dadurch teilweise willkürliche Zuordnung stellt den Sinn und die Reproduzierbarkeit einer Differenzierung der einzelnen intrazytoplasmatischen Expressionsformen jedoch in Frage.

Die Häufigkeit einer EMA-Expression in Ependymomen liegt mit 84,5% weit über den Angaben in entsprechenden Publikationen (0% bei Doglioni et al. 1987, 68,8% bei Uematsu et al. 1989, 23,7% bei Kaneko et al. 1990, 37,5% bei Figarella-Branger et al. 1991). Dies lässt sich am ehesten durch methodische Unterschiede in der Durchführung der Immunperoxidase-Färbung erklären. Alle veröffentlichten Studien wurden vor der durch Shi et al. 1991 eingeführten thermischen Antigen-Demaskierung durchgeführt, weshalb möglicherweise falsch negative Befunde erhoben wurden. Weiterhin kann auch die Anwendung unterschiedlicher monoklonaler Antikörper verantwortlich für divergente Ergebnisse sein, was Figarella-Branger et al. 1991 als denkbare Ursache abweichender Studienergebnisse im Nachweis von EMA diskutiert.

An diversen Tumoren konnten Sloane et al. 1980 und Sloane und Ormerod 1981 eine zunehmende Häufigkeit der intrazytoplasmatischen EMA-Expression mit ansteigendem Tumorgrad feststellen. Dies trifft für die in dieser Arbeit untersuchten Ependymome zu und erreicht bei undifferenzierter Wertung der intrazytoplasmatischen Immunpositivität statistische Signifikanz ($p=0.0099$). Jedoch ist der Unterschied in der Häufigkeit der

intrazytoplasmatischen EMA-Expression mit 66,7% in E (II) und 80,5% in aE (III) klein, so dass die differentialdiagnostische Bedeutung als gering einzustufen ist. Größere Bedeutung kommt möglicherweise den signifikanten Zusammenhängen der diffusen intrazytoplasmatischen EMA-Expression und der nicht differenzierten intrazytoplasmatischen EMA-Expression mit MIB-1 Labeling Indices >10% (EMA diffus: $p=0.012$, EMA intra-gesamt: $p=0.020$) und einer HLA-DR Expression (EMA diffus: $p<0.0001$, EMA intra-gesamt: $p=0.0010$) zu. Intrazytoplasmatische EMA-Expression steht außerdem bei Primärtumoren in einem umgekehrten Verhältnis zum Alter der Patienten ($p=0.0090$). Wegen der schon erwähnten fließenden Übergänge wurden für die Überlebenszeitberechnungen nur das nicht weiter differenzierte Vorliegen einer intrazytoplasmatischen EMA-Expression verwendet. Ein Einfluss dieser intrazytoplasmatischen EMA-Expression auf den klinischen Verlauf existiert im untersuchten Patientenkollektiv nicht. Damit kommt einer EMA-Expression aufgrund der vorliegenden Ergebnisse anders als bei Figarella-Branger et al. 1991 keine Rolle in der Einschätzung des Tumorverhaltens und der Prognose kindlicher Ependymome zu. Die Bedeutung einer EMA-Expression und der unterschiedlichen Expressionsformen im Rahmen einer Ependymomkrankung bleibt daher weiterhin ungeklärt. Eine EMA-Expression kann aber, wie dies in einschlägigen Lehrbücher angeführt wird (Burger und Scheithauer 1994, McLendon et al. 1998), als eines der differentialdiagnostischen Charakteristika ependymaler Tumoren angesehen werden.

MG/Makrophagen-Verteilung: Das in der vorliegenden Arbeit beobachtete heterogene Verteilungsmuster und die häufig anzutreffende septale Anordnung von MG/Makrophagen in Ependymomen beschrieben auch Roggendorf et al. 1996, die erstmals eine differenzierte Beurteilung der MG/Makrophagen-Verteilung in Hirntumoren, u.a. auch in 11 ependymalen Tumoren, vornahm. In der genannten Publikation wurde im Vergleich zu E (II) eine erhöhte MG/Makrophagen-Anzahl in aE (III) beobachtet. Dies lässt sich durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht bestätigen. Im Gegenteil ist der am Ort der höchsten Proliferation bestimmte prozentuale Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtzellzahl in aE (III) mit 5,5% geringer als in E (II) mit 8,5%. In der Gruppe aller untersuchten Tumoren und bei Rezidivtumoren erreicht dies auch statistische Signifikanz ($p=0.0046$ bzw. $p=0.019$),

jedoch nicht bei Primärtumoren ($p=0.14$). In Primärtumoren des Tumorgrades II zeigen sich in Arealen niedriger MG/Makrophagen-Dichte außerdem durchschnittlich mehr Zellen des MG/Makrophagen-Systems als in aE (III). In Arealen hoher Dichte existiert diesbezüglich kein Unterschied. Diese von Roggendorf et al. 1996 abweichenden Ergebnisse können einerseits Folge eines größeren Untersuchungskollektivs und der Beschränkung auf kindliche Ependymome sein, andererseits wurden die Auswertungsbereiche in unterschiedlicher Weise festgelegt. Während bei Roggendorf et al. 1996 im Tumorzentrum und in der Tumorperipherie ausgewertet wurde, fand dies in der vorliegenden Arbeit an einem Ort hoher und niedriger MG/Makrophagen-Dichte statt, außerdem am Ort der höchsten Tumorpheriferation. Eine Auswertung gemäß Roggendorf et al. 1996 erschien nicht sinnvoll, da von den wenigsten Tumoren ausreichend große Tumoranteile zur Untersuchung zur Verfügung standen.

Es liegt nahe, die Zunahme des prozentualen sowie absoluten Anteils der amöboiden MG und der Makrophagen in Arealen hoher MG/Makrophagen-Dichte und im an den Tumor angrenzenden Hirngewebe dem Konzept der funktionellen Plastizität der MG folgend gemäß Kreutzberg 1996 und Streit et al. 1999 als Aktivierung der MG im Rahmen des Tumorgeschehens zu werten.

HLA-DR Expression: Eine HLA-DR Expression durch Tumorzellen ist ein bekanntes Phänomen und findet sich häufig auch in Tumoren des ZNS, wie sich durch umfangreiche Studien von Rossi und seinen Mitarbeitern herausstellte. Vergleichbare Untersuchungen an ependymalen Tumoren wurden bisher soweit bekannt nicht publiziert. In der vorliegenden Arbeit wird eine HLA-DR Expression in 52,6% der untersuchten Ependymome nachgewiesen. Neben einer signifikanten Assoziation zwischen einer HLA-DR Expression und einer intrakraniellen Lage des Tumors ($p=0.0004$ in der Gruppe aller untersuchten Tumoren) besteht auch eine Korrelation mit einem MIB-1 LI $>10\%$ ($p=0.023$ in der Gruppe aller untersuchten Tumoren).

Die prognostischen Bedeutung einer HLA-DR Expression in ZNS-Tumoren ist unklar. Lediglich Rossi et al. 1991d untersuchten den klinischen Verlauf von Astrozytomen der Tumorgrade III und IV und konnten keinen statistisch signifikanten Unterschied für Tumoren mit bzw. ohne HLA-DR Expression feststellen, was mit den eigenen, an Ependymomen des Kindesalters erhobenen Befunden, übereinstimmt. Tran et al. 1998

konnten in astrozytären Tumoren ebenfalls eine HLA-DR Expression durch Tumorzellen nachweisen, jedoch nicht die für eine T-Zell-Aktivierung notwendigen Costimulatoren, wie z.B. B7. Sie vermuten daher, dass die Neuexpression von HLA-DR bei gleichzeitig fehlender Expression von Costimulatoren wie B7 zu einer T-Zell-Anergie führen könnte und damit zu einer Downregulation der auch gegen Tumoren gerichteten Immunabwehr.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen bei Berücksichtigung des aktuellen Wissensstandes bezüglich Diagnostik, Graduierung und prognostischer Einschätzung ependymaler Tumoren des Kindesalters nahe, dass nach der ausgesprochen großen Bedeutung einer totalen operativen Entfernung des Tumors die Bestimmung der Proliferationsaktivität wohl noch vor der Graduierung entsprechend der WHO-Richtlinien klinische Relevanz besitzt. Die deutlichen Korrelationen des MIB-1 LI sowie der p53-Akkumulation mit dem Tumorgrad nach WHO kann aber auch als Argument für eine gewisse Bedeutung des Graduierungssystems angeführt werden. Es ist jedoch offensichtlich, dass die Anaplasiekriterien um weitere, die Prognose der Tumorerkrankung besser erfassende Faktoren erweitert werden müssen. Die inzwischen durch zahlreiche Studien fundierten Kenntnisse über die Bedeutung der Proliferationsaktivität bei Tumoren im Allgemeinen und speziell bei Ependymomen sollten dazu führen, die Bestimmung der Proliferationsaktivität mit Hilfe eines geeigneten Proliferationsmarkers in die Routinediagnostik bei ependymalen Neoplasien aufzunehmen. Auch wenn dem p53-Status in der vorliegenden Arbeit keine prognostische Bedeutung zukommt, so wäre eine Klärung der Ursache und Bedeutung der im untersuchten Tumormaterial häufig anzutreffenden p53-Akkumulation bei bestehender signifikanter Korrelation mit dem MIB-1 LI sowie dem Tumorgrad nach WHO wünschenswert. Die gut bekannte Stellung von p53 an wichtigen Schnittstellen der Tumorentwicklung könnte bei Klärung der Ursachen einer p53-Akkumulation wichtige Rückschlüsse auf Ursachen und Ablauf der Tumorgenese bei Ependymomen erlauben und neue Forschungsansätze eröffnen. Von großem Interesse ist weiterhin die gegen das Tumorgeschehen gerichtete immunologische Abwehr, insbesondere vor dem Hintergrund der bisher nur in vitro nachgewiesenen tumorzytotoxischen Potenz der MG. Weitere differenzierte Untersuchungen des Aktivierungsniveaus, der Verteilung,

aber auch des Proliferationsverhaltens der Zellen des MG/Makrophagen-Systems könnten ebenso wie die Erforschung des Einflusses einer HLA-DR Expression durch Tumorzellen auf die T-Zell-Aktivierung zu weiteren Erkenntnissen bezüglich des Stellenwertes der immunologischen Tumorabwehr bei ependymalen Neoplasien führen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden der klinische Verlauf der Tumorerkrankung von 40 Patienten, die im Kindesalter an einem Ependymom erkrankten, erfasst und 58 operativ gewonnene Tumorproben mittels immunhistochemischer Methoden untersucht. Im Mittelpunkt dieser Untersuchungen standen die Überprüfung der p53-Akkumulation, der Proliferationsaktivität mit Hilfe des Antikörpers MIB-1 sowie der Neuexpression von HLA-DR durch Tumorzellen und eine Einschätzung der prognostischen Aussagekraft dieser Faktoren. Weiterhin wurde die EMA-Expression untersucht und eine Schwerpunkt auf die Analyse von Verteilung und Proliferationsaktivität der Zellen des MG/Makrophagen-Systems in kindlichen Ependymomen gelegt.

Die **klinischen Daten** der aufgenommenen Patienten stimmen weitgehend mit vergleichbaren Angaben in der Literatur überein. Das Alter der Patienten liegt zwischen 8 Monaten und 15 4/12 Jahren (Mittelwert: 61,3 Monate, Median: 41 Monate), eine Geschlechtspräferenz liegt nicht vor und eine totale Resektion konnte in 30,8% bei Primärtumoren und in 27,3% bei Rezidivtumoren erzielt werden. Abweichungen ergeben sich in der Lokalisationsverteilung, wo mit 22,5% weniger supratentorielle und mit 17,5% mehr spinale Ependymome angetroffen wurden. Außerdem ist der Anteil aE (III) mit 52,5% deutlich höher als in vergleichbaren Publikationen. Von den klinischen Variablen weist einzig das Resektionsausmaß eine prognostische Bedeutung auf, die beim mittleren PFI mit $p=0.035$ auch statistische Signifikanz erreicht. Trotz deutlicher Unterschiede im mittleren OS (110 Monate bei totaler und 44 Monate bei inkompletter Resektion) liegt keine Signifikanz vor ($p=0.12$). Alle anderen klinischen Variablen, einschließlich des Tumorgades nach WHO, zeigen keinen Einfluss auf den Verlauf der Tumorerkrankung.

Überraschend häufig kommt mit 56,9% in den untersuchten Tumorproben eine deutlich mit dem Tumorgrad nach WHO, dem MIB-1 LI und außerdem mit der Lokalisation korrelierende **p53-Akkumulation** vor.

Der **MIB-1 LI** zeigt eine große Streubreite (1,4% - 63,3%) und weist entsprechend des untersuchten Patientenkollektivs (kindliche Ependymome) im Gegensatz zu Ependymomen des Erwachsenenalters einen hohen Mittelwert und Median auf (21,8% bzw. 19,8%). Der MIB-1 LI korreliert statistisch signifikant mit dem WHO-Graduierungssystem, der Lokalisation und wie bereits erwähnt mit der p53-Akkumulation, außerdem negativ mit dem prozentualen Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtzellzahl am Ort der höchsten Proliferation. Lediglich dem MIB-1 LI kommt im untersuchten Patientenkollektiv eine gewisse prognostische Aussagekraft zu, nicht jedoch dem p53-Status. Statistische Signifikanz wird bei Gruppeneinteilung in MIB-1 LI <10% bzw. ≥10% allerdings nicht erreicht (mittleres PFI: $p=0.17$).

Erstmals wurde in 80,4% der untersuchten ependymalen Tumoren auch eine **Proliferation von Zellen des MG/Makrophagen-Systems** nachgewiesen. Bei weitgehend konstant niedriger absoluter Anzahl proliferierender Zellen des MG/Makrophagen-Systems am Ort der höchsten Proliferation unterscheiden sich E (II) und aE (III) in diesem Punkt nicht.

Die **Verteilung der Zellen des MG/Makrophagen-Systems** zeigte bei sehr heterogenem Verteilungsmuster häufig eine septale Anordnung insbesondere der amöboiden MG und der Makrophagen. In ein und der selben Tumorprobe existieren häufig Areale niedriger und hoher MG/Makrophagen-Dichte nebeneinander. Diesen Arealen lässt sich bei Primärtumoren eine charakteristische Zusammensetzung der verschiedenen Zellen des MG/Makrophagen-Systems zuteilen. Während in Arealen niedriger MG/Makrophagen-Dichte ramifizierte MG bei weitem überwiegt, nimmt in Arealen hoher MG/Makrophagen-Dichte der Anteil der amöboiden MG sowie der Makrophagen deutlich zu. Auch in Rezidivtumoren besteht eine ähnliche Heterogenität. Eine Bindung verschiedener Verteilungsmuster an Dichteparameter wie bei Primärtumoren lässt sich jedoch nicht nachweisen. Sowohl die Proliferation von Zellen des MG/Makrophagen-Systems als auch die Zunahme amöboider MG in Arealen hoher MG/Makrophagen-Dichte in Primärtumoren bestätigen das Konzept der funktionellen Plastizität der MG.

Obwohl eine **HLA-DR Expression durch Tumorzellen** auch in anderen Neoplasien des ZNS häufig vorkommt, wurden Ependymome diesbezüglich bisher nicht untersucht. In 52,6% aller Tumorproben finden sich in der vorliegenden Arbeit HLA-DR exprimierende Tumorzellen. Der klinische Verlauf dieser Patienten unterscheidet sich nicht von der Patientengruppe, deren Tumoren keine HLA-DR Expression aufweisen. Es besteht jedoch ein Zusammenhang zwischen einer HLA-DR Expression und dem prozentualen Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtzellzahl am Ort der höchsten Proliferation, was einen Einfluss einer HLA-DR Expression durch Tumorzellen auf das immunologische Geschehen nahe legt.

Eine **EMA-Expression** zeigt sich in 84,5% der untersuchten Fälle und ist damit ein Charakteristikum ependymaler Neoplasien, das auch als differentialdiagnostisches Kriterium angesehen werden kann. Auf den klinischen Verlauf kindlicher Ependymome hat eine EMA-Expression auch in den unterschiedlichen Expressionsformen keinen Einfluss. Korrelationen bestehen zwischen einer intrazytoplasmatischen EMA-Expression (sowohl in undifferenzierter Bewertung als auch in der diffusen intrazytoplasmatischen Expressionsform) und anaplastischen Ependymomen (WHO Grad III), sowie einem MIB-1 LI $\geq 10\%$ und einer HLA-DR Expression.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bekräftigen den hohen prognostischen Stellenwert einer totalen Resektion in der Therapie ependymaler Tumoren des Kindesalters. Weiterhin wird die Bedeutung der Proliferationsaktivität für den klinischen Verlauf der Tumorerkrankung unterstrichen. Die Bestimmung des MIB-1 LI sollte daher in die Routinediagnostik aufgenommen werden. Von großem wissenschaftlichem Interesse ist weiterhin die Klärung der Ursache und Bedeutung der häufig anzutreffenden p53-Akkumulation sowie der immunologischen Bedeutung der Zellen des MG/Makrophagen-Systems im Rahmen der Tumorabwehr.

6 Literaturverzeichnis

- Aas T, Borresen AL, Geisler S, Smith-Sorensen B, Johnsen H, Varhaug JE, Akslen LA, Lonning PE (1996): Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat Med* 2: 811-814
- Alliot F, Lecain E, Grima B, Pessac B (1991): Microglial progenitors with a high proliferative potential in the embryonic and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 1541-1545
- Amat JA, Ishiguro H, Nakamura K, Norton WT (1996): Phenotypic diversity and kinetics of proliferating microglia and astrocytes following cortical stab wounds. *Glia* 16: 368-382
- Barbareschi M, Iuzzolino P, Pennella A, Allegranza A, Arrigoni G, Dalla Palma P, Doglioni C (1992): p53 protein expression in central nervous system neoplasms. *J Clin Pathol* 45: 583-586
- Bennetto L, Foreman N, Harding B, Hayward R, Ironside J, Love S, Ellison D (1998): Ki-67 immunolabelling index is a prognostic indicator in childhood posterior fossa ependymomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24: 434-440
- Bouffet E, Perilongo G, Canete A, Massimino M (1998): Intracranial ependymomas in children: a critical review of prognostic factors and a plea for cooperation. *Med Pediatr Oncol* 30: 319-329
- Bouvier-Labit C, Civatte M, Bartoli C, Renaud W, Pellissier JF, Figarella-Branger D (1999): p16INK4a and p19INK4d mRNA expression in neuroglial tumours: correlation with Ki67 proliferation index. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25: 408-416
- Brooks WH, Markesbery WR, Gupta GD, Roszman TL (1978): Relationship of lymphocyte invasion and survival of brain tumor patients. *Ann Neurol* 4: 219-224
- Brown DC, Gatter KC (1990): Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 17: 489-503
- Bruner JM, Saya H, Moser RP (1991): Immunocytochemical detection of p53 in human gliomas. *Mod Pathol* 4: 671-674
- Burger PC, Scheithauer BW (1994): Atlas of the tumor pathology. Tumors of the central nervous system: 130, Armed Forces Institute of Pathology, Washington

- Cajal RS (1952): Neuroglia. Histologie du systeme nerveux de l'homme & des vertebres. Edicion preparada por el Instituto „Ramon y Cajal“ con motivo del primer centenario de su fundador y maestro. 1: 230-252. Instituto Ramon y Cajal, Madrid
- Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J (1992): Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 168: 357-363
- Chaux P, Martin MS, Martin F (1996): T-Cell co-stimulation by the CD28 ligand B7 is involved in the immune response leading to rejection of a spontaneously regressive tumor. *Int J Cancer* 66: 244-248
- Chiu JK, Woo SY, Ater J, Connelly J, Bruner JM, Maor MH, van Eys J, Oswald MJ, Shallenberger R (1992): Intracranial ependymoma in children: analysis of prognostic factors. *J Neurooncol* 13: 283-290
- Concha A, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F (1991): Can the HLA phenotype be used as a prognostic factor in breast carcinomas? *Int J Cancer Suppl* 6: 146-154
- Cruz-Sanchez FF, Rossi ML, Esiri MM, Reading M (1988): Epithelial membrane antigen expression in ependymomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 14: 197-205
- Cuzner ML, Hayes GM, Newcombe J, Woodroffe MN (1988): The nature of inflammatory components during demyelination in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 20: 203-209
- Davis EJ, Foster TD, Thomas WE (1994): Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res Bull* 34: 73-78
- del Rio-Hortega P (1932): Microglia. In: Penfield W (ed): *Cytology and cellular pathology of nervous system*. 2nd ed: 481-534. Hoeber, New York
- Dickson DW, Lee SC, Mattiace LA, Yen SH, Brosnan C (1993): Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. *Glia* 7: 75-83
- Dobbertin A, Schmid P, Gelman M, Glowinski J, Mallat M (1997): Neurons promote macrophage proliferation by producing transforming growth factor-beta2. *J Neurosci* 17: 5305-5315
- Dogliani C, Dell'Orto P, Coggi G, Iuzzolino P, Bontempini L, Viale G (1987): Choroid plexus tumors. An immunocytochemical study with particular reference to the coexpression of intermediate filament proteins. *Am J Pathol* 127: 519-529

- Duffner PK, Krischer JP, Sanford RA, Horowitz ME, Burger PC, Cohen ME, Friedman HS, Kun LE (1998): Prognostic factors in infants and very young children with intracranial ependymomas. *Pediatr Neurosurg* 28: 215-222
- Duncan JA, Hoffman HJ (1995): Intracranial ependymomas. In: Kaye AH, Lows ER Jr (eds): *Brain tumors*: 493-504. Churchill Livingstone, Edinburgh
- Dunning HS, Furth J (1935): Studies in the relation between microglia, histiocytes and monocytes. *Am J Pathol* 11: 895-919
- Ernestus RI, Schröder R, Stützer H, Klug N (1996): Prognostic relevance of localization and grading in intracranial ependymomas of childhood. *Childs Nerv Syst* 12: 522-556
- Ernestus RI, Schröder R, Stützer H, Klug N (1997): The clinical and prognostic relevance of grading in intracranial ependymomas. *Br J Neurosurg* 11: 421-428
- Ernestus RI, Wilcke O, Schröder R (1991): Supratentorial ependymomas in childhood: clinicopathological findings and prognosis. *Acta Neurochir (Wien)* 111: 96-102
- Esiri MM, al Izzi MS, Reading MC (1991): Macrophages, microglial cells, and HLA-DR antigens in fetal and infant brain. *J Clin Pathol* 44: 102-106
- Esiri MM, Morris CS (1991): Immunocytochemical study of macrophages and microglial cells and extracellular matrix components in human CNS disease. 2. Non-neoplastic diseases. *J Neurol Sci* 101: 59-72
- Felix CA, Slavic I, Dunn M, Strauss EA, Phillips PC, Rorke LB, Sutton L, Bunin GR, Biegel JA (1995): p53 gene mutations in pediatric brain tumors. *Med Pediatr Oncol* 25: 431-436
- Ferrante L, Mastronardi L, Celli P, Lunardi P, Acqui M, Fortuna A (1992): Intramedullary spinal cord ependymomas--a study of 45 cases with long-term follow-up. *Acta Neurochir (Wien)* 119: 74-79
- Ferrante L, Mastronardi L, Schettini G, Lunardi P, Fortuna A (1994): Fourth ventricle ependymomas. A study of 20 cases with survival analysis. *Acta Neurochir (Wien)* 131: 67-74
- Figarella-Branger D, Civatte M, Bouvier-Labit C, Gouvernet J, Gambarelli D, Gentet JC, Lena G, Choux M, Pellissier JF (2000): Prognostic factors in intracranial ependymomas in children. *J Neurosurg* 93: 605-613
- Figarella-Branger D, Gambarelli D, Dollo C, Devictor B, Perez-Castillo AM, Genitori L, Lena G, Choux M, Pellissier JF (1991): Infratentorial ependymomas of childhood.

- Correlation between histological features, immunohistological phenotype, silver nucleolar organizer region staining values and post-operative survival in 16 cases. *Acta Neuropathol (Berl)* 82: 208-216
- Fink KL, Rushing EJ, Schold SC Jr, Nisen PD (1996): Infrequency of p53 gene mutations in ependymomas. *J Neurooncol* 27: 111-115
- Foreman NK, Love S, Thorne R (1996): Intracranial ependymomas: analysis of prognostic factors in a population-based series. *Pediatr Neurosurg* 24: 119-125
- Frei K, Siepl C, Groscurth P, Bodmer S, Schwerdel C, Fontana A (1987): Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-gamma-treated microglial cells. *Eur J Immunol* 17: 1271-1278
- Fulci G, Ishii N, Van Meir EG (1998): p53 and brain tumors: from gene mutations to gene therapy. *Brain Pathol* 8: 599-613
- Fulci G, Van Meir EG (1999): p53 and the CNS: tumors and developmental abnormalities. *Mol Neurobiol* 19: 61-77
- Gasparini G, Weidner N, Maluta S, Pozza F, Boracchi P, Mezzetti M, Testolin A, Bevilacqua P (1993): Intratumoral microvessel density and p53 protein: correlation with metastasis in head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer* 55: 739-744
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984): Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133: 1710-1715
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983): Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31: 13-20
- Gerszten PC, Pollack IF, Martinez AJ, Lo KH, Janosky J, Albright AL (1996): Intracranial ependymomas of childhood. Lack of correlation of histopathology and clinical outcome. *Pathol Res Pract* 192: 515-522
- Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG, Gray G, Nadler LM (1993): Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 6586-6590
- Gosh AK, Gatter KC, Mason DY (1984): Immunocytical characterization of monoclonal anti-HLA-DR antibodies. In: Steel CM (ed): *Disease markers*. 223-233. John Wiley & Sons, Sussex

- Graeber MB, Bise K, Mehraein P (1994): CR3/43, a marker for activated human microglia: application to diagnostic neuropathology. *Neuropathol Appl Neurobiol* 20: 406-408
- Graeber MB, Tetzlaff W, Streit WJ, Kreutzberg GW (1988): Microglial cells but not astrocytes undergo mitosis following rat facial nerve axotomy. *Neurosci Lett* 85: 317-321
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC (1994): Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54: 4855-4878
- Hall PA, Lane DP (1994): p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry?--Revisited! *J Pathol* 172:1-4
- Healey EA, Barnes PD, Kupsky WJ, Scott RM, Sallan SE, Black PM, Tarbell NJ (1991): The prognostic significance of postoperative residual tumor in ependymoma. *Neurosurgery* 28: 666-671
- Heyderman E, Steele K, Ormerod MG (1979): A new antigen on the epithelial membrane: its immunoperoxidase localisation in normal and neoplastic tissue. *J Clin Pathol* 32: 35-39
- Hickey WF, Kimura H (1988): Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 239: 290-292
- Hilton DA, West KP (1990): An evaluation of the prognostic significance of HLA-DR expression in gastric carcinoma. *Cancer* 66: 1154-1157
- Hinds PW, Finlay CA, Quartin RS, Baker SJ, Fearon ER, Vogelstein B, Levine AJ (1990): Mutant p53 DNA clones from human colon carcinomas cooperate with ras in transforming primary rat cells: a comparison of the "hot spot" mutant phenotypes. *Cell Growth Differ* 1: 571-580
- Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smith-Sorensen B, Montesano R, Harris CC (1994): Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 22: 3551-3555
- Horn B, Heideman R, Geyer R, Pollack I, Packer R, Goldwein J, Tomita T, Schomberg P, Ater J, Luchtman-Jones L, Rivlin K, Lamborn K, Prados M, Bollen A, Berger M, Dahl G, McNeil E, Patterson K, Shaw D, Kubalik M, Russo C (1999): A multi-institutional retrospective study of intracranial ependymoma in children: identification of risk factors. *J Pediatr Hematol Oncol* 21: 203-211

- Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981): Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580
- Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL (1990): Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 335: 675-679
- Ikezaki K, Matsushima T, Inoue T, Yokoyama N, Kaneko Y, Fukui M (1993): Correlation of microanatomical localization with postoperative survival in posterior fossa ependymomas. *Neurosurgery* 32: 38-44
- Jayawickreme DP, Hayward RD, Harkness WF (1995): Intracranial ependymomas in childhood: a report of 24 cases followed for 5 years. *Childs Nerv Syst* 11:409-13
- Kalbfleisch JD, Prentice RL (1980): The statistical analysis of failure time data. John Wiley and Sons, New York
- Kaneko Y, Takeshita I, Matsushima T, Iwaki T, Tashima T, Fukui M (1990): Immunohistochemical study of ependymal neoplasms: histological subtypes and glial and epithelial characteristics. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 417: 97-103
- Kaplan EL, Meier P (1958): Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53: 457-481
- Karamitopoulou E, Perentes E, Diamantis I, Maraziotis T (1994): Ki-67 immunoreactivity in human central nervous system tumors: a study with MIB 1 monoclonal antibody on archival material. *Acta Neuropathol (Berl)* 87: 47-54
- Karamitopoulou E, Perentes E, Diamantis I (1993): p53 protein expression in central nervous system tumors: an immunohistochemical study with CM1 polyvalent and DO-7 monoclonal antibodies. *Acta Neuropathol (Berl)* 85: 611-616
- Kida S, Ellison DW, Steart PV, Weller RO (1995): Characterization of perivascular cells in astrocytic tumours and peritumoral oedematous brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 21: 121-129
- Kida S, Steart PV, Zhang ET, Weller RO (1993): Perivascular cells act as scavengers in the cerebral perivascular spaces and remain distinct from pericytes, microglia and macrophages. *Acta Neuropathol (Berl)* 85:646-652
- Kleihues P, Cavenee WK (2000): World Health Organisation classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the nervous system. IARC Press, Lyon

- Klein R, Roggendorf W (2001): Increased microglia-proliferation separates pilocytic astrocytomas from diffuse astrocytomas: a double labeling study. *Acta neuropathol* 101: 245-248
- Korkolopoulou P, Christodoulou P, Kouzelis K, Hadjiyannakis M, Priftis A, Stamoulis G, Seretis A, Thomas-Tsagli E (1997): MDM2 and p53 expression in gliomas: a multivariate survival analysis including proliferation markers and epidermal growth factor receptor. *Br J Cancer* 75: 1269-1278
- Korshunov A, Golanov A, Timirgaz V (2000): Immunohistochemical markers for intracranial ependymoma recurrence. An analysis of 88 cases. *J Neurol Sci* 177: 72-82
- Kovalic JJ, Flaris N, Grigsby PW, Pirkowski M, Simpson JR, Roth KA (1993): Intracranial ependymoma long term outcome, patterns of failure. *J Neurooncol* 15: 125-131
- Kreutzberg GW (1996): Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19: 312-318
- Kuchelmeister K, Elborg B, Gullotta F (1995): Immunohistochemical detection of p53 protein in tumours of the central nervous system. *Pathologica* 87: 498-502
- Lamb P, Crawford L (1986): Characterization of the human p53 gene. *Mol Cell Biol* 6: 1379-1385
- Levine AJ (1997): p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331
- Levine AJ, Momand I, Finlay CA (1991): The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351: 453-456
- Ling EA, Wong WC (1993): The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 7: 9-18
- Lonjon M, Goh KY, Epstein FJ (1998): Intramedullary spinal cord ependymomas in children: treatment, results and follow-up. *Pediatr Neurosurg* 29: 178-183
- Louis DN (1994): The p53 gene and protein in human brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 53: 11-21
- Louis DN, von Deimling A, Chung RY, Rubio MP, Whaley JM, Eibl RH, Ohgaki H, Wiestler OD, Thor AD, Seizinger BR (1993): Comparative study of p53 gene and protein alterations in human astrocytic tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 52: 31-38

- Lyons MK, Kelly PJ (1991): Posterior fossa ependymomas: report of 30 cases and review of the literature. *Neurosurgery* 28: 659-664
- McCormick D, Chong H, Hobbs C, Datta C, Hall PA (1993): Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB1. *Histopathology* 22: 355-360
- McGeer PL, Itagaki S, McGeer EG (1988): Expression of the histocompatibility glycoprotein HLA-DR in neurological disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 76: 550-557
- McLaughlin MP, Marcus RB Jr, Buatti JM, McCollough WM, Mickle JP, Kedar A, Maria BL, Million RR (1998): Ependymoma: results, prognostic factors and treatment recommendations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 40: 845-850
- McLendon RE, Enterline DS, Tien RD, Thorstad WL, Bruner JM (1998): Tumors of the central neuroepithelial origin. Tumors of the ependymoma group. In: Bigner DD, McLendon RE, Bruner JM (eds): *Russel and Rubinstein's pathology of tumors of the nervous system*. 6th edition: 387-417. Arnold, London
- Miller RW, Young JL Jr, Novakovic B (1995): Childhood cancer. *Cancer* 75 Suppl: 395-405
- Milner J, Medcalf EA (1991): Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* 65: 765-774
- Möller P, Koretz K, Schlag P, Momburg F (1991): Frequency of abnormal expression of HLA-A,B,C and HLA-DR molecules, invariant chain, and LFA-3 (CD58) in colorectal carcinoma and its impact on tumor recurrence. *Int J Cancer Suppl* 6: 155-162
- Möller P, Momburg F, Koretz K, Moldenhauer G, Herfarth C, Otto HF, Hämmerling GJ, Schlag P (1991): Influence of major histocompatibility complex class I and II antigens on survival in colorectal carcinoma. *Cancer Res* 51: 729-736
- Morimura T, Neuchrist C, Kitz K, Budka H, Scheiner O, Kraft D, Lassmann H (1990): Monocyte subpopulations in human gliomas: expression of Fc and complement receptors and correlation with tumor proliferation. *Acta Neuropathol (Berl)* 80: 287-294
- Morioka T, Baba T, Black KL, Streit WJ (1992a): Immunophenotypic analysis of infiltrating leukocytes and microglia in an experimental rat glioma. *Acta Neuropathol (Berl)* 83: 590-597

- Morioka T, Baba T, Black KL, Streit WJ (1992b): Inflammatory cell infiltrates vary in experimental primary and metastatic brain tumors. *Neurosurgery* 30: 891-896
- Morioka T, Baba T, Black KL, Streit WJ (1992c): Response of microglial cells to experimental rat glioma. *Glia* 6: 75-79
- Murata J, Ricciardi-Castagnoli P, Dessous L'Eglise Mange P, Martin F, Juillerat-Jeanneret L (1997): Microglial cells induce cytotoxic effects toward colon carcinoma cells: measurement of tumor cytotoxicity with a gamma-glutamyl transpeptidase assay. *Int J Cancer* 70: 169-174
- Nazar GB, Hoffman HJ, Becker LE, Jenkin D, Humphreys RP, Hendrick EB (1990): Infratentorial ependymomas in childhood: prognostic factors and treatment. *J Neurosurg* 72: 408-417
- Needle MN, Goldwein JW, Grass J, Cnaan A, Bergman I, Molloy P, Sutton L, Zhao H, Garvin JH Jr, Phillips PC (1997): Adjuvant chemotherapy for the treatment of intracranial ependymoma of childhood. *Cancer* 80: 341-347
- Ng HK, Lo SY, Huang DP, Poon WS (1994): Paraffin section p53 protein immunohistochemistry in neuroectodermal tumors. *Pathology* 26:1-5
- Nissl F (1899): Über eine Beziehung zwischen Nervenerkrankungen und gliösen Erscheinungen bei verschiedenen Psychosen. *Arch Psychiatr* 32: 656-676
- Nozaki M, Tada M, Matsumoto R, Sawamura Y, Abe H, Iggo RD (1998): Rare occurrence of inactivating p53 gene mutations in primary non-astrocytic tumors of the central nervous system: reappraisal by yeast functional assay. *Acta Neuropathol (Berl)* 95: 291-296
- Ohgaki H, Eibl RH, Wiestler OD, Yasargil MG, Newcomb EW, Kleihues P (1991): p53 mutations in nonastrocytic human brain tumors. *Cancer Res* 51: 6202-6205
- Ohno M, Komiyama A, Martin PM, Suzuki K (1993): Proliferation of microglia/macrophages in the demyelinating CNS and PNS of twitcher mouse. *Brain Res* 602: 268-274
- Orellana C, Hernandez-Marti M, Martinez F, Castel V, Millan JM, Alvarez-Garijo JA, Prieto F, Badia L (1998): Pediatric brain tumors: loss of heterozygosity at 17p and TP53 gene mutations. *Cancer Genet Cytogenet* 102: 93-99
- Papadopoulos DP, Giri S, Evans RG (1990): Prognostic factors and management of intracranial ependymomas. *Anticancer Res* 10: 689-692

- Passlick B, Izbicki JR, Simmel S, Kubuschok B, Karg O, Habekost M, Thetter O, Schweiberer L, Pantel K (1994): Expression of major histocompatibility class I and class II antigens and intercellular adhesion molecule-1 on operable non-small cell lung carcinomas: frequency and prognostic significance. *Eur J Cancer* 30A: 376-381
- Paulus W, Bancher C, Jellinger K (1993): Microglial reaction in Pick's disease. *Neurosci Lett* 161: 89-92
- Paulus W, Roggendorf W, Kirchner T (1992): Ki-M1P as a marker for microglia and brain macrophages in routinely processed human tissues. *Acta Neuropathol (Berl)* 84: 538-544
- Penfield W (1925): Microglia and the process of phagocytosis in gliomas. *Am J Pathol* 1: 77-90
- Perilongo G, Massimino M, Sotti G, Belfontali T, Masiero L, Rigobello L, Garrè L, Carli M, Lombardi F, Solero C, Sainati L, Canale V, del Prever AB, Giangaspero F, Andreussi L, Mazza C, Madon E (1997): Analyses of prognostic factors in a retrospective review of 92 children with ependymoma: Italian Pediatric Neuro-oncology Group. *Med Pediatr Oncol* 29: 79-85
- Perry VH, Gordon S (1988): Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci* 11: 273-277
- Pieters J (1997): MHC Class II restricted antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 9: 89-96
- Pollack IF, Gerszten PC, Martinez AJ, Lo KH, Shultz B, Albright AL, Janosky J, Deutsch M (1995): Intracranial ependymomas of childhood: long-term outcome and prognostic factors. *Neurosurgery* 37: 655-666
- Pollack IF, Hamilton RL, Finkelstein SD, Campbell JW, Martinez AJ, Sherwin RN, Bozik ME, Gollin SM (1997): The relationship between TP53 mutations and overexpression of p53 and prognosis in malignant gliomas of childhood. *Cancer Res* 57: 304-309
- Prayson RA (1999): Clinicopathologic study of 61 patients with ependymoma including MIB-1 immunohistochemistry. *Ann Diagn Pathol* 3: 11-18
- Prayson RA (1998): Cyclin D1 and MIB-1 immunohistochemistry in ependymomas: a study of 41 cases. *Am J Clin Pathol* 110: 629-634
- Prayson RA (1997): Myxopapillary ependymomas: a clinicopathologic study of 14 cases including MIB-1 and p53 immunoreactivity. *Mod Pathol* 10: 304-310

- Pulford KA, Rigney EM, Micklem KJ, Jones M, Stross WP, Gatter KC, Mason DY (1989): KP1: a new monoclonal antibody that detects a monocyte/macrophage associated antigen in routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* 42: 414-421
- Radzun HJ, Hansmann ML, Heidebrecht HJ, Bodewadt-Radzun S, Wacker HH, Kreipe H, Lumbeck H, Hernandez C, Kuhn C, Parwaresch MR (1991): Detection of a monocyte/macrophage differentiation antigen in routinely processed paraffin-embedded tissues by monoclonal antibody Ki-M1P. *Lab Invest* 65: 306-315
- Raju GC, Teh M, Wee A. The expression of HLA-DR antigen in cervical neoplasia (1994): *Cancer Detect Prev* 18: 367-373
- Redondo M, Concha A, Oldiviela R, Cueto A, Gonzalez A, Garrido F, Ruiz-Cabello F (1991): Expression of HLA class I and II antigens in bronchogenic carcinomas: its relationship to cellular DNA content and clinical-pathological parameters. *Cancer Res* 51: 4948-4954
- Rezai AR, Woo HH, Lee M, Cohen H, Zagzag D, Epstein FJ (1996): Disseminated ependymomas of the central nervous system. *J Neurosurg* 85: 618-624
- Ritter AM, Hess KR, McLendon RE, Langford LA (1998): Ependymomas: MIB-1 proliferation index and survival. *J Neurooncol* 40: 51-57
- Robertson PL, Zeltzer PM, Boyett JM, Rorke LB, Allen JC, Geyer JR, Stanley P, Li H, Albright AL, McGuire-Cullen P, Finlay JL, Stevens KR Jr, Milstein JM, Packer RJ, Wisoff J (1998): Survival and prognostic factors following radiation therapy and chemotherapy for ependymomas in children: a report of the Children's Cancer Group. *J Neurosurg* 88: 695-703
- Robinson LL (1997): General principles of the epidemiology of childhood cancer. In: Pizzo PA, Poplack DG (eds): *Principles and practice of pediatric oncology*. 3rd ed: 1-9. Lippincott, Philadelphia
- Roggendorf W, Strupp S, Paulus W (1996): Distribution and characterization of microglia/macrophages in human brain tumors. *Acta Neuropathol (Berl)* 92: 288-293
- Rossi ML, Buller J, Heath SA, Coakham HB (1991a): Monocyte/macrophage infiltrate in 41 oligodendrogliomas. Paraffin-wax study. *Pathol Res Pract* 187: 166-169
- Rossi ML, Cruz Sanchez F, Hughes JT, Esiri MM, Coakham HB (1988a): Immunocytochemical study of the cellular immune response in meningiomas. *J Clin Pathol* 41: 314-319

- Rossi ML, Cruz-Sanchez F, Hughes JT, Esiri MM, Coakham HB, Moss TH (1988b): Mononuclear cell infiltrate and HLA-DR expression in low grade astrocytomas. An immunohistological study of 23 cases. *Acta Neuropathol (Berl)* 76: 281-286
- Rossi ML, Esiri MM, Jones NR, Coakham HB, Moss TH, Cruz-Sanchez FF, Carey MP (1991b): Characterization of the mononuclear cell infiltrate and HLA-Dr expression in 19 oligodendrogliomas. *Surg Neurol* 36: 119-125
- Rossi ML, Hughes JT, Esiri MM, Coakham HB, Brownell DB (1987): Immunohistological study of mononuclear cell infiltrate in malignant gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 74: 269-277
- Rossi ML, Jones NR, Candy E, Nicoll JA, Compton JS, Hughes JT, Esiri MM, Moss TH, Cruz-Sanchez FF, Coakham HB (1989): The mononuclear cell infiltrate compared with survival in high-grade astrocytomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 78: 189-193
- Rossi ML, Jones NR, Esiri MM, Havas L, al Izzì M, Coakham HB (1991c): Mononuclear cell infiltrate and HLA-Dr expression in intra- and extradural secondary carcinomas. *Pathol Res Pract* 187: 55-61
- Rossi ML, Jones NR, Esiri MM, Havas L, al Izzì M, Coakham HB (1990a): Mononuclear cell infiltrate and HLA-Dr expression in 28 pituitary adenomas. *Tumori* 76: 543-547
- Rossi ML, Jones NR, Esiri MM, Havas L, Nakamura N, Coakham HB (1990b): Mononuclear cell infiltrate, HLA-Dr expression and proliferation in 37 acoustic schwannomas. *Histol Histopathol* 5: 427-432
- Rossi ML, Jones NR, Karr GF, Esiri MM, Havas L, Coakham HB (1991d): HLA-Dr expression by tumor cells compared with survival in high grade astrocytomas. *Tumori* 30: 122-125
- Rousseau P, Habrand JL, Sarrazin D, Kalifa C, Terrier-Lacombe MJ, Rekeciewicz C, Rey A (1994): Treatment of intracranial ependymomas of children: review of a 15-year experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 28: 381-386
- Rubio MP, von Deimling A, Yandell DW, Wiestler OD, Gusella JF, Louis DN (1993): Accumulation of wild type p53 protein in human astrocytomas. *Cancer Res* 53: 3465-3467

- Rushing EJ, Brown DF, Hladik CL, Risser RC, Mickey BE, White CL 3rd (1998): Correlation of bcl-2, p53, and MIB-1 expression with ependymoma grade and subtype. *Mod Pathol* 11: 464-470
- Rushing EJ, Yashima K, Brown DF, White CL 3rd, Shay JW, Risser RC, Gazdar AF (1997): Expression of telomerase RNA component correlates with the MIB-1 proliferation index in ependymomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 1142-1146
- Saito T, Tanaka R, Yoshida S, Washiyama K, Kumanishi T (1988): Immunohistochemical analysis of tumor-infiltrating lymphocytes and major histocompatibility antigens in human gliomas and metastatic brain tumors. *Surg Neurol* 29: 435-442
- Sala F, Talacchi A, Mazza C, Prisco R, Ghimenton C, Bricolo A (1998): Prognostic factors in childhood intracranial ependymomas: the role of age and tumor location. *Pediatr Neurosurg* 28: 135-142
- Salazar OM (1983): A better understanding of CNS seeding and a brighter outlook for postoperatively irradiated patients with ependymomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 9: 1231-1234
- Santha K, Juba A (1933): Weitere Untersuchungen über die Entwicklung der Hortegaschen Mikroglia. *Arch Psychiat Nervenkr* 98: 598-613
- Sasaki A, Nakazato Y (1992): The identity of cells expressing MHC class II antigens in normal and pathological human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 18: 13-26
- Schiffer D (1997): *Brain tumors. Biology, pathology, and clinical references.* 2nd ed, Springer, Berlin
- Schiffer D, Cavalla P, Migheli A, Chiò A, Giordana MT, Marino S, Attanasio A (1995): Apoptosis and cell proliferation in human neuroepithelial tumors. *Neurosci Lett* 195: 81-84
- Schiffer D, Chiò A, Cravioto H, Giordana MT, Migheli A, Soffietti R, Vigliani MC (1991a): Ependymoma: internal correlations among pathological signs: the anaplastic variant. *Neurosurgery* 29: 206-210
- Schiffer D, Chiò A, Giordana MT, Migheli A, Palma L, Pollo B, Soffietti R, Tribolo A (1991b): Histologic prognostic factors in ependymoma. *Childs Nerv Syst* 7: 177-182
- Schneider J, Hofman FM, Apuzzo ML, Hinton DR (1992): Cytokines and immunoregulatory molecules in malignant glial neoplasms. *J Neurosurg* 77: 265-273

- Schönrock LM, Kuhlmann T, Adler S, Bitsch A, Brück W (1998): Identification of glial cell proliferation in early multiple sclerosis lesions. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24: 320-330
- Schröder R, Ploner C, Ernestus RI (1993): The growth potential of ependymomas with varying grades of malignancy measured by the Ki-67 labelling index and mitotic index. *Neurosurg Rev* 16: 145-150
- Seto E, Usheva A, Zambetti GP, Momand J, Horikoshi N, Weinmann R, Levine AJ, Shenk T (1992): Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 12028-12032
- Sidransky D, Mikkelsen T, Schwechheimer K, Rosenblum ML, Cavanee W, Vogelstein B (1992): Clonal expansion of p53 mutant cells is associated with brain tumour progression. *Nature* 355: 846-847
- Sievers J, Parwaresch R, Wottge HU (1994): Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: morphology. *Glia* 12: 245-258
- Shi SR, Key ME, Kalra KL (1991): Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39: 741-748
- Sloane JP, Ormerod MG (1981): Distribution of epithelial membrane antigen in normal and neoplastic tissues and its value in diagnostic tumor pathology. *Cancer* 47: 1786-1795
- Sloane JP, Ormerod MG, Imrie SF, Coombes RC (1980): The use of antisera to epithelial membrane antigen in detecting micrometastases in histological sections. *Br J Cancer* 42: 392-398
- Soini Y, Niemelä A, Kamel D, Herva R, Bloigu R, Pääkkö P, Vähäkangas K (1994): p53 immunohistochemical positivity as a prognostic marker in intracranial tumours. *APMIS* 102: 786-792
- Spagnoli D, Tomei G, Ceccarelli G, Grimoldi N, Lanterna A, Bello L, Sinisi MM, De Santis A, Villani RM (2000): Combined treatment of fourth ventricle ependymomas: report of 26 cases. *Surg Neurol* 54: 19-26
- Spearman C (1904): The proof and measurement of association between two things. *Amer J Psychol* 15: 279-281

- Srivastava S, Wang S, Tong YA, Hao ZM, Chang EH (1993): Dominant negative effect of a germ-line mutant p53: a step fostering tumorigenesis. *Cancer Res* 53: 4452-4455
- Staneczek W, Jänisch W (1994): Epidemiologie der primären Tumoren des Zentralnervensystems bei Kindern und Jugendlichen. Eine bevölkerungsbezogene Studie. *Pathologie* 15: 207-215
- Stevens A, Klöter I, Roggendorf W (1988): Inflammatory infiltrates and natural killer cell presence in human brain tumors. *Cancer* 61: 738-743
- Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW (1988a): Functional plasticity of microglia: a review. *Glia* 1: 301-307
- Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW (1989): Expression of Ia antigen on perivascular and microglial cells after sublethal and lethal motor neuron injury. *Exp Neurol* 105: 115-126
- Streit WJ, Kreutzberg GW (1988b): Response of endogenous glial cells to motor neuron degeneration induced by toxic ricin. *J Comp Neurol* 268: 248-263
- Streit WJ, Walter SA, Pennell NA (1999): Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57: 563-581
- Stüben G, Stuschke M, Kroll M, Havers W, Sack H (1997): Postoperative radiotherapy of spinal and intracranial ependymomas: analysis of prognostic factors. *Radiother Oncol* 45: 3-10
- Sutter A, Hekmat A, Luckenbach GA (1991): Antibody-mediated tumor cytotoxicity of microglia. *Pathobiology* 59: 254-258
- Suzuki SO, Iwaki T (2000): Amplification and overexpression of mdm2 gene in ependymomas. *Mod Pathol* 13: 548-553
- Tada M, Iggo RD, Waridel F, Nozaki M, Matsumoto R, Sawamura Y, Shinohe Y, Ikeda J, Abe H (1997): Reappraisal of p53 mutations in human malignant astrocytic neoplasms by p53 functional assay: comparison with conventional structural analyses. *Mol Carcinog* 18: 171-176
- Timmermann B, Kortmann RD, Kühl J, Meisner C, Slave I, Pietsch T, Bamberg M (2000): Combined postoperative irradiation and chemotherapy for anaplastic ependymomas in childhood: results of the German prospective trials HIT 88/89 and HIT 91. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 46: 287-295

- Tominaga T, Kayama T, Kumabe T, Sonoda Y, Yoshimoto T (1995): Anaplastic ependymomas: clinical features and tumour suppressor gene p53 analysis. *Acta Neurochir (Wien)* 135: 163-170
- Tong CY, Ng HK, Pang JC, Hui AB, Ko HC, Lee JC (1999): Molecular genetic analysis of non-astrocytic gliomas. *Histopathology* 34: 331-341
- Tran CT, Wolz P, Egensperger R, Kösel S, Imai Y, Bise K, Kohsaka S, Mehraein P, Graeber MB (1998): Differential expression of MHC class II molecules by microglia and neoplastic astroglia: relevance for the escape of astrocytoma cells from immune surveillance. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24: 293-301
- Uematsu Y, Rojas-Corona RR, Llena JF, Hirano A (1989): Distribution of epithelial membrane antigen in normal and neoplastic human ependyma. *Acta Neuropathol (Berl)* 78: 325-328
- van Duinen SG, Ruiters DJ, Broecker EB, van der Velde EA, Sorg C, Welvaart K, Ferrone S (1988): Level of HLA antigens in locoregional metastases and clinical course of the disease in patients with melanoma. *Cancer Res* 48: 1019-1025
- Vanuytsel LJ, Bessell EM, Ashley SE, Bloom HJ, Brada M (1992): Intracranial ependymoma: long-term results of a policy of surgery and radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 23: 313-319
- Wu JK, Ye Z, Darras BT (1993): Frequency of p53 tumor suppressor gene mutations in human primary brain tumors. *Neurosurgery* 33: 824-830
- Wynford-Thomas D (1992): P53 in tumour pathology: can we trust immunocytochemistry? *J Pathol* 166: 329-330
- Zhou XP, Li YJ, Hoang-Xuan K, Laurent-Puig P, Mokhtari K, Longy M, Sanson M, Delattre JY, Thomas G, Hamelin R (1999): Mutational analysis of the PTEN gene in gliomas: molecular and pathological correlations. *Int J Cancer* 84: 150-154

7 Anhang

7.1 Pufferlösungen, Reagenzien, Detektionskit

a) Somogyi-Fixationslösung pH 7,2 – 7,4

Zusammensetzung:

- 500ml Sörensen Phosphatpuffer (Lösung I: 1,452g KH_2PO_4 (Best.-Nr.: 104873, Merck, Deutschland) auf 160ml Aqua dest. auffüllen. Lösung II: 9,98g Na_2HPO_4 (Best.-Nr.: 106346, Merck, Deutschland) auf 840ml Aqua dest. auffüllen. 80ml Lösung I zu 420ml Lösung II geben und den pH auf 7,4 einstellen.)
- 150 ml gesättigte wässrige Pikrinsäure (Best.-Nr.: 621, Merck, Deutschland)
- 348ml Paraformaldehydlösung (80g Paraformaldehyd (Best.-Nr.: 104005, Merck, Deutschland) in 696ml Ampuwa lösen und auf 50-60°C erhitzen, 20-25 Tropfen 1N NaOH langsam zufügen bis die Lösung klar wird, Lösung abkühlen lassen und filtrieren.)
- 2ml 25% Glutardialdehyd (Best.-Nr.: 104239, Merck, Deutschland)

Lösungen in der angegebenen Reihenfolge zugeben und den pH auf 7,2 – 7,4 einstellen.

b) 3-Aminopropyltriethoxy-Silane (APES) (Best.-Nr.: A 3648, Sigma, USA)

Beschichtung der Objektträger:

Objektträger für 40 Sekunden in 250ml Aceton mit 5ml APES stellen. Anschließend 2 x in Aceton und 2 x in Aqua dest. spülen und Objektträger trocknen lassen.

c) Citratpuffer pH 6,0 für die Mikrowellenvorbehandlung

10,5g Citronensäure-Monohydrat (Best.-Nr.: 100244, Merck, Deutschland) und 5,0g NaOH-Plätzchen (Best.-Nr.: 21148, Ferak, Deutschland) in 2,5l Aqua dest. lösen. Anschließend den Puffer auf pH 6,0 einstellen.

d) TBS-Puffer pH 7,6: Spülmedium zwischen den einzelnen Inkubationsschritten.

Stammlösung:

121,1g Tris (Best.-Nr.: A 1086, AppliChem, Deutschland) und 169,4g NaCl (Best.-Nr.: A 3597, AppliChem, Deutschland) in 1l Aqua dest. lösen und 80ml 25% HCl (Best.-Nr.: 100316, Merck, Deutschland) hinzufügen. Anschließend auf

pH 7,6 einstellen, auffüllen auf 2l mit Aqua dest. und pH überprüfen. Diese Stammlösung muss vor Gebrauch 1:10 mit Aqua dest. verdünnt werden und der pH gegebenenfalls erneut auf pH 7,6 eingestellt werden.

- e) TBS/BSA (TBS-Puffer pH 7,6 mit 0,1% BSA) für die Antikörperverdünnung
25mg kristallines Rinderalbumin (BSA) (Best.-Nr.: 11925, Serva, Deutschland) in 25ml TBS-Puffer pH 7,6 lösen.
- f) TBS/Trypsin/Calciumchlorid-Dihydrat-Lösung zur enzymatischen Antigen-demaskierung
In 250ml TBS-Puffer pH 7,6 werden 0,125g Trypsin (Best.-Nr.: T 8253, Sigma, Deutschland) und 0,25g Calciumchlorid-Dihydrat (Best.Nr.: 103282, Merck, Deutschland) gelöst. Anschließend wird der pH der Lösung auf 7,8 eingestellt und die Lösung auf 37°C erwärmt.
- g) Tris-HCl-Puffer pH 7,2: Medium für die Peroxidase-Substratreaktion mit DAB
15,14g Tris und 0,68g Imidazol (Best.-Nr.: 104716, Merck, Deutschland) in 2,5 l Aqua dest. lösen und 15,2ml 25% HCl hinzufügen. Anschließend auf pH 7,2 einstellen.
- h) H₂O₂ (Best.-Nr.: 107209, Merck, Deutschland)
- i) 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) (Best.-Nr.: D 56037, Sigma, Deutschland)
- j) Super Sensitive MultiLink Kit (Best.-Nr.: LP000-UL, BioGenex, Kanada)
enthält Link-Antikörper und Label-Enzym
- k) Ziegen Serum (Best.-Nr.: HK112-9K, BioGenex, Kanada)
- l) 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) (Best.-Nr.: HK 121-5K, BioGenex, Kanada)
- m) Substratpuffer/H₂O₂ für AEC (Best.-Nr.: HK 171-7K, BioGenex, Kanada)
- n) Vektor VIP Substrate Kit für Peroxidase (Best.-Nr.: SK-4600, Vektor Laboratories, USA)
- o) Eukitt (Best.-Nr.: G 123, Kindler, Deutschland)
- p) Aquatex (Best.-Nr.: 108562, Merck, Deutschland)

7.2 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen (Tabellen)

7.2.1 p53-Akkumulation, HLA-DR Expression, MIB-1 LI, MG/Makrophagen-Proliferation, prozentualer Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtzellzahl

Patient	p53		HLA-DR	MIB-1 LI	MG/Makrophagen-Proliferation		prozentualer Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtzellzahl am Ort der höchsten Proliferation
	0 = negativ + = <5% ++ = 5-10% +++ = >10%	%- Wert			absolute Anzahl/ 1000 Zellen	Prozentualer Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamt- proliferation	
1P	nicht untersucht						
1R	0		1	10,1%	2	2,0%	5,0%
2P	+++	22,5	0	18,4%	2	1,1%	4,7%
3P	+	3,2	1	30,4%	1	0,3%	4,3%
4P	+++	11,2	1	27,5%	1	0,4%	7,2%
5P	nicht untersucht						
5R1	+	3,1	0	2,9%	2	6,9%	7,0%
5R2	0		0	5,0%	1	2,0%	12,1%
6P	0		1	27,4%	5	1,8%	3,5%
7P	++	8,0	0	18,5%	4	2,2%	7,3%
8P	+++	35,0	0	57,7%	1	0,2%	1,6%
9P	0		1	19,8%	27	13,6%	17,4%
9R1	+++	13,4	1	32,6%	0	0,0%	0,8%
9R2	++	6,3	1	32,2%	3	0,9%	2,3%
10P	+	2,9	1	19,1%	0	0,0%	7,6%
11P	nicht untersucht						
11R1	+	3,4	1	32,5%	1	0,3%	3,2%
11R2	0		0	13,5%	0	0,0%	1,4%
12P	0		1	19,8%	27	13,6%	15,5%
13P	nicht untersucht						
13R1	+	3,6	0	16,4%	5	3,0%	4,5%
13R2	+	4,8	0	38,9%	0	0,0%	1,0%
13R3	++	5,4	0	53,4%	2	0,4%	2,4%
14P	+	1,0	0	16,4%	0	0,0%	1,8%
15P	nicht untersucht						
15R1	nicht untersucht						
15R2	nicht untersucht						
15R3	nicht untersucht						
15R4	+	3,8	0	30,4%	9	3,0%	12,4%
16P	0		1	2,3%	7	30,4%	6,3%
17P	nicht untersucht						
17R	0		1	21,8%	4	1,8%	6,7%

Patient	p53		HLA-DR	MIB-1 LI	MG/Makrophagen-Proliferation		prozentualer Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtzellzahl am Ort der höchsten Proliferation
	0 = negativ + = <5% ++ = 5-10% +++ = >10%	%-Wert			absolute Anzahl/1000 Zellen	Prozentualer Anteil der MG/Makrophagen an der Gesamtproliferation	
18P	nicht untersucht						
18R	+++	25,6	1	2,3%	12	52,2%	18,4%
19P	0		1	nicht auswertbar			
19R1	nicht untersucht						
19R2	0		1	18,3%	1	0,5%	7,5%
19R3	nicht untersucht						
19R4	++	9,4	1	53,8%	8	1,5%	6,1%
19R5	+	1,9	1	48,7%	9	1,8%	6,6%
20P	0		1	10,3%	0	0,0%	10,3%
20R1	nicht untersucht						
20R2	+	2,1	1	23,4%	4	1,7%	9,9%
20R3	+++	13,9	1	64,3%	0	0,0%	2,1%
21P	0		0	4,2%	3	7,1%	6,7%
22P	nicht untersucht						
22R	0		1	24,4%	3	1,2%	6,9%
23P	++	9,8	1	32,1%	3	0,9%	7,2%
24P	+++	12,0	0	25,5%	1	0,4%	1,7%
24R	+	4,2	0	22,1%	0	0,0%	4,4%
25P	nicht untersucht						
25R	0		1	23,3%	3	1,3%	4,7%
26P	+	3,3	1	12,5%	38	30,4%	14,5%
26R	0		nicht auswertbar	21,9%	1	0,5%	5,8%
27P	0		0	32,9%	2	0,6%	7,2%
27R	++	6,1	1	44,5%	2	0,4%	3,9%
28P	0		0	6,0%	3	5,0%	5,5%
29P	+	3,4	0	9,7%	0	0,0%	3,9%
30P	0		1	2,2%	2	9,1%	6,4%
31P	+	1,8	0	30,6%	4	1,3%	4,1%
32P	0		0	5,9%	0	0,0%	8,5%
33P	0		0	20,8%	0	0,0%	4,1%
33R1	0		0	1,4%	11	78,6%	6,1%
33R2	+	3,9	0	4,6%	19	41,3%	18,2%
34P	+	3,7	1	30,1%	6	2,0%	7,2%
34R	+	3,8	1	8,4%	3	3,6%	9,0%
35P	0		0	7,8%	nicht auswertbar		
36P	+	2,9	0	38,8%	4	1,0%	4,6%
36R	0		0	11,0%	3	2,7%	3,3%
37P	+	2,1	0	1,6%	1	6,3%	5,6%
38P	+	3,2	1	32,2%	2	0,6%	2,5%
39P	0		0	2,6%	1	3,8%	7,4%
40P	0		1	17,5%	5	2,9%	9,2%

7.2.2 MG/Makrophagen-Verteilung

Patient	Ort der Auswertung	MG/ Makrophagen insgesamt	ramifizierte MG		amöboide MG		Makrophagen	
			absolut	in %	absolut	in %	absolut	in %
1P	nicht untersucht							
1R	a	109	67	61,5%	36	33,0%	6	5,5%
	b	177	145	81,9%	25	14,1%	7	4,0%
2P	b	255	96	37,6%	137	53,7%	22	8,6%
3P	a	195	153	78,5%	34	17,4%	8	4,1%
	b	369	58	15,7%	229	62,1%	82	22,2%
4P	a	102	84	82,4%	17	16,7%	1	1,0%
	b	342	164	48,0%	164	48,0%	14	4,1%
5P	nicht untersucht							
5R1	b	204	167	81,9%	26	12,7%	11	5,4%
5R2	a	101	84	83,2%	11	10,9%	6	5,9%
	b	451	329	72,9%	99	22,0%	23	5,1%
6P	a	80	74	92,5%	4	5,0%	2	2,5%
	b	224	106	47,3%	108	48,2%	10	4,5%
7P	b	519	211	40,7%	261	50,3%	47	9,1%
8P	nicht untersucht							
9P	a	252	214	84,9%	35	13,9%	3	1,2%
	b	385	166	43,1%	184	47,8%	35	9,1%
9R1	a	75	66	88,0%	7	9,3%	2	2,7%
9R2	a	177	48	27,1%	84	47,5%	45	25,4%
10P	b	131	69	52,7%	57	43,5%	5	3,8%
11P	nicht untersucht							
11R1	a	179	135	75,4%	36	20,1%	8	4,5%
	b	321	60	18,7%	148	46,1%	113	35,2%
11R2	a	23	14	60,9%	8	34,8%	1	4,3%
	c	130	107	82,3%	19	14,6%	4	3,1%
	c	137	93	67,9%	35	25,5%	9	6,6%
12P	a	85	59	69,4%	26	30,6%	0	0,0%
	b	501	138	27,5%	296	59,1%	67	13,4%
13P	nicht untersucht							
13R1	b	476	338	71,0%	125	26,3%	13	2,7%
	b	464	167	36,0%	257	55,4%	40	8,6%
13R2	a	51	7	13,7%	24	47,1%	20	39,2%
13R3	b	316	153	48,4%	134	42,4%	29	9,2%
14P	a	137	117	85,4%	19	13,9%	1	0,7%
	b	367	139	37,9%	213	58,0%	15	4,1%
15P	nicht untersucht							
15R1	nicht untersucht							
15R2	nicht untersucht							
15R3	nicht untersucht							
15R4	b	206	61	29,6%	92	44,7%	53	25,7%
16P	a	154	111	72,1%	41	26,6%	2	1,3%
	b	285	120	42,1%	125	43,9%	40	14,0%
17P	nicht untersucht							

Patient	Ort der Auswertung	MG/ Makrophagen insgesamt	ramifizierte MG		amöboide MG		Makrophagen	
			absolut	in %	absolut	in %	absolut	in %
17R	b	434	391	90,1%	40	9,2%	3	0,7%
18P	nicht untersucht							
18R	b	337	119	35,3%	144	42,7%	74	22,0%
	b	467	384	82,2%	68	14,6%	15	3,2%
19P	nicht auswertbar							
19R1	nicht untersucht							
19R2	a	149	107	71,8%	37	24,8%	5	3,4%
	b	202	78	38,6%	106	52,5%	18	8,9%
19R3	nicht untersucht							
19R4	a	172	77	44,8%	80	46,5%	15	8,7%
	b	227	55	24,2%	139	61,2%	33	14,5%
	c	236	211	89,4%	23	9,7%	2	0,8%
	c	378	305	80,7%	66	17,5%	7	1,9%
19R5	b	220	27	12,3%	135	61,4%	58	26,4%
20P	a	216	188	87,0%	27	12,5%	1	0,5%
	b	428	138	32,2%	193	45,1%	97	22,7%
20R1	nicht untersucht							
20R2	b	275	233	84,7%	38	13,8%	4	1,5%
	b	571	147	25,7%	362	63,4%	62	10,9%
20R3	a	111	13	11,7%	73	65,8%	25	22,5%
	b	517	185	35,8%	299	57,8%	33	6,4%
	c	180	157	87,2%	21	11,7%	2	1,1%
	c	170	133	78,2%	34	20,0%	3	1,8%
21P	a	154	117	76,0%	34	22,1%	3	1,9%
	b	384	123	32,0%	235	61,2%	26	6,8%
22P	nicht untersucht							
22R	b	256	178	69,5%	73	28,5%	5	2,0%
23P	b	542	195	36,0%	301	55,5%	46	8,5%
24P	b	131	32	24,4%	70	53,4%	29	22,1%
24R	a	90	73	81,1%	13	14,4%	4	4,4%
	b	356	157	44,1%	165	46,3%	34	9,6%
25P	nicht untersucht							
25R	a	251	183	72,9%	67	26,7%	1	0,4%
	b	775	260	33,5%	469	60,5%	46	5,9%
26P	a	126	95	75,4%	30	23,8%	1	0,8%
	b	460	290	63,0%	162	35,2%	8	1,7%
26R	a	160	82	51,3%	53	33,1%	25	15,6%
	b	259	152	58,7%	91	35,1%	16	6,2%
27P	a	196	151	77,0%	40	20,4%	5	2,6%
	b	254	120	47,2%	120	47,2%	14	5,5%
27R	b	280	56	20,0%	180	64,3%	44	15,7%
28P	a	117	94	80,3%	21	17,9%	2	1,7%
29P	a	101	63	62,4%	28	27,7%	10	9,9%
30P	a	236	216	91,5%	19	8,1%	1	0,4%
	b	278	62	22,3%	145	52,2%	71	25,5%
31P	a	169	153	90,5%	16	9,5%	0	0,0%
	b	197	114	57,9%	69	35,0%	14	7,1%
32P	a	139	56	40,3%	70	50,4%	13	9,4%

Patient	Ort der Auswertung	MG/ Makrophagen insgesamt	ramifizierte MG		amöboide MG		Makrophagen	
			absolut	in %	absolut	in %	absolut	in %
33P	a	95	77	81,1%	16	16,8%	2	2,1%
33R1	a	122	86	70,5%	32	26,2%	4	3,3%
33R2	a	164	109	66,5%	50	30,5%	5	3,0%
	b	270	140	51,9%	123	45,6%	7	2,6%
34P	a	240	181	75,4%	52	21,7%	7	2,9%
	b	190	114	60,0%	67	35,3%	9	4,7%
	c	74	60	81,1%	14	18,9%	0	0,0%
34R	b	253	155	61,3%	83	32,8%	15	5,9%
35P	nicht auswertbar							
36P	b	151	80	53,0%	66	43,7%	5	3,3%
	c	150	133	88,7%	17	11,3%	0	0,0%
	d	260	33	12,7%	124	47,7%	103	39,6%
36R	b	193	164	85,0%	28	14,5%	1	0,5%
	d	173	94	54,3%	63	36,4%	16	9,2%
	d	203	134	66,0%	63	31,0%	6	3,0%
37P	b	215	124	57,7%	76	35,3%	15	7,0%
38P	a	146	95	65,1%	44	30,1%	7	4,8%
	b	293	176	60,1%	103	35,2%	14	4,8%
39P	a	171	148	86,5%	15	8,8%	8	4,7%
40P	a	155	110	71,0%	35	22,6%	10	6,5%
	b	355	110	31,0%	222	62,5%	23	6,5%
	c	176	149	84,7%	24	13,6%	3	1,7%

Ort der Auswertung: a und b: Tumor,
c: Tumor-entferntes Hirngewebe,
d: an den Tumor angrenzendes Hirngewebe

7.2.3 EMA-Expression

Patient	EMA-Expression 0 = negativ, 1 = positiv				
	Zelloberfläche	intrazytoplasmatisch			gesamt
	punktuell	diffus	ringförmig		
1P	nicht untersucht				
1R	1	1	1	1	1
2P	0	0	0	0	0
3P	1	0	1	0	1
4P	0	0	1	0	1
5P	nicht untersucht				
5R1	1	0	0	0	0
5R2	1	0	0	0	0
6P	1	0	1	0	1
7P	1	1	1	0	1
8P	0	0	0	0	0
9P	0	1	1	0	1
9R1	1	0	1	1	1
9R2	1	0	1	1	1
10P	0	0	0	0	0
11P	nicht untersucht				
11R1	0	0	1	0	1
11R2	1	1	1	0	1
12P	1	0	1	0	1
13P	nicht untersucht				
13R1	1	0	1	0	1
13R2	1	0	0	0	0
13R3	1	0	0	0	0
14P	0	1	0	1	1
15P	nicht untersucht				
15R1	nicht untersucht				
15R2	nicht untersucht				
15R3	nicht untersucht				
15R4	0	0	1	0	1
16P	0	1	0	0	1
17P	nicht untersucht				
17R	1	0	0	0	0
18P	nicht untersucht				
18R	1	0	0	0	0
19P	0	1	1	0	1
19R1	nicht untersucht				
19R2	1	1	1	0	1
19R3	nicht untersucht				
19R4	1	0	1	0	1
19R5	1	0	1	0	1
20P	1	0	1	0	1
20R1	nicht untersucht				
20R2	1	1	1	0	1

Patient	EMA-Expression 0 = negativ, 1 = positiv				
	Zelloberfläche	intrazytoplasmatisch			gesamt
		punktuell	diffus	ringförmig	
20R3	0	1	0	0	1
21P	1	1	0	1	1
22P	nicht untersucht				
22R	1	1	1	1	1
23P	1	0	1	1	1
24P	0	1	0	0	1
24R	0	0	0	0	0
25P	nicht untersucht				
25R	1	0	1	0	1
26P	1	1	0	0	1
26R	0	0	0	0	0
27P	0	0	0	0	0
27R	1	1	1	0	1
28P	0	0	0	0	0
29P	0	0	0	0	0
30P	1	0	1	0	1
31P	1	1	0	0	1
32P	1	0	0	0	0
33P	0	0	1	0	1
33R1	0	0	1	0	1
33R2	0	0	1	0	1
34P	1	0	1	1	1
34R	0	0	1	0	1
35P	1	1	0	0	1
36P	0	1	0	0	1
36R	1	1	1	1	1
37P	1	0	0	0	0
38P	1	0	1	0	1
39P	0	0	0	0	0
40P	1	1	1	1	1

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Wolfgang Roggendorf danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die wohlwollende Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft während der gesamten Arbeitsphase, sowie für die Übernahme des Referates.

Herrn Professor Dr. med. Andreas Krone gilt mein Dank für die Übernahme des Koreferates.

Bei Herrn Dr. med. Rüdiger Klein bedanke ich mich für unzählige Diskussionen, konstruktiv-kritische Ratschläge während der Laborarbeiten und der Erstellung des Manuskriptes, sowie für die freundschaftliche Unterstützung.

Ein herzliches Dankeschön gilt Frau Petra Herud, Frau Traudelies Mieth und Frau Hannelore Schraud für die Beratung und Unterstützung bei der Durchführung der Laborarbeiten, sowie Herrn Erwin Schmitt für die Hilfestellung bei der Fotodokumentation.

Für die Beratung und Unterstützung bei der statistischen Auswertung der erhobenen Daten bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Statistischen Beratungs- und Analysezentrum (SBAZ) der Universität Dortmund, insbesondere bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Andreas Christmann und Frau cand. stat. Corinna Miede, außerdem sehr herzlich bei Herrn Professor Dr. Siegfried Schach.

Herrn Professor Dr. med. Dr. med. h.c. Reza Parwaresch (Institut für Hämatopathologie der Universität zu Kiel) sei für die freundliche Bereitstellung des Antikörpers Ki-M1P gedankt.

Nur durch die uneingeschränkte Unterstützung und Befürwortung meines bisherigen Lebensweges durch meine Eltern war es möglich, Medizin zu studieren und diese Dissertation zu erstellen. Vielen Dank!

Diese Arbeit ist allen kleinen Tumorpatienten gewidmet.

Lebenslauf

Georg Martin Stettner

- 01.09.1973 Geburt in München als drittes von fünf Kindern der Eltern
Heidemarie Stettner und Dr. rer. nat. Gerhard Stettner
- 1980 – 1984 Grundschule Holzkirchen/Oberbayern
1984 – 1993 Musisches Pestalozzi-Gymnasium, München
Juli 1993 Abitur
- August 1993 – Zivildienst in der Heckscher Klinik (Kinder- und
Oktober 1994 Jugendpsychiatrie), München
- Oktober 1994 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Christian-
Albrechts-Universität zu Kiel
- August 1996 Ärztliche Vorprüfung
- September 1996 – Studium an der medizinischen Fakultät der Universität zu
August 1997 Helsinki/Finnland
- ab Oktober 1997 Studium an der Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
- Mai 1998 Beginn der Dissertation bei Herrn Professor Dr. med.
Wolfgang Roggendorf, Abteilung für Neuropathologie des
Pathologischen Institutes der Universität Würzburg, mit dem
Thema „Immunhistologische und morphometrische
Untersuchung der Ependymome im Kindesalter in
Korrelation zu den klinischen Befunden“.
- August 1998 1. Teil der ärztlichen Prüfung
September 2000 2. Teil der ärztlichen Prüfung
- März 2001 – Praktisches Jahr in
Februar 2002 Turku/Finnland (Innere Medizin, Kinderheilkunde) und
Würzburg (Kinderheilkunde, Chirurgie)
- Mai 2002 3. Teil der ärztlichen Prüfung
- seit August 2002 Arzt im Praktikum in der Klinik für Kinder- und
Jugendmedizin der Ruhr-Universität zu Bochum