

3. MONITORITZACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA A GRAN ESCALA EN FIBROBLASTES EMBRIONARIS DE RATOLÍ.

Els coneixements actuals sobre el mecanisme fisiopatològic de la X-ALD són molt escassos. Davant d'aquest fet, i donada la complexitat del procés biològic, hem cregut oportuna la utilització de les micromatrius de cADN (microarrays) per esbrinar els efectes de la inactivació del gen *ald* sobre l'expressió del genoma. Aquesta nova i poderosa tecnologia permet l'anàlisi de l'expressió gènica de tot el genoma (transcriptoma complet) sota determinades condicions o bé, com en el nostre cas, d'un determinat nombre de gens (transcriptoma parcial) que podrien ser susceptibles de ser modificats com a conseqüència d'una perturbació (la mutació del gen *ald*).

Per aconseguir el nostre objectiu, hem aprofitat la tecnologia de micromatrius de cADN disponible a l'IGBMC i hem construït una micromatriu de cADN que representa a 16.000 gens murins. Les sondes seleccionades representen als gens implicats en les principals vies anabòliques i catabòliques del metabolisme dels lípids, donant una importància especial a les vies de la β -oxidació peroxisomal i mitocondrial. Hi hem inclòs enzims, transportadors, receptors nuclears i cofactors que participen tant en la síntesi com en la degradació d'àcids grassos, així com aquells que estan relacionats amb el metabolisme del colesterol i de lípids complexos. Per altra banda, i tenint en compte que la X-ALD és una malaltia neurodegenerativa, hem inclòs enzims rellevants per a la síntesi i manteniment dels axons i de la mielina, molècules d'adhesió neural, factors de transcripció neuronals, canals iònics i proteïnes gap-junction. També hem introduït citoquines i enzims implicats en inflamació, activació de la microglia, regeneració, degeneració i envelliment. Finalment, hem inclòs totes les proteïnes peroxisomals identificades fins al moment.

Mitjançant aquesta micromatriu de cADN, hem analitzat l'expressió gènica en cultius de fibroblastes embrionaris de ratolí (MEFs). S'han utilitzat cultius de MEFs establerts a partir de dos clons *Ald ko* i dos clons *Wt*. Tots aquests clons són de sexe masculí i procedeixen de la mateixa camada, fet que contribueix a reduir la variabilitat interindividual. Amb aquests cultius podem analitzar les diferències en l'expressió gènica que es deriven de la inactivació d'*ald* (variable genotip). Alhora, l'anàlisi transcripcional ha estat ampliat a l'efecte del tractament amb àcid hexacosanoic (C26:0). Tenint en compte que aquest compost s'acumula a causa de la inactivació d'ALDP i que podria tenir un cert grau de participació en el mecanisme fisiopatològic de la X-ALD, és d'esperar que una sobrecàrrega indueixi canvis en el patró d'expressió

gènica. Així doncs, la meitat dels subcultius derivats de cadascun dels clons ha estat tractada amb C26:0 (8.2 μ M) durant 48h, mentre que la resta s'ha continuat cultivant amb medi estàndar. La concentració de C26:0 utilitzada pel tractament comporta un augment de 20 vegades del nivell d'aquest compost respecte l'existent en el medi estàndar (determinat prèviament a través de cromatografia de gasos (CromG)).

Per tal de comprovar l'efectivitat del tractament amb C26:0, hem mesurat el nivell d'aquest compost en els nostres cultius a través de CromG. En condicions de cultiu normals, els MEFs Ald ko presenten 5 vegades més de C26:0 que els MEFs Wt. Després del tractament amb C26:0, el nivell d'aquest compost en MEFs Wt augmenta 14 vegades respecte del nivell detectat en condicions de cultiu estàndar. En MEFs Ald ko, el tractament amb C26:0 incrementa 8 vegades el nivell d'aquest compost respecte el detectat en condicions de cultiu estàndar. D'aquesta manera, els MEFs Ald ko presenten 3 vegades més de C26:0 que els MEFs Wt quan el medi és enriquit amb aquest compost.

3.1. EFECTES DETECTATS EN L'EXPRESSIÓ GÈNICA.

A continuació presentem alguns dels resultats obtinguts amb les dades extretes de la micromatriu de cADN. En el primer apartat es tractaran les diferències basades en el genotip, mentre que en el segon es tractaran les diferències que es deriven del tractament amb àcid hexacosanoic. En ambdós casos es presentarà una llista amb alguns dels gens d'expressió alterada, que s'han elegit en base a les informacions bibliogràfiques obtingudes i es discutirà sobre la seva possible relació amb el factor estudiat. Cal tenir en compte que aquestes dades són preliminars i que cal la seva verificació posterior a través d'altres tècniques com la hibridació Northern o la RT-PCR quantitativa.

3.1.1. EFECTES EN L'EXPRESSIÓ GÈNICA BASADES EN DIFERÈNCIES A NIVELL DE GENOTIP (ALD KO VS WT).

En aquesta secció presentem alguns efectes detectats en l'expressió gènica en base a una diferència de genotip dels MEFs (Ald ko vs Wt), independentment de les condicions de cultiu que hagin rebut. A través de l'anàlisi de les micromatrius de cADN, hem detectat 395 gens amb un nivell d'expressió alterat en els clons Ald ko en comparació als Wt. D'aquests 395 gens, 261 es troben reprimits en els clons Ald ko mentre que 134 es troben sobreexpressats. Entre els gens reprimits cal destacar la presència d'**abcd1**, el gen codificador d'ALDP i únic control positiu de l'experiment.

Aquest fet és destacable de cara a la validació del mètode de tractament de dades utilitzat en aquest estudi. El nivell d'expressió del gen *abcd1* en els clons Ald ko és del 30% respecte el Wt.

Entre els gens amb l'expressió alterada en els clons Ald ko, n'hem trobat dos grups que, degut a la seva funció, podrien estar relacionats amb el procés fisiopatològic de la X-ALD. Un dels grups està constituït per gens amb funcions relacionades amb el metabolisme lipídic, mentre que l'altre inclou gens implicats en el procés de senyalització dels inositols (taula 4.4).

Dins del grup de gens relacionats amb el metabolisme lipídic, n'hi ha tres que participen en la síntesi de lípids: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa, serina-palmitoiltransferasa i UDP-glucosa ceramida glucosiltransferasa. **La 3- hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa** es troba implicada en la síntesi de colesterol. Catalitza la reducció del β -hidroxi- β -metil glutaril CoA a àcid mevalònic a través de 2 molècules de NADPH. Aquest enzim és el regulador de la via de síntesi del colesterol. El seu gen codificador es troba reprimat en els clons Ald ko (60% respecte el Wt, taula 4.4), fet que podria conduir a una disminució de la síntesi de colesterol.

Pel què fa als altres dos gens implicats en la síntesi lipídica, la funció dels seus productes estaria relacionada amb la formació dels esfingolípid. **La serina-palmitoiltransferasa** catalitza la síntesi de la dihidroesfingosina o esfinganina, precursor de l'esfingosina. Aquesta última dona lloc a la ceramida, que és el precursor de tots els esfingolípid. La **UDP-glucosa ceramida glucosiltransferasa** participa en la síntesi dels glucocerebròsids tot catalitzant la transferència d'una glucosa a la ceramida. El gen codificador de la serina-palmitoiltransferasa es troba sobreexpressat en els clons Ald ko (150% respecte el Wt, taula 4.4), fet que podria conduir a un augment de la síntesi d'esfingolípid. En canvi, el gen que codifica per la UDP-glucosa ceramida glucosiltransferasa es troba reprimat en els clons Ald ko (47% respecte el Wt, taula 4.4). Això es podria traduir en una disminució de la síntesi de glucocerebròsids, la qual cosa podria afavorir la formació d'un altre tipus d'esfingolípid.

A més dels gens implicats en la síntesi lipídica, hi ha dos gens que participen en la transferència de fosfolípids entre membranes, els quals es troben reprimats en els clons Ald ko (taula 4.4). Aquests gens codifiquen per la **proteïna transferidora de**

	% d'expressió respecte el Wt
ALDP	30
METABOLISME LIPIDIQ	
3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa	60
Proteïna transferidora de Fosfatidilcolina	57
Proteïna transferidora de Fosfatidilinositol	56
UDP-glucosa ceramida glucosiltransferasa	47
Serina-palmitoiltransferasa	150
Oxysterol binding protein-like 1A (OSBP)	150
RECEPTOR NUCLEAR	
PPAR gamma	63
VIA DE SENYALITZACIÓ DELS INOSITOLS	
Receptor acoblat a la proteïna G	53
Fosfolipasa C delta	60
Diacilglicerol cinasa alfa	66
Fosfatidilinositol 3-cinasa	65
Arrestina beta 2	65

TAULA 4.4. Gens que presenten un nivell d'expressió alterat en MEFs Ald ko respecte de MEFs Wt. Les dades han estat obtingudes a partir de l'anàlisi de micromatrus de cADN.

fosfatidilcolina (57% d'expressió en l'Ald ko respecte el Wt) i la **proteïna transferidora de fosfatidilinositol** (56% d'expressió en l'Ald ko respecte el Wt). Aquestes proteïnes poden aportar o retirar fosfolípids dels indrets on tenen lloc reaccions enzimàtiques que impliquen a aquestes molècules. D'aquesta manera poden participar en processos importants, com és el manteniment dels nivells de diacilglicerol a l'aparell de Golgi (necessaris pel transport de proteïnes a la membrana plasmàtica), a través de la regulació del seu consum en la formació de fosfatidilcolina²⁷⁸.

La “**oxysterol binding protein-like 1A**” (OSBP) és una altra proteïna relacionada amb el metabolisme lipídic. El seu gen codificador es troba sobreexpressat en els clons Ald ko (150% respecte el Wt) (taula 4.4). Aquesta proteïna s'uneix a oxisterols, que són derivats oxigenats del colesterol que participen en la regulació de la homeostasi del colesterol²⁷⁹. Alguns efectes coneguts dels oxisterols consisteixen en la disminució de la síntesi de colesterol, i en l'augment de l'esterificació del colesterol i de la síntesi d'esfingomielina.

La OSBP està distribuïda entre el citosol i les membranes de l'aparell de Golgi. Aquesta proteïna transloca a l'aparell de Golgi en resposta a alteracions en el tràfic de colesterol²⁸⁰, depleció de colesterol a la membrana plasmàtica²⁸¹, i quan uneix oxisterols²⁸². La funció exacta de la OSBP es desconeix, però la seva interacció amb l'aparell de Golgi en resposta als esterols és significativa perquè aquest òrganul té un paper important en el transport de colesterol. A l'aparell de Golgi es realitza l'assemblatge entre els rafts rics en colesterol/esfingolípids i la caveolina. Aquests rafts estan implicats en el transport de colesterol des del RE fins a la membrana plasmàtica, a través de l'aparell de Golgi²⁸³.

Alguns estudis indiquen que la OSBP està implicada en el procés de síntesi del colesterol i de l'esfingomielina. La sobreexpressió d'aquesta proteïna en cèl.lules CHO (Chinese Hamster Ovary) dóna lloc a una disminució del 50% en la síntesi d'èsters de colesterol i un augment de la síntesi de colesterol quan es cultiva en un medi deslipidat, o en presència d'oxisterols²⁸⁴. Aquest efecte seria contrari al que produeixen els oxisterols quan la OSBP no està sobreexpressada. En canvi, la sobreexpressió de OSBP en cèl.lules CHO potencia els efectes estimuladors dels oxisterols en la síntesi d'esfingomielina. Els oxisterols promouien la translocació de OSBP a l'aparell de Golgi, on estimularia la conversió de ceramida a esfingomielina²⁸⁵.

Les dades procedents del transcriptoma indiquen clarament que la inactivació d'ALDP i la consegüent acumulació de C26:0 es tradueixen en una reorganització de l'expressió de gens relacionats amb el metabolisme lipídic (processos de síntesi i de transport de lípids). La variació en els nivells d'expressió d'aquests gens podria conduir a una modificació de la composició lipídica de les membranes cel·lulars. Aquest fet, que probablement tindria repercussions importants en l'estructura i manteniment de les membranes, podria ser una de les claus per explicar el procés de desmielinització que es produeix a SNC en els pacients X-ALD amb la forma cerebral, i a SNP en els pacients AMN.

Les dades obtingudes de l'experiment amb la micromatriu de cADN també revelen que el gen codificador de **PPAR γ** es troba reprimat en els clons Ald ko (63% d'expressió respecte el Wt, taula 4.4). PPAR γ és un receptor nuclear conegut principalment per la seva participació en el procés de diferenciació dels adipocits. En aquest procés es produeix un augment de l'import de lípids i del metabolisme anabòlic i una disminució de la lipòlisi. Tots aquests canvis estan orquestrats per PPAR γ a través del control de l'expressió dels gens implicats en aquests processos. Aquest fet podria posar de manifest una possible relació entre l'alteració del nivell d'expressió de PPAR γ en MEFs Ald ko i els canvis en el nivell d'expressió que hem descrit anteriorment per alguns gens relacionats amb el metabolisme lipídic en aquestes mateixes cèl·lules. Per a això caldria estudiar primer si PPAR γ pot exercir algun control en l'expressió d'aquests gens (enumerats a la taula 4.4) en aquest tipus cel·lular.

A més dels gens implicats en el metabolisme lipídic, existeix un segon grup de gens amb l'expressió alterada en els clons Ald ko. Aquest segon grup de gens està relacionat amb la via de senyalització dels inositols (taula 4.4). Entre aquests destaquen els gens codificadors de la **fosfolipasa C (δ)** (PLC δ) i de la **diacilglicerol cinasa (α)** (DGK α), ambdós reprimats en els clons Ald ko (60% i 66% d'expressió, respectivament, en comparació al Wt). La PLC δ hidrolitza el fosfatidilinositol 4,5-bifosfat (PIP2), per donar lloc a 2 missatgers intracel·lulars secundaris: diacilglicerol (DAG) i inositol 1,4,5-trifosfat (IP3). El DAG media l'activació de la proteïna quinasa C (PKC), mentre que IP3 media l'alliberament intracel·lular de calci des del RE. La DGK α fosforila el DAG convertint-lo en àcid fosfatídic, el qual és també un missatger secundari. L'acció d'aquests dos enzims, la PLC δ i la DGK α , és molt important en el procés de transducció de senyals, ja que controlen els nivells cel·lulars de DAG. Aquest missatger secundari està implicat en molts processos, fet pel qual ha d'estar

ben regulat per mantenir unes condicions fisiològiques normals. Tenint en compte la importància de la funció d'aquestes dues proteïnes, la seva repressió podria tenir conseqüències rellevants per a la cèl.lula.

La PLC δ és activada a través de calci, com totes les altres isoformes d'aquest enzim. En canvi, la seva activitat no està controlada per la família de proteïnes G ni per la tirosina cinasa, al contrari del que succeeix per altres isoformes. A SNC de rata, la PLC δ està molt expressada en cèl.lules de l'astroglia, que és un dels tipus cel.lulars que media la resposta inflammatòria cerebral en la X-ALD i, en canvi, molt poc expressada en neurones^{286,287}. Pel què fa a la DGK α , s'ha vist a través d'hibridacions in situ en cervell de rata que es troba expressada en oligodendrocits però no en neurones²⁸⁸. En estudis immunohistoquímics posteriors s'ha confirmat l'expressió de la DGK α a la matèria blanca, però en canvi no s'ha detectat la seva expressió a la mielina del sistema nerviós perifèric²⁸⁹. Tenint en compte que els dos fenotips principals de la X-ALD són una forma cerebral (caracteritzada per una desmielinització) i una neuropatia perifèrica (AMN), el patró d'expressió de la DGK α podria convertir al seu gen codificador en un bon candidat a modificador de la malaltia X-ALD. Prenent totes les informacions en conjunt, creiem que seria interessant de realitzar estudis addicionals per veure si PLC δ i DGK α tenen alguna relació amb el mecanisme fisiopatològic de la X-ALD i, en concret, amb la resposta inflammatòria que caracteritza la forma més agressiva de la malaltia.

Els altres gens implicats en la via de senyalització dels inositols i que es troben amb l'expressió alterada en MEFs Ald ko codifiquen per les següents proteïnes: fosfatidilinositol-3-cinasa, receptor acoblat a la proteïna G i arrestin β 2. Tots ells es troben reprimits en els clons Ald ko (65%, 53%, 65% d'expressió, respectivament, en comparació al Wt, taula 4.4). La **fosfatidilinositol-3-cinasa** genera fosfatidilinositol 3,4-bifosfat i fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat. Aquests substractes són potents i selectius activadors de les isoformes de PKC pertanyents a les noves classes, mentre que no tenen massa efecte sobre les isoformes clàssiques o atípiques²⁹⁰. Pel què fa als **receptors acoblats a la proteïna G**, aquests transmeten els senyals extracel.lulars a l'interior de la cèl.lula. Aquests receptors estimulen la proteïna G, la qual pot activar la PLC β i donar lloc a la formació dels missatgers secundaris DAG i IP3, que alhora conduiran una sèrie de respostes. L'**arrestin β 2** també es pot unir a aquests receptors. De fet, les arrestines condueixen el procés d'aturada de transmissió de la senyal tot unint-se al receptor fosforilat. A més, també són capaces de mediar una sèrie de

processos de senyalització, com és l'activació de la cascada de senyalització de les MAP Kinases. Tots aquests resultats suggereixen fortament la possibilitat que el mecanisme de senyalització dels inositols estigui implicat en el mecanisme fisiopatològic de la X-ALD.

3.1.2. EFECTES EN L'EXPRESSIÓ GÈNICA BASADES EN EL TRACTAMENT AMB ÀCID HEXACOSANOIC (C26:0) (TRACTAMENT AMB C26:0 VS NO TRACTAMENT)

En aquest apartat presentem algunes alteracions gèniques basades en el tractament dels MEFs amb C26:0 (independentment del genotip de les cèl.lules). En base a aquest factor, hem trobat 500 gens alterats a nivell d'expressió a través de les dades obtingudes de les micromatrius de cADN. D'aquests, 229 gens es troben reprimits i 349 gens sobreexpressats en els clons tractats amb C26:0 respecte dels no tractats.

Entre els gens amb l'expressió alterada en els cultius tractats amb C26:0, volem destacar, en primer lloc, la presència d'alguns gens relacionats amb l'estrés oxidatiu (taula 4.5). En les cèl.lules tractades amb C26:0, hem detectat un increment del nivell d'expressió dels gens codificadors de la **peroxirredoxin 5** i de la **peroxirredoxin 6** (153% i 188% d'expressió, respectivament, en comparació als cultius no tractats). Les peroxirredoxines són proteïnes antioxidants que protegeixen a les cèl.lules del dany oxidatiu a través de la reducció de peròxid d'hidrogen i de peròxids orgànics. Aquest resultat suggereix l'existència d'un augment de l'estrés oxidatiu en les cèl.lules tractades amb C26:0. Anteriorment ja hem indicat que l'addició de C26:0 en cultius de cèl.lules gials de rata amplifica l'efecte de certs compostos inductors d'estrés oxidatiu, augmentant de forma significativa la producció de radicals lliures respecte de les cèl.lules no tractades amb C26:0 ¹⁴⁶. A més, això posa de manifest la relació que aquest compost podria tenir amb la detecció d'un increment de la peroxidació lipídica en pacients X-ALD ¹⁴⁷.

Hi ha un segon grup de gens, relacionats amb el metabolisme lipídic, que també tenen el nivell d'expressió alterat en les cèl.lules tractades amb C26:0. Entre aquests gens destacaríem la sobreexpressió del gen que codifica per la **fosfolipasa A2** (200% d'expressió en cèl.lules tractades respecte de les no tractades, taula 4.5). La fosfolipasa A2 hidrolitza l'enllaç éster sn-2 dels fosfolípids i allibera un àcid gras. Representa el mecanisme directe d'alliberament d'àcid araquidònic dels fosfolípids de membrana, el qual és precursor d'eicosanoïds i prostaglandines. En relació a l'increment de peroxirredoxines esmentat anteriorment, cal dir que la peroxidació dels

	% d'expressió respecte els no tractats amb C26:0
ESTRÉS OXIDATIU	
Peroxiredoxin 5	153
Peroxiredoxin 6	188
METABOLISME LIPÍDIC	
Fosfolipasa A2	200
Proteïna transportadora d'àcids grassos (FATP4 o Slc27)	63
Fatty acid-binding protein 5 (FABP5)	196
Fatty acyl-CoA synthetase (FACL4)	153
Acil-CoA oxidasa 1 (ACOX1)	170
3-hidroxil-3-metilglutaril-CoA sintasa	55
ABCG1	162
Apolipoprotein M	166
Fosfatidilinositol 3-cinasa	55

TAULA 4.5. Gens que presenten un nivell d'expressió alterat en MEFs tractats amb C26:0 respecte de MEFs no tractats. Les dades han estat obtingudes a partir de l'anàlisi de micromatrius de cADN.

fosfolípids de membrana està acompanyada per un increment de l'activitat de la fosfolipasa A2 ²⁹¹. S'ha suggerit que aquesta proteïna és necessària per reparar aquest tipus de dany peroxidatiu ²⁹².

Alguns dels gens amb l'expressió afectada en les cèl.lules tractades amb C26:0 tenen funcions relacionades directament amb àcids grassos. Aquests gens codifiquen per una proteïna transportadora d'àcids grassos (Slc27a4 o FATP4), una sintetasa d'àcids grassos (FACL4), una proteïna que uneix àcids grassos (FABP5) i l'acil-CoA oxidasa 1 (ACOX1) (taula 4.5). **FATP4** està reprimat en les cèl.lules tractades amb C26:0 (63% d'expressió respecte les cèl.lules no tractades). Aquesta proteïna s'ha vist expressada a les cèl.lules epitelials de l'intestí prim, i és capaç de transportar LCFAs i VLCFAs, fet que suggereix la possibilitat que pugui estar implicada en l'import de C26:0 a l'interior dels MEFs. En canvi, els gens codificadors de FACL4, FABP5 i ACOX1 es troben sobreexpressats en les cèl.lules tractades amb C26:0 (153%, 196% i 170% d'expressió respecte les cèl.lules no tractades, taula 4.5).

FACL4 és una proteïna que activa els LCFAs tant per a la síntesi de lípids cel.lulars com per a la seva degradació via β -oxidació. Se li ha descrit una preferència per l'àcid araquidònic com a substrate ²⁹³, fet que podria estar relacionat amb l'increment d'expressió de la fosfolipasa A2 detectat en aquestes cèl.lules. Pel què fa a **FABP5**, és una proteïna que uneix àcids grassos a l'interior de la cèl.lula. Es creu que la unió d'àcids grassos a aquestes proteïnes podria facilitar la descàrrega de proteïnes transportadores (com la FATP4) i de sintetases (com la FACL4) ²⁹⁴. D'aquesta manera actuaria com un tamponador d'àcids grassos a nivell intracel.lular. I l'última de les proteïnes mencionades, la **ACOX1**, és un enzim que catalitza la primera reacció del procés de β -oxidació d'àcids grassos a la mitocondria, i és on recau el control d'aquesta via metabòlica. L'increment de l'expressió d'aquest gen posaria de manifest una relació entre la β -oxidació peroxisomal de VLCFAs i la β -oxidació mitocondrial de LCFA, fet que ja ha estat demostrat en un altre estudi ¹⁸¹.

Si tenim en compte les funcions dels productes que codifiquen els gens *fatp4*, *fac14*, *fabp5* i *acox1*, les alteracions detectades en els seus nivells d'expressió semblen ser coherents amb una major concentració d'àcids grassos lliures a l'interior de la cèl.lula. D'aquesta manera hauríem identificat algunes proteïnes que podrien estar implicades en el metabolisme de l'àcid hexacosanoic i que, per tant, podrien tenir alguna participació en el mecanisme fisiopatològic de la X-ALD.

Els MEFs tractats amb C26:0 també presenten una alteració del nivell d'expressió de tres gens implicats en el metabolisme i homeostasi del colesterol. Aquests gens codifiquen per la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa, l'Apolipoproteïna M i el transportador ABCG1. El primer gen es trobaria reprimat en els MEFs tractats amb C26:0 (55% d'expressió respecte les cèl.lules no tractades, taula 4.5), mentre que els gens codificadors de l'Apolipoproteïna M i d'ABCG1 es troben sobreexpressats (162% i 166% d'expressió, respectivament, en comparació a les cèl.lules no tractades, taula 4.5). La **3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa** catalitza el primer pas de la síntesi del colesterol, proveint el substracte de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coa reductasa, que actuaria just després. Aquest darrer enzim es trobaria reprimat en els clons Ald ko, tal com hem comentat abans, la qual cosa estableix un paral·lelisme entre el factor genotip i el factor tractament amb C26:0. Pel què fa a l'**Apolipoproteïna M** i **ABCG1**, aquestes estan implicades en el transport revers del colesterol.

Finalment, en els MEFs tractats amb C26:0 hi ha una disminució del nivell d'expressió de la **fosfatidilinositol-3-cinasa** (65% d'expressió respecte les cèl.lules no tractades, taula 4.5). Aquest mateix efecte havia estat detectat en MEFs Ald ko, la qual cosa posaria de manifest una possible relació entre els nivells de C26:0, el mecanisme de senyalització de l'inositol i el mecanisme fisiopatològic de la X-ALD.

No s'han trobat altres alteracions comunes pels factors genotip i tractament amb C26:0, i el baix nombre de mostres disponibles no ens ha permès d'estudiar directament la interacció entre ambdues variables a través de la comparació dels clons Wt i Ald ko tractats amb C26:0. Aquest darrer aspecte seria particularment interessant per elucidar el paper d'aquest compost en el mecanisme fisiopatològic de la X-ALD, per la qual cosa creiem que cal repetir l'experiment però amb un nombre de mostres suficient com per poder tractar les dades estadísticament (prenent clons de sexe masculí Ald ko i Wt procedents de diverses camades).

L'experiència que acabem de presentar ha estat útil de cara a l'aprenentatge d'aquesta tècnica llarga i complexa, i ha contribuït a l'establiment i posada a punt de les condicions per a futurs experiments. Amb aquests resultats hem pogut fer un primer cribatge dels gens que presenten una alteració de la seva expressió a causa de l'absència d'ALDP o del tractament amb C26:0. La possible relació d'aquests efectes amb el mecanisme fisiopatològic de la X-ALD resta per aclarir i obre una nova àrea d'investigació. L'aplicació d'aquesta metodologia seria especialment interessant per a

la monitorització gènica en subtipus cel·lulars dels diferents teixits diana de la malaltia, sobretot en oligodendrocits i en cèl·lules de Schwann.

CONCLUSIONS I PERSPECTIVES

- 1) La determinació d'àcids grassos en teixits procedents del ratolí Ald/tg ens ha permès de demostrar que la sobreexpressió d'ALDRP (5-10 vegades respecte el Wt) en el ratolí Ald ko és capaç de corregir, *per se*, els nivells anòmals de C26:0 en tots els teixits on s'havien detectat (cervell, medul.la espinal, nervi ciàtic i glàndula adrenal). Les nostres dades constitueixen la primera prova, *in vivo*, que la sobreexpressió d'ALDRP té un efecte operatiu en la normalització dels nivells patològics de C26:0 derivats de la inactivació d'*ald*.
- 2) A través de la RT-PCR quantitativa hem demostrat que tant l'absència d'ALDP i/o d'ALDRP, així com la sobreexpressió d'ALDRP, no condueixen a cap modificació de l'expressió, a nivell de mARN, dels altres membres de la subfamília proteica ABCD en cap dels teixits murins analitzats (cervell, medul.la espinal, nervi ciàtic, glàndula adrenal i fetge). Creiem necessària, però, l'anàlisi del nivell proteic dels transportadors ABCD en aquests teixits per poder descartar l'acció de mecanismes de regulació post-transcripcionals.
- 3) La composició d'àcids grassos saturats de la glàndula adrenal dels ratolis Ald ko, Aldr ko i Ald/aldr ko apunta clarament a la implicació d'ALDP i d'ALDRP en el transport peroxisomal d'aquests compostos. Els nostres resultats indiquen, per primera vegada, l'existència d'una especificitat de substracte diferencial d'ambdues proteïnes per aquests compostos, basada en la longitud de cadena de l'àcid gras. En concret, ALDRP mostra una preferència pels àcids grassos saturats de 20 a 24 carbonis (ambdós inclosos), mentre que ALDP la mostra pels àcids grassos saturats de 24 i 26 carbonis.
- 4) El solapament detectat a glàndula adrenal en la preferència d'ALDP i d'ALDRP pel C24:0, juntament amb els increments sinèrgics de C24:0 a cervell i medul.la espinal del ratolí Ald/aldr ko, posen en evidència una redundància funcional entre ALDP i ALDRP pel transport d'aquest substracte, amb una eficiència similar per part d'ambdues proteïnes.
- 5) La composició de ω9-MUFAs a nervi ciàtic i a glàndula adrenal del ratolí Aldr ko ens ha permès posar de manifest, per primera vegada, la implicació d'ALDRP en el transport peroxisomal d'aquests compostos. Aquesta proteïna mostra una

preferència pels substractes de 20 a 24 carbonis de longitud, igual que en el cas dels àcids grassos saturats.

- 6) Els efectes sinèrgics de la doble inactivació d'ALDP i d'ALDRP en l'acumulació d'àcids grassos saturats de 22 a 26 carbonis a la glàndula adrenal, i de C22:1 ω 9 a medul.la espinal, nervi ciàtic i glàndula adrenal, demostren la participació d'ambdues proteïnes en el transport d'aquests compostos. Els nostres resultats suggereixen que, malgrat les preferències de substrate, la redundància funcional d'ALDP i d'ALDRP no estaria restringida només al transport de C24:0 sinó que existiria també per als altres compostos, tot i que amb una eficiència desigual per part d'ambdues proteïnes.
- 7) La determinació d'àcids grassos en els ratolins Wt/tg i Ald/tg demostra que la sobreexpressió d'ALDRP (5-10 vegades respecte el Wt) afavoreix la β -oxidació de C22:0 i de C24:0 a cervell, nervi ciàtic i glàndula adrenal. En conseqüència, es redueix la disponibilitat de substractes per a la síntesi d'àcids grassos de cadena superior, com el C26:0. Aquest mecanisme podria explicar la capacitat de la sobreexpressió d'ALDRP per normalitzar els nivells de C26:0 en el ratolí Ald ko, juntament amb la participació directa d'aquesta proteïna en el transport de C26:0. Les nostres dades no ens permeten de discriminar la participació ni el grau de contribució de cada un d'aquests mecanismes en la normalització dels nivells de C26:0 en teixits diana del ratolí Ald/tg.
- 8) A medul.la espinal i a nervi ciàtic, la sobreexpressió d'ALDRP afavoreix la formació de C22:5 ω 6. Tenint en compte que aquest procés es dona a través de la β -oxidació peroxisomal de C24:5 ω 6, és molt probable que la sobreexpressió d'ALDRP estigui relacionada amb un augment de l'import d'aquest compost al peroxisoma.
- 9) Creiem que la funció principal d'ALDP i d'ALDRP rau en el transport peroxisomal de compostos, però alguns dels nostres resultats* suggereixen amb força que la perturbació d'aquestes funcions, ja sigui per inactivació o per sobreexpressió d'aquestes proteïnes, causa modificacions en altres processos del metabolisme dels àcids grassos com és el de la seva síntesi. (*Alteracions observades a: sèrie dels ω 6-PUFAs a la glàndula adrenal de l'Ald/aldr ko; sèries dels saturats i dels ω 9-

MUFAs a glàndula adrenal i nervi ciàtic de l'Ald ko; totes les sèries d'àcids grassos analitzades a nervi ciàtic del Wt/tg).

- 10) Els nostres resultats han descartat qualsevol alteració en l'expressió, a nivell de mARN, dels gens codificadors d'elongases i de desaturases com a causants de les alteracions en els nivells d'àcids grassos a nervi ciàtic i glàndula adrenal dels ratolins Ald ko, Ald/aldr ko i Wt/tg a què hem fet referència en el punt 9. Caldria doncs, en el futur, estudiar directament les seves activitats enzimàtiques per a poder explicar millor aquests fenòmens.

De forma complementària, també hem descartat qualsevol alteració en l'expressió, a nivell de mARN, de gens implicats en la β -oxidació peroxisomal, així com el de la 2-enoil-CoA reductasa que possibilitaria la síntesi d'àcids grassos en aquest òrganul.

- 11) L'absència d'alteracions en l'expressió, a nivell de mARN, d'alguns gens controlats transcripcionalment per PPAR α , LXR i SREBP-1c, juntament amb la dels gens de la via de síntesi d'àcids grassos i de la β -oxidació peroxisomal (alguns d'ells controlats a nivell transcripcional per SREBP-1c en el primer cas, i per PPAR α en el segon cas), descarta que s'hagi produït una modificació de les funcions d'aquests receptors nuclears/factors de transcripció a glàndula adrenal i nervi ciàtic dels ratolins Ald/aldr ko i Wt/tg.

- 12) L'alta heterogeneïtat observada entre els efectes que produeix la mateixa mutació gènica (inactivació d'*ald* i/o *aldr*, sobreexpressió d'*aldr*) en els diferents teixits murins ens ha proporcionat una idea sobre la complexitat del mecanisme estudiat. Per a una millor definició del paper d'ALDP i d'ALDRP en el metabolisme dels àcids grassos, seria interessant de realitzar estudis similars en subtipus cel·lulars aïllats dels diferents teixits. Aquesta estratègia seria especialment adequada per teixits complexos com el cervell, on l'ús d'homogenats tissulars pot haver emmascarat alguns efectes.

- 13) La nostra avaluació sobre l'expressió d'ALDRP com a possible estratègia terapèutica per a la X-ALD és molt positiva en base als resultats obtinguts en ratolí. La sobreexpressió d'ALDRP (5-10 vegades respecte el Wt) en el ratolí Ald ko corregeix els nivells de C26:0 en tots els teixits i impedeix el desenvolupament del

fenotip nerològic. Pel què fa a les alteracions que produeix en altres sèries d'àcids grassos, aquestes no semblen tenir repercussions a nivell histològic, electrofisiològic ni en el comportament dels ratolins Wt/tg i Ald/tg²⁵⁴. Així doncs, en base a la gravetat de la X-ALD i a l'absència d'una teràpia efectiva per al seu tractament, considerem necessari l'inici d'una recerca de fàrmacs capaços de sobreexpressar ALDRP amb la perspectiva d'una futura aplicació en pacients.

- 14) La monitorització de l'expressió gènica a gran escala en MEFs mitjançant micromatrius de cADN indica que l'absència d'ALDP condueix a una reorganització de l'expressió de gens relacionats amb el metabolisme lipídic (processos de síntesi i de transport de lípids). Això podria conduir a una modificació de la composició lipídica de les membranes cel·lulars i, en conseqüència, repercutir en la seva estructura i funció.

Les dades procedents del transcriptoma també indiquen que l'absència d'ALDP en MEFs altera l'expressió de gens implicats en la via de senyalització dels inositols. Creiem necessària la realització d'estudis addicionals per veure si existeix una relació entre aquests canvis i el mecanisme fisiopatològic de la X-ALD, sobretot amb la resposta inflamatòria que caracteritza la forma més agressiva de la malaltia.

- 15) Els resultats obtinguts de les micromatrius de cADN en relació al tractament de MEFs amb C26:0 reforcen la relació que sembla existir entre aquest compost i l'increment d'estrés oxidatiu. Alhora, ens han permès d'identificar quatre gens (*fatp4*, *fabp5*, *fac14* i *acox1*) que podrien estar implicats directament en el metabolisme del C26:0, fet que podria ser útil de cara a la determinació del paper d'aquest compost en el mecanisme de la patologia X-ALD.

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

1. Horrocks, L. A. & Yeo, Y. K. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacol Res* **40**, 211-25 (1999).
2. Spector, A. A. Essentiality of fatty acids. *Lipids* **34 Suppl**, S1-3 (1999).
3. Suneja, S. K., Nagi, M. N., Cook, L. & Cinti, D. L. Decreased long-chain fatty acyl CoA elongation activity in quaking and jimpy mouse brain: deficiency in one enzyme or multiple enzyme activities? *J Neurochem* **57**, 140-6 (1991).
4. Cinti, D. L., Cook, L., Nagi, M. N. & Suneja, S. K. The fatty acid chain elongation system of mammalian endoplasmic reticulum. *Prog Lipid Res* **31**, 1-51 (1992).
5. Moon, Y. A., Shah, N. A., Mohapatra, S., Warrington, J. A. & Horton, J. D. Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem* **276**, 45358-66 (2001).
6. Nagarajan, R., Le, N., Mahoney, H., Araki, T. & Milbrandt, J. Deciphering peripheral nerve myelination by using Schwann cell expression profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8998-9003 (2002).
7. Tvrdik, P. et al. Role of a new mammalian gene family in the biosynthesis of very long chain fatty acids and sphingolipids. *J Cell Biol* **149**, 707-18 (2000).
8. Tvrdik, P. et al. Cig30, a mouse member of a novel membrane protein gene family, is involved in the recruitment of brown adipose tissue. *J Biol Chem* **272**, 31738-46 (1997).
9. Leonard, A. E. et al. Cloning of a human cDNA encoding a novel enzyme involved in the elongation of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Biochem J* **350 Pt 3**, 765-70 (2000).
10. Zhang, K. et al. A 5-bp deletion in ELOVL4 is associated with two related forms of autosomal dominant macular dystrophy. *Nat Genet* **27**, 89-93 (2001).
11. Bourre, J. M., Daudu, O. & Baumann, N. Nervonic acid biosynthesis by erucyl-CoA elongation in normal and quaking mouse brain microsomes. Elongation of other unsaturated fatty acyl-CoAs (mono and poly-unsaturated). *Biochim Biophys Acta* **424**, 1-7 (1976).
12. Zhang, X. M. et al. Elov14 mRNA distribution in the developing mouse retina and phylogenetic conservation of Elov14 genes. *Mol Vis* **9**, 301-7 (2003).
13. Bernstein, P. S. et al. Diverse macular dystrophy phenotype caused by a novel complex mutation in the ELOVL4 gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 3331-6 (2001).
14. Marzo, I., Alava, M. A., Pineiro, A. & Naval, J. Biosynthesis of docosahexaenoic acid in human cells: evidence that two different delta 6-desaturase activities may exist. *Biochim Biophys Acta* **1301**, 263-72 (1996).
15. Rodriguez, A. et al. Delta6- and delta5-desaturase activities in the human fetal liver: kinetic aspects. *J Lipid Res* **39**, 1825-32 (1998).
16. Marzo, I. et al. Biosynthesis of unsaturated fatty acids in the main cell lineages of human leukemia and lymphoma. *Biochim Biophys Acta* **1257**, 140-8 (1995).
17. Ntambi, J. M. et al. Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. Characterization of a differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase. *J Biol Chem* **263**, 17291-300 (1988).
18. Kaestner, K. H., Ntambi, J. M., Kelly, T. J., Jr. & Lane, M. D. Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. A second differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase. *J Biol Chem* **264**, 14755-61 (1989).
19. Cho, H. P., Nakamura, M. T. & Clarke, S. D. Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian Delta-6 desaturase. *J Biol Chem* **274**, 471-7 (1999).
20. Cho, H. P., Nakamura, M. & Clarke, S. D. Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human delta-5 desaturase. *J Biol Chem* **274**, 37335-9 (1999).
21. Albert, D. H., Rhamy, R. K. & Coniglio, J. G. Desaturation of eicosa-11,14-dienoic acid in human testes. *Lipids* **14**, 498-500 (1979).
22. Albert, D. H. & Coniglio, J. G. Metabolism of eicosa-11,14-dienoic acid in rat testes. Evidence for delta8-desaturase activity. *Biochim Biophys Acta* **489**, 390-6 (1977).
23. Grammatikos, S. I., Subbaiah, P. V., Victor, T. A. & Miller, W. M. n-3 and n-6 fatty acid processing and growth effects in neoplastic and non-cancerous human mammary epithelial cell lines. *Br J Cancer* **70**, 219-27 (1994).
24. Bardou, S., Le, M. T. & Alessandri, J. M. Metabolic conversion and growth effects of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids in the T47D breast cancer cell line. *Cancer Lett* **99**, 51-8 (1996).

25. Cook, H. W. et al. Alternate pathways in the desaturation and chain elongation of linolenic acid, 18:3(n-3), in cultured glioma cells. *J Lipid Res* **32**, 1265-73 (1991).
26. Voss, A., Reinhart, M., Sankarappa, S. & Sprecher, H. The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. *J Biol Chem* **266**, 19995-20000 (1991).
27. Moore, S. A., Hurt, E., Yoder, E., Sprecher, H. & Spector, A. A. Docosahexaenoic acid synthesis in human skin fibroblasts involves peroxisomal retroconversion of tetracosahexaenoic acid. *J Lipid Res* **36**, 2433-43 (1995).
28. Martinez, M. Abnormal profiles of polyunsaturated fatty acids in the brain, liver, kidney and retina of patients with peroxisomal disorders. *Brain Res* **583**, 171-82 (1992).
29. Martinez, M., Mougan, I., Roig, M. & Ballabriga, A. Blood polyunsaturated fatty acids in patients with peroxisomal disorders. A multicenter study. *Lipids* **29**, 273-80 (1994).
30. Lazarow, P. B. & De Duve, C. A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 2043-6 (1976).
31. Kunau, W. H., Kionka, C., Ledebur, A., Mateblowski, M., Moreno de la Garza, M., Schultz-Borchard, U., Thieringer, R., and Veenhuis, M. *In: Peroxisomes in Biology and Medicine (Fahimini, H.D. and Sies, H. eds) Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York*, 128-140 (1987).
32. Vanhove, G. F. et al. The CoA esters of 2-methyl-branched chain fatty acids and of the bile acid intermediates di- and trihydroxycoprostanic acids are oxidized by one single peroxisomal branched chain acyl-CoA oxidase in human liver and kidney. *J Biol Chem* **268**, 10335-44 (1993).
33. Verhoeven, N. M., Schor, D. S., ten Brink, H. J., Wanders, R. J. & Jakobs, C. Resolution of the phytanic acid alpha-oxidation pathway: identification of pristanal as product of the decarboxylation of 2-hydroxyphytanoyl-CoA. *Biochem Biophys Res Commun* **237**, 33-6 (1997).
34. Verhoeven, N. M., Wanders, R. J., Poll-The, B. T., Saudubray, J. M. & Jakobs, C. The metabolism of phytanic acid and pristanic acid in man: a review. *J Inherit Metab Dis* **21**, 697-728 (1998).
35. Prydz, K., Kase, B. F., Bjorkhem, I. & Pedersen, J. I. Subcellular localization of 3 alpha, 7 alpha-dihydroxy- and 3 alpha,7 alpha,12 alpha-trihydroxy-5 beta-cholestanoyl-coenzyme A ligase(s) in rat liver. *J Lipid Res* **29**, 997-1004 (1988).
36. Uchiyama, A. et al. Molecular cloning of cDNA encoding rat very long-chain acyl-CoA synthetase. *J Biol Chem* **271**, 30360-5 (1996).
37. Berger, J., Truppe, C., Neumann, H. & Forss-Petter, S. A novel relative of the very-long-chain acyl-CoA synthetase and fatty acid transporter protein genes with a distinct expression pattern. *Biochem Biophys Res Commun* **247**, 255-60 (1998).
38. Steinberg, S. J., Kemp, S., Braiterman, L. T. & Watkins, P. A. Role of very-long-chain acyl-coenzyme A synthetase in X-linked adrenoleukodystrophy. *Ann Neurol* **46**, 409-12 (1999).
39. Yamada, T. et al. Adrenoleukodystrophy protein enhances association of very long-chain acyl-coenzyme A synthetase with the peroxisome. *Neurology* **52**, 614-6 (1999).
40. Steinberg, S. J., Wang, S. J., Kim, D. G., Mihalik, S. J. & Watkins, P. A. Human very-long-chain acyl-CoA synthetase: cloning, topography, and relevance to branched-chain fatty acid metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* **257**, 615-21 (1999).
41. Smith, B. T., Sengupta, T. K. & Singh, I. Intraperoxisomal localization of very-long-chain fatty acyl-CoA synthetase: implication in X-adrenoleukodystrophy. *Exp Cell Res* **254**, 309-20 (2000).
42. Wanders, R. J., Denis, S., van Roermund, C. W., Jakobs, C. & ten Brink, H. J. Characteristics and subcellular localization of pristanoyl-CoA synthetase in rat liver. *Biochim Biophys Acta* **1125**, 274-9 (1992).
43. Jansen, G. A., van den Brink, D.M., Ofman, R., Draghici, O., Dacremont, G., Wanders, R.J.A. Identification of pristanal dehydrogenase activity in peroxisomes: conclusive evidence that the complete phytanic acid alpha-oxidation pathway is localized in peroxisomes. *Biochem Biophys Res Commun* **283**, 674-679 (2001).
44. Pahan, K., Cofer, J., Baliga, P. & Singh, I. Identification of phytanoyl-CoA ligase as a distinct acyl-CoA ligase in peroxisomes from cultured human skin fibroblasts. *FEBS Lett* **322**, 101-4 (1993).

45. Watkins, P. A., Howard, A. E., Gould, S. J., Avigan, J. & Mihalik, S. J. Phytanic acid activation in rat liver peroxisomes is catalyzed by long-chain acyl-CoA synthetase. *J Lipid Res* **37**, 2288-95 (1996).
46. Jimenez-Sanchez, G., Hebron, K.J., Silva-Zolezzi, I., Mihalik, S., Watkins, P., Espeel, M., Moser, A., Thomas, G., Roels, F., Valle, D. *Am. J. Hum. Genet* **67**, 65 (2000).
47. Osumi, T., Hashimoto, T. & Ui, N. Purification and properties of acyl-CoA oxidase from rat liver. *J Biochem (Tokyo)* **87**, 1735-46 (1980).
48. Fan, C. Y. et al. Hepatocellular and hepatic peroxisomal alterations in mice with a disrupted peroxisomal fatty acyl-coenzyme A oxidase gene. *J Biol Chem* **271**, 24698-710 (1996).
49. Van Veldhoven, P. P., Croes, K., Asselberghs, S., Herdewijn, P. & Mannaerts, G. P. Peroxisomal beta-oxidation of 2-methyl-branched acyl-CoA esters: stereospecific recognition of the 2S-methyl compounds by trihydroxycoprostanoyl-CoA oxidase and pristanoyl-CoA oxidase. *FEBS Lett* **388**, 80-4 (1996).
50. Pedersen, J. I., Veggan, T. & Bjorkhem, I. Substrate stereospecificity in oxidation of (25S)-3 alpha, 7 alpha, 12 alpha-trihydroxy-5 beta-cholestanoyl-CoA by peroxisomal trihydroxy-5 beta-cholestanoyl-CoA oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* **224**, 37-42 (1996).
51. Ikegawa, S., Goto, T., Mano, N. & Goto, J. Substrate specificity of THCA-CoA oxidases from rat liver light mitochondrial fractions on dehydrogenation of 3 alpha,7 alpha,12 alpha-trihydroxy-5 beta-cholestanic acid CoA thioester. *Steroids* **63**, 603-7 (1998).
52. Schmitz, W., Fingerhut, R. & Conzelmann, E. Purification and properties of an alpha-methylacyl-CoA racemase from rat liver. *Eur J Biochem* **222**, 313-23 (1994).
53. Schmitz, W., Albers, C., Fingerhut, R. & Conzelmann, E. Purification and characterization of an alpha-methylacyl-CoA racemase from human liver. *Eur J Biochem* **231**, 815-22 (1995).
54. Suzuki, Y. et al. D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase/D-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional protein deficiency: a newly identified peroxisomal disorder. *Am J Hum Genet* **61**, 1153-62 (1997).
55. van Grunsven, E. G. et al. Peroxisomal D-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: resolution of the enzyme defect and its molecular basis in bifunctional protein deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2128-33 (1998).
56. van Grunsven, E. G. et al. Peroxisomal bifunctional protein deficiency revisited: resolution of its true enzymatic and molecular basis. *Am J Hum Genet* **64**, 99-107 (1999).
57. van Grunsven, E. G., Mooijer, P. A., Aubourg, P. & Wanders, R. J. Enoyl-CoA hydratase deficiency: identification of a new type of D-bifunctional protein deficiency. *Hum Mol Genet* **8**, 1509-16 (1999).
58. Baes, M. et al. Inactivation of the peroxisomal multifunctional protein-2 in mice impedes the degradation of not only 2-methyl-branched fatty acids and bile acid intermediates but also of very long chain fatty acids. *J Biol Chem* **275**, 16329-36 (2000).
59. Qi, C. et al. Absence of spontaneous peroxisome proliferation in enoyl-CoA Hydratase/L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase-deficient mouse liver. Further support for the role of fatty acyl CoA oxidase in PPARalpha ligand metabolism. *J Biol Chem* **274**, 15775-80 (1999).
60. Bout, A., Teunissen, Y., Hashimoto, T., Benne, R. & Tager, J. M. Nucleotide sequence of human peroxisomal 3-oxoacyl-CoA thiolase. *Nucleic Acids Res* **16**, 10369 (1988).
61. Seedorf, U., Brysch, P., Engel, T., Schrage, K. & Assmann, G. Sterol carrier protein X is peroxisomal 3-oxoacyl coenzyme A thiolase with intrinsic sterol carrier and lipid transfer activity. *J Biol Chem* **269**, 21277-83 (1994).
62. Wanders, R. J. et al. Peroxisomal fatty acid alpha- and beta-oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases. *Biochem Soc Trans* **29**, 250-67 (2001).
63. Mukherji, M., Kershaw, N. J., Schofield, C. J., Wierzbicki, A. S. & Lloyd, M. D. Utilization of sterol carrier protein-2 by phytanoyl-CoA 2-hydroxylase in the peroxisomal alpha oxidation of phytanic acid. *Chem Biol* **9**, 597-605 (2002).
64. Verhoeven, N. M. et al. Phytanic acid and pristanic acid are oxidized by sequential peroxisomal and mitochondrial reactions in cultured fibroblasts. *J Lipid Res* **39**, 66-74 (1998).

65. Hiltunen, J. K., Karki, T., Hassinen, I. E. & Osmundsen, H. beta-Oxidation of polyunsaturated fatty acids by rat liver peroxisomes. A role for 2,4-dienoyl-coenzyme A reductase in peroxisomal beta-oxidation. *J Biol Chem* **261**, 16484-93 (1986).
66. Kunau, W. H. & Dommès, P. Degradation of unsaturated fatty acids. Identification of intermediates in the degradation of cis-4-decenoyl-CoA by extracts of beef-liver mitochondria. *Eur J Biochem* **91**, 533-44 (1978).
67. Stoffel, W. & Caesar, H. [Metabolism of unsaturated fatty acids. V. On the beta-oxidation of mono- and polyene-fatty acids. Mechanism of enzymatic reactions of delta-2-cis-enoyl-CoA compounds]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **341**, 76-83 (1965).
68. Smeland, T. E., Nada, M., Cuebas, D. & Schulz, H. NADPH-dependent beta-oxidation of unsaturated fatty acids with double bonds extending from odd-numbered carbon atoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6673-7 (1992).
69. He, X. Y. et al. Peroxisomes contain delta 3,5,delta 2,4-dienoyl-CoA isomerase and thus possess all enzymes required for the beta-oxidation of unsaturated fatty acids by a novel reductase-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **215**, 15-22 (1995).
70. Shoukry, K. & Schulz, H. Significance of the reductase-dependent pathway for the beta-oxidation of unsaturated fatty acids with odd-numbered double bonds. Mitochondrial metabolism of 2-trans-5-cis-octadienoyl-CoA. *J Biol Chem* **273**, 6892-9 (1998).
71. Geisbrecht, B. V., Liang, X., Morrell, J. C., Schulz, H. & Gould, S. J. The mouse gene PDCR encodes a peroxisomal delta(2), delta(4)-dienoyl-CoA reductase. *J Biol Chem* **274**, 25814-20 (1999).
72. Geisbrecht, B. V., Zhang, D., Schulz, H. & Gould, S. J. Characterization of PECL1, a novel monofunctional Delta(3), Delta(2)-enoyl-CoA isomerase of mammalian peroxisomes. *J Biol Chem* **274**, 21797-803 (1999).
73. Palosaari, P. M., and Hiltunen, J.K. Peroxisomal bifunctional protein from rat liver is a bifunctional enzyme possessing 2-enoyl-CoA hydratase, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, and D3,D2-enoyl-CoA isomerase activities. *J Biol Chem* **265**, 2446-2449 (1990).
74. Zhang, D. et al. Functional characterization of Delta3,Delta2-enoyl-CoA isomerases from rat liver. *J Biol Chem* **277**, 9127-32 (2002).
75. Verdino, B., Blank, M. L., Privett, O. S. & Lundberg, W. O. Metabolism of 4,7,10,13,16-Docosapentaenoic Acid in the Essential Fatty Acid-Deficient Rat. *J Nutr* **83**, 234-8 (1964).
76. Schlenk, H., Gellerman, J. L. & Sand, D. M. Retroconversion of polyunsaturated fatty acids in vivo by partial degradation and hydrogenation. *Biochim Biophys Acta* **137**, 420-6 (1967).
77. Kunau, W. H. Studies on the partial degradation of polyunsaturated fatty acids in subcellular fractions of rat liver. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **352**, 1297-305 (1971).
78. Hagve, T. A. & Christophersen, B. O. Evidence for peroxisomal retroconversion of adrenic acid (22:4(n-6)) and docosahexaenoic acids (22:6(n-3)) in isolated liver cells. *Biochim Biophys Acta* **875**, 165-73 (1986).
79. Christensen, E., Hagve, T. A. & Christophersen, B. O. The Zellweger syndrome: deficient chain-shortening of erucic acid (22:1 (n-9)) and adrenic acid (22:4 (n-6)) in cultured skin fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* **959**, 134-42 (1988).
80. Christensen, E., Gronn, M., Hagve, T. A., Kase, B. F. & Christophersen, B. O. Adrenoleukodystrophy. The chain shortening of erucic acid (22:1(n-9)) and adrenic acid (22:4(n-6)) is deficient in neonatal adrenoleukodystrophy and normal in X-linked adrenoleukodystrophy skin fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* **1002**, 79-83 (1989).
81. Christensen, E. et al. Peroxisomal beta-oxidation of polyunsaturated long chain fatty acids in human fibroblasts. The polyunsaturated and the saturated long chain fatty acids are retroconverted by the same acyl-CoA oxidase. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* **215**, 61-74 (1993).
82. Ferdinandusse, S. et al. Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the biosynthesis of docosahexaenoic acid. *J Lipid Res* **42**, 1987-95 (2001).
83. Sprecher, H., Luthria, D. L., Mohammed, B. S. & Baykousheva, S. P. Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* **36**, 2471-7 (1995).
84. Seubert, W. & Podack, E. R. Mechanisms and physiological roles of fatty acid chain elongation in microsomes and mitochondria. *Mol Cell Biochem* **1**, 29-40 (1973).

85. Horie, S., Suzuki, T. & Suga, T. Existence of acetyl-CoA-dependent chain elongation system in hepatic peroxisomes of rat: effects of clofibrate and di-(2-ethylhexyl)phthalate on the activity. *Arch Biochem Biophys* **274**, 64-73 (1989).
86. Cvetanovic, M., Moreno de la Garza, M., Dommes, V. & Kunau, W. H. Purification and characterization of 2-enoyl-CoA reductase from bovine liver. *Biochem J* **227**, 49-56 (1985).
87. Das, A. K., Uhler, M. D. & Hajra, A. K. Molecular cloning and expression of mammalian peroxisomal trans-2-enoyl-coenzyme A reductase cDNAs. *J Biol Chem* **275**, 24333-40 (2000).
88. Moser, H. W., Smith, K.D., Moser, A.B. X-linked adrenoleukodystrophy. In: Scriver CR, Sly AL, Valle WS, Beaudet D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7th edn.* New York: McGraw-Hill, 2325-2350 (1995).
89. Igarashi, M. et al. Fatty acid abnormality in adrenoleukodystrophy. *J Neurochem* **26**, 851-60 (1976).
90. Johnson, A. B., Schaumburg, H. H. & Powers, J. M. Histochemical characteristics of the striated inclusions of adrenoleukodystrophy. *J Histochem Cytochem* **24**, 725-30 (1976).
91. Siemerling, E., Creutzfeldt, H.G. Bronzekrankheit und sklerosierende Enzephalomyelitis. *Arch Psychiatr Nervenkr* **68**, 217-244 (1923).
92. Fanconi, A., Prader, A., Isler, W., Luethy, F. & Siebenmann, R. [Addison's Disease with Cerebral Sclerosis in Childhood. A Hereditary Syndrome Transmitted through Chromosome X?]. *Helv Paediatr Acta* **18**, 480-501 (1963).
93. Blaw, M. E. Adrenoleukodystrophy. In: Vinken, P.J., and Bruyn, C.W. (Eds): *Handbook of Clinical Neurology.* North Holland Publ. Co. Amsterdam, 128-133 (1970).
94. van Geel, B. M., Assies, J., Wanders, R. J. & Barth, P. G. X linked adrenoleukodystrophy: clinical presentation, diagnosis, and therapy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **63**, 4-14 (1997).
95. Schaumburg, H. H., Powers, J. M., Raine, C. S., Suzuki, K. & Richardson, E. P., Jr. Adrenoleukodystrophy. A clinical and pathological study of 17 cases. *Arch Neurol* **32**, 577-91 (1975).
96. Powers, J. M., Liu, Y., Moser, A. B. & Moser, H. W. The inflammatory myelinopathy of adreno-leukodystrophy: cells, effector molecules, and pathogenetic implications. *J Neuropathol Exp Neurol* **51**, 630-43 (1992).
97. Loes, D. J. et al. Adrenoleukodystrophy: a scoring method for brain MR observations. *AJNR Am J Neuroradiol* **15**, 1761-6 (1994).
98. Moser, H. W., Bergin, A., Naidu, S. & Ladenson, P. W. Adrenoleukodystrophy. *Endocrinol Metab Clin North Am* **20**, 297-318 (1991).
99. Moser, H. W. et al. Adrenoleukodystrophy: phenotypic variability and implications for therapy. *J Inherit Metab Dis* **15**, 645-64 (1992).
100. van Geel, B. M., Assies, J., Weverling, G. J. & Barth, P. G. Predominance of the adrenomyeloneuropathy phenotype of X-linked adrenoleukodystrophy in The Netherlands: a survey of 30 kindreds. *Neurology* **44**, 2343-6 (1994).
101. Schaumburg, H. H. et al. Adrenomyeloneuropathy: a probable variant of adrenoleukodystrophy. II. General pathologic, neuropathologic, and biochemical aspects. *Neurology* **27**, 1114-9 (1977).
102. Aubourg, P., Sellier, N., Chaussain, J. L. & Kalifa, G. MRI detects cerebral involvement in neurologically asymptomatic patients with adrenoleukodystrophy. *Neurology* **39**, 1619-21 (1989).
103. Moser, H. W., Moser, A. B., Naidu, S. & Bergin, A. Clinical aspects of adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy. *Dev Neurosci* **13**, 254-61 (1991).
104. Kumar, A. J. et al. MR findings in adult-onset adrenoleukodystrophy. *AJNR Am J Neuroradiol* **16**, 1227-37 (1995).
105. Dooley, J. M. & Wright, B. A. Adrenoleukodystrophy mimicking multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* **12**, 73-4 (1985).
106. Stockler, S. et al. Multiple sclerosis-like syndrome in a woman heterozygous for adrenoleukodystrophy. *Eur Neurol* **33**, 390-2 (1993).
107. van Geel, B. M. et al. Delay in diagnosis of X-linked adrenoleukodystrophy. *Clin Neurol Neurosurg* **95**, 115-20 (1993).
108. Pilz, P. & Schiener, P. [Combination of Addison's and Schilder's disease in a woman aged 43 years (author's transl)]. *Acta Neuropathol (Berl)* **26**, 357-60 (1973).

109. Aubourg, P., Chaussain, J.L. Adrenoleukodystrophy presenting as Addison's disease in children and adults. *Trends Endocrinol Metab* **2**, 49-52 (1991).
110. Moser, H. W. Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy. *Brain* **120 (Pt 8)**, 1485-508 (1997).
111. Tsuji, S. et al. Abnormality of long-chain fatty acids in erythrocyte membrane sphingomyelin from patients with adrenoleukodystrophy. *J Neurochem* **36**, 1046-9 (1981).
112. Molzer, B., Bernheimer, H. & Toifl, K. Fatty acid patterns in brain, fibroblast, leukocyte and body fluid lipids in adrenoleukodystrophy. *Acta Neuropathol Suppl (Berl)* **7**, 211-4 (1981).
113. Moser, H. W. et al. Adrenoleukodystrophy: elevated C26 fatty acid in cultured skin fibroblasts. *Ann Neurol* **7**, 542-9 (1980).
114. Tonshoff, B., Lehnert, W. & Ropers, H. H. Adrenoleukodystrophy: diagnosis and carrier detection by determination of long-chain fatty acids in cultured fibroblasts. *Clin Genet* **22**, 25-9 (1982).
115. Moser, H. W. et al. Adrenoleukodystrophy: increased plasma content of saturated very long chain fatty acids. *Neurology* **31**, 1241-9 (1981).
116. Moser AB, K. N., Bezman L, Lu S, Raymond GV, Naidu S, Moser HW. Plasma very long chain fatty acids in 3,000 peroxisome disease patients and 29,000 controls. *Ann Neurol* **45**, 100-110 (1999).
117. Moser, H. W., Moser, A. E., Trojak, J. E. & Supplee, S. W. Identification of female carriers of adrenoleukodystrophy. *J Pediatr* **103**, 54-9 (1983).
118. Watkins, P. A. et al. Altered expression of ALDP in X-linked adrenoleukodystrophy. *Am J Hum Genet* **57**, 292-301 (1995).
119. Feigenbaum, V. et al. Mutational and protein analysis of patients and heterozygous women with X-linked adrenoleukodystrophy. *Am J Hum Genet* **58**, 1135-44 (1996).
120. Boehm CD, C. G., Lachtermacher MB, Moser HW, Chong SS. Accurate DNA-based diagnostic and carrier testing for X-linked adrenoleukodystrophy. *Mol Genet Metab* **66**, 128-136 (1999).
121. Moser, H. W. et al. The prenatal diagnosis of adrenoleukodystrophy. Demonstration of increased hexacosanoic acid levels in cultured amniocytes and fetal adrenal gland. *Pediatr Res* **16**, 172-5 (1982).
122. Verhoeven, N. M., Kulik, W., van den Heuvel, C. M. & Jakobs, C. Pre- and postnatal diagnosis of peroxisomal disorders using stable-isotope dilution gas chromatography--mass spectrometry. *J Inher Metab Dis* **18 Suppl 1**, 45-60 (1995).
123. Singh, I., Moser, A. E., Moser, H. W. & Kishimoto, Y. Adrenoleukodystrophy: impaired oxidation of very long chain fatty acids in white blood cells, cultured skin fibroblasts, and amniocytes. *Pediatr Res* **18**, 286-90 (1984).
124. Singh, I., Moser, A. E., Goldfischer, S. & Moser, H. W. Lignoceric acid is oxidized in the peroxisome: implications for the Zellweger cerebro-hepato-renal syndrome and adrenoleukodystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 4203-7 (1984).
125. Lazo, O. et al. Peroxisomal lignoceroyl-CoA ligase deficiency in childhood adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 7647-51 (1988).
126. Wanders, R. J. et al. Direct demonstration that the deficient oxidation of very long chain fatty acids in X-linked adrenoleukodystrophy is due to an impaired ability of peroxisomes to activate very long chain fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* **153**, 618-24 (1988).
127. Tsuji, S., Ohno, T., Miyatake, T., Suzuki, A. & Yamakawa, T. Fatty acid elongation activity in fibroblasts from patients with adrenoleukodystrophy (ALD). *J Biochem (Tokyo)* **96**, 1241-7 (1984).
128. Wilson, R., Tocher, D. R. & Sargent, J. R. Effects of exogenous monounsaturated fatty acids on fatty acid metabolism in cultured skin fibroblasts from adrenoleukodystrophy patients. *J Neurol Sci* **109**, 207-14 (1992).
129. Rizzo, W. B. et al. Adrenoleukodystrophy: oleic acid lowers fibroblast saturated C22-26 fatty acids. *Neurology* **36**, 357-61 (1986).
130. Ho, J. K., Moser, H., Kishimoto, Y. & Hamilton, J. A. Interactions of a very long chain fatty acid with model membranes and serum albumin. Implications for the pathogenesis of adrenoleukodystrophy. *J Clin Invest* **96**, 1455-63 (1995).

131. Di Biase, A. et al. Effects of exogenous hexacosanoic acid on biochemical myelin composition in weaning and post-weaning rats. *Neurochem Res* **22**, 327-31 (1997).
132. Theda, C., Moser, A. B., Powers, J. M. & Moser, H. W. Phospholipids in X-linked adrenoleukodystrophy white matter: fatty acid abnormalities before the onset of demyelination. *J Neurol Sci* **110**, 195-204 (1992).
133. Bizzozero, O. A., Zuniga, G. & Lees, M. B. Fatty acid composition of human myelin proteolipid protein in peroxisomal disorders. *J Neurochem* **56**, 872-8 (1991).
134. McGuinness, M. C. et al. Human leukocyte antigens and cytokine expression in cerebral inflammatory demyelinating lesions of X-linked adrenoleukodystrophy and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **75**, 174-82 (1997).
135. Berger, J. et al. Association of X-linked adrenoleukodystrophy with HLA DRB1 alleles. *Biochem Biophys Res Commun* **216**, 447-51 (1995).
136. Griffin, D. E. et al. Identification of the inflammatory cells in the central nervous system of patients with adrenoleukodystrophy. *Ann Neurol* **18**, 660-4 (1985).
137. Paintlia, A. S. et al. Correlation of very long chain fatty acid accumulation and inflammatory disease progression in childhood X-ALD: implications for potential therapies. *Neurobiol Dis* **14**, 425-39 (2003).
138. Grau, G. E. et al. Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. *N Engl J Med* **320**, 1586-91 (1989).
139. McGuinness, M. C. et al. Tumor necrosis factor-alpha and X-linked adrenoleukodystrophy. *J Neuroimmunol* **61**, 161-9 (1995).
140. Hartung, H. P. & Toyka, K. V. Phorbol diester TPA elicits prostaglandin E release from cultured rat astrocytes. *Brain Res* **417**, 347-9 (1987).
141. Jeremy, J., Murphy, S., Morrow, C., Pearce, B. & Dandona, P. Phorbol ester stimulation of prostanoid synthesis by cultured astrocytes. *Brain Res* **419**, 364-8 (1987).
142. Brenner, T., Boneh, A., Shohami, E., Abramsky, O. & Weidenfeld, J. Glucocorticoid regulation of eicosanoid production by glial cells under basal and stimulated conditions. *J Neuroimmunol* **40**, 273-9 (1992).
143. Boneh, A., Shohami, E. & Brenner, T. Differential effects of phorbol myristate acetate and dexamethasone on protein kinase C activity and eicosanoids production in cultured rat astrocytes. *J Neurosci Res* **34**, 629-34 (1993).
144. Shirai, Y., Kashiwagi, K., Yagi, K., Sakai, N. & Saito, N. Distinct effects of fatty acids on translocation of gamma- and epsilon-subspecies of protein kinase C. *J Cell Biol* **143**, 511-21 (1998).
145. Ben-Yaacov, A., Minichiello, J., Newgreen, D. & Boneh, A. Perturbation of protein kinase C subtype activation in X-ALD fibroblasts: possible involvement of protein kinase C in the pathogenesis of adrenoleukodystrophy. *J Inherit Metab Dis* **23**, 416-20 (2000).
146. Di Biase, A. et al. Free radical release in C6 glial cells enriched in hexacosanoic acid: implication for X-linked adrenoleukodystrophy pathogenesis. *Neurochem Int* **44**, 215-21 (2004).
147. Vargas, C. R. et al. Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochim Biophys Acta* **1688**, 26-32 (2004).
148. Halliwell, B., Gutteridge, JMC. Oxygen radicals and nervous system. *Trends Neurosci* **8**, 22-26 (1996).
149. Méndez-Álvarez, E., Soto-Otero, R., Hermida-Aeijeiras, A., López-Real, AM., Labandeira-García, JL. Effects of aluminium and zinc on the oxidative stress caused by 6-hydroxydopamine autoxidation: relevance for the pathogenesis of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* **1586**, 155-168 (2001).
150. Karelson, E., Bogdanovic, N., Garlind, A., Winblad, B., Zilmer, K., Kullisaar, T., Vihalemm, T., Kairane, C., Zilmer, M. The cerebrocortical areas in normal brain aging and in the Alzheimer's Disease: noticeable difference in the lipid peroxidation level and in antioxidant defense. *Neurochem Res* **26**, 353-361 (2001).
151. Deli, M. A. et al. Exposure of tumor necrosis factor-alpha to luminal membrane of bovine brain capillary endothelial cells cocultured with astrocytes induces a delayed increase of permeability and cytoplasmic stress fiber formation of actin. *J Neurosci Res* **41**, 717-26 (1995).
152. Larocca, J. N., Farooq, M. & Norton, W. T. Induction of oligodendrocyte apoptosis by C2-ceramide. *Neurochem Res* **22**, 529-34 (1997).

153. Khan, M., Pahan, K., Singh, A. K. & Singh, I. Cytokine-induced accumulation of very long-chain fatty acids in rat C6 glial cells: implication for X-adrenoleukodystrophy. *J Neurochem* **71**, 78-87 (1998).
154. Keilhoff, G., Seidel, B. & Wolf, G. Absence of nitric oxide synthase in rat oligodendrocytes: a light and electron microscopic study. *Acta Histochem* **100**, 409-17 (1998).
155. Hewett, J. A., Hewett, S. J., Winkler, S. & Pfeiffer, S. E. Inducible nitric oxide synthase expression in cultures enriched for mature oligodendrocytes is due to microglia. *J Neurosci Res* **56**, 189-98 (1999).
156. Cimini, A. et al. TNFalpha downregulates PPARdelta expression in oligodendrocyte progenitor cells: implications for demyelinating diseases. *Glia* **41**, 3-14 (2003).
157. Powers, J. M., DeCiero, D. P., Ito, M., Moser, A. B. & Moser, H. W. Adrenomyeloneuropathy: a neuropathologic review featuring its noninflammatory myelopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* **59**, 89-102 (2000).
158. van Geel, B. M., Koelman, J. H., Barth, P. G. & Ongerboer de Visser, B. W. Peripheral nerve abnormalities in adrenomyeloneuropathy: a clinical and electrodiagnostic study. *Neurology* **46**, 112-8 (1996).
159. Blevins, L. S., Jr., Shankroff, J., Moser, H. W. & Ladenson, P. W. Elevated plasma adrenocorticotropin concentration as evidence of limited adrenocortical reserve in patients with adrenomyeloneuropathy. *J Clin Endocrinol Metab* **78**, 261-5 (1994).
160. Powers, J. M., Schaumburg, H. H., Johnson, A. B. & Raine, C. S. A correlative study of the adrenal cortex in adreno-leukodystrophy--evidence for a fatal intoxication with very long chain saturated fatty acids. *Invest Cell Pathol* **3**, 353-76 (1980).
161. Knazek, R. A., Rizzo, W. B., Schulman, J. D. & Dave, J. R. Membrane microviscosity is increased in the erythrocytes of patients with adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy. *J Clin Invest* **72**, 245-8 (1983).
162. Whitcomb, R. W., Linehan, W. M. & Knazek, R. A. Effects of long-chain, saturated fatty acids on membrane microviscosity and adrenocorticotropin responsiveness of human adrenocortical cells in vitro. *J Clin Invest* **81**, 185-8 (1988).
163. Ogino, T. Biochemical study of adrenoleukodystrophy (ALD). *Folia Psychiatr Neurol Jpn* **34**, 117-25 (1980).
164. Migeon, B. R. et al. Adrenoleukodystrophy: evidence for X linkage, inactivation, and selection favoring the mutant allele in heterozygous cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 5066-70 (1981).
165. Mosser, J. et al. Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* **361**, 726-30 (1993).
166. Mosser, J., Sarde, C. O., Vicaire, S., Yates, J. R. & Mandel, J. L. A new human gene (DXS1357E) with ubiquitous expression, located in Xq28 adjacent to the adrenoleukodystrophy gene. *Genomics* **22**, 469-71 (1994).
167. Sarde, C. O. et al. Genomic organization of the adrenoleukodystrophy gene. *Genomics* **22**, 13-20 (1994).
168. Braun, A., Kammerer, S., Ambach, H. & Roscher, A. A. Characterization of a partial pseudogene homologous to the adrenoleukodystrophy gene and application to mutation detection. *Hum Mutat* **7**, 105-8 (1996).
169. Eichler, E. E. et al. Interchromosomal duplications of the adrenoleukodystrophy locus: a phenomenon of pericentromeric plasticity. *Hum Mol Genet* **6**, 991-1002 (1997).
170. Cartier, N. et al. Retroviral-mediated gene transfer corrects very-long-chain fatty acid metabolism in adrenoleukodystrophy fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1674-8 (1995).
171. Shinnoh, N. et al. Adrenoleukodystrophy: the restoration of peroxisomal beta-oxidation by transfection of normal cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* **210**, 830-6 (1995).
172. Braiterman, L. T. et al. Suppression of peroxisomal membrane protein defects by peroxisomal ATP binding cassette (ABC) proteins. *Hum Mol Genet* **7**, 239-47 (1998).
173. Maestri, N. E. & Beaty, T. H. Predictions of a 2-locus model for disease heterogeneity: application to adrenoleukodystrophy. *Am J Med Genet* **44**, 576-82 (1992).
174. Korenke, G. C. et al. Cerebral adrenoleukodystrophy (ALD) in only one of monozygotic twins with an identical ALD genotype. *Ann Neurol* **40**, 254-7 (1996).
175. Corzo, D. et al. Contiguous deletion of the X-linked adrenoleukodystrophy gene (ABCD1) and DXS1357E: a novel neonatal phenotype similar to peroxisomal biogenesis disorders. *Am J Hum Genet* **70**, 1520-31 (2002).

176. Mosser, J. et al. The gene responsible for adrenoleukodystrophy encodes a peroxisomal membrane protein. *Hum Mol Genet* **3**, 265-71 (1994).
177. Contreras, M., Mosser, J., Mandel, J. L., Aubourg, P. & Singh, I. The protein coded by the X-adrenoleukodystrophy gene is a peroxisomal integral membrane protein. *FEBS Lett* **344**, 211-5 (1994).
178. Smith, K. D. et al. X-linked adrenoleukodystrophy: genes, mutations, and phenotypes. *Neurochem Res* **24**, 521-35 (1999).
179. Hettema, E. H. et al. The ABC transporter proteins Pat1 and Pat2 are required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **15**, 3813-22 (1996).
180. Heinzer, A. K., Kemp, S., Lu, J. F., Watkins, P. A. & Smith, K. D. Mouse very long-chain acyl-CoA synthetase in X-linked adrenoleukodystrophy. *J Biol Chem* **277**, 28765-73 (2002).
181. McGuinness, M. C. et al. Role of ALDP (ABCD1) and mitochondria in X-linked adrenoleukodystrophy. *Mol Cell Biol* **23**, 744-53 (2003).
182. Berger, J. et al. The four murine peroxisomal ABC-transporter genes differ in constitutive, inducible and developmental expression. *Eur J Biochem* **265**, 719-27 (1999).
183. Fouquet, F. et al. Expression of the adrenoleukodystrophy protein in the human and mouse central nervous system. *Neurobiol Dis* **3**, 271-85 (1997).
184. Troffer-Charlier, N. et al. Mirror expression of adrenoleukodystrophy and adrenoleukodystrophy related genes in mouse tissues and human cell lines. *Eur J Cell Biol* **75**, 254-64 (1998).
185. Lombard-Platet, G., Savary, S., Sarde, C. O., Mandel, J. L. & Chimini, G. A close relative of the adrenoleukodystrophy (ALD) gene codes for a peroxisomal protein with a specific expression pattern. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1265-9 (1996).
186. Kamijo, K., Taketani, S., Yokota, S., Osumi, T. & Hashimoto, T. The 70-kDa peroxisomal membrane protein is a member of the Mdr (P-glycoprotein)-related ATP-binding protein superfamily. *J Biol Chem* **265**, 4534-40 (1990).
187. Shani, N., Jimenez-Sanchez, G., Steel, G., Dean, M. & Valle, D. Identification of a fourth half ABC transporter in the human peroxisomal membrane. *Hum Mol Genet* **6**, 1925-31 (1997).
188. Holzinger, A., Kammerer, S., Berger, J. & Roscher, A. A. cDNA cloning and mRNA expression of the human adrenoleukodystrophy related protein (ALDRP), a peroxisomal ABC transporter. *Biochem Biophys Res Commun* **239**, 261-4 (1997).
189. Higgins, C. F. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**, 67-113 (1992).
190. Dean, M. & Allikmets, R. Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. *Curr Opin Genet Dev* **5**, 779-85 (1995).
191. Riordan, J. R. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**, 1066-73 (1989).
192. Allikmets, R. A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet* **17**, 122 (1997).
193. Brooks-Wilson, A. et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* **22**, 336-45 (1999).
194. Strautnieks, S. S. et al. A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet* **20**, 233-8 (1998).
195. de Vree, J. M. et al. Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 282-7 (1998).
196. Paulusma, C. C. et al. Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* **271**, 1126-8 (1996).
197. Ringpfeil, F., Lebwohl, M. G., Christiano, A. M. & Uitto, J. Pseudoxanthoma elasticum: mutations in the MRP6 gene encoding a transmembrane ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6001-6 (2000).
198. Thomas, P. M. et al. Mutations in the sulfonyleurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science* **268**, 426-9 (1995).
199. Allikmets, R. et al. Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A). *Hum Mol Genet* **8**, 743-9 (1999).
200. Berge, K. E. et al. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* **290**, 1771-5 (2000).

201. Momburg, F. et al. Selectivity of MHC-encoded peptide transporters from human, mouse and rat. *Nature* **367**, 648-51 (1994).
202. Dean, M. et al. Multiple mutations in highly conserved residues are found in mildly affected cystic fibrosis patients. *Cell* **61**, 863-70 (1990).
203. Oram, J. F. & Yokoyama, S. Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. *J Lipid Res* **37**, 2473-91 (1996).
204. Kamijo, K., Kamijo, T., Ueno, I., Osumi, T. & Hashimoto, T. Nucleotide sequence of the human 70 kDa peroxisomal membrane protein: a member of ATP-binding cassette transporters. *Biochim Biophys Acta* **1129**, 323-7 (1992).
205. Contreras, M., Sengupta, T. K., Sheikh, F., Aubourg, P. & Singh, I. Topology of ATP-binding domain of adrenoleukodystrophy gene product in peroxisomes. *Arch Biochem Biophys* **334**, 369-79 (1996).
206. Roerig, P., Mayerhofer, P., Holzinger, A. & Gartner, J. Characterization and functional analysis of the nucleotide binding fold in human peroxisomal ATP binding cassette transporters. *FEBS Lett* **492**, 66-72 (2001).
207. Tanaka, A. R. et al. ATP binding/hydrolysis by and phosphorylation of peroxisomal ATP-binding cassette proteins PMP70 (ABCD3) and adrenoleukodystrophy protein (ABCD1). *J Biol Chem* **277**, 40142-7 (2002).
208. Gartner, J., Dehmel, T., Klusmann, A. & Roerig, P. Functional characterization of the adrenoleukodystrophy protein (ALDP) and disease pathogenesis. *Endocr Res* **28**, 741-8 (2002).
209. Liu, L. X. et al. Homo- and heterodimerization of peroxisomal ATP-binding cassette half-transporters. *J Biol Chem* **274**, 32738-43 (1999).
210. Imanaka, T. et al. Characterization of the 70-kDa peroxisomal membrane protein, an ATP binding cassette transporter. *J Biol Chem* **274**, 11968-76 (1999).
211. Ewart, G. D., Cannell, D., Cox, G. B. & Howells, A. J. Mutational analysis of the traffic ATPase (ABC) transporters involved in uptake of eye pigment precursors in *Drosophila melanogaster*. Implications for structure-function relationships. *J Biol Chem* **269**, 10370-7 (1994).
212. Pollard, H., Moreau, J. & Aubourg, P. Localization of mRNAs for adrenoleukodystrophy and the 70 kDa peroxisomal (PMP70) proteins in the rat brain during post-natal development. *J Neurosci Res* **42**, 433-7 (1995).
213. Guimaraes, C. P. et al. Mouse liver PMP70 and ALDP: homomeric interactions prevail in vivo. *Biochim Biophys Acta* **1689**, 235-43 (2004).
214. Kemp, S. et al. Gene redundancy and pharmacological gene therapy: implications for X-linked adrenoleukodystrophy. *Nat Med* **4**, 1261-8 (1998).
215. Flavigny, E., Sanhaj, A., Aubourg, P. & Cartier, N. Retroviral-mediated adrenoleukodystrophy-related gene transfer corrects very long chain fatty acid metabolism in adrenoleukodystrophy fibroblasts: implications for therapy. *FEBS Lett* **448**, 261-4 (1999).
216. Netik, A. et al. Adrenoleukodystrophy-related protein can compensate functionally for adrenoleukodystrophy protein deficiency (X-ALD): implications for therapy. *Hum Mol Genet* **8**, 907-13 (1999).
217. Moser, A. B. et al. A new dietary therapy for adrenoleukodystrophy: biochemical and preliminary clinical results in 36 patients. *Ann Neurol* **21**, 240-9 (1987).
218. Rizzo, W. B. et al. Adrenoleukodystrophy: dietary oleic acid lowers hexacosanoate levels. *Ann Neurol* **21**, 232-9 (1987).
219. Rizzo, W. B. et al. Dietary erucic acid therapy for X-linked adrenoleukodystrophy. *Neurology* **39**, 1415-22 (1989).
220. Aubourg, P. et al. A two-year trial of oleic and erucic acids ("Lorenzo's oil") as treatment for adrenomyeloneuropathy. *N Engl J Med* **329**, 745-52 (1993).
221. van Geel, B. M. et al. Progression of abnormalities in adrenomyeloneuropathy and neurologically asymptomatic X-linked adrenoleukodystrophy despite treatment with "Lorenzo's oil". *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **67**, 290-9 (1999).
222. Poulos, A., Gibson, R., Sharp, P., Beckman, K. & Grattan-Smith, P. Very long chain fatty acids in X-linked adrenoleukodystrophy brain after treatment with Lorenzo's oil. *Ann Neurol* **36**, 741-6 (1994).
223. Rasmussen, M., Moser, A. B., Borel, J., Khangoora, S. & Moser, H. W. Brain, liver, and adipose tissue erucic and very long chain fatty acid levels in adrenoleukodystrophy

- patients treated with glyceryl trierucate and trioleate oils (Lorenzo's oil). *Neurochem Res* **19**, 1073-82 (1994).
224. Moser, H. W. & Borel, J. Dietary management of X-linked adrenoleukodystrophy. *Annu Rev Nutr* **15**, 379-97 (1995).
225. Krivit, W., Lockman, L. A., Watkins, P. A., Hirsch, J. & Shapiro, E. G. The future for treatment by bone marrow transplantation for adrenoleukodystrophy, metachromatic leukodystrophy, globoid cell leukodystrophy and Hurler syndrome. *J Inherit Metab Dis* **18**, 398-412 (1995).
226. Shapiro, E. et al. Long-term effect of bone-marrow transplantation for childhood-onset cerebral X-linked adrenoleukodystrophy. *Lancet* **356**, 713-8 (2000).
227. Peters, C. et al. Cerebral X-linked adrenoleukodystrophy: the international hematopoietic cell transplantation experience from 1982 to 1999. *Blood* **104**, 881-8 (2004).
228. Yamada, T. et al. Therapeutic effects of normal cells on ABCD1 deficient cells in vitro and hematopoietic cell transplantation in the X-ALD mouse model. *J Neurol Sci* **218**, 91-7 (2004).
229. Doerflinger, N. et al. Retroviral transfer and long-term expression of the adrenoleukodystrophy gene in human CD34+ cells. *Hum Gene Ther* **9**, 1025-36 (1998).
230. Cartier, N. Gene therapy strategies for X-linked adrenoleukodystrophy. *Curr Opin Mol Ther* **3**, 357-61 (2001).
231. Naldini, L. et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**, 263-7 (1996).
232. Benhamida S, P. F., Dubart-Kupperschmitt A, Zhao-Emonet JC, Cavazzana-Calvo M, Rocchiccioli F, Fichelson S, Aubourg P, Charneau P, Cartier N. Transduced CD34+ cells from Adrenoleukodystrophy Patients with HIV-derived vector mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice. *Molecular Therapy* **7**, 317-324 (2003).
233. Unterrainer, G., Molzer, B., Forss-Petter, S. & Berger, J. Co-expression of mutated and normal adrenoleukodystrophy protein reduces protein function: implications for gene therapy of X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet* **9**, 2609-16 (2000).
234. Bradford, R. H. et al. Expanded Clinical Evaluation of Lovastatin (EXCEL) study results. I. Efficacy in modifying plasma lipoproteins and adverse event profile in 8245 patients with moderate hypercholesterolemia. *Arch Intern Med* **151**, 43-9 (1991).
235. Lambert, M. et al. Treatment of familial hypercholesterolemia in children and adolescents: effect of lovastatin. Canadian Lovastatin in Children Study Group. *Pediatrics* **97**, 619-28 (1996).
236. Stein, E. A. et al. Efficacy and safety of lovastatin in adolescent males with heterozygous familial hypercholesterolemia: a randomized controlled trial. *Jama* **281**, 137-44 (1999).
237. Pahan, K., Sheikh, F. G., Namboodiri, A. M. & Singh, I. Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages. *J Clin Invest* **100**, 2671-9 (1997).
238. Singh, I., Khan, M., Key, L. & Pai, S. Lovastatin for X-linked adrenoleukodystrophy. *N Engl J Med* **339**, 702-3 (1998).
239. Pai, G. S. et al. Lovastatin therapy for X-linked adrenoleukodystrophy: clinical and biochemical observations on 12 patients. *Mol Genet Metab* **69**, 312-22 (2000).
240. McGuinness, M. C., Zhang, H. P. & Smith, K. D. Evaluation of pharmacological induction of fatty acid beta-oxidation in X-linked adrenoleukodystrophy. *Mol Genet Metab* **74**, 256-63 (2001).
241. Wachtel, H. The second-messenger dysbalance hypothesis of affective disorders. *Pharmacopsychiatry* **23**, 27-32 (1990).
242. Netik, A. et al. Risperidone does not normalize very long-chain fatty acid levels in adrenoleukodystrophy protein-deficient fibroblasts and mice. *J Inherit Metab Dis* **23**, 615-24 (2000).
243. Tinsley, J. M. et al. Amelioration of the dystrophic phenotype of mdx mice using a truncated utrophin transgene. *Nature* **384**, 349-53 (1996).
244. Albet, S. et al. Fenofibrate differently alters expression of genes encoding ATP-binding transporter proteins of the peroxisomal membrane. *FEBS Lett* **405**, 394-7 (1997).
245. Fourcade, S. et al. Fibrate induction of the adrenoleukodystrophy-related gene (ABCD2): promoter analysis and role of the peroxisome proliferator-activated receptor PPARalpha. *Eur J Biochem* **268**, 3490-500 (2001).

246. Pujol, A., Troffer-Charlier, N., Metzger, E., Chimini, G. & Mandel, J. L. Characterization of the adrenoleukodystrophy-related (ALDR, ABCD2) gene promoter: inducibility by retinoic acid and forskolin. *Genomics* **70**, 131-9 (2000).
247. Rampler, H. et al. Evaluation of the therapeutic potential of PPARalpha agonists for X-linked adrenoleukodystrophy. *Mol Genet Metab* **80**, 398-407 (2003).
248. Weinhofer, I., Forss-Petter, S., Zigman, M. & Berger, J. Cholesterol regulates ABCD2 expression: implications for the therapy of X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet* **11**, 2701-8 (2002).
249. Maestri, N. E., Brusilow, S. W., Clissold, D. B. & Bassett, S. S. Long-term treatment of girls with ornithine transcarbamylase deficiency. *N Engl J Med* **335**, 855-9 (1996).
250. Forss-Petter, S., Werner H, Berger J, Lassmann H, Molzer B, Schwab MH, Bernheimer H, Zimmermann F, Nave KA. Targeted inactivation of the X-linked adrenoleukodystrophy gene in mice. *J of Neuroscience Research* **50**, 829-843 (1997).
251. Lu, J. F., Lawler AM, Watkins PA, Powers JM, Moser AB. A mouse model for X-linked adrenoleukodystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9366-9371 (1997).
252. Kobayashi T., S. N., Kondo A, Yamada T. Adrenoleukodystrophy protein-deficient mice represent abnormality of very long chain fatty acid metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* **232**, 631-636 (1997).
253. Pujol, A., Hindelang C, Callizot N, Bartsch U, Schachner M, Mandel JL. Late onset neurological phenotype of the X-ALD gene inactivation in mice: a mouse model for adrenomyeloneuropathy. *Human Molecular Genetics* **11**, 499-505 (2002).
254. Pujol, A., Ferrer, I., Camps, C., Metzger, E., Hindelang, C., Callizot, N., Ruiz, M., Pàmols, T., Girós, M., Mandel, JL. Functional overlap between ABCD1 (ALD) and ABCD2 (ALDR) transporters: a therapeutic target for X-adrenoleukodystrophy. *Human Molecular Genetics* **13**, 2997-3006 (2004).
255. Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509 (1957).
256. Lepage G., Roy, CG. Direct transesterification of all classes of lipids in one-step reaction. *J. Lipid Research* **27**, 114-121 (1986).
257. Asheuer, M., Bieche, I., Laurendeau, I., Moser, A., Hainque, Vidaud, M., Aubourg, P. Decreased expression of *ABCD4* and *BG1* genes early in the pathogenesis of X-linked adrenoleukodystrophy. *Human Molecular Genetics* **14** (10), 1293-1303 (2005).
258. Kemp, S., Valianpour, F., Denis, S., Ofman, R., Sanders RJ., Mooyer, P., Barth, PG., Wanders, RJA. Elongation of very long-chain fatty acids is enhanced in X-linked adrenoleukodystrophy. *Molecular Genetics and Metabolism* **84**, 144-151 (2005).
259. Ruiz, M., Pàmols, T., Girós, M. Glycerol trioleate/glycerol trierucate therapy in X-linked adrenoleukodystrophy: saturated and unsaturated fatty acids in blood cells. Implications for the follow-up. *J. Inher. Metab. Dis* **19**, 188-192 (1996).
260. Ruiz M, Girós M. Fatty acid composition of mononuclear cells and its relationship with lipid metabolism in peroxisomal disorders. Personal data in thesis of M. Ruiz (2000).
261. Valianpour, F., Selhorst, JJ., van Lint, LE., van Gennip, AH., Wanders, RJA, Kemp, S. Analysis of very long-chain fatty acids using electrospray ionization mass spectrometry. *Molecular Genetics and Metabolism* **79**, 189-196 (2003).
262. Pai JT, Guryev O, Brown MS, Goldstein JL. Differential stimulation of cholesterol and unsaturated fatty acid biosynthesis in cells expressing individual nuclear sterol regulatory element binding proteins. *J. Biol. Chem* **273**, 26138-26148 (1998)
263. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest* **109**, 1125-1131 (2002).
264. Marcus SL, Miyata KS, Zhang B, Subramani S, Rachubinski RA, Capone JP. Diverse peroxisome proliferator-activated receptors bind to the peroxisome proliferator-responsive elements of the rat hydratase/dehydrogenase and fatty acyl-CoA oxidase genes but differentially induce expression. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **90**, 5723-5727 (1993).
265. Edwards PA, Tabor D, Kast HR, Venkateswaran A. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim. Biophys. Acta* **1529**, 103-113 (2000)
266. Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Yoshikawa T, Hasty AH, Tamura Y, Osuga JI, Okazaki H, Iizuka Y et al. Dual regulation of mouse (Delta) 5- and (Delta)6-desaturase gene expression by SREBP-1c and PPAR (alpha). *J. Lipid Res.* **43**, 107-114 (2002).

267. Tabor DE, Kim JB, Spiegelman BM, Edwards PA. Identification of conserved cis-elements and transcription factors required for sterol-regulated transcription of stearoyl-CoA desaturase 1 and 2. *J. Biol. Chem.* **274**, 20603-20610 (1999).
268. Miller CW, Ntambi JM. Peroxisome proliferators induce mouse liver stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9443-9448 (1996).
269. Nakamura MT, Nara TY. Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals. *Prostagl. Leukotr. and Essent. Fatty Acids* **68**, 145-150 (2003).
270. Yoshikawa T, Shimano N, Yahagi N et al. Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. *J. Biol. Chem* **277**, 1705-1711 (2002).
271. Ou J, Tu H, Shan B et al. Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 6027-6032 (2001).
272. Xu J, Teran-Garcia M, Park JH, Nakamura MT, Clarke SD. Polyunsaturated fatty acids suppress hepatic sterol regulatory element-binding protein 1 expression by accelerating transcript decay. *J. Biol. Chem.* **276**, 9800-9807 (2001).
273. Hannah VC, Ou J, Luong A, Goldstein JL, Brown MS. Unsaturated fatty acids down-regulate SREBP isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 4365-4372 (2001).
274. Xu J, Nakamura MT, Cho HP, Clarke SD. Sterol regulatory element binding protein 1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids: a mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. *J. Biol. Chem.* **274**, 23577-23583 (1999).
275. Jump DB. The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* **277**, 8755-8758 (2002).
276. Xu, HE., Lambert, MH., Montana, VG., Parks, DJ., Blanchard, SG., Brown, P.J., Sternbach, DD., Lehmann, JM., Wisely, GB., Willson, TM., Kiewer, SA., Milburn, MV. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell* **3**, 397-403 (1999).
277. Pawar, A., Jump, DB. Unsaturated fatty acid regulation of peroxisome proliferator-activated receptor α activity in rat primary hepatocytes. *J Biol Chem* **278**, 35931-35939 (2003).
278. Litvak, V., Dahan, N., Ramachandran, S., Sabanay, H., Lev, S. Maintenance of the diacylglycerol level in the Golgi apparatus by the Nir2 protein is critical for Golgi secretory function. *Nat Cell Biol* **7**, 225-234 (2005).
279. Schoojans, K., Brendel, C., Mangelsdorf, D., Auwerx, J. Sterols and gene expression: control of affluence. *Biochim Biophys Acta* **1529**, 114-125 (2000).
280. Ridgway, ND., Lagace, TA., Cook, HW., Byers, DM. Differential effects of sphingomyelin hydrolysis and cholesterol transport on oxysterol-binding protein phosphorylation and Golgi localization. *J Biol Chem* **20**, 31621-31628 (1998).
281. Storey, MK., Byers, DM., Cook, HW., Ridgway, ND. Cholesterol regulates oxysterol binding protein phosphorylation and Golgi localization in Chinese hamster ovary cells: correlation with stimulation of sphingomyelin synthesis. *Biochem J* **336**, 247-257 (1998).
282. Ridgway, ND., Dawson, PA., Ho, YK., Brown, MS., Goldstein, JL. Translocation of oxysterol binding protein to Golgi apparatus triggered by ligand binding. *J Cell Biol* **116**, 307-319 (1992).
283. Smart, EJ., Ying, Y., Donzell, WC., Anderson, RGW. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem* **271**, 29427-29435 (1996).
284. Lagace, TA., Byers, DM., Cook, HW., Ridgway, ND. Altered regulation of cholesterol and cholesteryl ester synthesis in Chinese-hamster ovary cells overexpressing the oxysterol-binding protein is dependent on the pleckstrin homology domain. *Biochem J* **15**, 205-213 (1997).
285. Lagace, TA., Byers, DM., Cook, HW., Ridgway, ND. Chinese hamster ovary cells overexpressing the oxysterol binding protein (OSBP) display enhanced synthesis of sphingomyelin in response to 25-hydroxycholesterol. *J Lipid Research* **40**, 109-116 (1999).

286. Choi, WC., Gerfen, CR., Suh, PG., Rhee, SG. Immunohistochemical localization of a brain isozyme of phospholipase-C (PLC-III) in astroglia in rat-brain. *Brain Res* **499**, 193-197 (1989).
287. Mizuguchi, M., Yamada, M., Kim, SU., Rhee, SG. Phospholipase C isozymes in neurons and glial cells in culture: an immunocytochemical and immunochemical study. *Brain Res* **548**, 35-40 (1991).
288. Goto, K., Kondo, H. Diacylglycerol kinase in the central nervous system: molecular heterogeneity and gene expression. *Chem Phys Lipids* **98**, 109-117 (1999).
289. Goto, K., Kondo, H. Functional implications of the diacylglycerol kinase family. *Advan Enzyme Regul* **44**, 187-199 (2004).
290. Liscovitch, M., Cantley, LC. Lipid second messengers. *Cell* **77**, 329-334 (1994).
291. Wolfe, LS., Horrocks, LA. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. Chapter 23. 5th Ed Raven Press (1994).
292. Van Kuijk, FJ., Handelman, GJ., Dratz, EA. Consecutive action of phospholipase A2 and glutathione peroxidase is required for reduction of phospholipid hydroperoxides and provides a convenient method to determine peroxide values in membranes. *J. Free Radic. Biol. Med.* **1** (5-6), 31-34 (1985).
293. Cho, YY., Kang, MJ., Ogawa, S., Yamashita, Y., Fujino, T. Regulation by adrenocorticotrophic hormone and arachidonate-preferring enzyme expressed in steroidogenic tissues. *Biochem Biophys Res Commun* **274**, 741-745 (2000)
294. Knudsen, J., Acyl-CoA-binding protein (ACBP) and its relation to fatty acid-binding protein (FABP): an overview. *Mol Cell Biochem* **98**, 217-223 (1990).

Aquesta tesi doctoral ha estat un llarg camí, ple de moments durs i de no tant durs. He tingut l'oportunitat de sortir del país i de conèixer altres mons, altres sistemes de recerca i diferents maneres de pensar, fet que ha estat molt il·lustratiu i formador. Durant aquests 5 anys no he caminat sola, i és per això que vull tenir un recordatori per a tots ells en aquestes pàgines.

En primer lloc, el meu agraïment a totes les persones que han contribuït al resultat final d'aquesta tesi:

Aurora Pujol i Marisa Girós, les directores de la tesi, pel temps que hi han dedicat. A l'Aurora haig d'agrair-li el fet d'haver-me obert les portes de l'IGBMC. A la Marisa, vull donar-li les gràcies per la confiança que sempre m'ha demostrat, tant en els bons moments com en els dolents.

Jean-Louis Mandel i Teresa Pàmpols, com a directors, respectivament, de l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC, Strasbourg) i de l'Institut de Bioquímica Clínica (IBC, Barcelona), els dos centres on he pogut desenvolupar aquest treball.

L'equip de "peroxis", la Montse Ruiz per la seva gran ajuda en la "titànica" tasca de quantificació d'àcids grassos i a la Lina per l'excel·lent suport tècnic i demés. També als diferents estudiants que han anat passant pel laboratori i que han contribuït a fer avançar el treball.

L'equip "ALD", per les reunions científiques del dimecres.

Christine Kretz, pel genotipatge setmanal dels ratolins i pel suport tècnic general, i a la Laurence Retenauer per l'ajuda proporcionada a l'estabulari.

L'estabulari de l'IGBMC, per tenir cura dels ratolins i, en especial a William per la realització de les extraccions de sang.

El servei de microarrays de l'IGBMC, particularment a Doulaye Dembélé, Bernard Jost i Christine Bole-Feysot.

El servei de síntesi d'oligonucleòtids de l'IGBMC.

Els serveis comuns generals de l'IBC i de l'IGBMC, que fan que els engranatges funcionin dia a dia.

Totes les persones que han treballat en la generació dels diferents ratolins “knockout” i transgènics, sense els quals no hauria estat possible aquest treball.

Yvon Trottier i Jocelyn Laporte, membres de l'equip del Pr. Mandel, per les fructíferes discussions mantingudes al llarg de la meva estada a l'IGBMC.

Àngels Tapias, per totes les contribucions que ha fet en aquesta tesi i, sobretot, en la meva formació com a científic.

ELA (European Leukodystrophy Association), pel suport econòmic proporcionat tant a nivell personal com al projecte en general.

I, a títol personal, vull agrair:

Als meus pares, pel seu suport constant i incondicional.

A en Josep, per la seva particular visió del món que t'han m'ha ajudat a relativitzar situacions, i per les frases de Nietzsche.

A l'Àngels, per tenir criteri propi i no jutjar a les persones a través de l'opinió de tercers. Crec que, gràcies a això, hem pogut disfrutar d'una molt bona amistat i compartir moments excel·lents a Strasbourg, ja sigui de “randonnée” pels Vosges o al voltant d'un “bon repàs alsacien”.

A en Ralf, qui va rien comprendre de cette thèse à cause de la langue mais qui a été là, comme Sancho Panza à côté de Don Quijote, pendant les “andanzas” des deux dernières années.

A tots els companys/es de l'IBC i de l'IGBMC amb els quals hagi compartit algun bon moment al llarg d'aquests anys.