

MONOKLONALE PROTEINE – EINE LABORCHEMISCHE HERAUSFORDERUNG

Klinisch-chemische Aspekte zur Interpretation von Laborbefunden im Rahmen der Gammopathieabklärung

Immunglobuline sind das charakteristische Produkt einer Plasmazelle. Auch ein proliferativer, entarteter Plasmazellklon sezerniert in der Regel ein Immunglobulin, das monoklonale Protein (auch M-Protein, M-Komponente oder Paraprotein genannt), welches im Blut – quasi als serologischer Tumormarker - nachgewiesen werden kann. Die Identifizierung eines M-Proteins im Rahmen des Screenings ist oft ein erster richtungsweisender, jedoch nicht beweisender, Hinweis auf eine Klonalität der Plasmazellen. Die Quantifizierung eines M-Proteins dient zum Zeitpunkt der Diagnosestellung u.a. der Risikostratifizierung, danach der Überwachung von Verlauf und Therapieansprechen.

Eine Monoklonalität kann alle Immunglobulinklassen (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE) und beide Leichtkettentypen (κ und λ) betreffen. Dabei muss es sich keineswegs immer um intakte Immunglobuline, bestehend aus schweren und leichten Ketten, handeln. Leichtketten-Myelome machen bis zu 20 % aller Multiplen Myelome aus. Extrem selten dagegen sind monoklonale Schwerekettenkrankheiten.

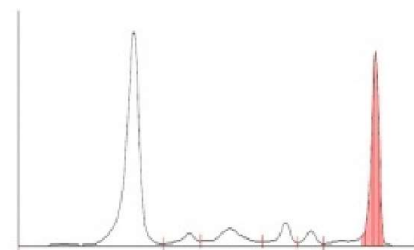
Im Gegensatz zu anderen serologischen Tumormarkern haben wir es bei M-Proteinen mit strukturell sehr variablen Molekülen zu tun. Ein intaktes Immunglobulin M (IgM) zum Beispiel, ein Pentamer mit einer Molekularmasse von 900 kDa, verhält sich nicht nur *in vivo* sondern auch *in vitro* anders, als ein Leichtketten-Monomer mit 24 kDa. Durch Rearrangement und somatische Mutation entsteht eine Fülle einzigartiger und für jeden Plasmazellklon, ob gesund oder entartet, hochspezifischer Immunglobuline.

Ein breites Spektrum an Krankheiten geht mit Paraprotein produzierenden Plasmazelldyskrasien (Paraproteinämien oder monoklonale Gammopathien) einher: von der low tumor-burden AL Amyloidose über die Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz (MGUS) bis zum Multiplen Myelom. Dies widerspiegelt sich auch in einem weiten Konzentrationsbereich der M-Proteine, welcher sich von wenigen mg/L bis zu mehreren g/L erstreckt. Diese enorme strukturelle und mengenmässige Vielfalt stellt eine ganz besondere Herausforderung für die proteinchemische Analytik dar. Verständlich deshalb auch, dass eine einzelne Testmethode für die zuverlässige Diagnose und Verlaufskontrolle aller Patienten nicht ausreicht. Ohne Anspruch auf Vollständigkeit soll Im Folgenden anhand drei der wichtigsten Methoden auf einige Besonderheiten aufmerksam gemacht werden, die sich bei der Auswertung und Interpretation proteinchemischer Befunde präsentieren.

Serum-Proteinelektrophorese (SPEP)

Die altbewährte, kostengünstige SPEP hat ihren zentralen Stellenwert bei der Suche und Verlaufsbeobachtung monoklonaler Proteine trotz der Einführung neuerer Analysenverfahren nicht verloren. Monoklonale Proteine manifestieren sich ab einer gewissen Serumkonzentration ($> ca. 5 \text{ g/L}$) typischerweise als engbasiger, zusätzlicher Peak (monoklonaler Extragradiant = M-Gradient), welcher am häufigsten in der γ -Fraktion vorkommt (roter Peak in Abb. rechts).

Tiefer konzentrierte M-Proteine ($< 2 \text{ g/L}$) oder solche, welche in den β - oder seltenerweise in den α -Fraktionen migrieren, sind wesentlich schwieriger von unspezifischen Unregelmässigkeiten im Pherogramm zu unterscheiden. Die diagnostische Sensitivität bei der SPEP als alleiniger Parameter zur Suche nach monoklonalen Gammopathien liegt denn auch bei ca. 80 %. Das heisst, ein M-Protein kann sich hinter einer quantitativ und im Kurvenverlauf völlig unauffälligen SPEP verbergen! Deshalb soll bei klinischem Verdacht trotz unauffälliger SPEP eine zusätzliche Methode (Immunfixation und/oder die quantitative Bestimmung der Serum- freie Leichtketten) veranlasst werden. Ebenso kann eine erniedrigte γ -Fraktion bei sonst unauffälligem Kurvenverlauf Ausdruck einer Monoklonalität sein. Sezerniert ein entarteter B-Zellklon nur



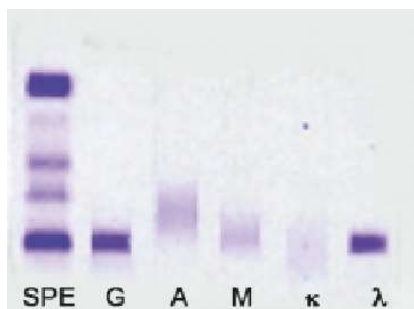
monoklonale, freie Leichtketten (Bence-Jones Protein), so fehlt in der SPEP häufig ein M-Gradient, da die Leichtketten dank ihrer niedrigen Molekularmasse rasch glomerulär filtriert werden. In diesem Fall ist eine weitere Abklärung mittels der Serum-freien Leichtkettenbestimmung oder einer Urin-Immundefixation zu empfehlen.

Die *International Myeloma Working Group* (1) empfiehlt denn auch für das erste Screening eine Kombination von Elektrophorese, Immundefixation und freie Leichtketten aus Serum einzusetzen. Die diagnostische Sensitivität aller drei Methoden zusammen liegt für Monoklonale Gammopathien unterschiedlicher Ätiologie bei ca. 97 %. Möchte man den diagnostischen Aufwand vereinfachen, kann ein minimales Screening-Panel bestehend aus der Kombination SPEP und Serum-freie Leichtketten in Betracht gezogen werden (diagnostische Sensitivität: ca. 94 %) (2). Der Miteinbezug einer Urin-Elektrophorese und -Immundefixation im Suchverfahren wird bei Verdacht auf eine AL Amyloidose, oder wenn ein M-Protein im Serum nachgewiesen werden konnte, empfohlen.

Lässt sich ein monoklonaler Gradient elektrophoretisch gut von den übrigen Fraktionen abtrennen, so kann dessen absolute Konzentration densitometrisch bestimmt werden. Dies ist auch für die Verlaufskontrolle bedeutend und stellt eine bessere Annäherung an den «wahren» Wert dar als die quantitative immunologische Bestimmung der entsprechenden Immunglobulinklasse. Ein Problem stellt sich bei der Densitometrie von M-Proteinen mit β -Mobilität (häufig vom IgA-Isotyp), da eine Überlappung mit den in der β -Fraktion vorkommenden physiologischen Proteinen (z.B. Transferrin, C3 Komplement, polyklonale Immunglobuline) unvermeidbar und eine densitometrische Quantifizierung deshalb ungenau ist. Das Monitoring erfolgt dann mittels der immunologischen Messung der involvierten Immunglobulinklasse und ggf. der freien Leichtketten. Als neue Alternative oder Ergänzung dient die gezielte Konzentrationsmessung der Schwer- und Leichtkettenkombination („HEVYLITE“, Fa. BindingSite). Hierbei wird gezielt das intakte Immunglobulin der betroffenen Klasse und des betroffenen Leichtkettentyps (entweder z.B. nur IgG/k oder nur IgG/ λ) gemessen.

Die erwähnten quantitativen Methoden sind nicht gleichwertig. Während z.B. mit der nephelometrischen Immunglobulin-Messung die Konzentrationen tendenziell überschätzt werden, kann es in der Densitometrie infolge Übersättigung der Farbstoffbindung zu falsch tiefen Konzentrationswerten kommen. Deshalb sollte(n) bei Verlaufbestimmungen möglichst immer dieselbe(n) Methode(n) angewendet werden.

Serum-Immundefixationselektrophorese (SIFE)



Wird in der SPEP ein M-Gradient nachgewiesen oder wird aufgrund der Klinik ein Multiples Myelom, ein Immunozytom oder eine andere Monoklonale Gammopathie stark vermutet, so sollte zur Bestätigung und Charakterisierung die sensitive Immundefixationselektrophorese (kurz Immundefixation, IFE oder IF) veranlasst werden. Klassischerweise zeigt sich ein Paraprotein in der SIFE als scharf abgegrenzte Bande - beim kompletten Immunglobulin in den Spuren der betroffenen Schwer- und Leichtkette (in Abb. links in G und λ) und bei Bence-Jones Proteinen nur in der entsprechenden Leichtkettenspur.

Unauffällige, wie auch ausgeprägte, pathologische Fälle können in der Regel mühelos beurteilt werden. Ein beträchtlicher Anteil betrifft jedoch diffus, grenzwertig oder diskret erscheinende Unregelmässigkeiten, Solche Inhomogenitäten oder Zonierungen dürfen einerseits nicht übergangen, andererseits auch nicht überbewertet werden. Die Übergänge von einer kaum erkennbaren Inhomogenität zu einer schwach ausgeprägten, aber deutlich fokussierten Bande eines MGUS und weiter zu einer stark ausgeprägten, monoklonalen Bande eines Multiplen Myeloms sind fließend. Entsprechend schwierig kann deshalb die Bewertung „Inhomogen versus Monoklonale Bande“ sein. Oft hilft dann eine Verlaufskontrolle nach wenigen Monaten: In der kalten Jahreszeit sind nicht selten diskrete Zonierungen nachweisbar, die dann wieder verschwinden. Solche „kleinere“ Monoklonale Gammopathien können Ausdruck eines passageren, akuten Virusinfekts sein und haben dann keine prognostische Relevanz. Bei Patienten mit zirkulierenden Immunkomplexen, z.B. im Rahmen einer Autoimmunerkrankung, oder bei immunsuppressiver Therapie kann es ebenfalls zu einzelnen oder auch multiplen, schwierig zu beurteilenden

Zonierungen kommen. Sind mindestens drei verschiedene klonale Proteine betroffen, dann spricht man von einer Oligoklonalität. Diese ist *per se* unspezifisch, sollte aber im unklaren Fall im Verlauf überprüft werden, um eine allfällige Progression eines dieser Klone in ein MGUS nicht zu verpassen.

Quantitative Bestimmung der Freien Leichtketten im Serum (SFLC)

Mittels stark aviden Antisera gegen die „kryptische“ Epitope (rot in Abb. unten) der freien Leichtketten ist es möglich, diese getrennt nach κ - und λ -Isotyp und ohne Kreuzreaktivität mit gebundenen Leichtketten nephelometrisch oder turbidimetrisch zu erfassen. Das Verhältnis der κ/λ -FLC bewegt sich normalerweise in relativ engen Grenzen (0.26–1.65).

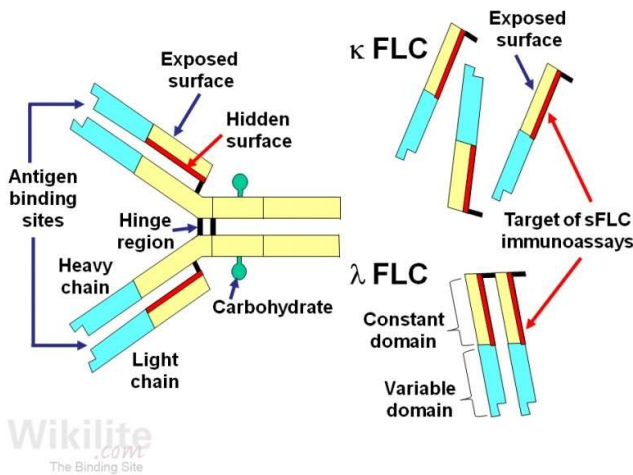


Abb. Links: Schematische Darstellung des „kryptischen“ Epitops (rot) der Leichtketten im intakten Immunglobulin (links) und in freien Leichtkettenmono- und -dimeren (rechts) (1)

Klinische Kernindikationen bestehen insbesondere in den Fällen, in denen die Leichtketten die einzigen sezernierten monoklonalen Proteine darstellen. So wird eine abnorme κ/λ -Ratio in 100 % der Patienten mit einem Leichtkettenmyelom detektiert. Bei anderen neoplastischen Plasmazellkrankheiten ist ebenfalls mit einer deutlichen Verschiebung der Leichtkettenratio als Zeichen der Monoklonalität zu rechnen. Beim therapiebedürftigen Multiplen Myelom gilt eine Konzentration der betroffenen Leichtkette im Serum von ≥ 100 mg/L und ein Verhältnis von involvierter zu unbetelligter Leichtkette von ≥ 100 als eines

der neuen Diagnosekriterien („biomarker of malignancy“) (3). Diagnostisch schwierig sind Abklärungen in Patienten mit geringer monoklonaler Leichtkettenproduktion einerseits und Leichtkettenanstieg bei Niereninsuffizienz sowie insbesondere oligoklonalen, entzündlichen Reaktionen andererseits. In solchen Fällen können die nur grenzwertig oder leicht pathologisch veränderten Leichtkettenverhältnisse überlappen. Aus diesem Grund erscheint die Bestätigung der Monoklonalität bei der Erstdiagnose allein anhand des κ/λ -Verhältnisses als problematisch.

Die eingangs erwähnte Variabilität der M-Proteine bringt es mit sich, dass auch die Messung der SFLC methodisch anspruchsvoll ist und sich Fehler trotz sachgemäsem Vorgehen und stimmiger Qualitätskontrollen unerkannt einschleichen können. Es kann deshalb durchaus angebracht sein, eine abnorme SFLC-Ratio vor dem Einsatz aufwendiger diagnostischer oder therapeutischer Massnahmen durch wiederholte Bestimmung zu einem anderen Zeitpunkt bestätigen zu lassen oder mit dem Labor Rücksprache zu halten.

- (1) Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, Miguel JS, Ludwig H, Hajek R, et al. International myeloma working group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009;23:215–24.
- (2) Willrich MA, Katzmann JA. Laboratory testing requirements for diagnosis and follow-up of multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:907–19
- (3) Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International myeloma working group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014;15:e538–48.

Autor: Dr. Siegfried Stranders

Abteilungsleiter Spezielle Klinische Chemie

Kontakt: T +41 71 494 39 50, siegfried.stranders@zlm.sg.ch

v_2017-10