

Aus dem Institut für Pathologie
Medizinische Fakultät der Universität Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Erbersdobler
Arbeit unter der Leitung von PD Dr. med. habil. Annette Zimpfer

**Klinisch-pathologische und molekulare Charakterisierung
des kardialen Myxoms unter besonderer Berücksichtigung der
regulatorischen Untereinheit 1-Alpha der cAMP-abhängigen
Proteinkinase A (PRKAR1A): eine retrospektive
monozentrische Studie von 2006 bis 2021**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Liza Marie Abel, geb. am 13.10.1994 in Berlin

Rostock, 2022

Gutachter:

PD Dr. med. A. Zimpfer, Universität Rostock, Institut für Pathologie

Prof. Dr. med. P. M. Dohmen, Universität Rostock, Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie

Prof. Dr. rer. nat. J. Kirfel, Universität zu Lübeck, Institut für Pathologie

Jahr der Einreichung: 2022

Jahr der Verteidigung: 2023

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Epidemiologie des kardialen Myxoms.....	1
1.2 Lokalisation und Klinik des sporadischen kardialen Myxoms.....	2
1.3 Therapieoptionen	3
1.4 Pathologische Diagnostik	5
1.4.1 Makroskopie.....	5
1.4.2 Mikroskopie.....	5
1.5 Histogenese	5
1.6 Carney-Komplex.....	6
1.7 Genetischer Hintergrund	9
1.7.1 Aufbau und Funktion der cAMP-abhängigen regulatorischen Untereinheit Typ I-Alpha der Proteinkinase A.....	9
1.7.2 Rolle von PRKAR1A beim kardialen Myxom	10
2 Zielstellung und Aufbau der Arbeit.....	13
2.1 Ziel der Arbeit.....	13
2.2 Studienaufbau	13
3 Material und Methoden	15
3.1 Studiendesign	15
3.2 Material	15
3.3 Datenerhebung	17
3.4 Literaturrecherche	18
3.5 Tissue Microarray.....	18
3.5.1 Prinzip der Tissue Microarray-Technik	18
3.5.2 Durchführung	19
3.6 Immunhistochemie	20
3.6.1 Prinzip des immunhistochemischen Verfahrens	20
3.6.2 Durchführung	21
3.6.3 Auswertungskriterien der immunhistochemischen Untersuchungen	22

3.7	Next Generation Sequencing.....	23
3.7.1	DNA-Extraktion	24
3.7.2	Erstellen der Library	24
3.7.3	Auswertung der NGS-Daten.....	26
3.8	Datenauswertung und Statistik	26
4	Ergebnisse.....	27
4.1	Charakteristiken des Patientenkollektivs	27
4.2	Klinisch-pathologische Charakterisierung	27
4.3	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen	31
4.3.1	Proteinkinase 1A.....	32
4.3.2	Ergebnisse weiterer immunhistochemischer Färbungen	34
4.4	<i>PRKAR1A</i> -Mutationsanalysen mittels NGS	37
5	Diskussion.....	41
5.1	<i>PRKAR1A</i> -Mutationen als möglicher Treiber bei sporadischen kardialen Myxomen	41
5.2	<i>PRKAR1A</i> -Expression bei sporadischen kardialen Myxomen.....	45
5.3	Korrelation klinischer und pathologischer Charakteristika bei sporadischen kardialen Myxomen	47
5.4	Immunhistochemische Markeranalysen.....	50
5.5	Methodendiskussion.....	51
6	Zusammenfassung.....	55
	Bibliographie/ Literaturverzeichnis.....	57
	Anhang.....	70
	Thesen.....	73
	Eidesstattliche Erklärung.....	75
	Danksagung.....	76

Abkürzungsverzeichnis

Alphabetisches Abkürzungs- und Begriffserklärungsverzeichnis

AC	Adenylatcyclasen
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Angina pectoris
ATP	Adenosintriphosphat
α-SMA	α -glattmuskuläres Aktin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of Differentiation
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CNC	Carney-Komplex
CRE	cAMP-responsive element
CREB	cAMP-responsive element binding protein
CT	Computertomographie
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EKG	Elektrokardiogramm
EMA	epitheliales Membranantigen
GH	Growth hormone (dt. Wachstumshormon)
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
H&E	Hämatoxylin und Eosin
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
LAMB	Akronym für Lentigines, atriale Myxome, mukokutane Myxome und blaue Nävi
LCCSCT	großzellig kalzifizierender Sertoli-Zell-Tumor
MAB	monoklonaler Antikörper
μl	Mikroliter
mRNA	messenger ribonucleic acid (messenger-RNA)
MRT	Magnetresonanztomographie
NAME	Akronym für Nävi, atriale Myxome, myxoide Neurofibrome und Epheliden
NGS	Next Generation Sequencing
nM	Nanomolar
NMD	Nonsense-vermittelter mRNA-Zerfall

NSE	Neuronen-spezifische Enolase
PAB	polyklonaler Antikörper
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDE	Phosphodiesterase
pH	potentia hydrogenii
PKA	Proteinkinase A
pM	Pikomolar
PPNAD	primäre pigmentierte nodulare adrenokortikale Krankheit
PRKAR1A	regulatorische Untereinheit 1-Alpha der cAMP-abhängigen Protein-kinase A
RtU	Ready-to-use
R1α	regulatorische Alpha-Untereinheit
SD	Standardabweichung
SPSS	Statistical Package of Social Sciences
TE	Tris-EDTA
TEE	transösophageale Echokardiographie
TIA	transitorisch ischämische Attacke
™	Trademark
TMA	Tissue Microarray
TTE	transthorakale Echokardiographie
UEA	Ulex Europeus-Agglutinin
UMR	Universitätsmedizin Rostock
vWF	von-Willebrand-Faktor
X²	Chi-Quadrat-Test

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Typische klinische Manifestationen bei Patienten mit Carney-Komplex.....	7
Abb. 1.2:	Schema des intrazellulären Signalweges der Proteinkinase A	10
Abb. 2.1:	Methodisches Flowchart: Rostocker Patientenkollektiv kardialer Myxome.....	14
Abb. 3.1:	Übersichtsdarstellung zur Herstellung von Tissue Microarrays.....	19
Abb. 3.2:	Empfängerblock mit eingebrachten Gewebezyllindern und Gewebeschnitt des Tissue Microarray-Blockes mit H&E-Färbung.....	20
Abb. 3.3:	Vereinfachte methodische Darstellung der Immunhistochemie	21
Abb. 4.1:	Altersverteilung des Gesamtkollektivs in Gruppen.....	27
Abb. 4.2:	Makroskopie eines jeweils breitbasigen kardialen Myxoms	28
Abb. 4.3:	Histologie sporadischer kardialer Myxome	29
Abb. 4.4:	Klinische Symptomatik in Abhängigkeit der beiden histologischen Subtypen	31
Abb. 4.5:	Färbeergebnisse für PRKAR1A.....	32
Abb. 4.6:	Korrelation der PRKAR1A-Expression mit der klinischen Symptomatik.....	34
Abb. 4.7:	Beispielhafte repräsentative Bilder der seriellen Färbung der Schnitte des Tissue Microarrays mittels verschiedener immunhistochemischer Marker.....	37
Abb. 4.8:	Ergebnisse der PRKAR1A-Mutationsanalysen mittels Next Generation Sequencing	37
Abb. 4.9:	Schematische Darstellung des Typs und der ungefähren Lage der 19 detektierten Mutationen im PRKAR1A-Gen.....	39
Abb. 4.10:	Relative Häufigkeit der PRKAR1A-Expression in Abhängigkeit des Mutationsstatus	39

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1:	Diagnosekriterien beim Carney-Komplex	8
Tab. 3.1:	Verwendete Materialien/Chemikalien und Herstellerangaben.....	15
Tab. 3.2:	Zusammenstellung der erhobenen Daten.....	17
Tab. 3.3:	Übersicht der verwendeten Antikörper und deren Anwendung	21
Tab. 3.4:	Bewertungskriterien der immunhistochemischen Marker.....	23
Tab. 3.5:	Amplifikation.....	24
Tab. 3.6:	Enzymatischer Verdau der PCR-Produkte	25
Tab. 3.7:	Ligation	25
Tab. 3.8:	Amplifikation der Library.....	25
Tab. 4.1:	Parametervergleich der Gruppen entsprechend des PRKAR1A- Expressionsverhaltens	33
Tab. 4.2:	Übersicht der immunhistochemischen Ergebnisse im Rostocker Kollektiv.....	34
Tab. 4.3:	Ergebnisse der PRKAR1A-Mutationsanalyse.....	38
Tab. 4.4:	Vergleich klinischer Parameter zwischen den mutierten und nicht-mutierten Myxomfällen.....	40

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des kardialen Myxoms

Tumorerkrankungen des Herzens wurden bereits 1562 in der Schrift „De re anatomica“ von M. R. Columbus beschrieben (1). Obwohl derartige Herztumoren demnach früh bekannt waren, wurden diese bis zur ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts überwiegend erst nach dem Tod mittels einer Autopsie diagnostiziert. Durch die Einführung bildgebender Verfahren gelang H. P. Goldberg im Jahre 1952 die angiographische Darstellung eines linken Vorhofmyxoms (2). Die erste erfolgreiche Resektion eines linksatrialen Myxoms unter Verwendung der Herz-Lungen-Maschine wurde 1954 von C. Crafoord durchgeführt (3, 4). Obwohl sich die bildgebenden Diagnoseverfahren und herzchirurgischen Techniken seitdem weiterentwickelt haben, stellen Herztumoren auch heutzutage noch eine Rarität im klinischen Alltag eines Kardiologen dar.

Basierend auf Angaben aus Autopsieberichten variiert die Inzidenz von Herztumoren zwischen 0,01 % und 0,19 % (5–8). Eine höhere Inzidenz zeigen Ergebnisse klinischer Analysen an herzchirurgischen Zentren, bei denen 0,45 % bis 0,85 % der insgesamt durchgeführten Herzoperationen auf die Entfernung kardialer Tumoren zurückzuführen sind (9, 10).

Die aktuelle Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) von 2021 umfasst die Differenzierung kardialer Tumoren in benigne, maligne und hämatolymphoide Tumoren (11). Es werden primäre von sekundären Herztumoren unterschieden, wobei sekundäre Herztumoren 20- bis 40-mal häufiger vorkommen. Etwa 90 % der primären Herztumoren sind benigne, die restlichen 10 % sind maligne (11, 12). Das kardiale Myxom ist bei den Erwachsenen nach dem papillären Fibroelastom die zweithäufigste Tumorentität, bezogen auf die primären Herztumoren (11). Bei Kindern und Jugendlichen treten unter den gutartigen Herztumoren am häufigsten Rhabdomyome auf, während kardiale Myxome nur einen geringen Anteil von 10 % ausmachen (13, 14). Grundsätzlich kommen kardiale Myxome in allen Altersgruppen vor, treten aber gehäuft im mittleren Lebensalter zwischen 30 und 60 Jahren auf (15, 16). Wie aus mehreren Studien hervorgeht, sind Frauen zwei- bis dreimal häufiger betroffen als Männer (17–19).

Überwiegend tritt das kardiale Myxom sporadisch auf, es kann jedoch in seltenen Fällen (3 % – 7 %) familiär bedingt sein. Die meisten der familiären Myxome sind mit weiteren Neoplasien assoziiert und kommen im Rahmen eines Syndroms vor, welches als Carney-Komplex (CNC) bezeichnet wird (20).

1.2 Lokalisation und Klinik des sporadischen kardialen Myxoms

Die klinische Symptomatik der Patienten ist sehr variabel und abhängig von verschiedenen Faktoren wie der Lage, Größe und Beweglichkeit des kardialen Myxoms. Die Hauptlokalisation ist in 72 % bis 93 % der Fälle der linke Vorhof, wobei wiederum die meisten dieser Myxome ihren Ursprung im interatrialen Septum nahe der Fossa ovalis haben (21–23).

An anderen Lokalisationen wie dem rechten Atrium (0,7 % – 7,2 %) oder den Ventrikeln (0,9 % – 3,6 %) kommen Myxome selten vor (23–25). Ein multizentrisches oder biatriales Auftreten ist bei sporadischen kardialen Myxomen ebenfalls eine Seltenheit, anders als bei CNC-assoziierten Myxomen (16, 24, 26).

Der Großteil der Patienten zeigt ein oder mehrere klinische Symptome der klassischen Triade aus obstruktiven, embolischen und konstitutionellen Symptomen. Kardiale Obstruktionen aufgrund einer Verlegung der atrioventrikulären Klappen oder des Ausflusstraktes führen häufig zu Symptomen wie Dyspnoe, Unwohlsein oder Synkopen. Bis zu 85 % der Patienten geben in der Anamnese eine zunehmende Dyspnoe als führendes Symptom an (27–29). Insbesondere linksatriale Myxome äußern sich durch obstruktive Symptome, dabei sind häufig veränderte Herzgeräusche zu auskultieren. Ebenso treten Palpitationen oder Tachyarrhythmien auf (18). In seltenen Fällen kann eine akute Verlegung der Mitralklappe zum plötzlichen Herztod führen (21, 23). Neurologische Symptome als Folge einer Embolie der Hirnarterien durch abgelöstes Tumorgewebe oder mobilisierte thrombotische Ablagerungen treten bei 10 % bis 30 % der Patienten auf (30, 31). Embolien der Nierenarterien, Mesenterialarterien oder auch Koronararterien sind ebenfalls möglich, jedoch deutlich seltener (25, 32).

Unspezifische Allgemeinsymptome wie Müdigkeit, Fieber oder Gewichtsverlust sind bei etwa 30 % der Patienten zu beobachten (27). Der Anteil asymptomatischer Patienten variiert in der Literatur zwischen 3,2 % und 46 % stark (18, 30, 32). Durch den vermehrten Einsatz bildgebender Verfahren werden heutzutage oftmals kleine und noch klinisch stumme Myxome als Zufallsbefund im Rahmen einer Abklärung anderer Erkrankungen diagnostiziert (33). Aufgrund der schwerwiegenden Symptome und Komplikationen ist es von großer Bedeutung, eine schnelle und gezielte Diagnosestellung zu gewährleisten.

Das diagnostische Vorgehen bei Patienten mit kardialem Myxom basiert auf der Anamnese, der klinischen Untersuchung sowie radiologischen und echokardiografischen Befunden. Die klinische Untersuchung des Patienten umfasst die Auskultation des Herzens auf mögliche pathologische systolische oder diastolische Herzgeräusche. Die auskultierbaren Herzgeräusche entstehen durch einen gestörten Blutfluss aufgrund von AV-Klappenobstruktionen oder Behinderungen des Klappenschlusses verursacht durch das Flottieren gestielter Myxome. Je nach Mobilität des Myxoms können sich die Geräusche, abhängig von der Körperlage, verändern (19, 34). Weiterhin wird in der Literatur bei einigen Patienten ein sogenannter Tumorplop beschrieben, wobei es sich um ein apikales frühdiastolisches Geräusch handelt (19, 35).

Verursacht durch die Myxommasse, können bei einigen Patienten Arrhythmien sowie ST-Strecken-Veränderungen oder Zeichen einer atrialen Hypertrophie nachweisbar sein (19, 36). Pathologische Herzgeräusche und Veränderungen im Elektrokardiogramm (EKG) stellen jedoch per se keine spezifischen Befunde für ein kardiales Myxom dar, da sie bei vielen anderen kardialen Erkrankungen ebenfalls auftreten können (34, 36).

Auch gibt es keine Hinweise darauf, dass ein bestimmter Bluttest für die Diagnose eines Myxoms pathognomonisch ist. Am häufigsten festzustellen sind eine Erhöhung der Leukozyten und der Thrombozyten sowie die Zunahme der Blutsenkungsgeschwindigkeit (16, 19). Ein gehäuftes Auftreten einer Erhöhung von Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) wird im Zusammenhang mit kardialen Myxomen ebenfalls beschrieben. Die Bedeutung dieser Parameter für eine präoperative Diagnostik oder eine Rezidivkontrolle ist bis zum jetzigen Zeitpunkt jedoch nicht nachgewiesen worden (37, 38).

Als kostengünstige Methode der Wahl kommt die transthorakale Echokardiographie (TTE) zum Einsatz, mit welcher sowohl die Größe und die Lage des Myxoms als auch dessen Anheftungsstelle beurteilt werden können (39). Die TTE ist in der klinischen Routinepraxis ein anwenderfreundliches und schnell verfügbares diagnostisches Instrument. In Fällen, in denen die Bildqualität nicht optimal ist oder Zweifel an der Diagnose bestehen, kann ergänzend die transösophageale Echokardiographie (TEE) eingesetzt werden. Die TEE weist mit über 95 % eine sehr hohe Sensitivität auf (40). Im Vergleich zur TTE liegen die Vorteile der TEE vor allem in der genaueren Identifizierung der Anheftungsstelle und dem Erkennen multipler Myxome (41). Die Magnetresonanztomographie (MRT) sowie die Computertomographie (CT) des Herzens können durch hochauflösende Bilder zusätzliche Informationen über das Ausmaß des Tumors im Herzen oder die angrenzenden extrakardialen Strukturen liefern. Sie werden eingesetzt, um mögliche Differenzialdiagnosen wie andere gutartige oder bösartige Tumoren, Thromben oder koexistierende Pathologien vor dem operativen Eingriff auszuschließen (42, 43).

1.3 Therapieoptionen

Bis heute gilt die operative Entfernung des kardialen Myxoms als Therapie der ersten Wahl. Die Operation sollte möglichst zeitnah nach Diagnosestellung des Tumors erfolgen, um Folgen von Klappenobstruktionen und systemischen Embolien zu minimieren. Heutzutage haben sich verschiedene Operationstechniken für die Tumorsektion bewährt und sind mit einem geringeren postoperativen Risiko sowie sehr guten Langzeitergebnissen assoziiert (22, 25, 44, 45). Häufig werden, wenn nötig, zeitgleich zur Myxomentfernung weitere Operationen wie Herzklappen- oder Bypassoperationen durchgeführt (22, 23, 26).

Während der Entfernung des Tumormaterials wird eine größtmögliche Minimierung mechanischer Manipulationen angestrebt, um mögliche systemische und pulmonale Embolien zu vermeiden (22, 30, 45). Das chirurgische Vorgehen orientiert sich in der Regel an der Lokalisation und Größe des Tumors sowie der Expertise des Operateurs. Am häufigsten wird als Zugang eine mediane Sternotomie gewählt und bei linksatrialen Myxomen ein biatrialer Zugang bevorzugt (22, 23). Die Vorteile dieses Zugangs liegen in einer guten Visualisierung des Tumors und des Tumorstiels, einer minimalen Manipulation sowie einer guten Sicht in alle Herzhöhlen (46). Insbesondere bei breitbasig aufsitzenden Myxomen im Bereich der Fossa ovalis ist es häufig notwendig, einen Teil der unterliegenden Endokard- und Myokardbasis mitzureseziieren, um den Tumor im Ganzen zu entfernen. Über den biatrialen Zugang kann im Anschluss mittels eines Gewebe-Patches ein sicherer Verschluss des Vorhofseptums gewährleistet werden (22, 46). Bei großen Tumoren oder multiplen Myxomen werden häufig Teilresektionen durchgeführt oder mehrere Operationszugänge kombiniert (22, 26). Darüber hinaus hat sich in den letzten zwei Jahrzehnten bei der Entfernung kardialer Myxome die minimalinvasive Chirurgie als eine weitere Operationsmethode etabliert (44, 47). Die Studienergebnisse zeigen gute operative Ergebnisse, geringe postoperative Komplikationen und ein gutes Langzeitüberleben, während die Fallzahlen mit minimalinvasiven Operationsverfahren jedoch begrenzt sind (44, 47). Zudem erhalten immer mehr Patienten mit kardialen Myxomen kombinierte Operationen, sodass minimalinvasive Techniken selten zum Einsatz kommen (22, 25).

Myxomresektionen sind mit einer geringen postoperativen Komplikationsrate assoziiert (23, 25, 26). Die 30-Tages-Mortalitätsrate liegt bei lediglich 0,5 % bis 3 % (22, 45, 48). In vielen herzchirurgischen Zentren zeigen sich nach erfolgreicher Tumorresektion hohe 5-Jahres-Überlebensraten zwischen 93 % und 98 % (23–25).

Tumorrezidive sporadischer kardialer Myxome treten mit 0 % bis 5 % der Fälle und im Vergleich zu CNC-assoziierten Myxomen, bei denen eine Rezidivrate von bis zu 30 % beschrieben wurde, selten auf (19, 22, 25, 26). Bei sporadischen kardialen Myxomen kommen Rezidive am häufigsten bei jüngeren Patienten mit kleinerer Tumorgröße und multipler Lokalisation vor (32, 48). Weiterhin werden die intraoperative Verschleppung von Tumorresten sowie die unzureichende Exzision der Myxome von einigen Autoren als Ursache für das Auftreten von Rezidiven aufgeführt (23, 46, 49).

1.4 Pathologische Diagnostik

1.4.1 Makroskopie

Das makroskopische Erscheinungsbild der Myxome kann sehr variabel sein. Die Größe variiert zwischen 1 cm und 15 cm und liegt durchschnittlich bei 4 cm bis 5 cm (19, 23, 50). Das Gewicht unterliegt mit 10 g bis 225 g ebenfalls einer großen Schwankungsbreite (15).

Entsprechend ihrer Oberflächenmorphologie werden kardiale Myxome in die zwei Kategorien eingeordnet: glatt und villös (Abb. 4.2 in Kapitel 4.2). Rund zwei Drittel der Myxome besitzen eine glatte, leicht glänzende Oberfläche und eine feste Konsistenz (19). Davon unterschieden werden kardiale Myxome mit villöser Oberfläche mit teils zottenartigen und brüchigen Ausläufern (19). Die Anheftungsfläche kann sowohl gestielt als auch breitbasig sein (28).

Überwiegend präsentiert sich die Schnittfläche der kardialen Myxome weiß-gräulich bis gelbbräunlich (51). Neben teilweise anhaftenden Thromben sind in einigen Fällen auf der Tumorschnittfläche kalzifizierende Bereiche, Einblutungen und Zysten erkennbar (52, 53).

1.4.2 Mikroskopie

Die Diagnose des kardialen Myxoms wird durch die Histopathologie sichergestellt. Histologisch zeigen sich sogenannte Myxomzellen. Diese polygonalen Zellen sind meist durch ein stern- oder spindelförmiges Aussehen charakterisiert (54). Der überwiegend eiförmige Zellkern ist von eosinophilem Zytoplasma umgeben. Die Myxomzellen sind in eine amorphe myxoide Matrix, bestehend aus sauren Mucopolysacchariden, eingebettet (Abb. 4.3) (55, 56). Die Zellen liegen zum Teil einzeln verteilt oder in Strängen, umgeben von kleinen Blutgefäßen, im myxoiden Stroma. Degenerative Veränderungen in Form von Fibrosen, zystischen Veränderungen und Verkalkungen sind mikroskopisch ebenfalls in vielen Fällen zu finden (57). Auch hämosiderinhaltige Makrophagen sowie inflammatorische Infiltrate können in der myxoiden Matrix vorliegen (51, 55). Bislang wurden keine histomorphologischen Unterschiede zwischen den sporadischen kardialen und den CNC-assoziierten Myxomen identifiziert (58).

1.5 Histogenese

Die Histogenese kardialer Myxome ist bis heute noch nicht abschließend geklärt und wird aufgrund sich widersprechender Studienergebnisse kontrovers diskutiert.

In mehreren Arbeiten zum Ursprung kardialer Myxomzellen wird die Annahme unterstützt, dass sich Myxome aus primitiven multipotenten mesenchymalen Zellen entwickeln (56, 59).

Vor dem Hintergrund, dass eine Vielzahl immunhistochemischer Marker bei kardialen Myxomen nachgewiesen werden konnte, wird vermutet, dass diese multipotenten Zellen die Fähigkeit besitzen, eine kardiogene, neuronale und endotheliale Zelldifferenzierung zu durchlaufen (53, 59, 60). Folgende Arbeiten unterstützen diese Hypothese: Kodoma et al. wiesen die Expression mehrerer kardiomyozytenspezifischer Transkriptionsfaktoren (Nkx2.5/Csx, GATA-4, MEF2 und eHAND) bei kardialen Myxomen nach (59). Zudem exprimieren kardiale Myxome α -glattmuskuläres Aktin (α -SMA), welches in den Herzmuskelzellen während der frühen Phase der fötalen Entwicklung zu finden ist und als Marker für Myofibroblasten dient. Ebenso zeigen kardiale Myxome eine Expression des Oberflächenproteins CD34, welches bei unreifen hämatopoetischen Progenitorzellen nachgewiesen werden kann (56). Einige Myxome weisen eine Koexpression der beiden Marker α -SMA und CD34 auf, was die Vermutung der Abstammung von einer frühen gemeinsamen Vorläuferzelle des Herzens unterstützt (56).

Pucci et al. wiesen neuronale Marker wie S100 und NSE in 94 % bzw. 89 % der Myxome nach (53). Zudem deutet eine Expression von Calretinin in kardialen Myxomzellen, ähnlich wie sie bereits in Ganglienzellen des fötalen Herzens nachgewiesen wurde, auf eine neuronale Differenzierung hin (61).

Ferner exprimieren gefäßähnliche Aggregate sowie die Myxomzellen selbst mehrere endotheliale Marker wie den von-Willebrand-Faktor vWF/FVIII, CD31 und Ulex Europeus-Agglutinine (UEA-1) (51, 53). Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme einer endothelialen Differenzierung der kardialen Vorläuferzellen. Selten vorkommende drüsenartige Epithelstrukturen innerhalb der myxoiden Matrix sind immunhistologisch nachweislich positiv für ein breites Spektrum an Zytokeratinen wie das epitheliale Membranantigen (EMA) (62). Ebenso wurde die Expression der Zytokeratin-Subtypen CK7 und CK20, welche normalerweise in der oberen Magen-Darm-Schleimhaut exprimiert werden, nachgewiesen (62). Aus diesen Ergebnissen wurde die Vermutung abgeleitet, dass es sich bei diesen drüsenartigen Strukturen möglicherweise um Reste des eingeschlossenen embryonalen Vormagens handeln könnte (62).

1.6 Carney-Komplex

Circa 3 % bis 10 % der kardialen Myxome manifestieren sich als Teil des sogenannten Carney-Komplexes (CNC). Beim CNC handelt es sich um ein Syndrom, welches erstmals im Jahr 1985 durch J. A. Carney als ein Komplex aus Myxomen, fleckiger Hautpigmentierung und endokriner Überaktivität beschrieben wurde (20).

Zuvor wurden Symptome wie Myxome, die in der Haut und am Herzen lokalisiert waren, in Verbindung mit Lentigenes und blauen Nävi unter dem Synonym NAME (Nävi, atriales Myxom, myxoides Neurofibrom und Epheliden) oder LAMB (Lentigenes, atriales Myxom, mukokutananes Myxom und blaue Nävi) zusammengefasst (63, 64).

Die Vererbung erfolgt überwiegend autosomal-dominant mit dennoch variablem Phänotyp (65). Etwa die Hälfte der CNC-Patienten weisen kardiale Myxome auf, allerdings können die Myxome auch in der Haut, der Brust und der Schilddrüse lokalisiert sein. Begleitend charakterisieren Lentigenes, hormonelle Überfunktionen wie beispielsweise die primäre pigmentierte nodulare adrenokortikale Krankheit (PPNAD) sowie bösartige Neubildungen wie ein Sertoli-Zell-Tumor des Hodens und Schwannome das Krankheitsbild (Abb. 1.1) (66, 67).

Auffällige Hautflecken, aber auch bläulich schimmernde Muttermale, sind beim CNC häufige klinische Manifestationen und sollten bei vermehrtem Auftreten an einen CNC denken lassen (Abb. 1.1) (68, 69).

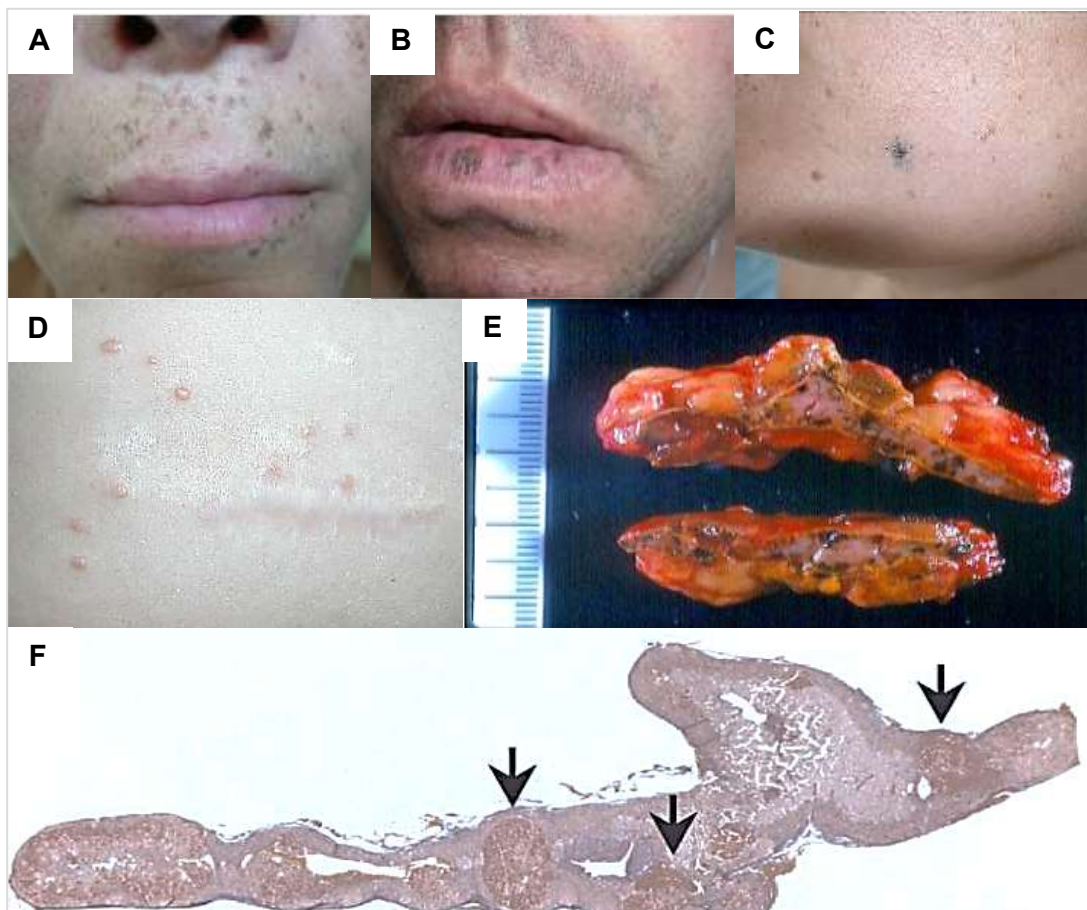


Abb. 1.1: Typische klinische Manifestationen bei Patienten mit Carney-Komplex (A/B): periorale und labiale Lentigenes; (C): sternförmige/netzartige Lentigo, auch als Tintenfleck-Lentigo bezeichnet; (D): multiple Myxome am Rumpf, die sich als kleine Papeln darstellen (A-D modifiziert nach Mateus et al., 2008 (69)); (E): makroskopischer Befund bei PPNAD. Die Schnittfläche zeigt multiple pigmentierte Mikronoduli (modifiziert nach Bertherat et al., 2006 (67)); (F): Der Querschnitt einer Nebenniere zeigt die charakteristische Histologie einer PPNAD mit multiplen Knötchen (Pfeile) (modifiziert nach Bossis et al., 2004 (70)).

Insgesamt ist das CNC-Syndrom eine Konstellation mehrerer variabler klinischer Manifestationen. Für die klinische Diagnosestellung des CNCs müssen entweder mindestens zwei Majorkriterien oder ein Majorkriterium sowie ein ergänzendes Kriterium vorliegen (Tab. 1.1) (66).

Tab. 1.1: Diagnosekriterien beim Carney-Komplex

Majorkriterien:
1. fleckige Hautpigmentierung mit typischer Verteilung (Lippen, Bindehaut und innere oder äußere Lidkante, Vaginal- und Penisschleimhaut)
2. Myxome ¹ (Haut und Schleimhaut)
3. kardiales Myxom ¹
4. Myxomatose der Brust ¹ oder fettunterdrückte MRT-Befunde, die auf diese Diagnose hindeuten ²
5. PPNAD ¹ oder paradoxe positive Reaktion der Glukokortikosteroide im Urin auf die Verabreichung von Dexamethason während des Liddle-Tests ³
6. Akromegalie aufgrund eines GH-produzierenden Adenoms ¹
7. LCCSCT ¹ oder charakteristische Verkalkung im Hoden-Ultraschall
8. Schilddrüsenkarzinom ¹ oder multiple, echoarme Knoten im Schilddrüsen-Ultraschall bei einem jungen Patienten
9. psammomatöses melanotisches Schwannom ¹
10. Blauer Nävus, epitheloider blauer Nävus ¹ (multipel)
11. duktales Adenom der Brust ¹ (multipel)
12. Osteochondromyxom*
Ergänzende Kriterien:
1. betroffener Verwandter ersten Grades
2. inaktivierende Mutation des <i>PRKAR1A</i> -Gens

¹ mit histologischem Nachweis; ² nach Courcoutsakis et al. (71); ³ nach Stratakis et al. (72); Tabelle modifiziert nach Stratakis et al., 2001 (66).

Verwendete Abkürzungen: PPNAD - primäre pigmentierte nodulare adrenokortikale Krankheit; GH - Wachstumshormon; LCCSCT - großzellig kalzifizierender Sertoli-Zell-Tumor.

Hinsichtlich klinischer Merkmale wurden Unterschiede zwischen sporadischen und CNC-assoziierten Myxomen beschrieben. Im Vergleich zu sporadischen kardialen Myxomen, treten CNC-assoziierte Myxome vermehrt zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr auf und zeigen damit ein deutlich früheres Erkrankungsalter (73).

Neben der Lokalisation im linken Atrium, ähnlich wie bei sporadischen Myxomen, sind CNC-assoziierte Myxome häufiger auch im rechten Atrium oder im linken Ventrikel lokalisiert und zeigen gehäuft ein multiples Auftreten (66, 73, 74).

Weiterhin ist bekannt, dass CNC-assoziierte Myxome eine signifikant höhere Rezidivrate nach operativer Tumorentfernung aufweisen, was eine engmaschige Nachsorge bei diesen Fällen begründet (26, 73). Bei Vorliegen eines CNC wird zudem empfohlen, Angehörige zu untersuchen, um bei ihnen die Erkrankung frühzeitig zu diagnostizieren und Komplikationen zu vermeiden (26, 73).

1.7 Genetischer Hintergrund

Obwohl sich in mehreren Studien das CNC-Syndrom als klinisch heterogen darstellte, konnten Ende des 20. Jahrhunderts bei Familien mit CNC potentiell verantwortliche Gene identifiziert werden, die auf den zwei Loci 17q22-24 und 2p16 kartiert sind (68, 75–77).

1.7.1 Aufbau und Funktion der cAMP-abhängigen regulatorischen Untereinheit Typ I-Alpha der Proteinkinase A

Das Forschungsteam um Dr. C. Stratakis entdeckte bei mehr als der Hälfte der CNC-Patienten ihrer Studie heterozygote inaktivierende Keimbahnmutationen im Proteinkinase-1-Alpha-Gen (*PRKAR1A*) (76). *PRKAR1A* ist auf dem langen Arm von Chromosom 17 (17q24.2) lokalisiert und codiert die regulatorische Untereinheit vom Typ 1 α (R1 α) der Proteinkinase A (PKA). Das Gen besteht aus elf Exons, von denen zehn codierend sind (75, 76, 78).

Die PKA gehört zur Gruppe der Serin/Threonin-Kinasen. Als cAMP-abhängige Proteinkinase ist die PKA an einer Vielzahl von Zellfunktionen wie der Differenzierung, Proliferation und Apoptose beteiligt (79). Im inaktivierten Zustand liegt die PKA als Heterotetramer, bestehend aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten, vor (80). Bisher sind für die regulatorische Untereinheit vier Unterformen (R1 α , R1 β , R2 α und R2 β) und für die katalytische Untereinheit drei Unterformen (C α , C β und C γ) bekannt (81). Die Bindung von cAMP an die regulatorischen Untereinheiten führt zur Freisetzung der katalytischen Untereinheiten, die im weiteren Verlauf durch Phosphorylierung eine Vielzahl von Zellfunktionen steuern (Abb. 1.2). Die regulatorische Untereinheit R1 α stellt eine Schlüsselkomponente im cAMP/PKA-Signalweg dar und ist vor allem an der Zellproliferation und der neoplastischen Transformation beteiligt (82). Untersuchungen an Mäusen, bei denen die R1 α -Untereinheit defekt war, haben zu einer signifikanten Erhöhung der PKA-Aktivität geführt (83). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die R1 α -Untereinheit eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der katalytischen Untereinheit und der damit verbundenen Regulation der PKA-Gesamtaktivität einnimmt.

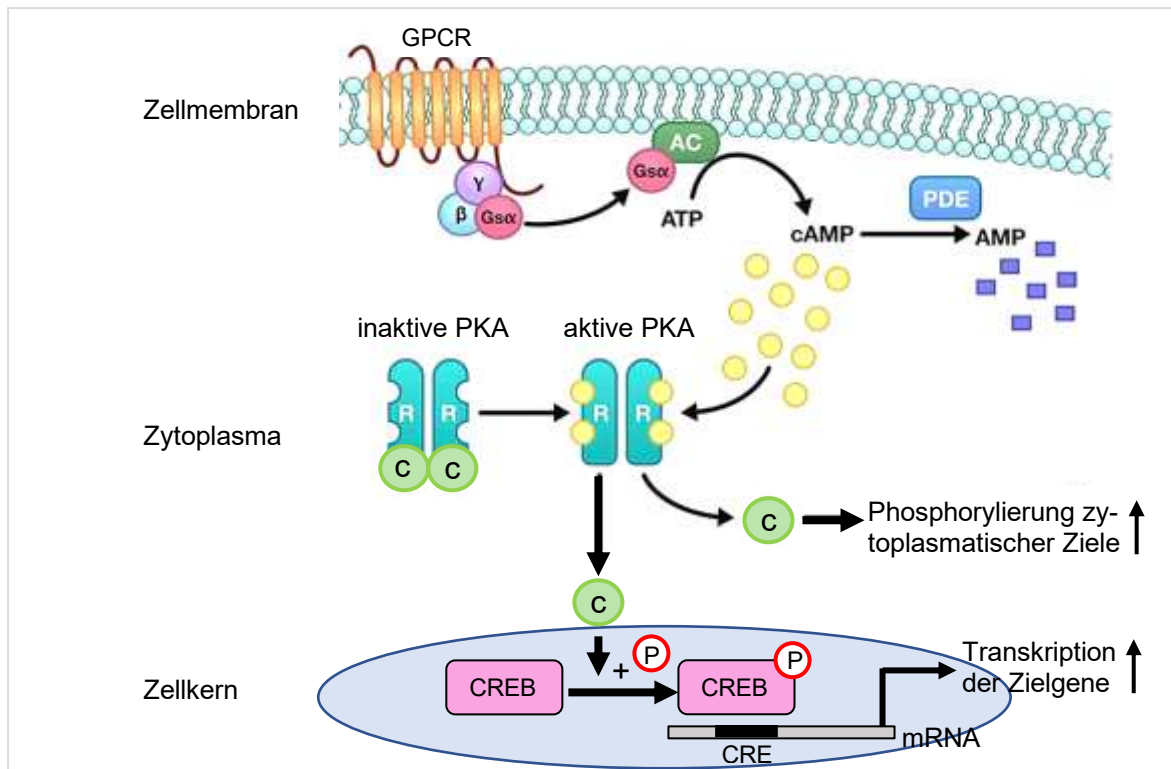


Abb. 1.2: Schema des intrazellulären Signalweges der Proteinkinase A

Nachdem der G-Protein-gekoppelte Rezeptor (GPCR) aktiviert ist, wird die Adenylatcyclase (AC) aktiviert, welche aus ATP cAMP bildet. Für die Aktivierung der Proteinkinase A bindet cAMP an die regulatorischen Untereinheiten (R). Dies führt zur Freisetzung der katalytischen Untereinheiten (C) aus den PKA-Tetramern. Die C-Untereinheiten phosphorylieren im Anschluss zyttoplasmatische und nukleäre Ziele wie CREB (cAMP-response element binding); weitere verwendete Abkürzungen: CRE – cAMP response element; PDE - Phosphodiesterase; AMP – Adenosinmonophosphat; Abbildung modifiziert nach London et al., 2020 (84).

1.7.2 Rolle von PRKAR1A beim kardialen Myxom

Seit der Identifizierung von *PRKAR1A* als potenziell verantwortliches Gen für die Entstehung von Tumoren beim CNC, wurden mehr als 100 verschiedene pathogene Mutationen beschrieben und ihre molekulare und funktionelle Bedeutung untersucht (74, 76, 85, 86). In einer großen Serie mit 353 Patienten gelang es, 80 verschiedene Mutationen bei insgesamt 73 % der Patienten mit CNC zu identifizieren (74). Die bislang beschriebenen Mutationen verteilen sich über das gesamte Gen mit einer Häufung auf den Exons 2, 3, 5 und 7. Viele der Mutationen wurden lediglich einmalig identifiziert, mit Ausnahme von zwei als Hotspot beschriebenen Lokalisationen, da diese in mehr als drei unabhängigen Stammbäumen detektiert wurden: c.709-7del6 in Intron 7 und c.491-492delTG in Exon 5 (74, 76, 86).

Bei den meisten *PRKAR1A*-Mutationen bei Patienten mit CNC handelt es sich um Frameshift- oder Nonsense-Mutationen oder Mutationen, welche mit Sequenzveränderungen im Bereich der Spleiß-Stellen einhergehen (74). Der überwiegende Teil der identifizierten Mutationen führt direkt oder indirekt zu einer vorzeitigen Termination der Translation.

Weitere Analysen ergaben, dass mutierte mRNAs durch einen intrazellulären Nonsense-vermittelten mRNA-Zerfall (NMD) abgebaut werden. Untersuchungen mittels Western Blot zeigten, dass auf Proteinebene keine verkürzten Formen des PRKAR1A-Proteins gebildet werden (85). Der Verlust des PRKAR1A-Proteins bei CNC-Patienten führt einerseits zu einem Anstieg der cAMP-aktivierten PKA-Aktivität (76, 87). Andererseits wurde nachgewiesen, dass der Verlust von PRKAR1A mit einem kompensatorischen Anstieg anderer Untereinheiten wie R2 β und einer Hochregulierung der Typ II PKA einhergeht (88). Insgesamt deutet die aktuelle Datenlage darauf hin, dass das Ungleichgewicht zwischen der Typ I und Typ II PKA, verursacht durch die Haploinsuffizienz des PRKAR1A-Gens, einen Einfluss auf die Entstehung von Tumoren bei CNC-Patienten hat (76, 86, 89).

Obwohl *PRKAR1A*-Mutationen bei der Mehrheit der CNC-Fälle vorliegen, zeigt sich dennoch eine große Variabilität bei der klinischen Manifestation. Bisher gibt es wenige Analysen zu Korrelationen zwischen Geno- und Phänotyp. Interessanterweise waren Mutationen im Bereich der Exons häufiger mit kardialen Myxomen, Akromegalie und Lentiginen assoziiert (74). Im Vergleich zu allen identifizierten *PRKAR1A*-Mutationen fand sich die Mutation c491-492del signifikant häufiger bei CNC-Patienten mit kardialen Myxomen, Lentiginen und Schilddrüsentumoren (74).

Ausgehend von diesen Erkenntnissen und dem Einfluss der vielfältigen *PRKAR1A*-Mutationen auf die Pathogenese von CNC, wurden daraufhin sporadische kardiale Myxome auf genetische Aberrationen von *PRKAR1A* untersucht. Mehrere publizierte Studien kamen zu dem Ergebnis, dass bei sporadischen Myxomen keine *PRKAR1A*-Mutationen vorliegen (90–92). Bereits 2002 untersuchten Fogt et al. 13 sporadische kardiale Myxome auf Veränderungen im *PRKAR1A*-Gen mit dem Ergebnis, dass weder ein Verlust der Heterozygotie auftrat, noch Bandenveränderungen, die auf eine Mikrosatelliteninstabilität hindeuten, zu finden waren (91). Auch weitere Studien konnten bei Studienpopulationen mit sporadischen kardialen Myxomen keine *PRKAR1A*-Mutationen nachweisen (90, 92). Infolge dieser Ergebnisse entstand die Annahme, dass die genetische Grundlage von sporadischen und CNC-assoziierten Myxomen nicht identisch sei und andere Mechanismen zur Pathogenese sporadischer kardialer Myxome beitragen (90–92).

Eine neuere Studie von Maleszewski et al. untersuchte sowohl CNC-assoziierte als auch sporadische Myxome auf *PRKAR1A*-Mutationen. Im Gegensatz zu vorherigen Studien konnten sie nicht nur bei den familiären Myxomen, sondern auch bei 31 % der sporadischen Myxome pathogene Mutationen im *PRKAR1A*-Gen detektieren (93). Das Vorhandensein von *PRKAR1A*-Mutationen bei sporadischen kardialen Myxomen bestätigten die Ergebnisse einer weiteren Studie, in der ein Anteil von knapp zwei Dritteln der sporadischen Myxome Mutationen zeigten (94).

Die Divergenz dieser Ergebnisse macht deutlich, dass es weiterer Studien bedarf, die sich mit der Klärung der Frage befassen, ob *PRKAR1A*-Mutationen ebenso wie bei CNC-assoziierten Myxomen an der Pathogenese sporadischer kardialer Myxome beteiligt sind. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie sollen für die Klärung dieser Fragestellung einen Beitrag leisten.

2 Zielstellung und Aufbau der Arbeit

2.1 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung sporadischer kardialer Myxome im Rostocker Patientenkollektiv unter Einbeziehung klinischer Daten sowie mittels immunhistochemischer und molekularer Untersuchungen, wobei der Schwerpunkt auf den Mutationen im *PRKAR1A*-Gen liegt. Die zentrale Hypothese der Studie ist, dass *PRKAR1A*-Mutationen in sporadischen kardialen Myxomen eine häufige und funktionell bedeutsame Genmutation darstellen, wobei möglicherweise andere Genloci als beim CNC betroffen sind.

Hierzu wurden im Rahmen der Arbeit folgende Punkte untersucht:

- Bestimmung der Häufigkeiten von Mutationen im *PRKAR1A*-Gen bei sporadischen kardialen Myxomen mittels Next Generation Sequencing (NGS)
- Vergleich der detektierten *PRKAR1A*-Mutationen zwischen sporadischen Myxomen und CNC-assoziierten Myxomen unter Einbezug der Literatur
- immunhistochemischer Nachweis von *PRKAR1A* im vorliegenden Myxomkollektiv
- Untersuchung des Zusammenhanges zwischen dem Expressionsverhalten von *PRKAR1A* und dem Vorhandensein von *PRKAR1A*-Mutationen
- immunhistochemische Charakterisierung des Myxomkollektivs unter Verwendung ausgewählter Marker
- Analyse klinischer Parameter und Untersuchung möglicher Unterschiede zwischen den klinischen Angaben und den histopathologischen sowie molekularen Eigenschaften im Rostocker Myxomkollektiv

2.2 Studienaufbau

Die vorliegende Arbeit beinhaltet sowohl die Auswertung der klinischen Daten als auch der immunhistochemischen Ergebnisse inklusive der Mutationsanalysen von 27 Myxom-Fällen.

Im ersten Schritt erfolgte die Evaluation aller Fälle im Hinblick auf die Frage, ob ausschließlich sporadische kardiale Myxome oder möglicherweise CNC-assoziierte Fälle im untersuchten Kollektiv vorlagen. Zu diesem Zweck wurden die Patienten zu einer Nachsorge in die Klinik einbestellt, um das Vorliegen eines CNCs mittels eines Fragebogens auszuschließen.

Zeitgleich wurden 26 Fälle immunhistochemisch mittels Tissue Microarray (TMA)-Technik untersucht. Ein weiterer Fall aus dem Jahr 2021 wurde nachträglich in die Studie eingeschlossen.

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden bei diesem Fall an konventionellen Großflächenschnitten durchgeführt. Zur immunhistochemischen Charakterisierung des Rostocker Kollektivs wurden folgende Marker verwendet: PRKAR1A, Desmin, Vimentin, CD31, CD34, Podoplanin, Calretinin, α -SMA und S100.

Die Häufigkeit des Proteinverlusts von PRKAR1A wurde ermittelt und mögliche Zusammenhänge zwischen dem Expressionsverhalten und weiteren histologischen und klinischen Parametern untersucht (Korrelationsanalysen).

Es erfolgten *PRKAR1A*-Mutationsanalysen aller in die Studie inkludierten 27 Fälle, unabhängig von den Ergebnissen zum Expressionsverhalten für PRKAR1A in der Immunhistochemie (IHC). Es folgte eine Bewertung der detektierten Mutation mittels Datenbankanalysen hinsichtlich der Frage, ob diese als z. B. pathogen einzustufen sind. Im Anschluss wurde untersucht, inwieweit die Fälle mit Expressionsverlust auch Auffälligkeiten in der Mutationsanalyse des *PRKAR1A*-Gens zeigten. Außerdem wurden die detektierten *PRKAR1A*-Mutationen mit den in der Literatur beschriebenen *PRKAR1A*-Mutationen bei CNC-assoziierten Myxomen verglichen. Das folgende Flowchart (Abb. 2.1) soll das vorliegende Tumorkollektiv und die durchgeführten Untersuchungen vereinfacht zusammenfassen:

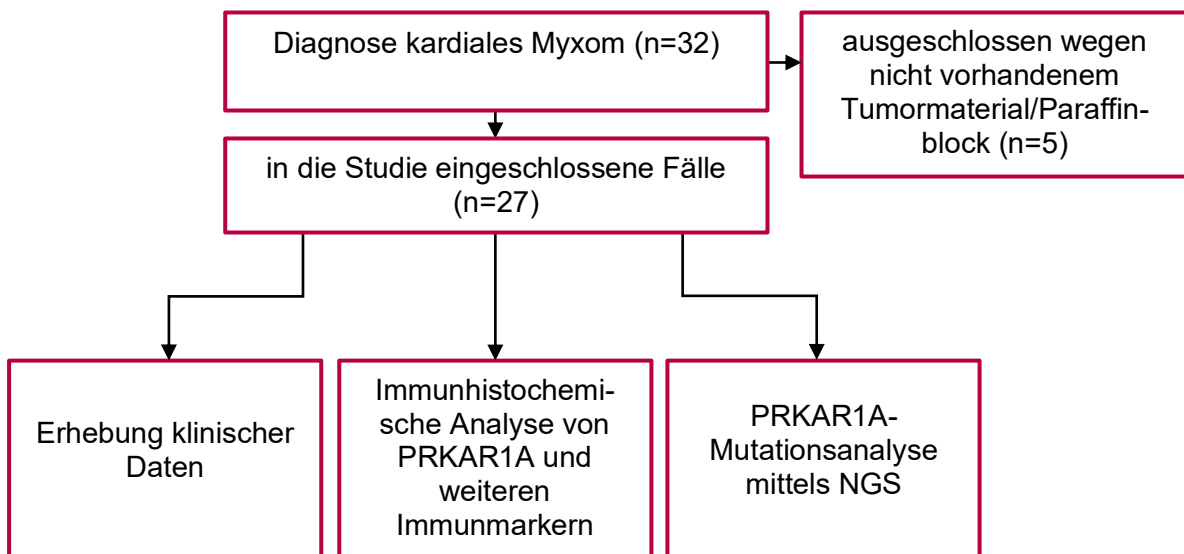


Abb. 2.1: Methodisches Flowchart (eigene Darstellung): Rostocker Patientenkollektiv kardialer Myxome

3 Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Die Diagnose eines kardialen Myxoms wurde im Zeitraum von 2006 bis 2021 an der Universitätsmedizin Rostock (UMR) initial bei insgesamt 32 Patienten gestellt. Für die immunhistochemischen Untersuchungen und die darauffolgenden Mutationsanalysen konnten auf Grundlage von Qualitätskriterien nur 27 der 32 Fälle als Patientenkollektiv ausgewählt werden. Das Vorhandensein von ausreichend Tumorgewebe für die histopathologischen und molekularen Analysen war hierbei der limitierende Faktor. Folglich wurden die Daten von fünf Fällen in der Auswertung nicht berücksichtigt. Patienten mit malignen Herztumoren und anderen benignen Tumorentitäten des Herzens wurden für die Untersuchungen dieser Arbeit nicht miteinbezogen.

3.2 Material

Die immunhistochemischen Untersuchungen und die Mutationsanalysen sind unter Verwendung der folgenden Materialien und Hilfsmitteln erstellt worden (Tab. 3.1):

Tab. 3.1: Verwendete Materialien/Chemikalien und Herstellerangaben

Materialien/Chemikalien	Hersteller
Verbrauchsmaterial	
beschichtete Objektträger	Dako, Instrumedics Inc, Hackensack, USA
Haftfolien	
TPC-Lösung	
Geräte	
Präzisionsstanzgerät	Beecher Instruments, Silver Springs, MD, USA
Mikrotom	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany
Immunostainer	Daco Deutschland GmbH, Hamburg, Germany
Lichtmikroskop	LEICA DM3000 LED
Kamera	Axiocam 305 color, Zeiss, Deutschland
Thermocycler	Sensoquest, Göttingen
NGS-Gerät	Illumina iSeq 100, Berlin

Tab. 3.1: Fortsetzung: Verwendete Materialien/Chemikalien und Herstellerangaben

Materialien/Chemikalien	Hersteller
Immunhistochemie	
EnVision™ FLEX Retrieval Solution, High pH	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking EnVision™ FLEX/HRP	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
EnVision™ FLEX DAB + Chromogen	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
EnVision™ FLEX Hematoxylin primäre Antikörper	Dako Deutschland GmbH, Hamburg (siehe Tab. 3.3)
NGS Mutationsanalyse	
Entparaffinierung	
Rotihistol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	Walter-CMP, Kiel
DNA-Extraktion	
GeneRead DNA FFPE-Kit	Qiagen, Hilden
DNA-Vermessung	
QuantiFluor ONE dsDNA System	Promega, Walldorf
Quantus Fluorometer	Promega, Walldorf
Library-Erstellung	
AmpliSeq for Illumina Custom Panel	Illumina, Berlin
AmpliSeq Library PLUS	Illumina, Berlin
AmpliSeq CD Indexes Set A	Illumina, Berlin
Aufreinigung	
Agencourt AMPure XP Magnetbeads	Beckman Coulter, Krefeld
DynaMag-96 Side, Magnetplatte	ThermoFisher, Dreieich
Vermessung	
QuantiFluor dsDNA System	Promega, Walldorf
Sequenzierung	
iSeq 100 Sequencing System	Illumina, Berlin
iSeq 100 i1 Reagent v2	Illumina, Berlin

3.3 Datenerhebung

Die Datenerhebung erfolgte nach den aktuell geltenden Datenschutzrichtlinien. Ein Ethikvotum lag vor (A2019-0007).

Die Zusammenstellung des für diese Arbeit relevanten Patientenkollektivs mit kardialen Myxomen erfolgte ab 2014 durch das interne Datenverwaltungsprogramm SAP. Für den Zeitraum von 2006 bis Sommer 2014 wurden die Daten aus dem System Pathix des Instituts für Pathologie der UMR eruiert. Mit definierten Suchschlüsseln sind die Fälle mit der Diagnose eines kardialen Myxoms in den jeweiligen Systemen ermittelt worden. Folgende Daten wurden erhoben (Tab. 3.2):

Tab. 3.2: Zusammenstellung der erhobenen Daten

Datentyp	Angaben
Patientendaten	Alter, Geburtsdatum, Geschlecht, ggf. Todesdatum
histopathologische Daten	Identifikationsnummer, Eingangsdatum, Tumorlokalisierung, Tumorgroße, Tumorgewicht, Makroskopie, Mikroskopie
klinische Daten	Datum der Diagnose, Zeitpunkt der Resektion, klinische Symptomatik, Diagnostik, Therapie, Rezidive, Überleben, Ausschluss CNC-assoziiertes Myxome

Makroskopische sowie mikroskopische Informationen der Myxome wurden den Angaben der histologischen Befunde entnommen. Prä-, intra- und postoperative Daten konnten in unterschiedlichem Umfang aus den Patientenakten des Archivs und aus den elektronisch gespeicherten Daten erhoben werden. Zur Komplettierung der klinischen Angaben wurden die Patienten im Rahmen einer Tumornachsorge zu einem persönlichen Gespräch in die Klinik einbestellt. Nach der erhaltenen persönlichen Einwilligung der Patienten für die Studienteilnahme konnten weitere Befunde von Nachsorgeuntersuchungen von den mitbehandelnden Fachärzten angefordert werden. Geschuldet der zu diesem Zeitpunkt bestehenden Regelungen aufgrund der Pandemielage durch SARS-CoV-2, wurde in fünf Fällen, bei denen ein persönliches Erscheinen nicht möglich war, das Gespräch telefonisch durchgeführt.

Um mögliche CNC-assoziierte Fälle zu identifizieren und auszuschließen, wurde mittels eines standardisierten Fragebogens (siehe Anhang 1) das Vorhandensein von CNC-assoziierten Symptomen abgefragt.

Die für diese Arbeit erhobenen Daten wurden gemäß den aktuellen Bestimmungen der allgemeinen Datenschutzrichtlinien anonymisiert und in einer Excel-Übersicht zusammengefasst und verarbeitet.

3.4 Literaturrecherche

Die Literaturrecherche erfolgte mittels der elektronischen Datenbank Pubmed (URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). Als Suchbegriffe dienten folgende Schlagworte, die teilweise auch in Kombination genutzt wurden:

- Cardiac Myxoma
- Left atrial Myxoma
- Benign neoplasm heart
- Carney Complex
- Familial cardiac myxoma
- Paraneoplastic syndrom CNC
- Proteinkinase1A
- Histogenesis Myxoma
- Histopathology of cardiac myxoma
- Clinical features of CNC
- LAMB
- NAME
- Clinical presentation of cardiac myxoma
- Therapies cardiac myxoma

Die verwendete Literatur wurde in das Literaturverwaltungsprogramm Citavi (Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz) eingepflegt und als Zitierhilfe zur Quellenangabe verwendet.

3.5 Tissue Microarray

3.5.1 Prinzip der Tissue Microarray-Technik

Das Verfahren des TMAs wird verwendet, um eine Vielzahl von Gewebeproben gleichzeitig untersuchen zu können (95). Mittels einer Hohlzylinder werden aus den Paraffinblöcken Gewebezylinder des zu untersuchenden Gewebes herausgestanzt und in einen Empfängerblock übertragen. Aus dem entstandenen Empfängerblock, der Stenzen mehrerer Gewebeproben enthält, können mehrere Schnitte angefertigt und für weitere immunhistochemische Untersuchungen verwendet werden.

3.5.2 Durchführung

Für die Durchführung des TMAs wurden zunächst die benötigten Paraffinblöcke sowie die entsprechenden Schnittpräparate des Patientenkollektivs aus dem pathologischen Archiv der UMR herausgesucht. Im Anschluss wurden in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. med. Annette Zimpfer die mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbten Gewebeschnitte mikroskopiert und die repräsentativen Tumorareale mit einem Stift markiert. Zur Anfertigung der Gewebe-TMAs wurde das Präzisionsinstrument der Firma Beecher Instruments (Tab. 3.1) verwendet. Entsprechend der identifizierten Tumorbereiche wurden aus den dazugehörigen Donorblöcken mit Hilfe einer Hohlzylinder jeweils fünf Gewebezylinder mit einem Durchmesser von einem Millimeter herausgestanzt. Die entnommenen Gewebezylinder wurden auf zuvor festgelegte Positionen auf einem neuen Empfängerparaffinblock übertragen (Abb. 3.1 und Abb. 3.2). Vor dem Zuschnitt am Mikrotom wurde der TMA-Block für 30 min bei 50 °C erwärmt, damit sich die Gewebestanden mit dem Paraffin des Empfängerblocks verbinden. Im Anschluss wurden im histopathologischen Labor mittels eines Mikrotoms 2 µm dicke Schnitte angefertigt und auf beschichtete Objektträger aufgebracht (Abb. 3.1).

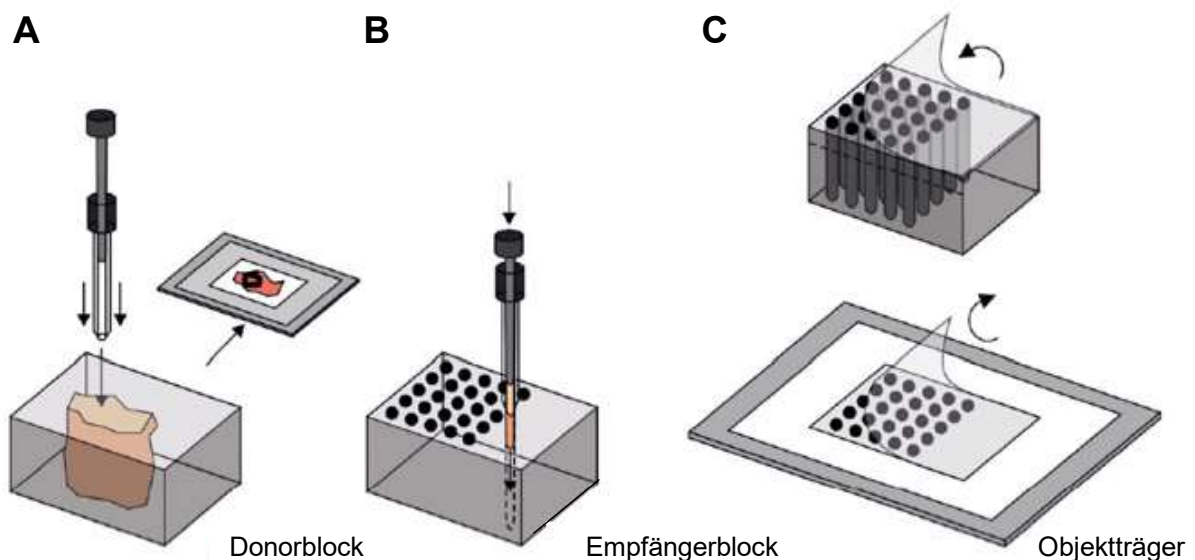


Abb. 3.1: Übersichtsdarstellung zur Herstellung von Tissue Microarrays

Modifiziert nach Kononen et al., 1998 (96); (A): Der H&E-Großflächenschnitt des Donorblockes dient zur Identifizierung von repräsentativem Gewebe, das darauffolgend mittels einer Hohlzylinder gezielt gestanzt wird. (B): Die entnommene Stanze wird in einen vorbereiteten Empfängerblock transferiert. (C): Von dem Empfängerblock werden Schnitte für weitere immunhistochemische Untersuchungen angefertigt und mittels einer Folie auf einem Objektträger platziert.

Die Schnitte standen für weitere histologische und immunhistochemische Untersuchungen zur Verfügung (Abb. 3.2).

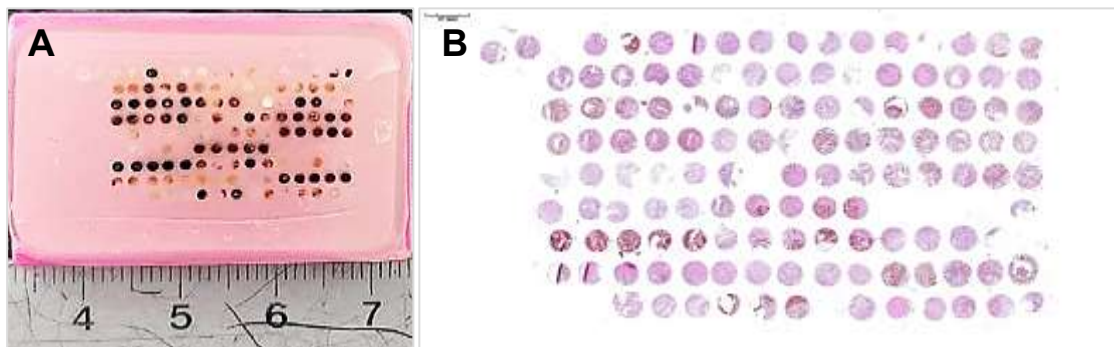


Abb. 3.2: (A): Empfängerblock mit eingebrachten Gewebezylindern. (B): Objektträger mit einem Gewebeschnitt des Tissue Microarray-Blockes mit H&E-Färbung

Pro Tumor wurden fünf Stenzen mit einem Stanzdurchmesser von 1 mm entnommen und in den Empfängerblock eingebracht. Drei Stenzen enthalten Normalgewebe. Stenzen aus dem Probeneingang des Instituts für Pathologie, Universitätsmedizin Rostock.

3.6 Immunhistochemie

3.6.1 Prinzip des immunhistochemischen Verfahrens

Die Immunhistochemie ist ein histopathologisches Verfahren, bei dem spezifische Proteine (z. B. PRKAR1A) mit Hilfe eines primären Antikörpers in Kombination mit einem Detektionssystem, bestehend aus einem Zweitantikörper und einem Chromogen, lichtmikroskopisch sichtbar gemacht werden (Abb. 3.3). Im ersten Schritt wird ein Primärantikörper verwendet, der selektiv an Epitope des Zielantigens bindet und diese ‚markiert‘. Der Antikörper kann sowohl mono- als auch polyklonal sein. Zur Detektion des entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexes wird in einem weiteren Schritt ein Sekundärantikörper eingesetzt. Häufig wird heutzutage ein enzymgekoppelter Sekundärantikörper verwendet, der an den zuvor gebildeten Antigen-Antikörper-Komplex bindet (Abb. 3.3). Abschließend wird ein chromogenes Substrat verwendet, welches von einem Enzym zu einem farbigen Niederschlag umgesetzt wird (Abb. 3.3). Das durch den Antikörper gebundene Antigen kann somit unter dem Mikroskop visualisiert und semiquantitativ ausgewertet werden (97, 98).

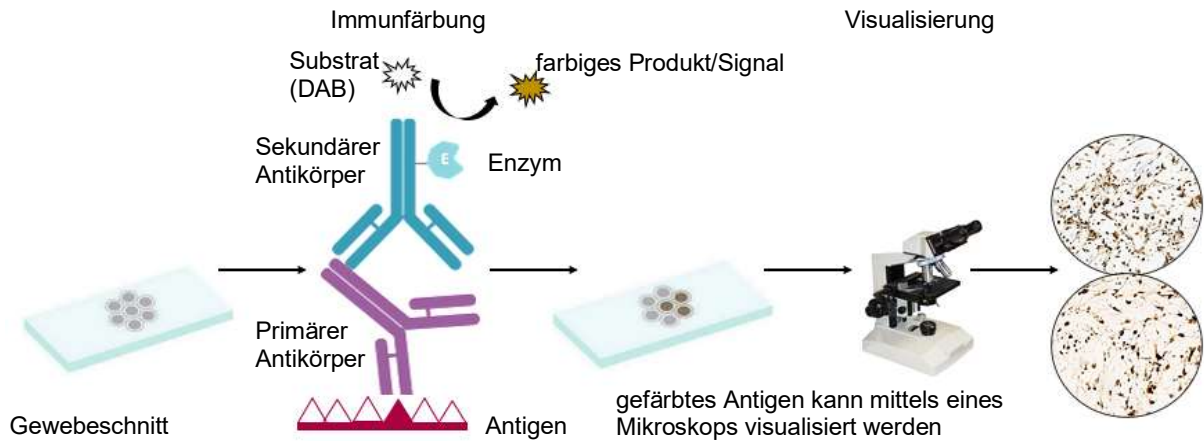


Abb. 3.3: Vereinfachte methodische Darstellung der Immunhistochemie und der anschließenden Visualisierung mittels eines Lichtmikroskops

Eigene Abbildung in Anlehnung an (99, 100); Abkürzungen: DAB - 3,3'-Diaminobenzidin.

3.6.2 Durchführung

Für die IHC an seriellen TMA-Schnitten wurden die folgenden aufgeführten Antikörper (Tab. 3.3) mit der jeweils angegebenen Verdünnung und Vorbehandlung verwendet:

Tab. 3.3: Übersicht der verwendeten Antikörper und deren Anwendung

Antikörper	Typ	Klon/ Hersteller	Vorbehandlung	Verdünnung	Entwicklung/ Gegenfärbung
Calretinin	MAB	DAK Calret 1/DAKO Deutschland GmbH	pH = 9/20 min/97 °C	1:50	DAB/H&E
CD31	MAB	JC70A/DAKO Deutschland GmbH	pH = 9/20 min/97 °C	1:50	DAB/H&E
CD34	MAB	QBend10/DAKO Deutschland GmbH	pH = 9/20 min/97 °C	RtU	DAB/H&E
Desmin	MAB	D33/DAKO Deutschland GmbH	pH = 9/20 min/97 °C	RtU	DAB/H&E
PRKAR1A	PAB	Abcam	pH = 9/20 min/97 °C	1:50	DAB/H&E
Podoplanin	MAB	D2-40/DAKO Deutschland GmbH	pH = 9/20 min/97 °C	RtU	DAB/H&E

Abkürzungen: MAB - Monoklonal (Maus); PAB - Polyklonal (Kaninchen); RtU - Ready-to-use; DAB - 3,3'-Diaminobenzidin; H&E – Hämatoxylin und Eosin

Tab. 3.3: Fortsetzung: Übersicht der verwendeten Antikörper und deren Anwendung

Antikörper	Typ	Klon/ Hersteller	Vorbehandlung	Verdü- nung	Entwicklung/ Gegenfärbung
S100	PAB	DAKO Deutschland GmbH	pH = 9/20 min/97 °C	1:4000	DAB/H&E
α-SMA	MAB	1A4/DAKO Deutschland GmbH	pH = 9/20 min/97 °C	1:100	DAB/H&E
Vimentin	MAB	V9/DAKO Deutschland GmbH	pH = 9/20 min/97 °C	RtU	DAB/H&E

Abkürzungen: MAB - Monoklonal (Maus); PAB - Polyklonal (Kaninchen); RtU - Ready-to-use; DAB - 3,3'-Diaminobenzidin; H&E – Hämatoxylin und Eosin

Die Färbungen wurden im immunhistochemischen Labor durchgeführt. Die vorab auf den Objektträger gezogenen Schnitte wurden zunächst schonend über Nacht bei 37 °C getrocknet, bevor eine automatisierte Vorbehandlung der Schnitte einschließlich Entparaffinierung, Rehydrierung und hitzeinduzierter Epitopdemaskierung unter Verwendung der EnVision™ FLEX Retrieval Solution, High pH (Tab. 3.1) erfolgte. Der nächste Schritt war die Inkubation mit den primären Antikörpern (Tab. 3.3). Für die immunhistochemischen Färbungen wurde der Autostainer Link 48 von DAKO verwendet. Das Substratsystem EnVision™ FLEX DAB + Chromogen (Tab. 3.1) zeigte das Endprodukt am Ort des Zielantigens durch eine kontrastreiche, braune Färbung. Zu jedem Antikörper wurden Positivkontrollen mitgeführt. Zur Gegenfärbung, die eine deutliche Blaufärbung der Zellkerne bewirkte, wurde EnVision™ FLEX Hematoxylin (Tab. 3.1) verwendet.

Die Färbeergebnisse für PRKAR1A an den TMA-Schnitten wurden durch erneute Färbungen an Großflächenschnitten validiert.

3.6.3 Auswertungskriterien der immunhistochemischen Untersuchungen

Die lichtmikroskopische Auswertung der TMA-Schnitte erfolgte semiquantitativ. Die Einzelinformationen wurden zu einem Gesamtergebnis pro Tumorfall zusammengefasst. Die Bewertungskriterien für die verwendeten immunhistochemischen Marker sind nachfolgend dargestellt (Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Bewertungskriterien der immunhistochemischen Marker

Marker	Expression	Auswertungsmodus
Calretinin	zytoplasmatisch	negativ = 0 ($\leq 10\%$ *) positiv = 1 ($> 10\%$ *)
CD31	membranös	negativ = 0 ($\leq 10\%$ *) positiv = 1 ($> 10\%$ *)
CD34	membranös	negativ = 0 ($\leq 10\%$ *) positiv = 1 ($> 10\%$ *)
Desmin	zytoplasmatisch	negativ = 0 ($\leq 10\%$ *) positiv = 1 ($> 10\%$ *)
Podoplanin	zytoplasmatisch	negativ = 0 ($\leq 10\%$ *) positiv = 1 ($> 10\%$ *)
PRKAR1A	nukleär und zytoplasmatisch	negativ/Komplettausfall = 0 ($\leq 10\%$ *) Partialausfall = 1 ($> 10\% - 20\%$ *) positiv/kein Expressionsverlust = 2 ($> 20\%$ *)
S100	nukleär und zytoplasma- tisch	negativ = 0 ($\leq 10\%$ *) positiv = 1 ($> 10\%$ *)
α-SMA	zytoplasmatisch	negativ = 0 ($\leq 10\%$ *) positiv = 1 ($> 10\%$ *)
Vimentin	zytoplasmatisch	negativ = 0 ($\leq 10\%$ *) positiv = 1 ($> 10\%$ *)

*Anteil der Tumorzellen mit nachgewiesener Expression des jeweiligen Antikörpers

3.7 Next Generation Sequencing

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der Technologie des Next Generation Sequencings (NGS) die zehn codierenden Exons (2 - 11) des *PRKAR1A*-Gens analysiert. Für die Analyse der 27 Proben wurde zur Erstellung der Library ein AmpliSeq For Illumina Custom DNA-Panel verwendet, welches die entsprechenden Bereiche des *PRKAR1A*-Gens abdeckt. Die Erstellung der Library erfolgte mittels des AmpliSeq Library PLUS-Kits und zur Sequenzierung wurde das Illumina iSeq100-System verwendet (Tab. 3.1).

3.7.1 DNA-Extraktion

Die Isolierung der Tumor-DNA erfolgte aus den Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten ausgewählten Gewebeschnitten. Mittels Inkubation in Rotihistol und anschließender Ethanolbehandlung wurde das Gewebe entparaffiniert. Die DNA wurde mittels dem GeneRead DNA FFPE-Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Zusammengefasst handelt es sich um einen enzymatischen Verdau des Gewebes mit Proteinase K für eine Stunde bei 56 °C und anschließender einstündiger Hitzebehandlung bei 96 °C zur Aufhebung von DNA-/Chromatin-Kreuzvernetzungen aufgrund der Formalin-Fixierung.

Es erfolgte eine säulenbasierte Aufreinigung des behandelten Lysats und beinhaltete mehrere Zentrifugationsschritte zum Binden der DNA, Entfernen von Verunreinigungen mit Hilfe von Waschpuffern und abschließenden Elutieren in 20 bis 25 µl RNase-freiem Wasser.

Die Konzentrationsbestimmung wurde mit dem fluoreszenzbasierten dsDNA One-System und dem Quantus Fluorometer durchgeführt (Tab. 3.1).

3.7.2 Erstellen der Library

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) handelt es sich um ein enzymabhängiges Verfahren. Es wird eingesetzt, um gezielt Abschnitte der genomischen DNA, welche durch Primer definiert werden, zu amplifizieren. Der gesamte Ablauf ist in mehrere Abschnitte untergliedert. Für die Amplifikation der genomischen DNA wurden das AmpliSeq Custom Panel und der AmpliSeq Hifi Mix (Tab. 3.1) verwendet. Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler in mehreren Schritten (Tab. 3.5).

Tab. 3.5: Amplifikation

Schritt	Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
1.	2 min	99 °C	1
2.	15 s	99 °C	20
3.	4 min	60 °C	1
4.	-	10 °C	herunterkühlen

Zu den PCR-Produkten wurde zum partiellen enzymatischen Verdau das FuPA-Reagenz hinzugegeben und das entsprechende Programm im Thermocycler durchlaufen (Tab. 3.6).

Tab. 3.6: Enzymatischer Verdau der PCR-Produkte

Schritt	Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
1.	10 min	50 °C	1
2.	20 min	62 °C	1
3.	-	10 °C	herunterkühlen

Für die anschließende Ligation der Adapter und Indizes, welche zur Identifikation der Proben dienen, wurden die Reagenzien Switch Solution, AmpliSeq CD Indizes und die DNA-Ligase verwendet (Tab. 3.1). Die Ligation wurde entsprechend dem Ablauf durchgeführt (Tab. 3.7).

Tab. 3.7: Ligation

Schritt	Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
1.	30 min	22 °C	1
2.	5 min	68 °C	1
3.	5 min	72 °C	1
4.	-	10 °C	herunterkühlen

Im nächsten Arbeitsschritt wurde die Library mittels magnetischer Beads und je 150 µl 70-prozentigem Ethanol aufgereinigt und anschließend nochmals amplifiziert. Jeder Ansatz (sog. Mastermix) pro Well innerhalb der 96-Well-Mikrotierplatte bestand aus 45 µl Lib Amp Mix und 5 µl Library Amp Primer. Die Amplifikation der Library fand im Thermocycler statt (Tab. 3.8):

Tab. 3.8: Amplifikation der Library

Schritt	Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
1.	2 min	98 °C	1
2.	15 s	98 °C	7
3.	1 min	64 °C	1
4.	-	10 °C	herunterkühlen

Im Weiteren erfolgten sowohl ein erneuter Aufreinigungszyklus mit Agencourt AMPure XP beads und 70-prozentigem Ethanol als auch die Elution der fertigen Libraries mit jeweils 30 µl low Tris-EDTA (TE). Anschließend wurden je 2 µl des Eluats mit dem QuantiFluor dsDNA System (Promega) vermessen. Die einzelnen Libraries wurden auf eine Konzentration von 10 Nanomolar (nM) verdünnt und gepoolt.

Nach einer Zwischenverdünnung auf 1 nM wurde der Pool auf eine finale Konzentration von 60 Pikomolar (pM) verdünnt. Davon wurden 20 µl in die iSeq 100 Cartridge pipettiert. Darauf folgend wurde die Flow Cell (Glasobjektträger mit beschichteten Oligonukleotiden) in die Cartridge gesteckt. Zur Sequenzanalyse wurde die nun fertige Kartusche in das iSeq 100-Gerät eingesetzt und der Lauf gestartet.

3.7.3 Auswertung der NGS-Daten

Als Grundlage der Analyse und Auswertung der sequenzierten Proben diente das Genom Hg19 (GRCh 37). Die Konvertierung der Rohdaten in Sequenzdaten und die Darstellung in Variant-Tabellen erfolgten mittels des Programms Local Run Manager. Der Cut-Off für eine Variante, die als Mutation gilt, liegt bei einer Allelfrequenz von 5 % und einer Coverage von > 300. Die detektierten Varianten wurden zur Auswertung in eine Excel-Tabelle überführt.

Anhand verschiedener Online-Tools wie z. B. MutationTaster (URL: <http://www.mutationtaster.org/>), Cosmic (URL: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) und Clinvar (URL: <https://www.clinicalgenome.org/data-sharing/clinvar/>) erfolgte die Beurteilung der detektierten Varianten im Hinblick auf die Bedeutung der Mutationen. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Konsequenz der Mutation (z. B. Nonsense, Frameshift etc.) sowie die Klassifizierung der Veränderungen in pathogen oder benigne gelegt. Zur graphischen Darstellung der Varianten wurde das Tool Mutation-Mapper (URL: https://www.cbioportal.org/mutation_mapper) verwendet.

3.8 Datenauswertung und Statistik

Sowohl die klinischen Daten als auch die Ergebnisse der immunhistochemischen und molekularbiologischen Auswertung wurden in das Programm SPSS (IBM Corp., Version 27.0) eingepflegt und verarbeitet. Dieses wurde für alle statistischen Analysen verwendet.

Quantitative Variablen wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Kategoriale Variablen wurden in absoluten Häufigkeiten und Prozentsätzen ausgedrückt. Auf Normalverteilung wurde mittels des Shapiro-Wilk-Test getestet. Bei Vergleichen zwischen zwei kategorialen Variablen erfolgte die Berechnung mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests (X^2) nach Pearson oder des exakten Tests nach Fisher. Aufgrund einer Stichprobenanzahl von < 50 wurde, wenn nötig, eine Korrektur nach Yates vorgenommen. Vergleiche von quantitativen Variablen zwischen den Niveaus kategorialer Variablen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Unterschiede wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn ein p -Wert von $p < 0,05$ vorlag (101).

4 Ergebnisse

4.1 Charakteristiken des Patientenkollektivs

Wie bereits in Kapitel 3.1 beschrieben, waren von insgesamt 27 Fällen sowohl klinisch-pathologische als auch immunhistochemische und molekulare Daten für statistische Analysen vorhanden. Zum Zeitpunkt der Nachsorge waren drei der 27 Patienten bereits verstorben (11 %). Bei 19 Patienten (70 %) erfolgte die standardisierte Befragung und die Nachsorge in der Klinik. Weitere fünf Patienten (19 %) wurden, nach vorherigem Einverständnis, telefonisch befragt. Nach der Evaluation des Fragebogens (Anhang 1) erfüllte kein Patient die klinischen Kriterien (Tab. 1.1) für die Diagnose eines CNC-assoziierten Myxoms.

4.2 Klinisch-pathologische Charakterisierung

Das Patientenkollektiv bestand aus 74 % Frauen (20/27) und 26 % Männern (7/27). Das Verhältnis zwischen Frauen und Männern betrug demnach knapp 3:1. Die jüngste Patientin erhielt die Diagnose im Alter von 24 Jahren, der älteste Patient mit 78 Jahren. Das durchschnittliche Patientenalter zum Zeitpunkt der Diagnose betrug 62 Jahre (Standardabweichung (*SD*): $\pm 10,7$ Jahre). Das Durchschnittsalter der Frauen lag bei 62 Jahren, bei Männern bei knapp 64 Jahren. Zur Veranschaulichung ist die Altersstruktur der Patienten je nach Geschlecht dargestellt (Abb. 4.1).

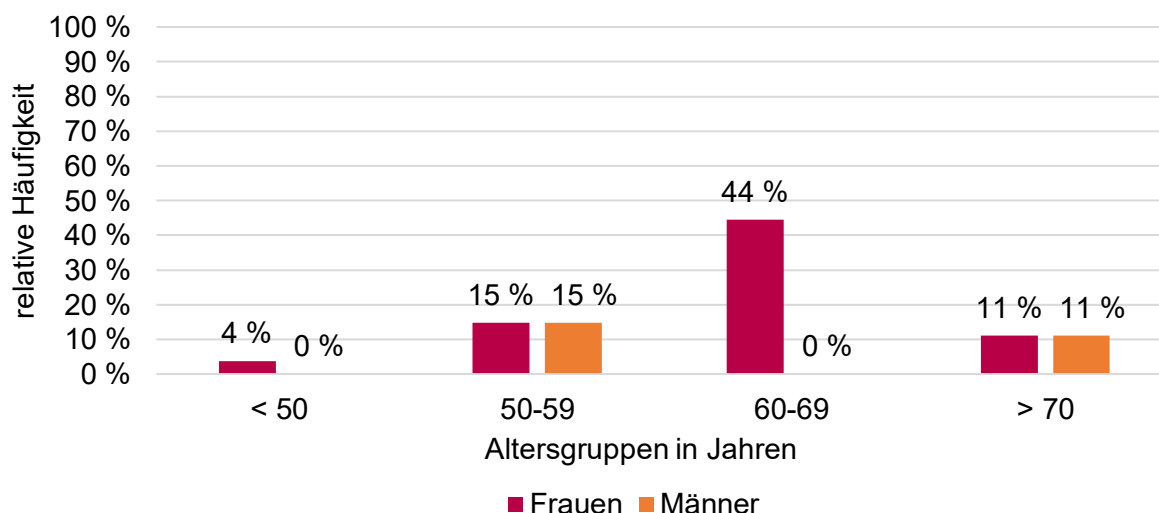


Abb. 4.1: Altersverteilung des Gesamtkollektivs in Gruppen

In Anlehnung an weitere klinisch-pathologische Studien wurden die Myxome entsprechend ihrer Oberflächenmorphologie dem Typ 1 mit fester Konsistenz und glatter Oberfläche oder dem Typ 2 mit unregelmäßiger villöser Oberfläche zugeordnet. Ein Anteil von 52 % (14/27) gehörte dem Typ 1 an, 48 % (13/27) der Myxome wiesen eine villöse Oberflächenmorphologie auf (Abb. 4.2).

Die Tumorgöße zeigte mit einem Minimum von 15 mm und einem Maximum von 80 mm eine große Schwankungsbreite. Im Durchschnitt wiesen die Myxome eine Größe von 36,3 mm (SD: $\pm 16,5$ mm) auf. Im Vergleich zu den soliden Tumoren mit durchschnittlich 40 mm waren die villösen Tumoren im Durchschnitt mit 32,2 mm knapp 8 mm kleiner. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,185$). Das Gewicht wurde lediglich bei fünf Fällen in der makroskopischen Beurteilung bestimmt, sodass dieser Parameter nicht berücksichtigt wurde.

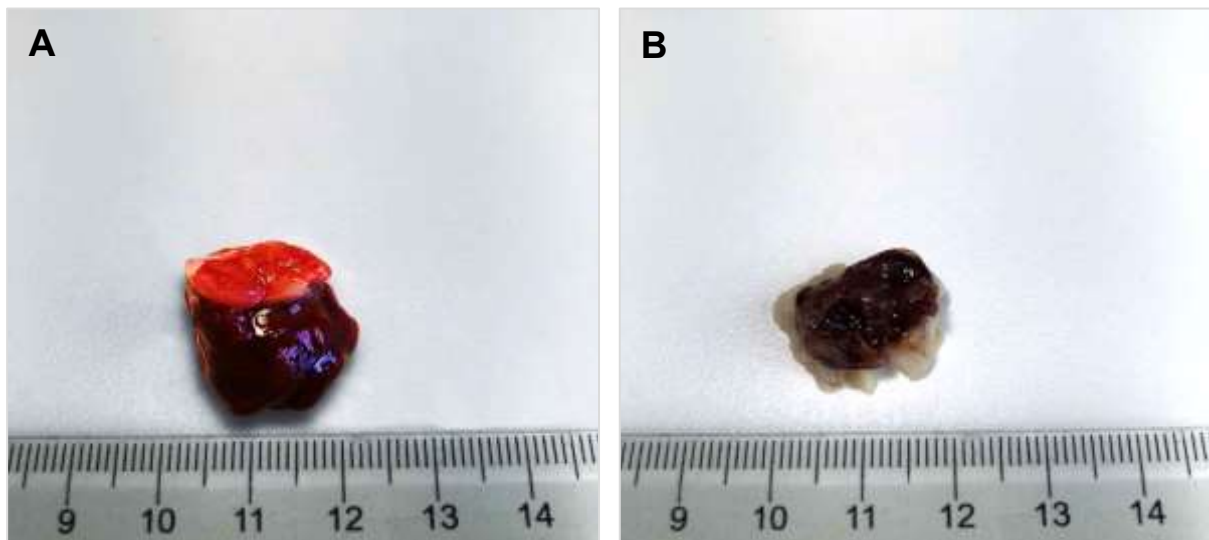


Abb. 4.2: Makroskopie eines jeweils breitbasigen kardialen Myxoms

(A): solides kardiales Myxom mit glatter und glänzender Oberfläche (Typ 1); (B): kardiales Myxom mit unregelmäßiger villöser Oberfläche (Typ 2); aus dem Probeneingang des Instituts für Pathologie, Universitätsmedizin Rostock.

Die Schnittflächen stellten sich zumeist glasig in gelber bis bräunlicher Farbe dar. Im Lichtmikroskop zeigten sich lockere Zellverbände mit typischen länglichen, teils sternförmig verzweigten, polygonalen Zellen mit eosinophilem Zytoplasmasaum, eingelagert in eine myxoide Matrix (Abb. 4.3). Konfluierende hämorrhagische Areale waren bei 37 % (10/27) der Myxome zu beobachten. Darüber hinaus zeigten sich in den meisten Fällen (22/27) fokale lymphoplasmazelluläre Entzündungsinfiltrate sowie Hämosiderophagen. Ebenfalls wiesen circa 15 % (4/27) Verkalkungsherde auf.

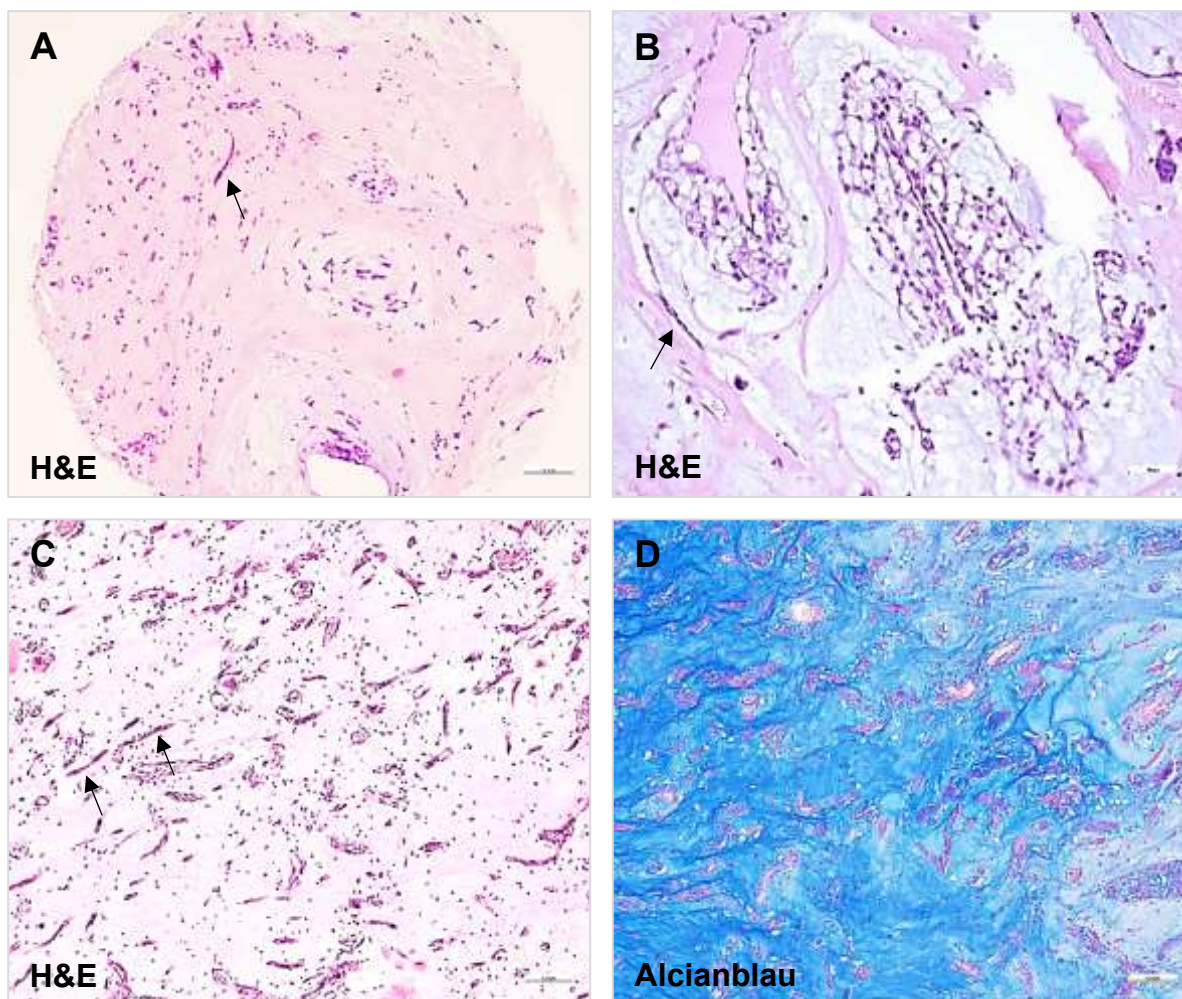


Abb. 4.3: Histologie sporadischer kardialer Myxome

(A-C): H&E-Färbung; zu sehen sind spindelförmige, polygonalen Myxomzellen (Pfeile), eingebettet in ein myxoides Stroma. Die Myxomzellen liegen teils einzeln oder in Strängen hintereinander. (D): Alcianblau-Färbung; blau angefärbt zeigt sich die myxoide Matrix, bestehend aus sauren Mucopolysacchariden. (A, C, D): 10-fache Vergrößerung; (B): 20-fache Vergrößerung; aus dem Probeneingang des Instituts für Pathologie, Universitätsmedizin Rostock.

Ausnahmslos waren alle Myxome im linken Atrium lokalisiert. Am häufigsten (22/27) fand sich die Anheftungsstelle des Tumors im Bereich der Fossa ovalis. Im Bereich des Vorhofdaches waren 11 % (3/27) lokalisiert. Lediglich in einem Fall wurde das Myxom an der Vorhofhinterwand diagnostiziert. Ein weiterer Fall zeigte sich im Bereich der Vorhofbasis und prolabierte bereits in die Klappenebene hinein. Ein multilokuläres Auftreten, bei dem mehrere Herzhöhlen betroffen waren, lag in dem vorliegenden Kollektiv nicht vor.

Die TTE als einfache, nicht-invasive Methode wurde bei allen Patienten durchgeführt, um die klinische Diagnose eines kardialen Myxoms zu stellen. In allen Fällen erfolgte zudem ein TEE zur weiteren klinischen Diagnostik.

Der Großteil des Patientenkollektivs (23/27) wies mindestens ein oder mehrere Symptome der klassischen Triade auf: 1) hämodynamische kardiale Anzeichen; 2) embolische Ereignisse; 3) konstitutionelle Symptome.

Hämodynamische Einschränkungen führten in knapp der Hälfte der Fälle (13/27) zur Vorstellung beim Hausarzt zwecks Abklärung der Symptomatik. Thorakale Schmerzen im Sinne einer Angina pectoris (AP)-Symptomatik und Dyspnoe als Zeichen einer Herzinsuffizienz waren mit je 33 % (9/27) die häufigsten Symptome, gefolgt von Palpitationen in 26 % (7/27) der Fälle. Häufig traten mehrere Symptome gleichzeitig auf. Schwindelgefühle sowie anhaltender Reizhusten waren mit 11 % (3/27) und 4 % (1/27) vergleichsweise selten.

Etwa 30 % der Patienten (8/27) kamen akut mit einer Apoplex-Symptomatik als Folge zerebraler embolischer Gefäßverschlüsse in die Klinik. Bei allen acht Patienten der Emboliegruppe wurde ein kraniales CT durchgeführt, bei fünf zusätzlich ein MRT des Kopfes.

Neben typischen Emboliesymptomen inklusive Hemiparese, Ataxie, Aphasie und Gedächtnisstörungen berichteten drei Patienten über das vorherige Auftreten einer transitorisch-ischämischen Attacke (TIA). In einem Fall war aufgrund vorheriger kardialer Symptome in der TTE der Verdacht auf ein kardiales Myxom gestellt worden, jedoch kam es noch vor Abklärung des Befundes zum Apoplex.

Konstitutionelle Symptome, welche sich unspezifisch mit Fieber, Gewichtsverlust und einem reduzierten Allgemeinzustand zeigten, traten bei 26 % (7/27) auf. Ein asymptomatischer Verlauf zeigte sich in 15 % (4/27) der Fälle. Im Rahmen der diagnostischen Abklärung anderer Erkrankungen erhielten diese Patienten die Diagnose als Zufallsbefund.

Die Verteilung der klinischen Symptomatik im Hinblick auf die Oberflächenmorphologie (villös/solide) der Myxome unterschied sich signifikant: Patienten mit embolischen Ereignissen wiesen mit einem Anteil von 88 % (7/8) eine villöse Tumoroberfläche auf (exakter Fisher-Test, $p = 0,013$; Abb. 4.4). Bei kardialer Symptomatik waren solide Tumoren doppelt so häufig wie villöse, allerdings war der Unterschied nicht statistisch signifikant (X^2 und Korrektur nach Yates, $p = 0,085/0,182$; Abb. 4.4). Tumoren mit solider oder villöser Oberfläche traten bei Patienten mit konstitutionellen Symptomen annähernd gleich häufig auf. Ebenfalls war dieses Ergebnis bei asymptomatischen Patienten zu beobachten (Abb. 4.4).

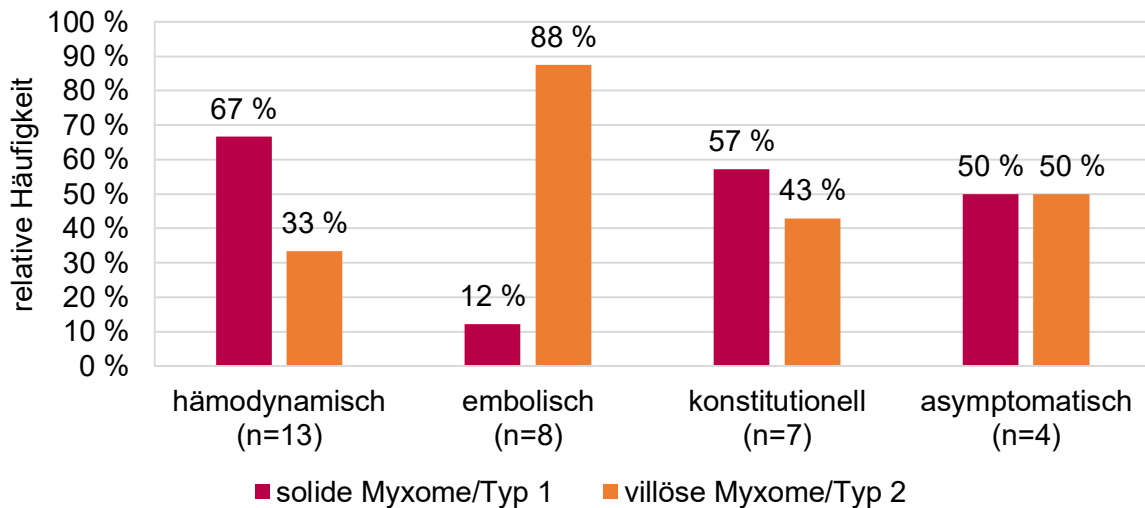


Abb. 4.4: Klinische Symptomatik in Abhängigkeit der beiden histologischen Subtypen

Bei allen 27 Patienten erfolgte eine operative Entfernung des Tumors unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine. 74 % der Fälle (20/27) wurden aufgrund der schwerwiegenden Symptomatik als dringlich eingestuft und zeitnah operiert, während 19 % (5/27) elektiv operiert wurden. Sieben Prozent (2/27) kamen notfallmäßig aufgrund ausgeprägter Apoplexsymptomatik in die Klinik und das kardiale Myxom wurde direkt operativ entfernt, um weitere Komplikationen zu vermeiden. Nach der operativen Entfernung der kardialen Myxome gab es keine Todesfälle während des Krankenhausaufenthaltes.

Zum Zeitpunkt der Nachbeobachtung waren 11 % (3/27) bereits verstorben. Eine Patientin verstarb aufgrund einer multilokulären zerebralen Metastasierung bei malignem Melanom. Bei einem weiteren Patienten wurde die Diagnose einer chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) gestellt. Als Todesursache war bei diesem Patienten eine Pneumonie angegeben. Hinsichtlich der Todesursache lagen bei der dritten Patientin keine Angaben vor.

Bei keinem der 24 Patienten, bei denen postoperative Nachsorgeuntersuchungen mittels TTE durchgeführt wurden, trat ein Rezidiv auf.

4.3 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen

Mittels antikörperbasierter Analysen wurde das Expressionsverhalten der oben genannten Proteine (Tab. 3.3) bei den vorliegenden 27 Myxomfällen untersucht. Für die immunhistochemische Charakterisierung lagen 130 Färbeergebnisse für jeden Antikörper vor.

4.3.1 Proteinkinase 1A

Alle 27 Fälle waren für die PRKAR1A-Analyse nutzbar. Die Expressionsergebnisse von PRKAR1A am TMA wurden an Großflächenschnitten nochmals validiert. Hieraus ergab sich in zwei Fällen eine Diskrepanz zwischen der Bewertung des Expressionsverhaltens. Die in dieser Studie dargelegten Ergebnisse der PRKAR1A-Expression bei sporadischen kardialen Myxomen beziehen sich auf die Färbeergebnisse der Großflächenschnitte. Eine vollständige zytoplasmatische und nukleäre Färbung fand sich bei 37 % (10/27) der Fälle. Der Anteil an Fällen, bei denen lediglich 10 % bis 20 % der Zellen PRKAR1A exprimierten, lag ebenfalls bei 37 % (10/27). Aufgrund der geringeren Expression wurden diese Präparate als Partialausfall gewertet. Die restlichen 26 % (7/27) zeigten keine Expression für PRKAR1A. In Abb. 4.5 werden die verschiedenen Expressionsmuster exemplarisch dargestellt.

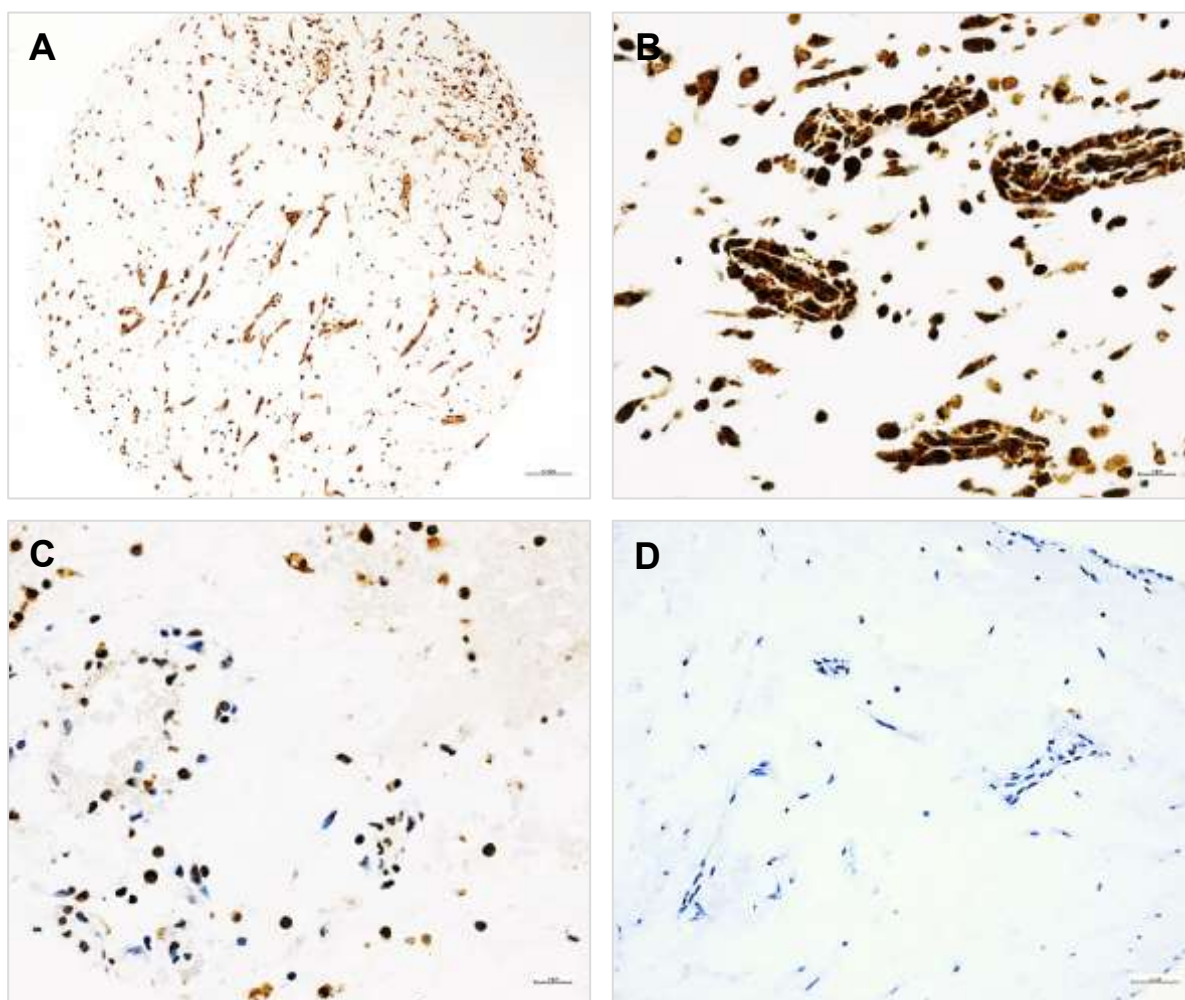


Abb. 4.5: Färbeergebnisse für PRKAR1A

Obere Reihe: (A): homogene Expression, 10-fache Vergrößerung; (B): homogene Expression, 20-fache Vergrößerung; untere Reihe: (C): Partialausfall, 20-fache Vergrößerung; (D): Komplettausfall, 20-fache Vergrößerung; aus dem Probeneingang des Instituts für Pathologie, Universitätsmedizin Rostock.

Der Vergleich des Expressionsverhaltens für PRKAR1A zwischen den zwei histomorphologischen Subtypen zeigte zwar keine statistisch signifikanten Unterschiede (exakter Fisher-Test, $p = 0,236$), allerdings waren Tendenzen bei der Verteilung zu erkennen. Myxome mit erhaltener Expression wiesen in 70 % (7/10) der Fälle eine solide Oberfläche auf, während bei partiellem und komplettem Expressionsverlust 59 % der Myxome zum villösen Typ gehörten (Tab. 4.1).

Weitere klinische Parameter wie Geschlecht, Patientenalter bei Diagnose sowie Tumorgröße wiesen keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich des Expressionsverhaltens für PRKAR1A auf. Die einzelnen Ergebnisse sind in Tab. 4.1 zusammengefasst.

Tab. 4.1: Parametervergleich der Gruppen entsprechend des PRKAR1A-Expressionsverhaltens

	PRKAR1A-Expression <i>n</i> (%)	PRKAR1A-Partial-/Komplettausfall <i>n</i> (%)	<i>p</i> -Wert
Fallzahl	10	17	-
Geschlecht (weiblich/männlich)	9/1 (90/10)	11/6 (65/35)	0,204 \perp
Alter	63,60 (<i>SD</i> \pm 15,02)	61,82 (<i>SD</i> \pm 7,65)	0,151 \diamond
Größe (mm)	42,20 (<i>SD</i> \pm 18,83)	32,82 (<i>SD</i> \pm 14,41)	0,144 \diamond
Tumormorphologie			0,236 \perp
- villös	3 (30)	10 (59)	
- solide	7 (70)	7 (41)	

Patientenalter und Tumorgröße sind jeweils als Mittelwert mit Standardabweichung (*SD*) angegeben. Die weiteren Angaben sind jeweils als absolute Zahlen und in Klammern als prozentualer Anteil an der Gruppenfallzahl angegeben.

Verwendete Tests: \perp - exakter Fisher-Test, \diamond - Mann-Whitney-U-Test

Signifikante Unterschiede der PRKAR1A-Expression hinsichtlich der embolischen Ereignisse ergaben sich nicht (exakter Fisher-Test, $p = 0,19$). Die Verteilung der PRKAR1A-Expression bei Patienten mit kardialen Symptomen zeigte signifikante Unterschiede (exakter Fisher-Test, $p = 0,014$; Abb. 4.6). Der Anteil von Patienten mit erhaltener Expression war in der Gruppe mit kardialer Symptomatik mit 60 % (9/15) deutlich höher als in der Gruppe ohne diese Symptome mit 8 % (1/12). In der Patientengruppe mit konstitutioneller Symptomatik war eine erhaltene Expression mit 86 % (6/7) ebenfalls signifikant häufiger gegenüber 20 % (4/20) in der Patientengruppe ohne konstitutionelle Symptomatik (exakter Fisher-Test, $p = 0,004$; Abb. 4.6).

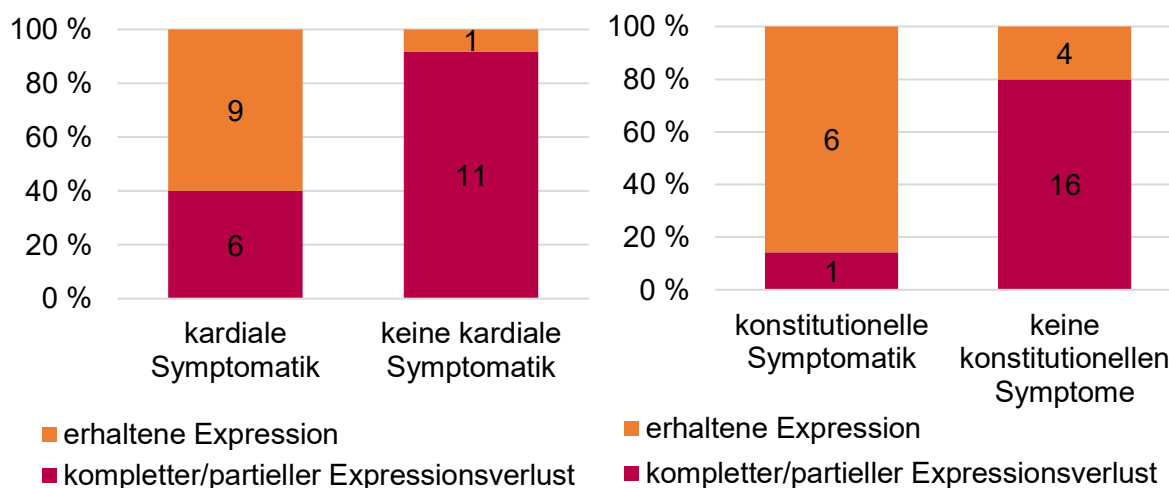


Abb. 4.6: Korrelation der PRKAR1A-Expression mit der klinischen Symptomatik
Kardiale Symptomatik (links), konstitutionelle Symptomatik (rechts); innerhalb der Balken sind die absoluten Zahlenwerte angegeben.

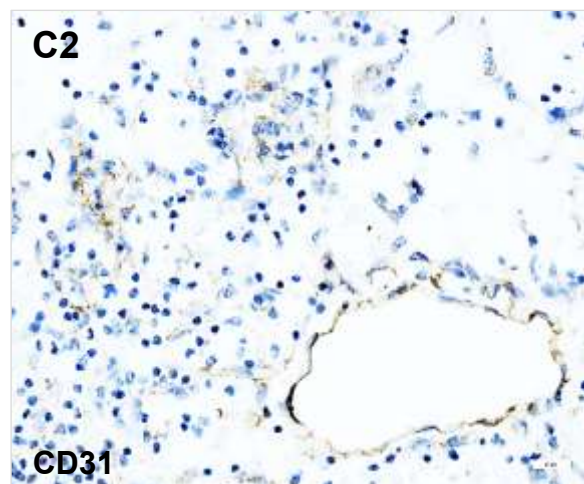
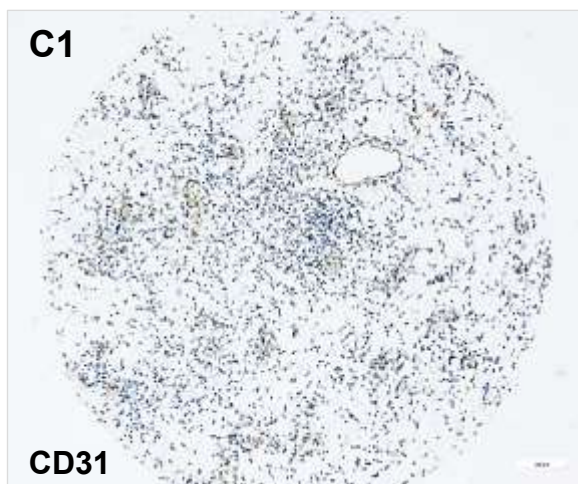
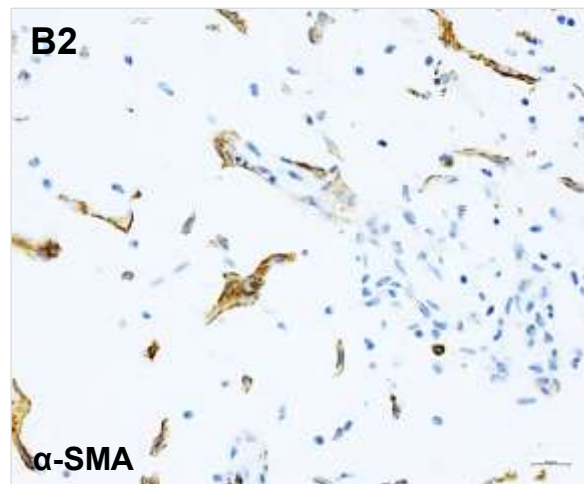
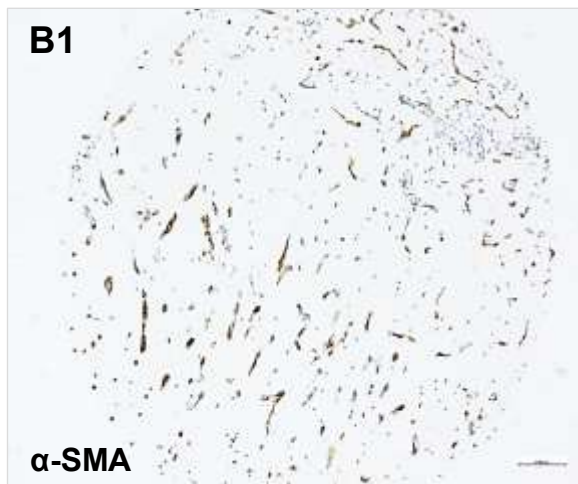
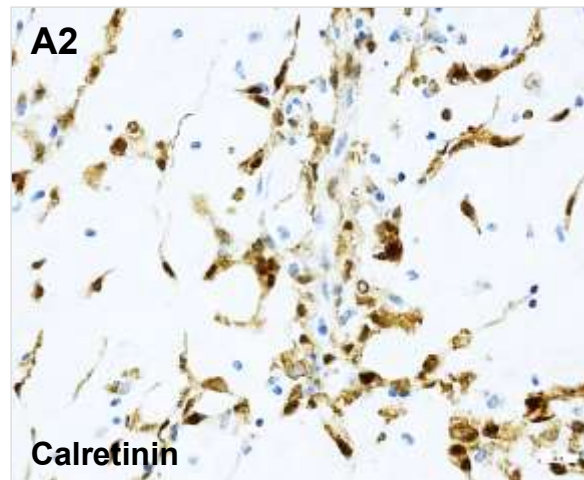
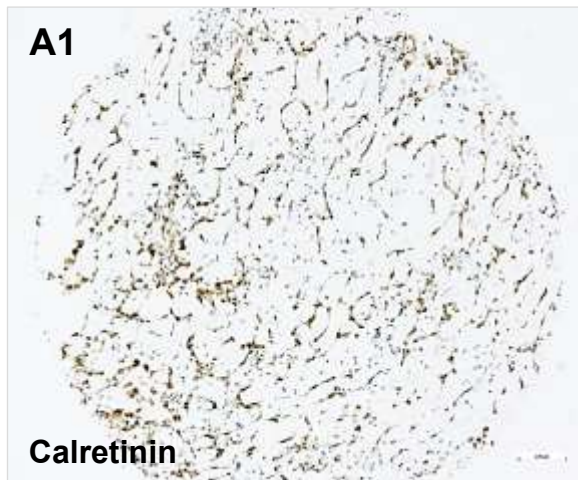
4.3.2 Ergebnisse weiterer immunhistochemischer Färbungen

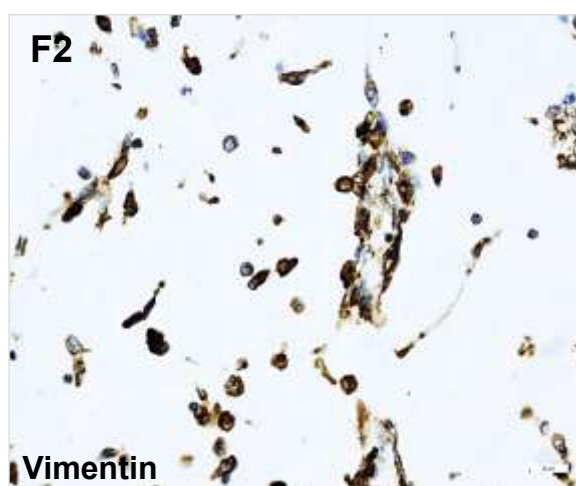
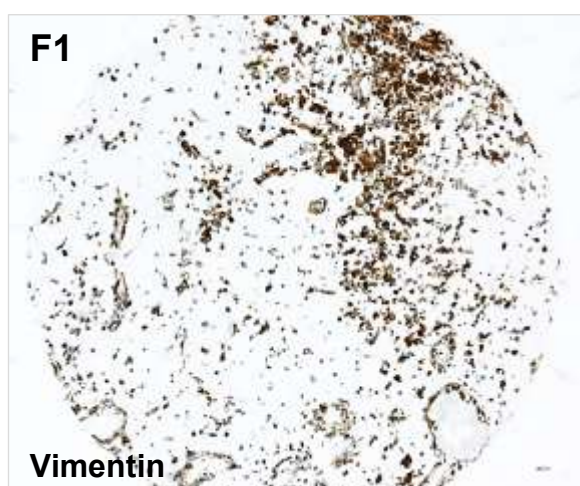
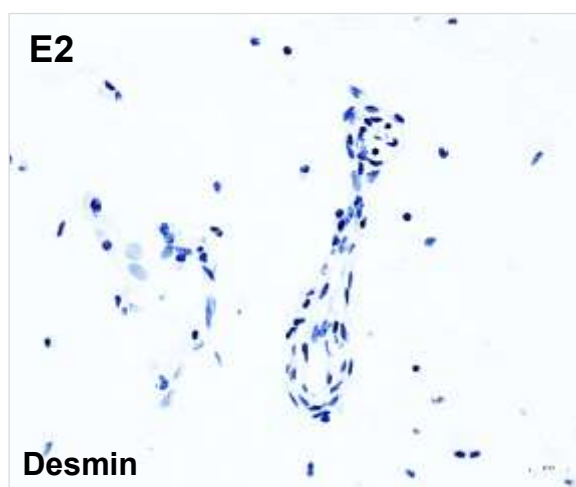
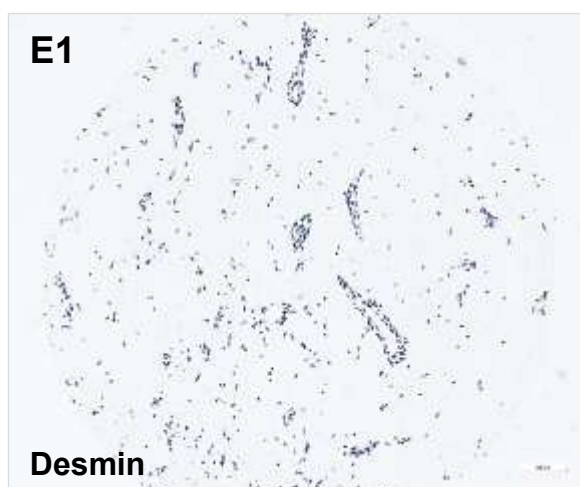
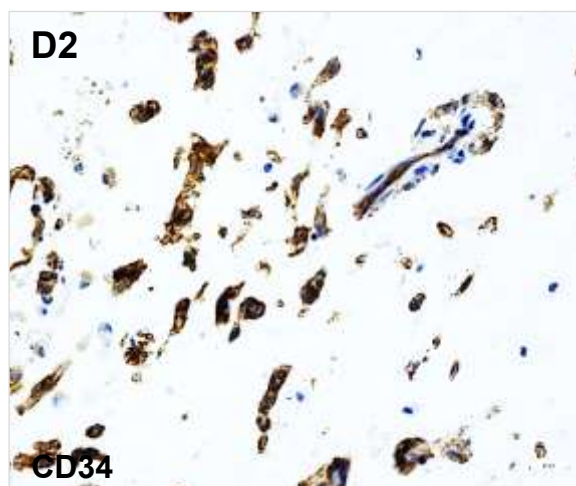
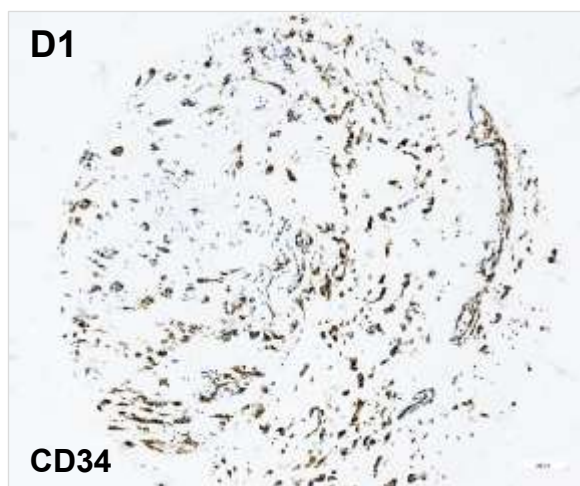
Die kardialen Myxome wurden ergänzend immunhistochemisch charakterisiert. Von den immunhistochemischen Färbungen mit Vimentin, CD34, Podoplanin, Desmin, Calretinin und S100 waren 26 (96 %) auswertbar. Für α -SMA und CD31 lag bei allen 27 Fällen ein auswertbares Ergebnis vor. Tabelle 4.2 gibt eine zusammenfassende Übersicht über das Färbeverhalten verschiedener immunhistochemischer Marker im Myxomkollektiv.

Tab. 4.2: Übersicht der immunhistochemischen Ergebnisse im Rostocker Kollektiv

Immunmarker	Expressionsverhalten	
	negativ <i>n</i> (%)	positiv <i>n</i> (%)
Calretinin	5 (20)	21 (80)
Desmin	26 (100)	0 (0)
α -SMA	10 (37)	17 (63)
Vimentin	0 (0)	26 (100)
CD31	17 (63)	10 (37)
CD34	0 (0)	26 (100)
Podoplanin	26 (100)	0 (0)
S100	22 (85)	4 (15)

Im Folgenden sind exemplarisch die Ergebnisse der IHC-Färbungen dargestellt (Abb. 4.7).





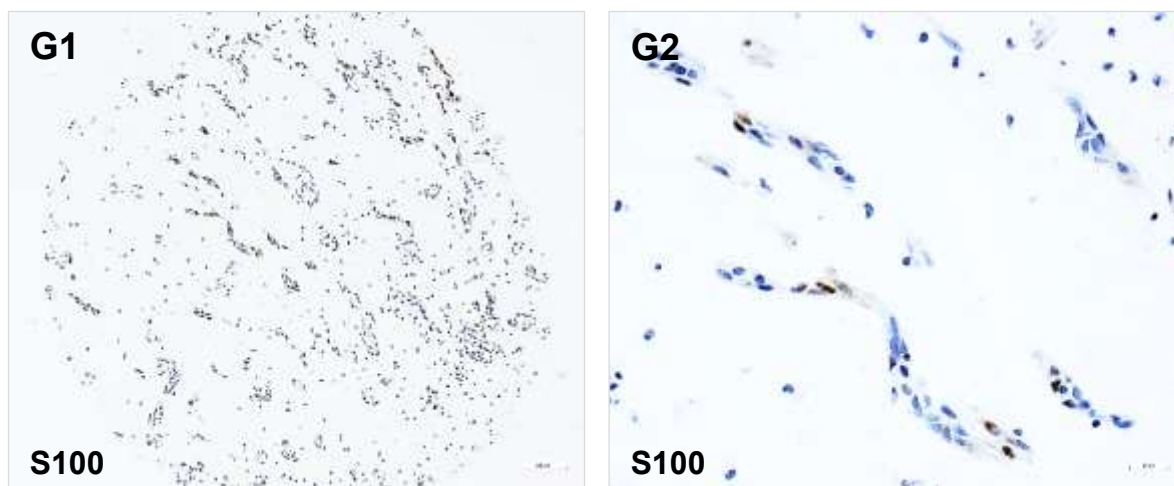


Abb. 4.7: Beispielhafte repräsentative Bilder der seriellen Färbung der Schnitte des Tissue Microarrays mittels verschiedener immunhistochemischer Marker

(A): Calretinin-positiv; (B): α -SMA-positiv; (C): CD31-positiv; (D): CD34-positiv; (E): Desmin-negativ; (F): Vimentin-positiv; (G): S100-partiell-positiv; (A1–G1): 10-fache Vergrößerung; (A2–G2): 40-fache Vergrößerung.

4.4 *PRKAR1A*-Mutationsanalysen mittels NGS

Alle 27 Fälle wurden mittels NGS auf Mutationen im *PRKAR1A*-Gen untersucht. In einem Fall konnte trotz mehrfachem Sequenzierungsansatz keine Mutationsanalyse durchgeführt werden, da die Qualität und die Menge der extrahierten DNA nicht ausreichend waren.

In knapp der Hälfte der Fälle (13/27) ließen sich Mutationen im *PRKAR1A*-Gen nachweisen (Abb. 4.8). Hierbei ist zu erwähnen, dass bei 46 % (6/13) der Myxome je zwei Mutationen im *PRKAR1A*-Gen vorlagen (Abb. 4.8).

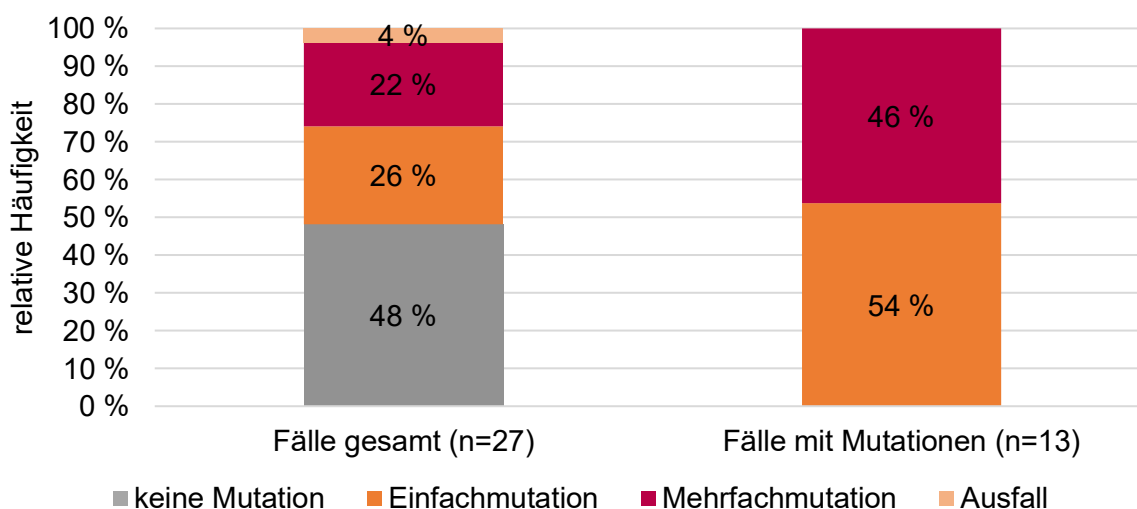


Abb. 4.8: Ergebnisse der *PRKAR1A*-Mutationsanalysen mittels Next Generation Sequencing

Unter den 19 detektierten Mutationen traten Frameshift- und Nonsense-Mutationen mit je 37 % (7/19) am häufigsten auf. Missense-Mutationen, bei denen es zum Austausch einer Base kam, ohne das Leseraster zu verschieben, lagen bei 11 % (2/19) der Mutationen vor. Alle identifizierten Mutationen wurden nach Datenbankanalysen als pathogen eingestuft.

Eine detaillierte Darstellung der *PRKAR1A*-Mutationensergebnisse ist Tab. 4.3 zu entnehmen.

Tab. 4.3: Ergebnisse der *PRKAR1A*-Mutationsanalyse

Fall	Mutation	Mutationstyp
1	p.E145Ifs*17	Frameshift
	p.V284Efs*11	Frameshift
5	p.S299*	Nonsense
10	p.1-46del	Transkriptionsstart
12	p.I295Vfs*12	Framehshift
	p.S307*	Nonsense
13	p.R42*	Nonsense
14	c.503-1G>A	Spleißstelle
15	p.Q66*	Nonsense
	p.Q179*	Nonsense
16	p.A270Gfs*8	Frameshift
	p.L296*	Nonsense
17	c.503-1G>T	Spleißstelle
20	p.S147N	Missense
21	p.K92Gfs*35	Frameshift
	p.Y246Lfs*7	Frameshift
24	p.S112Pfs*17	Frameshift
	p.W224*	Nonsense
27	p.D109H	Missense

Dargestellt ist die Stelle der jeweiligen Mutation auf der Proteinebene mit Ausnahme der Spleiß-Stellen, bei denen die Veränderung auf DNA-Ebene angegeben ist. Weiterhin ist der Mutationstyp der insgesamt 19 Mutationen angegeben. * - Stoppcodon; fs - Frameshift.

Die detektierten Mutationen waren über das gesamte *PRKAR1A*-Gen verteilt. Je 21 % (4/19) der Mutationen waren auf den Exons 3 und 9 lokalisiert. Diese waren damit am häufigsten betroffen. Exon 6 war mit 16 % (3/19) die zweithäufigste Lokalisation. Zwei der drei dort befindlichen Mutationen betrafen die Spleiß-Stelle vor dem Exon 6.

Die Verteilung der einzelnen Mutationen in Bezug auf die Lokalisation innerhalb des *PRKAR1A*-Gens illustriert Abb. 4.9.

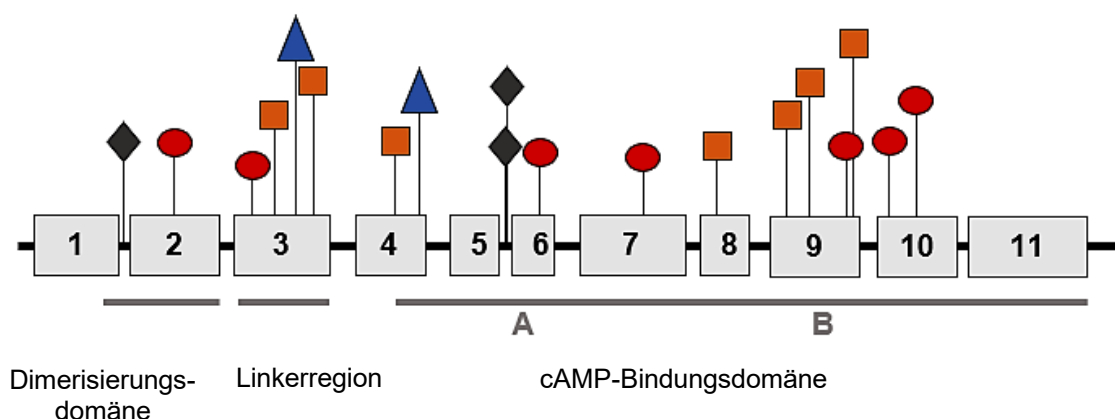


Abb. 4.9: Schematische Darstellung des Typs und der ungefähren Lage der 19 detektierten Mutationen im *PRKAR1A*-Gen

Erläuterung der Symbole: □ Frameshift (orange), ○ Nonsense (rot), ◇ Transkriptionsstart/Spleiß-Stelle (grau), △ Missense (blau); dargestellt sind die 11 Exons; eigene Darstellung.

In Proben mit Mutationen fanden sich signifikant häufiger Ausfälle der Proteinexpression von *PRKAR1A* (X^2 , $p = 0,042$). So lag bei 46 % (6/13) der mutierten Fälle gegenüber 8 % (1/13) bei nicht-mutierten Fällen ein vollständiger Ausfall der *PRKAR1A*-Expression vor (Abb. 4.10). Zwei Drittel (4/6) der mutierten Fälle mit gleichzeitigem Ausfall der Proteinexpression zeigten zudem mehr als nur eine Mutation. Nur 15 % (2/13) der Mutationsfälle wiesen eine Expression für *PRKAR1A* auf. Es ist zu erwähnen, dass bei diesen beiden Fällen eine Missense-Mutation vorlag, die nicht zu einem Expressionsverlust des Proteins geführt hatte.

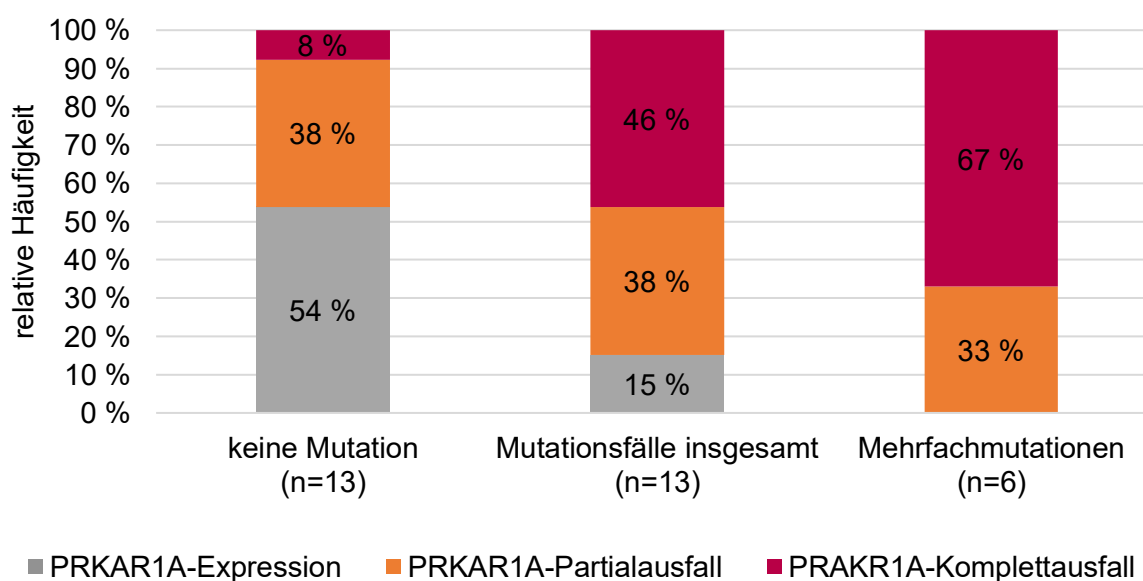


Abb. 4.10: Relative Häufigkeit der *PRKAR1A*-Expression in Abhängigkeit des Mutationsstatus

Die Tumormorphologie mutierter und nicht-mutierter Fälle unterschied sich signifikant (X^2 , $p = 0,006$). Hierbei zeigte sich, dass 77 % (10/13) der Myxome, bei denen eine Mutation detektiert wurde, eine villöse Tumoroberfläche besaßen. Im Vergleich zu den mutierten Fällen wiesen Myxome ohne vorhandene Mutation überwiegend eine solide Oberfläche auf (Tab. 4.4). Die Tumorgöße bei den mutierten Fällen war mit durchschnittlich 34,62 mm etwas kleiner als bei den Fällen ohne Mutation mit 37,46 mm. Der Unterschied war allerdings nicht signifikant (Tab. 4.4). Gleiches gilt für die Divergenzen zwischen den zwei Gruppen (mutiert/nicht-mutiert) bezüglich der Parameter Alter und Geschlecht sowie der Verteilung der klinischen Symptome (Tab. 4.4).

Tab. 4.4: Vergleich klinischer Parameter zwischen den mutierten und nicht-mutierten Myxomfällen

	PRKAR1A-Mutation <i>n</i> (%)	keine PRKAR1A-Mutation <i>n</i> (%)	p-Wert
Fallzahl	13	13	-
Geschlecht weiblich/männlich	8/5 (62/38)	12/1 (92/8)	0,16 \perp
Alter	58,8 (<i>SD</i> \pm 13,5)	65,0 (<i>SD</i> \pm 4,97)	0,151 \diamond
Größe (mm)	34,62 (<i>SD</i> \pm 17,7)	37,46 (<i>SD</i> \pm 16,27)	0,144 \diamond
Tumormorphologie			0,006*
- villös	10 (77)	3 (23)	
- solide	3 (23)	10 (77)	
klinische Symptome			
- hämodynamische Symptome	5 (38)	10 (77)	0,11 \perp
- embolische Ereignisse	6 (46)	2 (15)	0,202 \perp
- konstitutionelle Symptome	1 (8)	5 (38)	0,160 \perp
- asymptomatisch	3 (23)	1 (8)	0,593 \perp

Patientenalter und Tumorgöße sind jeweils als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Die weiteren Angaben sind jeweils als absolute Zahlen und in Klammern als prozentualer Anteil an der Gruppenfallzahl angegeben.

Verwendete Tests: * - X^2 -Test, \perp - exakter Fisher-Test, \diamond - Mann-Whitney-U-Test

5 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden 27 Fälle mit sporadischen kardialen Myxomen in Bezug auf histopathologische sowie klinische Charakteristika untersucht und potentielle *PRKAR1A*-Mutationen molekularpathologisch nachgewiesen. Kardiale Myxome gehören zu den seltenen benignen primären Herztumoren. Trotz der Seltenheit dieser Tumorentität und der häufig unspezifischen Frühsymptome ist das kardiale Myxom eine wichtige klinische Differentialdiagnose.

Ziel dieser Arbeit war es, die Häufigkeit von *PRKAR1A*-Mutationen bei sporadischen kardialen Myxomen sowie deren Expressionsverhalten von *PRKAR1A* mittels IHC anhand des Tumorkollektivs zu untersuchen. Weiterhin soll die Arbeit dazu beitragen, Unterschiede in der klinischen Symptomatik und der Tumormorphologie zwischen mutierten und nicht-mutierten Fällen zu detektieren. Im Folgenden werden die Ergebnisse des hier untersuchten Kollektivs im Kontext des aktuellen Forschungsstandes dargestellt.

5.1 *PRKAR1A*-Mutationen als möglicher Treiber bei sporadischen kardialen Myxomen

In der Literatur zeigen sich aktuell deutliche Unterschiede bei den Häufigkeitsangaben von *PRKAR1A*-Mutationen bei sporadischen kardialen Myxomen, woraus sich eine weitgehende Uneinigkeit für die Bedeutung dieses Gens bei der Genese dieser Erkrankung ergibt.

An einem kleinen Myxomkollektiv von 13 Patienten konnten Fogt et al. bei keinem Fall eine *PRKAR1A*-Mutation nachweisen (91). Mabuchi et al. stellten lediglich bei CNC-assoziierten Myxomen Mutationen im *PRKAR1A*-Gen fest, nicht jedoch bei sporadischen kardialen Myxomen, und wiesen darauf hin, dass sich die genetische Grundlage von sporadischen Myxomen und CNC-assoziierten Myxomen möglicherweise unterscheidet (90).

Bei dem vorliegenden untersuchten Tumorkollektiv zeigten sich bei 48 % der sporadischen kardialen Myxome Mutationen im *PRKAR1A*-Gen.

Ebenso wiesen Maleszewski et al. an einem großen Tumorkollektiv mit 103 sporadischen Myxomen mittels Sanger-Sequenzierung Mutationen im *PRKAR1A*-Gen nach (93). Der Anteil an Fällen mit Mutationen im *PRKAR1A*-Gen war in der vorliegenden Arbeit mit knapp 50 %, verglichen mit den Ergebnissen von Maleszewski et al. mit 31 %, deutlich höher (93). Die höhere Rate lässt sich möglicherweise auf die Art der verwendeten Methode zurückführen. Maleszewski et al. untersuchten ausschließlich die Fälle auf mögliche Mutationen, welche im Vorfeld eine negative *PRKAR1A*-Expression in der IHC aufwiesen.

Verglichen mit den vorliegenden Ergebnissen könnte die Ursache einer niedrigeren Mutationsrate bei Maleszewski et al. demnach darin zu finden sein, dass Fälle mit Missense-Mutationen, die keinen Expressionsverlust zur Folge haben, bei ihrem Vorgehen nicht berücksichtigt wurden und somit die Mutationsrate niedriger ausfiel (93). Darüber hinaus ist die in dieser Arbeit verwendete Methode des NGS im Gegensatz zur Sanger-Sequenzierung bei Maleszewski et al. als sensitiver einzustufen (mündliche Mitteilung von Dr. B. Schneider).

He et al. wiesen in ihrer Studie mit 64 % ihres Tumorkollektivs einen nochmals deutlich höheren Anteil an *PRKAR1A*-Mutationen bei sporadischen Fällen nach und betonten damit den Einfluss dieser Mutationen bei der Pathogenese dieser Tumorentität (94).

Zusammenfassend bestätigt die vorliegende Studie einen relativ hohen Anteil von *PRKAR1A*-Mutationen bei sporadischen kardialen Myxomen, wodurch anzunehmen ist, dass Mutationen im *PRKAR1A*-Gen für die Tumorentstehung relevant sind.

Im hiesigen Kollektiv zeigten sechs der 13 Fälle mit Mutationen (46 %) parallel zwei Mutationen innerhalb des *PRKAR1A*-Gens. He et al. beschrieben ebenfalls Fälle mit mehr als einer Mutation, allerdings war der Anteil mit knapp 10 % deutlich geringer (94). Die hohe Rate an Mehrfachmutationen im Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit führt unmittelbar zu der Frage, inwieweit bei diesen Fällen möglicherweise beide Allele betroffen sind und welche Auswirkungen sich daraus ergeben. Hierbei konnte die Arbeit zeigen, dass der Großteil der doppelt mutierten Fälle mit einem vollständigen Expressionsverlust für *PRKAR1A* in der IHC assoziiert war. Im Vergleich dazu gingen Fälle mit einer Mutation häufiger mit Partialausfällen für *PRKAR1A* einher, gleichzeitig war der Anteil an Komplettausfällen gering. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei den doppelt mutierten Fällen aufgrund des vollständigen *PRKAR1A*-Expressionsverlustes um biallelische Ereignisse handeln könnte. Darauf aufbauend, ist zu vermuten, dass bei doppelt mutierten Fällen mit lediglich partiellem Expressionsverlust entweder eine Heterogenität vorliegt oder monoallelische Ereignisse als Erklärung anzunehmen sind.

Die meisten Mutationen im vorliegenden Kollektiv waren Substitutionen und Deletionen, die zu Nonsense- und Frameshift-Mutationen führten. Missense-Mutationen wurden bei lediglich zwei Fällen beobachtet. Die Verteilung der Genmutationen spiegelte sich ebenfalls in dem Tumorkollektiv von Maleszewski et al. wider, bei denen in zwei Dritteln der Fälle Frameshift-Mutationen vorlagen (93). Ähnliche Ergebnisse fanden sich bei He et al. (94). Konkordante Ergebnisse zeigten sich in Studien mit CNC-assoziierten Myxomen, bei denen die Mehrheit der *PRKAR1A*-Mutationen ebenfalls Frameshift- und Nonsense-Mutationen waren (74, 102).

Die detektierten Mutationen des Kollektivs in der vorliegenden Arbeit waren über den gesamten *PRKAR1A*-Genbereich verteilt. Am häufigsten lagen die Mutationen in den Exons 3 und 9. He et al. wiesen die meisten ihrer Mutationen in den Exons 1 bis 5 nach (94), während bei Maleszewski et al. drei der neun Mutationen auf Exon 7 lokalisiert waren (93).

Zusammenfassend deuten die vorliegenden und die von anderen Studien beschriebenen Ergebnisse auf eine variable Verteilung der *PRKAR1A*-Mutationen bei sporadischen kardialen Myxomen entlang des gesamten Genbereiches hin. Bertherat et al. wiesen in einem großen Patientenkollektiv mit 353 CNC-Fällen in 73 % der Fälle *PRKAR1A*-Mutationen nach, die sich über den gesamten Genbereich verteilten, konnten jedoch zeigen, dass die Mutationen signifikant häufiger in den Exons 2, 3, 5, 7 und 8 lokalisiert waren (74).

Nach aktuellem Kenntnisstand wurden über 130 verschiedene *PRKAR1A*-Mutationen bei CNC-assoziierten kardialen Myxomen beschrieben, wovon bislang zwei Mutationen (c.491_492del und c709-7_709-2del) in mehreren Familien vorkamen und demnach bei CNC-Fällen als „Hot-Spot-Mutation“ eingestuft wurden (74). Keine dieser beiden Mutationen traten in den Studien von Maleszewski et al. und He et al. bei sporadischen kardialen Myxomen auf (93, 94). Ebenso fanden sich diese Mutationen nicht im vorliegenden Kollektiv.

Da die Anzahl an Studien zu *PRKAR1A*-Mutationen bei sporadischen kardialen Myxomen nach aktuellem Stand begrenzt ist, wurden die meisten der Mutationen bisher nur einmalig beschrieben. Allerdings kamen bei He et al. sieben der insgesamt 46 gefundenen Mutationen mehr als einmal vor (94). Zudem wiesen zwei Fälle ihrer Studie eine bereits von Maleszewski et al. beschriebene Mutation (c.289C>T) auf (93). Lediglich zwei der in der vorliegenden Arbeit detektierten Mutationen (c.C124T in Exon 2 und c.C196T in Exon 3) wurden vorher schon bei He et al. beschrieben (94).

Weiterhin ergibt sich in diesem Zusammenhang die Frage, inwieweit die vorliegenden Mutationen sporadischer kardialer Myxome mit denen bei CNC-assoziierten Myxomen übereinstimmen. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit lässt sich herausstellen, dass vier der insgesamt 19 Mutationen ebenfalls bei Studien mit CNC-assoziierten Myxomen detektiert wurden. Interessanterweise war unter diesen die Mutation (c.C124T), welche bereits in der Arbeit von He et al. beschrieben wurde (94). In der Gesamtheit deuten die bisherigen Studienergebnisse darauf hin, dass die detektierten *PRKAR1A*-Mutationen bei sporadischen kardialen Myxomen bis auf wenige Ausnahmen andere sind als bei CNC-assoziierten Fällen.

Bezüglich der von Experten kontrovers diskutierten Frage, inwieweit *PRKAR1A*-Mutationen, ähnlich wie bei CNC-assoziierten Fällen, bei der Pathogenese von sporadischen kardialen Myxomen eine Rolle spielen, ist aufgrund der relativ hohen Frequenz an *PRKAR1A*-Mutationen im vorliegenden Patientenkollektiv anzunehmen, dass Mutationen in diesem Gen einen Einfluss auf die Tumorentstehung bei sporadischen kardialen Myxomen haben.

Allerdings bleibt bei Myxomen ohne nachgewiesene *PRKAR1A*-Mutationen die Frage offen, inwieweit andere Mutationen einen Einfluss auf die Genese dieser Fälle haben könnten.

He et al. beschäftigten sich ebenfalls mit dieser Frage und spekulierten, dass Myxome ohne *PRKAR1A*-Mutationen als genetisch heterogen einzustufen sind und mehrere genetische Varianten für die Tumorentstehung verantwortlich sein könnten (94). In unserer Studie waren bei 52 % der Fälle keine *PRKAR1A*-Mutationen zu finden. Diese Beobachtung deutet ebenfalls darauf hin, dass neben dem Einfluss von *PRKAR1A* auch andere Mechanismen bei der Tumorgenese sporadischer kardialer Myxome eine Rolle spielen.

Zusätzlich zur Bestimmung der Häufigkeit der *PRKAR1A*-Mutationen wurde das vorliegende Patientenkollektiv hinsichtlich möglicher klinischer und pathologischer Unterschiede zwischen *PRKAR1A*-mutierten und nicht-mutierten Fällen untersucht. Myxome, bei denen eine *PRKAR1A*-Mutation vorlag, wiesen signifikant häufiger eine villöse Tumoroberfläche auf, während die Mehrheit der Myxome mit glatter Oberfläche keine *PRKAR1A*-Mutation trug.

Hinsichtlich der Verteilung der unterschiedlichen klinischen Symptomatik zwischen mutierten und nicht-mutierten Fällen, war in der vorliegenden Studie ebenfalls eine Tendenz erkennbar. 46 % der Fälle mit Mutationen im *PRKAR1A*-Gen, verglichen mit 8 % aus der Gruppe ohne Mutationen, präsentierten sich klinisch durch Embolien. Dagegen zeigten die Myxome bei Patienten mit kardialen oder konstitutionellen Symptomen nur in wenigen Fällen eine *PRKAR1A*-Mutation. Derartige Ergebnisse in Bezug auf klinisch-pathologischen Unterschiede zwischen *PRKAR1A*-mutierten und nicht-mutierten Fällen wurden in vergleichbaren Arbeiten von Maleszewski et al., He et al. sowie Tseng et al. bislang nicht beschrieben (93, 94, 103). Aufgrund der geringen Anzahl vergleichbarer Studien und der in dieser Arbeit bisher einmalig beschriebenen klinisch-pathologischen Unterschiede zwischen mutierten und nicht-mutierten Myxomen, lässt sich Folgendes schlussfolgern:

Die neuen Erkenntnisse dieser Studie leisten einen wichtigen Beitrag zur Charakterisierung sporadischer kardialer Myxome, jedoch lässt sich aufgrund der geringen Fallzahl eine abschließende umfangreiche Bewertung zur klinisch-pathologischen Unterscheidung mutierter und nicht-mutierter Fälle nicht erheben. Daher sind zukünftig weitere Studien mit größeren Tumorkollektiven erforderlich, um Myxome mit und ohne *PRKAR1A*-Mutation hinsichtlich klinisch-pathologischer Unterschiede zu untersuchen.

5.2 PRKAR1A-Expression bei sporadischen kardialen Myxomen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei sporadischen kardialen Myxomen die Expression von PRKAR1A immunhistochemisch untersucht. Die Daten zeigen, dass 37 % der Fälle einen partiellen Expressionsverlust für PRKAR1A aufwiesen und bei 26 % sogar ein Komplettausfall vorlag. Insgesamt war das Auftreten von Mutationen im *PRKAR1A*-Gen signifikant häufiger mit einem Verlust der PRKAR1A-Expression assoziiert. Bei den nicht-mutierten Fällen exprimierte der überwiegende Anteil PRKAR1A. Im Gegensatz dazu zeigten die mutierten Tumoren, mit Ausnahme von zwei Fällen, einen partiellen oder sogar vollständigen Expressionsverlust für PRKAR1A.

Bezugnehmend auf Kapitel 4.4 und Tabelle 4.3 waren in dem hier untersuchten Kollektiv die meisten Mutationen Frameshift- und Nonsense-Mutationen, die zu einem vorzeitigen Stoppcodon führen. Demnach lässt sich vermuten, dass diese ein verkürztes oder dysfunktionales Protein bilden, was ebenso den beobachteten PRKAR1A-Ausfall in der IHC erklärt.

Studien anderer Autoren konnten mittels Sequenzanalysen von mRNA-Transkripten bei Patienten mit CNC zeigen, dass mutierte mRNAs mit enthaltenem Stoppcodon aufgrund des Nonsense-vermittelten mRNA-Zerfalls instabil sind, da in Analyseproben nur die normale PRKAR1A-mRNA des Wildtyp-Allels nachgewiesen werden konnte (76). Darauf aufbauend untersuchten Kirschner et al. Proteinlysate aus CNC-Zellen mittels Western Blot und berichteten, dass keine verkürzten PRKAR1A-Proteine gebildet wurden und nur das vollständige Protein des Wildtyp-Allels nachweisbar war (76, 85, 86).

Übereinstimmend wiesen sowohl He et al. als auch Maleszewski et al. in 57 % bzw. 31 % des jeweiligen Kollektivs sporadischer kardialer Myxome mit PRKAR1A-Mutation immunhistochemisch einen Ausfall der PRKAR1A-Expression nach (93, 94).

Zwei Tumoren aus dem hier untersuchten Myxomkollektiv zeigten trotz einer detektierten PRKAR1A-Mutation in der IHC eine Expression für PRKAR1A. Es ist hervorzuheben, dass bei diesen beiden Myxomen jeweils eine Missense-Mutation vorlag. Die erhaltene PRKAR1A-Expression dieser Fälle ließe sich damit erklären, dass die Missense-Mutationen, verglichen mit den anderen Mutationsfällen (Frameshift-/ Nonsense-Mutation), nicht zu einem vorzeitigen Stoppcodon führen, was nahelegt, dass das Protein trotz der Missense-Mutation translatiert wurde. Die Entstehung dieser kardialen Myxome trotz der erhaltenen Expression des PRKAR1A-Proteins bei Missense-Mutationen deutet darauf hin, dass weitere Mechanismen unabhängig der PRKAR1A-Haploinsuffizienz für die Genese dieser Tumore verantwortlich sein könnten.

Es besteht die Vermutung, dass sich durch den Einbau einer abweichenden Base bei Missense-Mutationen die Struktur der regulatorischen Untereinheit R1 α und die Interaktion mit anderen zellulären Proteinen verändern könnten. Hierzu bedarf es weiterer umfangreicher Studien, die zur Klärung möglicher Interaktionen und der daraus resultierenden Tumorentstehung beitragen.

Ungeachtet dessen wies die vorliegende Studie ebenso Fälle auf, bei denen trotz fehlender *PRKAR1A*-Mutation ein Verlust der Proteinexpression zu beobachten war. Konkordante Ergebnisse zeigten Maleszewski et al. und wiesen darauf hin, dass bei diesen Fällen andere Mechanismen zur Pathogenese sporadischer kardialer Myxome beitragen (93). Für den Verlust der nachzuweisenden Proteinexpression wurden neben Veränderungen auf Genebene auch epigenetische Einflüsse (DNA-Hypermethylierung) und posttranskriptionelle Veränderungen in Betracht gezogen (93). Zusammengefasst zeigt sich, dass für die Fälle, bei denen trotz fehlender Mutationen Ausfälle in der *PRKAR1A*-Expression zu beobachten waren, weitere Studien erforderlich sind, um möglicherweise bisher noch nicht identifizierte Mechanismen der Tumorentstehung aufzudecken.

Mit Bezug auf Kapitel 1.6 ist bekannt, dass Patienten mit CNC-assoziierten Myxomen höhere Raten an Tumorrezidiven sowie multiple Lokalisationen der Myxome aufweisen und zudem häufiger betroffene Familienmitglieder haben. Hieraus ergibt sich klinisch die Notwendigkeit, CNC-assoziierte Myxome von sporadischen Tumorfällen abzugrenzen. Grundsätzlich wird die Diagnose eines kardialen Myxoms anhand histopathologischer Merkmale gestellt, während im Anschluss die Frage nach einem CNC anhand klinischer Kriterien erfolgt.

Maleszewski et al. sahen in der IHC mit *PRKAR1A* als Marker eine kostengünstige Möglichkeit der Unterscheidung mit dem Ziel, Patienten mit CNC zu filtern, um diese ausgewählt nachfolgend molekulargenetisch zu untersuchen (93). In ihrer Studie zeigten alle CNC-assoziierten Fälle keine Expression für *PRKAR1A* in der IHC, woraus sich eine Sensitivität dieses Markers von 100 % ergab (93). Allerdings war ebenfalls bei 32 % der sporadischen Myxome keine Expression für *PRKAR1A* zu sehen, was darauf hinwies, dass eine Differenzierung mittels IHC keine ausreichend spezifische Methodik darstellte und ihre ursprünglichen Überlegungen nicht bewiesen werden konnten.

Ebenso wie bei He et al., die in 47 % der sporadischen kardialen Myxome keine Expression von *PRKAR1A* zeigen konnten (94), fand sich im Kollektiv der vorliegenden Arbeit in über der Hälfte der Fälle eine reduzierte oder vollständig fehlende *PRKAR1A*-Expression.

Zusammenfassend bestätigt die hier vorliegende Studie damit die Ergebnisse von Maleszewski et al. (93) und He et al. (94), dass anhand der IHC keine ausreichende Differenzierung CNC-assoziiierter und sporadischer kardialer Myxome möglich ist und als diagnostisches Verfahren hierfür nur eingeschränkt nützlich ist.

5.3 Korrelation klinischer und pathologischer Charakteristika bei sporadischen kardialen Myxomen

Zahlreiche Studien untersuchten an Tumorkollektiven unterschiedlicher Größe die klinischen Charakteristika sporadischer kardialer Myxome. Literaturangaben zufolge treten sporadische kardiale Myxome bevorzugt bei Frauen auf (21, 23, 24, 27, 29), was sich in den Ergebnissen der vorliegenden Studie widerspiegelt, in der ein Verhältnis von 3:1 von Frauen zu Männern beobachtet wurde. Das Alter der Patienten dieses Kollektivs reichte von 24 bis 77 Jahren und lag im Durchschnitt bei 62 Jahren. Aus der Literatur ist bekannt, dass kardiale Myxome in allen Altersgruppen auftreten können, wobei das durchschnittliche Erkrankungsalter mit 40 bis 60 Jahren angegeben wird (16, 18).

In der vorliegenden Studie waren die Myxome ausschließlich im linken Atrium lokalisiert. Andere Autoren gaben das linke Atrium ebenfalls als häufigste Lokalisation an, berichteten allerdings auch über das Vorkommen von Myxomen im rechten Atrium oder in den Ventrikeln (23, 32, 33, 104). Das hier untersuchte und vergleichsweise kleine Patientenkollektiv von nur 27 Fällen liefert für den Unterschied in der Tumorlokalisation die wahrscheinlichste Erklärung. Über zwei Drittel der im linken Atrium lokalisierten Myxome des Kollektivs hatten ihren Ursprung im Bereich des interatrialen Septums nahe der Fossa ovalis, was den Angaben früherer Studien entspricht (27, 33). Seltener befanden sich die Myxome an der Vorhofhinterwand, dem Vorhofdach oder innerhalb der Klappenebene.

In dieser Studie wiesen 48 % der Myxome eine villöse und 52 % eine glatte Tumoroberfläche auf. Dieses Ergebnis entspricht den Angaben von Studien mit ähnlicher Fallzahl (54, 105).

Mit durchschnittlich 3,6 cm lagen die Tumoren der vorliegenden Studie mit Bezug auf die Größe im unteren Drittel der in der Literatur beschriebenen Durchschnittsgröße von 2,7 cm bis 6,3 cm (23, 31, 32).

Yuda et al. unterteilten ihr Patientenkollektiv in Abhängigkeit des Diagnosezeitpunktes (1978 – 1987 und 1988 – 1997) in zwei Gruppen und verglichen die Größe sowie das Gewicht der kardialen Myxome (33). Der maximale Durchmesser der Myxome in der früheren Gruppe war signifikant größer und das Gewicht tendenziell schwerer als in der späten Gruppe. Begründet wurde dieses Ergebnis mit der Einführung besserer diagnostischer Verfahren wie der Echokardiographie, mit der die Tumoren frühzeitiger erkannt werden können (33).

Die klinische Präsentation von Patienten mit kardialen Myxomen variiert je nach Lokalisation, Größe und Mobilität der Tumoren. Der Großteil der Patienten präsentiert Symptome, die auf intrakardiale Klappenobstruktionen zurückzuführen sind. Die Häufigkeit der klinischen Symptome für das dieser Studie zugrunde liegende Tumorkollektiv war wie folgt verteilt: 48 % kardiale hämodynamische Symptome, 30 % embolische Ereignisse und 26 % konstitutionelle Symptome.

Insgesamt entsprechen die Häufigkeiten der klinischen Symptome den Angaben in der Literatur. Als führende Symptome wurden in bisher veröffentlichten Studien Dyspnoe und Palpitationen bei bis zu 84 % bzw. 39 % der Patienten angegeben (28, 106). Embolische Ereignisse durch abgelöstes Tumormaterial oder verschleppte Thromben wurden in 15 % bis 40 % der Fälle beschrieben (19, 21, 29). Ein Anteil von 5 % bis 34 % hatte konstitutionelle Symptome wie Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Fieber oder Gewichtsverlust (19, 28). Das Vorliegen dieser unspezifischen Symptome ist bislang nicht vollständig geklärt und ist weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung. Vermutet wird der Einfluss von Zytokinen wie IL-6, die ähnlich wie bei entzündlichen Erkrankungen für das Auftreten der beschriebenen Symptome verantwortlich sein könnten (37, 107). Mendoza et al. zeigten bereits Korrelationen zwischen der Serumkonzentration von IL-6 und dem Vorhandensein konstitutioneller Symptome (37).

Mehrere Autoren berichteten zudem über asymptomatische Patienten mit kardialen Myxomen, bei denen der Tumor im Zusammenhang mit anderen diagnostischen Routineuntersuchungen detektiert wurde. Die Häufigkeitsangaben schwanken zwischen 3 % und 46 % stark (18, 30, 108). In dieser Arbeit wiesen 15 % der Patienten keinerlei Symptome auf. Eine mögliche Erklärung der Schwankungsbreite könnte in regionalen Unterschieden bei der Verfügbarkeit und Anwendung diagnostischer Verfahren liegen.

Interessanterweise zeigten einige Arbeiten signifikante Unterschiede zwischen den klinischen Symptomen und der Tumormorphologie. So wurde mehrfach berichtet, dass Embolien signifikant häufiger bei Tumoren mit einer villösen Oberfläche vorkommen (32, 105, 109). Im Gegensatz dazu sind kardiale, hämodynamisch bedingte Symptome gehäuft mit soliden Tumoren assoziiert (21).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die in der Literatur beschriebenen Unterschiede. Während signifikant häufiger villöse Myxome zu embolischen Ereignissen führten, traten bei doppelt so vielen Patienten mit solider Tumoroberfläche kardiale Symptome auf.

Als Erklärung ist anzunehmen, dass es aufgrund der unregelmäßigen Oberfläche der villösen Tumoren vermehrt zu turbulenten Strömungen kommen kann, die daraufhin die Bildung und Anlagerung von Thromben begünstigen.

Wang et al. wiesen darüber hinaus nach, dass Patienten mit kardialen Symptomen größere Tumoren hatten und embolische Ereignisse mit einer verminderter Tumorgöße assoziiert waren (32). In unserem Untersuchungskollektiv waren villöse Tumore durchschnittlich knapp einen Zentimeter kleiner als solide Myxome, signifikant war das Ergebnis allerdings nicht. Die Verknüpfung der eben beschriebenen Beobachtungen legt die Vermutung nahe, dass villöse Tumoren aufgrund ihrer Präferenz zu embolischen Ereignissen häufig früher klinisch in Erscheinung treten.

Damit sind sie bei Diagnosestellung meist kleiner als die Tumoren mit glatter Oberfläche, welche erst später und durch hämodynamische Einschränkungen auffällig werden.

Bezugnehmend auf Kapitel 1.2 erfolgt die klinische Diagnosestellung heutzutage vorwiegend mittels einer TTE, da pathologische Auskultationsbefunde wie ein Tumorplop und veränderte Laborparameter, wie sie beim kardialen Myxom zu finden sind, nicht ausreichend spezifisch sind. In der vorliegenden Arbeit war bei keinem Fall ein Tumorplop dokumentiert. In neueren Studien wird dieser Begriff nur noch selten beschrieben (106). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass bei der Dokumentation vorwiegend berücksichtigt wird, ob es sich um ein systolisches oder diastolisches Herzgeräusch handelt. Auch die Tatsache, dass das kardiale Myxom eine sehr seltene Erkrankung ist und häufiger vorkommenden Herzerkrankungen ebenfalls diastolische Herzgeräusche verursachen, könnte eine Ursache dafür sein. Nicht zuletzt werden heute für die Diagnosestellung häufig bildgebende Verfahren eingesetzt. Da die TTE eine einfache sowie kostengünstige Methode bietet, um die Lokalisation und Struktur kardialer Myxome zuverlässig darzustellen, erscheint es nachvollziehbar, dass sie heutzutage der reinen Auskultation überlegen ist (54, 110).

Der Einsatz der TTE als diagnostisches Mittel der Wahl erfolgte bei allen 27 Fällen, was dem Vorgehen aus zuvor berichteten Studien entsprach. Zusätzlich wurde in 89 % eine TTE, in 22 % ein CT und in 11 % ein MRT zur Diagnosesicherung durchgeführt.

In der vorliegenden Studie wurde bei allen 27 Patienten therapeutisch eine chirurgische Exzision der Myxome durchgeführt. Bis heute gilt die operative Entfernung der kardialen Myxome als bevorzugte kurative Therapie und sollte so schnell wie möglich nach Diagnosestellung durchgeführt werden (23). Ein Fall der vorliegenden Studie verdeutlicht die Notwendigkeit einer unverzüglichen operativen Entfernung des Myxoms, um weitere Komplikationen zu vermeiden. Bei einer Patientin bestand der Verdacht eines kardialen Myxoms, der mittels bildgebender Diagnostik weiter abgeklärt werden sollte. Noch vor Diagnosestellung erlitt die Patientin einen Schlaganfall. Daraufhin wurde sie in die Klinik eingewiesen und das Myxom wurde schnellstmöglich entfernt.

Patienten mit sporadischen kardialen Myxomen haben im Verhältnis zu CNC-assoziierten Myxomen eine deutlich geringere Rezidenz der Myxome (26). Karabinis et al. wiesen in einem Nachbeobachtungszeitraum von durchschnittlich 3,7 Jahren in 3 % der sporadischen Myxome ein Rezidiv nach (18). Während bei anderen Studien ebenfalls Rezidivraten zwischen 1 % und 3 % beobachtet wurden (23, 108), trat in dieser Arbeit bei keinem der Patienten im Nachbeobachtungszeitraum ein Rezidiv auf. Ursache hierfür könnte die vergleichsweise geringe Fallzahl sein. Zusätzlich lässt sich das Fehlen von Rezidiven auf die Tatsache zurückführen, dass in dem hier vorliegenden Patientenkollektiv keine CNC-assoziierten Fälle oder Myxome mit multipler Lokalisation vorhanden waren, bei denen eine erhöhte Rezidivrate der Literatur entsprechend zu erwarten gewesen wäre (26, 32, 48).

5.4 Immunhistochemische Markeranalysen

Bezugnehmend auf Kapitel 1.5 ist die Histogenese des kardialen Myxoms nach wie vor unklar. Zahlreiche Studien haben diesbezüglich Untersuchungen durchgeführt, in denen die Expression unterschiedlicher immunhistochemischer Marker bei kardialen Myxomen untersucht wurde. Da Myxome eine Vielzahl von verschiedenen Zellmarkern exprimieren, unterstützen mehrere Autoren die Ansicht, dass kardiale Myxome aus multipotenten mesenchymalen Vorläuferzellen hervorgehen, die zu verschiedenen Arten der weiteren Differenzierung befähigt sind.

Kardiale Myxome weisen entsprechend mehrerer Literaturangaben eine Expression für Vimentin in 90 % bis 100 % der Fälle auf (56, 57, 111). In diesem Kollektiv zeigten alle Myxome eine Expression für Vimentin.

Die durchgehend fehlende Expression, die in der vorliegenden Arbeit für Desmin beobachtet wurde, stimmte mit den Ergebnissen von Curschellas et al. überein (112). Diese Ergebnisse decken sich jedoch nicht mit Expressionsergebnissen anderer Studien, die über eine Expression von Desmin bei kardialen Myxomen berichteten. Deshpande et al. wiesen in mehr als der Hälfte der Fälle (16/30) eine Expression für Desmin nach (51). Johansson et al. erzielten in fünf von 19 Fällen positive Ergebnisse (111), während bei Govoni et al. alle untersuchten Fälle (8/8) Desmin exprimierten (113).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie belegen eine Expression von α -SMA in über der Hälfte der Fälle (63 %, 17/27). Woodcock-Mitchel et al. zeigten, dass α -SMA sowohl in embryonalen Skelett- und Herzmuskelzellen besonders stark exprimiert wird als auch am komplexen Prozess der myogenen Differenzierung beteiligt ist (114). α -SMA wurde in der Studie von Orlandi et al. bei 83,3 % exprimiert und zeigte in der PCR-Analyse in allen Fällen DNA-Transkripte (56). Die Expressionsergebnisse dieser sowie anderer Studien für α -SMA deuten demnach darauf hin, dass die Myxomzellen einer primitiveren kardialen Vorläuferzelle ähnlich sind.

Calretinin exprimierten 80 % (21/26) der Myxome dieses Kollektivs. Dieses Ergebnis ähnelt dem von Acebo et al. und Orlandi et al., die gleichermaßen eine zytoplasmatische Expression von Calretinin beobachteten (56, 115).

Bei immunhistochemischen Untersuchungen der Myxomzellen auf endotheliale Marker wie CD31 wiesen bei Acebo et al. 50 % der Fälle eine Expression dieses Markers auf (116). CD31 wurde in die vorliegende Studie aufgenommen, aber nur in 37 % der Fälle exprimiert. Dabei markiert CD31 auch Makrophageninfiltrate, welche im myxoiden Stroma häufig vorkommen und ggf. zu Fehlinterpretation mit höheren CD31-Expressionraten geführt haben könnten.

CD34 ist ein membranständiges Protein, welches in unreifen hämatopoetischen Stammzellen und embryonalen Fibroblasten vorkommt (117). Darüber hinaus wird es in den Kapillarendothelien und in Kapillaren der Plazenta exprimiert (118).

In der vorliegenden Studie war in allen Fällen eine Expression von CD34 nachweisbar, was sich ebenso in den Ergebnissen von Zheng et al. widerspiegelte (57). Orlandi et al. konnten in ihrer Studie bei zwei Dritteln der Fälle (20/30) eine positive CD34-Reaktion zeigen (56).

Als ein Marker für Endothelien von Lymphkapillaren verwendete die vorliegende Studie Podoplanin, allerdings zeigte keiner der Fälle eine Expression für Podoplanin. Zusammengekommen mit der im Vergleich durchweg vorhandenen Expression für CD34 deutet das Ergebnis darauf hin, dass sporadische kardiale Myxome eine vaskuläre endotheliale Differenzierung durchlaufen.

In dem hier untersuchten Kollektiv wurde S100 von nur 15 % (4/26) der kardialen Myxome exprimiert. Pucci et al. konnten in ihrer Studie für S100 als Marker neurogener Differenzierung in 89 % der Fälle eine Expression nachweisen (53). Curshellas et al. wiesen bei 45 % (5/11) ihres Kollektivs eine Expression für S100 nach (112), was sich in der Studie von Deshpande et al. mit 47 % (14/30) exprimierten Fällen ebenso wiederfindet (51).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass eine variable Expression für endothelialen, mesenchymalen und neurogenen Markern bei sporadischen kardialen Myxomen nachgewiesen werden konnte. Unter den mesenchymalen Derivaten scheinen die endothelialen und myogenen Differenzierungslinien die bedeutendsten zu sein. Eine Expression neurogener Marker wie S100 findet sich ebenfalls in einigen sporadischen kardialen Myxomen. Die Expression epithelialer Differenzierungsmarker wurde in der vorliegenden Studie nicht untersucht. Trotz einer relativ geringen Fallzahl können die Ergebnisse dieser Studie die Annahme unterstützen, dass kardiale Myxome aus multipotenten Vorläuferzellen mit der Fähigkeit zur mesenchymalen, endothelialen und neurogenen Zelldifferenzierung hervorgehen.

5.5 Methodendiskussion

Grundlage der vorliegenden Arbeit waren vorhandene Daten aus dem internen klinischen Archiv sowie den elektronischen Datenverwaltungsprogrammen Copra, SAP und Pathix. Weitere Daten wurden durch ein persönliches Gespräch mit den Patienten erhoben und entsprechend den Anforderungen der Datenschutzverordnung pseudonymisiert.

Es ergeben sich aus der Methodenwahl Limitationen, die nachfolgend kritisch evaluiert werden.

Die Auswahl der Myxomfälle erfolgte durch die Schlagwortsuche mit dem Begriff „kardiales Myxom“ im elektronischen System der Pathologie der UMR. Durch falsche oder mangelhafte Verschlüsselung der eingesendeten und untersuchten Proben ist es möglich, dass in dem untersuchten Zeitraum nicht alle Fälle berücksichtigt wurden.

Da es sich um eine retrospektive Arbeit handelt, zeigten sich fehlende Angaben besonders innerhalb klinischer Parameter in unterschiedlicher Ausprägung. Durch umfangreiche Aktenrecherche und die Sichtung von Arztberichten mitbehandelnder Kardiologen konnten fehlende Daten ergänzt werden. Zusätzlich wurden die 24 noch lebenden Patienten zu einem persönlichen bzw. in fünf Fällen wegen der Corona-Lage zu einem telefonischen Nachsorgegespräch eingeladen. Dadurch konnten wichtige klinische Parameter reevaluiert und ergänzt werden, sodass der Anteil an auswertbaren klinischen Daten bei 100 % lag. Die Limitationen, die sich aus dem Design einer retrospektiven Studie ergeben, sind aufgrund der differenzierten Erhebung der klinischen Daten vernachlässigbar. Weiterhin wurden in diesem Zusammenhang mittels eines standardisierten Interviews Fälle von CNC-assoziierten Myxomen soweit möglich ausgeschlossen.

Die Fallzahl ist mit 27 Patienten relativ gering und führt zu Einschränkungen in der Teststärke der Arbeit. Unter Berücksichtigung der Seltenheit dieser Tumorentität und dem Vergleich internationaler Literatur bietet diese Arbeit dennoch statistisch repräsentative Ergebnisse.

Besonders zeichnet sich diese Arbeit durch das breitgefächerte Spektrum an Untersuchungen zur Charakterisierung des Tumorkollektivs aus, woraus sich ebenfalls der Single-Center-Ansatz als Methode der Wahl begründen lässt.

In der vorliegenden Arbeit wurden 26 der 27 Fälle von sporadischen kardialen Myxomen mittels TMA-Technik immunhistochemisch untersucht. Die TMA-Technik ermöglichte eine gleichzeitige Analyse der Färbeergebnisse mehrerer Tumorproben auf einem Objektträger (96). Weiterhin wurden die Proben im TMA identisch und zeitgleich geschnitten, gefärbt und anschließend ausgewertet. Methodische Unregelmäßigkeiten betreffen somit alle Proben in gleichem Maß, wodurch die Proben von tagesabhängigen Schwankungen unbeeinflusst bleiben. Aufgrund des gleichen Stanzdurchmessers besaßen alle Proben dieselbe Form. Subjektive Fehler, die bei Schnittpräparaten aufgrund unterschiedlicher Formen der Präparate häufiger vorkommen, konnten so zusätzlich reduziert werden.

Beim TMA werden lediglich kleine Ausschnitte des Tumors aus dem gesamten Gewebeblock ausgestanzt (96). Da die spindelförmigen Myxomzellen heterogen im myxoiden Stroma vorliegen, ist zu hinterfragen, ob eine Stanze von einem Millimeter Durchmesser eine ausreichende Aussagekraft besitzt. Um die Repräsentativität der Stenzen zu erhöhen und mögliche verfehlende Stenzen zu vermeiden, wurde pro Fall fünfmal gestanzt. Dieses Vorgehen orientierte sich an Studien, in denen nachgewiesen werden konnte, dass durch mehrfaches Stanzen eine hohe Konkordanz hinsichtlich des Auswertungsergebnisses zwischen TMA und Großflächenschnitt zu erreichen war (119–121). Die Entnahme mehrerer Proben pro Tumor ist besonders bei einem kleinen Patientenkollektiv von Vorteil, da ein Verlust einzelner Fälle das Gesamtergebnis stärker beeinträchtigen würde (122). Fünf Prozent der Stenzen waren aufgrund von unzureichendem Stanzmaterial und Artefakten nicht auswertbar.

Als weitere Fehlerquelle ist zu berücksichtigen, dass die Bewertung des Expressionsverhaltens durch nur einen Untersucher erfolgte. Allerdings wurde die Auswertung in Unkenntnis der darüber hinaus erhobenen molekularen und klinischen Daten durchgeführt, was einen weiteren subjektiven Bewertungsfehler minimiert. Die Einteilung der Färbeergebnisse in einen semiquantitativen, dreistufigen Score führte unvermeidlich zu einem Informationsverlust. In Anlehnung an die Studien von Maleszewski et al. und He et al. wurden die Proben den Expressionsmustern 0 (keine Expression), 1 (teilweise Expression) und 2 (erhaltene Expression) zugewiesen. Aufgrund fehlender prozentualer Angaben hinsichtlich der einzelnen Auswertungsmodalitäten in diesen Studien, ergeben sich allerdings Einschränkungen bezüglich der Vergleichbarkeit zwischen den Ergebnissen (93, 94). Zusätzlich wurden andere Färbeprotokolle inklusive unterschiedlicher Reagenzien, Antikörper und Verdünnungen verwendet, wodurch die Vergleichbarkeit der Färbeergebnisse hinsichtlich anderer Studien ebenfalls limitiert ist (93, 94).

Eine weitere mögliche Einschränkung begründet sich in der Art des verwendeten Gewebes. Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurde Formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe verwendet. Die Formalinfixierung kann mit einem variablen Verlust der Antigenität einhergehen, da Epitope bzw. antigene Bindungsstellen durch die chemische Fixierung geschädigt oder maskiert werden können. Hieraus entstehend kann eine verminderte Immunreaktivität in der angewandten Analysemethode zu falsch-negativen Ergebnissen geführt haben (123–125).

Die kardialen Myxome wurden mittels NGS auf Mutationen im *PRKAR1A*-Gen untersucht. Die Methode beruht auf einer parallelen Sequenzierung von einer großen Anzahl von DNA-Fragmenten innerhalb eines einzigen Sequenzierungsdurchlaufs. Trotz des hohen Arbeits- und Kostenaufwands wurde diese Methode gewählt, da sie eine sehr verlässliche Identifizierung fast aller genetischen Veränderungen ermöglicht (126).

Um ausreichend DNA aus dem Gewebe für zuverlässige Ergebnisse der NGS zu erhalten, wurden die entsprechenden myxoiden Bereiche anhand der jeweiligen Großflächenschnitte durch eine Pathologin gekennzeichnet. Zur Anreicherung des Tumorgewebes wurden ggf. kleinere tumortragende Areale mikrodisseziert.

Wie auch bei der IHC, ergaben sich aus der Art des verwendeten Gewebes folgende Limitationen für die Methode der NGS: Zum einen führt die Formalin-Fixierung des Gewebes zur Desaminierung, Fragmentierung und Methylierung der DNA, woraus sich Einschränkungen bei der Amplifizierbarkeit der DNA ergeben können. Die Desaminierung der DNA-Basen begünstigt Sequenzartefakte, wobei C:G > T:A-Veränderungen am häufigsten vorkommen, wodurch die molekularen Untersuchungen erschwert und verfälscht werden (127, 128).

Zum anderen ist davon auszugehen, dass die DNA aus Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebetteten Gewebe im Vergleich zu DNA aus frischem Tumormaterial eher von schlechterer Qualität ist (mündliche Mitteilung von Dr. B. Schneider). Nichtsdestotrotz war die NGS-Analyse in 26 von 27 Tumorproben erfolgreich und auch alte Gewebeproben waren sequenzierbar.

Um mögliche Fehler innerhalb der methodischen Aufbereitung der Proben zu vermeiden, wurden alle Analysen von einem erfahrenen Mitarbeiter im molekularpathologischen Labor durchgeführt (Dr. B. Schneider). Durch die Verwendung moderner Extraktionskits wurden Fehler hinsichtlich der Sequenzartefakte weitestgehend eliminiert. Die in der vorliegenden Studie detektierten 19 Mutationen wurden durch eine hohe Anzahl von Reads abgedeckt, sodass davon auszugehen war, dass es sich um echte Mutationen gehandelt hat.

Anders als bei Maleszewski et al., wurde in der vorliegenden Arbeit bei den detektierten Mutationen keine zusätzliche Keimbahnanalyse durchgeführt (93). Erstens begründete sich dieses Vorgehen daraus, dass gezielte Keimbahnanalysen nur unter strengen ethisch vertretbaren Vorschriften durchgeführt werden und dem Einverständnis des Patienten bedürfen. Zweitens war entsprechend der Allelfrequenz der detektierten Mutationen von $< 0,5$ davon auszugehen, dass es sich um somatische Mutationen gehandelt hat. Lediglich bei einer Mutation war eine Allelfrequenz von $> 0,5$ zu beobachten. Ob es sich bei diesem Fall um eine mögliche Keimbahnmutation handeln könnte, müsste mittels Keimbahnanalysen untersucht werden.

Unter Berücksichtigung der aufgeführten Einschränkungen kann diese Arbeit durch das vielschichtige Studiendesign eine umfangreiche Übersicht des Status quo sporadischer kardialer Myxome im Rostocker Patientenkollektiv bieten. Weitere Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven sind zukünftig notwendig, um die dargelegten Ergebnisse zu evaluieren, validieren und zu ergänzen.

6 Zusammenfassung

Das kardiale Myxom ist eine seltene benigne Neoplasie des Herzens. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt zwischen 40 und 60 Jahren. Entsprechend mehrerer großer Studien weist die klinische Symptomatik kardialer Myxome eine große Variabilität auf. Zusätzlich werden diese Symptome ebenso bei vielen anderen kardialen Erkrankungen beobachtet, was die Diagnosestellung erschwert. Die Histogenese dieser Tumorentität ist bis heute unklar. Forschungsergebnisse aus den vergangenen 20 Jahren lassen anhand der Expression verschiedener Immunmarker vermuten, dass sich kardiale Myxome aus unreifen Vorläuferzellen entwickeln, die sich zu endothelialen, neuronalen sowie glattmuskulären und teilweise glandulären Zellen differenzieren können. Über genaue Differenzierungsvorgänge ist jedoch wenig bekannt. Etwa 7 % der Herzmyxome treten im Rahmen des CNC auf, einem autosomal-dominanten multiplen Tumorsyndrom.

Die Pathogenese sporadischer kardialer Myxome ist bis heute ungeklärt. Untersuchungen an CNC-assoziierten Fällen konnten zeigen, dass 45 % bis 65 % der CNC-Patienten Keimbahnmutationen des *PRKAR1A*-Gens aufweisen und für die Pathogenese dieser Myxome verantwortlich sind. Die Studienlage zu *PRKAR1A*-Veränderungen bei sporadischen kardialen Myxomen ist zum einen begrenzt, zum anderen mit *PRKAR1A*-Mutationsraten zwischen 0 % und 87 % variabel.

Das vorrangige Ziel dieser Arbeit war es, mittels NGS die Häufigkeit von *PRKAR1A*-Mutationen bei sporadischen kardialen Myxomen zu untersuchen und damit einen Beitrag zur Klärung der Pathogenese dieser Tumorentität zu leisten.

In der vorliegenden Studie wurden retrospektiv histopathologische und klinische Daten von 27 Patienten, die im Zeitraum von 2006 bis 2021 an der Universitätsklinik in Rostock aufgrund eines kardialen Myxoms behandelt wurden, gesammelt. Ein möglicher zugrunde liegender Fall mit CNC wurde durch eine standardisierte Befragung ausgeschlossen. Es wurde eine immunhistochemische *PRKAR1A*-Analyse durchgeführt und die Reaktivität der Myxomzellen wurde semiquantitativ eingestuft. Ebenso wurde das Expressionsverhalten weiterer immunhistochemischer Marker untersucht. Anschließend wurde in allen 27 Fällen eine NGS-Analyse der *PRKAR1A*-Exons 2 bis 11 durchgeführt.

In der Mutationsanalyse konnten bei 48 % der sporadischen Tumoren *PRKAR1A*-Mutationen nachgewiesen werden. Weiterhin ergab der Vergleich mutierter und nicht-mutierter Fälle, dass Myxome mit *PRKAR1A*-Mutationen signifikant häufiger einen Expressionsausfall von *PRKAR1A* zeigten. Ebenso zeigten sich signifikante Unterschiede in Bezug auf die Tumormorphologie. Gegenüber den soliden Myxomen wiesen Myome mit villöser Oberfläche signifikant mehr *PRKAR1A*-Mutationen auf.

Die statistischen Analysen zeigten ebenso signifikante Unterschiede hinsichtlich der Tumormorphologie in Abhängigkeit der klinischen Symptomatik sporadischer kardialer Myxome. Villöse Tumoren waren signifikant häufiger mit embolischen Ereignissen assoziiert. Hämodynamische Einschränkungen sowie konstitutionelle Symptome waren tendenziell häufiger bei soliden Tumoren zu beobachten.

Ergänzend wurde gezeigt, dass kardiale Myxome eine variable, aber positive Immunreaktivität für endotheliale, mesenchymale und neurogene Marker besitzen und unter den mesenchymalen Derivaten wohl die endothelialen und myogenen Differenzierungslinien die bedeutendsten sein könnten. Diese Befunde stützen die Annahme, dass kardiale Myxome aus multipotenten Vorläuferzellen mit der Fähigkeit zur mesenchymalen, endothelialen und neurogenen Zelldifferenzierung hervorgehen.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Studie mittels NGS ein relativ hoher Anteil von *PRKAR1A*-Mutationen bei sporadischen kardialen Myxomen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass Mutationen im *PRKAR1A*-Gen auch bei sporadischen Fällen eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung spielen, wie es bereits bei CNC-assoziierten Myxomen gezeigt wurde. Myxome ohne detektierte Mutationen legen allerdings nahe, dass auch andere Mechanismen die Genese beeinflussen. Trotz signifikanter Unterschiede der *PRKAR1A*-Expression in Abhängigkeit des Mutationsstatus, kann die IHC nicht als Screening-Instrument eingesetzt werden, um mögliche Fälle mit *PRKAR1A*-Mutationen im Voraus zu identifizieren.

Bibliographie/ Literaturverzeichnis

1. Columbus RM. Libri 15 De re anatomica. Paris; 1562.
2. Goldberg HP, Glenn F, Dotter CT, Steinberg I. Myxoma of the left atrium; diagnosis made during life with operative and post-mortem findings. *Circulation* 1952; 6(5):762–7. doi: 10.1161/01.cir.6.5.762.
3. Senning A. Developments in cardiac surgery in Stockholm during the mid and late 1950s. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989; 98(5):825–32.
4. Chitwood WR. Clarence Crafoord and the first successful resection of a cardiac myxoma. *The Annals of Thoracic Surgery* 1992; 54(5):997–8. doi: 10.1016/0003-4975(92)90676-u.
5. Leach WB. Primary neoplasms of the heart. *Archives of pathology* 1947; 44(2):198–204.
6. Heath D. Pathology of cardiac tumors. *The American Journal of Cardiology* 1968; 21(3):315–27. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002914968901367>. Datum der letzten Abfrage: 10.05.2022. doi: 10.1016/0002-9149(68)90136-7.
7. Wold LE, Lie JT. Cardiac myxomas: a clinicopathologic profile. *The American journal of pathology* 1980; 101(1):219–40.
8. McAllister HA, Fenoglio JJ. Tumors of the cardiovascular system. *Atlas of tumor pathology* 1978:1–20.
9. Strecker T, Rösch J, Weyand M, Agaimy A. Primary and metastatic cardiac tumors: imaging characteristics, surgical treatment, and histopathological spectrum: a 10-year-experience at a German heart center. *Cardiovascular Pathology* 2012; 21(5):436–43. doi: 10.1016/j.carpath.2011.12.004.
10. Steger CM, Hager T, Ruttmann E. Primary cardiac tumours: a single-center 41-year experience. *ISRN cardiology* 2012; 2012:1–7. doi: 10.5402/2012/906109.
11. Chan JKC, Cooper WA, Jain D, Lazar AJ, Maleszewski JJ. Tumours of the heart. In: Lokuhetty D, White VA, Cree IA. *WHO Classification of Tumours. Thoracic Tumours* [5. Auflage]. Lyon: IARC 2021; 5: 227–36. ISBN: 978-92-8324506-3.
12. Basso C. Surgical pathology of primary cardiac and pericardial tumors. *Eur J Cardiothorac Surg* 1997; 12(5):730–8. doi: 10.1016/S1010-7940(97)00246-7.

13. Beghetti M, Gow RM, Haney I, Mawson J, Williams WG, Freedom RM. Pediatric primary benign cardiac tumors: A 15-year review. *American heart journal* 1997; 134(6):1107–14. doi: 10.1016/s0002-8703(97)70032-2.
14. Padalino MA, Vida VL, Boccuzzo G, Tonello M, Sarris GE, Berggren H et al. Surgery for Primary Cardiac Tumors in Children: early and late results in a multicenter European Congenital Heart Surgeons Association study. *Circulation* 2012; 126(1):22–30. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.037226.
15. Yu K, Liu Y, Wang H, Hu S, Long C. Epidemiological and pathological characteristics of cardiac tumors: a clinical study of 242 cases. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery* 2007; 6(5):636–9. doi: 10.1510/icvts.2007.156554.
16. Keeling I. Cardiac myxomas: 24 years of experience in 49 patients. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 2002; 22(6):971–7. doi: 10.1016/s1010-7940(02)00592-4.
17. Blondeau P. Primary cardiac tumors--French studies of 533 cases. *The Thoracic and cardiovascular surgeon* 1990; 38 Suppl 2:192–5. doi: 10.1055/s-2007-1014065.
18. Karabinis A, Samanidis G, Khoury M, Stavridis G, Perreas K. Clinical presentation and treatment of cardiac myxoma in 153 patients. *Medicine (Baltimore)* 2018; 97(37):12397-12403. doi: 10.1097/MD.00000000000012397.
19. Pinede L, Duhaut P, Loire R. Clinical presentation of left atrial cardiac myxoma. A series of 112 consecutive cases. *Medicine (Baltimore)* 2001; 80(3):159–72. doi: 10.1097/00005792-200105000-00002.
20. Carney JA, Gordon H, Carpenter PC, Shenoy BV, Go VL. The complex of myxomas, spotty pigmentation, and endocrine overactivity. *Medicine (Baltimore)* 1985; 64(4):270–83. doi: 10.1097/00005792-198507000-00007.
21. Garatti A, Nano G, Canziani A, Gagliardotto P, Mossuto E, Frigiola A et al. Surgical excision of cardiac myxomas: twenty years experience at a single institution. *The Annals of Thoracic Surgery* 2012; 93(3):825–31. doi: 10.1016/j.athoracsur.2011.11.009.
22. Yüksel A, Saba D, Veliöğlu Y, Ener S, Özkan H. Biatial Approach Provides Better Outcomes in the Surgical Treatment of Cardiac Myxomas. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery* 2016; 31(4):309–17. doi: 10.5935/1678-9741.20160066.
23. Lee KS, Kim GS, Jung Y, Jeong IS, Na KJ, Oh BS et al. Surgical resection of cardiac myxoma-a 30-year single institutional experience. *J Cardiothorac Surg* 2017; 12(1):12–8. doi: 10.1186/s13019-017-0583-7.

24. Wu X, Yang D, Yang Z, Li J, Zhao Y, Wang K et al. Clinical characteristics and long term post-operative outcome of cardiac myxoma. *EXCLI J* 2012; 11:240–9.
25. Jiang C-X, Wang J-G, Qi R-D, Wang W, Gao L-J, Zhao J-H et al. Long-term outcome of patients with atrial myxoma after surgical intervention: analysis of 403 cases. *J Geriatr Cardiol* 2019; 16(4):338–43. doi: 10.11909/j.issn.1671-5411.2019.04.003.
26. Wei K, Guo H-W, Fan S-Y, Sun X-G, Hu S-S. Clinical features and surgical results of cardiac myxoma in Carney complex. *J Card Surg* 2019; 34(1):14–9. doi: 10.1111/jocs.13980.
27. Tasoglu I, Tutun U, Lafci G, Hijaazi A, Yener U, Yalcinkaya A et al. Primary cardiac myxomas: clinical experience and surgical results in 67 patients. *J Card Surg* 2009; 24(3):256–9. doi: 10.1111/j.1540-8191.2008.00797.x.
28. Vaideeswar P, Gupta R, Mishra P, Lanjewar C, Raut A. Atypical cardiac myxomas: a clinicopathologic analysis and their comparison to 64 typical myxomas. *Cardiovasc Pathol* 2012; 21(3):180–7. doi: 10.1016/j.carpath.2011.07.001.
29. Zheng Z, Guo G, Xu L, Lei L, Wei X, Pan Y. Left atrial myxoma with versus without cerebral embolism: length of symptoms, morphologic characteristics, and outcomes. *Tex Heart Inst J* 2014; 41(6):592–5. doi: 10.14503/THIJ-13-3862.
30. Patil NP, Dutta N, Satyarthi S, Geelani MA, Kumar Satsangi D, Banerjee A. Cardiac myxomas: experience over one decade. *J Card Surg* 2011; 26(4):355–9. doi: 10.1111/j.1540-8191.2011.01271.x.
31. Abu Abeeleh M, Saleh S, Alhaddad E, Alsmady M, Alshehabat M, Bani Ismail Z et al. Cardiac myxoma: clinical characteristics, surgical intervention, intra-operative challenges and outcome. *Perfusion* 2017; 32(8):686–90. doi: 10.1177/0267659117722596.
32. Wang Z, Chen S, Zhu M, Zhang W, Zhang H, Li H et al. Risk prediction for emboli and recurrence of primary cardiac myxomas after resection. *J Cardiothorac Surg* 2016; 11:11–22. doi: 10.1186/s13019-016-0420-4.
33. Yuda S, Nakatani S, Yutani C, Yamagishi M, Kitamura S, Miyatake K. Trends in the clinical and morphological characteristics of cardiac myxoma: 20-year experience of a single tertiary referral center in Japan. *Circulation Journal* 2002; 66(11):1008–13. doi: 10.1253/circj.66.1008.
34. Acebo E, Val-Bernal JF, Gómez-Román JJ, Revuelta JM. Clinicopathologic study and DNA analysis of 37 cardiac myxomas: a 28-year experience. *Chest* 2003; 123(5):1379–85. doi: 10.1378/chest.123.5.1379.

35. Reynen K. Cardiac myxomas. *The New England Journal of Medicine* 1995; 333(24):1610–7. doi: 10.1056/NEJM199512143332407.
36. Seol S-H, Kim D-I, Jang J-S, Yang T-H, Kim D-K, Kim D-S. Left atrial myxoma presenting as paroxysmal supraventricular tachycardia. *Heart, Lung & Circulation* 2014; 23(2):65-66. doi: 10.1016/j.hlc.2013.05.641.
37. Mendoza CE, Rosado MF, Bernal L. The role of interleukin-6 in cases of cardiac myxoma. Clinical features, immunologic abnormalities, and a possible role in recurrence. *Tex Heart Inst J* 2001; 28(1):3–7.
38. Mendoza CE, Rosado MF, Pacheco P. Interleukin-6 production and recurrent cardiac myxoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 121(2):395–6. doi: 10.1067/mtc.2001.109704.
39. Ma H, Niu Y, Tian M, Liu L, Gong W, Zheng M. A study of 399 cardiac tumors: Characteristics of echocardiography and pathological features. *Echocardiography (Mount Kisco, N.Y.)* 2022; 39(1):37–45. doi: 10.1111/echo.15249.
40. Xia H, Gan L, Jiang Y, Tang Q, Zhang P, Tang X et al. Use of transesophageal echocardiography and contrast echocardiography in the evaluation of cardiac masses. *International Journal of Cardiology* 2017; 236:466–72. doi: 10.1016/j.ijcard.2017.01.073.
41. Pérez de Isla L, Castro R de, Zamorano JL, Almería C, Moreno R, Moreno M et al. Diagnosis and treatment of cardiac myxomas by transesophageal echocardiography. *The American Journal of Cardiology* 2002; 90(12):1419–21. Verfügbar unter: [https://www.ajconline.org/article/S0002-9149\(02\)02891-6/fulltext](https://www.ajconline.org/article/S0002-9149(02)02891-6/fulltext). Datum der letzten Abfrage: 10.05.2022. doi: 10.1016/S0002-9149(02)02891-6.
42. Sparrow PJ, Kurian JB, Jones TR, Sivananthan MU. MR imaging of cardiac tumors. *Radiographics* 2005; 25(5):1255–76. doi: 10.1148/rg.255045721.
43. Giusca S, Mereles D, Ochs A, Buss S, André F, Seitz S et al. Incremental value of cardiac magnetic resonance for the evaluation of cardiac tumors in adults: experience of a high volume tertiary cardiology centre. *The international Journal of Cardiovascular Imaging* 2017; 33(6):879–88. doi: 10.1007/s10554-017-1065-7.
44. Vistarini N, Alloni A, Aiello M, Viganò M. Minimally invasive video-assisted approach for left atrial myxoma resection. *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery* 2010; 10(1):9–11. doi: 10.1510/icvts.2009.217232.
45. Nehaj F, Sokol J, Mokan M, Jankovicova V, Kovar F, Kubaskova M et al. Outcomes of Patients with Newly Diagnosed Cardiac Myxoma: A Retrospective Multicentric Study. *BioMed research international* 2018; 2018:1–5. doi: 10.1155/2018/8320793.

46. Jones DR, Warden HE, Murray GF, Hill RC, Graeber GM, Cruzzavala JL et al. Biatrial approach to cardiac myxomas: A 30-year clinical experience. *The Annals of Thoracic Surgery* 1995; 59(4):851–6. doi: 10.1016/0003-4975(95)00064-r.
47. Nordstrand IAJ, Tam RKW. Minimally invasive surgery for cardiac myxomas using an upper hemi-sternotomy and biatrial septal approach. *Heart, Lung & Circulation* 2005; 14(4):255–61. doi: 10.1016/j.hlc.2005.03.022.
48. Shah IK, Dearani JA, Daly RC, Suri RM, Park SJ, Joyce LD et al. Cardiac Myxomas: A 50-Year Experience With Resection and Analysis of Risk Factors for Recurrence. *The Annals of Thoracic Surgery* 2015; 100(2):495–500. doi: 10.1016/j.athoracsur.2015.03.007.
49. Shinfeld A, Katsumata T, Westaby S. Recurrent cardiac myxoma: seeding or multifocal disease? *The Annals of Thoracic Surgery* 1998; 66(1):285–8. doi: 10.1016/S0003-4975(98)00481-0.
50. McAllister HA. Primary tumors and cysts of the heart and pericardium. *Current Problems in Cardiology* 1979; 4(2):1–51. doi: 10.1016/0146-2806(79)90008-2.
51. Deshpande A, Venugopal P, Sampath Kumar A, Chopra P. Phenotypic characterization of cellular components of cardiac myxoma: A light microscopy and immunohistochemistry study. *Human Pathology* 1996; 27(10):1056–9. doi: 10.1016/s0046-8177(96)90283-x.
52. Hwang JJ, Lien WP, Kuan P, Hung CR, How SW. Atypical myxoma. *Chest Journal* 1991; 100(2):550–1. doi: 10.1378/chest.100.2.550.
53. Pucci A, Gagliardotto P, Zanini C, Pansini S, Di Summa M, Mollo F. Histopathologic and clinical characterization of cardiac myxoma: review of 53 cases from a single institution. *American Heart Journal* 2000; 140(1):134–8. doi: 10.1067/mhj.2000.107176.
54. Swartz MF, Lutz CJ, Chandan VS, Landas S, Fink GW. Atrial myxomas: pathologic types, tumor location, and presenting symptoms. *J Card Surg* 2006; 21(4):435–40. doi: 10.1111/j.1540-8191.2006.00265.x.
55. Sarjeant JM, Butany J, Cusimano RJ. Cancer of the heart: epidemiology and management of primary tumors and metastases. *Am J Cardiovasc Drugs* 2003; 3(6):407–21. doi: 10.2165/00129784-200303060-00004.
56. Orlandi A, Ciucci A, Ferlosio A, Genta R, Spagnoli LG, Gabbiani G. Cardiac myxoma cells exhibit embryonic endocardial stem cell features. *The Journal of Pathology* 2006; 209(2):231–9. doi: 10.1002/path.1959.

57. Zheng J-J, Geng X-G, Wang H-C, Yan Y, Wang H-Y. Clinical and histopathological analysis of 66 cases with cardiac myxoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2013; 14(3):1743–6. doi: 10.7314/apjcp.2013.14.3.1743.
58. Carney JA. Differences between nonfamilial and familial cardiac myxoma. *The American Journal of Surgical Pathology* 1985; 9(1):53–5. doi: 10.1097/00000478-198501000-00009.
59. Kodama H, Hirotani T, Suzuki Y, Ogawa S, Yamazaki K. Cardiomyogenic Differentiation in Cardiac Myxoma Expressing Lineage-Specific Transcription Factors. *The American Journal of Pathology* 2002; 161(2):381–9. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64193-4.
60. Sakamoto H, Sakamaki T, Sumino H, Sawada Y, Sato H, Sato M et al. Production of endothelin-1 and big endothelin-1 by human cardiac myxoma cells--implications of the origin of myxomas-. *Circulation Journal* 2004; 68(12):1230–2. doi: 10.1253/circj.68.1230.
61. Terracciano LM, Mhawech P, Suess K, D'Armiento M, Lehmann FS, Jundt G et al. Calretinin as a marker for cardiac myxoma. Diagnostic and histogenetic considerations. *Am J Clin Pathol* 2000; 114(5):754–9. doi: 10.1309/NR6G-T872-F090-LBRW.
62. Pucci A, Bartoloni G, Tessitore E, Carney JA, Papotti M. Cytokeratin profile and neuroendocrine cells in the glandular component of cardiac myxoma. *Virchows Archiv* 2003; 443(5):618–24. doi: 10.1007/s00428-003-0882-3.
63. Rhodes AR, Silverman RA, Harrist TJ, Perez-Atayde AR. Mucocutaneous lentiginos, cardiomucocutaneous myxomas, and multiple blue nevi: The "LAMB" syndrome. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1984; 10(1):72–82. doi: 10.1016/s0190-9622(84)80047-x
64. Atherton DJ, Pitcher DW, Wells RS, MacDonald DM. A syndrome of various cutaneous pigmented lesions, myxoid neurofibromata and atrial myxoma: the NAME syndrome. *Br J Dermatol* 1980; 103(4):421–9. doi: 10.1111/j.1365-2133.1980.tb07266.x.
65. Carney JA, Hruska LS, Beauchamp GD, Gordon H. Dominant Inheritance of the Complex of Myxomas, Spotty Pigmentation, and Endocrine Overactivity. *Mayo Clinic Proceedings* 1986; 61(3):165–72. Verfügbar unter: [https://www.mayoclinicproceedings.org/article/S0025-6196\(12\)61843-6/fulltext](https://www.mayoclinicproceedings.org/article/S0025-6196(12)61843-6/fulltext). Datum der letzten Abfrage: 14.03.2022. doi: 10.1016/S0025-6196(12)61843-6.

66. Stratakis CA, Carney JA, Kirschner LS. Clinical and Molecular Features of the Carney Complex: Diagnostic Criteria and Recommendations for Patient Evaluation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2001; 86(9):4041-4046. doi: 10.1210/jcem.86.9.7903.
67. Bertherat J. Carney complex (CNC). *Orphanet J Rare Dis* 2006; 1(21). Verfügbar unter: <https://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/1750-1172-1-21>. Datum der letzten Abfrage: 17.02.2022. doi: 10.1186/1750-1172-1-21.
68. Stratakis CA, Carney JA, Lin JP, Papanicolaou DA, Karl M, Kastner DL et al. Carney complex, a familial multiple neoplasia and lentiginosis syndrome. Analysis of 11 kindreds and linkage to the short arm of chromosome 2. *J Clin Invest* 1996; 97(3):699–705. doi: 10.1172/JCI118467.
69. Mateus C, Palangié A, Franck N, Groussin L, Bertagna X, Avril M-F et al. Heterogeneity of skin manifestations in patients with Carney complex. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2008; 59(5):801–10. doi: 10.1016/j.jaad.2008.07.032.
70. Bossis I, Stratakis CA. Minireview: PRKAR1A: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 2004; 145(12):5452–8. Verfügbar unter: <https://academic.oup.com/endo/article/145/12/5452/2499732>. Datum der letzten Abfrage: 18.05.2022. doi: 10.1210/en.2004-0900.
71. Courcoutsakis NA, Chow CK, Shawker TH, Carney JA, Stratakis CA. Syndrome of spotty skin pigmentation, myxomas, endocrine overactivity, and schwannomas (Carney complex): breast imaging findings. *Radiology* 1997; 205(1):221–7. doi: 10.1148/radiology.205.1.9314989.
72. Stratakis CA, Sarlis N, Kirschner LS, Carney JA, Doppman JL, Nieman LK et al. Paradoxical response to dexamethasone in the diagnosis of primary pigmented nodular adrenocortical disease. *Annals of Internal Medicine* 1999; 131(8):585–91. doi: 10.7326/0003-4819-131-8-199910190-00006.
73. Pitsava G, Zhu C, Sundaram R, Mills JL, Stratakis CA. Predicting the risk of cardiac myxoma in Carney complex. *Genetics in Medicine* 2021; 23(1):80–5. doi: 10.1038/s41436-020-00956-3.
74. Bertherat J, Horvath A, Groussin L, Grabar S, Boikos S, Cazabat L et al. Mutations in regulatory subunit type 1A of cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase (PRKAR1A): phenotype analysis in 353 patients and 80 different genotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(6):2085–91. doi: 10.1210/jc.2008-2333.

75. Casey M, Vaughan CJ, He J, Hatcher CJ, Winter JM, Weremowicz S et al. Mutations in the protein kinase A R1alpha regulatory subunit cause familial cardiac myxomas and Carney complex. *J Clin Invest* 2000; 106(5):31-38. doi: 10.1172/JCI10841.
76. Kirschner LS, Carney JA, Pack SD, Taymans SE, Giatzakis C, Cho YS et al. Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nature Genetics* 2000; 26(1):89-92. doi: 10.1038/79238.
77. Matyakhina L, Pack S, Kirschner LS, Pak E, Mannan P, Jaikumar J et al. Chromosome 2 (2p16) abnormalities in Carney complex tumours. *J Med Genet* 2003; 40(4):268-77. doi: 10.1136/jmg.40.4.268.
78. Casey M, Mah C, Merliss AD, Kirschner LS, Taymans SE, Denio AE et al. Identification of a novel genetic locus for familial cardiac myxomas and Carney complex. *Circulation* 1998; 98(23):2560-6. doi: 10.1161/01.cir.98.23.2560.
79. Cho-Chung YS, Pepe S, Clair T, Budillon AO, Nesterova M. cAMP-dependent protein kinase: role in normal and malignant growth. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 1995; 21(1-3):33-61. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/1040842894001669>. Datum der letzten Abfrage: 14.04.2022. doi: 10.1016/1040-8428(94)00166-9.
80. Bossis I, Voutetakis A, Bei T, Sandrini F, Griffin KJ, Stratakis CA. Protein kinase A and its role in human neoplasia: the Carney complex paradigm. *Endocrine-Related Cancer* 2004; 11(2):265-80. Verfügbar unter: <https://erc.bioscientifica.com/view/journals/erc/11/2/15163302.xml>. Datum der letzten Abfrage: 21.05.2021. doi: 10.1677/erc.0.0110265.
81. Foss KB, Landmark B, Skålhegg BS, Taskén K, Jellum E, Hansson V et al. Characterization of in-vitro-translated human regulatory and catalytic subunits of cAMP-dependent protein kinases. *European journal of biochemistry* 1994; 220(1):217-23. doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18617.x.
82. Tortora G, Damiano V, Bianco C, Baldassarre G, Bianco AR, Lanfrancone L et al. The RIalpha subunit of protein kinase A (PKA) binds to Grb2 and allows PKA interaction with the activated EGF-receptor. *Oncogene* 1997; 14(8):923-8. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/1200906>. Datum der letzten Abfrage: 11.03.2022. doi: 10.1038/sj.onc.1200906.
83. Amieux PS, McKnight GS. The essential role of RI alpha in the maintenance of regulated PKA activity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002; 968:75-95. doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04328.x.

84. London E, Bloyd M, Stratakis CA. PKA functions in metabolism and resistance to obesity: lessons from mouse and human studies. *Journal of Endocrinology* 2020; 246(3):51-64. doi: 10.1530/JOE-20-0035.
85. Kirschner LS, Sandrini F, Monbo J, Lin JP, Carney JA, Stratakis CA. Genetic heterogeneity and spectrum of mutations of the PRKAR1A gene in patients with the carney complex. *Hum Mol Genet* 2000; 9(20):3037–46. doi: 10.1093/hmg/9.20.3037.
86. Groussin L, Kirschner LS, Vincent-Dejean C, Perlemoine K, Jullian E, Delemer B et al. Molecular analysis of the cyclic AMP-dependent protein kinase A (PKA) regulatory subunit 1A (PRKAR1A) gene in patients with Carney complex and primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) reveals novel mutations and clues for pathophysiology: augmented PKA signaling is associated with adrenal tumorigenesis in PPNAD. *American Journal of Human Genetics* 2002; 71(6):1433–42. doi: 10.1086/344579.
87. Robinson-White A, Hundley TR, Shiferaw M, Bertherat J, Sandrini F, Stratakis CA. Protein kinase-A activity in PRKAR1A-mutant cells, and regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2. *Hum Mol Genet* 2003; 12(13):1475–84. doi: 10.1093/hmg/ddg160.
88. Griffin KJ, Kirschner LS, Matyakhina L, Stergiopoulos SG, Robinson-White A, Lenherr SM et al. A transgenic mouse bearing an antisense construct of regulatory subunit type 1A of protein kinase A develops endocrine and other tumours: comparison with Carney complex and other PRKAR1A induced lesions. *J Med Genet* 2004; 41(12):923–31. doi: 10.1136/jmg.2004.028043.
89. Kirschner LS, Kusewitt DF, Matyakhina L, Towns WH, Carney JA, Westphal H et al. A mouse model for the Carney complex tumor syndrome develops neoplasia in cyclic AMP-responsive tissues. *Cancer Research* 2005; 65(11):4506–14. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0580.
90. Mabuchi T, Shimizu M, Ino H, Yamguchi M, Terai H, Fujino N et al. PRKAR1A gene mutation in patients with cardiac myxoma. *International Journal of Cardiology* 2005; 102(2):273–7. doi: 10.1016/j.ijcard.2004.05.053.
91. Fogt F, Zimmerman RL, Hartmann CJ, Brown CA, Narula N. Genetic alterations of Carney complex are not present in sporadic cardiac myxomas. *International journal of molecular medicine* 2002; 9(1):59–60. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11744997/>. Verfügbar unter: <https://www.spandidos-publications.com/ijmm/9/1/59>. Datum der letzten Abfrage: 17.02.2022.

92. Mantovani G, Bondioni S, Corbetta S, Menicanti L, Rubino B, Peverelli E et al. Analysis of GNAS1 and PRKAR1A gene mutations in human cardiac myxomas not associated with multiple endocrine disorders. *Journal of endocrinological investigation* 2009; 32(6):501–4. doi: 10.1007/BF03346496.
93. Maleszewski JJ, Larsen BT, Kip NS, Castonguay MC, Edwards WD, Carney JA et al. PRKAR1A in the development of cardiac myxoma: a study of 110 cases including isolated and syndromic tumors. *The American Journal of Surgical Pathology* 2014; 2014(8):1079–87. doi: 10.1097/PAS.000000000000202.
94. He J, Sun M, Li E, Hou Y, Shepard MJ, Di Chen et al. Recurrent somatic mutations of PRKAR1A in isolated cardiac myxoma. *Oncotarget* 2017; 8(61):103968–74. Verfügbar unter: <https://www.oncotarget.com/article/21916/text/>. doi: 10.18632/oncotarget.21916.
95. Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10(7):657–62. doi: 10.1093/hmg/10.7.657.
96. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature medicine* 1998; 4(7):844–7. doi: 10.1038/nm0798-844.
97. Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 2005; 42(4):405–26. doi: 10.1354/vp.42-4-405.
98. McCourt CM, Boyle D, James J, Salto-Tellez M. Immunohistochemistry in the era of personalised medicine. *Journal of Clinical Pathology* 2013; 66(1):58–61. doi: 10.1136/jclinpath-2012-201140.
99. Immunohistochemistry (IHC) [Internet]. Assay Biotech 2022. Verfügbar unter: <https://www.assaybiotechnology.com/Immunohistochemistry-IHC-Protocol.html>. Datum der letzten Abfrage: 10.05.2022.
100. Immunohistochemistry [Internet]. BD Biosciences 2022. Verfügbar unter: <https://www.bdbiosciences.com/en-ca/learn/applications/immunohistochemistry#Overview>. Datum der letzten Abfrage: 10.05.2022.
101. Krentz H. Beschreibende Statistische Analysen (Band1). In: *Statistische Analysen mit SPSS in der Medizin*. Aachen: Shaker 2008: 218-231. ISBN: 978-3-8322-3979-4.
102. Horvath A, Bertherat J, Groussin L, Guillaud-Bataille M, Tsang K, Cazabat L et al. Mutations and polymorphisms in the gene encoding regulatory subunit type 1-alpha of protein kinase A (PRKAR1A): an update. *Human mutation* 2010; 31(4):369–79. doi: 10.1002/humu.21178.

103. Tseng I-C, Huang W-J, Jhuang Y-L, Chang Y-Y, Hsu H-P, Jeng Y-M. Microinsertions in PRKACA cause activation of the protein kinase A pathway in cardiac myxoma. *The Journal of Pathology* 2017; 242(2):134–9. doi: 10.1002/path.4899.
104. Patel J, Sheppard MN. Pathological study of primary cardiac and pericardial tumours in a specialist UK Centre: surgical and autopsy series. *Cardiovascular Pathology* 2010; 19(6):343–52. doi: 10.1016/j.carpath.2009.07.005.
105. Ha J-W, Kang W-C, Chung N, Chang B-C, Rim S-J, Kwon J-W et al. Echocardiographic and morphologic characteristics of left atrial myxoma and their relation to systemic embolism. *The American Journal of Cardiology* 1999; 83(11):1579–82. Verfügbar unter: [https://www.ajconline.org/article/S0002-9149\(99\)00156-3/fulltext](https://www.ajconline.org/article/S0002-9149(99)00156-3/fulltext). Datum der letzten Abfrage: 10.05.2022. doi: 10.1016/S0002-9149(99)00156-3.
106. Cetin G, GURSOY M, UGURLUCAN M, UZUNHASAN I, HATEMI AC, TIRELI E et al. Single-institutional 22 years experience on cardiac myxomas. *Angiology* 2010; 61(5):504–9. doi: 10.1177/0003319709352489.
107. Yokomuro H, Yoshihara K, Watanabe Y, Shiono N, Koyama N, Takanashi Y. The variations in the immunologic features and interleukin-6 levels for the surgical treatment of cardiac myxomas. *Surgery today* 2007; 37(9):750–3. doi: 10.1007/s00595-006-3448-6.
108. Pacini D, Careddu L, Pantaleo A, Berretta P, Leone O, Marinelli G et al. Primary benign cardiac tumours: long-term results. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 2012; 41(4):812–9. doi: 10.1093/ejcts/ezr067.
109. He D-K, Zhang Y-F, Liang Y, Ye S-X, Wang C, Kang B et al. Risk factors for embolism in cardiac myxoma: a retrospective analysis. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 2015; 21:1146–54. doi: 10.12659/MSM.893855.
110. Poterucha TJ, Kochav J, O'Connor DS, Rosner GF. Cardiac Tumors: Clinical Presentation, Diagnosis, and Management. *Curr Treat Options Oncol* 2019; 20(8):66. doi: 10.1007/s11864-019-0662-1.
111. Johansson L. Histogenesis of cardiac myxomas. An immunohistochemical study of 19 cases, including one with glandular structures, and review of the literature. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 1989; 113(7):735–41.
112. Curschellas E, Toia D, Borner M, Mihatsch MJ, Gudat F. Cardiac myxomas: immunohistochemical study of benign and malignant variants. *Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology* 1991; 418(6):485–91. doi: 10.1007/BF01606497.

113. Govoni E, Severi B, Cenacchi G, Laschi R, Pileri S, Rivano MT et al. Ultrastructural and immunohistochemical contribution to the histogenesis of human cardiac myxoma. *Ultrastructural Pathology* 1988; 12(2):221–33. doi: 10.3109/01913128809058220.
114. Woodcock-Mitchell J, Mitchell JJ, Low RB, Kieny M, Sengel P, Rubbia L et al. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed in embryonic rat cardiac and skeletal muscles. *Differentiation* 1988; 39(3):161–6. doi: 10.1111/j.1432-0436.1988.tb00091.x.
115. Acebo E, Val-Bernal JF, Gómez-Roman JJ. Thrombomodulin, calretinin and c-kit (CD117) expression in cardiac myxoma. *Histol Histopathol* 2001; 16(4):1031–6. doi: 10.14670/HH-16.1031.
116. Acebo E, Val-Bernal JF, Gómez-Román JJ. Prichard's structures of the fossa ovalis are not histogenetically related to cardiac myxoma. *Histopathology* 2001; 39(5):529–35. doi: 10.1046/j.1365-2559.2001.01266.x.
117. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95(3):952–8. Verfügbar unter: <https://ash-publications.org/blood/article/95/3/952/138667/Expression-of-VEGFR-2-and-AC133-by-circulating>. Datum der letzten Abfrage: 14.05.2022.
118. te Velde EA, Exalto N, Hesseling P, van der Linden HC. First trimester development of human chorionic villous vascularization studied with CD34 immunohistochemistry. *Human Reproduction* 1997; 12(7):1577–81. doi: 10.1093/humrep/12.7.1577.
119. Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, Mastorides S, Dudas ME, Leung DHY et al. Validation of Tissue Microarrays for Immunohistochemical Profiling of Cancer Specimens Using the Example of Human Fibroblastic Tumors. *The American Journal of Pathology* 2001; 158(4):1245–51 doi: 10.1016/S0002-9440(10)64075-8.
120. Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Köchli OR et al. Tissue Microarrays for Rapid Linking of Molecular Changes to Clinical Endpoints. *The American Journal of Pathology* 2001; 159(6):2249–56. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63075-1.
121. Tzankov A, Zimpfer A, Pehrs A-C, Lugli A, Went P, Maurer R et al. Expression of B-cell markers in classical hodgkin lymphoma: a tissue microarray analysis of 330 cases. *Modern Pathology* 2003; 16(11):1141–7. doi: 10.1097/01.MP.0000093627.51090.3F.
122. Sauter G. Representativity of TMA studies. *Methods in molecular biology* 2010; 664:27–35. doi: 10.1007/978-1-60761-806-5_3.

123. Hayat MA. Fixation and Embedding. In: *Microscopy, Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods* [1. Auflage]. New York: Springer 2002; 53-69. doi: 10.1007/0-306-47599-5_3.
124. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *The American Journal of Surgical Pathology* 2000; 24(7):1016–9. doi: 10.1097/00000478-200007000-00014.
125. Arnold MM, Srivastava S, Fredenburgh J, Stockard CR, Myers RB, Grizzle WE. Effects of fixation and tissue processing on immunohistochemical demonstration of specific antigens. *Biotechnic & Histochemistry* 1996; 71(5):224–30. doi: 10.3109/10520299609117164.
126. Schaaf CP, Zschocke J. Molekulargenetik. In: *Basiswissen Humangenetik* [2. Auflage]. Berlin, Heidelberg: Springer 2013; 147-55. doi: 10.1007/978-3-642-28907-1. ISBN: 978-3-642-28907-1.
127. Do H, Dobrovic A. Limited copy number-high resolution melting (LCN-HRM) enables the detection and identification by sequencing of low level mutations in cancer biopsies. *Molecular cancer* 2009; 8:82–93. doi: 10.1186/1476-4598-8-82.
128. Akbari M, Doré Hansen M, Halgunset J, Skorpen F, Krokan HE. Low copy number DNA template can render Polymerase Chain Reaction error prone in a Sequence-dependent manner. *The Journal of molecular diagnostics* 2005; 7(1):36–9. doi: 10.1016/s1525-1578(10)60006-2.

Anhang

Anhang 1: Anamnesebogen Teil 1

Anamnesebogen

Persönliche Daten:

Name:

Geburtsdatum:

Telefonnummer:

Aktueller Hausarzt:

Aktueller Kardiologe:

Vegetative Anamnese:

Körpergewicht:

Ggf. Gewichtsverlauf in der Zeit nach der OP

Körpergröße:

- Allgemeinzustand: gut
 leicht reduziert
 deutlich reduziert

Rauchen/Alkohol:

Aktuelle Symptomatik:

- Belastbarkeit
- Thoraxschmerzen
 - In Ruhe
 - Bei Bewegung
- Herzrhythmusstörungen
- Schwindel
- Ödeme
- Herzfrequenz: _____
- Blutdruckmessung: systolisch/ diastolisch _____ / _____
- EKG: wann war das letzte EKG?
- Herztöne
- Palpitationen

Aktuelle Anamnese:

Anhang 1: Anamnesebogen Teil 2

Sind Rezidive aufgetreten?

Ja

Nein

Ggf. kurze Anamnese über den gesundheitlichen Verlauf seit der Operation:

Vorerkrankungen:

Kardiale Vorerkrankungen:

Weitere:

Symptome vor Diagnose des kardialen Myxoms

Palpitationen

Synkopen

Dyspnoe weitere:

Schwindel

Übelkeit

Brustenge

Schlaganfall

Arterielle Embolien

Mitral-/Trikuspidalinsuffizienz

Carney-Komplex assoziierte Vorerkrankungen:**Hauptkriterien:**

Fleckige Hautpigmentierungen Myxome an Haut/Schleimhaut

Myxomatosis der Brust

Akromegalie bei GH-produzierendem Adenom

Primäre pigmentierte nodulare adrenokortikale Krankheit

Großzelliger kalzifizierter Sertoli-Zell-Tumor (LCCSCT)

Schilddrüsenkarzinom oder echoarme Knoten im Ultraschall (junges Alter)

Psammomatöses Schwannom duktales Adenom der Brust

Blauer Nävus

Osteochondromyxom

Ergänzende Kriterien:

Gab es in Ihrer Familie kardiale Vorerkrankungen/ein kardiales Myxom?

Verwandte 1 Grades:

Verwandte 2. Grades:

Anhang 1: Anamnesebogen Teil 3

Sind Mutation des *PRKAR1A* – Gens bekannt?

Haben Sie weitere Tumorerkrankungen: Wenn ja, welche:

Weitere Erkrankungen/Operationen:

Einverständnis zur Publikation sowie Verwendung zu wissenschaftlichen Vorträgen von medizinischen Daten.

Hiermit erkläre ich mich mit der wissenschaftlichen Publikation sowie Verwendung zu wissenschaftlichen Vorträgen von krankheitsspezifischen Daten meiner Erkrankung in anonymisierter Form einverstanden.

Ort, Datum:

Unterschrift:

Thesen

1. Das kardiale Myxom ist die zweithäufigste benigne primäre kardiale Neoplasie. Mit einer Inzidenz von 0,5 - 1 pro 1 000 000 Einwohnern gehört das kardiale Myxom dennoch zu den seltenen Erkrankungen. Die Ätiologie ist noch nicht vollständig geklärt. Ein Ausgang von einer multipotenten mesenchymalen Vorläuferzelle wird vermutet.
2. Die Symptomatik der Myxome reicht von obstruktiven Symptomen mit Dyspnoe, Schwindel und Palpitationen bis hin zu embolischen Ereignissen, kann aber auch komplett asymptomatisch sein.
3. In weniger als 10 % der kardialen Myxome zeigt sich eine familiäre autosomal-dominant vererbte Herkunft mit unterschiedlicher Penetranz. Diese Art der Myxome wurde das erste Mal 1985 von J. A. Carney als Carney-Komplex (CNC) beschrieben. Weitere CNC-assoziierte Symptome sind pigmentierte Hautläsionen, blaue Nävi, Lentigines und Hautmyxome.
4. Als Ursache der CNC-Erkrankungen sind derzeit zwei Genloki bekannt. In der Literatur wurden insbesondere Mutationen im *PRKAR1A*-Gen auf Chromosom 17 als mögliche Ursache detektiert. Weitere verantwortliche Gene wurden auf Chromosom 2 beschrieben.
5. Aufgrund der Mutation im *PRAKR1A*-Gen kommt es bei CNC-Fällen bei der immunhistochemischen Diagnostik zu Ausfällen in der *PRKAR1A*-Expression. In der Studie von Bertherat et al wird auf Grundlage dieser Erkenntnis angenommen, mithilfe der *PRKAR1A*-Expression die sporadischen Myxomfälle und die CNC-assoziierten Fälle zu differenzieren.
6. Die Datenlage über das Vorhandensein von Mutationen im *PRKAR1A*-Gen bei sporadischen Myxomen ist umstritten. Einige Autoren beschreiben keine Mutationen im *PRKAR1A*-Gen bei den sporadischen Myxomen und schlussfolgern daraus, dass isolierte kardiale Myxome nicht dieselben genetischen Grundlagen aufweisen, wie solche, die im Rahmen des CNCs entstehen. Im Gegensatz dazu wiesen Maleszewski et al. und He et al. in ihren Studien in ein bis zwei Dritteln der Fälle *PRKAR1A*-Mutationen bei sporadischen Myxomen nach. Weiterhin waren immunhistochemisch Ausfälle des *PRKAR1A*-Proteins zu detektieren.
7. Ziel der Arbeit war es, das vorliegende Kollektiv sporadischer kardialer Myxome sowohl klinisch-pathologisch als auch immunhistochemisch zu charakterisieren, wobei der Schwerpunkt auf der Mutationsanalyse des *PRKAR1A*-Gens lag, um damit zur Klärung der Pathogenese sporadischer kardialer Myxome beizutragen.

8. In dieser Arbeit wurde retrospektiv das Rostocker Kollektiv mit 27 kardialen Myxomfällen aus dem Zeitraum von 2006 bis 2021 analysiert. Dabei wurden die Fälle mit Hilfe eines standardisierten Fragebogens in Hinblick auf das Vorliegen von sporadischen Erkrankungsfällen evaluiert. Die klinischen Befunde ergänzten die histologischen und molekularen Ergebnisse.
9. Unabhängig von den Ergebnissen des *PRKAR1A*-Expressionsverhaltens erfolgte eine Mutationsanalyse des *PRKAR1A*-Gens aller 27 Fälle mittels NGS.
10. Die Ergebnisse der Mutationsanalyse und der immunhistochemischen Färbung für *PRKAR1A* wurden auf mögliche Zusammenhänge mit histologischen Daten sowie klinischen Parametern untersucht.
11. *PRKAR1A*-Mutationen waren in 48 % der sporadischen kardialen Myxome vorhanden. Am häufigsten lagen Frameshift- und Nonsense-Mutationen vor.
12. Ein Verlust der *PRKAR1A*-Expression fand sich signifikant häufiger bei mutierten Fällen. Zwei Fälle mit Missense-Mutation zeigten keinen *PRKAR1A*-Expressionsverlust.
13. Kardiale Myxome mit villöser Tumoroberfläche korrelierten mit dem Auftreten von *PRKAR1A*-Mutationen und wiesen eine signifikant höhere Rate an thromboembolischen Ereignissen auf.
14. *PRKAR1A*-Mutationen bei sporadischen Myxomen sind häufig und spielen zumindest bei einem Teil der kardialen Myxome bei der Pathogenese eine Rolle. Expressionsausfälle von *PRKAR1A* korrelieren mit dem Vorhandensein von Mutationen. Fälle mit *PRKAR1A*-Mutationen, aber lediglich einem Partialausfall oder einer erhaltenen Expression, zeigen, dass der mittels Immunhistochemie vorliegende *PRKAR1A*-Expressionsausfall als Surrogatmarker für das Vorhandensein einer *PRKAR1A*-Mutation nicht ausreichend ist. Bei vollständigen oder partiellen Proteinausfällen ohne Präsenz von nachgewiesenen Mutationen scheinen andere, zum Teil bisher unbekannte Mechanismen eine Rolle zu spielen. Abschließend konnte gezeigt werden, dass die Tumormorphologie einen Einfluss auf die klinische Symptomatik hat und mit dem Vorhandensein von *PRKAR1A*-Mutationen assoziiert ist.
15. Kardiale Myxome besitzen eine variable, aber positive Immunreaktivität für endotheliale, mesenchymale und neurogene Marker, dabei scheinen die endothelialen und myogenen Differenzierungslinien, die wichtigsten zu sein. Diese Befunde stützen die Annahme, dass kardiale Myxome aus multipotenten Vorläuferzellen mit der Fähigkeit zur mesenchymalen, endothelialen und neurogenen Zelldifferenzierung hervorgehen.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock

08.06.2022

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen nachstehenden Personen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation auf unterschiedliche Art und Weise unterstützt haben.

Ich danke Prof. Dr. med. A. Erbersdobler für die Möglichkeit, an seinem Institut diese Dissertationsschrift durchführen zu können.

Mein aufrichtiger Dank gilt meiner Doktormutter, Frau OÄ PD Dr. med. A. Zimpfer, für die ausgezeichnete Betreuung meiner Dissertation, sowohl in menschlicher als auch wissenschaftlicher Hinsicht mit Ihrer Bereitschaft, mich mit Hilfestellungen zu unterstützen als auch ihre stetige Geduld während der Anfertigung der Dissertation und darüber hinaus.

Prof. Dr. med. P. M. Dohmen, Klinikdirektor der Herzchirurgie, danke ich für die inhaltlichen Anregungen und Hilfestellungen, die gute Zusammenarbeit sowie die Bereitstellung der für die Dissertation notwendigen klinischen Daten. Für die tatkräftige und ausdauernde Unterstützung bei der Erhebung der klinischen Daten im Rahmen der Patientennachsorge danke ich FA Dr. med. A. Alozie.

Einen besonderen Dank möchte ich dem molekularpathologischen Labor aussprechen, das die Mutationsanalysen mittels NGS möglich gemacht hat. Insbesondere die Unterstützung von Herrn Dr. phil. nat. B. Schneider bei molekularbiologischen Fragestellungen und seine vielen differenzierten Anmerkungen kamen mir bei der Anfertigung dieser Arbeit sehr zugute.

Ein großer Dank richtet sich an die Mitarbeiter des Labors für die Hilfsbereitschaft bei der Anfertigung der Schnittpräparate und den vielen immunhistochemischen Färbungen.

Ich danke Frau Kollhoff, Sekretärin in der Abteilung für Herzchirurgie, für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei den administrativen und organisatorischen Belangen, die im Rahmen der Patienteneinbestellung notwendig waren.

Tief verbunden und dankbar bin ich meinen Eltern, Petra und Gerd Abel, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht haben und mich während meiner gesamten Studienzeit unermüdlich unterstützt haben. Ich danke Ihnen für ihr grenzenloses Verständnis und ihre aufmunternden Worte bei der Bewältigung der stetigen Herausforderungen in dieser bewegenden Zeit für mich.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Partner, der mir während der Anfertigung dieser Dissertation unterstützend und mit liebevollen Worten zur Seite stand.

Ferner möchte ich meinen Freunden und Kommilitonen danken, die mich im Rahmen des Studiums moralisch unterstützt und aufgemuntert haben.