

Immunochemische und chromatographische Bestimmung von ABH-Antigenen im kompakten Knochengewebe*

Roman Hauser¹, Steven Rand², Beate Annuß², und Bernd Brinkmann²

¹Institut für Rechtsmedizin der Medizinischen Akademie Gdansk, Curie Sklodoskiej 3a, 80-210 Gdansk, Polen

²Institut für Rechtsmedizin der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, Von-Esmarch-Str. 86, D-4400 Münster, Bundesrepublik Deutschland

Immunochemical and chromatographical detection of ABH antigens in compact bone tissue

Summary. The identification of ABH antigens from compact bone tissue is known from many sources. The purpose of this study was to make a contribution to the localization of blood-group-active substances in compact bone tissue. A variety of preparation and identification methods were successfully used and compared. Samples were extracted from compact bone tissue, separated by HPTLC, and examined using the absorption-elution and PAP techniques. Additionally, the PAP technique was carried out on cryostat sections. Serologically active blood-group substances were consistently demonstrated in the organic components of the haversian canals.

Key words: ABO detection in bones, immunohistochemistry (PAP technique) – ABO blood group substances from bones, extraction

Zusammenfassung. Der Nachweis von ABH-Antigenen aus kompaktem Knochengewebe ist vielerorts bekannt. Die vorliegende Studie soll einen Beitrag zur Lokalisation dieser blutgruppenaktiven Substanzen im kompakten Knochen leisten. Hierzu wurden verschiedene Aufbereitungs- und Nachweistechiken erfolgreich durchgeführt und miteinander verglichen. Aus kompaktem Knochengewebe extrahierte und über HPTLC aufgetrennte Proben wurden dem Absorptions-Elutionstest und der PAP-Technik unterzogen. Zusätzlich wurde die PAP-Technik an Kryostatschnitten aus Knochengewebe durchgeführt. Übereinstimmend ließen sich serologisch aktive Substanzen in den organischen Bestandteilen der Havers'schen Kanäle lokalisieren.

*Diese Studie wurde im wesentlichen durch ein Stipendium der Alexander-von-Humboldt-Stiftung ermöglicht

Sonderdruckanfragen an: B. Brinkmann

Schlüsselwörter: ABO-Bestimmung an Knochen, Immunhistochemie (PAP-Methode) – Blutgruppensubstanzen des ABO-Systems in Knochen, Extraktion

Einleitung

In zahlreichen Publikationen wurde über die Bestimmung der ABO-Blutgruppen an Knochen menschlicher Leichen berichtet [7, 8, 18, 22, 31, 32, 33]. In der Regel kam die Absorptions-Elutionstechnik zur Anwendung. Hierbei waren Untersuchungsbefunde von frischem Material immer eindeutig zuzuordnen. Jedoch ergaben sich bei faulendem Knochengewebe aufgrund unspezifischer serologischer Reaktionen Schwierigkeiten bei der Befundinterpretation [1, 10, 11, 12, 29, 30]. Ursächlich dafür ist der Einfluß verschiedener Fäulnisbakterien [6, 23, 26, 27, 28].

Blutgruppensubstanzen sind im Knochengewebe nachweisbar, bisher jedoch nicht eindeutig lokalisiert. Sie scheinen mehr auf Gewebeantigene der Knochen zurückzuführen zu sein als auf erythrozytäre Antigene [9]. Unabhängig voneinander stellten Scheibe [25], Kirst [16], Bayer [2] und Kellermann [14, 15] fest, daß ABO-Aktivität im Knochengewebe durch das Se-Gen gesteuert wird. Grundlegende Arbeiten von Grupp und Ceppellini [nach 24] über die Kontrolle der Synthese von ABO- und Le-Substanzen in Körpergeweben und –flüssigkeiten wurden kürzlich von Oriol weitergeführt. Er postuliert das endo- und ektodermale Modell der genetischen ABH-Synthesekontrolle [19, 20, 21]. Hiernach sollen ABO-Substanzen in Endothelzellen, Erythrozytenmembranen, sensorischen Nervenfasern der Spinalganglien und damit auch in ihren terminalen Verzweigungen im Knochengewebe vorhanden sein. Sie entstehen auf dem Gerüst des 2. Präkursortyp (Laktoneo-), sind unabhängig von Se- und Le-Gensteuerung und sind ektodermaler Herkunft. Ein weiterer Teil von Blutgruppensubstanzen wird vom Plasma an die Erythrozytenmembran absorbiert und ist endodermaler Herkunft [1. und 2. Präkursortyp (Lakto- und Laktoneo-)] und wird von den Le- und Se-Genen kontrolliert. Knochengewebe besteht zu ca. 35% aus organischem Material: u. a. Gefäße, Nervenzellen, Osteozyten, intrazelluläre Knochensubstanzen, Kollagenfasern. Jede dieser genannten Komponenten könnte als potentieller Antigen-Träger in Frage kommen.

Ziel dieser Studie ist es daher, die ABH-Antigene den entsprechenden Komponenten zuzuordnen.

Material und Methoden

Von sechs menschlichen Leichen mit folgenden Blutgruppenzugehörigkeiten:

1. 0, Le(a-b+)
2. A₁B, Le(a-b-)
3. A₁, Le(a+b-)
4. A₂, Le(a+b-)
5. A₁, Le(a-b-)
6. B, Le(a+b-)

wurden Fragmente des Femur entnommen, von Weichteilhaftungen befreit und anschließend nach drei verschiedenen Verfahren aufgearbeitet:

A. Es wurden jeweils ca. 1 mm dicke Knochenscheiben in Formalin fixiert und anschließend mit 10%iger EDTA-Lösung (pH 7,0) dekalzifiziert. Aus den so entkalkten Knochenscheiben wurden histologische Kryostat-Schnitte (15–20 µm) hergestellt. Diese wurden auf einer Tüpfelplatte der folgenden enzymimmuno histochemischen PAP-Methode unterzogen [4, 22]:

1. Vorbehandlung zur Entfernung endogener Peroxidasen:
30 min Inkubation in 1%igem H₂O₂ in Methanol
2. Blockieren unspezifischer Antikörperbindungsstellen:
Inkubation in 1:20 verdünntem Schweineserum
3. Absorptionsphase mit Antisera¹:
 - a) – Seraclone Anti-A, Biotest, Art. Nr. 801320 – Verdünnung 1:10
– Seraclone Anti-B, Biotest, Art. Nr. 801345 – Verdünnung 1:10
– Monoclonal Anti-H, Dakopatts, Code No. A 583 – Verdünnung 1:50
 - b) – Rabbit antiserum to mouse IgM, Bionetics, Cat. 8403-09 – Verdünnung 1:500
– Rabbit anti-mouseimmunglobulins, Dakopatts, Code Nr. Z 259 – Verdünnung 1:50
 - c) – Swine anti-rabbitimmunglobulins, Dakopatts, Code Nr. Z 196 – Verdünnung 1:100
 - d) – PAP (rabbit), Dakopatts, Code Nr. Z 113 – Verdünnung 1:100
4. Visualisierung der Reaktion durch Zufügen von H₂O₂ und 3-Amino-9-Ethylcarbazol (Sigma No. A-5754) als Substrat; 20 min Inkubation)
5. Gegenfärbung mit Hämatoxylin 30–60 sec
6. Mikroskopische Auswertung

B. Knochenfragmente der vorstehend aufgeführten Leichen 1. bis 4. wurden pulverisiert. Anschließend wurden sie während 24 Std mehrfach mit Aqua dest und nachfolgend mehrfach mit Aceton gewaschen. Der letzte Waschgang erfolgte mit 50°C warmem Aceton. Nach Dekalzifizierung mit EDTA-Lösung (pH 7) wurden sie erneut im Aqua dest und Aceton gewaschen.

Von den so erhaltenen 4 verschiedenen Knochenpulvern wurden 2 (die mit den Blutgruppen 0 bzw. A₂) intensiv fraktionsweise mit Aqua dest gewaschen. Jede Waschfraktion wurde nach Einengen auf Peroxidase-Aktivität mit Hilfe der „Kastle-Meyer-Reaktion“ überprüft. Nach 6 Waschfraktionen (insgesamt 90 min) war keine Peroxidase-Aktivität mehr nachweisbar.

Alle 4 Knochenpulver wurden sodann mit 1:1 eines Phosphatpuffer-Butanolgemisches über 72 Std erschöpfend extrahiert [17, 34]. Die Butanolphasen wurden jeweils vereinigt und bei 45°C am Rotationsverdampfer auf 10 ml konzentriert. Durch Zentrifugation wurde der verbliebene Butanol-Überstand abgetrennt und zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde in Anlehnung an Brockhaus [5] in ein Gemisch aus Chloroform:Methanol:Wasser (8:4:2,4) aufgenommen. Durch kräftiges Schütteln entstand eine Suspension. Nach Zentrifugation wurde die obere Phase gewonnen. Die untere Phase wurde noch zweimal mit der sog. „theoretischen oberen Phase“ des Lösungsmittelgemisches Chloroform:Methanol:Wasser (8:4:2,4) ausgeschüttelt. Die vereinigten Überstände wurden zur Trockene eingeeengt; der verbliebene Rückstand wurde in 1 ml Chloroform:Methanol (2:1) aufgenommen und zentrifugiert. Jeweils 10, 20, 30 und 40 µl des Überstandes wurden in flachbodigen Plastikröhrchen mit Stickstoff abgedampft. An dem so erhaltenen Rückstand wurde die Absorptions-Elutionstechnik durchgeführt. Die hierbei verwendeten Antisera waren polyklonales Anti-A (Behring

¹Entfernen nicht absorbierter Antikörper durch mehrmaliges Waschen in 0,5 M TBS (pH 7,6)

ORVE 20/21), polyklonales Anti-B (Behring, ORVF 20/21) mit einem Titer von 1:128 und Lectine UEA-1 (Medac, Nr. L-2201) in einer Verdünnung 1:30.

Je 50 µl des Überstandes wurden in einem Doppelansatz dünn-schichtchromatographisch an Kieselgel 60 (HPTLC-Aluminiumplatten) mit dem Laufmittel Chloroform:Methanol:Wasser (65:35:8) aufgetrennt. Anschließend wurden die Aluminiumplatten in Streifen geschnitten, so daß nun 4 Zwillings-Chromatogramme vorlagen. Der eine Teil jedes Zwillings-Chromatogramms wurde dem unspezifischen Nachweis für Zuckerverbindungen mit 0,5% iger Orcin-Lösung (Serva Nr. 31180) in 2 N-H₂SO₄ mit anschließender 15-minütiger Trocknung bei 110°C unterzogen und zur Zuordnung der Banden auf den anderen unbehandelten Teil jedes Zwillings-Chromatogramms herangezogen. Aus diesem wurde jeweils in dem zu erwartenden Bandenbereich das Kieselgel abgekratzt, zweimal mit Chloroform:Methanol (2:1) extrahiert, das Lösungsmittel abgedampft und an den Konzentraten die Absorptions-Elutionstechnik durchgeführt.

C. Versuchsweise wurde an einigen Chromatogrammen der Blutgruppensubstanznachweis mit der PAP-Methode durchgeführt. Die Methode ist analog zu derjenigen, die bereits zum Nachweis der Glykosphingolipide der ABH- und Le-Blutgruppensubstanzen aus Erythrozyten beschrieben wurde [13]. Erste Versuche wurden mit dem Restmaterial der unter B. beschriebenen Methode durchgeführt. Nach schwachem Reaktionsausfall wurde die dabei eingesetzte Knochenmenge bei erneuter Aufarbeitung auf ca. 200 g Ursprungsgewicht angehoben. Bei diesem Material handelte es sich um Knochengewebe eines Trägers der Blutgruppe A₁B, Le(a-b+).

Ergebnisse

A. Die Durchführung der PAP-Technik an Kryostatschnitten von Knochengewebe ergab bei mikroskopischer Beurteilung positive serologische Reaktionen des organischen Gewebes in den Havers'schen Kanälen: Gefäßwänden, Erythrozyten, Nervenfasern (?) und dem Osseomukoid, welches als Belag auf der Wand der Havers'schen Kanäle des Knochens vorhanden ist. Diese Reaktionen konnten mittels Antikörper-Enzym-Substratreaktion und der daraus resultierenden Einfärbung sichtbar gemacht werden. Weiterhin ergaben sich spezifische blaßrote Einfärbungen des Bindegewebes der Havers'schen Kanäle. Eine positive Reaktion ließ sich jedoch nicht in sämtlichen Kanälen feststellen. In zwei Fällen (A₁ und A₂) wurde stellenweise eine unspezifische Reaktion des Osseomukoids und des Bindegewebes mit Anti-B-Antiserum beobachtet. In sämtlichen untersuchten Fällen erwiesen sich die Osteozyten und Kollagenfasern als serologisch inaktiv.

B. Serologische Aktivität wurde nur in Knochenextrakten der Blutgruppen A₁B, A₁ und A₂ nachgewiesen. Der Extrakt von Knochen der Blutgruppe 0 war serologisch inaktiv (siehe Tabelle 1).

In Abbildung 1. sind die mit Orcin angefärbten Chromatogramme dargestellt. Die mit den Ziffern I-V bezeichneten Bandenbereiche wurden in den unbehandelten Zwillingschromatogrammen abgekratzt und extrahiert.

Zwischen den 4 Chromatogrammen existieren geringe Unterschiede in der Intensität: Bei zusätzlicher Aqua-dest-Spülung ist diese schwächer (Position 1, 4) als ohne Spülung (Position 2, 3). Serologische Aktivität wurde nur in den Kieselgel-Eluaten aus den Feldern III der Positionen 2, 3 und 4 nachgewiesen. Bei Unterteilung des Feldes III in IIIa (untere Zone: 2 Banden) und IIIb (obere

Tabelle 1. Serologische Aktivität der Knochenextrakte Ausprägung durch Einteilung der Agglutinationsstärke von – bis +++ dargestellt

	10 µl				20 µl				30 µl				40 µl			
	0	A ₁ B	A ₁	A ₂	0	A ₁ B	A ₁	A ₂	0	A ₁ B	A ₁	A ₂	0	A ₁ B	A ₁	A ₂
α	–	+	+	–	–	+	+	±	–	++	+	+	–	+	+	+
β	–	+	–	–	–	+	–	–	–	++	–	–	–	+	–	–
UEA	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

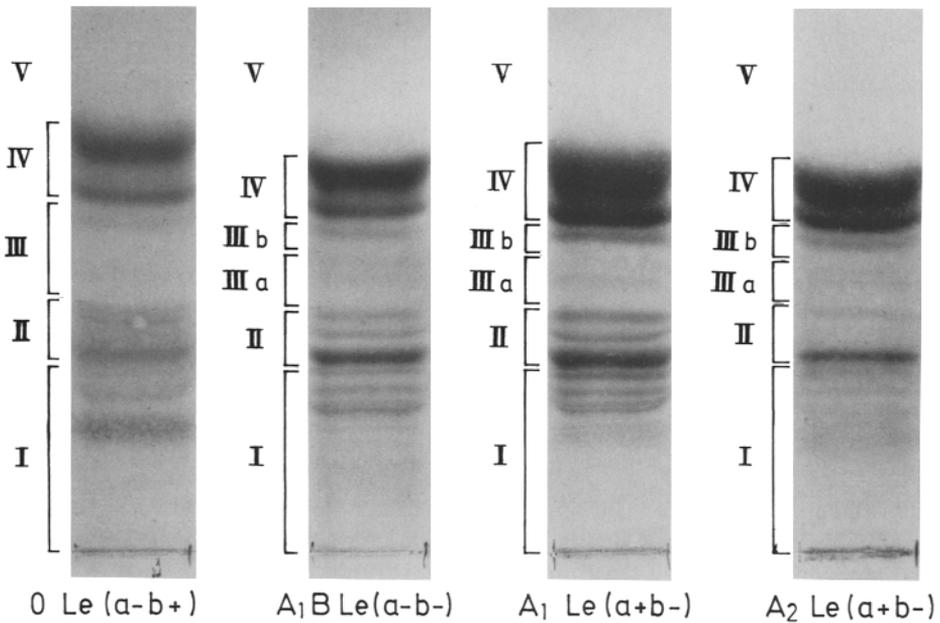


Abb.1. Dünnschichtchromatogramme von Knochenextrakten nach Anfärbung mit Orcin

Zone: 1 Bande) zeigte sich, daß diese Aktivität in der oberen Zone (IIIb) stärker war. Eine Ausnahme bildet das Feld III in Position 2 (Knochen A₁B): Die serologische Aktivität der A-Substanz wurde im Bereich der Zonen IIIa und IIIb nachgewiesen, während jene der B-Substanz nur im Bereich der unteren Zone (IIIa) nachgewiesen wurden.

C. Die aus Knochengewebe der Blutgruppenträger A₁B, A₁ und A₂ extrahierten Glycosphingolipide der Blutgruppensubstanzen ergaben nach Anwendung der PAP-Technik auf den Chromatogrammen Reaktionen in Form von schwach hellrot eingefärbten Banden. Diese Anfärbungen waren serologisch spezifisch. Chromatogramme von Knochenextrakten der Blutgruppe 0 reagierten negativ.

Ein Vergleich der Zwillingschromatogramme: Orcin – PAP-Technik zeigte, daß neben den im Bereich der Zonen IIIa und IIIb auftretenden positiven PAP-Reaktionen auch schwach positive PAP-Reaktionen in Höhe der Zonen I und

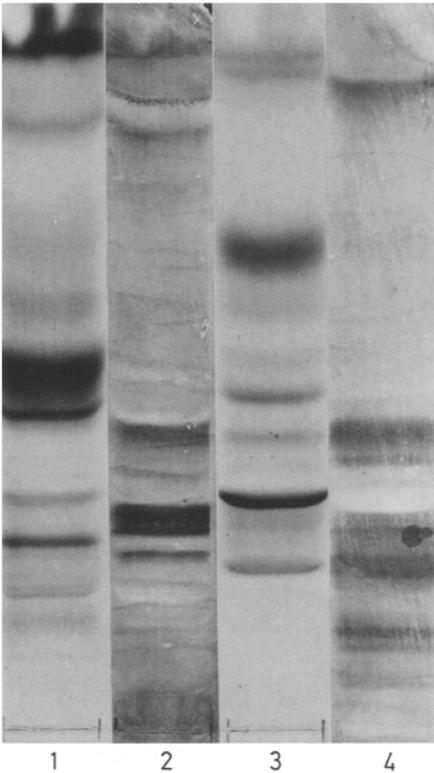


Abb. 2. Zwillingschromatogramme eines Knochenextraktes (A_1B) Pos. 1, Pos. 2 und eines Erythrozyten-Membranextraktes (A_1) Pos. 3, Pos. 4. Pos. 1, Pos. 3: Anfärbung mit Orcin; Pos. 2, Pos. 4: Anfärbung der A-aktiven Glykosphingolipide mittels der PAP-Methode

II vorlagen. Nicht alle PAP-positiven Banden der Zonen I und II wiesen Äquivalente auf den mit Orcin behandelten Chromatogrammen auf. Dagegen hatten die meisten Orcin-positiven Banden auf allen Zonen (I–V) keine Äquivalente auf den mit der PAP-Technik behandelten Chromatogrammen.

Das Chromatogramm des Knochenextraktes der Blutgruppe A_1B zeigte im Bereich der Zone IIIb weder bei Anwendung der Absorptions-Elutionstechnik noch bei der PAP-Technik serologische B-Aktivität (siehe Abschnitt B).

Die deutlichste Reaktion der A-aktiven Glykosphingolipide ließ sich auf einem Chromatogramm eines Knochenextraktes, das aus 200 g statt nur 100 g Knochenmaterials der Blutgruppenzugehörigkeit A_1B Le(a–b+) gewonnen worden war, beobachten (Abb. 2).

Diskussion

In bisherigen Veröffentlichungen wurde die Lokalisation der Blutgruppensubstanzen in Knochengewebe nicht definiert. Anfänglich bestand die Überlegung, ob serologische Aktivitäten in bestimmten Strukturen des Kompaktknochens vorliegen. Mittels PAP-Technik konnten ABH-Aktivität in den inneren Schichten der Gefäßwände, Erythrozyten, Nervenfasern (?), im Osseomukoid, das die Wände der Haver'schen Kanäle auskleidet und am schwächsten im Binde-

gewebe der Havers'schen Kanäle festgestellt werden. Da die Anwendung der Gefrierschnitt-Technik zu einer erheblichen mechanischen Beeinträchtigung des Gewebes führt, war die Zuordnung der morphologischen Strukturen nicht immer eindeutig möglich. Dieses traf insbesondere auf die Nervenfasern zu.

Der Nachweis serologischer Aktivität im Osseomukoid- und Bindegewebe – unabhängig vom Le-Status – war unerwartet. In zwei Fällen traten zusätzlich hier stellenweise unspezifische serologische Reaktionen auf. Aus der Literatur ergaben sich bisher keine Anhaltspunkte für serologische Aktivitäten in den genannten Strukturen.

Die Grundsubstanz des Bindegewebes weist eine große Menge an Mukopolysacchariden, bestehend u. a. aus Aminozuckern, auf. Ähnliche Eigenschaften besitzt das Osseomukoid, das die Grundsubstanz der interzellulären Knochensubstanz bildet. Die strukturelle Ähnlichkeit in der Bauweise von Blutgruppensubstanzen mit diesen Strukturen könnte eine Erklärung für mögliche Kreuzreaktionen sein.

Bisher sind einige Arbeiten erschienen, die Extraktionsverfahren zur Gewinnung von Blutgruppensubstanzen aus Knochengewebe beschreiben. Borgognini hat Versuche dieser Art an der Spongiosa des Knochens durchgeführt und setzte dazu Extraktionsverfahren auf wässriger Basis ein [3]. Mit diesem Extraktionsmittel ist es unserer Meinung nach nicht möglich, reine blutgruppenspezifische Substanzen zu isolieren, lediglich morphologische Strukturen, mit denen die Antigene verknüpft sind, z. B. Endothelzellen oder Fragmente von Erythrozyten-Membranen. – In einer anderen Untersuchung wurde kompaktes Knochengewebe in 83%igem Ethanol extrahiert [12]. Darin konnten serologisch aktive Substanzen des ABO-Systems nach Abkühlung auf -10°C im Präzipitat nachgewiesen werden. In der vorliegenden Untersuchung wird eine *n*-Butanol-Extraktion beschrieben, die bislang bei der Isolierung von blutgruppenspezifischen Substanzen aus Erythrozyten-Membranen erfolgreich angewendet worden ist [17, 34].

Chromatogramme von Knochenextrakten, die mit Orcin angefärbt wurden, wiesen eine Reihe von Banden auf (Abb. 1). Dabei handelt es sich zumeist um serologisch inaktive Zuckerverbindungen. Nur die Kieselgel-Extrakte des Feldes III auf den unbehandelten Chromatogrammen wiesen im Absorptions-Elutionstest serologische Aktivität auf (Abb. 1). Dieses Ergebnis wurde durch die anschließende Untersuchung mit der PAP-Methode bestätigt. Hierbei wurde außerdem serologische Aktivität im Bereich der Felder I und II nachgewiesen. Es stellt sich somit die Frage, warum die Aktivität der Felder I und II nicht mit der Absorptions-Elutionsmethode nachweisbar war. In den Bereichen der Felder I und II gab es neben den serologischen aktiven Banden auch Anfärbungen durch serologisch inaktive Zucker (Abb. 2). Nach dem Eluieren der blutgruppenaktiven Glykosphingolipide, zusammen mit den entsprechenden serologisch inaktiven Zuckern vom Kieselgel, wurden die Eluate abgedampft und mit den bei der Absorptions-Elutionsmethode verwendeten Antiseren überschichtet. Durch Überschichtung mit diesen wässrigen Antikörperlösungen werden vorhandene leicht lösliche Zuckerverbindungen und hiervon mitgerissenen Glykosphingolipide in Lösung gebracht und durch die Spülvorgänge während der Absorptions-Elutionsmethode ausgewaschen. Sie stehen somit anschließend für

die eigentliche Nachweisreaktion nicht mehr zur Verfügung. Im Feld III waren die serologisch neutralen Zucker dagegen nicht nachweisbar.

Obwohl die Knochen der Blutgruppenzugehörigkeit A₂ zusätzlich bis zum Verschwinden der Peroxidase-Aktivität gespült wurden, war sowohl im Knochenextrakt direkt als auch auf den entsprechenden Chromatogrammen serologische Aktivität nachweisbar. Das bestätigt, wie die mikroskopischen Untersuchungen bereits gezeigt hatten, daß die serologische Aktivität des Knochens durch Erythrozyten und Gewebsantigene bestimmt wird. Knochen mit H-Blutgruppenaktivität wurden analog gespült. Hier war jedoch weder im Knochenextrakt direkt noch auf den entsprechenden Chromatogrammen serologische Aktivität vorhanden. Ursächlich dafür könnte sein, daß während der intensiven Spülung nicht nur Erythrozytenmembranen, sondern auch die Gewebsträger der blutgruppenspezifischen Substanzen abgetrennt wurden. Im Einklang damit steht, daß auch der Nachweis der serologischen Aktivität im Kryostatschnitt mittels PAP bei diesen Knochen (Blutgruppe H) am schwächsten war.

An den Chromatogrammen des Knochenextraktes der Blutgruppe A₁B war in der Zone IIIb mittels der PAP-Technik keine B-Aktivität nachweisbar. Die gleiche Beobachtung wurde an den Extrakten von A₁B Glykosphingolipiden aus Erythrozytenmembranen gemacht [13]. Dieses Phänomen ist erklärbar durch eine Verschiebung der Glykosphingolipide A und B mit gleicher Zuckerkettenlänge aufgrund der Anwesenheit einer Acetylgruppe in der A-Determinanten gegenüber der stärker polaren Hydroxylgruppe in der B-Determinanten.

Aus den vorstehenden Ausführungen werden abschließend folgende Kernsätze formuliert:

1. Im Kompaktknochengewebe nachweisbare ABH-Blutgruppensubstanzen sind sowohl Gewebe- als auch erythrozytäre Antigene.
2. ABH-Aktivität ist in den Endothelzellen, Erythrozytenmembranen, im Osseomukoid, im Bindegewebe und in den Nervenfasern (?) festgestellt worden.
3. Für serologische Untersuchungen im Knochengewebe kommen neben den bisher bekannten Methoden sowohl die enzymimmunochemische PAP-Methode als auch die dünn-schichtchromatographische Auftrennung von Glykosphingolipiden aus Knochenextrakten mit anschließendem Nachweis mittels Absorptions-Elutions- oder PAP-Technik infrage.

Danksagung. Die Autoren bedanken sich für die hilfreiche und freundliche Unterstützung bei den Mitarbeitern Dr. Jürgen Lenz und Petra Ritter.

Literaturverzeichnis

1. Berg S, Bertozzi B, Meier R, Mendritzki S (1983) Vergleichend-methodologischer Beitrag und kritische Bemerkungen zur Interpretation von Blutgruppenbestimmungen an Mumienrelikten und Skelettfunden. *Anthrop Anz* 41: 1-19
2. Beyer S (1962) Über den Nachweis gruppenspezifischer Substanzen im Knochen. *Med Diss Greifswald*
3. Borgognini SM (1968) New trends in blood group determination in human bones. *Proc VIIth Intern Congr Anthropol Sci, Tokyo-Kyoto*, 144

4. Brinkmann B, Kernbach G, Rand S (1986) Cytochemical detection of ABH antigens in human body fluids (1986). *Z Rechtsmed* 96:111–117
5. Brockhaus M (1985) Detection of glycolipid antigens with monoclonal antibodies. *Immunol Methods* III:133–145
6. Cameron C, Graham F, Dunsford I, Sickles G, Macpherson CR, Cahan A, Sanger R, Race RR (1959) Acquisition of AB-like antigen by red blood cells. *British Med J* 2:29–32
7. Ezra-Cohn HE, Cook SF (1961) Blood typing compact human bone tissue. *Nature* 191:1267–1268
8. Hauser R, Raszeja S (1982) Thermostabilit e de l'estimation des antig enes des groupes ABO dans les os humains. XII Kongre  der Internationalen Akademie f ur gerichtliche und soziale Medizin, Wien 17.–22. Mai 1982, 573–576
9. Hauser R (1984) Ocena przydatno ci bada  serologicznych ko ci do okre lania grupy krwi nieznanych zwok. *Probl Krym* 165:405
10. Hauser R, Raszeja S, Pawlowski R, Samet A (1984) Mikrobielle Kontamination der Antigene ABO im Knochengewebe. *Z Rechtsmed* 92:189–197
11. Hauser R (1986) Der Versuch einer Einsch tzung der Blutgruppenzugeh rigkeit von Knochen, die dem Verwesungsproze  unterliegen. *Z Rechtsmed* 96:49–55
12. Hauser R (1988) Essai de l'explication du m canisme de l'apparition des r cations non sp cifiques dans des os soumis   la putr faction. *Acta medicinae legalis et socialis* (im Druck)
13. Hauser R, Rand S, Lenz J, Brinkmann B. Nachweis von Glycosphingolipid-Antigene ABH und Lewis auf D nnschichtplatten mittels der PAP-Methode. *Z Rechtsmed* (im Druck)
14. Kellermann G (1971) Methodological investigations on the ABO-typing of ancient bones. *Humangenetik* 14:50–55
15. Kellermann G (1972) Further studies on the ABO-typing of ancient bones. *Humangenetik* 14:232–236
16. Kirst R, Landes B (1971)  ber ABO-Bestimmungen am kompakten Knochen. *Kriminalistik und forensische Wissenschaften* 6:99–112
17. Koscielak J, Miller-Podraza H, Zdebska E (1978) Isolation of poly-(glycosyl)-ceramides with A, B, H, and I blood-group activities. *Methods in Enzymol. Complex Carbohydrates. Vol L, Part C*: 211–216
18. Makowski A, Stec J (1977) Oznaczenie antygen w układu ABO w ko ciach ludzkich. *Probl Krym* 130:743–751
19. Oriol R (1987) ABH and related tissue antigens. *Biochem Soc Transactions*. 621st Meeting, Lond: 596–699
20. Oriol R, Pendu J, Mollicone R (1986) Genetics of ABO, H, Lewis X and related antigens. *Vox Sang* 51:161–171
21. Oriol R, Pendu J, Sparkes RS, Sparkes MC, Christ M, Gale RP, Terasaki PI, Bernoco M (1981) Insight into the expression of ABH and Lewis antigens through human bone marrow transplantation. *Am J Hum Genet* 33:551–560
22. Pedal I, H lle J (1984) Immunenzymatische Bestimmung des ABO- und Sekretorstatus an paraffineingebettetem Autopsiematerial. *Z Rechtsmed* 93:289–300
23. Pereira M (1973) ABO grouping of decomposed human tissue. *J Forens Sci Soc* 13:33–36
24. Race R, Sanger R (1975) *Blood Groups in Man*. Blackwell Scient Publ, Oxford
25. Scheibe E, Gibb B, Beyer S (1962) Zum Nachweis von blutgruppenaktiven Stoffen im Menschenknochen. *Dtsch Z Gerichtl Med* 52:220–230
26. Seyfriedowa H (1961) Czynniki T i jego znaczenie w serohematologii sadowej. *Praca habilitacyjna*, Pozna 
27. Springer G, Williamson P, Brandes WC (1961) Blood group activity of gramnegative bacteria. *J Exp Med* 113,4:1077–1093
28. Springer G (1970) Importance of blood-group substances interactions between man and microbes. *Ann New York Sciences* 169:134–152
29. Thieme FP, Otten CM, Sutton HE (1956) A blood typing of human skull fragments from the pleistocene. *Am J Phys Anthropol* 14:437–443

30. Thieme FP, Otton CM (1957) The unreliability of blood typing aged bone. *Am J Phys Anthropol* 15:387–397
31. Weinberg H, Makin M (1959) A and B antigens in human bone tissue. *J Bone Joint Surg* 41B, 1:151–153
32. Yada S, Okane M, Sano Y (1966) A simple method for bloodgrouping bone fragments. *Acta Crim Japon* 32:99–101
33. Yada S, Tsugawa N, Uchida H, Yamada S (1972) Blood grouping of the compact bone tissue. *Acta Crim Japon* 38:113–117
34. Zdebska E, Chelstowska A, Zieleński J, Lenkiewicz B, Kościelak J (1982) Fucosyltransferase may promote complexity of polyglycosyl conjugates of erythrocyte membranes. *Biochim et Biophys Acta* 717:1–5

Eingegangen am 3. Oktober 1988