

# Potenzial, Fallstricke und aktueller Status der molekularen Diagnostik am Beispiel der Insektengiftallergie

EDZARD SPILLNER<sup>1</sup>, SIMON BLANK<sup>1</sup>, THILO JAKOB<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Hamburg; <sup>2</sup>Allergieabteilung und Forschergruppe Allergologie, Universitäts-Hautklinik, Universitätsklinikum Freiburg

## Zusammenfassung

Die molekulare Allergiediagnostik ist in den letzten Jahren von einem weitestgehend akademischen Steckenpferd zu einem essenziellen Werkzeug der modernen Diagnostik gereift. So konnte in vielen Bereichen die Diagnostik auf der Basis des klassischen Extrakts, üblicherweise eines hochkomplexen Cocktails unterschiedlichster Moleküle, um eine Vielzahl seiner Einzelallergene erweitert werden, die eine Analyse wesentlich verlässlicher, aber auch ungleich vielschichtiger machen. In wenigen Gebieten tritt dabei der Fortschritt so klar zutage wie im Bereich der Hymenoptereingiftallergien.

Hymenoptereingiftallergien gehören aufgrund des hohen Risikos anaphylaktischer Reaktionen mit möglicherweise fatalen Folgen zu den schwersten Hypersensibilitäten. In Westeuropa gilt dies insbesondere für die Allergien auf die Gifte der Honigbiene und der gemeinen Wespe. Obgleich für eine

Vielzahl von Allergenquellen die Zusammensetzung im Detail geklärt werden konnte, waren für Hymenoptereingifte lange Zeit lediglich Major-Allergene charakterisiert.

Heutzutage ist eine deutlich größere Anzahl von Allergenen identifiziert und hinsichtlich ihrer Funktion, ihrer Natur und ihres allergenen Potenzials charakterisiert. Zudem erlauben fortschrittlichere Expressionsstrategien für die rekombinante Produktion von Giftallergenen eine Modifikation der Moleküle und versprechen damit Einblicke in unterschiedliche Arten der IgE-Reaktivität und des Sensibilisierungsmusters.

Damit kann das Wissen um die Allergene im Cocktail des Hymenoptereingifts und ihre molekulare Nutzung helfen, die Diagnostik zu verbessern und Instrumente zur Evaluierung und Optimierung therapeutischer Strategien bereitstellen.

**Perspectives, pitfalls and current status of molecular diagnosis in insect venom allergy**

**Schlüsselwörter**  
Allergenkomponenten – Allergie – Insektengift – Kreuzreaktivität – rekombinante Allergene – Sensibilisierung

## Summary

Molecular approaches in allergy diagnosis in the last years evolved from a merely academic exercise to an essential tool in modern diagnostics. Thereby, the classical diagnostics based on crude extracts, mostly a complex cocktail of a variety of different molecules, could be broadened by a plethora of single components rendering an analysis much more reliable, but also much more complex. In few areas the advancement is as evident as in hymenoptera venom allergy.

Hymenoptera venom allergy is one of the most severe hypersensitivities with regard to the high risk of anaphylactic conditions with potential fatal outcome. In Western Europe this relates primarily to allergies to venoms of the honeybee and the common yellow jacket. Although the composition of

allergenic extracts has been resolved for a plethora of allergen sources in detail, only major allergens of hymenoptera venoms had been characterized.

Today an increasing number of allergens is identified, characterized regarding function and nature and assessed for allergenic potential. Moreover, advanced expression strategies for recombinant production of venom allergens allow for modification of the molecules and provide insight into different types of IgE reactivities and sensitization pattern.

The obtained knowledge about the allergens in hymenoptera venom cocktails and their molecular use can help to improve current diagnostics for hymenoptera venom allergy and serve as tools for reevaluation and improvement of current therapeutic strategies.

## Key words

Allergen components – allergy – cross-reactivity – insect venom – recombinant allergens – sensitization

## Eingang/Submitted

20. Februar 2012

## Annahme/Accepted

28. März 2012

### Verwendete Abkürzungen

BAT	Basophilenaktivierungstest
CCD	Cross-reactive carbohydrate determinants
CRP	Kohlenhydratreiches Protein
DPP IV	Dipeptidylpeptidase IV
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Fuk	Fukose
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
HRP	Meerrettichperoxidase
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
Man	Mannose
MRJP	Major royal jelly Protein
MUXF	Bromelain
MW	Molecular weight
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDGF	Platelet derived growth factor
sIgE	Spezifisches Immunglobulin E
TG	Trockengewicht
VEGF	Vascular endothelial growth factor

### Extrakte und Allergene

Die heutige Allergiediagnostik ist geprägt durch einen dramatischen Anstieg von Wissen und eine zunehmende Verfügbarkeit von Einzelallergenen, welche noch vor einer Dekade als solche nicht vorhersehbar war. Oftmals als Gegenpol zur klassischen, extraktbasierten Diagnostik verstanden, ist die molekulare Diagnostik heute eine Option, um auf der Basis des extraktbasierten Wissens detailliertere Informationen zu gewinnen und diese für den individuellen Patienten zu nutzen.

Gleichzeitig stellt die aktuelle Situation mit einer Vielzahl von natürlichen, aber auch rekombinanten Allergenen lediglich eine Momentaufnahme dar, die den Wissensstand und die technischen Möglichkeiten der letzten Jahre widerspiegelt. Das Verhältnis von extrakt- zu einzelallergenbasierten Ansätzen dürfte sich in der Zukunft weiter zugunsten der molekularen Diagnostik verschieben, da der Erkenntnisgewinn auf molekularer Ebene die Waagschale stetig mit neuen und interessanten Molekülen füllt.

Eine simplifizierte, aber exemplarische Quintessenz der molekularen Diagnostik gewährt z. B. der Allergen-Chip ImmunoCAP® ISAC (Thermo Scientific), der eine Fülle von Allergenen für die molekulare Diagnostik trägt. In der aktuell erhältlichen Version mit 112 Allergenen sind 50 % der Allergene rekombinanten Ursprungs und 50 % nativen Ursprungs. Extrakte hingegen sind nicht vertreten. Für die proteom-biochemisch problematischen Insektengifte sind hier lediglich vier Allergene präsent.

Generell repräsentiert die Insektengiftallergie eine der schwersten Hypersensitivitätsreaktionen und ist

mit einer hohen Anaphylaxierate assoziiert. Das Vorkommen tödlicher Reaktionen macht Hymenoptergifte deutlich vor anderen Toxinen aus dem Tierreich zu den für den Menschen bedrohlichsten Giften überhaupt. Trotz dieser Datenlage ist die Natur bekannter und neuer Komponenten nicht geklärt. Zudem sind Methoden zu ihrer rekombinanten Produktion, ihrer posttranslationalen Definition und Implementierung in moderne diagnostische Verfahren nach wie vor nicht adäquat realisiert. Die Nutzung von krudem Gift für Diagnostik und Therapie von Insektengift-hypersensitivitäten ist zudem mit signifikanten Nachteilen assoziiert, die auf der Vernachlässigung der Zusammensetzung der Gifte und der Relevanz von Minor-Allergenen für die Pathogenese, das klinische Erscheinungsbild, die Diagnose und die therapeutische Effizienz beruhen.

Klassisch werden zur Diagnostik (und Therapie) aufgearbeitete Rohgifte eingesetzt, die durch unterschiedliche mechanische und manuelle Verfahren isoliert werden. Parallel zu diesen klassischen Extrakten wurden schon seit einiger Zeit gereinigte Allergene wie das native Api m 1 für eine molekulare Diagnostik eingesetzt, was aber weniger eine molekulare als eine Surrogatstrategie darstellt. Eine praktikable Komponentenauflösung lässt sich auch durch Separation der natürlichen Komponenten, z. B. durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)-Verfahren realisieren (wie das ehem. AlaBLOT™-System, Siemens Healthcare Diagnostics). Hierbei ist jedoch zu bedenken, dass eine Interpretation nur bekannte Proteine einschließen kann und Überlagerungen durch unbekannte Vertreter nicht verlässlich vermieden werden können.

### Hymenoptereingiftallergene

Die generelle Problematik solcher Ansätze lässt sich idealerweise durch die Betrachtung der allergologisch relevanten Giftkomponenten der Honigbiene (*Apis mellifera*) und der gemeinen Wespe (*Vespa vulgaris*), den hierzulande entscheidenden Hymenopterspezies, verdeutlichen, wie sie heute bekannt bzw. in den Allergendatenbanken vertreten sind (Tabelle 1).

Die am besten bekannten Bienengiftallergene umfassen die Phospholipase A2 (Api m 1), die Hyaluronidase (Api m 2) und das aus 26 Aminosäuren bestehende basische Peptid Melittin (Api m 4) [2], die mit 12 %, 2 % und 50 % des Trockengewichts Proteine mittlerer bis hoher Konzentration darstellen [26]. Klassische Allergene des Wespengifts sind die Phospholipase A1 (Ves v 1), die Hyaluronidase (Ves v 2) und das Antigen 5 (Ves v 5) [22], dem bisher keine Funktion zugeordnet werden konnte.

In den letzten Jahren wurden jedoch signifikante Fortschritte bei der Identifizierung neuer, oft gering konzentrierter Moleküle gemacht, denen wiederum zum Teil schon lange allergenes Potenzial zugeordnet

werden konnte. So konnte das Gen der sauren Phosphatase des Bienengifts (Api m 3) identifiziert und das Protein rekombinant hergestellt werden [2, 11]. Mit der Identifizierung des 100-kDa-Allergen-C (Api m 5) des Bienengifts sowie seines Homologs im Wespengift, Ves v 3, als Dipeptidylpeptidasen IV konnte eine neue Klasse von Hymenopterengiftenzymen beschrieben werden [3, 14]. Im Wespengift wurde zusätzlich zur klassischen Hyaluronidase (Ves v 2.0101) eine inaktive Isoform (Ves v 2.0201) identifiziert [24], die eine inaktivierende Mutation im aktiven Zentrum aufweist und die dominierende Isoform im Gift zu sein scheint. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es sich bei Api m 10 (kohlenhydratreiches Protein, Icarapin) um ein neues Major-Allergen des Bienengifts sowie ein Allergen mit möglicherweise großer Bedeutung für diagnostische und therapeutische Anwendungen handelt [5]. Andere Immunglobulin-E(IgE)-bindende Proteine des Bienengifts umfassen einen putativen Proteaseninhibitor (Api m 6) [21], eine Protease (Api m 7) [37], eine Esterase (Api m 8) und eine Peptidase (Api m 9), deren Relevanz Gegenstand derzeitiger Untersuchungen ist. Als neueste Allergene sind u. a. die zwei „Major royal jelly“-Proteine (MRJP) 8 und 9 (zwei Isoformen des Api m 11) des Bienengifts [6] sowie als neue Panallergene das Vitellogenine, Api m 12 und Ves v 6 (Manuskript eingereicht), zu nennen.

An dieser Stelle sei auch erwähnt, dass nahezu alle und insbesondere die neueren Allergene Glykoproteine sind, die eigene Schwierigkeiten mit sich bringen.

Neben diesen Komponenten mit dokumentierter allergener Natur konnten in jüngster Zeit einige weitere Komponenten wie z. B. ein C1q-ähnliches Protein [10], ein PDGF/VEGF („platelet derived growth factor/vascular endothelial growth factor“)-ähnliches Protein [30] und Hexamerin [31] identifiziert werden, deren allergene Natur jedoch noch zu evaluieren bleibt. Ihr geringer Anteil am Gift wird auch hier eine rekombinante Zugänglichkeit erfordern.

Dank der zunehmenden Anwendung proteomischer und genomischer Ansätze ist für die Zukunft mit Sicherheit davon auszugehen, dass die Zahl relevanter identifizierter Allergene in Hymenopterengiften signifikant ansteigen wird. Welche Anzahl und insbesondere welche konkreten Allergene für eine molekulare Diagnostik essenziell und sinnvoll sein werden – speziell die speziesspezifischen oder eher anhand ihrer IgE-Reaktivität ausgewählten Vertreter – und in welcher Form sie zum Einsatz kommen sollten, ist zum jetzigen Zeitpunkt allerdings noch nicht abzusehen.

### **Anfänge der molekularen Diagnostik der Hymenopterengiftallergie**

Bis in jüngste Zeit war nur eine außerordentlich stark begrenzte Anzahl von Giftallergenen, so z. B. Api m 1, Api m 4 und Ves v 5 als native oder re-

kombinante Äquivalente verfügbar [23, 28]. Ihre Nutzung und damit die gegebene Möglichkeit, Analysen auf molekularer Ebene zu realisieren, brachten eine gewisse Verbesserung der Diagnostik mit sich [17, 27].

Prinzipiell gelten jedoch für die Isolierung bzw. Herstellung von Giftallergenen grundsätzliche Probleme und Erwägungen. Eine Reinigung nativer Proteine aus dem Gift ist, wenn überhaupt, nur für ausreichend vorhandene Proteine sinnvoll (Api m 1, Api m 4, Ves v 1, Ves v 5). Dennoch ist gerade hier das Risiko verbleibender Komponenten, die das Bild auf molekularer Ebene verfälschen, gegeben. So ist z. B. eine Abtrennung von Api m 4 als dominante Komponente des Bienengifts schwierig.

Bei einer rekombinanten Expression besteht dieses Problem nicht; Schwierigkeiten liegen vielmehr in einer adäquaten Umsetzung der Produktion. Für erste Expressionen von Insektengiftallergenen wurde auf das bakterielle Expressionssystem zurückgegriffen, das sicherlich dafür prädestiniert ist, einfach und schnell große Mengen an Protein zu erhalten. Allerdings gilt es, neben einer effizienten Produktion authentische Faltung und Immunoreaktivität der Allergene zu gewährleisten. Ihre toxischen Eigenschaften und enzymatischen Aktivitäten beeinflussen jedoch die Effizienz der Expression und die Eigenschaften der resultierenden rekombinanten Allergene. Dennoch konnten ausgewählte Insektengiftallergene, meist für strukturelle Analysen, funktionell in Bakterien produziert werden (**Tabelle 1**) [8, 9, 13, 25, 35, 36]. Die Effizienz dieser Verfahren ist jedoch häufig durch die Notwendigkeit extensiver Faltungsschritte beeinträchtigt und die Anwendung auf strukturell vergleichsweise einfache und kleine Moleküle beschränkt.

Insgesamt gilt, dass eine Reinigung nur bedingt und eine bakterielle Expression nur für wenige, bevorzugt nicht glykosylierte Allergene niederen Molekulargewichts sinnvoll ist.

### **Rekombinante Allergene aus Eukaryoten**

Eukaryotische Zellen wachsen langsamer und mit geringeren Proteinausbeuten, hinterlassen jedoch auf dem Protein unveränderliche Spuren in Form posttranslationaler Modifikationen. Im Gegensatz zu *Escherichia (E.) coli* addieren Eukaryoten wie Hefen und insbesondere auch Insektenzellen und Säugerzellen Oligosaccharide, die bei ähnlicher Grundstruktur dem nativen, glykosylierten Allergen näher kommen, aber dennoch deutliche Varianzen aufweisen und neben der Faltung auch die Immunoreaktivität beeinflussen [36]. Da die meisten IgE-Epitope konformationeller Natur zu sein scheinen und eine intakte Oberfläche voraussetzen, ist diese Art der Allergenexpression für diagnostische Zwecke vorzuziehen, da für die Ausbildung der korrekten dreidimensio-

Tabelle 1

Übersicht über die bekannten Bienengift- und Wespengiftallergene <sup>a</sup>							
Allergen	Name/Funktion	MW (kDa)	% TG	potenzielle N-Glykosylierung	bakterielle Expression	eukaryotische Expression	BAT
<b>Bienengiftallergene</b>							
Api m 1	Phospholipase A2	17	12	1	+	+	+
Api m 2 <sup>c</sup>	Hyaluronidase	45	2	3	+	+	+
Api m 3	Saure Phosphatase	49	1–2	2		+	+
Api m 4	Melittin	3	50	-		-	
Api m 5 <sup>d</sup>	Allergen C/DPP IV	100	<1	6		+	+
Api m 6	Proteaseinhibitor	8	1–2	-		+	
Api m 7 <sup>f</sup>	Protease	39	?	3		+	
Api m 8	Carboxylesterase	70	?	4		+	
Api m 9	Carboxypeptidase	60	?	4		+	
Api m 10	CRP/Icarapin	55	<1	2	+	+	+
Api m 11.0101	MRJP 8	65	?	6		+	
Api m 11.0201	MRJP 9	60	?	3		+	
Api m 12 <sup>e</sup>	Vitellogenin	200	?	1		+	
<b>Wespengiftallergene</b>							
Ves v 1	Phospholipase A1	35	6–14	-		+	+
Ves v 2.0101 <sup>c</sup>	Hyaluronidase	45	1–3	4	+	+	
Ves v 2.0201 <sup>c</sup>	Hyaluronidase <sup>b</sup>	45	?	2		+	
Ves v 3 <sup>d</sup>	DPP IV	100	?	6		+	+
Ves v 5	Antigen 5	25	5–10	-	+	+	+
Ves v 6 <sup>e</sup>	Vitellogenin	200	?	4		+	

BAT: Basophilenaktivierungstest; CRP: Carbohydrate-rich protein; DPP IV: Dipeptidylpeptidase IV; MRJP: Major royal jelly protein; MW: Molecular weight; TG: Trockengewicht  
<sup>a</sup>Speziesspezifische Allergene sind in Standardschrift und bekannte kreuzreaktive Allergene kursiv dargestellt. <sup>b</sup>inaktiv; <sup>c,d,e</sup>kreuzreaktive Allergene; <sup>f</sup>Eine homologe Protease im Wespengift sowie weitere Proteasen im Bienengift wurden identifiziert, die aber noch nicht als Allergene beschrieben sind.

nenalen Struktur vieler eukaryotischer Proteine posttranslationale Modifikationen essenziell sind.

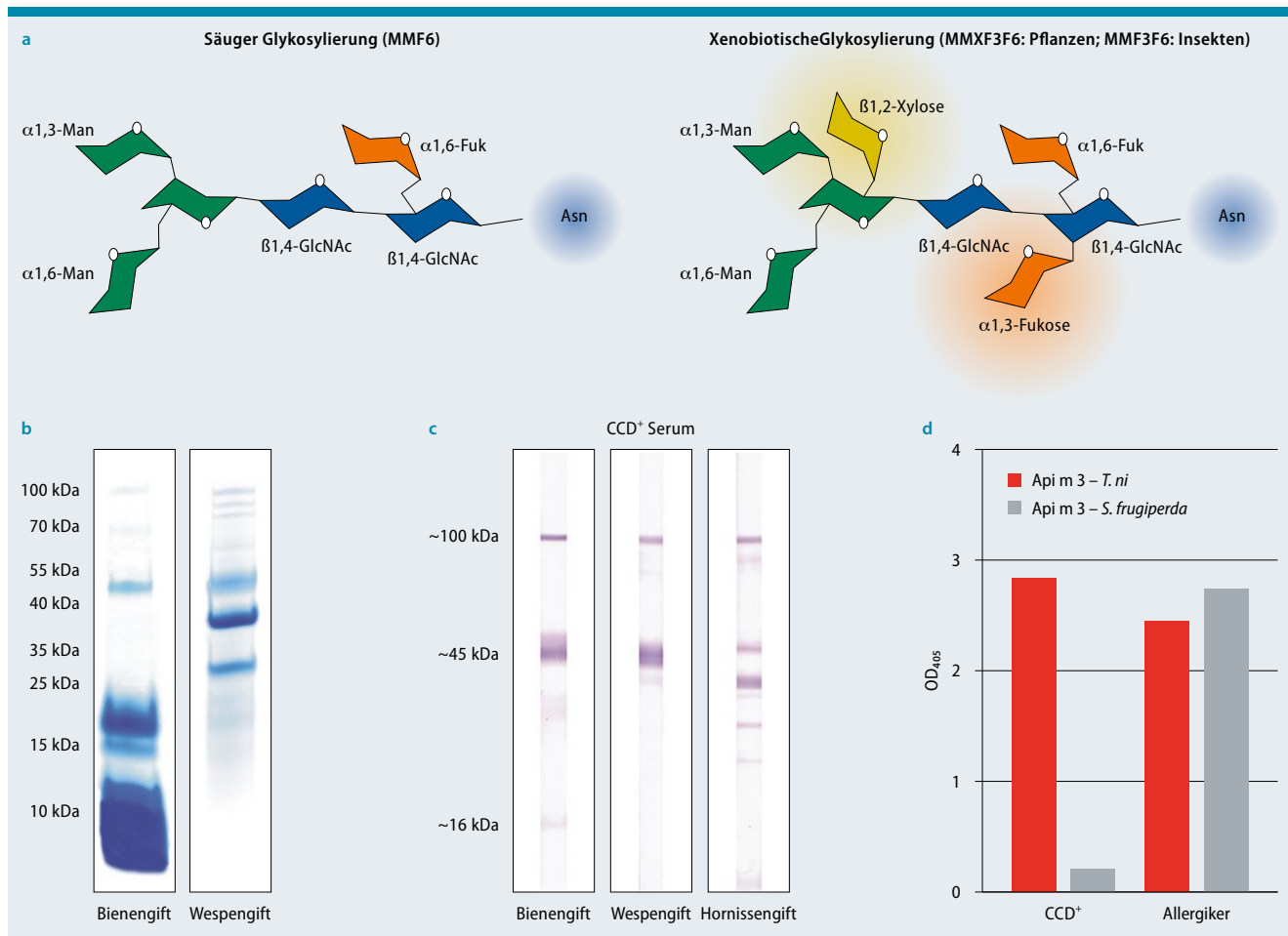
Obgleich früh erkannt [36], konnten in den letzten Jahren für Insektengiftallergene insbesondere die Expression in Insektenzellen als geeignetes System etabliert und die Funktionalität der Proteine, die Epitopauthentizität und die korrekte Faltung resultierender Proteine demonstriert werden (Tabelle 1) [3, 32, 36]. Als ein Indiz für letztere kann die enzymatische Aktivität (sofern vorhanden) angesehen werden, wie sie für in Insektenzellen produzierte Phospholipase A1 (Ves v 1) [33], Hyaluronidasen (Api m 2, Ves v 2) [32, 36] und Dipeptidylpeptidasen IV (Api m 5, Ves v 3) [3] nachgewiesen werden konnte.

Als weiteres Beispiel für die Stärke rekombinanter Verfahren kann hier wiederum das Api m 1 angeführt werden. In der Natur als Gemisch mehrerer Glykoformen vorliegend, zeigt eine Expression von Api m 1 in *E. coli* ein vollständig homogenes Protein. Eine Expression in Eukaryoten zeigt ein heterogenes Gemisch von auch natürlich vorliegenden

Glykoformen, die bei Bedarf gezielt produziert werden können [4]. Eine Deletion der Glykosylierungsposition führt hier erneut zu einem homogenen Protein. Unterschiedliche Varianten dieser Formen sind oder werden kommerziell verfügbar sein; welche Variante ein optimales Äquivalent des nativen Allergens darstellt, liegt in der klinischen Fragestellung begründet.

### Molekulare Diagnostik zur Abgrenzung von Doppelsensibilisierungen

Neben einer echten Doppelsensibilisierung gegen Bienen- und Wespengift können in der extraktbasierten In-vitro-Allergiediagnostik Kreuzreaktivitäten zu falsch-positiven Testergebnissen führen. Dieses Phänomen kann zum einen auf gemeinsamen Proteinepitopen homologer Allergene beider Gifte beruhen, wie für die Hyaluronidasen (Api m 2, Ves v 2) und Dipeptidylpeptidasen (Api m 5, Ves v 3) beschrieben und wahrscheinlich für die neu identifizierten 200-kDa-Allergene (Api m 12, Ves v 6),



**Abb. 1:** Kreuzreaktive Kohlenhydratdeterminanten (CCD) im Bienen- und Wespengift und ihr Einfluss auf sIgE-Reaktivitäten. **a:** Vereinfachte, exemplarische Darstellung der „Core“-Glykosylierung von Säugern wie dem Menschen im Vergleich zu xenobiotischer Glykosylierung von Insekten und Pflanzen. Diese trägt einen zusätzlichen  $\alpha$ 1,3-verknüpften Fukoserest sowie bei Pflanzen einen  $\beta$ 1,2-verknüpften Xyloserest (GlcNAc: N-Acetylglucosamin; Man: Mannose; Fuk: Fukose). **b:** Stark varierte Verteilung von hoch und gering vorkommenden Komponenten des Bienen- und Wespengifts in einer gelelektrophoretischen Analyse. **c:** Exemplarische sIgE-Reaktivität eines CCD („cross-reactive carbohydrate determinants“)-positiven Serums mit Bienen-, Wespen- und Hornissengift im Immunoblot. **d:** sIgE-Reaktivität eines CCD-positiven Serums und dem Serum eines Bienengift-Allergikers mit rekombinanten Api m 3 aus *Spodoptera frugiperda* und *Trichoplusia (T.) ni* Insektenzellen im ELISA („enzyme linked immunosorbent assay“). Im Gegensatz zur ausgeprägten CCD-Reaktivität von in *T. ni* Insektenzellen hergestelltem Api m 3 ist diese bei in Sf9-Zellen hergestelltem Api m 3 immunologisch nicht nachweisbar.

die in beiden Giften vorkommen. Zum anderen kann jedoch ein Großteil der Kreuzreakтивitäten auf IgE-Antikörper zurückgeführt werden, die gegen kreuzreaktive Glykosylierungen („cross-reactive carbohydrate determinants“, CCD) der Allergene gerichtet sind [1, 12, 18]. Dies ist von besonderer Bedeutung, da die meisten Bienen- und Wespengiftallergene Glykoproteine mit einer bis mehrerer solcher Kohlenhydratstrukturen darstellen (**Tabelle 1**).

Verantwortlich sind IgE-Antikörper gegen einen  $\alpha$ 1,3-verknüpften Fukoserest der insektenspezifischen (bei Pflanzen auch gegen  $\beta$ 1,2-Xylose) Glykosylierung (**Abb. 1a**). Solche xenobiotischen Modifikationen stellen hoch immunogene Epitope dar, die sowohl

spezifische Immunglobulin G(IgG)- als auch IgE-Antikörper induzieren können [19].

Gegen das Fukoseepitop gerichtete IgE-Antikörper sind für etwa 75% der in In-vitro-Tests diagnostizierten Doppelsensibilisierungen gegen Bienen- und Wespengift verantwortlich [18], was die Wahl der geeigneten therapeutischen Intervention in vielen Fällen erschwert. Die klinische Relevanz derartiger IgE-Antikörper wird kontrovers diskutiert, scheint aber im Fall der Insektengiftallergie gering zu sein. Nichtsdestoweniger haben schwere anaphylaktische Reaktionen gegen das  $\alpha$ -Gal-Epitop (Galaktose- $\alpha$ 1,3-Galaktose) bei Gabe des therapeutischen Antikörpers Cetuximab (Erbitux<sup>®</sup>) [7] und bei Allergien gegen rotes Fleisch gezeigt, dass

Tabelle 2

Beispiele für sIgE-Reaktivitätsprofile der extrakt- und allergenbasierten Diagnostik der Insektengiftallergie							
Diagnostik	Patienten sIgE						
	1	2	3	4	5	6	7
<b>Extrakt-basiert</b>							
BG	+	+	+	+	+	+	-
WG	+	+	+	+	-	+	-
<b>Allergen-basiert</b>							
Api m 1	+	-	-	+	-	+	-
Api m 2	-	+	-	+	+	+	-
Api m 3	+	-	-	+	-	+	+
Api m 4	+	-	-	-	+	+	-
Api m 5	-	-	-	+	-	+	-
Api m 10	+	+	-	+	+	+	+
Ves v 1	-	-	+	+	-	+	-
Ves v 5	-	-	+	+	-	+	-
CCD	+	+	+	+	-	+	-
Relevantes Insekt	B	B	W	B/W	B	B/W	B

*B: Biene; BG: Bienengift; sIgE: spezifisches Immunglobulin E; W: Wespe; WG: Wespengift*

Kohlenhydratstrukturen erhebliche systemische Reaktionen auslösen können.

Ungeachtet dessen stellen Anti-CCD-IgE ein unbestrittenes Problem der In-vitro-Allergiediagnostik dar, da sie zu multiplen Reaktivitäten mit jeglichen glykosylierten Pflanzen- (Nahrungsmittel, Pollen) als auch Insektengiftallergenen führen und so klinisch relevante Sensibilisierungen gegen Protein epitope überlagern (Abb. 1b, c). Zum Nachweis solcher CCD-spezifischer Antikörper stehen mittlerweile unterschiedliche Reagenzien zur Verfügung (Bromelain, MUXF; Meerrettichperoxidase, HRP; Ascorbatoxidase), die allerdings eher als phänomenologischer Indikator denn als exakte Glykanstruktur zu betrachten sind und ebenfalls keine Schlussfolgerung über die Relevanz anderer Sensibilisierungen erlauben.

Die Verwendung glykosylierter, speziesspezifischer Allergene wie z. B. Api m 1 (Tabelle 1) ist nur eine scheinbare Lösung und die Deletion von Glykosylierungsstellen – wie hier im kommerziellen Produkt realisiert – scheidet bei Proteinen mit multiplen Glykanen wie Api m 3 oder Api m 5 alleine aus praktischen Gesichtspunkten de facto aus.

Gerade in diesem Bereich verfügt die molekulare Allergiediagnostik der Insektengiftallergie mit rekombinanten Allergenen über ein erhebliches Potenzial. So resultiert die Verwendung von Sf9-Insektzellen aus *Spodoptera frugiperda* als Expressionssystem in Allergenen, die unter Beibehaltung einer funktionellen Glykosylierung, korrekter Faltung und einem vollständigen Epitopspektrum keine immu-

nologisch nachweisbare CCD-Reaktivität zeigen (Abb. 1d). Dieses Phänomen geht offensichtlich auf die spezifische Vermeidung der α1,3-Core-Fukosylierung zurück [32]. Andere Insektzellen wiederum, wie z. B. solche aus *Trichoplusia ni*, können exakt den authentischen Phänotyp inklusive CCD-Reaktivität prägen, was bei eventuellem Bedarf an naturidentischen Allergenen und für funktionelle Studien der Glykane interessant werden kann.

Bisher hat sich die molekulare Diagnostik primär unter Nutzung nicht-CCD-reaktiver speziesspezifischer Allergene wie Ap1 m 1 und Ves v 5 als nützlich bei der Unterscheidung von echter Doppelsensibilisierung und Kreuzreaktivität erwiesen [15, 16, 29]. Dieses Potenzial kann in der Zukunft sowohl durch zusätzliche speziesspezifische als auch kreuzreaktive, aber CCD-freie Allergene weiter ausgeschöpft werden, wie eine exemplarische Analyse individueller Reaktivitätsprofile auf der Basis sowohl herkömmlicher, extraktbasierter als auch einzelallergenbasierter Verfahren zeigt (Tabelle 2).

Weiterhin erlauben CCD-frei hergestellte korrekt gefaltete Allergene erstmals die Beurteilung ihrer Relevanz unabhängig von ihrer natürlichen Glykosylierung unter Umgehung aufwendiger Inhibitionsanalysen. So konnten wir unter Verwendung von CCD-freiem, korrekt gefaltetem Ves v 2.0101 und Ves v 2.0201 die klassische Rolle der Hyaluronidasen als Major-Allergen des Wespengifts klar widerlegen [32], eine Einschätzung, die von anderen bestätigt wurde [20, 34]. Im Gegenzug konnten für stark glykosylierte

Proteine eine ausgeprägte IgE-Reaktivität und klinische Relevanz gezeigt werden [3, 5]. Insgesamt konnten in dieser Weise für alle bekannten Allergene der Honigbiene und der gemeinen Wespe spezifische IgE-Reaktivitäten nachgewiesen werden (**Tabelle 1**).

Die Verwendung solcherart definierter rekombinanter Moleküle, die nicht die natürliche, aber die diagnostisch bzw. klinisch relevante IgE-Reaktivität widerspiegeln, wird zukünftig ein neues Licht auf die Bedeutung einzelner Allergene sowie der Gesamtsensibilisierungsprofile werfen.

### Molekulare Diagnostik bei negativem oder geringem sIgE

Ein relevantes Problem der In-vitro-Diagnostik der Insektengiftallergie unter Verwendung von Giftextrakten stellen Patienten dar, die trotz nachgewiesener Symptomatik negative Testergebnisse zeigen. Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass Giftextrakte heterogene Gemische darstellen, in denen die verschiedenen Komponenten in stark unterschiedlichen Konzentrationen vorkommen und einzelne Allergene bei der Verarbeitung zudem verloren gehen oder degradiert werden können [5]. So kann in der Diagnostik leicht eine Verschiebung der Information zugunsten überwiegend vorhandener Allergene wie Api m 1 und Api m 4 auftreten. Patienten, die gegen gering vorhandene Allergene, wie z. B. Api m 10, sensibilisiert sind, können so der extraktbasierten Diagnostik entgehen (**Tabelle 2**, Patient 7).

Ein weiteres Problem scheint aus der geringeren Reaktivität einzelner Allergene im Kontext des Extrakts zu erwachsen, so z. B. Ves v 5, was in einer scheinbar geringeren Gesamtreaktivität resultieren würde [16].

Diese und viele andere Probleme können mit der molekularen Diagnostik unter Nutzung reiner rekombinanter Allergene, die zudem quantitativ nicht limitiert und damit analytisch besser zugänglich sind, umgangen werden. Unabhängig hiervon konnten zelluläre diagnostische Verfahren wie der Basophilaktivierungstest Informationen auf molekularer Ebene liefern und damit die vielfältige Einsetzbarkeit rekombinanter Allergene unterstreichen.

### Perspektiven

Die bereits jetzt greifbare molekulare Diagnostik im Bereich der Hymenoptereingiftallergien bietet elegante Strategien zur Unterscheidung von genuiner Doppelsensibilisierung und Kreuzreaktivität sowie zur Vermeidung von Reaktivitätsverschiebungen zugunsten weniger relevanter Allergene in Extrakten. Unter Verwendung eines wachsenden Panels CCD-freier speziesspezifischer und homologer rekombinanter Allergene wird die molekulare Diagnostik zunehmend die Erstellung individueller Sensibilisierungsprofile von Patienten ermöglichen. Diese beinhaltet

das Potenzial, Therapieverläufe detailliert zu verfolgen, therapieinduzierte Neusensibilisierungen zu erkennen, Möglichkeiten zur Anpassung therapeutischer Interventionen und vielleicht auch prognostische Optionen zu entwickeln. Mit diesen Fortschritten betritt auch die Diagnostik der Hymenoptereingiftallergie endgültig das Zeitalter der molekularen Diagnostik.

### PD Dr. Edzard Spillner

Institut für Biochemie und Molekularbiologie  
Department Chemie, Universität Hamburg  
Martin-Luther-King-Platz 6  
20146 Hamburg  
E-Mail: spillner@chemie.uni-hamburg.de

### Erklärung zum Interessenkonflikt

Edzard Spillner ist Mitbegründer von PLS-Design. Simon Blank erklärt, dass kein Interessenkonflikt vorliegt. Thilo Jakob hat Forschungsgelder sowie Berater- und Vortragshonorare von der Firma Phadia (jetzt Thermo Fisher) erhalten.

### Literatur

1. Aalberse RC, Akkerdaas J, Ree R van. Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. *Allergy* 2001; 56: 478–90
2. Arbesman CE, Reisman RE, Wypych JI. Allergenic potency of bee antigens measured by RAST inhibition. *Clin Allergy* 1976; 6: 587–95
3. Blank S, Seismann H, Bockisch B, Braren I, Cifuentes L, McIntyre M, Ruhl D, Ring J, Bredehorst R, Ollert MW, Grunwald T, Spillner E. Identification, recombinant expression, and characterization of the 100 kDa high molecular weight hymenoptera venom allergens Api m 5 and Ves v 3. *J Immunol* 2010; 184: 5403–13
4. Blank S, Michel Y, Seismann H, Plum M, Greunke K, Grunwald T, Bredehorst R, Ollert M, Braren I, Spillner E. Evaluation of different glycoforms of honeybee venom major allergen phospholipase A2 (Api m 1) produced in insect cells. *Protein Pept Lett* 2011a; 18: 415–22
5. Blank S, Seismann H, Michel Y, McIntyre M, Cifuentes L, Braren I, Grunwald T, Darsow U, Ring J, Bredehorst R, Ollert M, Spillner E. Api m 10, a genuine *A. mellifera* venom allergen, is clinically relevant but underrepresented in therapeutic extracts. *Allergy* 2011b; 66: 1322–9
6. Blank S, Bantleon F, McIntyre M, Ollert M, Spillner E. The major royal jelly proteins 8 and 9 (Api m 11) are glycosylated components of *Apis mellifera* venom with allergenic potential beyond carbohydrate based reactivity. *Clin Exp Allergy* 2012 (in press)
7. Chung CH, Mirakhor B, Chan E, Le QT, Berlin J, Morse M, Murphy BA, Satinover SM, Hosen J, Mauro D, Slebos RJ, Zhou Q, Gold D, Hatley T, Hicklin DJ, Platts-Mills TA. Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *N Engl J Med* 2008; 358: 1109–17
8. Dudler T, Chen WQ, Wang S, Schneider T, Annand RR, Dempcy RO, Cramer R, Gmachl M, Suter M, Gelb MH. High-level expression in *Escherichia coli* and rapid purification of enzymatically active honey bee venom phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1165: 201–10
9. Gmachl M, Kreil G. Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 3569–73
10. Graaf DC de, Brunain M, Scharlaken B, Peiren N, Devreese B, Ebo DG, Stevens WJ, Desjardins CA, Werren JH, Jacobs FJ.

- Two novel proteins expressed by the venom glands of *Apis mellifera* and *Nasonia vitripennis* share an ancient C1q-like domain. *Insect Mol Biol* 2010; 19 Suppl 1: 1–10
11. Grunwald T, Bockisch B, Spillner E, Ring J, Bredehorst R, Ollert MW. Molecular cloning and expression in insect cells of honeybee venom allergen acid phosphatase (Api m 3). *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 848–54
  12. Hemmer W, Focke M, Kolarich D, Dalik I, Gotz M, Jarisch R. Identification by immunoblot of venom glycoproteins displaying immunoglobulin E-binding N-glycans as cross-reactive allergens in honeybee and yellow jacket venom. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 460–9
  13. Henriksen A, King TP, Mirza O, Monsalve RI, Meno K, Ipsen H, Larsen JN, Gajhede M, Spangfort MD. Major venom allergen of yellow jackets, Ves v 5: structural characterization of a pathogenesis-related protein superfamily. *Proteins* 2001; 45: 438–48
  14. Hoffman DR, Shipman WH, Babin D. Allergens in bee venom II. Two new high molecular weight allergenic specificities. *J Allergy Clin Immunol* 1977; 59: 147–53
  15. Hofmann SC, Pfender N, Weckesser S, Blank S, Huss-Marp J, Spillner E, Jakob T. Detection of IgE to rApi m 1 and rVes v 5 is valuable but not sufficient to distinguish bee from wasp venom allergy (Reply). *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128: 248
  16. Hofmann SC, Pfender N, Weckesser S, Huss-Marp J, Jakob T. Added value of IgE detection to rApi m 1 and rVes v 5 in patients with Hymenoptera venom allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 265–7
  17. Jakob T, Ollert M. Rekombinante Insektengiftallergene – Nutzen in der Abgrenzung von Kreuzsensibilisierungen und echten Doppelsensibilisierungen. *Allergo J* 2011; 20: 22–3
  18. Jappe U, Raulf-Heimsoth M, Hoffmann M, Burow G, Hubsch-Muller C, Enk A. In vitro hymenoptera venom allergy diagnosis: improved by screening for cross-reactive carbohydrate determinants and reciprocal inhibition. *Allergy* 2006; 61: 1220–9
  19. Jin C, Hantusch B, Hemmer W, Stadlmann J, Altmann F. Affinity of IgE and IgG against cross-reactive carbohydrate determinants on plant and insect glycoproteins. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 185–190.e2
  20. Jin C, Focke M, Leonard R, Jarisch R, Altmann F, Hemmer W. Reassessing the role of hyaluronidase in yellow jacket venom allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125: 184–90.e1
  21. Kettner A, Hughes GJ, Frutiger S, Astori M, Roggero M, Spertini F, Corradin G. Api m 6: a new bee venom allergen. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 914–20
  22. King TP, Alagon AC, Kuan J, Sobotka AK, Lichtenstein LM. Immunochemical studies of yellowjacket venom proteins. *Mol Immunol*. 1983; 20: 297–308
  23. King TP, Spangfort MD. Structure and biology of stinging insect venom allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123: 99–106
  24. Kolarich D, Leonard R, Hemmer W, Altmann F. The N-glycans of yellow jacket venom hyaluronidases and the protein sequence of its major isoform in *Vespula vulgaris*. *FEBS J* 2005; 272: 5182–90
  25. Kuchler K, Gmachl M, Sippl MJ, Kreil G. Analysis of the cDNA for phospholipase A2 from honeybee venom glands. The deduced amino acid sequence reveals homology to the corresponding vertebrate enzymes. *Eur J Biochem*. 1989; 184: 249–54
  26. Müller UR. *Insektenstichallergie: Klinik, Diagnostik und Therapie*. Stuttgart – New York: Gustav Fischer, 1988
  27. Müller UR. Recombinant Hymenoptera venom allergens. *Allergy* 2002; 57: 570–6
  28. Müller UR. Recent developments and future strategies for immunotherapy of insect venom allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003; 3: 299–303
  29. Müller UR, Johansen N, Petersen AB, Fromberg-Nielsen J, Haeblerli G. Hymenoptera venom allergy: analysis of double positivity to honey bee and *Vespula* venom by estimation of IgE antibodies to species-specific major allergens Api m1 and Ves v5. *Allergy* 2009; 64: 543–8
  30. Peiren N, Vanrobaeys F, Graaf DC de, Devreese B, Van Beeumen J, Jacobs FJ. The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1752: 1–5
  31. Schmidt M, Weimer ET, Sakell RH, Hoffman DR. Proteins in the high molecular weight fraction of honeybee venom. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: S107
  32. Seismann H, Blank S, Braren I, Greunke K, Cifuentes L, Grunwald T, Bredehorst R, Ollert M, Spillner E. Dissecting cross-reactivity in hymenoptera venom allergy by circumvention of alpha-1,3-core fucosylation. *Mol Immunol* 2010a; 47: 799–808
  33. Seismann H, Blank S, Cifuentes L, Braren I, Bredehorst R, Grunwald T, Ollert M, Spillner E. Recombinant phospholipase A1 (Ves v 1) from yellow jacket venom for improved diagnosis of hymenoptera venom hypersensitivity. *Clin Mol Allergy* 2010b; 8: 7
  34. Seppala U, Selby D, Monsalve R, King TP, Ebner C, Roepstorff P, Bohle B. Structural and immunological characterization of the N-glycans from the major yellow jacket allergen Ves v 2: the N-glycan structures are needed for the human antibody recognition. *Mol Immunol* 2009; 46: 2014–21
  35. Skov LK, Seppala U, Coen JJ, Crickmore N, King TP, Monsalve R, Kastrup JS, Spangfort MD, Gajhede M. Structure of recombinant Ves v 2 at 2.0 Angstrom resolution: structural analysis of an allergenic hyaluronidase from wasp venom. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2006; 62: 595–604
  36. Soldatova LN, Cramer R, Gmachl M, Kemeny DM, Schmidt M, Weber M, Mueller UR. Superior biologic activity of the recombinant bee venom allergen hyaluronidase expressed in baculovirus-infected insect cells as compared with *Escherichia coli*. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 691–8
  37. Winningham KM, Fitch CD, Schmidt M, Hoffman DR. Hymenoptera venom protease allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 928–33





NEU: Die e.Akademie  
von Springer Medizin  
Jetzt online!

# Die Springer Medizin e.Akademie

Medizinische Fortbildung – wann und wo immer Sie wollen!

**So einfach geht's:**

- Als e.Med-Nutzer erhalten Sie **uneingeschränkt** Zugriff auf alle CME-Fortbildungen, e.Tutorials und e.Tutorials plus aller Zeitschriften und Magazinen von Springer Medizin. Mehr Infos gibt es unter [www.springermedizin.de/eMed](http://www.springermedizin.de/eMed).
- Als **Abonnent** einer Fachzeitschrift können Sie innerhalb der e.Akademie **zielgerichtet** auf alle aktuellen und archivierten CME-Einheiten und künftigen interaktiven Fortbildungsmodule Ihrer Zeitschrift zugreifen.
- Als **Leser** stehen Ihnen **zeitlich begrenzt** die einzelnen CME-Module der jeweiligen Ausgabe in der gewohnten PDF-Variante zur Verfügung. Verwenden Sie dazu die neue Fortbildungs-Identifikations-Nummer (FIN). Mehr dazu erfahren Sie auf der zweiten Seite dieses Fragebogens.



[www.springermedizin.de/kurse-allergo-journal](http://www.springermedizin.de/kurse-allergo-journal)  
FIN: AJ1204Mj gültig bis 3. Juli 2012



Diese CME-Fortbildungseinheit ist von der Bayerischen Landesärztekammer mit zwei bzw. drei Punkten zur zertifizierten Fortbildung anerkannt.

## Molekulardiagnostik und Insektengiftallergie

? Welche der folgenden Allergene des Bienen- und Wespengiftes zeigen Kreuzreaktivität auf Proteinebene?

- Phospholipasen
- Dipeptidylpeptidasen
- Saure Phosphatasen
- Antigen 5
- Major Royal Jelly Proteine

? Welcher der folgenden Wirtsorganismen führt keine posttranslationalen Modifikationen von Allergenen in Form von Glykosylierungen durch?

- Hefen
- Säugerzellen
- Insektenzellen
- E. coli
- Pflanzen

? Welche der folgenden Modifikationen ist verantwortlich für Carbohydrat-basierte Kreuzreaktivität von Insektengiftallergenen?

- $\beta$ 1,2-Xylose
- $\alpha$ 1,3-Galaktose
- $\alpha$ 1,3-Fukose
- $\alpha$ 1,6-Fukose
- $\alpha$ 1,3-Mannose

? Welches der folgenden Moleküle ist nicht zum Nachweis Carbohydrat-basierter Kreuzreaktivität geeignet?

- Meerrettichperoxidase
- MUXF
- Bromelain
- Ascorbatoxidase
- Antigen 5

? Bei welchem der folgenden Allergene handelt es sich nicht um ein Spezies-spezifisches Allergen?

- Phospholipase A1
- Phospholipase A2
- Hyaluronidase
- Antigen 5
- Melittin

? Welche der folgenden Aussagen zur Carbohydrat-basierten Kreuzreaktivität von Bienen- und Wespengift ist richtig?

- Eine Diagnostik unter Nutzung von Bienen- und Wespengift sowie eines CCD-Markers erlaubt die Identifizierung des für den Patienten relevanten Insekts.
- Die Höhe des spezifischen IgE gegen Bienen- und Wespengift erlaubt die Identifizierung des für den Patienten relevanten Insekts.

- Eine Diagnostik unter Nutzung Spezies-spezifischer, nicht-glykosylierter Allergene erlaubt die Identifizierung des für den Patienten relevanten Insekts.
- Bei Vorhandensein von anti-CCD IgE ist in keinem Fall die Identifizierung des für den Patienten relevanten Insektes möglich, sodass eine Therapie mit beiden Giften eingeleitet werden sollte.
- Anti-CCD IgE gegen Insektengifte sind klinisch hoch relevant und es sollte bei ihrem Vorhandensein in jedem Fall eine Therapie mit beiden Giften eingeleitet werden.

**? Nach einer anaphylaktischen Reaktion auf den Stich eines nicht identifizierten Insekts stellt sich eine 40-jährige Patientin in Ihrer Sprechstunde vor. Die In-vitro-Diagnostik zeigt positive Testergebnisse auf Bienengift, Wespengift, CCDs sowie auf Ves v 5 (Antigen 5) und ein negatives Ergebnis auf Api m 1 (Phospholipase A2) und Ves v 1 (Phospholipase A2). Welche Therapie würden Sie aufgrund dieses Befundes einleiten?**

- Die Patientin zeigt eine Sensibilisierung gegen Bienengift, sodass eine Therapie mit Bienengift ausreichend ist.
- Die Patientin zeigt eine Sensibilisierung gegen Wespengift, sodass eine Therapie mit Wespengift ausreichend ist.
- Die Patientin zeigt eine Doppelsensibilisierung gegen Bienen- und Wespengift, sodass eine Therapie mit beiden Giften erfolgen sollte.
- Der positive in vitro Test auf Ves v 5 besitzt keine Aussagekraft, da ein homologes Protein im Bienengift vorhanden ist. Die Therapie sollte mit beiden Giften erfolgen.
- Ausschließlich ein positiver In-vitro-Test mit zwei Spezies-spezifischen Allergenen erlaubt eine Aussage über das für die Patientin relevante Insekt. Die Therapie sollte mit beiden Giften erfolgen.

**? Welche der Aussagen zur Extrakt-basierten In-vitro-Diagnostik der Bienen- und Wespengift-Allergie ist falsch?**

- Einzelne Allergene können bei der Verarbeitung von Giftextrakten verloren gehen, sodass Patienten, die gegen gering vorhandene Allergene sensibilisiert sind, der Extrakt-basierten Diagnostik entgehen können.

- Einzelne Allergene können im Kontext des Extraktes eine geringere Reaktivität aufweisen, was in einer scheinbar geringeren Gesamtreaktivität resultieren kann.
- Die Extrakt-basierte Diagnostik kann von anti-CCD IgE beeinträchtigt werden, was die Unterscheidung von genuiner Doppelsensibilisierung und Kreuzreaktivität erschwert.
- Die Extrakt-basierte Diagnostik kann durch homologe Allergene, die in beiden Giften vorkommen, beeinträchtigt werden, was die Unterscheidung von genuiner Doppelsensibilisierung und Kreuzreaktivität erschwert.
- Die wichtigen Allergene sind in den Giftextrakten in ungefähr gleichen Mengen vorhanden, sodass keine Verschiebung der Informationen zugunsten überwiegend vorhandener Allergene auftreten kann.

**? Welche Aussage über rekombinante Allergene ist falsch?**

- In Bakterien hergestellte Allergene weisen in der Regel das volle Epitopspektrum nativer Allergene auf.
- Durch Herstellung von Allergenen in unterschiedlichen Insektenzelllinien lassen sich differenziell glykosylierte Allergene mit unterschiedlicher CCD-Reaktivität herstellen.
- Posttranslationale Modifikationen sind in vielen Fällen essenziell für die Ausbildung der korrekten dreidimensionalen Struktur von Allergenen.
- Eukaryotische Zellen wie Insekten-, Säuger- und Hefezellen führen posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen und das Einführen von Disulfidbrücken durch.
- Die von unterschiedlichen Zelllinien durchgeführten posttranslationalen Modifikationen von Allergenen können variieren und so deren Immunreaktivität beeinflussen.

**? Welches der folgenden Allergene ist von Natur aus nicht glykosyliert und könnte so auch in nativer Form zur Diagnostik unter Umgehung von CCD-Reaktivität eingesetzt werden?**

- Api m 1
- Ves v 2
- Api m 3
- Ves v 5
- Api m 5



## Füllen Sie Ihr Punktekonto – in der e.Akademie von Springer Medizin!

Ab sofort finden Sie alle CME-Fortbildungseinheiten aus dem Allergo Journal online in der e.Akademie. Als ÄDA/DGAKI-Mitglied haben Sie freien Zugang zu allen Fortbildungen aus dem Allergo Journal. Als sonstiger Leser können Sie an der aktuellen Einheit für einen begrenzten Zeitraum kostenlos teilnehmen. Dafür benötigen Sie die auf der vorherigen Seite abgedruckte FIN. Und so geht's:

### 1. Auswählen

Gehen Sie auf [springermedizin.de/eakademie](http://springermedizin.de/eakademie) und geben Sie die FIN in die Suchmaske ein.

### 2. Anmelden/Registrieren

Falls Sie noch keinen Springer-Medizin-Zugang haben, bitten wir Sie, sich einmalig zu registrieren. Geben Sie dann Ihre persönlichen Zugangsdaten ein.

### 3. Teilnehmen

Nach der Anmeldung können Sie eine PDF-Version des Fortbildungsbeitrags herunterladen und den Fragebogen bearbeiten. Als e.Med-Abonnent können Sie diese Fortbildungseinheit auch direkt online in einer multimedialen Variante, als e. Tutorial, durchführen.

### 4. CME-Punkte sammeln

Direkt nach der Teilnahme erfahren Sie, ob Sie bestanden haben:  
 \_7–9 richtige Antworten  
 = zwei CME-Punkte,  
 \_10 richtige Antworten  
 = drei CME-Punkte.  
 Sie können den Kurs einmal wiederholen.

### Kontakt und weitere Informationen:

Springer-Verlag GmbH  
 Springer Medizin Kundenservice  
 Tel.: 0800 77 80 777  
 E-Mail: [kundenservice@springermedizin.de](mailto:kundenservice@springermedizin.de)