

## **A<sub>1</sub>- und A<sub>2</sub>-Blutgruppensubstanzen: existieren Strukturunterschiede?**

**R. Hauser<sup>1</sup>, G. Fechner<sup>2</sup> und B. Brinkmann<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Institut für Rechtsmedizin, Medizinische Akademie Gdańsk, Curie Skłodowskiej 3a,  
PL-80-210 Gdańsk, Polen

<sup>2</sup>Institut für Rechtsmedizin, Westfälische Wilhelms-Universität Münster,  
Von-Esmarch-Strasse 86, D-4400 Münster, Bundesrepublik Deutschland

Eingegangen 20. Oktober 1989

### **A<sub>1</sub>- and A<sub>2</sub>-Blood group substances: structural differences?**

**Summary.** Blood group substances were extracted from erythrocytes of blood groups A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> and separated using HPTLC. Identification of blood group A was carried out on the chromatogram using the PAP-technique. The specific demonstration of the serologically active glycosphingolipids allowed a comparison of the A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> blood group substance bands. The difference between the A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> Substances appears to be only a quantitative one.

**Key words:** A<sub>1</sub>- and A<sub>2</sub>-blood group substances, immunohistochemistry (PAP-method) – Glycosphingolipids

**Zusammenfassung.** Aus Erythrozyten der Blutgruppen A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> wurden Blutgruppensubstanzen extrahiert und mittels HPTLC aufgetrennt. An den Chromatogrammen wurde der A-Nachweis mittels PAP-Technik durchgeführt. Die spezifische Darstellung der serologisch aktiven Glykosphingolipide erlaubt die Banden der A<sub>1</sub>- und A<sub>2</sub>-Blutgruppensubstanzen zu vergleichen. Die Unterschiede zwischen den A<sub>1</sub>- und A<sub>2</sub>-Substanzen scheinen nur quantitativer Art zu sein.

**Schlüsselwörter:** A<sub>1</sub>- und A<sub>2</sub>-Blutgruppensubstanzen, Immunhistochemie (PAP-Methode) – Glykosphingolipide

### **Einleitung**

Untersuchungen zur Aktivität von Antigenen der Blutgruppe A, die von Dungen und Hirschfeld initiiert wurden [4], und der Nachweis von Agglutininen, die selektiv Erythrozyten mit dem starken Antigen A agglutinieren, waren die

Grundlage, um die Blutgruppe A in die Untergruppen A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> zu differenzieren.

Seit den Untersuchungen von Thomsen et al. [13] bestehen keine Zweifel an dem Vorkommen zweier verschiedener Allele: A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub>. Es ist bekannt, daß die Blutgruppenaktivität A von den *N*-Acetylgalaktosamintransferasen codiert wird. Diese Transferasen sollen sich in ihren genetisch determinierten kinetischen Eigenschaften unterscheiden, nicht in ihrer Substratspezifität [11]. Infolgedessen soll die Transferase A<sub>2</sub> eine geringere Menge der Substanz H in A<sub>2</sub> umwandeln als die Transferase A<sub>1</sub>.

Bisher konnte noch nicht eindeutig entschieden werden, ob zwischen den Blutgruppensubstanzen A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> ein qualitativer oder nur ein quantitativer Unterschied besteht.

Die Untersuchungen haben ergeben, daß auf einem Erythrozyten der Blutgruppe A<sub>1</sub> 900.000–1.700.000 Determinanten und auf einem Erythrozyten der Blutgruppe A<sub>2</sub> 240.000–290.000 Determinanten vorkommen [5, 11]. – In Polyglykosylceramid-Präparaten von Erythrozyten der Blutgruppe A<sub>1</sub> wurden dreimal soviel Strukturen A aufgefunden, gemessen am *N*-Acetylgalaktosamin-Inhalt, wie bei analogen Präparaten der Blutgruppe A<sub>2</sub> [8]. Ähnliche Resultate ergaben sich bei der Untersuchung von Polyglykosylpeptiden [14].

In letzter Zeit wurde nachgewiesen, daß Glykolipide der Blutgruppe A<sub>1</sub> eine ungewöhnliche Determinante A beinhalten, bei der die Gruppensequenz A verdoppelt ist; GalNAc α 1–3 (Fuk α 1–2 (Gal β 1–3 GalNAc α 1–3) Fuk α 1–2) Gal β 1–4 GlcNAc β 1–3 Gal β 1–4 Glc [3]. Nach Pendu et al. [10] entspricht diese Struktur dem 3. Präkursorbautyp. Man denkt auch daran, daß die Differenzen zwischen den Determinanten A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> in ihrer unterschiedlichen sterischen Anordnung liegen [12]. Moreno et al. [9] geben an, daß die Blutgruppensubstanz A<sub>1</sub> auf dem 1. und 2. Präkursorbautyp aufgebaut ist, dagegen die Blutgruppensubstanz A<sub>2</sub> nur auf dem 2. Präkursorbautyp.

In der vorliegenden Arbeit sollen die strukturellen Unterschiede der Untergruppen A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> mittels vergleichender Untersuchung der chromatographisch aufgetrennten Glykosphingolipide der Blutgruppensubstanzen erfolgen. Die Glykosphingolipide werden mit Hilfe der PAP-Methode dargestellt.

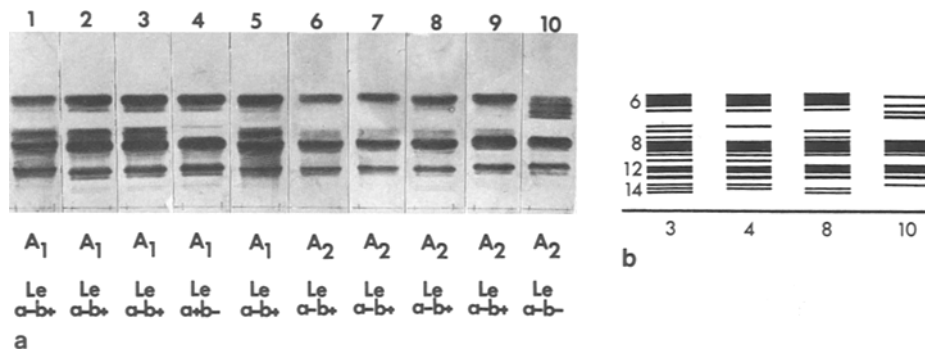
## Material und Methoden

Die zu den Untersuchungen benutzten Erythrozytensedimente stammen von jeweils 5 Personen der Blutgruppe A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub>. Bei diesen wurde auch der Lewis-Phänotyp bestimmt. Zur Methodik der Extraktion der ABH-Antigene und ihrer histochemischen Darstellung wird auf die Literatur verwiesen [1, 2, 6, 7]. Folgende Schritte wurden durchgeführt:

1. Hämolyse der Erythrozytensedimente;
2. Phosphatpuffer-*N*-Butanol-Extraktion der erhaltenen Erythrozytenmembranen;
3. Dialyse der eingeengten Butanolphasen;
4. Extraktion der in der Butanolphase gelösten Substanzen;
5. Dünnschichtchromatographie der Extrakte;
6. Nachweis der Antigene mittels PAP-Methode.

## Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung sind aus der Abbildung 1a und b ersichtlich.



**Abb. 1. a (links).** Glykosphingolipidmuster verschiedener A-Untergruppen/-Lewis-Konstellationen nach immunchemischer Darstellung (PAP-Methode). **b (rechts)** (Schema) Teilausschnitt der Positionen 3, 4, 8 und 10 mit Bezeichnung der Zahl der Zuckerglieder (nach 7)

Die Menge des zur Lyse und Extraktion verwendeten Blutes war jeweils dieselbe, so daß die Chromatogramme auch quantitativ verglichen werden können. Nach unseren vorhergehenden Untersuchungen [7] werden die AB-Antigene tragenden Oligoglykosphingolipide durch verschiedene Gruppen mit je 6-, 8-, 12-, 14-gliedrigen Zuckerketten repräsentiert.

In der vorliegenden Untersuchung sind einige Banden vergleichsweise schwach exprimiert. Allgemein läßt sich auch feststellen, daß die Bandenmuster der Blutgruppe A<sub>1</sub> intensiver ausgeprägt sind als die der Blutgruppe A<sub>2</sub>. Das bedeutet, daß die Mengen der serologisch reagierenden Glykosphingolipide im Vergleich zwischen A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> unterschiedlich groß sind. Beide Untergruppen unterscheiden sich also quantitativ.

Darüber hinaus sind im Vergleich zwischen beiden Blutgruppen keine Differenzen im chromatographischen Verhalten erkennbar, welche einen Rückschluß auf qualitative Unterschiede – im wesentlichen also solche der Molekülgröße und des Löslichkeitsverhaltens – zulassen. Ganz diskrete Zuckerkettenverschiebungen und ganz geringgradige Differenzen der Bandenbreite betreffen beide Untergruppen gleichermaßen und lassen keinen Rückschluß auf Assoziation zu einer der beiden Blutgruppen zu.

Hingegen scheint eine auffällige Lewis-Assoziation zu bestehen. In den Pos. 4 und 10 fehlt das Le(b)-Antigen. Hier fehlen auch im Vergleich zu den übrigen Mustern Teile der 8-gliedrigen Glykosphingolipide. Das bedeutet, daß fehlende Glykosphingolipide den gleichen (endodermalen) Ursprung haben wie das Le(b)-Antigen und ebenfalls aus dem Plasma in die Erythrozytenmembranen absorbiert sind.

In Pos. 10 fehlt dazu auch Le(a)-Antigen, das in allen übrigen Positionen vorhanden ist [nach 7]. Dieser Extrakt weist im Bereich der 6-gliedrigen Glykosphingolipide, im Vergleich zu den anderen Positionen, ein breit zerlegtes Bandenmuster auf. Daraus ergibt sich, daß 6-gliedrige Moleküle in ihrem chromatographischen Verhalten in bestimmter Weise von Le(a)-Molekülen beeinflusst werden. Nach unseren früheren Untersuchungen wird die Le(a)-Substanz von 5-gliedrigen Zuckerketten repräsentiert [7].

Das Fehlen augenfälliger Unterschiede zwischen beiden Blutgruppen läßt zwei Möglichkeiten offen:

- zum einen wurden hier Oligoglykosylceramide mit nur max. 14 Zuckermolekülen untersucht. Die Polyglykosylceramide weisen im Vergleich hierzu 20–60 Zuckerreste pro Molekül auf und hierdurch auch eine größere Zahl von Determinanten der jeweiligen Blutgruppen. Es läßt sich nicht ausschließen, daß in dieser Molekülgruppe Unterschiede auch qualitativer Art nachweisbar wären.
- Seyfried [12] hält es für möglich, daß den Unterschieden zwischen den Blutgruppensubstanzen  $A_1$  und  $A_2$  Differenzen in der stereochemischen Struktur zugrunde liegen. Auch eine solche Hypothese läßt sich durch die vorliegende Untersuchung weder beweisen noch widerlegen.

Wenig wahrscheinlich ist die Begründung von qualitativen Unterschieden mit dem Postulat, daß die Blutgruppensubstanz  $A_2$  nur auf dem Präkursortyp 2 aufgebaut ist, dagegen die Blutgruppensubstanz  $A_1$  auf dem Präkursortyp 1 und 2 [9]. Das Vorhandensein des Phänotypes  $A_2$ -Le(a-b+) steht zu dieser Hypothese im Widerspruch.

Zusammengefaßt ergibt sich aus der vorliegenden Untersuchung kein Hinweis auf regelmäßig auftretende Strukturunterschiede zwischen  $A_1$  und  $A_2$ .

Es ist aber möglich, daß eventuelle qualitative Differenzen zwischen beiden Untergruppen sporadisch, irregulär und zufällig vorkommen, wie z. B. die beschriebene Verdoppelung der Gruppensequenz A in der Determinante der Blutgruppe  $A_1$  [3].

## Literatur

1. Brinkmann B, Kernbach G, Rand S (1986) Cytochemical detection of ABH antigens in human body fluids. *Z Rechtsmed* 96: 111–117
2. Brockhaus M (1985) Detection of glycolipid antigens with monoclonal antibodies. *Immunol Methods* III: 133–145
3. Clausen H, Watanabe K, Kannagi R, Levery SB, Nudelman E, Arao Tomono X, Hakomori SI (1984) Blood group A glycolipid ( $A^x$ ) with globo-series structure which is specific for blood group  $A_1$  erythrocytes: one of the chemical bases for  $A_1$  and  $A_2$  distinction. *Biochem Biophys Res Commun* 33: 523–538
4. Dungern E, Hirsfeld L (1911) Über gruppenspezifische Strukturen des Blutes. III Mitt. *Z Immun Forsch* 8: 526–531
5. Economidou J, Hughes-Jones NC, Gardner B (1967) Quantitative measurements concerning A and B antigen sites. *Vox Sang* 12: 321–329
6. Hansson GC, Karlsson KA, Larson G, Samuelsson BE, Thurin J, Bjursten LM (1985) Detection of blood group glycosphingolipid antigens on thin-layer plates using polyclonal antisera. *J Immunol Methods* 83: 37–42
7. Hauser R, Rand S, Lenz J, Brinkmann B (1989) Nachweis von Glykosphingolipid-Antigene ABH und Lewis auf Dünnschichtplatten mittels der PAP-Methode. *Z Rechtsmed* 103: 47–56
8. Kościelak J, Miller-Podraza H, Krauze R, Piasek A (1976) Isolation and characterisation of poly(glycosyl) cermides (megaloglycolipidis) with A, H and I blood-group activities. *Eur J Biochem* 71: 9–18
9. Moreno C, Lundblad A, Kabat AE (1971) Immunochemical studies on blood groups, II. A comparative study of the reaction of  $A_1$  and  $A_2$  blood group glycoproteins with human anti-A. *J Exp Med* 134: 439–446
10. Pendu J, Lambert F, Samuelsson BE, Breimer ME, Seitz RC, Pilar-Urdaniz M, Suesa N, Ratcliffe M, Francois A, Poschmann A, Vinas J, Oriol R (1986) Monoclonal antibodies specific for type 3 and type 4 chain-based blood group determinants: relationship to the  $A_1$  and  $A_2$  subgroups. *Glycoconjugate* 3: 255–271

11. Schenkel-Brunner H (1980) Enzymatische Untersuchungen zur Entstehung der Untergruppen A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub>. *Wien Klin Wochenschr* 92:749–758
12. Seyfriedowa H (1985) Immunologiczne podstawy współczesnej transfuzjologii. *Współczesna transfuzjologia*. PZWL Warszawa
13. Thomsen O, Friedenreich V, Warsaae E (1930) Über die Möglichkeit der Existenz zweier neuer Blutgruppen; auch ein Beitrag zur Beleuchtung sogenannter Untergruppen. *Acta Pathol Microbiol Scand* 7:157–161
14. Vitala J, Finne J, Krusius T (1982) Blood group A and H determinants in polyglycosyl peptides of A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> erythrocytes. *Eur J Biochem* 126:401–411