

L'adrenoleucodistròfia lligada a l'X (X-ALD) és un desordre metabòlic d'origen genètic caracteritzat per una desmielinització progressiva del sistema nerviós central o perifèric, segons la forma clínica, i una insuficiència adrenocortical. Els pacients mostren una acumulació d'àcids grassos saturats de cadena molt llarga (AGCMLL), i en especial d'àcid hexacosanoic (C26:0), a plasma i teixits diana. L'acumulació d'aquests compostos és deguda a un defecte en el seu procés de beta-oxidació peroxisomal. La causa genètica d'aquesta malaltia rau en les mutacions que afecten al gen *ALD* (*ABCD1*), les quals donen lloc a una pèrdua de funció de la proteïna ALDP (*ABCD1*). ALDP és una proteïna de tipus "ATP-binding cassette" localitzada a la membrana peroxisomal. El fenotip bioquímic dels pacients suggereix que ALDP està implicada en l'import d'AGCMLL al peroxisoma.

A la membrana peroxisomal existeix una altra proteïna, ALDRP (*ABCD2*), amb un elevat percentatge d'identitat a nivell d'aminoàcid amb ALDP. Aquesta proteïna mostra certa redundància funcional amb ALDP al ser capaç de corregir els nivells d'AGCMLL en fibroblasts de pacients quan és sobreexpressada. Aquest fet obre les portes cap a una possible estratègia terapèutica per a la X-ALD basada en la sobreexpressió d'aquesta proteïna. El treball realitzat en aquesta tesi doctoral preté aportar noves dades sobre els efectes de la sobreexpressió d'ALDRP *in vivo*, així com del paper que desenvolupen ALDP i ALDRP en el metabolisme dels àcids grassos, utilitzant ratolins "knockout" (ko) i transgènics (tg) com a material d'investigació. Els animals utilitzats inclouen els ratolins Ald ko (inactivació del gen *abcd1*), Aldr ko (inactivació del gen *abcd2*), Ald/aldr ko (inactivació dels gens *abcd1* i *abcd2*), Wt/tg (sobreexpressió del gen *abcd2*, que condueix a un augment del nivell de proteïna ALDRP de 5-10 vegades respecte el Wild-type (Wt)), i Ald/tg (inactivació del gen *abcd1* + sobreexpressió del gen *abcd2*).

La determinació d'àcids grassos en teixits procedents del ratolí Ald ko permet detectar augments d'AGCMLL, i en especial de C26:0, en teixits neurals i glàndula adrenal en comparació al Wt. El ratolí Ald/tg, en canvi, presenta uns valors normals o inclús disminuïts de C26:0 en aquests mateixos teixits en comparació al Wt. Aquest resultat demostra, per primera vegada, que la sobreexpressió d'ALDRP és operativa, *in vivo*, en la normalització dels nivells d'AGCMLL. La determinació d'àcids grassos en teixits procedents de ratolins Ald ko, Aldr ko i Ald/aldr ko ha permès la identificació de substrats específics d'ALDP i d'ALDRP en les sèries d'àcids grassos saturats i omega9-mono-insaturats de 20 a 26 carbonis de longitud. En l'estudi dels efectes de la sobreexpressió d'ALDRP a través dels ratolins Wt/tg i Ald/tg, hem detectat algunes alteracions en els nivells d'àcids grassos d'alguns teixits procedents d'aquests animals. Aquestes alteracions, que afecten a àcids grassos de les sèries omega6 i omega3-poli-insaturats, suggereixen la implicació de modificacions en el procés de síntesi d'aquests compostos. A través d'estudis de RT-PCR quantitativa hem descartat alteracions en l'expressió a nivell de RNA missatger dels gens que codifiquen per elongases i desaturases (enzims que participen en la síntesi dels àcids grassos) que puguin explicar els canvis detectats en els nivells de substrats.

Finalment, el treball presentat en aquesta tesi doctoral inclou un estudi basat en la utilització de micromatrius de cDNA, amb l'objectiu de monitoritzar l'expressió gènica en fibroblasts embrionaris de ratolí. Hem utilitzat mostres de cultius de genotip Wt o Ald ko per determinar diferències en l'expressió gènica causades per l'absència d'ALDP, i mostres de cultius tractats/no tractats amb C26:0 per estudiar el paper d'aquest compost en el mecanisme fisio-patològic d'aquesta malaltia.

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) is a metabolic genetic disorder characterised by progressive demyelination within the central or peripheral nervous system (depending on the clinical form) and adrenocortical insufficiency. Patients present an accumulation of saturated very long chain fatty acids (VLCFAs), specially hexacosanoic acid (C26:0), in plasma and target tissues. The accumulation of these compounds is due to a defect in their peroxisomal beta-oxidation. The disease is caused by mutations in the *ALD* gene (*ABCD1*) which leads to a loss of function of the ALDP protein (*ABCD1*). ALDP is an ATP-binding cassette protein localised in the peroxisomal membrane. The biochemical phenotype of patients suggests that ALDP might be involved in the transport of VLCFAs into the peroxisome.

ALDRP (*ABCD2*) is a peroxisomal membrane protein that possesses a high percentage of identity at the amino acid level with ALDP. There seems to exist a functional redundancy between ALDP and ALDRP, since overexpression of ALDRP is able to normalise the accumulation of VLCFAs in X-ALD fibroblasts. This finding has opened new perspectives for developing a therapeutic strategy for X-ALD based on the overexpression of ALDRP. The work realised in this thesis contributes with new data about the effects of ALDRP overexpression *in vivo* and the role of ALDP and ALDRP in the fatty acid metabolism. We have used knockout (ko) and transgenic (tg) mouse models as material for our research, including Ald ko mice (*abcd1* gene inactivation), Aldr ko mice (*abcd2* gene inactivation), Ald/aldr ko mice (*abcd1* and *abcd2* gene inactivation), Wt/tg mice (*abcd2* gene overexpression, leading to a 5-10-fold increase of ALDRP protein level compared to Wild-type (Wt) mice), and Ald/tg mice (*abcd1* gene inactivation + *abcd2* gene overexpression).

The fatty acid levels determined in tissues of Ald ko mice show an accumulation of VLCFAs, especially of C26:0, in neural tissues and adrenal gland compared to Wt. In contrast, the level of C26:0 in these tissues appears normal or decreased in Ald/tg mice compared to Wt. These results demonstrate, for the first time, that ALDRP overexpression is operative *in vivo* normalising VLCFAs levels. The fatty acid levels determined in tissues of Ald ko, Aldr ko and Ald/aldr ko mice have led to the identification of specific substrates for ALDP and ALDRP among saturated and omega9-monounsaturated fatty acids with a chain length from 20 to 26 carbons. The effects of ALDRP overexpression have been studied analysing tissues of Wt/tg and Ald/tg mice. We have detected alternate levels of some omega6 and omega3-polyunsaturated fatty acids in several tissues of these mice, compared to Wt. These results suggest modifications in the synthesis of these compounds. In order to explain these alterations in fatty acid levels, we have discarded the involvement of variations in the expression (at mRNA level) of genes encoding for elongases and desaturases (enzymes which participate in the fatty acid synthesis).

Finally, this thesis includes a study based on the use of cDNA microarrays, in order to monitor gene expression in mouse embryonic fibroblasts (MEFs). We have used samples of Ald ko

and Wt MEFs to determine differences in gene expression caused by ALDP absence. We have also analysed samples of MEFs either cultured or not cultured with C26:0 to investigate the role of this compound in the physio-pathological mechanism of this disease.