

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2022.12.10-15>

## Исследование функций белка VPS33A при мукополисахаридоз-плюс синдроме

Васильев Ф.Ф.<sup>1</sup>, Софронова В.М.<sup>1,2</sup>, Максимова Н.Р.<sup>1</sup>, Каваками Ю.<sup>2</sup>, Отомо Т.<sup>2</sup>

1 – ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова»  
677000, г. Якутск, Россия, ул. Белинского, д. 58

2 – Медицинская школа Кавасаки  
701-0192, г. Курасики, Япония

Ранее нами было выявлено новое заболевание из группы наследственных болезней обмена веществ с аутосомно-рецессивным типом наследования – мукополисахаридоз-плюс синдром (МПСПС). В результате проведенного полноэкзомного секвенирования была установлена патогенная гомозиготная мутация p.R498W в гене VPS33A. Целью настоящего исследования являлось изучение влияния мутации p.R498W в гене VPS33A на уровень белка и его функции. Клеточная модель заболевания была сгенерирована методом Crispr-Cas9. Исследование активности аутофагии проводилось путем анализа различий в количестве маркера аутофагосом LC3-II между образцами в присутствии или отсутствии ингибитора лизосом бафиломицина А1. Уровень эндоцитоза был определен при исследовании деградации рецепторов EGF.

Было выявлено снижение уровня белка VPS33A в клеточных линиях с мутацией p.R498W в гетерозиготном и гомозиготном состоянии до ~43% и ~25%, соответственно. Мы выявили, что мутация p.R498W не оказывает влияния на основные известные функции белка VPS33A – эндоцитоз и аутофагию. Интенсивность флуоресценции в мутантных клетках была значительно повышена в сравнении с контролем, что свидетельствовало о смещении pH лизосом в кислую сторону. Повреждение домена 2-2, в котором расположена мутация p.R498W, приводило к дисфункции белка VPS33A. Фундаментальная значимость исследования обусловлена необходимостью расшифровки механизмов развития данного заболевания с целью поиска подходов к адекватной терапии.

**Ключевые слова:** мукополисахаридоз-плюс синдром, ген VPS33A, геномное редактирование, аутофагия, эндоцитоз.

**Для цитирования:** Васильев Ф.Ф., Софронова В.М., Максимова Н.Р., Каваками Ю., Отомо Т. Исследование функций белка VPS33A при мукополисахаридоз-плюс синдроме. *Медицинская генетика* 2022; 21(12): 10-15.

**Автор для корреспонденции:** Васильев Филипп Филиппович; e-mail: ff.vasilev@s-vfu.ru

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ФСРГ-2020-0014).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 19.11.2022

## Investigation of VPS33A protein function in mucopolysaccharidosis-plus syndrome

Vasilev F.F.<sup>1</sup>, Sofronova V.M.<sup>1,2</sup>, Maksimova N.R.<sup>1</sup>, Kawakami Y.<sup>2</sup>, Otomo T.<sup>2</sup>

1 – North-Eastern Federal University  
58, Belinsky st, Yakutsk, 677027, Russian Federation

2 – Kawasaki Medical School  
701-0192, Kurashiki, Japan

Previously, we identified a novel disease from the group of hereditary metabolic diseases with an autosomal-recessive type of inheritance - mucopolysaccharidosis-plus syndrome (MPSPS). Using whole exome sequencing, we revealed pathogenic homozygous mutation p.R498W in the VPS33A gene. The objective of study was to analyze the effect of the mutation in the VPS33A gene on the protein level and its function. The cellular model of the disease was generated using Crispr-Cas9 system. Determination of autophagic activity was carried out by analyzing differences in the amount of the LC3-II between samples with and without addition of lysosome inhibitor bafilomycin A1. The level of endocytosis was determined by analysis of EGFR degradation. In the present study we revealed a reduction in the level of the VPS33A protein in cell lines with heterozygous and homozygous p.R498W mutations up to ~43% and ~25%, respectively. We also found that p.R498W mutation does not affect to the main known functions of the VPS33A - endocytosis and autophagy. The fluorescence intensity in the mutant cells was significantly increased compared to the controls, which indicated a shift of lysosomal pH to the acid side. Impairment of domain 2-2 led to dysfunction of the VPS33A protein. The fundamental significance of the study is due to decipher the pathological mechanisms of disease development to find approaches to adequate therapy.

**Keywords:** mucopolysaccharidosis-plus syndrome, VPS33A gene, genome editing, autophagy, endocytosis.

**For citation:** Vasilev F.F., Sofronova V.M., Maksimova N.R., Kawakami Y., Otomo T. Investigation of VPS33A protein function in mucopolysaccharidosis-plus syndrome. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]*. 2022; 21(12): 10-15 (In Russ.)

**Corresponding author:** Vasilev Filipp Filippovich; **e-mail:** ff.vasilev@s-vfu.ru

**Funding.** The study was supported by the Ministry Education and Science of Russian Federation (Project No. FSRG-2020-0014).

**Conflict of interest.** The authors declare no conflicts of interest.

**Accepted:** 19.11.2022

## Введение

За период с 2005 по 2013 годы усилиями педиатров и генетиков Медико-Генетического Центра (МГЦ) «Республиканской Больницы №1-Национальный Центр Медицины» («РБ№1-НЦМ», г. Якутск) была выявлена и обособлена группа детей с мукополисахаридоз-подобным фенотипом. Все они были из якутских семей. Особенности данных детей было наличие частых респираторных заболеваний, сочетание присутствия гликозаминогликанов (ГАГ) в моче с отсутствием снижения активности известных лизосомных ферментов и ранняя младенческая смертность. Сотрудниками генетической лаборатории ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет» (СВФУ) совместно с МГЦ «РБ№1-НЦМ» и научной группой из Университета Осака (Япония) выявили новое, не описанное ранее заболевание из группы наследственных болезней обмена веществ с аутосомно-рецессивным типом наследования [1]. Впервые были описаны клинические проявления тяжелого наследственного заболевания с мультисистемным поражением органов и ранней манифестацией: грубые черты лица, скелетные аномалии, поражение сердца, контрактуры суставов, отставание в психомоторном развитии. Заболевание было включено в международную базу данных наследственных заболеваний OMIM (#617303) в 2017 г. под названием «мукополисахаридоз-плюс синдром» (МПСПС). Название заболевания имеет дополнение «плюс» в виду того, что помимо клинической картины конвенциональных мукополисахаридозов у больных МПСПС наблюдаются дополнительные нарушения со стороны почек и гемопoэтической системы. В настоящее время патогенетическое лечение отсутствует. Заболевание прогрессирует стремительно, прогноз неблагоприятный.

В результате проведенного полноэкзомного секвенирования была установлена молекулярно-генетическая причина заболевания – мутация с.1492С>Т (p.R498W) в гене *VPS33A* (Vacuolar protein sorting-associated protein 33A) [1]. В якутской популяции была установлена экстремально высокая частота данной мутации, которая составила 1:81 [2]. Основной функцией белка *VPS33A* является Rab-опосредованное связывание и последующее слияние ранних эндосом по-

средством комплекса CORVET (class C core vacuole/endosome tethering) и поздних эндосом с лизосомами через комплексы HOPS (homotypic fusion and protein sorting complex) [3]. Ген *VPS33A* кодирует белок размером 57 кДа, состоящий из четырех доменов: 1, 2, 3a и 3b [4]. Мутация p.R498W, ответственная за МПСПС, расположена в участке домена 2. Сам домен 2 условно подразделен на две части (2-1 и 2-2).

В настоящее время патогенез МПСПС остается до конца не выясненным. Известно, что группа болезней, называемых лизосомными болезнями накопления, обусловлена наличием дефектов в генах, которые приводят к недостаточности гидролитических ферментов в лизосомах, вследствие этого накапливаются субстраты. При новом заболевании не было выявлено дефицита ферментов. Также теперь известна причина заболевания – специфичная мутация в гене *VPS33A*. Однако до сих пор неизвестно как одна миссенс-мутация в гене *VPS33A* приводит к накоплению субстратов. Целью настоящего исследования являлось изучение влияния патогенной мутации в гене *VPS33A* на уровень белка и его функции.

## Методы

Объектами исследования являлись модельные клеточные культуры HeLa, а также геномная и кодирующая ДНК, полученная из клеток HeLa. Клетки HeLa культивировались в питательной среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, «Sigma Aldrich», США) с 10% фетальной бычьей сывороткой FBS (fetal bovine serum) и раствором пенициллина/стрептомицина во влажной атмосфере при температуре 37°C и 5% концентрации CO<sub>2</sub>. Для приготовления клеток HeLa с модификациями в гене *VPS33A*, был проведен дизайн олигонуклеотидов гидовых РНК (гРНК) с использованием онлайн программы Benchling CRISPR Guide RNA (gRNA) Design Tool (США). Последовательности гРНК были клонированы в вектор pSpCas9(BB)-2A-GFP (pX458) (плазмида Addgene #48138) согласно протоколу, описанному ранее [5]. Плазмиды с гРНК, направленными на различные участки гена *VPS33A*, кодирующие домены белка, трансфицировали в клетки

HeLa с использованием реагента Effectene («Qiagen», Германия). Для создания клеточной модели заболевания трансфекция осуществлялась вместе с матрицей ssODN (single-stranded oligodeoxynucleotides, одноцепочечные олигодеоксинуклеотиды), содержащей целевую мутацию p.R498W и синонимичные мутации, образующие новый сайт для фермента рестрикции *DraIII* и меняющие последовательность PAM (protospacer adjacent motif). Через 48 часов после трансфекции проводили сортировку GFP<sup>+</sup> популяций в 96-луночные планшеты и оставляли на культивирование в течение двух недель. Геномную ДНК выделяли с помощью реагента для экстракции ДНК QuickExtract («Lucigen», США) и затем анализировали прямым секвенированием.

Для проведения иммуноблоттинга использовались следующие первичные антитела: anti-ACTB («MBL», Япония), anti-EGFR («MBL», Япония), anti-LC3 («MBL», Япония), anti-VPS33A («NovusBio», США). Вторичные антитела были конъюгированы с HRP (horseradish peroxidase) anti-rabbit IgG («Invitrogen», США) и anti-mouse IgG («Invitrogen», США). Клетки лизировались в SDS (sodium dodecyl sulphate) буфере Лэммли и затем нагревались при температуре 95°C в течение 5 минут. После разделения белков в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) проводился их трансфер на 0,45 мкм PVDF (polyvinylidene fluoride) мембрану. Визуализация результатов проводилась с использованием субстрата Clarity Western ECL («Bio-Rad», США).

Исследование аутофагии было проведено согласно протоколу, описанному ранее [6]. Клетки культивировали в течение одного дня, конфлуэнция клеток на момент исследования составляла примерно 70%. После двукратной отмывки клеток в PBS (phosphate buffer saline) добавляли 125 нМ бафиломицина A1 (BafA1, «Cayman Chemicals», США). Через 2 часа клетки промывали в PBS и лизировали в SDS буфере Лэммли. Для проверки деградации EGFR (epidermal growth factor receptor) клетки дважды промывали теплым PBS (в течение 2 часов) и инкубировали в культуральной среде без FBS в течение 1 часа. Затем клетки культивировали в среде с 125 нМ BafA1 в течение 1 часа и добавляли EGF («Life Technologies», США) (100 нг/мл). Образцы анализировали методом иммуноблоттинга с использованием антител anti-LC3 и anti-EGFR.

Для определения уровня гепарансульфата были использованы образцы клеточных лизатов и питательной среды, в которой культивировались клетки в течение 48 часов. Клетки отбирались с чашек Петри при достижении 100% конфлуэнции при помощи трипсина. Подсчет концентрации общего белка осуществлялся по ме-

тоду Брэдфорда. Определение уровня гепарансульфата проводили методом иммуноферментного анализа с помощью коммерческого диагностического набора Human heparan sulfate ELISA Kit («Cusabio», США), в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Для изучения кислотности в лизосомах клетки были посажены на покровные стекла в 12-луночных планшетах и окрашены 200 нМ LysoTracker Red DND-99 («Molecular Probes», США) в течение 1 часа при 37°C. Затем клетки были отмыты в PBS и зафиксированы в 4% параформальдегиде в течение 20 минут. Клетки визуализировали под флуоресцентным микроскопом IX83 («Olympus», Япония). Анализ изображений проводили с использованием программы ImageJ («National Institute of Health», США).

### Результаты и обсуждение

Методом геномного редактирования Crispr-Cas9 нами были сгенерированы клеточные линии HeLa, содержащие мутацию p.R498W в гене *VPS33A*. Помимо целевой мутации p.R498W в матрицу ssODN была включена синонимичная мутация CCG(Pro)>CCA(Pro), образующая сайт рестрикции 5'-CACNNGTG-3' для фермента *DraIII*. Наличие данного сайта рестрикции позволило проводить селективный скрининг клонов методом ПЦР-ПДРФ (полимеразная цепная реакция – полиморфизм длин рестрицированных ферментов). Всего было отобрано и проанализировано 118 клонов, из которых 2 клон имели продукты с длинами, соответствующими наличию гомозиготной встройки. Также были идентифицированы клоны с вероятной гетерозиготной вставкой. Проведение секвенирования по Сэнгеру подтвердило присутствие целевой мутации C>T (p.R498W) и отсутствие нецелевых мутаций у участка внесения дупликации у клонов с гомозиготной и гетерозиготной встройкой (рис. 1).

После валидации клеточной модели заболевания нами были проведены исследования по изучению влияния патогенной мутации в гене *VPS33A* на уровень и функции белка. Pavlova с соавт. [7] выявили снижение уровня белка VPS33A в фибробластах двух пациентов с МПСПС по сравнению с контрольными группами. Также они выявили, что понижение уровня белка не являлось следствием изменения транскрипции мРНК *VPS33A*. В нашем исследовании также было выявлено снижение уровня белка VPS33A в клеточных линиях с мутацией p.R498W в гетерозиготном и гомозиготном состоянии до ~43% и ~25%, соответственно (рис. 2A).

Вероятно, что миссенс-мутация p.R498W дестабилизирует фолдинг белка VPS33A и тем самым снижает его внутриклеточное содержание. Анализ стабильности белка VPS33A *in silico* с использованием доступных онлайн-программ показал, что мутация p.R498W может снижать стабильность белка (SDB: ddG = -0,22; Strum: ddG = -2,39).

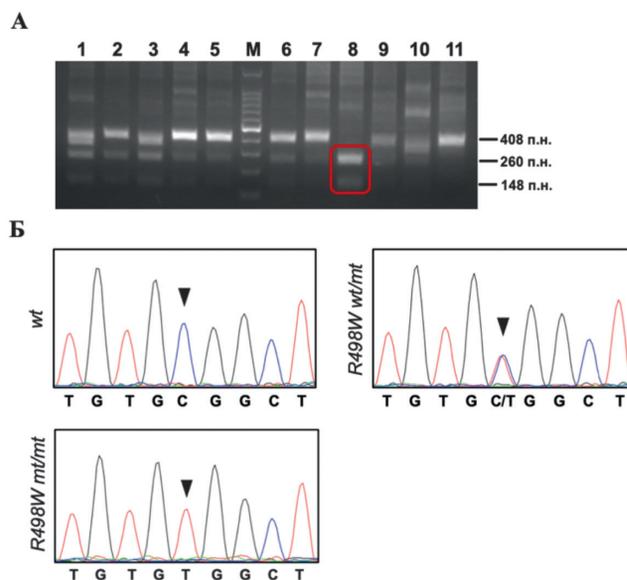
Аутофагия и эндоцитоз – фундаментальные клеточные процессы, которые очень важны для развития клеток и поддержания клеточного гомеостаза. Эти процессы регулируются комплексами HOPS и CORVET. Данные многокомпонентные связывающие комплексы взаимодействуют с Rab-ГТФазами или SNARE комплексами и способствуют слиянию между везикулами в аутофагическом и эндоцитарном путях. VPS33A является основной субъединицей этих комплексов и функционирует во внутриклеточном трафике. Мы выявили, что мутация p.R498W не оказывает влияния на основные известные функции белка VPS33A – эндоцитоз и аутофагию (рис. 2Б, 2В).

У пациентов с МПСПС наблюдались повышенные уровни ГАГ в моче и высокие уровни гепарансульфата в плазме [1]. Поэтому далее мы исследовали уровень ГАГ в модельных клетках МПСПС (рис. 2Г). Уровни гепарансульфата в клетках МПСПС были повышены в 2 раза по сравнению с уровнем гепарансульфата в клетках HeLa дикого типа. В клетках, гетерозиготных по мутации p.R498W, мы не выявили накопления гепарансульфата, но в питательной среде от гетерозиготных p.R498W wt/mt клеток было выявлено накопление гепарансульфата по сравнению с контролем. Индивиды с гетерозиготной мутацией p.R498W являются носителями и не проявляют признаков заболевания. Вероятно, уровень ГАГ в клетках имеет решающее значение для развития клинической картины заболевания, а уровень белка VPS33A достаточен для поддержки его функции у гетерозигот.

Также нами было проведено изучение функций лизосом в данных клетках с целью выяснения механизмов накопления ГАГ. Исследование лизосомной pH проводилось с использованием флуоресцентного красителя LysoTracker, который аккумулируется в кислых компартментах клетки. Интенсивность флуоресценции в мутантных клетках была значительно повышена в сравнении с контролем, что свидетельствовало о смещении pH лизосом в кислую сторону, то есть снижении pH (рис. 2Д).

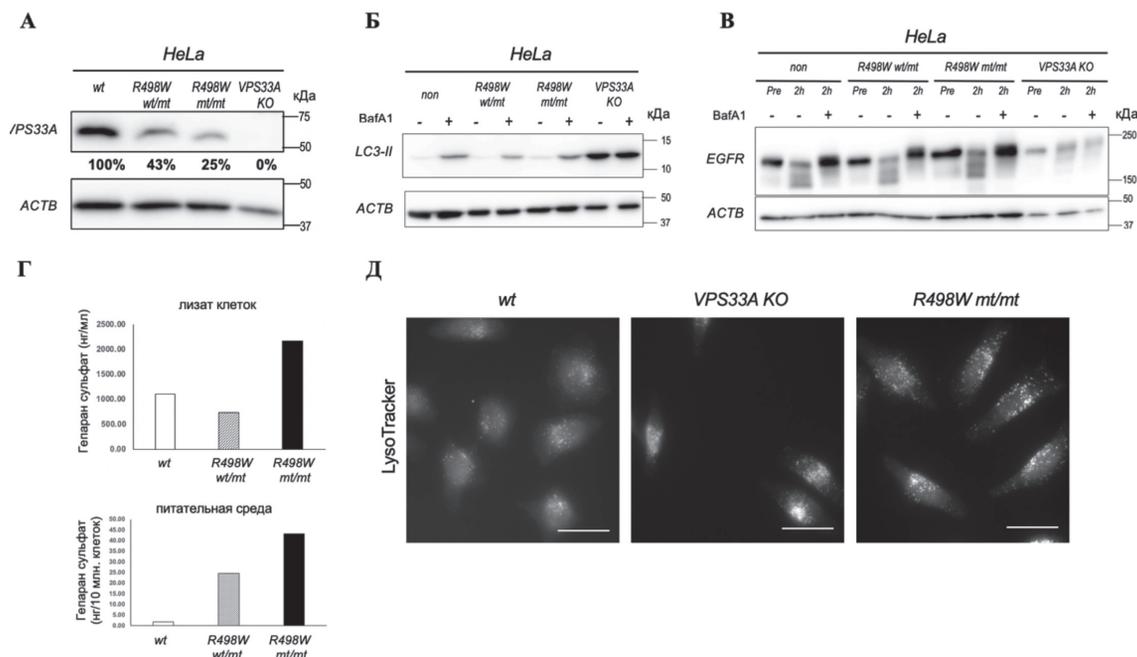
Таким образом, в клеточных моделях МПСПС было выявлено снижение уровня белка VPS33A, массивное накопление ГАГ и смещение лизосомного pH.

При этом известные функции белка VPS33A (аутофагия, эндоцитоз) не были нарушены. С целью выяснения причины накопления ГАГ была проведена работа по изучению домен-специфических функций белка. Известно, что различные домены в белке VPS33A отвечают за разные функции. Домен 3а отвечает за взаимодействие с комплексом SNARE, домен 3b является интерфейсом связывания с белком VPS16 (субъединицей комплексов HOPS/CORVET) [4, 8]. Функции доменов 1 и 2 в настоящий момент неизвестны. Нами были приготовлены клетки, содержащие мутации в генах, кодирующих домены 1, 2-1, 3а, 3b и 2-2 белка VPS33A. Критерием отбора клеток являлось наличие мутаций, не приводящих к сдвигу рамки считывания, и наличие белка по иммуноблоттингу. Список клонов и результаты проведенных исследований приведены в таблице.



**Рис. 1.** Валидация клеточной модели мукополисахаридоз-плюс синдрома. (А) ПЦР-ПДРФ анализ полученных клонов. Электрофорез на 3% агарозном геле продуктов рестрикции ферментом *DraIII* (10U, 16 часов): клон №8 содержит гомозиготную мутацию p.R498W mt/mt; (Б) Секвеннограмма последовательности гена *VPS33A* в области внесения двуникового разрыва системой *Crispr-Cas9*. М – маркер; wt – дикий тип; mt – мутант.

**Fig. 1.** Validation of the cellular model of mucopolysaccharidosis-plus syndrome. (A) PCR-RFLP analysis of the resulting clones. Electrophoresis on 3% agarose gel of *DraIII* restriction products (10U, 16 hours): clone No.8 contains a homozygous mutation p.R498W mt/mt; (B) Sequence of the *VPS33A* gene in the double strand break region produced by the *Crispr-Cas9* system. M – marker; wt – wild type; mt – a mutant.



**Рис. 2.** Исследование уровня белка VPS33A и его функций в клеточной модели МПСПС. (А) Уровень белка VPS33A. Репрезентативный рисунок иммуноблоттинга; (Б) Исследование функции аутофагии. Репрезентативный рисунок иммуноблоттинга маркера аутофагосом LC3-II. Различия в интенсивности LC3-II между образцами с и без 125 нМ BafA1 демонстрируют активность аутофагии; (В) Исследование функции эндоцитоза. Клетки тестировались 125 нМ BafA1 в качестве контроля деградации и стимулировались 100 нг/мл EGF; (Г) Исследование уровня ГАГ. Уровень гепарансульфата был определен в лизате и в питательной среде, в которой культивировались модельные клетки МПСПС в течение 48 часов. Уровень гепарансульфата в среде был стандартизован по числу клеток; (Д) Исследование лизосомного pH. Интенсивность сигнала LysoTracker RED DND99 (1:5000, 200 нМ) была выше в p.R498W mt/mt клетках в сравнении с клетками дикого типа. Масштаб: 20 мкм.

**Fig. 2.** Analysis of the VPS33A protein level and its functions in the MPPS cell model. (A) VPS33A protein level. Representative immunoblot pattern; (B) Autophagy function. Representative immunoblotting pattern of the autophagosome marker LC3-II. Differences in LC3-II intensity between samples with and without 125 nM BafA1 demonstrate autophagy activity; (C) Endocytosis function analysis. Cells were tested with 125 nM BafA1 as a degradation control and stimulated with 100 ng/ml EGF; (D) Glycosaminoglycan levels. The level of heparan sulfate was determined in the lysate and in the culture medium in which the MPPS model cells were cultured for 48 hours. The level of heparan sulfate in the medium was standardized by the number of cells; (E) Lysosomal pH study. The signal intensity of LysoTracker RED DND99 (1:5000, 200 nM) was higher in p.R498W mt/mt cells compared to wild type cells. Scale: 20 μm.

**Список отобранных клонов для исследования домен-специфических функций белка VPS33A**

**List of selected clones for the study of domain-specific functions of the VPS33A protein**

№	Домен	Мутации		Фенотип		
		1	2	Белок (%)	Аутофагия	Эндоцитоз
1	— (wt)	нет	нет	100,0	+	+
2	— (KO)	delГ	del4	0	—	—
3	— (KI)	R498W	wt/mt	43	+	+
4	— (KI)	R498W	mt/mt	25	+	+
5	1	delГ	del3	17,8	+	+
6	2-1	C>T	del29	69,3	+	+
7	2-2	del3	del3	5,4	—	—
8	2-2	del3	del16	5,2	—	—
9	2-2	del3	del3	4,6	—	—
10	3a	del21	insA	9,0	—	—
11	3a	del6	homo	10,2	—	—
12	3b	del6	del2	2,4	—	—

**Примечание:** KO knock-out; KI knock-in; (+) функция сохранена; (–) функция нарушена

Аутофагические и эндоцитозные пути не были нарушены при мутациях в доменах 1 и 2-1. Выявленные дисфункции при наличии мутаций в доменах 3a и 3b, по всей видимости, связаны с нарушением связывания VPS33A с SNARE и VPS16, соответственно. Результаты проведенного исследования позволяют предположить, что домен 2-2 необходим для сохранения функций белка. Вероятно, что патогенная мутация p.R498W не «повреждает» домен 2-2, а нарушает неизвестную функцию VPS33A. Лимитирующим фактором данного исследования является то, что клоны имели разные мутации и различный уровень белка VPS33A.

Текущее исследование направлено на изучение патогенеза наследственного аутосомно-рецессивного заболевания МПСРС на молекулярном уровне. Фундаментальная значимость проекта обусловлена необходимостью расшифровки механизмов развития данного заболевания с целью поиска подходов к адекватной терапии. Исследование патогенеза нового заболевания позволит провести поиск новых биомаркеров лизосомных болезней накопления. Результаты исследования станут основой для усовершенствования диагностики и понимания сложных метаболических процессов, свя-

занных с лизосомными болезнями накопления. Исследование продолжается.

### Литература / References

1. Kondo H., Maksimova N., Otomo T. et al. Mutation in VPS33A affects metabolism of glycosaminoglycans: a new type of mucopolysaccharidosis with severe systemic symptoms. *Hum Mol Genet.* 2017;26:173-183.
2. Vasilev F., Sukhomyasova A., Otomo T. Mucopolysaccharidosis-Plus Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2020;21(2):421.
3. Gissen P., Johnson C.A., Gentle D. et al. Comparative evolutionary analysis of VPS33 homologues: Genetic and functional insights. *Hum Mol Genet.* 2005;14:1261-1270.
4. Baker R.W., Jeffrey P.D., Hughson F.M. Crystal Structures of the Sec1/Munc18 (SM) Protein Vps33, Alone and Bound to the Homotypic Fusion and Vacuolar Protein Sorting (HOPS) Subunit Vps16. *PLoS ONE.* 2013;8:e67409.
5. Ran F.A., Hsu P.D., Wright J. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2281-2308.
6. Klionsky D.J., Abdelmohsen K., Abe A. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy.* 2016;12:1-222.
7. Pavlova E., Shatunov A., Wartosch L. et al. The lysosomal disease caused by mutant VPS33A. *Hum Mol Genet.* 2019;28(15):2514-2530.
8. Jiang P., Nishimura T., Sakamaki Y. et al. The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Mol Biol Cell.* 2014;25:1327-1337.