

## **Nachweis von Glykosphingolipiden der ABH- und Le-Antigene auf Dünnschichtplatten mittels der PAP-Methode\***

**R. Hauser<sup>1</sup>, S. Rand<sup>2</sup>, J. Lenz<sup>2</sup>, und B. Brinkmann<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Institut für Rechtsmedizin der Medizinischen Akademie Gdansk, Curie Sklodowskiej 3a, PL-80–210 Gdansk, Polen (Stipendiat der Alexander-von-Humboldt-Stiftung)

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

### **Detection of Glycosphingolipid antigens ABH and Lewis on thin-layer plates using the PAP-method**

**Summary.** Stroma from hemolyzed erythrocytes of blood groups 0, A<sub>1</sub>, B and A<sub>1</sub>B were obtained and subjected to butanol/phosphate buffer extraction. This extract was separated using HPTLC, and the ABH and Le substances were detected on the chromatogram using the PAP technique. The staining of the bands allowed specific demonstration of the serologically active glycosphingolipids present in the ABH and Le blood group substances. The antigens of the AB0 system showed a 3- to 12-band pattern. Each of the antigens Le<sup>a</sup> and Le<sup>b</sup> presented 3 bands. The slight differences in the levels of glycosphingolipids of equal chain lengths are probably due to differences in their chemical structures.

**Key word:** Glycosphingolipids of ABH and Le blood group substances, PAP method

**Zusammenfassung.** Aus hämolysierten Erythrozyten der Blutgruppe 0, A, B, and A<sub>1</sub>B wurde die Membranmasse gewonnen und einer Butanol-Phosphatpufferextraktion unterzogen. Die so gewonnenen Extrakte wurden mittels HPTLC aufgetrennt. An den Chromatogrammen wurde der ABH- und Le-Nachweis mittels PAP-Technik durchgeführt. Die hierbei erzielte Bandenanfärbung erlaubt die spezifische Darstellung der serologisch aktiven Glykosphingolipide der ABH- und Le-Blutgruppensubstanzen. Die

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

*Sonderdruckanfragen an:* B. Brinkmann

Antigene des AB0-Systems zeigen sich in Gestalt von 3- bis 12-bandigen Mustern. Die Antigene Le<sup>a</sup> und Le<sup>b</sup> weisen jeweils 3 Banden auf. Kleine Verschiebungen in den Höhenniveaus der Glykosphingolipidgruppen der gleichen Kettenlänge des AB0-Systems können auf Unterschiede im chemischen Antigenaufbau zurückgeführt werden.

**Schlüsselwort:** Glykosphingolipide der ABH- und Le-Substanzen, PAP-Methode

## Einleitung

Der Blutgruppennachweis an forensischen Substraten hat seine Grenzen dort, wo durch bakterielle Glykosidasen, Deacetylasen und Glykosyltransferasen determinierende Zuckermoleküle entweder entfernt oder angefügt werden. In Folge entstehen „neue“ Blutgruppen [5, 21, 23]. Serologische Methoden sind dann nicht mehr imstande, Artefakte von „wahren“ Werten zu unterscheiden. Immunhistochemische Methoden haben einen wesentlichen Teil dieser Lücke geschlossen, da ihr Reaktionsausfall an morphologische Strukturen gebunden ist [3, 12, 19, 20]. Sie haben ihre Grenzen dort, wo der Zersetzungsprozeß weiter fortgeschritten ist. Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, eine auch dann noch brauchbare Methode zu erarbeiten und ihre Aussagefähigkeit zunächst an optimalen Substraten zu überprüfen.

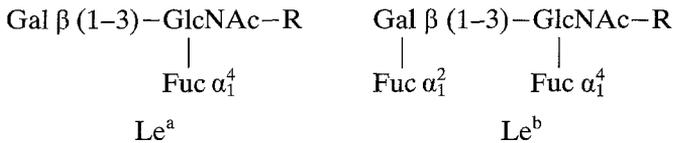
### *Derzeitiger Wissensstand*

Bis heute sind zahlreiche Publikationen erschienen, die die aus Erythrozyten extrahierten Glykosphingolipidketten der Blutgruppensubstanzen beschreiben. Die Untersuchungen wurden vorwiegend unter Anwendung von chemisch-analytischen Methoden durchgeführt [6, 8, 13, 14, 30]. U. a. durch Morgan und Watkins wurden die Synthesemechanismen sowie die Trägerstrukturen der AB0- und Lewis-Antigen-Determinanten aufgeklärt. Diese Antigene finden sich in zwei grundsätzlich unterschiedlichen chemischen Stoffklassen: Als Glykosphingolipide – Verbindungen aus einer Zuckerkette und einem Lipid, welches aus Fettsäuren und Sphingosin besteht – und als Glykoproteide – hier ist die Zuckerkette an jeweils unterschiedliche Proteine gekoppelt. Die frühere klassische Unterteilung in wasserlösliche Antigene – Glykoproteine – und membrangebundene Antigene – Glykosphingolipide – ist durch die Tatsache relativiert, daß membrangebundene Antigene auch Glykoproteid-Natur haben und vice versa.

Bezüglich des Kohlenhydrat-Anteils existieren i. W. zwei Grundtypen [15, 28]:

- Lakto-Glykosylceramide (1. Präkursorbautypus/Kette 1)  
Gal β (1–3)–GlcNAc β (1–3)–Gal β (1–4)–Glc–Cer
- Laktoneo-Glykosylceramide (2. Präkursorbautypus/Kette 2)  
Gal β (1–4)–GlcNAc β (1–3)–Gal β (1–4)–Glc–Cer

Die Le<sup>a</sup>- und Le<sup>b</sup>-aktiven Glykosphingolipide gehören der ersten der o. g. Ketten an:



In den letzten Jahren wurde die Hypothese von Grubb und Ceppellini [24] über die Kontrolle der Biosynthese von ABH- und Le-Substanzen durch Oriol weiterentwickelt. Dieser führte das endo- und ektodermale Modell der genetischen ABH-Synthesekontrolle ein. Seit relativ kurzer Zeit wird erfolgreich versucht, die ABH-Glykosphingolipide mit Hilfe von radioimmunologischen Methoden nachzuweisen [1, 2, 7, 25, 27].

## Material und Methoden

### a. Untersuchungsmaterial

Die untersuchten Erythrozytenmassen stammten von:

- 5 Personen der Gruppe A<sub>1</sub> - diese waren z. T. Le(a+), z. T. Le(b+), so daß die Mischung Le(a+b+) war;
- 1 Person der Gruppe B - Le(a-b+);
- 1 Person der Gruppe A<sub>1</sub>B - Le(a+b-)
- 1 Person der Gruppe 0 - Le(a-b-).

### b. Hämolyse

Die Erythrozytenmasse wurde im Verhältnis 1 : 5 mit Aqua dest (4°C) versetzt und mit 3%iger eiskalter Essigsäure auf pH 5.5 eingestellt. Anschließend Zentrifugation und mehrfaches Waschen des Sediments mit Aqua dest.

### c. Butanolextraktion

Je 50 ml Erythrozytenmembranen der jeweiligen Gruppe wurden jeweils 24 Stunden mit verschiedenen Butanol/Phosphatpuffer-Mischungen extrahiert [13, 29]:

- 1. 200 ml Phosphatpuffer (0.02 M, pH 7.5)  
+ 250 ml n-Butanol
- 2. + 3. 250 ml Phosphatpuffer (0.02 M, pH 7.5)  
+ 250 ml n-Butanol

Die aus jeder Gruppe erhaltenen Butanolphasen wurden auf jeweils 10 ml eingengt.

### d. Dialyse

Der durch Zentrifugation (2.5 min, 15000 U/min) gewonnene Überstand von jeweils 2 ml eingengter Butanolphase wurde mit 24 ml Aqua dest verdünnt und anschließend wieder auf ca. 4-5 ml eingengt. Dieser Extract wurde bei dreimaligem Wasserwechsel 48 h bei 4°C dialysiert (Visking-Dialyseschlauch, Serva Type 36/32). Die Dialysate wurden zur Trockene eingengt.

### e. Extraktion

In Anlehnung an Brockhaus [4] wurden die Rückstände 3 mal mit Chloroform:Methanol:Wasser (8:4:2.4) ausgeschüttelt, zentrifugiert (5 min, 5000 U/min), die oberen Phasen wurden jeweils gesammelt und zur Trockene eingengt.

### f. Dünnschichtchromatographie

Die Extrakte wurden in 1 ml Chloroform:Methanol (2:1) suspendiert und zentrifugiert (2.5 min, 15000 U/min). Je 30  $\mu$ l Überstand wurden strichförmig auf mit Kieselgel 60 (Merck) beschichteten HPTLC-Aluminiumplatten aufgetragen. Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte mit Chloroform:Methanol:Wasser (65:35:8). Nach Trocknen bei Raumtemperatur wurden die HPTLC-Platten in Streifen geschnitten, 2 min in 0.5% ige Plexigum P-28-Diethylether (Polyisobutylmetacrylat, Röhm, Darmstadt) getaucht und erneut bei Raumtemperatur getrocknet [10].

### g. Immunhistochemische Untersuchungen

Die DC-Streifen wurden 2 h mit 1% iger Rinderserumalbuminlösung (0.5 M TBS, pH 7.6) inkubiert. Die noch feuchten Plättchen wurden mit den für die PAP-Methode [3, 19, 20] üblichen Seren überschichtet (0.1 ml/1 cm<sup>2</sup>):

1. – Seraclone Anti-A, Biotest, Titer 1:4
  - Seraclone Anti-B, Biotest, Titer 1:4
  - Lektine UEA-1 Pure, Medac, Verdünnung 1:800
  - Mouse monoclonal anti H, Dakopatts, Verdünnung 1:20
  - Monoclonal Anti-Le<sup>a</sup>, Fresenius, Verdünnung 1:10
  - Monoclonal Anti-Le<sup>b</sup>, Fresenius, Verdünnung 1:10
2. – Rabbit anti-mouse, Bionetics, Verdünnung 1:500
  - Rabbit anti-UEA I, Medac, Verdünnung 1:100
  - Rabbit anti-mouse IgG, Dakopatts, Verdünnung 1:20
3. – Swine anti-rabbit IgG, Dakopatts, Verdünnung 1:100
4. – PAP (rabbit), Dakopatts, Verdünnung 1:100.

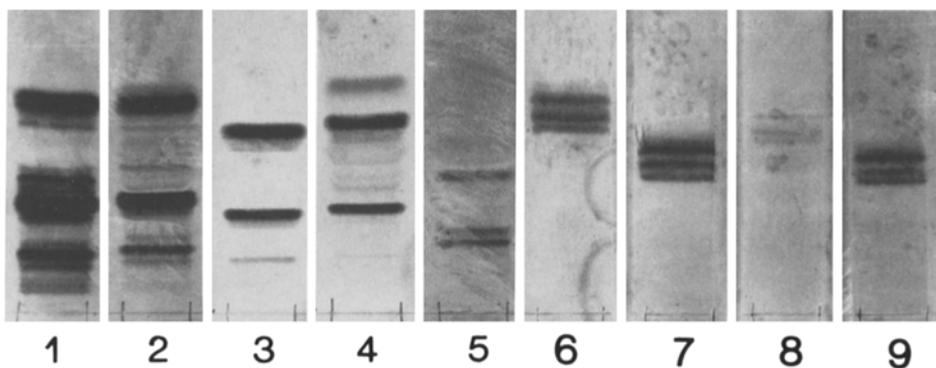
Alle Seren wurden mit 1% iger Rinderserumalbuminlösung verdünnt. Die Reaktion mit den ersten Seren (Pkt. 1) dauerte 2 h, die nächsten jeweils 40 min. Zwischen den einzelnen Reaktionen wurden die DC-Streifen mit einer TBS-Lösung (0.5 M, pH 7.6) abgespült.

Farbreaktionen wurden mit Hilfe von 3-Amino-9-Ethylcarbazol, N,N-Dimethylformamid, Na-Acetat-Puffer und 3% igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5–8 min) hervorgerufen.

## Ergebnisse

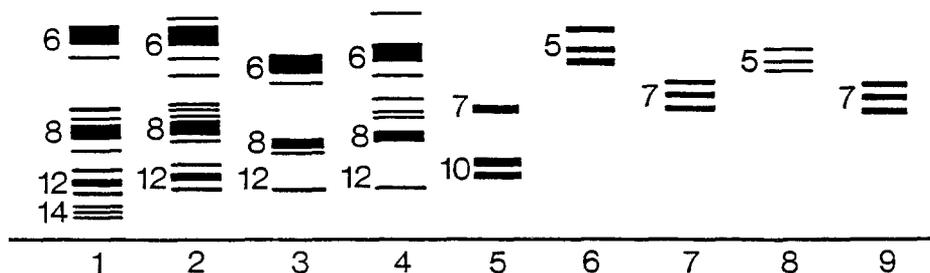
Die auf den Plättchen erkennbaren serologischen Reaktionen zwischen den chromatographisch aufgetrennten Glykosphingolipiden und den entsprechenden Antikörpern zeigen die Pos. 1–9 der Abb. 1. Darüber hinaus ist anzumerken:

- Extrakte der Blutgruppe 0 reagieren mit Anti-H-Serum schwächer als mit Ulex europaeus (letzte Reaktion ist in Pos. 5, Abb. 1 dargestellt);
- Extrakte der Blutgruppe A<sub>1</sub>B Le(a+b-) zeigen dasselbe Bandenmuster mit Anti-Le<sup>a</sup>-Serum wie Extrakte der Blutgruppen A<sub>1</sub> Le(a+b+) (Pos. 6);
- Extrakte der Blutgruppe A<sub>1</sub>B Le(a+b-) reagieren negativ mit Anti-Le<sup>b</sup>-Serum;
- Extrakte der Blutgruppe 0 Le(a-b-) reagieren negativ mit Anti-Le<sup>a</sup>- und Anti-Le<sup>b</sup>-Seren;



**Abb. 1a.** Nachweis von Glykosphingolipiden der ABH- und Le-Antigene an Kieselgel mittels der PAP-Methode

Pos. 1: A <sub>1</sub>	—	α	Pos. 6: A <sub>1</sub>	—	anti-Le <sup>a</sup>
Pos. 2: A <sub>1</sub> B	—	α	Pos. 7: A <sub>1</sub>	—	anti-Le <sup>b</sup>
Pos. 3: B	—	β	Pos. 8: B	—	anti-Le <sup>a</sup>
Pos. 4: A <sub>1</sub> B	—	β	Pos. 9: B	—	anti-Le <sup>b</sup>
Pos. 5: H	—	UEA-1			



**Abb. 1b.** (Schema)

– Extrakte der Blutgruppe A<sub>1</sub> und A<sub>1</sub>B reagieren deutlich positiv mit den entsprechenden Anti-A- und Anti-B-Seren; ausgesprochen schwach mit Ulex europaeus.

### Diskussion

Bei den chromatographisch/immunochemisch dargestellten Substanzen handelt es sich um kurzkettige Glykosphingolipide. Diese Substanzen wurden bis vor kurzem mit Hilfe chemischer und radioimmunologischer Methoden analysiert [1, 2, 6, 7, 13, 14, 30]. In dieser Untersuchung gelang der Nachweis mit einem kombinierten chromatographischen/immunochemischen Verfahren. Bezüglich der Le-Substanzen gelang erstmalig ein solcher Nachweis; diesbezüglich ist eine radioimmunologische Methode aus der zugänglichen Literatur nicht ersichtlich.

**Tabelle 1.** ABH-Antigene in Abhängigkeit vom Syntheseort

Untersuchungsmaterial		Endodermaler Ursprung – absorbiert aus Plasma	Ektodermaler Ursprung – produziert durch Zellen der Erythropoese
		1. Präkursortyp 2. Präkursortyp	2. Präkursortyp
A <sub>1</sub>	Le(a+b+)	+	+
B	Le(a-b+)	+	+
A <sub>1</sub> B	Le(a+b-)	-	+
0	Le(a-b-)	+ oder -	+

**Tabelle 2.** Serologische Aktivitäten der untersuchten Extrakte

		Aus Plasma absorbiert		Produziert durch Zellen der Erythropoese
		1. Präk.-Typ	2. Präk.-Typ	2. Präk.-Typ
A <sub>1</sub>	Le(a-b+)	A Le(b+)	A	A
A <sub>1</sub>	Le(a+b-)	Le(a+)		A
B	Le(a-b+)	B Le(b+)	B	B
A <sub>1</sub> B	Le(a+b-)	Le(a+)		A, B, AB
0	Le(a-b-)	H oder Non-H	H oder Non-H	H

Nach Oriol existieren zwei Modelle einer genetischen Synthesekontrolle der ABH-Substanzen [16, 17, 18]. Die in der vorliegenden Untersuchung extrahierten Glykosphingolipide lassen sich hiernach unterteilen in zwei Strukturklassen (s. Tabelle 1).

Dies bedeutet, daß die ABH-Substanzen unserer Glykosphingolipidextrakte unterschiedlicher Herkunft sind: Alle weisen aufgrund ihrer erythropoetischen Herkunft ABH-Substanzen des 2. Präkursortypus auf. Daneben haben die Extrakte der Blutgruppe A, B, möglicherweise auch 0 zusätzlich ABH-Substanzen aus dem Plasma absorbiert. Unter Berücksichtigung der unter „Vorbemerkungen“ dargestellten chemischen Formeln sind daher bezüglich unserer Extrakte folgende serologische Aktivitäten zu fordern (s. Tabelle 2).

#### *Zur Festlegung der Gliedrigkeit / des Kettentyps*

Le(a)- und Le(b)-Antigene der Positionen 6–9 (Abb. 1) können nur dem Präkursortyp 1 angehören und sind somit sekundär an die Erythrozytenmembranen absorbiert. Die Muster sind jeweils 3-bandig, und daher existieren entweder im Zuckeranteil oder im Ceramid-Anteil vermutlich geringgradige qualitative Unterschiede. Bei Le(a) sind die Zuckerketten definitionsgemäß 5-gliedrig, bei Le(b) sind sie entweder 6- oder 7-gliedrig. – Der Unterschied zwischen Le(a) und Le(b) besteht nicht nur in dem zusätzlichen Fucose-Molekül bei Le(b), sondern auch darin, daß erst dann an Kette 1 die endständige An-

knüpfung des ABH-determinierenden Zuckers möglich ist. – Beim Seit-zu-Seit-Vergleich der Le(b)-Banden der Pos. 7 mit der Pos. 1 findet sich in letzterer in entsprechender Region zwischen „6“ und „8“ eine sehr abgeschwächte Bande. Ähnliches gilt für das Le(b)-Muster der Pos. 9 im Vergleich zu Pos. 3 (zwischen „6“ und „8“). Zwei Deutungen sind möglich: Entweder ist die A- und B-Antigenität bei gleichzeitigem Vorhandensein des Le(b)-Antigens (auf demselben Molekül) extrem gering, oder es wird bei Vorhandensein von Le(b) nur an einen sehr kleinen Teil zusätzlich der A-, B- oder H-determinierenden Zucker angehängt. Im letzteren Fall müßte Le(b) überwiegend 6-gliedrig sein; in beiden Fällen jedoch würden die schwachen Banden der Pos. 1 und 3 7-gliedrig sein müssen, da hier auf jeden Fall auch der A- oder B-determinierende Zucker angeknüpft ist. – Aus dieser letzteren Feststellung folgt, daß die übrigen Banden der Pos. 1 und 3 (1.) durch den 2. Präkursortyp bestimmt werden, (2.) sich in logischer Reihenfolge den 6-, 8-, 12- und 14-gliedrigen Glykosphingolipiden zuordnen lassen.

Zu den Le-Mustern ist ein Nebenbefund erwähnenswert: In Pos. 8 finden sich drei schwache Le(a)-Banden an einem Extrakt des serologischen Phänotyps B Le(a–b+). Dies bedeutet, daß trotz serologischer Negativität die Le(a)-Substanz chemisch an den Erythrozyten vorhanden war und bestätigt auch den Befund, daß mehr als 90% der Menschen Le(a)-Substanz aufweisen sollen [26].

Bei weiterem Vergleich der Chromatogramme mit der Literatur zur Blutgruppensynthese [9, 11, 15] sind folgende Rückschlüsse möglich: Die Chromatogramme in den Pos. 1, 2, 3, und 4 sind bezüglich ihrer Kohlenhydrat-Kettenlänge definiert: In der Pos. 1 finden sich 6-, 8- 12- und 14-gliedrige Zuckerketten, die Kettenlängen in den übrigen Positionen ergeben sich aus der Abb. 1b. Eine genauere Begründung hierzu folgt. Im Originalchromatogramm fällt im Seit-zu-Seit-Vergleich eine gewisse Verschiebung zwischen scheinbar identischen Banden auf. Diese sind u. E. wie folgt erklärbar:

- Verschiebung der 6- und 8-gliedrigen Zuckerketten der Pos. 2 im Vergleich zu jenen der Pos. 3 kann durch die Acetylgruppe der A-Determinanten verursacht werden, wo hingegen die OH-Gruppe der B-Determinanten stärker polar wirkt.
- Ähnliche Aspekte gelten für den Seit-zu-Seit-Vergleich zwischen Pos. 2 und 4 – auch hier bezüglich der 6- bis 8-gliedrigen Zucker.
- Kleine Niveau-Unterschiede der 8-, 12- und 14-gliedrigen Zucker zwischen den Pos. 1 und 2 können durch die zusätzliche Anwesenheit Le(b)-aktiver Ketten in Pos. 1 erklärt werden (s. a. unten).
- Ähnliches gilt für die B-Reaktion in den Pos. 3 und 4. Hier gelten zwei Berücksichtigungsgründe: Für die 6- bis 8-gliedrigen Ketten gilt, daß diese in der Pos. 3 auch Le(b)-aktiv sind. Außerdem haben die Ketten in Pos. 4 zusätzlich Acetylgruppen der hier in der Reaktion nicht hervorgetretenen A-Determinanten.

Wie aus Abb. 1 ersichtlich ist, sind in praktisch jeder durch die Zuckerkettenlänge definierten Region mehrere Banden erkennbar. Häufig sind neben kräftig gefärbten Hauptbanden 2–4 Nebenbanden erkennbar. So weist z. B. die Region „12“ der Pos. 1 und 2 ein 3-bandiges Muster auf, ebenso die Region „14“.

– Bekanntlich sind Zuckerketten mit mehr als 8 Molekülen dichotom verzweigt. Diese Verästelung erfolgt immer durch Ankopplung von N-Acetyl-Lactosamin-Gruppen (Gal  $\beta$  (1–4)–GlcNac) [9, 11]. Somit ist es möglich, daß die in Region „12“ dargestellten Banden zwei Kettenverästelungen haben und daß diese Äste unterschiedliche Determinanten aufweisen. So kann z. B. die untere Bande der Region „12“ in Pos. 2 A-Aktivität haben, da die ihr entsprechende Bande in Pos. 4 das B-Antigen hat. – Eine solche „gemischte“ Antigenizität erklärt jedoch längst nicht die gesamte Bandenzahl. Eine andere Erklärung ist die Annahme unvollständiger Glykosidierung, d. h. die Glykosyltransferasen, welche die A-, B-, H- und Le-determinierenden Zucker übertragen, glykosidieren nicht jeden Präkursor in gleicher Weise. Als Folge entstünden neben z. B. 12- bis 14-gliedrigen Ketten auch 10- bis 12-gliedrige usw.

Der Extrakt der Blutgruppe 0 (Pos. 5 der Abb. 1) hat lediglich 3 Banden mit H-Aktivität; theoretisch wären 5 Varianten (7- bis 12-gliedrig) denkbar. Ulex europaeus reagiert bekanntlich mit Kette-2-Antigenen, jedoch nur schwach mit Kette-1 [22]. Dieser Befund ist in dem Sinne zu deuten, daß in Pos. 5 lediglich (oder ganz überwiegend) den 2. Präkursortyp nachgewiesen wurde und damit bei den in Tabelle 2 existierenden Möglichkeiten durch diesen Befund ein Non-Sekretor festgelegt ist.

Aus vorstehenden Befunden und Erörterungen läßt sich abschließend formulieren:

- Kurzkettige, chromatographisch aufgetrennte Glykosphingolipide können nicht nur mit chemischen und radioimmunologischen, sondern auch mittels immunchemischer Methoden nachgewiesen werden.
- Je nach der Blutgruppensubstanz des AB0- und Le-Systems können sie durch 5- bis 16-gliedrige Zuckerketten repräsentiert werden.
- Kleine Verschiebungen in den Höhenniveaus der Glykosphingolipidgruppen der gleichen Kettenlänge des AB0-Systems können durch Unterschiede im chemischen Antigenaufbau aufgeklärt werden.
- Die Antigene Le<sup>a</sup> und Le<sup>b</sup> zeigen sich in Gestalt dreibandiger Muster. Die Le<sup>a</sup>-Substanz wird von 5-gliedrigen und die Le<sup>b</sup>-Substanz von 6- oder 7-gliedrigen Zuckerketten repräsentiert.
- Eine positive Reaktion zwischen Glykosphingolipiden B – Le(a–b+) und Anti Le<sup>a</sup>-Serum bezeugt das Vorhandensein von Le<sup>a</sup>-Substanzen in den Erythrozyten des Phänotyps Le(a–b+).
- Es kann als wahrscheinlich angenommen werden, daß die A- und B-Antigen-Eigenschaften nur einem kleinen Teil der Le<sup>b</sup>-Substanzen verliehen werden können.

## References

1. Björk S, Breimer ME, Hansson GC, Karlsson KA, Larson G, Lefler H (1983) Blood group glycosphingolipids of human gastro-intestinal tissues. Glycoconjugates de la membrane erythrocytaire et leurs marqueurs genetiques. Colloque Associé INSRM et CNTS, 27–29 juin, Paris, 125–137
2. Breimer ME, Hansson GC, Larson G (1983) Blood group glycosphingolipids of human kidney. Proc of the 8th Intern Symp on Glycoconj, July 17–23, Lund-Ronneby: 421–422

3. Brinkmann B, Kernbach G, Rand S (1986) Cytochemical detection of ABH antigens in human body fluids. *Z Rechtsmed* 96:111–117
4. Brockhaus M (1985) Detection of glycolipid antigens with monoclonal antibodies. *Immunol Methods* III:133–145
5. Cameron C, Graham F, Dunsford I, Sickles G, Macpherson CR, Cahan A, Sanger R, Race RR (1959) Blood group reactions in ancient human skeletons. *Am J Phys Anthropol* 21:429
6. Falk KE, Karlsson KA, Samuelson BE (1981) A new way of chemical blood-typing of human single individuals. *FEBS Lett* 124:37–77
7. Gane P, Vellayoudom J, Mollicone R, Breimer ME, Samuelsson BE, Rouger P, Gerard G, Pèndu J, Oriol R (1987) Heterogeneity of anti-A and anti-B monoclonal reagents. *Vox Sang* 53:117–125
8. Hakomori S (1978) Isolation of blood group ABH-active glycolipids from human erythrocyte membranes. *Methods in Enzymology Volume L Complex Carbohydrates Part C*: 207–211
9. Hakomori S (1984) Blood group glycolipid antigens and their modifications as human cancer antigens. *Am J Clin Path* 82, 6:635–648
10. Hansson GC, Karlsson G, Larson BE, Samuelsson BE, Thurin J, Bjursten LM (1985) Detection of blood group type glycosphingolipid antigens on thin-layer plates using polyclonal antisera. *J Immunol Methods* 83:37–42
11. Hanfland P, Dabrowski J, Egge H (1983): ABH- and Lewis-blood-group-active glycosphingolipids from red cell membranes and plasma. *Glycoconjugues de la membrane erythrocytaire et leurs marqueurs genetiques. Colloque Associé INSRM et CNTS, 27–29 juin, Paris* 107–116
12. Ito N, Nishi K, Nakajima M, Matsuda Y, Ishitani A, Mizumoto J, Hirota T (1986) Localization of blood group antigens in human pancreas with lectin-horseradish peroxidase conjugates. *Acta Histochem Cytochem* 19, 2:205–217
13. Kościelak J, Miller-Podraza H, Zdebska E (1978) Isolation of poly(glycosyl)ceramides with A, B, H and I blood-group activities. *Methods in Enzymology Volume L Complex Carbohydrates Part C*:211–216
14. Kościelak J, Piasek A, Górniak H, Gadras A, Gregor A (1973) Structures of fucose-containing glycolipids with H and B blood-group activity and of sialic acid and glucosamine-containing glycolipids of human-erythrocyte membrane. *Eur J Biochem* 37:214–225
15. Miller-Podraza H (1984) Biosynthesis of glycosphingolipids. *Postepy Biochemii* 3:379–508
16. Oriol R (1987) ABH and related tissue antigens. *Biochem Soc Transactions*. 621st Meeting London: 596–599
17. Oriol R, Pèndu J, Mollicone R (1986) Genetics of AB<sub>0</sub>, H, Lewis X and related antigens. *Vox Sang* 51:161–171
18. Oriol R, Pèndu 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
19. Pedal I, Hülle J (1984) Immunenzymatische Bestimmung des AB<sub>0</sub>- und Sekretorstatus an paraffineingebettetem Autopsiematerial. *Z Rechtsmed* 93:289–300
20. Pedal I, Kuhn K, Hülle J (1985) Immunhistochemische Bestimmung von mütterlicher und kindlicher Blutgruppe (AB<sub>0</sub>) an reifem Placentagewebe. *Z Rechtsmed* 94:145–153
21. Pedal I (1987) Blutgruppen-Immunhistochemie: AB<sub>0</sub>(H)- und Lewis-Antigene menschlicher Gewebe. Thieme, Stuttgart New York
22. Pèndu J, Lemieux RU, Lambert F, Dalix AM, Oriol R (1982) Distribution of H type 1 and H type 2 antigenic determinants in human sera and saliva. *Am J Hum Genet* 34:402–415
23. Pereira M (1973) AB<sub>0</sub> grouping of decomposed human tissue. *J Forensic Sci Soc* 13:33
24. Race R, Sanger H (1975) *Blood Groups in Man* Blackwell Scient Publ, Oxford
25. Rohr TE, Smith DF, Zopf DA, Ginsburg V (1980) Le<sup>b</sup>-active glycolipid in human plasma: measurement by radioimmunoassay. *Archiv of Biochem and Biophys* 199, 1:265–269
26. Rudowski W, Pawlewski S (1985) *Współczesna Transfuzologia*. PZWL Warszawa

27. Samuelsson BE (1983) Solid-phase biosynthesis on high performance thin-layer plates of blood group glycosphingolipids. Proc of the 7th Intern Symp on Glycoconj. July 17–23 Lund-Ronneby: 425–426
28. Sweely CC, Siddiqui B (1977) Chemistry of mammalian glycolipids. The Glycoconjugates I Academic Press NY San Francisco London 459: 540
29. Zdebska E, Chestowski A, Zieleński J, Lenkiewicz B, Kościelak J (1982) Fucosyltransferase may promote complexity of polyglycosyl conjugates of erythrocyte membranes. Biochim Biophys Acta 717: 1–5
30. Zdebska E, Miller-Podraza H, Kościelak J (1980) Structure and blood group activity of poly(glycosyl)ceramides. Acta Haemat Pol 11, 2: 93–96

Eingegangen am 3. Oktober 1988