Gammopathie-Diagnostik

Nachweis monoklonaler Immunglobuline und monoklonaler freier Leichtketten (Bence-Jones-Proteine) in Serum, Urin und bei besonderen Fragestellungen auch im Liquor cerebrospinalis.

Testparameter

- Eiweißelektrophorese (Serum): Screeningtest. Bei begründetem Verdacht auf Plasmazelltumor wegen ungenügender Sensitivität nicht ausreichend.
- Immunfixationselektrophorese (Serum): Nachweis eines monoklonalen Immunglobulins und/oder monoklonaler freier Leichtketten.
- Leichtketten, freie, Bence-Jones-Proteine (Urin): Bewertung des Malignitätsgrades bei pathologischer Immunfixationselektrophorese.

Material

Serum, 1 mL

Urin, 10 mL aus 24 Std.-Sammelurin, Urinvolumen bitte angeben.

Liquor, 1 mL

Referenzbereich Monoklonale Immunglobuline und/oder freie Leichtketten nicht nachweisbar.

Methode IF-ELPHO, RID, NEPH

Qualitätskontrolle siehe Einzelanalysen

Anforderungsschein Download und Analysenposition

Auskünfte Immunchemie

Analysenkosten EBM, GOÄ

Immunpathologie

Monoklonale Gammopathien entstehen durch die Proliferation eines Plasmazellklons, dessen Tochterzellen in Bezug auf Struktur, physikochemische Eigenschaften (isoelektrischer Punkt, elektrophoretische Mobilität) und Antigenspezifität identische Immunglobuline synthetisieren. Bei diesen monoklonalen Proteinen kann es sich um vollständige Immunglobuline mit Leicht- und Schwerketten handeln, die sich außer in ihrer Antigenspezifität nicht von den anderen polyklonalen Immunglobulinen unterscheiden, oder auch nur Teile eines Immunglobulins wie Schwerketten (Schwerkettenerkrankung) oder Leichtketten (Bence-Jones-Proteine, Leichtkettenerkrankung). Mit monoklonalen Gammopathien assoziierte Erkrankungen sind u. a. die monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz (MGUS, siehe Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz), AsmoulderingA multiples Myelom, multiples Myelom (siehe Infobox: Multiples Myelom, Stadieneinteilung), Plasmazell-Leukämie, solitäre medulläre (ossäre) oder extramedulläre Plasmozytome, primäre Amyloidose, Makroglobulinämie Waldenström, Schwerkettenkrankheit, osteosklerotisches Myelom und POEMS-Syndrom (POEMS = Polyneuropathie, Organomegalie, Eosinophilie, monoklonale Gammopathie, Hautläsionen).

Die monoklonale Gammopathie entwickelt sich aus einer Folge von Mutationen, die zu einer immortalisierten und autonomen Plasmazelle führen. Beim multiplen Myelom erfolgen die ersten genetischen Veränderungen wahrscheinlich nach der Differenzierung in langlebige Plasmazellen, die bereits eine V(D)J-Rekombination der IgH- und IgL-Gene, somatische Hypermutationen der variablen IgH- und IgL-Genregionen und eine produktive IgH-Switch-Rekombination zu einem anderen Isotyp (IgG, IgA) vollzogen haben. Mit der konventionellen zytogenetischen Karyotypisierung lassen sich in 30 - 50 %, mit der empfindlicheren FISH-Technik (Fluoreszenz in situ Hybridisierung) in nahezu 100 % der multiplen Myelome Chromosomenanomalien nachweisen. Bereits bei 50 % der MGUS finden sich Aneuploidien. Der Übergang der MGUS zum multiplen Myelom erfolgt nach weiteren Mutationen, die das vom Knochenmarkstroma unabhängige Überleben des malignen Zellklons ermöglichen.

Gammopathie-Diagnostik

Charakteristische Chromosomenaberrationen sind die Monosomie 13, die Trisomien der Chromosomen 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19. In den meisten Myelomzelllinien bestehen Translokationen aus verschiedenen Partnerchromosomen in die IgH-Switch-Region (Chromosom 14q32). Möglicherweise erfolgen die Translokationen auf dem nicht produktiven Allel während der Isotyp-Switch-Rekombination. Diese Translokationen in den IgH-Locus, seltener in den IgL-κ-Locus (Chromosom 2p12) oder IgL-λ-Locus (Chromosom 22q11) können zu einer Dysregulation von Onkogenen führen, wie z. B. von Bcl-1, Cyclin D1 (Chromosom 11q13; t(11;14) (q13;q32)), c-myc (8q24), Bcl-2 (18q21), MLL-1 (11q23), FGFR3 (fibroblast growth factor; 4p16.3 t(4; 14) (p16; q32)). Durch diese Translokation kommt das multiple Myeloma Oncogene 1 (MUM1)/Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4)-Gen unter die Kontrolle des IgH-Gens. Durch die Translokation der Onkogene in den starken, regulatorischen IgH-Locus kommt es zu einer ständigen Aktivierung und zur Immortalisierung der Tumor (Myelom-) -zelle.

Lympho-hämatopoetische Wachstumsfaktoren (IL-6, IL-6Pα, GM-CSF, IFN-α, IL-10 u. a.) und Adhäsionsmoleküle unterstützen die Proliferation und Entwicklung der Tumorzellen im Knochenmark. Das möglicherweise in den Tumoren gebildete IL1β kann das pleiotrope IL-6 stimulieren, welches das Wachstum auch von Plasmozytomzellen fördert (Ras-MPAK-Signalweg). Spätere aktivierende Mutationen von Ras-Genen können zur Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren und zur Unterdrückung der Apoptose führen. Weitere Mutationen (t(14:18), p53-Gen, Rb-Gen (Chromosom 13q12-14)) können ebenfalls die Apoptose unterbinden und zur Autonomie der Tumorzellen beitragen. Die Deletionen im Chromosom 13q14 scheinen wichtige prognostische Marker darzustellen.

Diagnostik

Schwerpunkt der Diagnostik von Plasmazellneoplasien sind proteinchemische Untersuchungen mit qualitativen und quantitativen Analysen der Immunglobuline zum Nachweis einer monoklonalen Gammopathie. Da diese Untersuchungen jedoch keine Unterscheidung von malignen und nicht malignen (MGUS) monoklonalen Gammopathien ermöglichen, sind bei positivem Testausfall ergänzende Untersuchungen zur Beurteilung des Malignitätsgrades, der Tumormasse, der Biologie der proliferierenden Zellen sowie hämatologische Untersuchungen an Knochenmarksbiopsien (Bestimmung des dominierenden Zelltyps (grading), von Wachstumsart und Ausbreitung (staging); Histochemie und Immunhistochemie) und Knochenmarksaspiraten (Immunzytologie, Plasmazell-labelling-Index, Zytogenetik und Molekulargenetik) sowie Untersuchungen mit bildgebenden Verfahren (Röntgen, CT, MRT) zur Beurteilung der Knochenstruktur und der Tumorausbreitung notwendig.

Bei V. a. eine Plasmazellneoplasie sollte auch der Urin untersucht werden, da bei 5 % der multiplen Myelome nur freie Leichtketten (M_r 25 - 50 kDa) sezerniert werden, die bei noch intakter Nierenfunktion vollständig im Urin ausgeschieden werden und daher im Serum nicht nachgewiesen werden können. Die bei über der Hälfte der Patienten mit multiplen Myelomen vorhandene Bence-Jones-Proteinurie gilt als Abgrenzungskriterium gegenüber der MGUS. Ihr Nachweis ist daher von prognostischer Bedeutung.

Eiweißelektrophorese: Die Serumeiweißelektrophorese (Zelluloseacetat- oder Kapillarelektrophorese) ist bei jedem Verdacht auf eine Plasmazellerkrankung indiziert. Verdächtige Allgemeinsymptome sind die Folgen einer Anämie wie Leistungsknick, Abgeschlagenheit, Müdigkeit, seltener finden sich Inappetenz und Gewichtsverlust. Verdächtig sind auch Infektanfälligkeit, schleichend beginnende Knochenschmerzen (rheumatische Beschwerden) und Laborbefunde wie eine stark beschleunigte Blutsenkungsgeschwindigkeit, Anämie, Geldrollenbildung (Blutausstrich), Hyperproteinämie, Kreatinin- und Calciumerhöhung. Eine Bence-Jones-Proteinurie läßt sich mit den üblichen Streifentests nicht erfassen, da diese zwar Albumin aber keine Leichtketten nachweisen.

Gammopathie-Diagnostik

Monoklonale Immunglobuline wandern in der Eiweißelektrophorese wegen des einheitlichen isoelektrischen Punktes der Moleküle gleich schnell und führen zu einer lokalisierten scharfbegrenzten Eiweißbande, die sich als sog. γ-Zacke bzw. als schmalbasiger M-Gradient (M = monoklonal) darstellt. Monoklonale Proteine unter < 1g/L lassen sich mit dieser Technik allerdings nicht mehr eindeutig nachweisen. Der M-Gradient ist meist in der γ-Fraktion lokalisiert, kann aber bei höherer negativer Ladung der Proteine auch in der β-oder α-Fraktion liegen. Falls sich der M-Gradient von den anderen Eiweißfraktionen gut abgrenzen lässt, kann seine Konzentration näherungsweise bestimmt werden. In der Regel werden mit diesem Verfahren bessere Annäherungswerte als mit der nephelometrischen Bestimmung der Immunglobulinfraktion erhalten. Die quantitative Bestimmung des M-Gradienten ist für die individuelle Verlaufskontrolle wichtig. Die Korrelation von Tumormasse und Konzentration des monoklonalen Proteins ist interindividuell wegen des unterschiedlichen Differenzierungsgrades und der unterschiedlichen Sekretionsrate der individuellen Tumoren allerdings schlecht. Plasmazellleukämien und plasmoblastische Myelome weisen häufig eine sehr geringe Paraproteinsynthese auf. Besser geeignet zur Abschätzung der Tumormasse sind das β_2-Mikroglobulin und der histologische Knochenmarksbefund.

Differentialdiagnostisch sind von den M-Gradienten andere schmalbasige Banden abzugrenzen, die z.B. durch Fibrinogen (βγ-Bereich), Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexe (α_2), hohe Transferrinkonzentrationen (αβ) oder bei nephrotischem Syndrom (α_2-β), Akute-Phase-Reaktionen und Hyperlipoproteinämien (α_2) und artefiziellen Blutungen (β) auftreten können.

Immunfixationselektrophorese: Bei Nachweis einer atypischen Bande in der Eiweißelektrophorese oder bei einem anders begründetem Verdacht auf eine Plasmazellneoplasie sollte auch bei normaler Eiweißelektrophorese (z. B. bei geringer Konzentration des monoklonalen Proteins, Immunglobulin-Mangel im hohen Lebensalter), eine Immunfixationselektrophorese durchgeführt werden. Als Suchtest genügt in der Regel eine Untersuchung mit polyvalenten Antiseren, die simultan die Fc-Fragmente von IgG, IgA und IgM sowie κ- und λ- Ketten erkennen. Stellt sich eine monoklonale Bande dar, wird mit monospezifischen Antiseren der Typ des M-Proteins bestimmt. Finden sich nur monoklonale Leichtketten, muss ein seltenes monoklonales IgD oder IgE ausgeschlossen werden (auch quantitative IgD- und IgE-Bestimmung).

Am häufigsten lassen sich monoklonale Gammopathien vom Isotyp IgG (60 %), gefolgt von IgA (18 %) und IgM (14 %) nachweisen. Ausschließlich Bence-Jones-Proteine finden sich in 5 - 6 % der Fälle, biklonale Gammopathien (2 %) und IgD- (0,3 %) oder IgE- (< 0,1 %) sowie Schwerketten-Gammopathien sind selten.

Monoklonale Immunglobuline in höherer Konzentration sind zwar richtungsweisend, jedoch nicht beweisend für eine Plasmazellneoplasie. Abhängig vom Lebensalter werden in steigendem Prozentsatz auch monoklonale Gammopathien, die als MGUS einzuordnen sind, gefunden. Die MGUS ist durch eine niedrige Konzentration des monoklonalen Immunglobulins, durch niedriges β_2-Mikroglobulin, niedrigen Plasmazell-labelling-Index, ein fehlendes Antikörper-Mangel-Syndrom und eine nur minimale Bence-Jones-Proteinurie (< 0,2 - 0,4 g/L) gekennzeichnet. Da die Immunfixationselektrophorese 10-fach empfindlicher ist als die früher gebräuchliche Immunelektrophorese (Nachweisgrenze monoklonaler Proteine 0,05 g/L), werden heute mehr Gammopathien, häufiger auch bi- und triklonale Gammopathien mit unterschiedlichen Schwer- und Leichtkettentypen nachgewiesen, von denen differentialdiagnostisch oligoklonale Gammopathien abgegrenzt werden müssen.

Zum Nachweis einer Schwerkettengammopathie wird ebenfalls die Immunfixationselektrophorese eingesetzt. Hier fehlt beim Nachweis einer monoklonalen Schwerkette das Signal einer monoklonalen Leichtkette mit gleichem elektrophoretischem Laufverhalten. Bei der Schwerketten-Krankheit, einer Variante des multiplen Myeloms werden ausschließlich Immunglobulin-

Gammopathie-Diagnostik

Schwerketten vom α-, γ- oder μ-Typ synthetisiert. Der α-Typ (Eidelman-Seligmann-Syndrom) stellt die häufigste Form der Schwerketten-Krankheit vor allem im Mittelmeerraum dar (Befall des Dünndarms, Durchfälle, Malabsorptionssyndrome). Weniger häufig ist die γ-Schwerketten-Krankheit (Franklin-Syndrom; generalisierte Erkrankung älterer Menschen, Lymphknotenschwellungen, Splenomegalie, Knochenmarkinfiltration mit lymphoplasmozytischen Zellen, autoimmunhämolytische Anämie, rheumatoide Arthritis), am seltensten der μ-Typ (lymphoproliferative Neoplasie, auch Manifestation als ALL).

Quantitative Bestimmung der Immunglobuline und freien Leichtketten: Die quantitative Bestimmung der Immunglobuline (IgG, IgA, IgM, gegebenenfalls auch von IgD und IgE) dient der Abschätzung der Konzentrationen des monoklonalen Proteins (siehe oben) und der Beurteilung der Konzentration der restlichen polyklonalen Immunglobuline. Die monoklonalen Immunglobuline werden mit den konventionellen Methoden oft zu hoch gemessen. Schwieriger ist die genaue Bestimmung der Konzentration freier Leichtketten, da hierzu Antiseren notwendig werden, die nicht mit den an Schwerketten gebundenen Leichtketten normaler Immunglobuline kreuzreagieren dürfen. Auch bei den nichtsekretorischen Plasmazellneoplasien (multiples Myelom, Leichtkettenamyloidose) sind mit empfindlichen Methoden vielfach im Serum noch Spuren monoklonaler Leichtketten nachzuweisen, die sich mit der Immunfixationselektrophorese nicht darstellen lassen.

Plasmazell-Labeling-Index: Mit dem Plasmazell-Labeling-Index (PCLI) wird die Proliferationsrate monoklonaler Plasmazellen im Knochenmark oder auch im peripheren Blut angegeben. Er dient der differentialdiagnostischen Abgrenzung eines aktiven multiplen Myeloms von der MGUS oder dem smouldering multiplen Myelom, dem Nachweis des Übergangs aus einer stationären Phase in eine Phase der Progression und der Abschätzung der Krankheitsprognose. Das Testprinzip beruht darauf, dass Zellen in der S-Phase das Thymidinanalogon Bromdesoxyuridin (BrdU) einbauen, das mit markierten monoklonalen Antikörpern nachgewiesen werden kann. Die monoklonalen Plasmazellen selbst werden mit Antikörpern gegen κ- oder λ-Ketten ($\kappa/\lambda > 5$ oder $< 0{,}5$), den Antikörpern gegen CD38 und CD138 sowie anhand ihrer Morphologie identifiziert. Der Anteil der in der S-Phase befindlichen (proliferierenden) Zellen wird in % angegeben. Die Referenzbereiche des PCLI liegen bei < 0,8 %, deutlich erhöhte Werte bei progredientem Verlauf betragen > 2 %. Auch bei Werten im Referenzbereich kann ein aktives multiples Myelom bestehen.

β_2-Mikroglobulin ist die Leichtkette der HLA-Klasse I-Antigene, die zwar auf nahezu allen Zelltypen, in besonderer Dichte aber auf Lymphozyten exprimiert werden. Die Plasmakonzentration des 11,8 kDa großen Proteins hängt von dem Umsatz der Lymphozyten und von seiner renalen Elimination ab. Falls interkurrierende Infektionen ausgeschlossen werden, ist es als Tumormarker (Tumormasse, Prognose) für das multiple Myelom geeignet. Bei Konzentrationen von über 3,0 mg/L ist die Überlebenszeit bereits erheblich reduziert. Die aktuelle Nierenfunktion muss in solche Überlegungen mit einbezogen werden, da bei gestörter Eliminationsrate die Konzentration im Serum überproportional ansteigt und eine größere Tumormasse vortäuscht.

Blutbild: Das Blutbild gibt Hinweise auf den Knochenmarkstatus. Eine schwere Anämie ist ein prognostisch ungünstiges Zeichen. Leukopenie und Antikörpermangel erhöhen die Infektanfälligkeit. Thrombopenien verursachen Blutungen. Bei Übergang in eine Plasmazellleukämie steigt die Zahl der Plasmazellen im peripheren Blut auf > 2.000 Plasmazellen/μL. Bei morphologischer Entdifferenzierung der Zellen empfiehlt sich die immunzytologische Charakterisierung der lymphatischen Zellen ($CD138^+/CD38^+$). Die Monoklonalität lässt sich durch den λ/κ-Ketten-Quotienten nachweisen.

Urinproteinanalyse: Sie dient dem Nachweis einer Tubulusschädigung. Bei fortgeschrittenem Nierenschaden findet sich auch eine glomeruläre Proteinurie. Bei abnehmender glomeru-

Gammopathie-Diagnostik

lärer Filtration geht auch die Ausscheidung von Bence-Jones-Proteinen zurück, ihre Konzentration im Blut steigt an. Bei Amyloidosen besteht oft ein Missverhältnis zwischen der ausgeprägten Proteinurie und einer nur geringen Bence-Jones-Proteinurie.

Viskosität: Die Bestimmung der Plasmaviskosität dient dem Nachweis und der Verlaufsbeurteilung eines Hyperviskositäts-Syndroms (Morbus Waldenström, selten bei multiplem Myelom), das auch durch eine gleichzeitige Zytopenie kompensiert werden kann.

Kryoglobuline: Kälteabhängige Hautläsionen und Durchblutungsstörungen können bei multiplem Myelom und Makroglobulinämie Waldenström auf eine Kryoglobulinämie Typ I (monoklonale Immunglobuline) oder Typ II (gemischte monoklonale und polyklonale Kryoglobulinämie) hinweisen (siehe Kryoglobuline).

Calcium: Eine Hypercalcämie manifestiert sich im Gefolge von Osteolysen. Zu berücksichtigen ist die erhöhte Konzentration des Gesamtproteins, da 50 % des Ca^{2+} bei normalem pH an Proteine gebunden werden. Gegebenenfalls Bestimmung des ionisierten Calcium oder rechnerische Korrektur.

Autoantikörper: Bei paraproteinämischen peripheren Polyneuropathien können Antikörper gegen myelinassoziiertes Glykoprotein (MAG), peripheres Nervenmyelin oder Ganglioside auftreten. Die Untergruppe der MAG-assoziierten IgM-Gammopathie geht mit schweren Neuropathien einher (siehe: Myelin assoziiertes Glykoprotein-Autoantikörper, Gangliosid-Autoantikörper).

Immunzytologie: Untersuchungen des peripheren Blutes oder von Knochenmarksaspiraten zur differentialdiagnostischen Abgrenzung von multiplem Myelom und anderen mit einer monoklonalen Gammopathie assoziierten Non-Hodgkin-Lymphomen und reaktiven polyklonalen Plasmozytosen (Infektionen, Entzündungen, maligne epitheliale Tumoren, Morbus Hodgkin).

Zytogenetik: Nachweis von Chromosomenaberrationen im Rahmen von klinischen Studien. Für den Einzelfall noch wenig aussagekräftig. Die technischen Schwierigkeiten bei konventioneller Zytogenetik (langsame Plasmazellproliferation) können mit der FISH-Technik kompensiert werden. Mit chromosomspezifischen Zentromer-Sonden und locusspezifischen Sonden lassen sich bei bis zu 97 % der Patienten Chromosomenaberration nachweisen. Allgemein haben Patienten mit aberrantem Karyotyp eine kürzere Überlebenszeit. Die häufigsten Aberrationen betreffen das Chromosom 13 (Monosomie-Deletion des langen Arms oder dem Bereich 13q14), das Chromosom 14 und 11 (Bereich 14q32 und 11q13-q23).

H.-P. Seelig