

ABH- und Lewis-Antigene der Trachealdrüsen

II. Lewis-negative Individuen

I. Pedal¹ und V. Schmidt²

¹Institut für Rechtsmedizin der Universität Heidelberg, Voßstrasse 2, D-6900 Heidelberg, Bundesrepublik Deutschland

²Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Tübingen, Nägelestrasse 5, D-7400 Tübingen, Bundesrepublik Deutschland

ABH and Lewis Antigens of the Tracheal Glands

Part II: Lewis-Negative Individuals

Summary. Immunocytochemical studies were performed on tracheal wall samples embedded in paraffin; the samples were taken at 23 autopsies. In all cases, the red cells had been typed in postmortem serological studies as being Le(a – b –). Blood-group antigens were demonstrated by the indirect immunoperoxidase technique, using monoclonal Anti-A, Anti-B, Anti-Le^a and Anti-Le^b; H was detected by UEA 1. The secretor characteristics could clearly be diagnosed from the ABH staining pattern of the mucous glands. In 11 cases, the lewis antigen labeling patterns were identical to the group of Lewis-positive individuals. It seems probable, from the statistical point of view, that these 11 individuals were, in fact, Lewis-positive and that the negative serology resulted from deterioration of the cadaver blood samples. The immunocytochemistry was quite different in the remaining 12 cases: (a) secretors ($n = 9$) were completely negative for Le^a, Le^b was equally negative in one case, but in the remainder it was detectable within mucous epithelia in minimal amounts and in an atypical granular distribution; (b) nonsecretors ($n = 3$) reversely exhibited complete negativity for Le^b but a minimal staining for Le^a. These findings are in harmony with the well established Lewis serology typing of secretions in Lewis negative individuals. Thus, a minimal Lewis antigen biosynthesis and secretion seem to occur in the absence of the Le gene: A α -4-L-fucosyltransferase of low activity might be the product of the allele le.

Key words: ABO(H) antigens of tracheal glands – Lewis antigens of tracheal glands – Secretor character

Zusammenfassung. In 23 Sektionsfällen, bei denen am Leichenblut der erythrocytäre Typ Le (a – b –) festgestellt worden war, wurden an paraffineingebetteten Trachealwandproben immunhistochemische Studien durchgeführt. Die Antigendarstellungen erfolgten nach der indirekten Immunperoxidase-methode mit monoklonalen Antikörpern gegen Le^a, Le^b, A und B als primären Antikörpern; das H-Antigen wurde mit UEA 1 dargestellt. Das Markierungsverhalten der mukösen Drüsen für die ABH-Antigene erlaubte eine eindeutige Differenzierung zwischen Sekretoren und Nonsekretoren. Das Lewis-Markierungsverhalten war in 11 Fällen mit demjenigen Lewis-positiver Individuen identisch. Statistische Betrachtungen legen nahe, daß es sich bei dieser Gruppe tatsächlich um Lewis-positive Individuen handelt, deren erythrocytäre Lewis-Merkmale im gealterten Leichenblut nicht erfaßt wurden. Die übrigen 12 Fälle zeigten ein völlig anderes immunhistochemisches Bild: a) Die Sekretoren ($n = 9$) waren für Le^a vollständig negativ; Le^b war in einem Falle nicht, in den übrigen Fällen innerhalb muköser Epithelien in minimaler Quantität und atypischer, granulärer Verteilung nachweisbar. b) Nonsekretoren ($n = 3$) wiesen umgekehrt bei völliger Negativität für Le^b abortive Markierungen für Le^a auf. Diese Beobachtungen, die mit bekannten serologischen Befunden an den Sekreten gut übereinstimmen, sprechen dafür, daß auch in Abwesenheit des Le-Gens in geringer Menge Lewis-Antigene synthetisiert und sezerniert werden können: Möglicherweise kodiert das Allel le eine α -4-L-Fucosyltransferase geringer Effizienz.

Schlüsselwörter: ABO(H)-Antigene, Trachealdrüsen – Lewis-Antigene, Trachealdrüsen – Sekretorstatus

Einleitung

Die ABH-Antigene menschlicher Gewebe können mit immunhistochemischen Methoden dargestellt werden. Nach den Orten ihres Vorkommens lassen sich erythrocytäre, endotheliale und epitheliale ABH-Antigene unterscheiden. Während die gruppenspezifischen erythrocytären und endothelialen ABH-Antigene unabhängig vom Sekretorstatus konstant nachgewiesen werden können, steht ihr Vorkommen in einigen Epithelzellpopulationen unter strikter Kontrolle des Sekretorgans (Pedal 1987). Die muköse Epithelzelle der Trachealdrüsen ist ein Prototyp dieser Gruppe von Epithelien, deren immunhistochemisches ABH-Markierungsverhalten zuverlässige Rückschlüsse auf den Sekretorstatus des Individuums erlaubt.

In der vorausgegangenen Mitteilung (Pedal und Bedeker 1986) wurde festgestellt, daß bei Lewis-positiven Individuen das Markierungsverhalten der mukösen Trachealdrüsen-Epithelien für Le^a und Le^b ebenfalls in charakteristischer Weise vom Sekretorstatus geprägt wird: Bei Sekretoren überwiegt regelmäßig die Le^b-Markierung, bei Nonsekretoren die Le^a-Markierung. Das immunhistochemische Verhalten der mukösen Epithelien korreliert also sehr gut mit dem bekannten serologischen Verhalten der Sekrete.

Wenn die Biosynthese von Lewis-Antigenen die Anwesenheit des Lewis-Gens (Genotyp LeLe oder Lele) zur Voraussetzung hat, ist zu erwarten, daß in

Organen Lewis-negativer Individuen (Genotyp $lele$) weder Le^a noch Le^b nachgewiesen werden kann. Vorstudien zu der früheren Untersuchung hatten aber überraschend gezeigt, daß auch in dieser Fallgruppe Lewis-Antigene immunhistochemisch gefunden werden können. Die vorliegende Studie untersucht nun an einer größeren Zahl von Sektionsfällen systematisch das ABH- und Lewis-Markierungsverhalten der Trachealdrüsen Lewis-negativer Individuen. Die Untersuchungen wurden analog unserer früheren Studie (Pedal und Baedeker 1986) durchgeführt, auf die hinsichtlich methodischer Details und ausführlicher Quellenangaben verwiesen werden kann.

Material und Methode

In einer Serie von 140 unausgewählten Sektionsfällen wurden ABO- und Lewis-Status bestimmt. Die Untersuchungen erfolgten am Leichenblut im Agglutinationstest. Die ABO-Bestimmungen wurden routinemäßig mit humanen Seren durchgeführt. Die Lewis-Eigenschaften wurden im Röhrchentest an gewaschenen Erythrocyten mit monoclonalen Antikörpern Seralone der Fa. Biotest, Offenbach (Anti- Le^a : Kat. Nr. 808400; Anti- Le^b : Kat. Nr. 808405) untersucht. Alle $Le(a-b-)$ -Befunde wurden durch Nachuntersuchung mit Ziegenseren der Fa. Behring, Frankfurt/Main (Anti- Le^a : Kat. Nr. ORXR 04/05; Anti- Le^b : Kat. Nr. ORXS 04/05) abgesichert.

Während die Verteilung der ABO-Typen der statistischen Erwartung entsprach, ergab sich für die Verteilung der erythrocytären Lewis-Typen folgendes Bild:

	Serologische Befunde	Statistische Erwartung ^a
$Le(a-b+)$	84	100.8
$Le(a+b-)$	33	30.8
$Le(a-b-)$	23	8.4
Summe	140	140

^anach Spielmann und Kühnl 1982

Die signifikanten Abweichungen von den Erwartungswerten in den Gruppen $Le(a-b+)$ und $Le(a-b-)$ werden im Rahmen der Diskussion erörtert.

An Paraffinschnitten von Trachealwandproben der 23 $Le(a-b-)$ -Fälle wurden nach der indirekten Immunperoxidase-methode (vgl. Pedal und Baedeker 1986) die ABH- und Lewis-Antigene dargestellt. Als primäre Antikörper dienten wie in der vorausgegangenen Studie monoklonale Antikörper Seralone der Fa. Biotest, Offenbach, (Anti-A: Kat. Nr. 801315; Anti-B: Kat. Nr. 801340; Anti- Le^a und Anti- Le^b : s.o.); das H-Antigen wurde mit UEA 1 (Fa. Medac, Hamburg, Kat. Nr. L-2210) nachgewiesen. Vier zusätzliche, sicher Lewis-negative Fälle aus früheren Untersuchungsreihen wurden einbezogen.

Ergebnisse

ABH-Markierung

Das immunhistochemische ABH-Markierungsverhalten der mukösen Trachealdrüsen-Epithelien erlaubte in allen 23 $Le(a-b-)$ -Fällen eine eindeutige Aus-

sage über den Sekretorstatus: 19 Fälle waren durch intensive, diffuse, gruppenspezifische Zytoplasmamarkierung als Sekretoren charakterisiert; die übrigen vier erwiesen sich als Nonsekretoren mit fehlender oder allenfalls diskreter Markierung muköser Epithelien. Das ABH-Markierungsverhalten des Drüsenepithels – wie auch des intraductal gelegenen Sekretes – unterschied sich bei Sekretoren und bei Nonsekretoren nicht von dem bei Lewis-positiven Individuen beobachteten und in der früheren Mitteilung (Pedal und Baedeker 1986) beschriebenen Muster.

Von den vier zusätzlich einbezogenen Lewis-negativen Fällen erwiesen sich zwei als Sekretoren und zwei als Nonsekretoren.

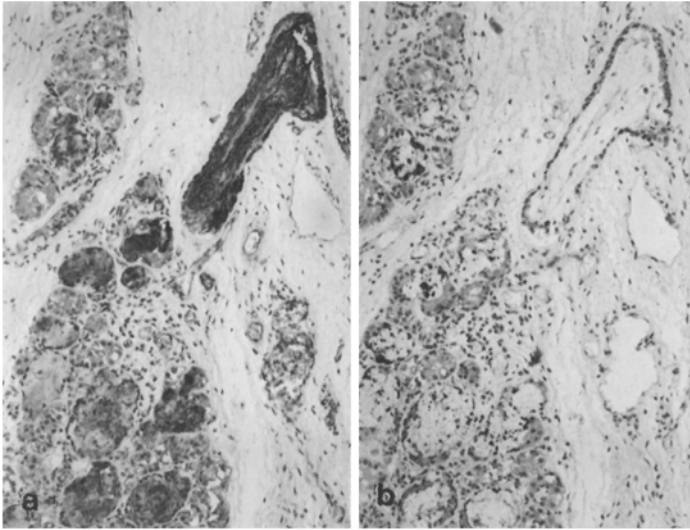


Abb. 1. **a** Gleichmäßige UEA 1-Positivität des mukösen Trachealdrüsenepithels bei einem Lewis-negativen Sekretor. **b** Im Gegensatz zu der uniformen Le^b -Markierung der mukösen Epithelien bei Lewis-positiven Sekretoren (Pedal und Baedeker 1986) ist für Lewis-negative Individuen ein *diskretes, atypisches Markierungsmuster* charakteristisch. Beachte das entsprechende Färbeverhalten des intraduktalen Sekretes. L 156/85, indirekte Immunperoxidase-technik mit UEA 1 (**a**) bzw. monoklonalem Anti- Le^b (**b**). $\times 120$

Lewis-Markierung

Die 23 Fälle vom erythrocytären Typus $Le(a-b-)$ zerfallen nach ihrem Markierungsverhalten für Le^a und Le^b in zwei klar unterschiedene Gruppen.

In 11 Fällen entsprach das Markierungsverhalten vollkommen demjenigen Lewis-positiver Individuen: 10 Fälle aus dieser Gruppe, nach ihrem ABH-Markierungsverhalten Sekretoren, wiesen die dem erythrocytären Typ $Le(a-b+)$ entsprechende, starke Drüsenmarkierung für Le^b auf; in einem Falle lag, wie beim erythrocytären Typ $Le(a+b-)$, eine starke Markierung für Le^a bei fehlender ABH-Markierung vor.

In den übrigen 12 Fällen stellten sich Lewis-Antigene immunhistochemisch nicht oder nur in diskreter, atypischer Form dar; nach dem ABH-Markierungs-

verhalten gliedern sich diese Fälle in neun Sekretoren und drei Nonsekretoren. Im einzelnen waren in den beiden Untergruppen folgende Befunde zu erheben:

Die neun Sekretoren (und die zusätzlich einbezogenen zwei Lewis-negativen Sekretoren) wiesen übereinstimmend eine völlige Negativität für Le^a auf. Während bei Lewis-positiven Sekretoren oft Spuren von Le^a nachgewiesen werden können (Pedal und Baedeker 1986), war die Negativität in den vorliegenden Fällen total, so daß ein methodischer Fehler nur durch Wiederholungen und mitgeführte Positivkontrollen ausgeschlossen werden konnte. Die Le^b -Darstellung verlief in einem Falle ebenfalls vollkommen negativ. In allen übrigen Fällen waren bei sorgfältiger Suche Markierungen für Le^b erkennbar. Obgleich das Markierungsverhalten von demjenigen Lewis-positiver Individuen immer eindeutig abwich, bestand doch von Fall zu Fall eine erhebliche Variabilität; sie betraf einerseits den Anteil muköser Epithelzellen, in denen Le^b -positives Material überhaupt vorkam, andererseits das intrazelluläre Verteilungsmuster der spezifischen Markierungen. Ausnahmsweise kam eine diffuse Zytoplasmamarkierung wie bei Lewis-positiven Individuen vor, die aber stets nur ganz vereinzelte Zellen oder kleine Zellgruppen betraf. Sehr viel häufiger war eine Le^b -Positivität feiner oder gröberer Granula zu sehen, die spärlich im Zytoplasma muköser Epithelien und etwas vermehrt perinukleär auftraten. Das Vorkommen solcher Granula war entweder auf wenige Zellen beschränkt oder betraf die Mehrzahl der mukösen Epithelzellen. Im intraductalen Sekret waren diskrete Schlieren oder, bei granulärer Zytoplasmamarkierung, vereinzelte Granula Le^b -positiven Materials erkennbar.

Die drei Nonsekretoren (ebenso wie die zwei zusätzlich einbezogenen Lewis-negativen Nonsekretoren) verhielten sich bezüglich der Lewis-Antigen-Markierungen exakt spiegelbildlich zu der soeben besprochenen Untergruppe der Lewis-negativen Sekretoren. Bei ihnen verlief also die Darstellung von Le^b vollkommen negativ. Le^a war in einem der insgesamt fünf Fälle nicht darstellbar. In den übrigen Fällen zeigte sich eine abortive Markierung für Le^a mit verschiedenen Variationen, wie sie für Le^b in der Untergruppe der Sekretoren beobachtet wurden.

Diskussion

Wie nicht anders zu erwarten, besteht im ABH-Markierungsverhalten der Trachealdrüsen kein Unterschied zwischen Lewis-positiven und Lewis-negativen Individuen. Hieraus folgt, daß durch immunhistochemische Darstellung der Antigene A, B und H in der Trachealwand auch in der Gruppe $Le(a-b-)$ über die Diagnose der ABO-Gruppenzugehörigkeit hinaus der Sekretorstatus festgestellt werden kann. Über entsprechende Ergebnisse an paraffin-eingebettetem Nierengewebe wurde schon früher in dieser Zeitschrift berichtet (Pedal und Hülle 1984).

Die am Leichenblut als $Le(a-b-)$ charakterisierten Individuen ($n=23$) stellen nach dem Markierungsverhalten der Trachealdrüsen für die Lewis-Antigene kein einheitliches Kollektiv dar: Sie verhielten sich teils ($n=11$) genau wie Lewis-positive Sekretoren und Nonsekretoren, teils ($n=12$) zeigten sie

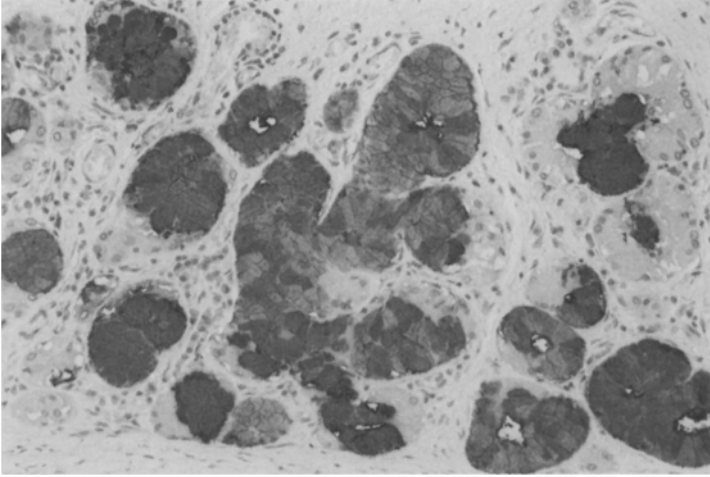


Abb. 2. Zum Vergleich: Gleichmäßige Le^a-Markierung der mukösen Epithelien bei einem Lewis-positiven Nonsekretor. L 55/86, Le(a+b-), indirekte Immunperoxidasetechnik mit monoklonalem Anti-Le^a. × 200

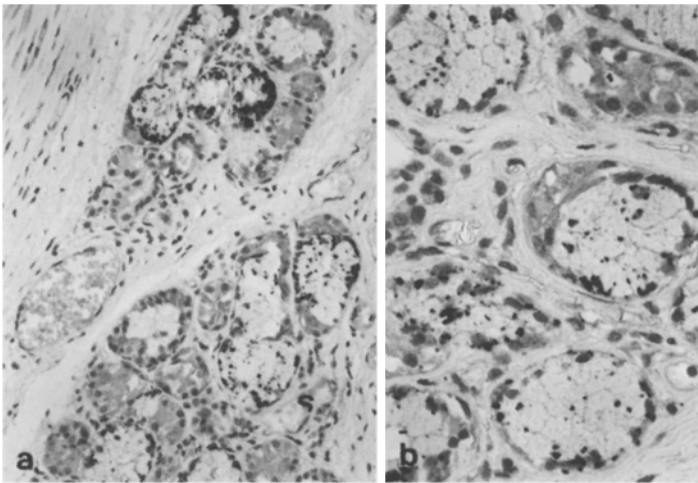


Abb. 3a, b. Abortive, granuläre Le^b-Markierung der mukösen Epithelien bei einem Lewis-negativen Sekretor; eine Bevorzugung der perinukleären Region ist deutlich erkennbar. L 156/85, indirekte Immunperoxidasetechnik mit monoklonalem Anti-Le^b. **a** × 200, **b** × 400

eine fehlende oder abortive Markierung der Trachealdrüsen, wie sie bei Lewis-positiven Individuen nie vorkommt. Nach unserer Auffassung besteht nur in den Fällen mit fehlender/abortiver Drüsenmarkierung tatsächlich Lewis-Negativität, während in den übrigen Fällen die serologische Diagnose Le(a-b-) fehlerhaft ist. Tatsächlich muß mit falsch-negativen Le^a- oder Le^b-Befunden an

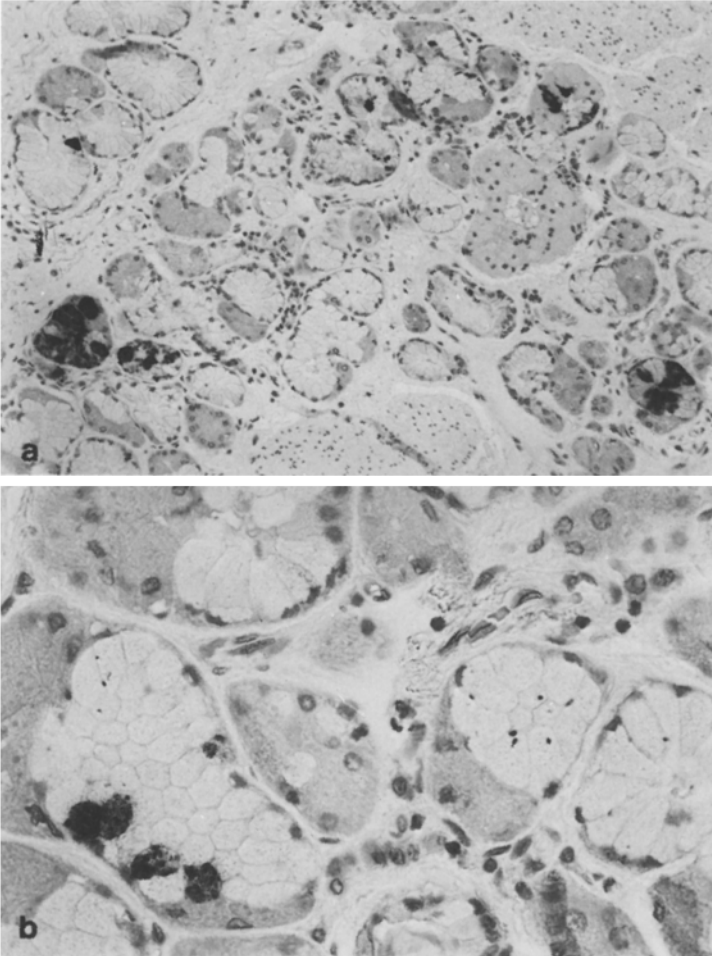


Abb. 4a, b. Le^b-Markierung einzelner muköser Epithelien bei einem Lewis-negativen Sekretor. L 244/85, indirekte Immunperoxidasetechnik mit monoklonalem Anti-Le^b. **a** × 160, **b** × 500

schlecht erhaltenem Leichenblut gerechnet werden, da die Lewis-Antigene im Gegensatz zu den ortsständigen ABH-Antigenen lediglich an die Erythrocytenoberfläche absorbiert sind (Watkins 1980) und sich unter Einflüssen der Auto- und Heterolyse entsprechend leicht wieder ablösen können.

Die statistischen Daten unterstützen diese Interpretation: Werden nur die Fälle mit fehlender/abortiver Lewis-Antigen-Markierung als wirklich Lewis-negativ akzeptiert, so resultiert eine Korrektur der überhöhten Le(a-b-)-Fallzahl bis in den Bereich der statistischen Erwartung. Werden andererseits die immunhistochemisch Lewis-positiven Fälle den Lewis-positiven Sekretoren ($n = 10$) und den Lewis-positiven Nonsekretoren ($n = 1$) zugeordnet, so erhält man auch für die Gruppe der Lewis-positiven Sekretoren eine befriedigende Annäherung an den statistischen Erwartungswert:

	Sero- logischer Befund	Immun- histo- chem. Befund	Statistische Erwartung ^a
Le pos., Se +	84	+ 10 = 94	100.8
Le pos., se -	33	+ 1 = 34	30.8
le neg.	23	- 11 = 12	8.4

^anach Spielmann und Kühnl 1982

Juhl (1985) konnte an einer kleinen Zahl von Le(a-b-)-Fällen im Urothel von Operationspräparaten teils Negativität, teils Lewis-Antigen-Markierungen wie in der Gruppe Le(a-b+) feststellen. Nach unseren ganz analogen, an Trachealdrüsen erhobenen Befunden ist die plausibelste Erklärung – die auch von der Autorin diskutiert wird – in einem lagerungsbedingten Verlust erythrocytärer Lewis-Merkmale in den Blutproben zu sehen.

Die Lewis-Antigene sind also am Ort ihrer Synthese, etwa in mukösen Epithelien der Trachealdrüsen, wesentlich autolyse- und fäulnisresistenter als an der Erythrocytenoberfläche. Ihre Haltbarkeit ist derjenigen der chemisch eng verwandten ABH-Antigene vergleichbar. Dies erklärt neben den diskutierten Differenzen zwischen Serologie und Immunhistochemie die Darstellbarkeit epithelialer Lewis-Antigene selbst in stark zersetzten Geweben (Pedal 1987).

Daß bei sicher Lewis-negativen Individuen Lewis-Antigene überhaupt, wenn auch nur in Spuren, nachgewiesen werden können, widerspricht zunächst den heutigen Vorstellungen über die genetische Steuerung der Lewis-Antigen-Biosynthese (Watkins 1980). Stichprobenartige Überprüfungen der immunhistochemischen Befunde mit Ziegenseren als primären Antikörpern sprechen ebenso wie das streng spiegelbildliche Verhalten der Le^b- und der Le^a-Markierung bei Lewis-negativen Sekretoren und Nonsekretoren für die Spezifität der Darstellung. Eine Kreuzreaktion einerseits des Anti-Le^a mit dem Antigen Le^c der Lewis-negativen Nonsekretoren (Gunson und Latham 1972), andererseits des Anti-Le^b mit dem Antigen Le^d der Lewis-negativen Sekretoren (Potapov 1970) könnte die Befunde zwar prinzipiell erklären (Arcilla und Sturgeon 1973). Diese Hypothese kann aber, da Le^c bzw. Le^d bei Lewis-negativen Individuen anscheinend in regulärer Weise sezerniert werden, nicht erklären, weshalb bei Lewis-Negativität stets nur diskrete und atypische immunhistochemische Markierungen gefunden werden.

Unsere immunhistochemischen Befunde stehen in sehr guter Übereinstimmung mit serologischen Beobachtungen, nach denen im Speichel Lewis-negativer Sekretoren sehr häufig Le^b und im Speichel Lewis-negativer Nonsekretoren fast konstant Le^a in geringen Mengen nachgewiesen werden kann (Andresen 1972; Arcilla und Sturgeon 1973, mit Hinweisen auf die ältere Literatur).

Wenn nach diesen Befunden Lewis-negative Individuen tatsächlich Lewis-Antigene in geringem Umfang sezernieren, so muß bei ihnen eine nicht von dem Gen Le kodierte α -4-L-Fucosyltransferase existieren, die analog dem Lewis-Enzym den Praecursor Typ I zu Le^a und H Typ I zu Le^b fucosyliert. Möglicher-

weise ist diese strukturell veränderte oder quantitativ verminderte Fucosyltransferase das Produkt des Allels *le*, das dann nicht als wirklich inertes Allel aufzufassen wäre (Arcilla und Sturgeon 1973); andererseits ist die Mitwirkung eines vom Lewis-System unabhängigen Gens nicht auszuschließen.

Literatur

- Andresen PH (1972) Demonstration of *Le^x* substance in the saliva of ABH nonsecretors. *Vox Sang* 23:262–269
- Arcilla MB, Sturgeon P (1973) Studies on the secretion of blood group substances. II. Observations on the red cell phenotype *Le(a–b–x–)*. *Vox Sang* 25:72–87
- Gunson HH, Latham V (1972) An agglutinin in human serum reacting with cells from *Le(a–b–)* non-secretor individuals. *Vox Sang* 22:344–353
- Juhl BR (1985) Immunohistochemical demonstration and localization of Lewis a and Lewis b determinants in human urothelium. *J Histochem Cytochem* 33:309–314
- Pedal I (1987) Blutgruppen-Immunhistochemie. ABO(H)- und Lewis-Antigene menschlicher Gewebe. Thieme, Stuttgart New York
- Pedal I, Baedeker Ch (1986) ABH- und Lewis-Antigene der Trachealdrüsen. I. Lewis-positive Individuen. *Z Rechtsmed* 97:89–98
- Pedal I, Hülle J (1984) Immunenzymatische Bestimmung des ABO- und Sekretorstatus an paraffineingebettetem Autopsiematerial. *Z Rechtsmed* 93:289–300
- Potapov MI (1970) Detection of the antigen of the Lewis system characteristic of the erythrocytes of the secretory group *Le(a–b–)*. *Probl Haematol, Moskau* 15:45
- Spielmann W, Kühnl P (1982) Blutgruppenkunde. Thieme, Stuttgart New York
- Watkins WM (1980) Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis and P blood group system. *Adv Hum Genet* 10:1–136, 379–385

Eingegangen am 17. September 1987