

Heparán sulfatos, amiloidosis y neurodegeneración

Cecilia Vera, Jorge A. Álvarez-Orozco, Auriane Maïza, Sandrine Chantepie, Rosana N. Chehín, Mohand O. Ouidja, Dulce Papy-García

Introducción. Numerosos trastornos neurodegenerativos se han asociado directamente a la acumulación de fibras amiloides. Estas fibras están formadas por proteínas o péptidos con conformaciones alteradas y que se agregan *in vivo* en asociación con polisacáridos de tipo heparán sulfatos.

Objetivos. Examinar los conceptos más recientes sobre la biología de los heparán sulfatos y su papel en la agregación del péptido Abeta, de la proteína tau, de la alfa-sinucleína y de los priones, y analizar sus implicaciones en trastornos neurodegenerativos como las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson y las enfermedades priónicas.

Desarrollo. *In vitro*, los heparán sulfatos han desempeñado un papel importante en el proceso de oligomerización y fibrilación de proteínas o péptidos amiloidógenos, en la estabilización de estos cuerpos y su resistencia a la proteólisis, participando así en la formación de una gran variedad de fibras amiloides. Los heparán sulfatos se han relacionado también con el proceso de internalización de fibras proamiloides durante el proceso de propagación intercelular (*spreading*) considerado como central en la evolución de las proteinopatías, cuyo mejor ejemplo es la enfermedad de Alzheimer.

Conclusión. Este trabajo sugiere que las estructuras finas de los heparán sulfatos, sus localizaciones celulares y tisulares, así como sus concentraciones locales, pueden regular los procesos de amiloidosis. Avances en la comprensión de esta área de la gliconeurobiología permitirán mejorar la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares del proceso neurodegenerativo.

Palabras clave. Abeta. Agregación proteica. Alfa-sinucleína. Enfermedad de Alzheimer. Enfermedad de Parkinson. Glicosaminoglicanos. Heparán sulfatos. Neurodegeneración. Prion. Proteína tau.

Introducción

Los amiloides son agregados proteicos fibrilares compuestos de proteínas que adquieren, en condición patológica, un plegamiento del tipo hoja β -plegada que induce su agregación [1]. Esta disposición conformacional confiere a las proteínas una fuerte resistencia a la proteólisis, a la desnaturalización y a los mecanismos generales de eliminación proteica que operan en las células. Más de 40 proteínas humanas pueden formar este tipo de depósitos fibrilares insolubles, muchos de los cuales son el sello distintivo de las enfermedades amiloides conocidas como plegopatías (enfermedades de plegamiento proteico) o *protein misfolding diseases*. Las plegopatías incluyen afecciones sistémicas, así como importantes enfermedades neurodegenerativas (Tabla). En el cerebro, los eventos de plegamiento anormal están asociados a patologías como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y las enfermedades priónicas [2]. Aunque los mecanismos mediante los cuales los amiloides se forman en estas patologías, así como la manera en la que ejercen sus efectos nocivos, no se han elucidado por completo,

está bien establecido que las proteínas que constituyen estos agregados son específicas de cada una de las enfermedades en las que están implicadas: el péptido β -amiloides ($A\beta$) y la proteína tau anormalmente fosforilada están involucrados en la enfermedad de Alzheimer; la α -sinucleína, en la enfermedad de Parkinson; la huntingtina, en la enfermedad de Huntington; y la proteína prion con una conformación anormal (conocida como PrP^{Sc}), en las encefalopatías espongiiformes transmisibles [3]. Muchas de estas enfermedades están asociadas al envejecimiento, y el número de personas afectadas sigue en evolución, posiblemente como resultado del aumento en la esperanza de vida de la población.

La falta de soluciones terapéuticas para el tratamiento eficaz de las enfermedades de plegamiento proteico ha llevado a la investigación biomédica a enfocarse en la búsqueda de nuevas bases celulares y moleculares responsables del desarrollo de estas condiciones patológicas. En los tejidos afectados, los depósitos amiloides pueden ser observados extra o intracelularmente [4,5]. Aunque las proteínas mal plegadas son el componente fundamental de los agregados amiloides, éstos se forman y crecen en entornos complejos que incluyen muchas otras

Laboratoire Croissance, Réparation et Régénération Tissulaires; Université Paris Est Créteil; Créteil, Francia (C. Vera, A. Maïza, S. Chantepie, M.O. Ouidja, D. Papy-García). Instituto Superior de Investigaciones Biológicas; Instituto de Química Biológica Dr. Bernabé Bloj; Tucumán, Argentina (C. Vera, R.N. Chehín). Universidad del Valle de México; Campus Zapopan; Zapopan, Jalisco, México (J.A. Álvarez-Orozco).

Correspondencia:

Profa. Dulce Papy-García. Laboratoire Croissance, Réparation et Régénération Tissulaires. CNRS 9215. Faculté des Sciences et Technologie. Université Paris Est Créteil. 61, Av. du Général de Gaulle. 94000 Créteil (France).

E-mail:

papy@u-pec.fr

Agradecimientos:

A la Ligue Européenne Contre la Maladie d'Alzheimer (LECA)/Fondation Vaincre Alzheimer, por su apoyo a la tesis de A.M. (n.º FR-15055); a CONICET, por su apoyo a la tesis de C.V.; y a la Unión Europea, por su apoyo al proyecto H2020 FET OPEN RIA n.º 737390 sobre los HS y la enfermedad de Alzheimer.

Nota:

C.V. y J.A.A.O. participaron por igual en la elaboración del artículo.

Aceptado tras revisión externa: 05.09.17.

Cómo citar este artículo:

Vera C, Álvarez-Orozco JA, Maïza A, Chantepie S, Chehín RN, Ouidja MO, et al. Heparán sulfatos, amiloidosis y neurodegeneración. *Rev Neurol* 2017; 65: 457-68.

© 2017 Revista de Neurología

Tabla. Amiloidosis humanas y las respectivas proteínas amiloides implicadas, sus precursoras, y la localización de sus depósitos amiloides.

Proteína precursora	Proteína amiloide	Enfermedad/síndrome	Localización
Proteína precursora amiloide y variantes	A β	Enfermedad de Alzheimer, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo lowa o amiloidosis cerebrovascular, angiopatía amiloide cerebral o angiopatía congófilica	Cerebro
(Pro)calcitonina	ACal	Tumores tiroideos de células C	Tiroides
Alfa-sinucleína	α -Syn	Enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy, variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, atrofia multisistémica	Cerebro
Amiloide A sérico	AA	Amiloidosis sistémica secundaria asociada a inflamación	Todos los órganos, excepto el sistema nervioso central
Apolipoproteína A-I	AApoAI	Amiloidosis sistémicas hereditarias	Corazón, hígado, riñón, sistema nervioso periférico, testículo, laringe, piel
Apolipoproteína A-II	AApoAII	Amiloidosis sistémicas hereditarias	Principalmente riñón
Apolipoproteína A-IV	AApoAIV	Amiloidosis esporádica asociada al envejecimiento	Médula del riñón, sistémica
Ataxina-1		Ataxia espinocerebelosa	Cerebro, médula espinal
Atrofina-1		Atrofia dentorrubropalidoluisiana	Cerebro
Cadena α del fibrinógeno A	AFib	Amiloidosis sistémica hereditaria	Principalmente riñón
Cistatina C	ACys	Angiopatia amiloide cerebral hereditaria	Cerebro
Factor natriurético auricular	AANF	Amiloidosis auricular	Corazón
Gelsolina	AGel	Amiloidosis sistémica hereditaria, amiloidosis familiar de tipo finlandés	Sistema nervioso periférico, córnea
Huntingtina		Enfermedad de Huntington	Cerebro
Inmunoglobulina, cadenas liviana y pesada (L y H)	AL y AH	Amiloidosis sistémica primaria	Todos los órganos, excepto el sistema nervioso central
Insulina	Alns	Amiloidosis localizada por inyección de insulina	latrógena, sitio de inyección
Lactadherina	AMed	Amiloidosis con depósito senil en media aórtica	Músculo liso de la aorta
Lactoferrina	ALac	Amiloidosis corneal	Córnea
Lisozima y sus variantes	ALys	Amiloidosis sistémica hereditaria no neuropática	Riñón, hígado, bazo, nodos linfáticos, piel, tracto gastrointestinal

moléculas, las cuales pueden contribuir al mecanismo de plegamiento patológico. Entre éstas, los heparán sulfatos (HS) concentran un interés particular debido a su capacidad de interactuar y de favorecer la agregación de prácticamente todas las proteínas que tienen tendencia a formar amiloides, incluyendo la tau, el péptido A β , la α -sinucleína y los priones [6,7]. *In vitro*, en contacto con los HS, todas estas proteínas normalmente solubles forman fibras de tipo hoja β -plegada insolubles. *In vivo*, la presencia de HS en los diferentes depósitos proteicos sugiere la participación de estos polisacáridos en los procesos de plegamiento patológico [6]. Esta revisión presenta un análisis de varios trabajos que, juntos, sugieren que los HS pueden constituir un elemento importante en los mecanismos fisiopatológicos que conllevan a las plegopatías.

Heparán sulfatos: gran diversidad estructural

Los HS son polisacáridos lineares que pertenecen a la familia de los glicosaminoglicanos (GAG), constituyentes glicánicos de la matriz extracelular. En la matriz extracelular, los HS se encuentran covalentemente unidos a cuerpos proteicos con quienes forman los HS proteoglicanos (HSPG). Por definición, los HSPG se encuentran asociados a la membrana exterior de la célula o secretados en la matriz extracelular, desde donde participan en la regulación de procesos celulares fundamentales y en el mantenimiento de la homeostasis tisular. La familia de GAG incluye igualmente el condroitín sulfato, el queratán sulfato y el ácido hialurónico; este último es el único GAG no sulfatado [8]. Los principales HSPG son los sindecanos, los glicoproteínas y los perlecanos. Estructuralmente, los HS son polisacáridos formados por la repetición de un residuo disacárido de base constituido por una glucosamina y un ácido urónico, ya sea ácido glucurónico o ácido idurónico. El encadenamiento de estos disacáridos forma largas cadenas lineares de tallas variables, que van de algunos a cientos de kilodaltons (Fig. 1). Los HS presentan una gran diversidad estructural debido a la presencia de grupos sulfato distribuidos variablemente a lo largo de la cadena glicánica, lo que da lugar a un gran número de secuencias que varían entre los diferentes tipos celulares y los diferentes tejidos [8]. Debido al importante contenido en cargas negativas de los grupos sulfatos posicionados a lo largo de sus cadenas glicánicas, los HS pueden interactuar con un gran número de proteínas conocidas con el nombre genérico de proteínas de unión a heparina –*heparin binding proteins*

(HBP)–, las cuales incluyen varios factores de crecimiento, citocinas y todas las proteínas capaces de formar agregados amiloides, incluyendo el péptido $\alpha\beta$, la α -sinucleína, la proteína prion y la proteína tau [9].

Complejidad de los heparán sulfatos y sus roles biológicos

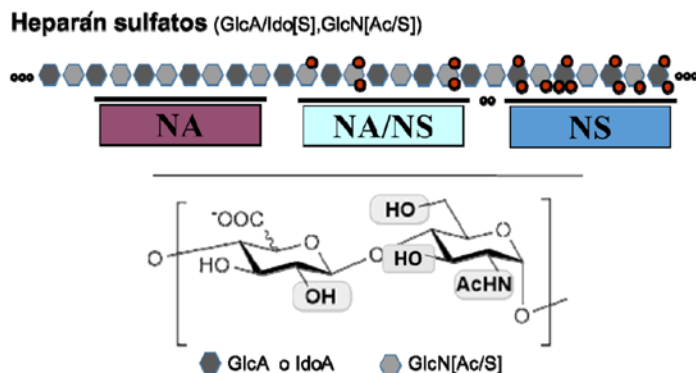
Los HS se caracterizan por almacenar una gran cantidad de informaciones biológicas diferentes. Estas informaciones se relacionan con la gran variedad de secuencias de sulfatación diferentes, las cuales son capaces de regular la acción de proteínas particulares en los tejidos en los que se forman las secuencias [8]. La diversidad estructural en los HS se debe a un proceso de biosíntesis complejo, pero extremadamente bien regulado [10]. En particular, la expresión específica en las diferentes células y tejidos de una variedad de sulfotransferasas (HSST), incluyendo las HS2ST (HS2STvar 1 y var 2), las HS3ST (HS3ST1, 2, 3A1, 3B1, 4, 5 y 6) y las HS6ST (HS6ST1, 2varL, 2varS, 3), genera secuencias de HS específicas a esas células y tejidos [8-10]. Después de su síntesis, los HSPG son transportados desde el Golgi a la membrana externa de la célula o son secretados en la matriz extracelular. Los HS pueden entonces ser reinternalizados por endocitosis y llevados al lisosoma, en donde se degradan, o procesados en el espacio extracelular por la heparanasa o por las sulfatasas Sulfs. Estas últimas son enzimas que eliminan los grupos sulfato en C6 de las unidades de glucosamina de los HS. Recientemente, se ha demostrado en modelos celulares y animales que la inhibición de la biosíntesis de los HS provoca directamente la inhibición de la deposición amiloidea [11,12].

Los HSPG son correceptores celulares de un gran número de factores de crecimiento y citocinas de tipo HBP. Los HS permiten la interacción de estas proteínas con sus receptores de alta afinidad en la superficie de las células. Así, los HS son elementos indispensables que permiten la asociación receptor-ligando; su ausencia causa la interrupción de la señalización celular [8,9]. Además de esta actividad ‘correceptor’, los HS potencian los efectos biológicos de los factores de crecimiento, quimiocinas o proteínas de tipo HBP con quien interactúan, protegiéndolas de la degradación proteolítica y acentuando así sus biodisponibilidades [8,13]. De manera similar, los HS pueden también estabilizar los agregados de proteínas amiloides y protegerlos de la degradación proteolítica, favoreciendo su acumulación patológica [14]. Así, los HS pueden coordinar los procesos biológicos fundamentales o pa-

Tabla. Amiloidosis humanas y las respectivas proteínas amiloides implicadas, sus precursoras, y la localización de sus depósitos amiloides (cont.).

Proteína precursora	Proteína amiloide	Enfermedad/síndrome	Localización
Polipéptido amiloide de los islotes pancreáticos (IAPP, amilina)	AIAPP	Diabetes de tipo II	Páncreas
Prolactina	APro	Prolactinomas de glándula pituitaria	Glándula pituitaria
ABriPP/ADanPP	ABri/ADan	Demencia familiar de tipo británico y danés	Cerebro
Proteína priónica y variantes	APrP	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, insomnio familiar letal, kuru	Cerebro
Proteína receptora de andrógeno		Amioatrofia bulboespinal o enfermedad de Kennedy	Cerebro, saco escrotal, dermis, riñón, corazón, testículos, médula espinal
Queratoepitelina	AKer	Amiloidosis localizada familiar, distrofia corneal	Córnea
Proteína tau	Tau	Enfermedad de Alzheimer, demencia frontotemporal, enfermedad de Pick, parálisis progresiva supranuclear	Cerebro
Transtiretina natural	ATTR	Amiloidosis sistémica senil, amiloidosis cardíaca senil	Varios órganos y tejidos, incluyendo corazón, glándulas, arterias, huesos, hígado, tracto digestivo, etc.
Variantes de transtiretina	ATTR	Polineuropatía amiloidótica familiar de tipo I	Sistema nervioso periférico y autónomo, corazón, ojos
β_2 -microglobulina	A β 2M	Amiloidosis asociada a diálisis	Sistema musculoesquelético, sistema nervioso periférico, tracto gastrointestinal, lengua, corazón, tracto urogenital
Quimiotaxina-2 derivada de células leucocitarias (LECT2)	ALECT2	Amiloidosis renal asociada a LECT2	Principalmente riñón
Proteína C del surfactante (SP-C)	ASPC	Enfermedad pulmonar difusa asociada a mutaciones de SP-C	Pulmón
Galectina 7	AGal7	Amiloidosis cutánea localizada	Piel
Corneodesmosina	ACor	Hipotricosis simple del cuero cabelludo	Epitelio cornificado y folículos pilosos
Proteína odontogena asociada a ameloblastos	AOAAP	Tumor odontogeno epitelial calcificante	Tumores odontógenos
Semenogelina 1	ASem1	Amiloidosis localizada de las vesículas seminales	Vesículas seminales
Enfurvitida	AEnf	Amiloidosis cutánea por inyección de enfurvitida	Iatrogénica

Figura 1. Estructura esquemática de una cadena de heparán sulfato (HS). Se representan las regiones NA (no sulfatadas), NA/NS (caracterizadas por portar grupos *N* sulfato y *N* acetilo) y NS (ricamente sulfatadas). Se representa la estructura de un disacárido característico de HS; hay que notar que los grupos enmarcados son susceptibles de portar grupos sulfatos.



tológicos con importantes consecuencias en la homeostasis tisular y en la reconstrucción de tejidos dañados [9,10].

Agregación proteica

Todas las fibras amiloides comparten ciertas características estructurales comunes a pesar de la considerable diversidad en las secuencias primarias de sus proteínas constitutivas. Los depósitos amiloides extraídos de los tejidos se componen típicamente de fibras no ramificadas ensambladas a partir de dos a tres filamentos (protofilamentos) enrollados entre sí. Estos filamentos son ricos en estructuras de tipo hoja (o lámina) plegada β que forman una estructura β cruzada (*cross-beta*) en la cual los filamentos individuales se organizan perpendicularmente al eje largo de la fibra por medio de enlaces paralelos [1,15]. En solución, la formación de la fibra amiloidea ocurre generalmente bajo un proceso de polimerización en dos fases; una primera fase de nucleación, llamada también fase de latencia (*lag phase*), y una segunda fase de extensión o polimerización (o fase de crecimiento) (Fig. 2). La etapa inicial de la formación de un núcleo implica la asociación lenta y reversible de monómeros. Se supone que la fase de latencia corresponde al tiempo necesario para que los 'núcleos' se formen. Este proceso es termodinámicamente desfavorable y constituye la etapa límite que define la velocidad del proceso de fibrilación. Una vez que un núcleo se ha formado, la adición de monómeros al núcleo llega a ser

termodinámicamente favorecida, y esto da lugar a una extensión rápida y a la formación de fibras amiloides [16]. En el modelo de conversión conformacional nucleada, se supone que se forman complejos oligoméricos esféricos que se convierten lentamente en fibras [17]. Estos oligómeros median la transición conformacional del polipéptido a partir de una estructura sin conformación a una conformación hoja plegada β , seguida de la formación del amiloide. Este mecanismo se ha propuesto para los péptidos amiloidógenos humanos, como el polipéptido IAPP y el péptido A β [18,19]. Otro mecanismo propuesto implica una conversión dirigida por un monómero en la cual su transición estructural de un estado nativo a un estado prefibrilar influye en otros monómeros nativos que experimentan la misma transición; esto provoca la formación de una estructura fibrilar amiloidea intermedia, que entonces puede crecer para formar la fibra [20] (Fig. 2). Actualmente, es difícil elegir cuál de los mecanismos propuestos interviene en patología, puesto que hay poca información disponible sobre las estructuras intermedias presentes en las vías de crecimiento amiloides *in vivo* [21]. Así, la trayectoria de la formación de las fibras comienza con precursores cinéticos prefibrilares, las protofibras o los oligómeros solubles intermediarios, los cuales presentan una tendencia intrínseca a organizarse y a formar estructuras fibrilares. El interés por estos intermediarios prefibrilares ha crecido, pues se han asociado a una mayor citotoxicidad que la de las fibras maduras, consideradas menos tóxicas o inofensivas [22]. Esto ha llevado a la idea de que la base molecular de las patologías amiloides puede estar relacionada con la aparición transitoria de los agregados prefibrilares. Sin embargo, el mecanismo específico por el cual estas especies parecen mediar sus efectos tóxicos aún no se entiende completamente. Numerosos trabajos han sugerido que los HS pueden participar en prácticamente todas las fases de formación de amiloides, y se han propuesto vías de crecimiento amiloides alternativas que compiten con la vía dependiente de nucleación y en las diferentes fases del proceso de agregación proteica [6,7,23,24].

Heparán sulfatos y amiloidosis

Varios estudios han demostrado que los procesos de agregación proteica se catalizan, aceleran o potencian, o las cinéticas de agregación se modifican, en presencia de moléculas polianiónicas, como la heparina y los HS [6,7,23,24]. La importancia de los

HS en la agregación de proteínas se ha documentado en varios casos. Por ejemplo, *in vitro*, la heparina estabiliza el estado agregado de la acilfosfatasa, modelo clásico para el estudio de la amiloidosis [25]. El amiloide sérico A es una proteína que produce agregados amiloides; los HS catalizan este proceso al promover la conversión de las proteínas nativas en amiloides [26]. Además, estudios recientes han demostrado que los HS inducen cambios en el proceso de agregación proteica, favoreciendo un camino paralelo más rápido [24]. Así, los HS han mostrado afectar a los procesos de fibrilación de proteínas, modificando considerablemente sus cinéticas de agregación *in vitro*.

In vivo, los órganos afectados por las amiloidosis son diversos; las amiloidosis del sistema nervioso central son las más conocidas, pero existen también amiloidosis sistémicas importantes que afectan a diferentes órganos (Tabla). La amiloidosis primaria es generalmente agresiva y afecta al riñón, el hígado, el aparato digestivo, las glándulas suprarrenales y el corazón. La amiloidosis secundaria es más limitada, y afecta al riñón, el hígado, el bazo y las glándulas suprarrenales. Por ejemplo, la amiloidosis asociada a diálisis, una enfermedad relativamente reciente, implica principalmente la agregación y depósito de la β_2 -microglobulina en tejidos osteoarticulares en donde el HSPG perlecano se acumula durante las fases tempranas de la enfermedad [27]. El examen cuidadoso de los tejidos afectados por trastornos amiloides, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, la diabetes del tipo II, la amiloidosis de cadena ligera y las enfermedades priónicas, entre otras, ha revelado la presencia en los depósitos amiloides de una cantidad significativa de HS [28-30]. Por otra parte, fuertes evidencias indican que estos polisacáridos desempeñan un papel activo favoreciendo la formación y la estabilización de las fibras amiloides en los tejidos enfermos [7,31].

Aunque diversas hipótesis se han propuesto para explicar los mecanismos por los cuales los HS podrían facilitar la formación de las fibras amiloides *in vivo*, hay aún muy poca información disponible, y el mecanismo exacto por el cual los HS aceleran la amiloidogénesis en los tejidos todavía está en discusión. En ese sentido, se ha presumido que los HS favorecen la nucleación, la agregación y la formación de fibras amiloides por intermedio de un mecanismo sustancialmente diferente al que ocurre en solución [32]. Los datos disponibles sugieren que los HS pueden a la vez influir y promover el plegamiento de polipéptidos formando estructuras pre-amiloides y actuar como base estructural para un autoensamblaje, aumentando así el número de se-

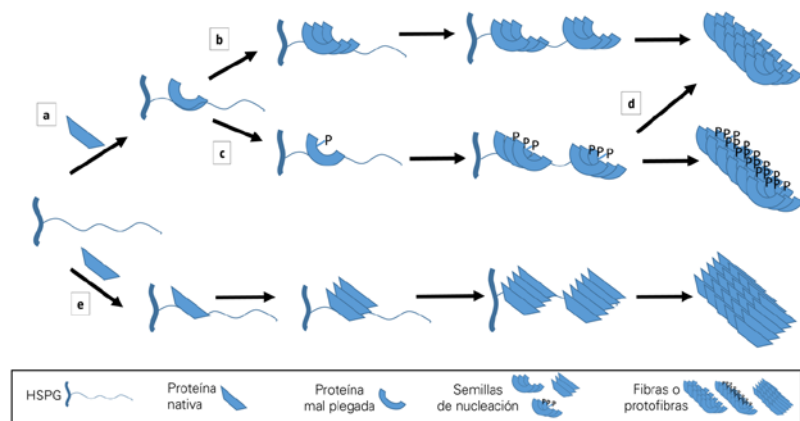
Figura 2. Esquematación del modelo de conversión conformacional de nucleación favorecido por los heparán sulfatos (HS) durante la cinética de formación de fibras amiloides. Este modelo en dos fases supone la formación inicial de complejos oligoméricos esféricos que se convierten lentamente en protofibras, seguida de la formación de fibras amiloides. Las cadenas de HS pueden participar al proceso de amiloidosis en la fase de latencia o nucleación, y en la fase de polimerización o de crecimiento. En la primera etapa permiten la formación de un núcleo de monómeros seguida por la segunda etapa que incluye una extensión rápida de protofibras y la formación de fibras amiloides [6,7,17,81].



millas de nucleación (Fig. 3). En las últimas etapas del proceso de amiloidosis, los HS podrían también catalizar la agregación lateral de pequeñas fibras promoviendo su insolubilidad y resistencia contra la proteólisis [23,33]. Estas y otras observaciones sugieren que los HS pueden efectivamente desempeñar un papel central en el proceso de amiloidosis *in vivo*. Sin embargo, sus efectos podrían ser sobre todo protectores, gracias a su implicación en la conversión de las partículas proteotóxicas solubles en fibras amiloides menos tóxicas [6]. Las diferentes posibles acciones de los HS durante la agregación proteica se resumen en la figura 3.

Aunque los HS son macromoléculas por definición extracelulares, es interesante notar que estos polisacáridos forman parte de la mayoría, si no de todos, los tipos de amiloides que se acumulan no solo fuera, sino también dentro de las células enfermas [4,7,31]. Debido a su conocida localización extracelular, los HS se descartaron por largo tiempo en la reflexión sobre la formación de agregados amiloides intracelulares, como los observados en las enfermedades de Alzheimer (ovillos neurofibrilares de tau) y de Parkinson (agregados de α -sinucleína) hasta la reciente demostración que revela que, en condición patológica, los HS se acumulan intracelularmente, en donde pueden interactuar con las proteínas propensas a la agregación [4]. Esta observación concuerda con previos estudios que muestran una acumulación de HS intracelulares en

Figura 3. Posibles mecanismos que implican los heparán sulfatos (HS) en la formación de fibras amiloides *in vivo*. Los HS pueden inducir un mal plegamiento (o conformación) de la proteína nativa (a), induciendo su nucleación y agregación (b), o permitiendo el ataque por cinasas responsables de la fosforilación anormal (c) y su agregación en su estado anormalmente fosforilado o en combinación con la proteína mal plegada (d). Los HS podrían también favorecer directamente el proceso de nucleación sin pasar por un estado de mal plegamiento (e), provocando directamente la formación de estructuras preamiloideas y aumentando así el número de semillas de nucleación que pueden actuar como base estructural para un autoensamblaje.



células sometidas a estrés [34,35]. Estas observaciones sugirieron que, *in vivo*, no sólo los HS extracelulares, sino también los intracelulares, pueden modificar las cinéticas de agregación de proteínas intracelulares y la estabilidad de los agregados amiloides. La distribución de diferentes tipos de HS generados por una biosíntesis específica en cada tejido o tipo de célula provoca la existencia de diferentes ambientes biológicos que pueden igualmente afectar la extensión y la distribución tisular de la deposición amiloidea *in vivo*.

Heparán sulfatos y enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es una patología fatal de evolución lenta que ataca el cerebro y principal causa de demencia en las personas mayores en el mundo; hasta hoy no se ha encontrado un tratamiento efectivo que permita evitar su aparición o detener su evolución [36]. La enfermedad se caracteriza por dos tipos de lesiones cerebrales, las placas seniles y los ovillos neurofibrilares, formados respectivamente de agregados de péptido A β o de proteína tau anormalmente fosforilada (P-tau) [37]. La acumulación del péptido A β en la matriz extracelular, o de P-tau en el interior de las neuronas, son eventos críticos en el desarrollo y evolución de

la enfermedad. Los HS se han asociado a estos agregados proteicos no sólo en los espacios extracelulares, sino igualmente en los intracelulares [4,28,38].

Heparán sulfatos y patología A β

La implicación de los HS en la agregación y formación de depósitos de péptidos A β en la enfermedad de Alzheimer fue sugerida por Snow et al [28], quienes encontraron estos polisacáridos en las placas amiloides de los cerebros afectados por la enfermedad. En los años siguientes, otros estudios mostraron la capacidad de los HSPG de interactuar con los péptidos A β y de inducir su agregación [38,39]. Los péptidos A β son fragmentos proteicos de principalmente 40 (A β 40) o 42 (A β 42) aminoácidos. Estos fragmentos resultan del corte secuencial de la proteína precursora de amiloide por la β -secretasa y la γ -secretasa, complejos enzimáticos que incluyen las presenilinas 1 y 2. La presencia de mutaciones autosómicas dominantes en los genes que codifican para la proteína precursora de amiloide, las presenilinas 1 o 2, causan la enfermedad de Alzheimer familiar (< 5% de casos). Un aumento en la proporción A β 42/A β 40 en el cerebro enfermo se ha asociado con la forma genética y precoz de la enfermedad. De acuerdo con estas observaciones, el péptido A β 42 presenta una cinética de agregación y una toxicidad más importante que el A β 40 [40].

Se ha documentado la importancia de los HS en la formación de los agregados amiloides A β . Por ejemplo, los ratones transgénicos que sobreexpresan la heparanasa, enzima que degrada los HS extracelulares, muestran una disminución significativa de placas amiloides A β , aunque la producción y la proporción de A β 40 y A β 42 no se altera [41]. Estructuralmente, ciertos estudios muestran que los residuos 12-18 (Ac-VHHQKLV-NH₂) en A β 40 y A β 42 constituyen el sitio de interacción con los HS [42]. Sin embargo, una interacción específica entre A β 42 y los HS parece participar en la ruptura de un puente salino existente entre la lisina 28 y la alanina 42 en este péptido [43]. En ausencia de la interacción con los HS, este puente estabiliza una estructura en forma de S formada por tres hojas β plegadas; su alteración por posibles interacciones con los HS provocaría la aceleración de la agregación [43]. Esto no ocurriría con el péptido A β 40, cuya estructura es de tipo pasador y está formada únicamente por dos hojas β plegadas, menos susceptibles al proceso de precipitación inducido por los HS, lo que justificaría una cinética de agregación diferente [43]. Concerniendo los HS, se ha mostrado que las secuencias con un alto contenido en grupos sulfato

colocalizan con los depósitos de A β 40 y de A β 42, mientras que los HS con bajo contenido en sulfatos solo interaccionan con las placas formadas por A β 40 [44]. Además, los grupos *N*- y 2-*O*-sulfatos en los HS parecen ser indispensables para su interacción con las fibras amiloides, mientras que la interacción con los monómeros A β requiere además la presencia de grupos 6-*O*-sulfato [45]. Así, se ha demostrado que las interacciones de los HS con el péptido A β afectan efectivamente a la estructura secundaria de este último, y que el contenido y la posición de los grupos sulfatos, así como la longitud de las secuencias sulfatadas, en las cadenas de HS pueden estar implicados en esos efectos [46]. Esto conforta la idea de que la estructura fina de los HS puede condicionar su interacción con los diferentes péptidos A β *in vivo* [47].

Dada la importancia que se ha dado a la formación del péptido A β y a su oligomerización y acumulación en forma de fibras amiloides durante el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, la eliminación de oligómeros solubles se ha considerado como blanco terapéutico para reducir la citotoxicidad de los péptidos A β , ya sea mediante la prevención de su formación o promoviendo su incorporación en fibras. En consecuencia, se han propuesto diversas estrategias terapéuticas dirigidas a prevenir la oligomerización, la formación de fibras o la eliminación de agregados fibrilares de A β . Sin embargo, aunque el efecto neuroprotector de diferentes GAG naturales o de sus análogos contra el efecto tóxico de los oligómeros A β se ha demostrado en cultivos de células neuronales [48-50], esta estrategia, al igual que otras basadas en el uso de moléculas anti-A β , anticuerpos anti-A β específicos u otras moléculas que mostraron inhibir eficazmente la formación y acumulación de oligómeros A β neurotóxicos y la formación de fibras amiloides, no ha logrado mostrar ninguna modificación en la evolución de la patología [51]. Esto sugiere que la formación del péptido A β , su oligomerización, agregación o acumulación, así como la toxicidad de las partículas proteopáticas derivadas, no parecen ser los elementos centrales responsables de la patología, y pone en duda el papel hasta ahora considerado central de la cascada amiloide en la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, otros eventos, como los que implican la proteína tau, pueden ser los factores críticos en el desarrollo de la enfermedad.

Heparán sulfatos y patología tau

La proteína tau es una proteína asociada a los microtúbulos responsables de la formación y de la es-

tabilidad del citoesqueleto neuronal y del transporte axonal; la tau contribuye a su dinamismo, a su estabilidad y a su función [52]. En condición fisiológica, la tau es una proteína altamente soluble que no muestra prácticamente ninguna tendencia a agregarse. Sin embargo, en el cerebro de los pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer, esta proteína se encuentra fuertemente agregada bajo una forma anormalmente fosforilada (P-tau). En el cerebro enfermo, estos agregados de tau forman los filamentos helicoidales apareados que se acumulan en el interior de la célula neuronal, en donde evolucionan hasta formar ovillos neurofibrilares, característicos de la enfermedad de Alzheimer y de otras taupatías [52]. *In vitro*, el proceso de agregación de tau no es posible sin la incorporación de moléculas polianiónicas, como la heparina o los HS. El entorno aniónico necesario para inducir la agregación de tau *in vitro* sugiere que las moléculas cargadas negativamente, como los HS, pueden desempeñar un papel crucial en la maduración de las fibras de tau *in vivo* y, por lo tanto, podrían ser un determinante de la formación de los agregados de tau en el cerebro enfermo [53]. Esta suposición se encuentra reforzada por los estudios de Snow et al, que muestran que en las células neuronales enfermas los ovillos neurofibrilares colocalizan con HS altamente sulfatados [28,38]. Los ovillos neurofibrilares están formados de P-tau, la cual resulta de la fosforilación de tau por una batería de cinasas [54] cuyas actividades *in vitro* requieren la presencia de heparina [4,55]. Esto sugiere que en el cerebro con enfermedad de Alzheimer, los HS presentes en el espacio intracelular de las neuronas pueden participar no sólo en los procesos de agregación, sino también de fosforilación anormal de tau [4]. Este es un aspecto importante que hay que considerar, pues recientemente la agregación de tau o de P-tau en el cerebro enfermo constituye una de las principales dianas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y de otras taupatías [56].

La participación de los HS en los procesos de agregación o de fosforilación de tau *in vivo* ha sido un sujeto poco abordado. Sin embargo, las constantes cinéticas de la formación de fibras de tau en presencia y en ausencia de heparina se han evaluado *in vitro* [57]. Esos estudios muestran que la heparina puede participar en el proceso de agregación durante las primeras etapas de nucleación (fase de latencia), interaccionando con dos moléculas de tau y formando así un dímero propenso a la agregación y capaz de generar fibras cortas y finas, posiblemente de naturaleza tóxica. En otro trabajo, la interacción de tau con la heparina se estudió usando el fragmen-

to tau (244-372) y una heparina de 7 kDa. Las cinéticas de fibrilación mostraron que la heparina en exceso retarda la fase *lag* [58]. Aunque la importancia de grupos 3-O-sulfato en la cadena de la heparina se mostró en modelos celulares y animales [4], un trabajo reciente utilizando fragmentos de tau y heparinas modificadas mostró que los grupos 6-O-sulfato en los HS son necesarios para establecer la interacción, lo que sugiere un papel importante de esta sulfatación precisa en la interacción HS-tau *in vivo*, y posiblemente en su agregación [59].

Aparte del papel que los HS parecen desempeñar en los procesos de fosforilación y de agregación de tau *in vivo*, estos polisacáridos mostraron un papel central en el proceso de propagación de partículas proteopáticas de tau de una célula a otra, fenómeno conocido como *spreading*. La existencia de este proceso de propagación de partículas proteopáticas de tau entre células y regiones en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer se dedujo a partir de estudios que mostraron que, al inicio, la taupatía se detecta en ciertas regiones del cerebro y que, al avanzar la enfermedad, la taupatía se extiende a otras regiones. Aunque aún no se sabe exactamente cómo se produce esta propagación, Diamond et al han propuesto una hipótesis en la que el mecanismo sería similar al que opera durante la propagación de los priones [60]. La implicación de los HS en el proceso de *spreading* se demostró en estudios recientes en los que mostramos que los HSPG presentes en la membrana celular desempeñan un papel central en la internalización de los agregados de tau por las células sanas, y que esta internalización es mediada por la interacción de las cadenas de HS con partículas proteopáticas de tau [61]. Más recientemente también mostramos que, en las células enfermas, los HS se localizan intracelularmente, e interaccionan con la tau nativa induciendo su fosforilación anormal y posiblemente su agregación [4]. Estos eventos pueden tener importantes implicaciones en la comprensión de los mecanismos celulares relacionados con el mal plegamiento de tau, su agregación y propagación.

Glicosaminoglicanos y enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson es un tipo de trastorno del movimiento que ocurre cuando las neuronas dopaminérgicas no producen suficiente dopamina debido a su entrada en un proceso de muerte neuronal [62]. Algunos casos son genéticos, pero la mayoría se considera esporádica. Patológicamente, la

enfermedad de Parkinson está caracterizada por la presencia de agregados proteicos en las células neuronales, que han sido llamados cuerpos de Lewy. Los cuerpos de Lewy están principalmente formados por una proteína, la α -sinucleína, anormalmente fibrilada [63]. Aunque los papeles fisiológicos de esta proteína no se han clarificado, se ha mostrado su implicación en la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson y de otras patologías llamadas α -sinucleinopatías [64]. Así, los cuerpos de Lewy se han observado en modelos transgénicos en donde una mutación en el gen de la α -sinucleína reproduce la forma dominante autosómica observada en las formas hereditarias de la enfermedad de Parkinson [63]. Sin embargo, estos cuerpos existen también en las formas esporádicas de la enfermedad en las que no se ha identificado ninguna mutación y, por lo tanto, el origen de la agregación de α -sinucleína sigue sin determinarse.

La α -sinucleína es una proteína de 14 kDa muy conservada y abundante en las neuronas de diversas regiones del cerebro, notablemente en el compartimento presináptico. En el humano se conocen tres isoformas de α -sinucleína, de 112, 126 o 140 aminoácidos, producidas por corte y empalme alternativo [65,66]. La región central de la α -sinucleína, formada por los residuos 61-95, comprende una zona altamente propensa a la agregación, mientras que el dominio C-terminal (residuos 96-140) protege de la agregación. Este dominio contiene tres residuos de tirosina altamente conservados y considerados como la firma de la familia sinucleína. La α -sinucleína posee una gran plasticidad estructural que le permite adoptar diversas conformaciones, y una gran tendencia a desplegarse y a agregarse, lo que le permite formar oligómeros profibrilares y fibras amiloides [66].

La α -sinucleína es el componente principal de los cuerpos de Lewy [63]. Sin embargo, se ha encontrado también que otras moléculas, como los GAG, y particularmente los HS, están presentes en estos agregados proteicos de α -sinucleína, lo cual sugiere que los HS pueden desempeñar un rol en el proceso patológico de agregación de esta proteína [67]. Dependiendo de su nivel de sulfatación y de la posición de los grupos sulfatos, los GAG han mostrado estimular diferencialmente la formación de fibras de la α -sinucleína por intermedio de interacciones con la secuencia consenso KTKEGV en el dominio N-terminal de la proteína [67]. Aunque *in vitro* e *in celulo* los GAG endógenos aceleran la cinética de agregación de esta proteína [34], su participación en la agregación de α -sinucleína *in vivo* es aún objeto de controversia. En 2004, van Horssen

et al, utilizando técnicas inmunohistoquímicas, no lograron detectar HSPG en los cuerpos de Lewy en tejidos de cerebro afectados por la enfermedad de Parkinson [68]. Sin embargo, esto lo contradijeron Liu et al, quienes en 2005 mostraron que la HSPG agrina colocaliza con la α -sinucleína en los cuerpos de Lewy de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra *pars compacta* en el cerebro de sujetos con enfermedad de Parkinson [69]. Esta discrepancia puede explicarse por la utilización de anticuerpos anti-HS poco específicos. Por otra parte, se ha mostrado un efecto indirecto de los HS sobre la cinética de agregación y la toxicidad de la α -sinucleína a partir de su interacción con la enzima glucolítica gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) [70]. Mediante una interacción específica con esta enzima, la heparina es capaz de inducir, *in vitro*, un cambio conformacional del homotetrámero constituyente de la GAPDH, promoviendo su agregación. Ciertos intermediarios tempranos en este proceso de agregación, clasificados como protofibras de acuerdo con sus características estructurales, fueron capaces de modular la cinética de agregación de la α -sinucleína, reduciendo la fase de latencia y favoreciendo la rápida formación de fibras amiloides. Aunque estas observaciones sugieren la posible participación de los HS en el proceso de agregación intracelular de la α -sinucleína en la enfermedad de Parkinson, se necesitan aún muchos otros estudios para mejorar el conocimiento sobre el papel de los GAG en general, y de los HS en particular, en esta patología.

Heparán sulfatos y enfermedades priónicas

La proteína prion es una glicoproteína implicada en un tipo de enfermedades conocidas como encefalopatías espongiiformes transmisibles, también llamadas enfermedades priónicas [71]. Las encefalopatías espongiiformes transmisibles son enfermedades neurodegenerativas mortales que pueden desarrollarse en la mayoría de las especies de mamíferos. Incluyen la tembladera ovina, la encefalopatía espongiiforme bovina, el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y su variante iatrogénica en el humano [72]. Esta última es una forma infecciosa que se puede transmitir a través de trasplantes de órganos o tejidos, o por ingestión de productos biológicos contaminados. Actualmente, no hay tratamiento eficaz para este tipo de patología.

El evento clave en la biología de las enfermedades priónicas es la conversión de la proteína prion

normal, o proteína prion celular (PrPc), presente en la membrana externa de las células, en una forma de conformación anormal (PrPres). El cambio de conformación PrPc en PrPres provoca la agregación y acumulación patológica de la forma mal plegada y resistente al ataque de proteasas. Los agregados de PrPres se llaman priones [71]. Varios estudios han demostrado múltiples estados de agregación (oligoméricos, prefibrilares y fibrilares) de la PrPres y varias arquitecturas de las fibras formadas. Sin embargo, ambos, los oligómeros solubles y las fibras insolubles, se originan a partir de la forma mal conformada de la proteína y, aunque las fibras son características de la enfermedad, las especies más infecciosas parecen ser sus formas oligoméricas. Se han revisado los mecanismos subyacentes a la agregación de la proteína prion y la relevancia de cada forma agregada en los diferentes tipos de enfermedades priónicas [73].

La conversión de la PrPc en PrPres ocurre en el espacio extracelular, en proximidad de la membrana celular, y requiere la presencia de HSPG en la membrana [74]. Los priones así generados se agregan y forman las placas amiloides características de la enfermedad. Como otras placas amiloides, los amiloides de las enfermedades priónicas contienen GAG [28]. De acuerdo con un rol posible de los HSPG en la transconformación de la PrPc en PrPres, ciertos polianiones polisulfatados han demostrado tener efectos profilácticos en la progresión de la neurodegeneración en modelos celulares y animales de la patología, presumiblemente gracias a su capacidad de unirse a los priones y de inhibir así su interacción con los HSPG en la membrana de la célula [74]. Ciertos polisacáridos aniónicos, particularmente la heparina, algunos HS miméticos y el polisulfato de pentosano, han demostrado inhibir directamente la fibrilación de PrPres *in vivo* e *in vitro* [75,76]. Es interesante remarcar que, dependiendo de la concentración usada, por un lado, la heparina protege contra la agregación de la PrPres, y, por otro lado, la induce [77,78]. Esto aclaró ciertos conflictos anteriores sobre el efecto anti o proamiloidógeno de la heparina [79], y mostró que su efecto inhibitorio o inductor de la agregación depende de la concentración utilizada. Éste también puede ser el caso de los GAG endógenos o de los análogos propuestos para el tratamiento de este tipo de enfermedades [80,81]. Estas observaciones indican que, además del grado de sulfatación, la concentración de los GAG en los diferentes compartimentos celulares pueden modificar de manera diferente los procesos de agregación de proteínas amiloidógenas.

Conclusión

Los GAG sulfatados, particularmente los HS, han mostrado que modifican las cinéticas de agregación de proteínas implicadas en los procesos neurodegenerativos, incluyendo las enfermedades de Alzheimer, de Parkinson y priónicas. Formas endógenas de estos polisacáridos complejos se han encontrado asociadas a los agregados proteicos característicos de estas enfermedades en las regiones del cerebro afectadas. *In vitro*, la posición y la cantidad de sulfatos en las cadenas de HS han mostrado influir en las cinéticas de agregación, mientras que sus concentraciones locales parecen influir en sus papeles anti o proamiloidógenos. Aunque algunas pistas sobre la importancia de la estructura de los HS en los procesos de agregación comienzan a surgir, aún no está claro si la estructura fina de estos polisacáridos complejos influye de una manera central en los procesos celulares que conllevan a la agregación patológica *in vivo*. Sin embargo, la mayor parte de los estudios realizados a fin de comprender el posible papel de los GAG y particularmente de los HS en estas patologías ha considerado principalmente la presencia de estos azúcares en el espacio extracelular y en la membrana celular, y muy pocos estudios comienzan a considerar su importancia en el espacio intracelular en caso de patología [4]. Cabe imaginar que los HS estructuralmente alterados en los procesos neurodegenerativos pueden promover o inhibir la agregación de las proteínas amiloidógenas y alterar su acumulación o toxicidad. Evidentemente, la caracterización de la estructura de los HS y CS endógenos en condiciones normales y patológicas es crucial para investigar sus implicaciones en los procesos patológicos. Avances en esta área aumentarán la comprensión de los mecanismos moleculares que rigen los diferentes tipos de enfermedades neurodegenerativas y otras amiloidosis.

Bibliografía

- Nelson R, Sawaya MR, Balbirnie M, Madsen AO, Riekel C, Grothe R, et al. Structure of the cross- β spine of amyloid-like fibrils. *Nature* 2005; 435: 773-8.
- Dobson CM. The amyloid phenomenon and its links with human disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017; 9. pii: a023648.
- Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* 2006; 75: 333-66.
- Sepúlveda-Díaz JE, Alavi-Naini SM, Huynh MB, Ouidja MO, Yanicostas C, Chantepie S, et al. HS3ST2 expression is critical for the abnormal phosphorylation of tau in Alzheimer's disease-related tau pathology. *Brain* 2015; 138: 1339-54.
- Goedert M. Neurodegeneration. Alzheimer's and Parkinson's diseases: the prion concept in relation to assembled Abeta, tau, and alpha-synuclein. *Science* 2015; 349: 1255-55.
- Iannuzzi C, Irace G, Sirangelo I. The effect of glycosaminoglycans (GAG) on amyloid aggregation and toxicity. *Molecules* 2015; 20: 2510-28.
- Papy-Garcia D, Christophe M, Huynh MB, Fernando S, Ludmilla S, Sepúlveda-Díaz JE, et al. Glycosaminoglycans, protein aggregation and neurodegeneration. *Curr Protein Pept Sci* 2011; 12: 258-68.
- Li JP, Kusche-Gullberg M. heparan sulfate: biosynthesis, structure, and function. *Int Rev Cell Mol Biol* 2016; 325: 215-73.
- Gandhi NS, Mancera RL. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem Biol Drug Des* 2008; 72: 455-82.
- Kitagawa H. Biosynthesis of the sulfated glycosaminoglycans in relation to human diseases. *Seikagaku* 2004; 76: 1175-90.
- Kisilevsky R, Szarek WA, Ancsin JB, Elimova E, Marone S, Bhat S, et al. Inhibition of amyloid A amyloidogenesis *in vivo* and *in tissue culture* by 4-deoxy analogues of peracetylated 2-acetamido-2-deoxy-alpha- and beta-D-glucose: implications for the treatment of various amyloidoses. *Am J Pathol* 2004; 164: 2127-37.
- Li JP, Galvis ML, Gong F, Zhang X, Zcharia E, Metzger S, et al. *In vivo* fragmentation of heparan sulfate by heparanase overexpression renders mice resistant to amyloid protein A amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 6473-7.
- Sadir R, Imberty A, Baleux F, Lortat-Jacob H. Heparan sulfate/heparin oligosaccharides protect stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 against proteolysis induced by CD26/dipeptidyl peptidase IV. *J Biol Chem* 2004; 279: 43854-60.
- Gupta-Bansal R, Frederickson RC, Brunden KR. Proteoglycan-mediated inhibition of A beta proteolysis. A potential cause of senile plaque accumulation. *J Biol Chem* 1995; 270: 18666-71.
- Makin OS, Serpell LC. Examining the structure of the mature amyloid fibril. *Biochem Soc Trans* 2002; 30: 521-5.
- Kelly JW. The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. *Curr Opin Struct Biol* 1998; 8: 101-6.
- Serio TR, Cashikar AG, Kowal AS, Sawicki GJ, Moslehi JJ, Serpell L, et al. Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. *Science* 2000; 289: 1317-21.
- Lee J, Culyba EK, Powers ET, Kelly JW. Amyloid-beta forms fibrils by nucleated conformational conversion of oligomers. *Nat Chem Biol* 2011; 7: 602-9.
- Wei L, Jiang P, Xu W, Li H, Zhang H, Yan L, et al. The molecular basis of distinct aggregation pathways of islet amyloid polypeptide. *J Biol Chem* 2011; 286: 6291-300.
- Gibson TJ, Murphy RM. Inhibition of insulin fibrillogenesis with targeted peptides. *Protein Sci* 2006; 15: 1133-41.
- Bernacki JP, Murphy RM. Model discrimination and mechanistic interpretation of kinetic data in protein aggregation studies. *Biophys J* 2009; 96: 2871-87.
- Cecchi C, Stefani M. The amyloid-cell membrane system. The interplay between the biophysical features of oligomers/fibrils and cell membrane defines amyloid toxicity. *Biophys Chem* 2013; 182: 30-43.
- Ancsin JB. Amyloidogenesis: historical and modern observations point to heparan sulfate proteoglycans as a major culprit. *Amyloid* 2003; 10: 67-79.
- Motamedi-Shad N, Monsellier E, Torrasa S, Relini A, Chiti F. Kinetic analysis of amyloid formation in the presence of heparan sulfate: faster unfolding and change of pathway. *J Biol Chem* 2009; 284: 29921-34.
- Motamedi-Shad N, Monsellier E, Chiti F. Amyloid formation by the model protein muscle acylphosphatase is accelerated by heparin and heparan sulphate through a scaffolding-based mechanism. *J Biochem* 2009; 146: 805-14.
- Elimova E, Kisilevsky R, Ancsin JB. Heparan sulfate promotes the aggregation of HDL-associated serum amyloid A: evidence for a proamyloidogenic histidine molecular switch. *FASEB J* 2009; 23: 3436-48.
- Naiki H, Nagai Y. Molecular pathogenesis of protein misfolding diseases: pathological molecular environments versus quality control systems against misfolded proteins. *J Biochem* 2009; 146: 751-6.

28. Snow AD, Wight TN, Nochlin D, Koike Y, Kimata K, DeArmond SJ, et al. Immunolocalization of heparan sulfate proteoglycans to the prion protein amyloid plaques of Gerstmann-Strausler syndrome, Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie. *Lab Invest* 1990; 63: 601-11.
29. Young ID, Ailles L, Narindrasorasak S, Tan R, Kisilevsky R. Localization of the basement membrane heparan sulfate proteoglycan in islet amyloid deposits in type II diabetes mellitus. *Arch Pathol Lab Med* 1992; 116: 951-4.
30. Hernández F, Pérez M, Lucas JJ, Ávila J. Sulfo-glycosaminoglycan content affects PHF-tau solubility and allows the identification of different types of PHFs. *Brain Res* 2002; 935: 65-72.
31. Díaz-Nido J, Wandosell F, Ávila J. Glycosaminoglycans and beta-amyloid, prion and tau peptides in neurodegenerative diseases. *Peptides* 2002; 23: 1323-32.
32. Zhu M, Souillac PO, Ionescu-Zanetti C, Carter SA, Fink AL. Surface-catalyzed amyloid fibril formation. *J Biol Chem* 2002; 277: 50914-22.
33. McLaurin J, Franklin T, Zhang X, Deng J, Fraser PE. Interactions of Alzheimer amyloid-beta peptides with glycosaminoglycans effects on fibril nucleation and growth. *Eur J Biochem* 1999; 266: 1101-10.
34. Lehri-Boufala S, Ouidja MO, Barbier-Chassefiere V, Henault E, Raisman-Vozari R, Garrigue-Antar L, et al. New roles of glycosaminoglycans in alpha-synuclein aggregation in a cellular model of Parkinson disease. *PLoS One* 2015; 10: e0116641.
35. Yue XL, Lehri S, Li P, Barbier-Chassefiere V, Petit E, Huang QF, et al. Insights on a new path of pre-mitochondrial apoptosis regulation by a glycosaminoglycan mimetic. *Cell Death Differ* 2009; 16: 770-81.
36. Scheltens P, Blennow K, Breteler MM, De Strooper B, Frisoni GB, Salloway S, et al. Alzheimer's disease. *Lancet* 2016; 388: 505-17.
37. García-Ribas G, López-Sendón Moreno JL, García-Caldentey J. Biomarcadores en la enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol* 2014; 58: 308-17.
38. Snow AD, Sekiguchi R, Nochlin D, Fraser P, Kimata K, Mizutani A, et al. An important role of heparan sulfate proteoglycan (Perlecan) in a model system for the deposition and persistence of fibrillar A beta-amyloid in rat brain. *Neuron* 1994; 12: 219-34.
39. Castillo GM, Ngo C, Cummings J, Wight TN, Snow AD. Perlecan binds to the beta-amyloid proteins (A beta) of Alzheimer's disease, accelerates A beta fibril formation, and maintains A beta fibril stability. *J Neurochem* 1997; 69: 2452-65.
40. Bitan G, Kirkitadze MD, Lomakin A, Vollers SS, Benedek GB, Teplow DB. Amyloid beta-protein (A beta) assembly: A beta 40 and A beta 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 330-5.
41. Jendresen CB, Cui H, Zhang X, Vlodayvsky I, Nilsson LN, Li JP. Overexpression of heparanase lowers the amyloid burden in amyloid- β precursor protein transgenic mice. *J Biol Chem* 2015; 290: 5053-64.
42. Nguyen K, Rabenstein DL. Interaction of the heparin-binding consensus sequence of β -amyloid peptides with heparin and heparin-derived oligosaccharides. *J Phys Chem B* 2016; 120: 2187-97.
43. Rodríguez RA, Chen LY, Plascencia-Villa G, Perry G. Elongation affinity, activation barrier, and stability of A β 42 oligomers/fibrils in physiological saline. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 487: 444-9.
44. Zhang GL, Zhang X, Wang XM, Li JP. Towards understanding the roles of heparan sulfate proteoglycans in Alzheimer's disease. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 516028.
45. Lindahl B, Westling C, Giménez-Gallego G, Lindahl U, Salmivirta M. Common binding sites for beta-amyloid fibrils and fibroblast growth factor-2 in heparan sulfate from human cerebral cortex. *J Biol Chem* 1999; 274: 30631-5.
46. Madine J, Clayton JC, Yates EA, Middleton DA. Exploiting a (13)C-labelled heparin analogue for in situ solid-state NMR investigations of peptide-glycan interactions within amyloid fibrils. *Org Biomol Chem* 2009; 7: 2414-20.
47. Bruinsma IB, Te Riet L, Gevers T, Ten Dam GB, Van Kuppevelt TH, David G, et al. Sulfation of heparan sulfate associated with amyloid-beta plaques in patients with Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2010; 119: 211-20.
48. Woods AG, Cribbs DH, Whittemore ER, Cotman CW. Heparan sulfate and chondroitin sulfate glycosaminoglycan attenuate beta-amyloid(25-35) induced neurodegeneration in cultured hippocampal neurons. *Brain Res* 1995; 697: 53-62.
49. Bravo R, Arimón M, Valle-Delgado JJ, García R, Durany N, Castel S, et al. Sulfated polysaccharides promote the assembly of amyloid beta(1-42) peptide into stable fibrils of reduced cytotoxicity. *J Biol Chem* 2008; 283: 32471-83.
50. Bergamaschini L, Rossi E, Storini C, Pizzimenti S, Distaso M, Perego C, et al. Peripheral treatment with enoxaparin, a low molecular weight heparin, reduces plaques and beta-amyloid accumulation in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2004; 24: 4181-6.
51. Armstrong RA. A critical analysis of the 'amyloid cascade hypothesis'. *Folia Neuropathol* 2014; 52: 211-25.
52. Guo T, Noble W, Hanger DP. Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol* 2017; 133: 665-704.
53. Konno T, Oiki S, Hasegawa K, Naiki H. Anionic contribution for fibrous maturation of protofibrillar assemblies of the human tau repeat domain in a fluoroalcohol solution. *Biochemistry* 2004; 43: 13613-20.
54. Martin L, Latypova X, Wilson CM, Magnaudeix A, Perrin ML, Yardin C, et al. Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 2013; 12: 289-309.
55. Paudel HK, Li W. Heparin-induced conformational change in microtubule-associated protein Tau as detected by chemical cross-linking and phosphopeptide mapping. *J Biol Chem* 1999; 274: 8029-38.
56. Medina M, Ávila J. New perspectives on the role of tau in Alzheimer's disease. Implications for therapy. *Biochem Pharmacol* 2014; 88: 540-7.
57. Ramachandran G, Udgaonkar JB. Understanding the kinetic roles of the inducer heparin and of rod-like protofibrils during amyloid fibril formation by Tau protein. *J Biol Chem* 2011; 286: 38948-59.
58. Zhu HL, Fernández C, Fan JB, Shewmaker F, Chen J, Minton AP, et al. Quantitative characterization of heparin binding to Tau protein: implication for inducer-mediated tau filament formation. *J Biol Chem* 2010; 285: 3592-9.
59. Zhao J, Huvent I, Lippens G, Eliezer D, Zhang A, Li Q, et al. Glycan determinants of heparin-tau interaction. *Biophys J* 2017; 112: 921-32.
60. Frost B, Diamond MI. Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2010; 11: 155-9.
61. Holmes BB, DeVos SL, Kfoury N, Li M, Jacks R, Yanamandra K, et al. Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: E3138-47.
62. Przedborski S. The two-century journey of Parkinson disease research. *Nat Rev Neurosci* 2017; 18: 251-9.
63. Nussbaum RL. The identification of alpha-synuclein as the first Parkinson disease gene. *J Parkinsons Dis* 2017; 7 (Suppl 1): S45-51.
64. Bourdenx M, Dehay B, Bezdard E. Down-regulating alpha-synuclein for treating synucleopathies. *Mov Disord* 2014; 29: 1463-5.
65. Beyer K. Alpha-synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers. *Acta Neuropathol* 2006; 112: 237-51.
66. Uversky VN. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J Neurochem* 2007; 103: 17-37.
67. Cohlberg JA, Li J, Uversky VN, Fink AL. Heparin and other glycosaminoglycans stimulate the formation of amyloid fibrils from alpha-synuclein in vitro. *Biochemistry* 2002; 41: 1502-11.
68. Van Horsen J, De Vos RA, Steur EN, David G, Wesseling P, De Waal RM, et al. Absence of heparan sulfate proteoglycans in Lewy bodies and Lewy neurites in Parkinson's disease brains. *J Alzheimers Dis* 2004; 6: 469-74.
69. Liu IH, Uversky VN, Munishkina LA, Fink AL, Halfter W, Cole GJ. Agrin binds alpha-synuclein and modulates alpha-synuclein fibrillation. *Glycobiology* 2005; 15: 1320-31.

70. Torres-Bugeau CM, Ávila CL, Raisman-Vozari R, Papy-García D, Itri R, Barbosa LR, et al. Characterization of heparin-induced glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase early amyloid-like oligomers and their implication in alpha-synuclein aggregation. *J Biol Chem* 2012; 287: 2398-409.
71. Annus A, Csati A, Vecsei L. Prion diseases: new considerations. *Clin Neurol Neurosurg* 2016; 150: 125-32.
72. Casadevall-Codina T, Guerrero-Castaño C, Espada-Oliván F, Ruscalleda-Morell N, Acosta-Peña AM, Cuenca-Luque R. Afectación de la segunda motoneurona y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. *Rev Neurol* 2016; 63: 238-40.
73. Wang G, Wang M, Li C. The unexposed secrets of prion protein oligomers. *J Mol Neurosci* 2015; 56: 932-7.
74. Rouvinski A, Karniely S, Kounin M, Moussa S, Goldberg MD, Warburg G, et al. Live imaging of prions reveals nascent PrP^{Sc} in cell-surface, raft-associated amyloid strings and webs. *J Cell Biol* 2014; 204: 423-41.
75. Larramendy-Gozalo C, Barret A, Daugeos E, Mathieu E, Antonangeli L, Riffet C, et al. Comparison of CR36, a new heparan mimetic, and pentosan polysulfate in the treatment of prion diseases. *J Gen Virol* 2007; 88: 1062-7.
76. Ouidja MO, Petit E, Kerros ME, Ikeda Y, Morin C, Carpentier G, et al. Structure-activity studies of heparan mimetic polyanions for anti-prion therapies. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 363: 95-100.
77. Fontaine SN, Brown DR. Mechanisms of prion protein aggregation. *Protein Pept Lett* 2009; 16: 14-26.
78. Muras AG, Hajj GN, Ribeiro KB, Nomizo R, Nonogaki S, Chammas R, et al. Prion protein ablation increases cellular aggregation and embolization contributing to mechanisms of metastasis. *Int J Cancer* 2009; 125: 1523-31.
79. Cortijo-Arellano M, Ponce J, Durany N, Cladera J. Amyloidogenic properties of the prion protein fragment PrP(185-208): comparison with Alzheimer's peptide Abeta(1-28), influence of heparin and cell toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 368: 238-42.
80. Bergamaschini L, Rossi E, Vergani C, De Simoni MG. Alzheimer's disease: another target for heparin therapy. *Sci World J* 2009; 9: 891-908.
81. Quittot N, Sebastiao M, Bourgault S. Modulation of amyloid assembly by glycosaminoglycans: from mechanism to biological significance. *Biochem Cell Biol* 2017; 95: 329-37.

Heparan sulphates, amyloidosis and neurodegeneration

Introduction. A number of neurodegenerative disorders have been linked directly to the accumulation of amyloid fibres. These fibres are made up of proteins or peptides with altered structures and which join together *in vivo* in association with heparan sulphate-type polysaccharides.

Aims. To examine the most recent concepts in the biology of heparan sulphates and their role in the aggregation of the peptide Abeta, of tau protein, of alpha-synuclein and of prions. The study also seeks to analyse their implications in neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's disease and prion diseases.

Development. *In vitro*, heparan sulphates have played an important role in the process of oligomerisation and fibrillation of amyloidogenic proteins or peptides, in the stabilisation of these bodies and their resistance to proteolysis, thereby participating in the formation of a wide range of amyloid fibres. Heparan sulphates have also been related to the internalisation of pro-amyloid fibres during the process of intercellular propagation (spreading), which is considered to be crucial in the development of proteinopathies, the best example of which is Alzheimer's disease.

Conclusion. This study suggests that the fine structures of heparan sulphates, their localisation in cells and tissues, together with their local concentration, may regulate the amyloidosis processes. The advances made in the understanding of this area of glyconeurobiology will make it possible to improve the understanding of the cell and molecular mechanisms underlying the neurodegenerative process.

Key words. Abeta. Alpha-synuclein. Alzheimer's disease. Glycosaminoglycans. Heparan sulphates. Neurodegeneration. Parkinson's disease. Prion. Protein aggregation. Tau protein.