

Genetisch bedingte Variabilität des Alkoholstoffwechsels und ihr Einfluß auf Trinkverhalten und Neigung zum Alkoholismus*

R. Eckey, D. P. Agarwal und H. W. Goedde

Institut für Humangenetik der Universität Hamburg, Butenfeld 32, D-2000 Hamburg 54,
Bundesrepublik Deutschland

Eingegangen am 6. Juli 1989

Genetic factors in alcohol metabolism: implications in alcohol drinking habits, alcohol abuse and alcoholism

Summary. Alcoholism is one of the most challenging current health problems in the Western countries with far-reaching medical, social, and economic consequences. There are a series of factors that interact in predisposing or protecting an individual against alcoholism and alcohol-related disorders. This article surveys the state of our knowledge concerning the biochemical and genetic variations in alcohol metabolism and their implications in alcohol sensitivity, alcohol drinking habits, and alcoholism in different racial/ethnic groups. The major pathway for the degradation of ethanol is its oxidation to hydrogen and acetaldehyde – to which many of the toxic effects of ethanol can be attributed. Variations in alcohol and acetaldehyde metabolism via genetically determined polymorphisms in alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) seem to play an important role in individual and racial differences in acute and chronic reactions to alcohol, alcohol drinking habits, as well as vulnerability to organ damage after chronic alcohol abuse. Alcohol sensitivity and associated discomfort symptoms accompanying alcohol ingestion may be determinental for the significantly low incidence of alcoholism among the Japanese, Chinese and other Orientals of Mongoloid origin. An abnormal ALDH isozyme has been found to be widely prevalent among individuals of the Mongoloid race and is mainly responsible for the acute sensitivity to alcohol commonly observed in this race. Persons sensitive to alcohol by virtue of their genetically controlled ALDH isozyme deficiency may be discouraged from drinking large amounts of alcohol in their daily life due to the initial adverse reaction experienced after drinking alcohol. Indeed, a significantly low incidence of the mitochondrial ALDH isozyme deficiency has been observed in alcoholics as compared to psychiatric patients, drug dependents and healthy

* Herrn Professor Dr. Werner Janssen zum 65. Geburtstag gewidmet
Sonderdruckanfrage an: H. W. Goedde

controls in Japan. How far any variation in ADH and/or ALDH activity among individuals of Caucasian origin will have similar effects has yet to be studied.

Key words: Alcohol metabolism, genetic factors – Drinking habits, genetic factors – Alcohol abuse – Alcoholism

Zusammenfassung. Nach heutiger Erkenntnis spielt der Acetaldehyd, das giftige erste Abbauprodukt des Ethanols, eine entscheidende Rolle für die akute und chronische Wirkung des Alkohols. Die Höhe des Acetaldehydspiegels nach Alkoholgenuß wird vor allem von den Aktivitäten der Enzyme Alkoholdehydrogenase (ADH) und Aldehyddehydrogenase (ALDH) bestimmt. Von beiden Enzymen sind genetisch bedingte Polymorphismen bekannt, deren Auswirkungen auf den Metabolismus des Acetaldehyds nur zum Teil bekannt sind. Im vorliegenden Übersichtsreferat werden die Hauptabbauwege des Ethanols, die wichtigsten Eigenschaften und die derzeit bekannten interindividuellen und interethnischen Unterschiede der Isoenzymmuster von ADH und ALDH zusammenfassend dargestellt. Am Beispiel der sog. ALDH I-Defizienz, die in „mongoliden“ Populationen weit verbreitet ist, wird gezeigt, daß eine verminderte Gesamtaktivität der Aldehyddehydrogenase in der Leber mit einer erhöhten Alkoholempfindlichkeit und mit einer geringeren Anfälligkeit für Alkoholismus verbunden ist. Es wird diskutiert, inwieweit auch in europäischen Populationen interindividuelle Unterschiede in der Gesamtaktivität der Aldehyddehydrogenase bestehen können, die möglicherweise Auswirkungen haben auf die Alkoholsensitivität und das Trinkverhalten eines Individuums.

Schlüsselwörter: Alkoholmetabolismus, genetische Faktoren – Trinkverhalten, Einfluß genetischer Faktoren – Alkoholmissbrauch – Alkoholismus

Einleitung

Der Alkohol (Ethanol, Äthylalkohol) ist in allen Industriestaaten und in zunehmendem Maße auch in den Entwicklungsländern die am häufigsten konsumierte stimmungsverändernde Droge. Obwohl ein allgemeiner Trend zu alkoholärmeren Getränken besteht, ist der Pro-Kopf-Konsum an reinem Alkohol in der Bundesrepublik Deutschland nach vorübergehend rückläufigen Verbrauchszyzlen im Jahre 1987 wieder um 0,9% auf 11,61 angestiegen [1]. Im internationalen Vergleich nahm die Bundesrepublik damit nach Frankreich, Luxemburg und Spanien den 4. Platz ein.

In allen Staaten mit hohem Pro-Kopf-Verbrauch an Alkohol stellt der Alkoholismus eine der häufigsten Erkrankungen dar. Chronischer Alkoholmissbrauch bringt jedoch nicht nur die Gefahr einer Suchtentwicklung mit sich; auch an der Entstehung zahlreicher metabolischer Störungen und Organveränderungen ist oft ein übermäßiger Alkoholkonsum maßgeblich beteiligt. Da sowohl die Alkoholabhängigkeit als auch die alkoholtoxischen Organschäden nur sehr begrenzt therapierbar sind, kommt der Verhütung dieser Erkrankungen

eine besondere Bedeutung zu. Vorbedingung für wirksame Präventivmaßnahmen ist aber eine möglichst genaue Kenntnis der Faktoren, die das Trinkverhalten eines Menschen beeinflussen können.

Äußere Gegebenheiten wie Verfügbarkeit und Preis alkoholischer Getränke, Beruf, soziale Stellung, familiäre Verhältnisse und die in einer Gesellschaft vorherrschenden Moralvorstellungen haben mit Sicherheit großen Einfluß auf das Trinkverhalten eines Individuums. Zwillings- und Adoptionsstudien deuten jedoch darauf hin, daß das Trinkverhalten und die Anfälligkeit für Alkoholismus insbesondere auch von genetischen Faktoren beeinflußt wird [2, 3]. Welcher Art diese Faktoren sind, ist noch weitgehend unbekannt. Eine mögliche Ursache für ein unterschiedliches Trinkverhalten könnten erbliche Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber der pharmakologischen und toxischen Wirkung des Ethanol sein. Daß es derartige Unterschiede sowohl zwischen einzelnen Individuen als auch zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen gibt, ist seit längerer Zeit bekannt. Bei der Suche nach den physiologischen und biochemischen Mechanismen, die die Alkoholempfindlichkeit eines Individuums beeinflussen, sind in den letzten Jahrzehnten insbesondere im Metabolismus des Äthylalkohols einige interessante Zusammenhänge sichtbar geworden.

Metabolismus des Ethanol

Über 90% des enteral aufgenommenen Ethanol werden beim Menschen über verschiedene Stoffwechselwege zu Kohlendioxid und Wasser abgebaut, der Rest wird unverändert über Nieren, Lunge und Haut ausgeschieden. Entscheidend für die Entgiftung des Alkohols sind insbesondere die ersten beiden Abbau schritte, die vorwiegend durch die NAD-abhängigen Enzyme Alkoholdehydrogenase (ADH) und Aldehyddehydrogenase (ALDH) katalysiert werden (Abb. 1). Die Alkoholdehydrogenase oxidiert Ethanol zu Acetaldehyd, der anschließend in einem zweiten Oxidationsschritt durch die Aldehyddehydrogenase zu Acetat umgesetzt wird. Acetat wird nach seiner Aktivierung zu Acetyl-Coenzym A durch das Enzym Thiokinase vorwiegend im Citrat- und im Tricarbonsäurezyklus zu Wasser und Kohlendioxid abgebaut. An der Oxidation des

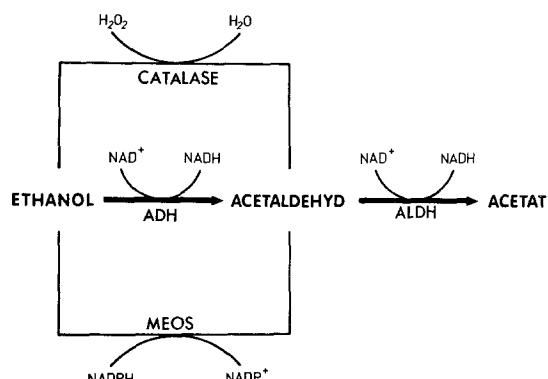


Abb. 1. Hauptabbauwege des Ethanol

Ethanols zu Acetaldehyd sind neben der Alkoholdehydrogenase auch das sog. mikrosomale Ethanol oxidierende System („MEOS“) und die Katalase beteiligt [4, 5]. Acetaldehyd kann auch durch die flavinhaltige Aldehydoxidase zu Acetat und durch den Pyruvatdehydrogenase-Komplex über eine Hydroxyethyl-thiaminpyrophosphat-Zwischenverbindung („aktiver Acetaldehyd“) zu Acetyl-Coenzym A umgesetzt werden [6]. Diese Nebenwege spielen normalerweise für den Metabolismus des Ethanols nur eine untergeordnete Rolle. Durch chronischen Alkoholabusus kann allerdings die Aktivität des „MEOS“ über eine Enzyminduktion erheblich gesteigert werden [7].

Der Abbau des Ethanols bis zum Acetat findet zum weitaus größten Teil in der Leber statt, die die höchsten Aktivitäten der beteiligten Enzyme bzw. Enzymsysteme aufweist. Acetat wird nach den Berechnungen von Fellenius et al. [8] nur zu ca. 25% in der Leber weiter abgebaut; der überwiegende Teil wird extrahepatisch verstoffwechselt, und zwar vor allem in Herz- und Skelettmuskulatur und in geringerem Maße auch in der Niere und im Gehirn. Obwohl Acetat als normales Zwischenprodukt des Intermediärstoffwechsels keine eigene Toxizität besitzt, kann es durch chronisch erhöhte Acetatspiegel aber möglicherweise zu Störungen des Fettstoffwechsels kommen, von denen insbesondere Herz, Arterienwände und Leber betroffen sein sollen [9].

Für die durch chronischen Alkoholabusus verursachten Zell- und Gewebeschäden ist sehr wahrscheinlich vorwiegend der Acetaldehyd verantwortlich, der weitaus toxischer als das Ethanol selbst [10–12] ist. Auch an der Auslösung akuter Intoxikationserscheinungen nach übermäßigem Alkoholgenuss sowie an der Entstehung von „Katersymptomen“ dürfte dieser Metabolit zumindest beteiligt sein. Typische Symptome einer akuten Acetaldehyd-Vergiftung sind Kopfschmerzen, Tachykardie, Blutdruckabfall, Hautrötung, Hitzegefühl, Übelkeit und Erbrechen.

Die hohe Toxizität des Acetaldehyds beruht wahrscheinlich zum großen Teil auf seiner Fähigkeit, mit Zell- und Plasmaproteinen kovalente Bindungen einzugehen, wodurch „Acetaldehyd-Proteinaddukte“ entstehen [13–16]. Die Adduktbildung kann Struktur und Funktion der Proteine stark verändern, was bei Enzymen z.B. zum Verlust der katalytischen Aktivität führen kann [17]. Durch die Strukturveränderung können auf der Oberfläche der Proteine neue antigene Determinanten entstehen, die die Produktion von Autoantikörpern nach sich ziehen [18]. Es wird vermutet, daß diese Antikörper zur Zellschädigung bei chronischem Alkoholismus beitragen.

Wegen der hohen Toxizität des Acetaldehyds ist anzunehmen, daß die Empfindlichkeit eines Individuums gegenüber der akuten und chronischen Wirkung des Ethanols entscheidend durch die nach Alkoholgenuss entstehenden Acetaldehydspiegel in Blut und Geweben beeinflußt wird. Die Acetaldehydspiegel werden maßgeblich bestimmt durch das Verhältnis zwischen den Entstehungs- und Abbaugeschwindigkeiten dieses Metaboliten. Die Entstehungsgeschwindigkeit hängt vorwiegend von der Aktivität der Alkoholdehydrogenase ab. Für den Abbau des Acetaldehyds ist ganz überwiegend das Enzym Aldehyddehydrogenase verantwortlich. Die wesentlichsten Eigenschaften sowie interindividuelle und interethnische Unterschiede dieser beiden Enzyme sollen daher im folgenden näher betrachtet werden.

Alkoholdehydrogenase

Die Alkoholdehydrogenase (ADH, EC 1.1.1.1) ist ein zinkhaltiges Enzym, das fast ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert ist. Das Organ mit der höchsten ADH-Konzentration ist die Leber; beträchtliche ADH-Aktivität kann aber auch im Darm, in der Niere und in der Lunge nachgewiesen werden.

Als Substrate der Alkoholdehydrogenase kommen zahlreiche primäre und sekundäre aliphatische und aromatische Alkohole und die entsprechenden Aldehyde bzw. Ketone in Frage. Die allgemeine Reaktionsgleichung lautet:



Beim Abbau des Ethanols zu Kohlendioxid und Wasser ist diese Reaktion der geschwindigkeitsbegrenzende Schritt.

Die physiologische Rolle der ADH bei Säugern ist nicht genau bekannt. Möglicherweise sind verschiedene Alkohole, die in Spuren zusammen mit der Nahrung aufgenommen werden oder der Ethanol, der durch die Darmflora produziert wird [19], natürliche Substrate der Leber-ADH. Auch eine Beteiligung des Enzyms bei der Biosynthese von Steroiden [20], beim Metabolismus von ω -Hydroxy-Fettsäuren [21] und bei der Retinol/Retinal-Umwandlung [22, 23] wurden diskutiert. Obwohl wegen der relativ hohen Aktivität in der Leber eine wichtige Funktion zu vermuten ist, kann das Enzym bei Ratten *in vivo* durch Pyrazol und seine Derivate über verschieden lange Zeiträume gehemmt werden, ohne das nachteilige Folgen erkennbar würden [24]. Es können sogar Mäusestämme („deermice“) gezüchtet werden, denen aufgrund eines genetischen Defektes dieses Enzym völlig fehlt [25]. Wahrscheinlich können andere Enzyme oder Enzymsysteme wie das „MEOS“ einen Ausfall der ADH zumindest teilweise kompensieren [26].

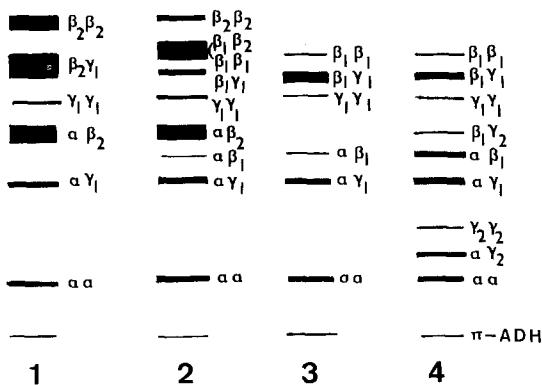
Als Hemmstoffe der ADH sind neben Pyrazol und seinen Derivaten, die bei der Oxidation von Alkoholen als kompetitive Inhibitoren wirken, u. a. auch EDTA, 1,10-Phenanthrolin, Isobutyramid, Primaquin und Thyroxin bekannt.

In der enzymatisch aktiven Form besteht die Alkoholdehydrogenase aus zwei Untereinheiten mit Molekulargewichten von ca. 40000. Jede Untereinheit besitzt ein aktives Zentrum und zwei Zinkatome, die für die katalytische Aktivität erforderlich sind.

Mindestens 5 Genorte (ADH_1 – ADH_5) kontrollieren die Synthese verschiedener Untereinheiten, die mit α , β , γ , π und χ bezeichnet werden. Für die Genorte ADH_2 und ADH_3 sind 3 bzw. 2 Allele bekannt, die die Synthese der Monomere β_1 , β_2 , β_3 bzw. γ_1 und γ_2 steuern.

Aufgrund ihrer Zusammensetzung aus den verschiedenen Untereinheiten werden die Isoenzyme der ADH in 3 Klassen eingeteilt:

Die Isoenzyme der Klasse I bestehen aus α -, β - oder γ -Monomeren, die untereinander frei kombinierbar sind. Die verschiedenen Dimere zeigen unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeiten [27], so daß in Abhängigkeit von den zugrundeliegenden Genotypen bei einem Individuum 6–15 Isoenzyme dieser Klasse nachgewiesen werden können (Abb. 2). Wegen ihrer hohen Aktivität gegenüber Ethanol spielen die Isoenzyme der Klasse I beim Alkoholabbau wahrscheinlich die entscheidende Rolle. Dimere, die mindestens eine β_2 -Unter-

**Abb. 2.** Schematische Darstellungverschiedener Isoenzymmuster
der menschlichen Leber-ADH
nach Stärkegel-Elektrophorese.

Zugrundeliegende Genotypen:

- 1: ADH_2^{2-2} , ADH_3^{1-1} ; 2: ADH_2^{1-2} , ADH_3^{1-1} ; 3: ADH_2^{1-1} , ADH_3^{1-1} ,
4: ADH_2^{1-1} , ADH_3^{1-2}

Tabelle 1. Häufigkeit der atypischen ADH in verschiedenen Populationen

Population	Häufigkeit (%)	Literatur
Japaner	85–98	30–35
Chinesen	89	36
Schweizer	20	37
Deutsche	9–14	33, 38, 39
Engländer	5–10	40–42
Schwarze Amerikaner	<10	34
Weisse Amerikaner	<5	34
Brasilianer (Bahia)	2.8	43
Inder	0	36
Nordamerik. Indianer (Sioux, Navajo, Pueblo)	0	44

einheit enthalten, werden als „atypische“ ADH bezeichnet [28]. Während die meisten anderen Isoenzyme ihre höchste in-vitro-Aktivität bei pH 10.5 zeigen, liegt das pH-Optimum der Homodimere aus den β_2 -Untereinheiten bei pH 8.5, also wesentlich näher am physiologischen Bereich. Darüber hinaus besitzen die „atypischen“ Isoenzyme eine erheblich höhere spezifische Aktivität als die „normalen“ Isoenzyme der ADH [29]. Populationsgenetische Untersuchungen haben gezeigt, daß die atypische ADH bei Europäern nur in einer maximalen Häufigkeit von 20% vorkommt, während sie in japanischen und chinesischen Populationen bei 85–98% der untersuchten Individuen nachzuweisen ist (Tabelle 1).

Die sog. Indianapolis-Variante der ADH, die aus den β_3 -Untereinheiten besteht, zeigt zwei pH-Optima (pH 7.0 und 10.0) und eine höhere elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit. Unter der schwarzen Bevölkerung Nordamerikas kommt diese ADH-Form in einer Häufigkeit von ca. 25% vor, während sie bei weißen Amerikanern, Deutschen und Japanern bisher nicht nachgewiesen wurde [45, 46].

Die Isoenzyme der Klasse II bestehen aus den Genprodukten des Locus ADH₄ (π -Untereinheiten). Beim Menschen wurde allerdings bisher nur ein derartiges Isoenzym, nämlich das Homodimer $\pi\pi$, nachgewiesen. Es wird nicht durch Pyrazol gehemmt, zeigt eine relativ geringe Affinität zu Ethanol und eine Bevorzugung der längerkettigen aliphatischen und aromatischen Alkohole.

Eine Reihe weiterer Isoenzyme der Alkoholdehydrogenase, die in der Elektrophorese am schnellsten zur Anode wandern, werden in der Klasse III der ADH (γ -ADH) zusammengefaßt. Diese Isoenzyme werden nicht durch 4-Methylpyrazol gehemmt und oxidieren nur längerkettige aliphatische und aromatische Alkohole, so daß sie für den Abbau des Ethanols *in vivo* keine Bedeutung haben.

Die verschiedenen molekularen Formen der ADH kommen in den einzelnen Organen und Geweben in sehr unterschiedlichen Mengenverhältnissen vor. Während in der Leber alle ADH-Klassen vertreten sind, lassen sich z.B. im Magen-Darm-Trakt fast nur die aus den γ -Untereinheiten bestehenden Isoenzyme nachweisen. Die Genprodukte des Locus ADH₄ (π -Untereinheiten) werden nur in der Leber exprimiert. Isoenzyme der Klasse III stellen im Hoden, in der Placenta und im Gehirn die Hauptaktivität, kommen aber auch in allen anderen Organen vor.

Aldehyddehydrogenase

In fast allen Geweben eines Säugetierorganismus kann Aktivität der NAD-abhängigen Aldehyddehydrogenase (ALDH, EC 1.2.1.3) nachgewiesen werden, wobei die Leber die weitaus höchste spezifische Aktivität besitzt. Bei allen bisher untersuchten Säugetieren ließen sich mindestens zwei Isoenzyme der ALDH unterscheiden, von denen das eine vorwiegend in den Mitochondrien, das andere im Cytoplasma der Leberzelle zu finden war.

Die Substratspezifität der Aldehyddehydrogenase ist gering. Es werden sowohl gesättigte als auch ungesättigte, geradkettige und verzweigte, aliphatische ebenso wie aromatische Aldehyde zu den entsprechenden Säuren nach folgender allgemeiner Reaktionsgleichung umgesetzt.



Das Redoxpotential der Oxidation des Acetaldehyds zu Acetat beträgt bei pH 7.0 ca. +0.26V (−12 kcal/Mol), so daß diese Reaktion *in vivo* nahezu irreversibel ist. Aufgrund der geringen Substratspezifität der ALDH liegt die Vermutung nahe, daß das Enzym auch *in vivo* an der Oxidation verschiedener Aldehyde beteiligt ist, die entweder als Geschmacks- und Aromastoffe („food flavours“) in Nahrungsmitteln enthalten sind oder endogen als Metaboliten des Intermediärstoffwechsels entstehen. Diskutiert wird u.a. eine Beteiligung der ALDH an der Bildung von Gallensäuren sowie am Metabolismus von Corticosteroid- und biogenen Aldehyden [47–51]. Im Gehirn ist die Aldehyddehydrogenase wahrscheinlich am Abbau von Neurotransmitter-Aldehyden wie DOPAL beteiligt [52]. Ein gestörter Abbau von Dopamin durch anhaltend hohe Acetaldehydspiegel wird als mögliche Ursache der Suchtentstehung bei chronischem

Alkoholabusus diskutiert, da sich Dopamin mit Aldehyden zu Kondensationsprodukten mit morphinartiger Wirkung verbinden kann [53].

Aldehyddehydrogenasen werden durch eine Reihe von Sulphydil-Reagenzien gehemmt. Bekanntester Vertreter dieser Gruppe ist Disulfiram (= Tetraäthylthiuram-Disulfid), das unter der Bezeichnung „Antabus“ zur Erzeugung einer Aversion gegen Alkohol in der Therapie von Alkoholikern eingesetzt wird. Bei vielen Spezies wirkt diese Verbindung vor allem auf die cytoplasmatischen Isoenzyme der ALDH. In vitro kann die volle Enzymaktivität durch Inkubation mit 2-Mercaptoethanol wiederhergestellt werden. Auch in vivo scheint die Disulfiram-Hemmung entgegen früheren Vermutungen nicht irreversibel zu sein. Verlaufskontrollen an Alkoholikern und Gesunden haben nämlich gezeigt, daß nach Absetzen einer Antabus-Therapie die ALDH-Aktivität des Blutes in wesentlich kürzerer Zeit wieder normale Werte erreicht, als für eine Neusynthese des Enzyms im Laufe der Erythropoese notwendig wäre [54, 55].

Weitere bekannte Hemmstoffe der Aldehyddehydrogenase sind Cyanamid, das ähnlich wie Disulfiram therapeutisch genutzt wurde, Chloralhydrat (= Trichloracetaldehyd), das als stärkster kompetitiver Hemmstoff gilt, sowie Jodacetamid, Pargylin und Reserpin.

Es gibt auch Verbindungen, die die Aktivität der Leber-ALDH von Säugetieren über den Mechanismus der Enzyminduktion steigern können: Nach intraperitonealer Injektion von Phenobarbital wurde in Leberhomogenaten von Mäusen eine etwa 2fach höhere ALDH-Aktivität gemessen als in den Leberhomogenaten unbehandelter Tiere [56]. Bei ähnlichen Versuchen mit Ratten wurde bei manchen Tieren eine bis zu 30fache Steigerung der cytoplasmatischen ALDH-Aktivität festgestellt, während die Enzymaktivität anderer Ratten nicht beeinflußt wurde [57, 58]. Durch Züchtungsversuche konnte nachgewiesen werden, daß diese Fähigkeit zur Induktion der Aldehyddehydrogenase autosomal dominant vererbt wird. Die Aktivität eines anderen cytoplasmatischen ALDH-Isoenzys der Rattenleber konnte durch TCDD (Tetrachlorobenzop-dioxin) bis zu 150fach gesteigert werden [59].

Zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führten die bisherigen Versuche, im Tierexperiment durch längere Verabreichung von Alkohol die ALDH-Aktivität in der Leber bzw. im Gehirn zu beeinflussen: Während in einigen Fällen keine Änderung der Enzymaktivitäten festgestellt wurde [56, 60], konnten bei anderen Untersuchungen sowohl Induktionen als auch Repressionen einzelner Isoenzyme der ALDH nachgewiesen werden [61–64]. Möglicherweise sind diese widersprüchlichen Ergebnisse ebenfalls auf genetische Unterschiede zwischen den Versuchstieren zurückzuführen.

Die Wirkung des Alkohols und seiner Metaboliten auf die menschliche Aldehyddehydrogenase wurde bisher vorwiegend an Zell- und Gewebeproben von Alkoholikern studiert. Während in Autopsie-Gehirnproben kein signifikanter Unterschied zwischen den ALDH-Aktivitäten von Alkoholikern und Nicht-Alkoholikern festgestellt wurde [65], konnte in Biopsie- und Autopsie-Leberproben sowie in den Erythrozyten von Alkoholikern eine Verminderung der durchschnittlichen ALDH-Aktivitäten nachgewiesen werden [66–72]. Eine Zeitlang wurde vermutet, daß die verminderte ALDH-Aktivität in Leber und Erythrozyten von Alkoholikern, die auch mit erhöhten Blut-Acetaldehydspie-

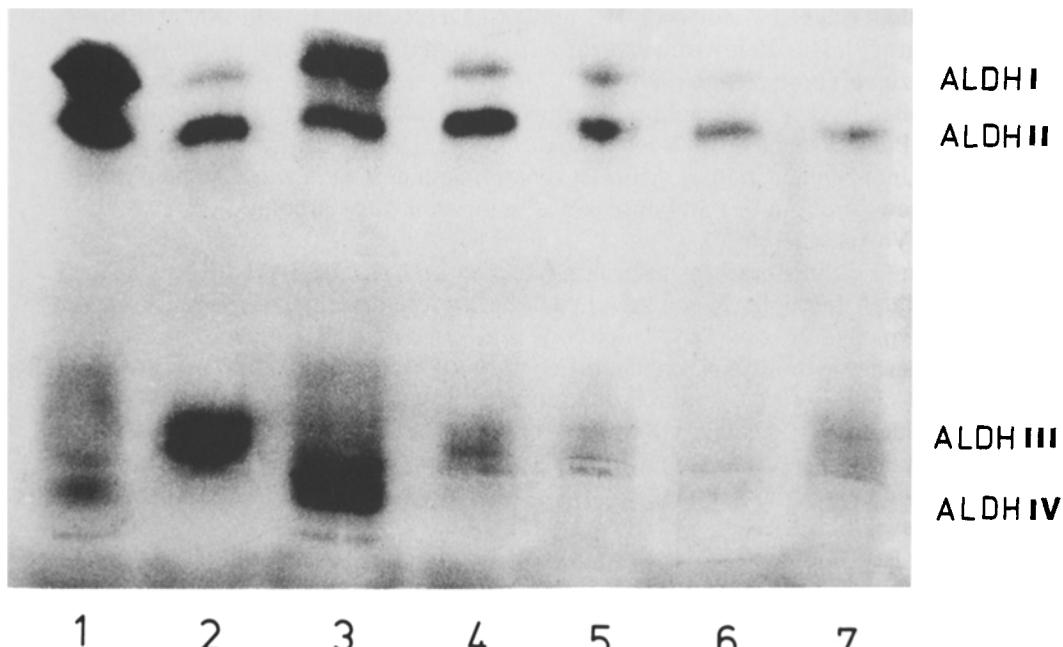


Abb. 3. ALDH-Isoenzymmuster verschiedener menschlicher Organe nach isoelektrischer Fokussierung im pH-Bereich 3.5–9.5 1: Leber, 2: Magen, 3: Niere, 4: Dünndarm, 5: Lunge, 6: Muskel, 7: Milz

geln nach Alkoholgenuß einhergeht [73], nicht eine Folge des Alkoholmißbrauchs sei, sondern seine Ursache oder zumindest ein genetischer Marker für die Neigung zum Alkoholismus [66, 68]. Bei Verlaufskontrollen stellte sich jedoch heraus, daß die ALDH-Aktivität in den Erythrozyten der Alkoholiker nach längerer Abstinenz wieder normale Werte erreicht [70, 71]. Somit kann die verminderte ALDH-Aktivität in Leber und Erythrozyten nicht als genetischer Marker für die Neigung zum Alkoholismus angesehen werden, sondern eher als „biochemischer Marker“ für das gegenwärtige Trinkverhalten einer Person.

Der Aktivitätsverlust der Erythrozyten-ALDH nach Alkoholabusus beruht sehr wahrscheinlich nicht auf einer verminderten Synthese des Enzymproteins, sondern auf einer Inaktivierung infolge des chronischen Alkoholmißbrauchs [74]. Unklar ist z. Zt. noch, über welche Mechanismen diese Inaktivierung verursacht wird. Eine direkte Wirkung des Ethanols oder des Acetaldehyds konnte zumindest *in vitro* nicht nachgewiesen werden [75].

In menschlichen Organen lassen sich mittels Elektrophorese und isoelektrischer Fokussierung mindestens vier Isoenzyme der Aldehyddehydrogenase unterscheiden, die in der Reihenfolge abnehmender elektrophoretischer Beweglichkeiten und ansteigender isoelektrischer Punkte mit ALDH I-IV [76, 77] bezeichnet werden (Abb. 3). Abweichend von dieser „sequentiellen“ Nomenklatur werden insbesondere von amerikanischen Autoren die Bezeichnungen

„ALDH₂“ oder „E₂“ für ALDH I und „ALDH₁“ oder „E₁“ für ALDH II bevorzugt [78]. Zur Zeit wird versucht, die Nomenklatur der Aldehyddehydrogenasen zu vereinheitlichen [79].

Außer in den elektrophoretischen Beweglichkeiten und in den isoelektrischen Punkten zeigen die Isoenzyme der menschlichen Aldehyddehydrogenase auch Unterschiede in ihrer Affinität zu verschiedenen Aldehyden, in den Molekulargewichten, in der Stabilität sowie in ihrer subzellulären und organspezifischen Verteilung.

Am besten erforscht sind bisher ALDH I und ALDH II, die die höchsten Affinitäten zu aliphatischen Aldehyden besitzen und deshalb auch als „Hauptisoenzyme“ oder „low Km“-Isoenzyme der ALDH bezeichnet werden. Eigene Untersuchungen an menschlichen Leberhomogenaten deuten darauf hin, daß ca. 80–90% der gesamten Oxidationskapazität der menschlichen Leber für Acetaldehyd auf der Aktivität dieser beiden Isoenzyme beruht, wobei die Gesamtaktivität von ALDH I ca. dreimal so hoch ist wie die von ALDH II. Innerhalb der Leberzelle kann die höchste ALDH I-Aktivität in den Mitochondrien nachgewiesen werden, während ALDH II-Aktivität vorwiegend im Cytosol zu finden ist [80, 81].

In der enzymatisch aktiven Form bestehen die Hauptisoenzyme wahrscheinlich aus jeweils 4 gleichen Untereinheiten. Für die Tetramere von ALDH I und ALDH II wurden von verschiedenen Untersuchern Molekulargewichte zwischen 204000 und 235000 bzw. zwischen 212000 und 245000 ermittelt [77, 78, 82, 83]. Die Synthese der Untereinheiten wird von Genen auf den Chromosomen 12 bzw. 9 kontrolliert [84, 85]. Obwohl beide Polypeptide aus jeweils 500 Aminosäureresten bestehen, und eine Sequenzhomologie von ca. 68% zeigen [86], konnten Hybride aus den zwei verschiedenen Monomeren bisher nicht nachgewiesen werden. Die immunologische Verwandtschaft zwischen den Hauptisozytinen ist noch nicht eindeutig geklärt. Während die meisten Autoren von einer partiellen immunologischen Identität ausgehen, ist es offenbar dennoch möglich, monospezifische polyklonale Kaninchen-Antikörper sowohl gegen ALDH I als auch gegen ALDH II zu erzeugen [87].

Über die Isoenzyme III und IV ist wesentlich weniger als über die Hauptisoenzyme bekannt. Da ihre Aktivität gegenüber kurzkettigen aliphatischen Aldehyden relativ gering ist, werden sie auch als „high-Km-Isoenzyme“ der ALDH bezeichnet. Beide Isoenzyme können sowohl NAD⁺ als auch NADP⁺ als Coenzym verwerten. ALDH III zeigt beim Menschen in der Magenschleimhaut die höchste Aktivität [88–92], kann aber auch in Lunge, Darm und Milz nachgewiesen werden. Dieses Isoenzym bevorzugt aromatische Aldehyde wie Benzaldehyd, Nitrobenzaldehyd und Furfuraldehyd. In normaler menschlicher und tierischer Leber ist meist keine oder nur sehr geringe ALDH III-Aktivität zu finden. Durch Karzinogene und andere Chemikalien wie 2-Acetylaminofluoren, 4-Dimethylaminoazobenzol und Phenobarbital kann jedoch in der Leber von Ratten die Synthese von Isoenzymen induziert werden, die ALDH III in ihren enzymkinetischen Eigenschaften stark ähneln [93]. Auch beim Menschen wurde kürzlich in einem primären Lebercarcinom ein Isoenzym der ALDH nachgewiesen, das mit der Magen-ALDH III immunologisch identisch war und sich auch elektrophoretisch und enzymkinetisch sehr ähnlich verhielt [92].

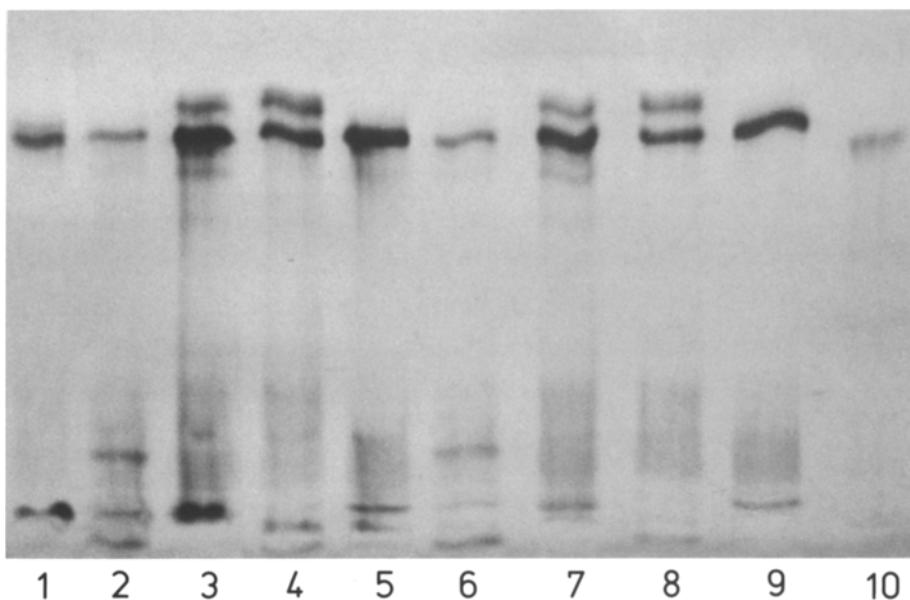


Abb. 4. ALDH-Isoenzymmuster normaler (3, 4, 7, 8) und ALDH I-defizienter (1, 2, 5, 6, 9, 10) japanischer Leberproben

Größere Aktivität von ALDH IV kommt beim Menschen vor allem in Leber und Niere vor. Nach neueren Untersuchungen besteht die größte Affinität zu Glutamat γ -Semialdehyd (=1-Pyrrolin-5-Carboxylat), so daß jetzt angenommen wird, daß ALDH IV mit der 1-Pyrrolin-5-Carboxylat-Dehydrogenase identisch ist [94].

Die Aminosäuresequenzen von ALDH III und IV sind noch nicht bekannt; auch ihre Molekulargewichte und die Zahl ihrer Untereinheiten konnten noch nicht eindeutig bestimmt werden. Die Ergebnisse bisheriger Untersuchungen sprechen jedoch dafür, daß sowohl ALDH III als auch ALDH IV nur aus zwei Untereinheiten bestehen, deren Molekulargewichte größer sind als die von ALDH I und II [90–92, 94].

Genetisch bedingte Polymorphismen der menschlichen Aldehyddehydrogenase wurden bisher nur bei Angehörigen mongolider Populationen beobachtet. Die weitaus häufigste ALDH-Variante zeichnet sich durch ein Fehlen des Isoenzymes I aus (Abb. 4) und wurde zuerst in Leberproben von Japanern in einer Häufigkeit von fast 50% entdeckt [95, 96]. Da das Isoenzym auch in Fibroblastenkulturen und Haarwurzellysaten nachzuweisen ist [76, 96], konnten in den letzten Jahren zahlreiche Feldstudien in verschiedenen Populationen sowie erste Familienuntersuchungen durchgeführt werden, deren Ziel die Ermittlung von Verbreitung und Erbgang genetisch bedingter Varianten der ALDH war [97–102]. Dabei zeigte sich, daß diese sog. ALDH I-Defizienz innerhalb mongolider Völker weit verbreitet ist, bei Angehörigen anderer ethnischer Gruppen aber nicht vorkommt (Abb. 5). Diese Tatsache, ebenso wie erste Ergebnisse von Familienuntersuchungen [99, 103], sprechen eindeutig für die Erblichkeit

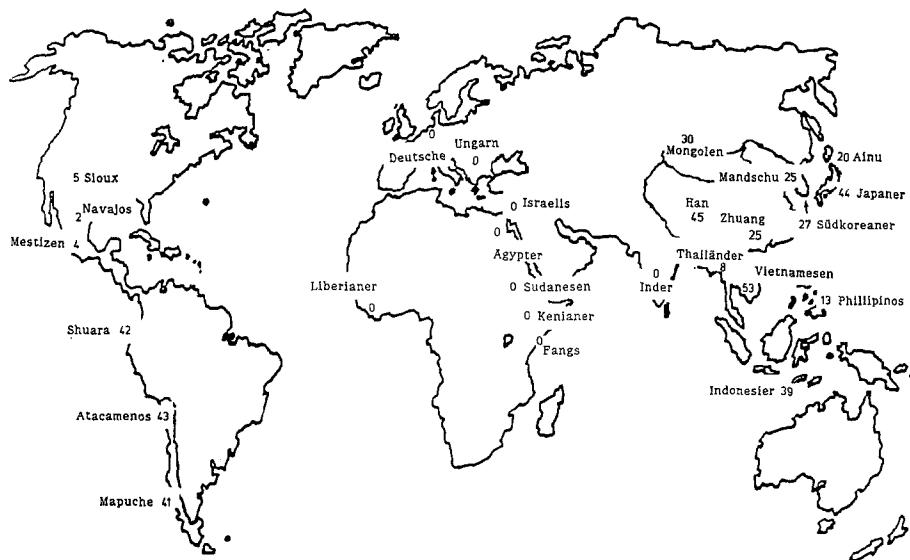


Abb. 5. Häufigkeit der ALDH I-Defizienz (%) in verschiedenen Populationen

der ALDH I-Defizienz. Als Ursache der ALDH I-Defizienz wurde eine Strukturmutation am ALDH I-Locus verantwortlich gemacht, die zur Synthese eines enzymatisch inaktiven Proteins führt, das aber mit ALDH I immunologisch identisch ist [104]. Dieses kreuzreagierende Material (CRM) unterscheidet sich vom normalen Enzymprotein nur durch eine einzige Aminosäure in Position 14 am C-terminalen Ende der Peptidkette [105, 106]. Die Folgen dieser Anomalie für den Metabolismus des Acetaldehyds und für die Alkoholempfindlichkeit eines Individuums werden im nächsten Abschnitt dargestellt.

Varianten des cytosolischen Isoenzymes der menschlichen ALDH (ALDH II) wurden bisher erst bei 4 Individuen beobachtet, die alle mongoliden Populationen angehörten. Bei einer dieser Varianten, die in einer Autopsie-Leberprobe eines Japaners entdeckt wurde, konnte ein inaktives ALDH II-Enzymprotein nachgewiesen werden [107]. Die übrigen Varianten unterschieden sich vom normalen Isoenzym II durch ein abnormes Bandenmuster, bei dem nach Auf trennung durch Elektrophorese oder isoelektrische Fokussierung anstelle einer einzelnen Bande mehrere Banden unterschiedlicher Intensität beobachtet wurden [108, 109]. Da es sich hier um Einzelbeobachtungen handelte, konnte bisher noch nicht näher untersucht werden, ob diese ALDH II-Anomalien genetisch bedingt sind und eine Bedeutung für die Acetaldehydabbauraten haben.

Bedeutung der Alkohol-abbauenden Enzyme für Alkoholempfindlichkeit und Trinkverhalten

Neben den interindividuellen Unterschieden im Trinkverhalten, die innerhalb jeder Population beobachtet werden können, gibt es teilweise auch deutliche interethnische Unterschiede im Pro-Kopf-Verbrauch an Alkohol und der Zahl

Tabelle 2. Häufigkeit einer Alkohol-Überempfindlichkeit in verschiedenen Populationen

Population	Häufigkeit des Flushing-Syndroms (%)	Literatur
Europide	4	110
Europide	10	111
Europide amerikanischen oder europäischen Ursprungs	12	112
Amerik. Indianer	50	110
Amerik. Mongolide	80	110
Amerik. Mongolide mit halb-europäider Abstammung	90	110
Orientalen	70	112
Hapa Haole (Hawaii)	60	113
Japaner, Taiwaner, Koreaner	83	114
Japaner	85	115
Japaner	58	116
Chinesen	57	111
Vietnamesen	60	96

der Alkoholkranken. So wird in ostasiatischen Populationen traditionell erheblich weniger Alkohol konsumiert als in Europa und in Nordamerika. Andererseits neigen nordamerikanische Indianer in besonderem Maße zu übermäßigem Alkoholgenuß und zum Alkoholismus. Mit Sicherheit hängt der Alkoholkonsum einer ethnischen Gruppe zu einem großen Teil auch von äußeren Faktoren wie Lebensstandard, Traditionen, Religion und gesellschaftlichen Normen ab. Es gibt aber inzwischen eindeutige Hinweise dafür, daß das Trinkverhalten einer Bevölkerung auch von biologischen Faktoren maßgeblich beeinflußt werden kann. Zumindest in japanischen Populationen ist ein Zusammenhang zwischen dem relativ geringen Alkoholkonsum und einer höheren Alkoholempfindlichkeit von Angehörigen mongolider Völker deutlich geworden. Es ist nämlich seit langem bekannt, daß viele Angehörige mongolider Völker auf Alkohol sehr viel empfindlicher reagieren als die meisten Europäer oder weißen Nordamerikaner (Tabelle 2). Die Empfindlichkeit äußert sich darin, daß bereits nach Aufnahme von Alkoholdosen, die bei den meisten Europäern keine oder nur eine geringe Wirkung zeigen, bei den betroffenen Personen ausgeprägte Unverträglichkeitssymptome ausgelöst werden. Nach dem auffälligsten Symptom, der Hautrötung, die meist periorbital beginnt und sich dann auf das ganze Gesicht ausbreitet, wird diese Unverträglichkeitsreaktion auch als „Flushing-Syndrom“ bezeichnet. Weitere Symptome, die gleichzeitig oder nach höheren Dosen auftreten können, sind Blutdruckabfall, Tachykardie, Palpitationen, Muskelschwäche, Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen. In Abhängigkeit von der Alkoholmenge nach der die Symptome auftreten, werden von einigen

Autoren „slow flusher“ und „fast flusher“ unterschieden. Erste Familienuntersuchungen deuteten darauf hin, daß das Flushing-Syndrom dominant vererbt wird [117].

Da die Symptome des Flushing-Syndroms als unangenehm empfunden werden und die Mehrheit der Japaner und Chinesen nach Alkoholgenuß davon betroffen wird, könnte dies eine plausible Erklärung für den traditionell niedrigen Alkoholkonsum und die geringe Anfälligkeit für Alkoholismus von Angehörigen mongolider Populationen sein. Um zu prüfen, ob ein derartiger Zusammenhang besteht, wurden in den letzten Jahren mehrere epidemiologische Erhebungen in verschiedenen Populationen durchgeführt [118–122]. Obwohl die Ergebnisse in den verschiedenen ethnischen Gruppen z. T. unterschiedlich ausfielen, kann aus ihnen doch der allgemeine Schluß gezogen werden, daß Individuen mit „fast flushing“ im Durchschnitt weniger trinken als Individuen mit „slow flushing“ oder ohne diese Symptomatik. Am deutlichsten wurde dieser Zusammenhang in japanischen Populationen, während in anderen ethnischen Gruppen der Einfluß der Alkoholüberempfindlichkeit auf das Trinkverhalten weniger ausgeprägt war.

Obwohl noch nicht klar ist, ob eine erhöhte Alkoholsensitivität immer über die gleichen physiologischen bzw. biochemischen Mechanismen zustande kommt, haben die Untersuchungen der letzten Jahrzehnte deutlich gemacht, daß die biologische Ursache des Flushing-Syndroms zumindest bei Mongoliden vorwiegend im Metabolismus des Ethanol s bzw. des Acetaldehyds zu suchen ist.

Da die Symptome des Flushing-Syndroms große Ähnlichkeit haben mit denen, die bei Acetaldehyd-Intoxikation zu beobachten sind, und da bei Personen mit Flushing-Symptomen auch erhöhte Blut-Acetaldehydspiegel gemessen wurden [116, 123, 124], gilt es heute als erwiesen, daß nicht der Ethanol selbst, sondern sein erster Metabolit Acetaldehyd der eigentliche Auslöser der Unverträglichkeitssymptome ist. Über die Entstehung der erhöhten Acetaldehydspiegel gab es allerdings längere Zeit zwei unterschiedliche Ansichten: Sowohl eine beschleunigte Oxidation des Ethanol s als auch ein verlangsamter Abbau des Acetaldehyds aufgrund einer ALDH I-Defizienz wurden als Ursachen diskutiert.

Nach Entdeckung der „atypischen“ ADH, die *in vitro* Ethanol sehr viel schneller zu Acetaldehyd abbaut als das für Europäer normale Isoenzym, lag zunächst die Vermutung nahe, daß eine beschleunigte Oxidation des Ethanol s bei Individuen mongoliden Ursprungs für die erhöhten Acetaldehydspiegel und die damit verbundene Alkoholsensitivität verantwortlich sei [33]. Eine signifikant erhöhte Alkoholabbaurate bei Trägern der „atypischen“ ADH wäre auch von forensischer Bedeutung, z. B. für die Rückrechnung von Alkoholspiegeln vom Entnahmepunkt auf den Deliktzeitpunkt. Bei Untersuchungen an Leberbiopsieproben in Kombination mit Alkoholtrinkversuchen bzw. mit intravenöser Alkoholzufuhr wurde zwar in den Leberhomogenaten mit atypischer ADH (umgerechnet auf pH 7.4) eine 3–5fach höhere Enzymaktivität ermittelt; der Ethanolabbau *in vivo* war bei den betreffenden Individuen aber nicht signifikant erhöht [39, 40]. Dies deutet darauf hin, daß *in vivo* nicht die Menge bzw. die Aktivität der ADH der limitierende Faktor der Ethanoloxidation ist, sondern andere Parameter wie z. B. die Geschwindigkeit der Reoxidation von NADH zu NAD⁺. Auch die Möglichkeit, daß eine beschleunigte Ethanoloxida-

tion durch das MEOS oder durch die Katalase zu erhöhten Acetaldehydspiegeln führt, kann ausgeschlossen werden, da zwischen den Alkoholabbauraten von Japanern mit und ohne Flushing-Syndrom keine signifikanten Unterschiede nachzuweisen waren [125]. Außerdem ist die Häufigkeit der Alkohol-Überempfindlichkeit deutlich geringer als die Häufigkeit der atypischen ADH in mongoliden Populationen. Daher dürfte die Hauptursache der Alkoholempfindlichkeit vieler Angehöriger mongolider Völker nicht in einer Überproduktion von Acetaldehyd durch eine „hyperaktive“ Alkoholdehydrogenase bestehen, sondern in dem verzögerten Abbau dieses Metaboliten aufgrund einer ALDH I-Defizienz. Nach eigenen Messungen ist die Oxidationskapazität für Acetaldehyd in der Leber eines ALDH I-Defizienten auf ca. $\frac{1}{3}$ des Normalwertes reduziert. Durch Untersuchungen an Haarwurzelllysaten mongolider Individuen konnte darüber hinaus eine enge Korrelation zwischen ALDH I-Defizienz und Flushing-Symptomatik nachgewiesen werden [97–103, 125].

Der Erbgang der ALDH I-Defizienz ist noch nicht zweifelsfrei aufgeklärt. Aufgrund früherer Familienstudien und Untersuchungen auf Proteinebene wurde zunächst ein genetisches Modell entwickelt, nach dem am ALDH I-Locus zwei Allele ALDH I¹ und ALDH I² vorkommen können, die kodominant vererbt werden [103, 107]. Neuerdings ist es möglich, den ALDH I-Genotyp mit Hilfe von molekulargenetischen Methoden direkt zu bestimmen. Die Ergebnisse der bisher vorliegenden Studien sprechen allerdings eher für eine dominante Vererbung der ALDH I-Defizienz [126–128]. Unklar ist noch, ob vollständige Dominanz besteht oder ob heterozygote Individuen noch eine geringe Menge des normalen Isoenzymes bilden, was eine plausible Erklärung für die unterschiedlichen Schweregrade des Flushing-Syndroms wäre.

Bei einer in Japan durchgeföhrten Studie an Alkoholikern, psychisch kranken Nichtalkoholikern (Schizophrene und Drogenabhängige) und Gesunden wurde in der Gruppe der Alkoholiker ein weit geringerer Prozentsatz an Personen mit ALDH I-Defizienz gefunden als in den übrigen Kollektiven [108]. So mit scheint die ALDH I-Defizienz aufgrund der mit ihr verbundenen Alkoholempfindlichkeit einen genetisch bedingten Schutzfaktor gegen Alkoholmissbrauch darzustellen.

Bei Angehörigen europäischer Völker wurden bisher zwar keine genetisch bedingte Varianten der ALDH-Isoenzyme nachgewiesen; trotzdem entspricht es einer allgemeinen Erfahrung, daß auch in diesen Populationen die psychische und körperliche Reaktion nach Aufnahme einer vergleichbaren Dosis von Ethanol interindividuell sehr unterschiedlich ausfallen kann. Auch das Risiko, alkoholtoxische Organschäden davonzutragen, scheint bei vergleichbarem Alkoholkonsum unterschiedlich hoch zu sein. Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, leidet auch ein geringer Prozentsatz von Europäern nach Alkoholgenuss unter ausgeprägten Unverträglichkeitssymptomen, die dem Flushing-Syndrom ähneln. Ob diese Alkohol-Unverträglichkeitsreaktion auch auf erhöhten Acetaldehydspiegeln beruht und ebenfalls erblich ist, wurde noch nicht untersucht. Es wäre aber durchaus denkbar, daß es auch unter Europäern Individuen gibt, die zwar ein normales ALDH-Isoenzymmuster zeigen, deren ALDH-Gesamtaktivität aber – möglicherweise aufgrund verminderter Enzymsynthese – deutlich vermindert ist. Tatsächlich konnten wir vor kurzem sowohl in Autopsieproben von

Leber und anderen Organen, ebenso wie in Erythrozyten gesunder Blutspender erhebliche interindividuelle Unterschiede in den ALDH-Aktivitäten nachweisen. Eine Abhängigkeit der Aktivität und der Menge des Enzymproteins in den Erythrozyten vom Alter oder vom Geschlecht des Blutspenders wurde nicht beobachtet [129]. Unklar ist z. Zt. noch, ob die nachgewiesenen interindividuellen Aktivitätsunterschiede der ALDH mit Unterschieden in der Empfindlichkeit gegenüber der toxischen Wirkung des Acetaldehyds verbunden sind und somit das Trinkverhalten eines Individuums beeinflussen können.

Literatur

1. Ziegler H (1988) Alkoholkonsum 1987. In: Deutsche Hauptstelle gegen die Suchtgefährden (Hrsg) Jahrbuch 1989 zur Frage der Suchtgefährden. Neuland-Verlagsgesellschaft, Hamburg, S 139–147
2. Goodwin DW, Schulsinger F, Hermansen L, Guze SB, Winokur G (1973) Alcohol problems in adoptees raised apart from alcoholic biological parents. *Arch Gen Psychiat* 31: 164–169
3. Martin NG (1987) Genetic differences in drinking habits, alcohol metabolism and sensitivity in unselected samples of twins. In: Goedde HW, Agarwal DP (eds) Genetics and alcoholism. Liss, New York, pp 109–119
4. Lieber CS, DeCarli LM (1970) Hepatic microsomal ethanol-oxidizing system. *J Biol Chem* 245: 2505–2512
5. Chance B, Oshino N, Sugano T, Jamieson D (1974) Role of catalase in ethanol metabolism. In: Thurman RG, Yonetani T, Williamson JR, Chance B (eds) Alcohol and aldehyde metabolizing systems, vol. I. Academic Press, New York, pp 169–182
6. Goedde HW (1963) Zum Wirkungsmechanismus von Vitamin B₁: Reindarstellung und enzymatische Reaktionen von „aktivem Acetaldehyd“ (2-(a-Hydroxyäthyl 9-thiaminpyrophosphat). *Int Z Vitaminforsch* 33: 18–40
7. Mezey E, Tobon F (1971) Rates of ethanol clearance and activities of the ethanol-oxidizing enzymes in chronic alcoholic patients. *Gastroenterology* 61: 707–715
8. Fellenius E, Björkroth U, Kiessling KH (1975) Metabolic changes induced by ethanol in muscle and liver tissue of the rat in vivo. *Acta Chem Scand* 27: 2361–2366
9. Lieber CS (1985) Ethanol metabolism and pathophysiology of alcoholic liver disease. In: Seitz HK, Kommerell B (eds) Alcohol related diseases in gastroenterology. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 19–47
10. Truitt EB Jr, Walsh MJ (1973) The role of acetaldehyde in the actions of ethanol. In: Kissin H, Begleiter H (eds) Biology of alcoholism, vol 1. Plenum Press, New York, pp 161–195
11. Barry RE, McGivan JD (1985) Acetaldehyde alone may initiate hepatocellular damage in acute alcoholic liver disease. *Gut* 26: 1065–1069
12. Salaspuro M, Lindros KO (1985) Metabolism and toxicity of acetaldehyde. In: Seitz HK, Kommerell B (eds) Alcohol related diseases in gastroenterology. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 106–123
13. Gaines KC, Salhany JM, Tuma DJ, Sorrell MF (1977) Reactions of acetaldehyde with human erythrocyte membrane proteins. *FEBS Lett* 75: 115–117
14. Stevens VJ, Fantl WJ, Newman CB, Sims RV, Cerami A, Peterson CM (1981) Acetaldehyde adducts with hemoglobin. *J Clin Invest* 67: 361–369
15. Nomura F, Lieber CS (1981) Binding of acetaldehyde to rat liver microsomes: enhancement after chronic alcohol consumption. *Biochem Biophys Res Commun* 100: 131–137
16. Donohue TM, Tuma DJ, Sorrell MF (1983) Acetaldehyde adducts with proteins: binding of [¹⁴C]acetaldehyde to serum albumin. *Arch Biochem Biophys* 220: 239
17. Tuma DJ, Sorrell MF (1987) Functional consequences of acetaldehyde binding to proteins. *Alcohol Alcoholism*, Suppl 1: 61–66

18. Israel Y, Hurwitz E, Niemelä O, Arnon R (1986) Monoclonal and polyclonal antibodies against acetaldehyde-containing epitopes in acetaldehydeprotein adducts. *Proc Natl Acad Sci* 83: 7923–7927
19. Krebs HA, Perkins JR (1970) The physiological role of alcohol dehydrogenase. *Biochem J* 118: 635–644
20. Christophe J, Popjak G (1961) Studies on the biosynthesis of cholesterol XIV. The origin of prenoic acids from allyl pyrophosphates in liver enzyme systems. *J Lipid Res* 2: 244–257
21. Björkhem I (1972) On the role of alcohol dehydrogenase in w-oxidation of fatty acids. *Eur J Biochem* 30: 441–451
22. Bliss AF (1951) The equilibrium between vitamin A, alcohol and aldehyde in the presence of alcohol dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 31: 197–204
23. Zachman RD, Olson YA (1961) A comparison of retenene reductase and alcohol dehydrogenase of rat liver. *J Biol Chem* 236: 2309–2313
24. Goldberg L, Rydberg U (1969) Inhibition of ethanol metabolism in vivo by administration of pyrazole. *Biochem Pharmacol* 18: 1749–1762
25. Burnett KG, Felder MR (1980) Ethanol metabolism in *Peromyscus* genetically deficient in alcohol dehydrogenase. *Biochem Pharmacol* 29: 125–130
26. Alderman J, Takagi T, Lieber CS (1987) Ethanol-metabolizing pathways in deer mice: estimation of flux calculated from isotope effects. *J Biol Chem* 262: 7497–7503
27. Harada S, Agarwal DP, Goedde HW (1978) Human liver alcohol dehydrogenase isozyme variation: Improved methods using prolonged high voltage starch gel electrophoresis and isoelectric focusing. *Hum Genet* 40: 215–220
28. von Wartburg J-P, Papenberg J, Aebi H (1965) An atypical human alcohol dehydrogenase. *Can J Biochem* 43: 889–898
29. Yin SN, Bosron WF, Magnes LJ, Li T-K (1984) Human liver alcohol dehydrogenase: purification and kinetic characterization of the $\beta_2\beta_2$, $\beta_2\beta_1$, $\alpha\beta_2$ and $\beta_2\gamma_1$ "Oriental" isoenzymes. *Biochemistry* 23: 5847–5853
30. Fukui M, Wakasugi C (1972) Liver alcohol dehydrogenase in a Japanese population. *Jpn J Leg Med* 26: 46–51
31. Ogata S, Mizohata M (1973) Studies on atypical human liver alcohol dehydrogenase in Japan. *Jpn J Stud Alc* 8: 33–44
32. Stamatoyannopoulos G, Chen SH, Fukui F (1975) Liver alcohol dehydrogenase in Japanese: High population frequency of atypical form and its possible role in alcohol sensitivity. *Am J Hum Genet* 27: 789–796
33. Harada S, Misawa S, Agarwal DP, Goedde HW (1980) Liver alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase in the Japanese: Isozyme variation and its possible role in alcohol intoxication. *Am J Hum Genet* 32: 8–15
34. Bosron WF, Li T-K (1986) Genetic polymorphism of human liver alcohol and aldehyde dehydrogenases and their relationship to alcohol metabolism and alcoholism. *Hepatology* 6: 502–510
35. Ikuta T, Shibuya A, Yoshida A (1988) Direct determination of usual (Caucasian type) and atypical (Oriental type) alleles of class I human alcohol dehydrogenase-2 locus. *Biochem Genet* 26: 519–525
36. Teng YS, Jehan S, Lie-Injo LE (1979) Human alcohol dehydrogenase ADH 2 and ADH 3 polymorphism in ethnic Chinese and Indians of West Malaysia. *Hum Genet* 53: 87–90
37. von Wartburg J-P, Schürch PM (1968) Atypical human liver alcohol dehydrogenase. *Ann NY Acad Sci* 151: 936–946
38. Käferstein H, Berghaus G, Detmar J (1976) „Normale“ und „atypische“ Alkoholdehydrogenase – Einflußfaktoren auf die Enzymaktivitäten der Leber. *Blutalkohol* 13: 144–155
39. Schulz W, Kreuzberg S, Neymeyer HG, Schwarz U, Pachaly A (1976) Über die Häufigkeit der atypischen ADH in Leberbiopsiematerial und den Einfluß auf den Äthanolumsatz in vivo. *Kriminalistik und forensische Wissenschaften* 26: 109–111
40. Edwards JA, Price Evans DA (1967) Ethanol metabolism in subjects possessing typical and atypical liver alcohol dehydrogenase. *Clin Pharmacol Ther* 8: 824–829

41. Smith M, Hopkinson DA, Harris H (1971) Developmental changes and polymorphism in human alcohol dehydrogenase. *Ann Hum Genet* 34:251–271
42. Smith M, Hopkinson DA, Harris H (1972) Alcohol dehydrogenase isozyme in adult human stomach and liver: evidence for activity of the ADH₃ locus. *Ann Hum Genet* 35: 243–253
43. Azevêdo ES, Da Silva MCBO, Tavares-Neto J (1975) Human alcohol dehydrogenase ADH₁, ADH₂ and ADH₃ loci in a mixed population of Bahia, Brazil. *Ann Hum Genet* 39:321–327
44. Rex DK, Bosron WF, Smialek JE, Li T-K (1985) Alcohol and aldehyde dehydrogenase isoenzymes in North American Indians. *Alcoholism Clin Exp Res* 9:147–152
45. Bosron WF, Li T-K, Vallee BL (1980) New molecular forms of human liver alcohol dehydrogenase: Isolation and characterization of ADH Indianapolis. *Proc Natl Acad Sci* 289:545–548
46. Agarwal DP, Meier-Tackmann D, Harada S, Goedde HW (1981) A search for the Indianapolis variant of human alcohol dehydrogenase in liver autopsy samples from North Germany and Japan. *Hum Genet* 59:170–171
47. Okuda K, Higushi B, Fukuba R (1973) Horse liver 3a,7a,12a Trihydroxy-5β-cholestane-26 aldehyde dehydrogenase as liver aldehyde dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 293:15–25
48. Monder C, Wang PT (1973) Oxidation of 21-dehydrocorticosteroids to steroidal 20-oxo-21-oic acids by an aldehyde dehydrogenase of sheep adrenal. *J Biol Chem* 248:8547–8554
49. Noble EP, Tewari S (1977) Metabolic aspects of alcoholism in the brain. In: Lieber CS (ed) *Metabolic aspects of alcoholism*, pp 149–185
50. Lahti RA, Majchrowicz E (1969) Acetaldehyde – an inhibitor of the enzymatic oxidation of 5-hydroxyindolacetaldehyde. *Biochem Pharmacol* 18:535–538
51. Tank AW, Weiner H, Thurman JA (1976) Ethanol-induced alterations of dopamine metabolism in rat liver. *Ann NY Acad Sci* 273:219–226
52. Agarwal DP, Hafer G, Harada S, Goedde HW (1982) Studies on aldehyde dehydrogenase and aldehyde reductase in human brain. In: Weiner H, Wermuth B (eds) *Enzymology of carbonyl metabolism. Aldehyde dehydrogenase and aldo/keto reductase*. Liss, New York, pp 319–328
53. Rommelspacher H (1988) Pathobiochemie der Alkoholkrankheit. *Deutsches Ärzteblatt-Arztliche Mitteilungen* 1/2:25–27
54. Hellström E, Tottmar O, Widerlöv E (1983) Effects of oral administration or implantation of disulfiram on aldehyde dehydrogenase activity in human blood. *Alcoholism Clin Exp Res* 7:231–236
55. Tottmar O, Hellström E (1983) Aldehyde dehydrogenase in blood: A sensitive assay and inhibition by disulfiram. *Pharmacol Biochem Behav* 18, Suppl 1:103–107
56. Redmond G, Cohen G (1971) Induction of liver aldehyde dehydrogenase: Possible role in ethanol tolerance after exposure to barbiturates. *Science* 171:387–389
57. Deitrich RA (1971) Genetic aspects of increase in rat liver aldehyde dehydrogenase induced by phenobarbital. *Science* 173:334–336
58. Deitrich RA (1972) Genetic influence upon phenobarbital-induced increase in rat liver supernatant aldehyde dehydrogenase activity. *J Biol Chem* 247:7232–7236
59. Deitrich RA, Bludeau P, Stock T, Roper M (1977) Induction of different rat liver supernatant aldehyde dehydrogenases by phenobarbital and tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Biol Chem* 252:6169–6176
60. Tottmar O, Kiessling KH, Forsling H (1974) Effects of phenobarbital and ethanol on rat liver aldehyde dehydrogenases. *Acta Pharmacol Toxicol* 35:270–276
61. Horton AA, Barret MC (1976) Rates of induction of mitochondrial aldehyde dehydrogenase in rat liver. *Biochem J* 157:177–179
62. Amir S (1978) Brain aldehyde dehydrogenase: adaptive increase following prolonged ethanol administration in rats. *Neuropharmacology* 17:463–467
63. Greenfield NJ, Pietruszko R, Lin G, Lester D (1976) The effect of ethanol ingestion on the aldehyde dehydrogenases of rat liver. *Biochim Biophys Acta* 428:627–632

64. Hasumura Y, Teschke R, Lieber CS (1975) Acetaldehyde oxidation by hepatic mitochondria: Decrease after chronic ethanol consumption. *Science* 189: 727–729
65. Pietruszko R, Reed DM, Vallari RC, Major LF (1981) Brain aldehyde dehydrogenase in human alcoholics and controls. *Alcoholism Clin Exp Res* 5: 78–84
66. Jenkins WJ, Peters TJ (1980) Selectively reduced hepatic acetaldehyde dehydrogenase in alcoholics. *Lancet* 1: 628–629
67. Agarwal DP, Dethling J, Wolken S, Harada S, Goedde HW (1982) Subcellular distribution and properties of ALDH isozymes in autopsy livers from normals and alcoholics. *Alcoholism Clin Exp Res* 6: 426–438
68. Thomas M, Halsall S, Peters TJ (1982) Role of hepatic acetaldehyde dehydrogenase in alcoholism: Demonstration of persistent reduction of cytosolic activity in abstaining patients. *Lancet* 2: 1057–1059
69. Agarwal DP, Tobar-Rojas L, Meier-Tackmann D, Schrappe O, Harada S, Kaschkat G, Goedde HW (1982) Human erythrocyte aldehyde dehydrogenase: a biochemical marker of alcoholism? *Alcoholism Clin Exp Res* 5: 12–16
70. Agarwal DP, Harada S, Goedde HW, Schrappe O (1983) Cytosolic aldehyde dehydrogenase and alcoholism. *Lancet* 1: 68
71. Agarwal DP, Tobar-Rojas L, Harada S, Goedde HW (1983) Comparative study of erythrocyte aldehyde dehydrogenase in alcoholics and control subjects. *Pharmacol Biochem Behav* 18, Suppl 1: 89–95
72. Maring JA, Weigand K, Brenner HD, von Wartburg J-P (1983) Aldehyde oxidizing capacity of erythrocytes in normal and alcoholic individuals. *Pharmacol Biochem Behav* 13, Suppl 1: 135–138
73. Korsten MA, Matsuzaki S, Feinman L, Lieber CS (1975) High blood acetaldehyde levels after ethanol administration. Difference between alcoholic and non-alcoholic subjects. *N Engl J Med* 292: 386–389
74. Agarwal DP, Volkens T, Hafer G, Goedde HW (1987) Erythrocyte aldehyde dehydrogenase: studies of properties and changes in acute and chronic alcohol intoxication. In: Weiner H, Flynn TG (eds) Enzymology and molecular biology of carbonyl metabolism: aldehyde dehydrogenase, aldo-keto reductase and alcohol dehydrogenase. Liss, New York, pp 85–101
75. Volkens T, Eckey R, Agarwal DP, Goedde HW (1988) Erythrocyte aldehyde dehydrogenase activity in alcoholism: in vitro effect of hydrogen peroxide and glutathione. In: Nordmann R, Ribiere C, Rouch H (eds) Alcohol toxicity and free radical mechanisms. Pergamon Press, Oxford, New York, pp 207–211
76. Goedde HW, Agarwal DP, Harada S (1979) Alcohol metabolizing enzymes: Studies of isozymes in human biopsies and cultured fibroblasts. *Clin Genet* 16: 29–33
77. Harada S, Agarwal DP, Goedde HW (1980) Electrophoretic and biochemical studies of human aldehyde dehydrogenase isozymes in various tissues. *Life Sci* 26: 1771–1780
78. Greenfield NJ, Pietruszko R (1977) Two aldehyde dehydrogenases from human liver; isolation via affinity chromatography and characterization of the isozymes. *Biochim Biophys Acta* 483: 35–45
79. Nomenclature of mammalian aldehyde dehydrogenases. In: Weiner H, Flynn TG (eds) Enzymology and molecular biology of carbonyl metabolism. 2. Aldehyde dehydrogenase, alcohol dehydrogenase and aldo/keto reductase. Liss, New York, pp xix–xxi
80. Koivula T (1975) Subcellular distribution and characterization of human liver aldehyde dehydrogenase fractions. *Life Sci* 16: 1563–1570
81. Meier-Tackmann D, Korencke GC, Agarwal DP, Goedde HW (1988) Aldehyde dehydrogenase isozymes: subcellular distribution in livers from alcoholics and healthy subjects. *Alcohol* 5: 73–80
82. Jones GL, Teng Y-S (1983) A chemical and enzymological account of the multiple forms of human liver aldehyde dehydrogenase. Implications for ethnic differences in alcohol metabolism. *Biochim Biophys Acta* 745: 162–174
83. Ikawa M, Impraim C, Wang G, Yoshida A (1983) Isolation and characterization of aldehyde dehydrogenase isozymes from usual and atypical human livers. *J Biol Chem* 258: 6282–6287

84. Hsu LC, Yoshida A, Mohandas T (1986) Chromosomal assignment of the genes for human aldehyde dehydrogenase-1 and aldehyde dehydrogenase-2. *Am J Hum Gen* 38: 641–648
85. Braun T, Grzeschik KH, Bober E, Agarwal DP, Singh S, Goedde HW (1986) The structural gene for the mitochondrial aldehyde dehydrogenase maps to human chromosome 12. *Hum Genet* 73:365–367
86. Hempel J, Jörnvall H (1987) Functional topology of aldehyde dehydrogenase structures. In: Weiner H, Flynn TG (eds) Enzymology and molecular biology of carbonyl metabolism: aldehyde dehydrogenase, aldo-keto reductase and alcohol dehydrogenase. Liss, New York, pp 1–14
87. Agarwal DP, Eckey R, Harada S, Goedde HW (1984) Basis of aldehyde dehydrogenase deficiency in Orientals: immunochemical studies. *Alcohol* 1:111–118
88. Teng Y-S (1981) Stomach aldehyde dehydrogenase: Report of a new locus. *Hum Her* 31: 74–77
89. Meier-Tackmann D, Agarwal DP, Saha N, Goedde HW (1984) Aldehyde dehydrogenase isozymes in stomach autopsy specimens from Germans and Chinese. *Enzyme* 32: 170–177
90. Santisteban I, Povey S, West LF, Parrington JM, Hopkinson DA (1985) Chromosome assignment, biochemical and immunological studies on a human aldehyde dehydrogenase, ALDH3. *Ann Hum Genet* 49:87–100
91. Pietruszko R, Ryzlak MT, Forte-McRobbie CM (1987) Multiplicity and identity of human aldehyde dehydrogenases. *Alcohol Alcoholism, Suppl* 1:175–179
92. Agarwal DP, Eckey R, Rudnay A-C, Volkens T, Goedde HW (1989) “High Km” aldehyde dehydrogenase isozymes in human tissues: Constitutive and tumor-associated forms. In: Weiner H, Flynn TG (eds) Enzymology and molecular biology of carbonyl metabolism: aldehyde dehydrogenase, alcohol dehydrogenase and aldo/keto reductase. Liss, New York, pp 119–131
93. Lindahl R (1982) Induction of aldehyde dehydrogenases during hepatocarcinogenesis. In: Weiner H, Wermuth B (eds) Enzymology of carbonyl metabolism: aldehyde dehydrogenase and aldo/keto reductases. Liss, New York, pp 121–135
94. Forte-McRobbie CM, Pietruszko R (1986) Purification and characterization of human liver “high Km” aldehyde dehydrogenase and its identification as glutamic γ -semialdehyde dehydrogenase. *Biol Chem* 261:2154–2163
95. Goedde HW, Harada S, Agarwal DP (1979) Racial differences in alcohol sensitivity: A new hypothesis. *Hum Genet* 51:331–334
96. Goedde HW, Agarwal DP, Harada S (1980) Genetic studies on alcohol metabolizing enzymes: Detection of isozymes in human hair roots. *Enzyme* 25: 281–286
97. Agarwal DP, Harada S, Goedde HW (1981) Racial differences in biological sensitivity to ethanol: The role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase isozymes. *Alcoholism Clin Exp Res* 5:12–16
98. Goedde HW, Agarwal DP, Harada S, Meier-Tackmann D (1982) ALDH polymorphism and alcohol sensitivity: Biochemical and population genetic studies. *Alcoholism Clin Exp Res* 6:426–438
99. Goedde HW, Agarwal DP, Harada S, Meier-Tackmann D, Ruofu D, Bienzle U, Kroeger A, Hussein L (1983) Population genetic studies on aldehyde dehydrogenase isozyme deficiency and alcohol sensitivity. *Am J Hum Genet* 35: 769–772
100. Goedde HW, Agarwal DP, Harada S (1983) The role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase in alcohol metabolism, alcohol sensitivity and alcoholism. In: Rattazzi MC, Scandalios JG, Whitt GS (eds) Isozymes, current topics in biological and medical research, vol 8. Liss, New York, pp 175–193
101. Goedde HW, Benkmann HG, Kriese G, Bogdanski P, Agarwal DP, Ruofu D, Liangzhong C, Meiyi C, Yida Y, Juijin X, Shizhe L, Yongfa W (1984) Aldehyde dehydrogenase deficiency and alcohol sensitivity in four different Chinese populations. *Hum Hered* 34:183–186
102. Goedde HW, Agarwal DP, Paik YK (1984) Frequency of aldehyde dehydrogenase I isozyme deficiency in Koreans: A pilot study. *Korean J Hum Genet* 5:88–90

103. Goedde HW, Agarwal DP, Eckey R, Harada S (1985) Population genetic and family studies on aldehyde dehydrogenase isozyme deficiency and alcohol sensitivity. *Alcohol* 2:383–390
104. Impraim C, Wang G, Yoshida A (1982) Structural mutation in a major human aldehyde dehydrogenase gene results in loss of enzyme activity. *Am J Hum Genet* 34:837–841
105. Yoshida A (1982) Molecular basis of difference in alcohol metabolism between Orientals and Caucasians. *Jpn J Hum Gen* 27:55–70
106. Yoshida A, Huang I-Y, Ikawa M (1984) Molecular abnormality of an inactive aldehyde dehydrogenase variant commonly found in Orientals. *Proc Natl Acad Sci* 81:258–261
107. Yoshida A, Wang G, Dave V (1983) Determination of genotypes of human aldehyde dehydrogenase ALDH 2 locus. *Am J Hum Genet* 35:1107–1116
108. Harada S, Agarwal DP, Goedde HW, Ishikawa B (1983) Aldehyde dehydrogenase isozyme variation and alcoholism in Japan. *Pharmacol Biochem Behav* 18, Suppl 1:152–153
109. Eckey R, Agarwal DP, Goedde HW (1986) Detection and partial characterization of a variant form of cytosolic aldehyde dehydrogenase isozyme. *Hum Genet* 72:95–97
110. Wolff P (1973) Vasomotor sensitivity to ethanol in diverse Mongoloid populations. *Am J Hum Genet* 25:193–202
111. Zeiner AR, Paredes A, Christensen DH (1979) The role of acetaldehyde in mediating reactivity to an acute dose of ethanol among different racial groups. *Alcoholism Clin Exp Res* 3:11–18
112. Ewing JA, Rouse BA, Pellizzari ED (1974) Alcohol sensitivity and ethnic background. *Am J Psychiatr* 131:206–210
113. Wilson Jr, McClearn GE, Johnson RC (1978) Ethnic variation in the use and effects of alcohol. *Drug Alcohol Depend* 3:147–151
114. Wolff P (1972) Ethnic differences in alcohol sensitivity. *Science* 175:449–450
115. Morikawa Y, Matsuzaki J, Kuratsune M, Tsukamoto S, Makisumi S (1968) Plethysmographic study of effects of alcohol. *Nature* 220:186–188
116. Mizoi Y, Ijiri I, Tatsuno J, Kijima T, Fujiwasa S, Adachi J, Hishida S (1979) Relationship between facial flushing and blood acetaldehyde levels after alcohol intake. *Pharmacol Biochem Behav* 10:303–311
117. Schwitters SY, Johnson RC, Johnson SB, Ahern FM (1982) Familial resemblances in flushing following alcohol use. *Behav Genet* 12:349–352
118. Schwitters SY, Johnson RC, McClearn GE, Wilson JR (1982) Alcohol use and the flushing response in different racial-ethnic groups. *J Stud Alcohol* 43:1259–1262
119. Johnson RC, Nagoshi CT, Schwitters SY, Bowman KS, Ahern FM, Wilson JR (1983) Further investigation of racial/ethnic differences and of familial resemblances in flushing in response to alcohol. *Behav Genet* 14:171–178
120. Park JY, Huang Y-H, Nagoshi CT, Yuen S, Johnson RC, Ching CA, Bowman KS (1984) The flushing response to alcohol use among Koreans and Taiwanese. *J Stud Alcohol* 45:481–485
121. Suwaki H, Ohara H (1985) Alcohol-induced facial flushing and drinking behavior in Japanese men. *J Stud Alcohol* 46:196–198
122. Nagoshi CT, Dixon LK, Johnson RC, Yuen SHL (1988) Familial transmission of alcohol consumption and the flushing response to alcohol in three Oriental groups. *J Stud Alcohol* 49:261–267
123. Harada S, Agarwal DP, Goedde HW, Takagi S (1983) Blood ethanol and acetaldehyde levels in Japanese alcoholics and controls. *Pharmacol Biochem Behav* 18, Suppl 1:139–140
124. Inoue K, Fukunaga M, Kiriyma T, Komura S (1984) Accumulation of acetaldehyde in alcohol-sensitive Japanese: Relation to ethanol and acetaldehyde oxidizing capacity. *Alcoholism Clin Exp Res* 8:319–321
125. Mizoi Y, Kogame M, Fukunaga T, Adachi J, Ueno Y, Fujiwara S (1988) Profile of ethanol metabolism: aldehyde dehydrogenase deficiency and its significance. In: Kamada T, Kuriyama K, Suwaki H (eds) Biomedical aspects of alcohol and alcoholism. Gendaikikaku-shuppan, Tokyo, pp 31–45
126. Shibuya A, Yoshida A (1988) Frequency of the atypical aldehyde dehydrogenase-2 gene ($ALDH_2^2$) in Japanese and Caucasians. *Am J Hum Genet* 43:741–743

127. Goedde HW, Singh S, Agarwal DP, Fritze G, Stapel K, Paik YK (1989) Genotyping of mitochondrial aldehyde dehydrogenase in blood samples using allele-specific oligonucleotides: comparison with phenotyping in hair roots. *Hum Genet* 81:305–307
128. Singh S, Fritze G, Fang B, Harada S, Paik YK, Eckey R, Agarwal DP, Goedde HW (1989) Inheritance of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: genotyping in Chinese, Japanese and South Korean families reveals dominance of the mutant allele. *Hum Genet* 83:119–121
129. Eckey R, Agarwal DP, Cohn P, Püschel K, Goedde HW (1989) Neue Aspekte des Acetaldehydmetabolismus in menschlichen Geweben und Erythrozyten. *Beitr Gericht Med* XLVII:397–402