

РОЛЬ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА Th2-ЦИТОКИНОВ IL-4 И IL-5 В АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

Обзор

© 2023 И.П. Шиловский^{1*}, В.И. Ковчина¹, Е.Д. Тимотиевич¹,
А.А. Никольский¹, М.Р. Хаитов^{1,2}

¹ ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России,
115522 Москва, Россия; электронная почта: ip.shilovsky@nrcii.ru

² ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет
имени Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 05.05.2023

После доработки 15.08.2023

Принята к публикации 15.08.2023

Бронхиальная астма (БА) — это хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, включающее в себя несколько фенотипов, самым распространенным из которых (до 80% от всех случаев) является аллергическая БА. Ключевыми участниками патогенеза этого заболевания являются Th2-цитокины (IL-4, IL-5, IL-9 и IL-13). Гены, кодирующие эти цитокины, как и подавляющее большинство генов человека, состоят из нескольких экзонов, и, соответственно, из единого мРНК-предшественника в результате альтернативного сплайсинга может образовываться несколько вариантов зрелых мРНК и изоформ белка, которые также могут участвовать в патогенезе БА. Анализ научной литературы и баз данных показал наличие альтернативных мРНК-транскриптов для IL-4, IL-5 и IL-13. При этом у IL-4 и IL-5 альтернативные транскрипты несут открытые рамки считывания, а следовательно, могут кодировать функциональные белки. Для IL-4 показано существование не только альтернативных мРНК-транскриптов, но и альтернативной изоформы белка (IL-4δ2), которая утратила часть, кодируемую экзоном-2. Сходный по структуре альтернативный транскрипт, утративший экзон-2 (IL-5δ2) был идентифицирован для IL-5. В данном обзоре мы обобщаем сведения об известных на данный момент альтернативных мРНК-транскриптах и белковых изоформах Th2-цитокининов, прежде всего, IL-4 и IL-5. Мы проанализировали известные биологические свойства альтернативных вариантов этих цитокинов, их возможную роль в развитии аллергической БА, а также рассмотрели диагностический и терапевтический потенциал.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бронхиальная астма, Th2-цитокины, альтернативный сплайсинг, сигнальный путь.

DOI: 10.31857/S0320972523100159, **EDN:** OSYUPD

ВВЕДЕНИЕ

Бронхиальная астма (БА) — гетерогенное заболевание, обычно характеризующееся хроническим воспалением дыхательных путей [1]. В отдельных странах заболеваемость достигает 15–18% [2], в России — около 7% населения [3]. Рост распространенности БА, по всей видимости, связан с недостаточностью суще-

ствующих способов терапии. В то же время создание новых методов лечения невозможно без раскрытия молекулярных и клеточных механизмов патогенеза.

За последние три десятилетия получены убедительные доказательства участия клеток Т-хелперов типа 2 (Th2) и продуцируемых ими цитокинов (IL-4, IL-5, IL-9 и IL-13) в формировании основных проявлений БА [4]. Длительное время считалось, что это заболевание развивается исключительно по Th2-зависимому механизму и ассоциировано с инфильтрацией респираторного тракта провоспалительными клетками — эозинофилами. Однако в свете новых данных астму рассматривают как гетерогенное заболевание, включающее

Принятые сокращения: АПК — антигенпрезентирующие клетки; БА — бронхиальная астма; пре-мРНК — мРНК-предшественник; ЭР — эндоплазматический ретикулум; ILC2 — врожденные лимфоидные клетки 2-го типа; ORF — открытая рамка считывания; Th2-клетки — Т-хелперы типа 2.

* Адресат для корреспонденции.

в себя несколько фенотипов. Так, например, в отдельный фенотип выделяют нейтрофильную БА, характеризующуюся нейтрофильным (или смешанным) воспалением дыхательных путей, которая развивается по Th17-зависимому механизму. Такая астма зачастую протекает тяжело и трудно поддается традиционному лечению кортикостероидами. Тем не менее самым распространенным фенотипом является аллергическая БА (до 80% всех случаев), которая развивается с участием Th2-клеток и продуцируемых ими цитокинов [5, 6].

Согласно современным представлениям, патогенез аллергической БА развивается в два этапа: 1) этап сенсибилизации, 2) эффекторный этап [4]. Сенсибилизация происходит при первичном контакте с аллергенами, которые попадают в организм через повреждения в эпителии. Происходит презентация аллергена с помощью молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса II на антигенпрезентирующих клетках (АПК), прежде всего дендритных клетках и альвеолярных макрофагах [7]. После контакта с аллергеном АПК мигрируют в региональные лимфоузлы, где активируют наивные Th0-клетки, которые под влиянием определенного цитокинового окружения дифференцируются в Th2-клетки, продуцирующие так называемые Th2-цитокины (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13) [4, 8]. Именно данные цитокины обеспечивают формирование основных проявлений патологии. Каким образом происходит дифференцировка Th0- в Th2-клетки, окончательно не известно. Согласно одному из предположений, ключевую роль в этом процессе могут играть эпителиальные клетки и врожденные лимфоидные клетки 2-го типа (ILC2). Некоторые аллергены способны активировать эпителиальные клетки (в том числе за счет взаимодействия с рецептором TLR4 [9]), что индуцирует продукцию ими провоспалительных факторов (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TSLP, IL-25 и IL-33) [10]. В свою очередь, IL-25 и IL-33 активируют ILC2, которые продуцируют IL-5 и IL-13, последний из которых может способствовать дифференцировке Th2-клеток [11–13]. Примечательно, что, согласно новым данным, не только ILC2 активируют Th2-клетки, но и, наоборот, Th2-клетки, продуцируя IL-4 и прочие факторы, способствуют экспансии ILC2 [14].

Параллельно в регионарных лимфоузлах происходит контакт аллергена с В-клетками, что способствует их дифференцировке в плазматические клетки, продуцирующие антитела. Под действием Th2-цитокinov (IL-4 и IL-13) В-клетки синтезируют IgE, который, связы-

ваясь с рецепторами на поверхности тучных клеток и базофилов, опосредует последующие аллергические реакции [4, 15] (рис. 1). Кроме того, дендритные клетки и альвеолярные макрофаги, помимо выполнения функций АПК, способны активироваться аллергенами (за счет распознавания их рецепторами TLR2, TLR4 и Dectin-1) и продуцировать провоспалительные цитокины, например TNF α , что также вносит вклад в патогенез БА [16, 17].

На эффекторной стадии при повторном контакте с аллергеном происходит его взаимодействие с IgE, который находится на поверхности тучных клеток и базофилов, что способствует их дегрануляции и высвобождению провоспалительных медиаторов (гистамина, лейкотриенов и хемокинов) во внесклеточное пространство. Гистамин и лейкотриены влияют на гладкую мускулатуру дыхательных путей, вызывая бронхоспазм, а также увеличивают проницаемость кровеносных сосудов, благодаря чему провоспалительные клетки (эозинофилы, нейтрофилы и лимфоциты) проникают в ткань легких из системного кровотока. В участке воспаления Th2-клетки активируются при повторном контакте с аллергеном и продуцируют IL-4, IL-5, IL-9 и IL-13. Эти цитокины способствуют гиперпродукции слизи бронхиальным эпителием, гиперреактивности бронхов и привлечению эозинофилов в участок воспаления и их активации. Эозинофилы в ходе своей дегрануляции дополнительно высвобождают медиаторы воспаления, приводящие к повреждению окружающих тканей [4, 15] (рис. 1). Накоплено много экспериментальных доказательств участия Th2-цитокinov в патогенезе аллергической БА, что обобщено в ряде современных обзоров [18–20].

Примечательно, что гены всех вышеуказанных Th2-цитокinov в своей структуре имеют несколько интронов и экзонов. Соответственно, при формировании зрелых транскриптов молекулы мРНК-предшественников (пре-мРНК) подвергаются сплайсингу – процессу удаления интронов. Сплайсинг осуществляется мультисубъединичным комплексом – сплайсосомой, которая включает несколько малых ядерных рибонуклеопротеинов (мяРНП) и большое количество вспомогательных белков. Процесс сплайсинга представляет собой последовательное связывание и высвобождение мяРНП и вспомогательных факторов, в результате чего в цепи пре-мРНК происходит два разрыва (на 5'- и на 3'-конце интрона) с последующим сшиванием двух экзонов. В результате образуется зрелый мРНК-транскрипт. Молекулярный механизм сплайсинга

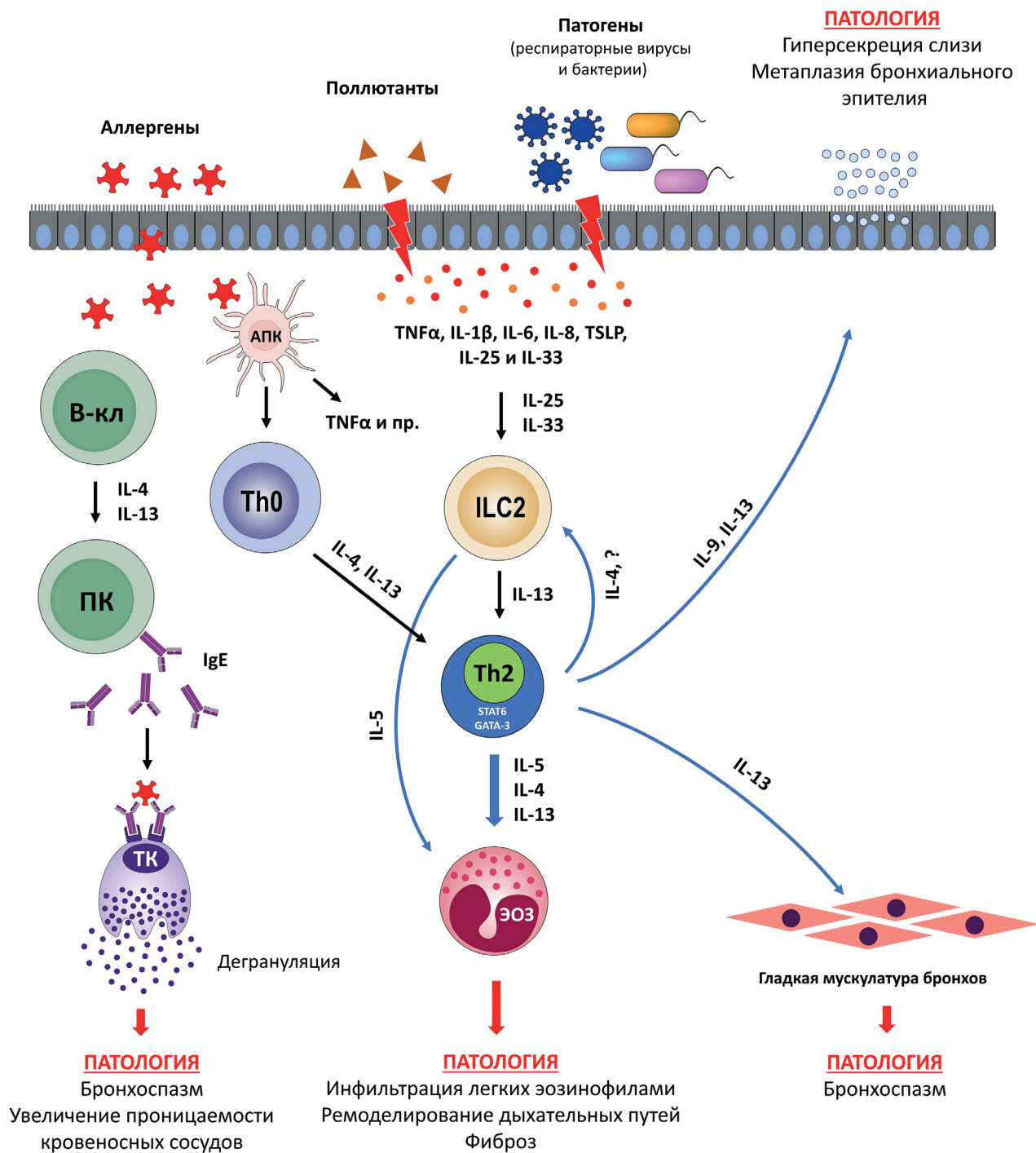


Рис. 1. Роль Th2-цитокинов в патогенезе аллергической БА. Аллерген поглощается АПК (например, дендритными клетками, макрофагами и др.), которые мигрируют в регионарные лимфоузлы, где стимулируют дифференцировку наивных Th0-клеток. Th0-Клетки дифференцируются в Th2 под действием IL-4 и IL-13. В свою очередь, Th2-клетки вырабатывают цитокины IL-4, IL-5, IL-9 и IL-13. Под влиянием цитокинов (IL-4 и IL-13) происходит дифференцировка В-лимфоцитов в плазматические клетки (ПК) и синтез IgE. Молекулы IgE связываются со специфическими рецепторами (FcεR) на тучных клетках (ТК) и базофилах, что при повторном контакте с аллергеном приводит к их дегрануляции и высвобождению гистамина, лейкотриенов, и т.д., вызывая бронхоспазм и увеличивая проницаемость кровеносных сосудов. IL-5 способствует привлечению эозинофилов в участок воспаления, которые, в свою очередь, вызывают повреждение ткани легких. IL-13 напрямую действует на гладкую мускулатуру, вызывая бронхоспазм. IL-9 и IL-13 действуют на бронхиальный эпителий, приводя к гиперсекреции слизи. Аллергены (и прочие факторы) способны активировать эпителиальные клетки, что индуцирует продукцию ими провоспалительных факторов (TNFα, IL-1β, IL-6, IL-8, TSLP, IL-25 и IL-33). IL-25 и IL-33 активируют ILC2, которые продуцируют IL-5 и IL-13, последний из которых может усилить Th2-иммунный ответ. Th2-Клетки также способствуют экспансии ILC2 за счет продукции IL-4 и других факторов. Кроме того, аллергены активируют АПК при помощи рецепторов TLR2, TLR4 и Dectin-1, которые выступают дополнительными источниками провоспалительных цитокинов, например TNFα

относительно хорошо изучен и подробно описан в ряде обзоров [21, 22].

Под альтернативным сплайсингом понимают процесс образования различных зрелых мРНК из одного предшественника, которые образуются в результате удаления из пре-мРНК не только интронов, но и экзонов (альтернативных экзонов). Этот механизм обеспечивает разнообразие транскриптов, белков и их функций. Большинство генов человека содержат несколько экзонов, при этом для 95% мультиэкзонных генов человека характерен альтернативный сплайсинг [23, 24]. Процесс альтернативного сплайсинга имеет сложную систему регуляции, которая заключается главным образом в повышении или уменьшении стерической доступности сайтов сплайсинга для сплайсосомы. В итоге, включение или исключение альтернативного экзона в зрелую мРНК определяется балансом активаторов и ингибиторов сплайсинга, наличием регуляторных последовательностей (энхансеров и сайленсеров) в пре-мРНК, ее вторичной структурой, которая может «маскировать» сайты сплайсинга [25], а также «скоростью работы» РНК-полимеразы [26]. Современные представления о молекулярных механизмах альтернативного сплайсинга обобщены в обзорах [24, 27, 28].

Поскольку гены Th2-цитокинов содержат несколько экзонов, то возможно существование альтернативных мРНК-транскриптов и изоформ белков. Для некоторых Th2-цитокинов (IL-4 и IL-5) были идентифицированы альтернативные изоформы белка и альтернативные мРНК-транскрипты, которые наравне с полноразмерными вариантами могут участвовать в патогенезе аллергической БА. В данном обзоре мы обобщаем сведения об известных на данный момент альтернативных мРНК-транскриптах и белковых изоформах Th2-цитокинов и анализируем их возможную роль в развитии аллергической БА, а также диагностический и терапевтический потенциал.

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ВАРИАНТЫ Th2-ЦИТОКИНОВ

Принимая во внимание тот факт, что гены всех Th2-цитокинов в своей структуре имеют несколько интронов и экзонов, можно ожидать, что в результате альтернативного сплайсинга образуется несколько мРНК-транскриптов (таблица) [29–32]. Для генов, кодирующих IL-4 и IL-5, идентифицированы альтернативные изоформы белка и альтернативные мРНК-транскрипты, которые, предпо-

жительно, могут кодировать белки, так как содержат открытые рамки считывания (ORF, open reading frame) [29, 33]. Для гена, кодирующего IL-9, не идентифицировано альтернативных транскриптов. Единственный известный на сегодняшний день мРНК-транскрипт этого гена, кодирует полноразмерный IL-9 человека (144 а.о.); он имеет размер 605 нуклеотидов и состоит из 5 экзонов (таблица). Еще один Th2-цитокин (IL-13), хотя и имеет 4 альтернативных мРНК-транскрипта, однако все они не содержат ORF и, скорее всего, не кодируют белковые продукты, а следовательно их биологическая значимость неочевидна (таблица).

Учитывая, что альтернативные мРНК-транскрипты, кодирующие ORF, выявлены для IL-4 и IL-5, в данном обзоре мы более подробно рассматриваем именно эти цитокины. Также мы приводим анализ опубликованных экспериментальных данных о возможной роли альтернативных вариантов IL-4 и IL-5 в развитии аллергической астмы.

РОЛЬ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ВАРИАНТОВ IL-4 В БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

IL-4 – это многофункциональный цитокин, который был открыт в 1980-х гг. Главным образом он продуцируется Th2-клетками, а также тучными клетками, базофилами и эозинофилами [39]. IL-4 играет важную патогенетическую роль при астме. В частности, он вызывает дифференцировку Th2-лимфоцитов, синтез IgE В-клетками, альтернативную активацию макрофагов, выработку коллагена фибробластами, а также эозинофильное воспаление легких [40].

Свои биологические функции IL-4 реализует при помощи двух типов рецепторов. Тип I формируется цепями IL-4R α и γ c, а тип II – цепями IL-4R α и IL-13R α 1. Примечательно, что с рецептором типа II может связываться другой Th2-цитокин – IL-13. Большинство видов клеток экспрессируют оба типа рецепторов, однако тип I наиболее представлен на гемопоэтических клетках (Т-, В-клетках, макрофагах, эозинофилах, базофилах и тучных клетках), вследствие чего эти клетки реагируют преимущественно на IL-4. Рецептор типа II представлен на негемопоэтических клетках (эпителиальных, клетках гладкой мускулатуры и др.) (рис. 2) [41]. Вследствие значительного сходства рецепторов биологические эффекты IL-4 и IL-13 схожи. Однако различный профиль представленности рецепторов типов I и II на разных видах клеток обуславливают

Альтернативные мРНК-транскрипты Th2-цитокинов человека и их характеристика

Цитокин	ID мРНК-транскрипта в https://www.ensembl.org/	Размер мРНК- транскрипта, нукл	Белок	Описание	Ссылка
IL-4	ENST00000231449.7	615	153 а.о.	содержит все 4 экзона и кодирует полноразмерный белок IL-4	база данных строения геномов позвоночных, ensembl.org
	ENST00000622422.1	717	предполагаемый белок 136 а.о.	отсутствует часть экзона-3 и экзона-4, кодирует ORF	
	ENST00000350025.2	414	137 а.о.	отсутствует экзон-2, кодирует изоформу IL-4δ2	база данных строения геномов позвоночных, ensembl.org , [29, 34–38]
	ENST00000495905.1	305	нд	содержит фрагменты двух экзонов, не кодирует ORF	база данных строения геномов позвоночных, ensembl.org
IL-5	ENST00000231454.6	815	134 а.о.	содержит все 4 экзона и кодирует полноразмерный белок IL-5	
	нд	нд	предполагаемый белок 123 а.о.	отсутствует экзон-2, предположительно, кодирует изоформу IL-5δ2	[33]
	ENST00000450655.1	276	51 а.о.	содержит фрагменты трех экзонов, кодирует ORF	
	ENST00000462418.1	905	нд	содержит фрагменты двух экзонов, не кодирует ORF	
IL-9	ENST00000274520.2	605	144 а.о.	содержит все 5 экзонов и кодирует полноразмерный белок IL-9	база данных строения геномов позвоночных, ensembl.org
IL-13	ENST00000304506.7	1283	146 а.о.	содержит все 4 экзона и кодирует полноразмерный белок IL-13	
	ENST00000468334.5	1082	нд	не содержит экзонов, кодирующих ORF	
	ENST00000487267.5	1033	нд	не содержит экзонов, кодирующих ORF	
	ENST00000459878.5	777	нд	не содержит экзонов, кодирующих ORF	
	ENST00000462480.1	1562	нд	содержит фрагменты трех экзонов, не кодирует ORF	

Примечание. ORF – открытая рамка считывания (open reading frame); нукл – нуклеотиды; нд – данные отсутствуют.

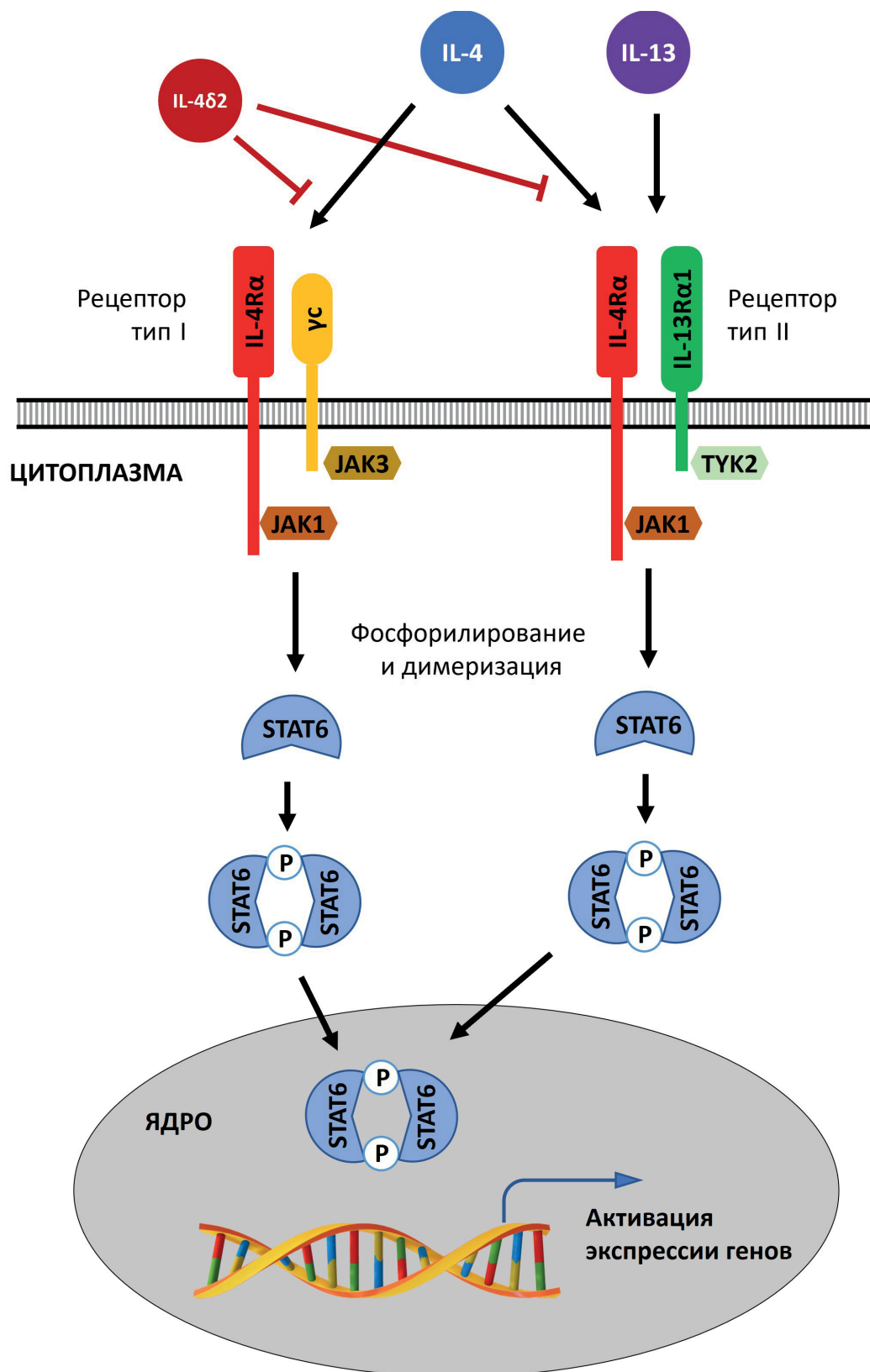


Рис. 2. Рецептор и сигнальные пути IL-4 и IL-4δ2, а также IL-13. IL-4 способен связываться с двумя типами рецепторов. Рецептор типа I состоит из цепей IL-4Rα и γc; рецептор типа II состоит из цепей IL-4Rα и IL-13Rα1. Другой Th2-цитокин – IL-13 – способен связываться только с рецептором типа II. После связывания IL-4 или IL-13 со своим рецепторным комплексом происходит фосфорилирование киназ YAK и TYK, а также фактора транскрипции STAT6. Фосфорилированный STAT6 димеризуется, после чего транслируется в ядро, где активирует экспрессию генов, отвечающих за развитие Th2-иммунного ответа. IL-4δ2 способен связываться с цепью рецептора IL-4Rα, препятствуя связыванию полноразмерного IL-4 со своим рецептором, тем самым ингибируя его активность

некоторые различия в биологических функциях этих цитокинов. В отличие от IL-4, IL-13 способен оказывать прямой эффект на клетки гладкой мускулатуры бронхов и тем самым опосредовать бронхоконстрикцию при БА [41, 42]. Кроме того, IL-13, действуя на эпителиальные клетки респираторного тракта, индуцирует гиперсекрецию слизи, что также является характерным проявлением этой патологии [41].

Связывание IL-4 с рецептором типа I приводит к активации киназ JAK1 и JAK3, а связывание IL-4 (или IL-13) с рецептором типа II активирует киназы JAK1 и TYK2/JAK2. Активированные киназы осуществляют фосфорилирование остатков тирозина в цитоплазматических доменах цепей рецептора, которые, в свою очередь, выступают в роли сайтов докинга для передачи сигнала последующей адапторной молекуле — фактору транскрипции STAT6. После активации путем фосфорилирования этот фактор формирует димеры, которые транслоцируются в ядро, где активирует транскрипцию определенных генов, вовлеченных в активацию Th2-клеток и развитие аллергических реакций (рис. 2) [41].

Ген, кодирующий IL-4, состоит из четырех экзонов [43, 44]. Полноразмерный белок IL-4 (153 а.о.) кодируется всеми четырьмя экзонами. У человека идентифицирована еще одна изоформа этого белка (IL-4δ2 размером 136 а.о.), кодируемая экзонами 1, 3 и 4; т.е. в результате альтернативного сплайсинга происходит делеция экзона-2. мРНК-транскрипт, кодирующий IL-4δ2, был идентифицирован методом секвенирования в 1996 г. [29]. Аналогичный мРНК-транскрипт был идентифицирован и у мышей, он выявлялся в селезенке и костном мозге [45]; позднее был идентифицирован соответствующий белок [36]. Также было показано, что оба транскрипта (кодирующих как полноразмерный, так и укороченный белок) выявлялись в более широком спектре тканей и клеток мыши [29, 34, 46–51]. При анализе базы данных было идентифицировано еще два альтернативных транскрипта, один из которых несет ORF, кодирующую предполагаемый белок размером 136 а.о. (таблица). Однако отсутствуют публикации, описывающие его возможные свойства.

Биологические функции IL-4δ2. После получения рекомбинантного белка IL-4δ2 была проведена серия экспериментов с целью установить его биологические эффекты. В культуре клеток было продемонстрировано, что, в отличие от полноразмерного цитокина, IL-4δ2 не влиял на пролиферацию Т-клеток [34] или экспрессию цитокинов (IFNγ, IL-1, IL-6, IL-8

и др.) моноцитами человека. В то же время IL-4δ2 ингибировал пролиферацию Т-клеток, индуцируемую полноразмерным IL-4 [34], и уменьшал его продукцию Th2-клетками [35], блокировал эффекты IL-4 в культуре моноцитов, а также ингибировал способность IL-4 запускать синтез IgE В-клетками [34]. Все эти данные указывают на то, что изоформа IL-4δ2 является негативным регулятором IL-4. Было показано, что IL-4δ2 способен связываться с теми же рецепторами, что и полноразмерный IL-4, это позволяет укороченной форме конкурентно ингибировать эффекты полноразмерной. Отсутствие фрагмента белка, кодируемого экзоном-2, приводит к изменению его трехмерной структуры, что уменьшает сродство IL-4δ2 к рецептору по сравнению с IL-4. Тем не менее этого сродства достаточно для конкурентного ингибирования эффектов IL-4 *in vitro* [34, 38] (рис. 2).

Дополнительно было показано, что в культуре первичных Т-лимфоцитов человека IL-4δ2 активировал продукцию IFNγ, IL-6, IL-10, MCP-1 и TNFα [35]. Способность этой изоформы активировать продукцию IFNγ подтверждает представления о том, что IL-4δ2 является негативным регулятором Th2-иммунного ответа и, соответственно, может принимать участие в патогенезе аллергической БА. Таким образом, исследования на клеточных культурах показали, что IL-4δ2 может быть антагонистом IL-4 и многообещающим терапевтическим агентом.

Способность IL-4δ2 негативно регулировать Th2-иммунный ответ подтверждается экспериментами *in vivo*, т.к. введение животным IL-4δ2 активировало продукцию IFNγ, являющегося антагонистом IL-4 [52–54]. Примечательно, что в ответ на введение IL-4δ2 в дыхательные пути мышей развивалось незначительное воспаление, выражавшееся в накоплении Т- и В-лимфоцитов в легких. В то же время введение IL-4 провоцировало более выраженное воспаление, характеризующееся не только инфильтрацией Т- и В-лимфоцитами, но и эозинофилами, а также гиперплазией бокаловидных клеток респираторного эпителия [36, 55]. Эти данные указывают на наличие собственной биологической активности IL-4δ2, которая, по всей видимости, опосредована рецептором для полноразмерного IL-4, так как нокаут мРНК, кодирующих STAT6 или IL-4R, значительно нивелировал IL-4δ2-индуцированную инфильтрацию лимфоцитов [55]. Независимость биологических свойств IL-4δ2 подтверждается также транскриптомными исследованиями, которые показывают, что IL-4

и IL-4δ2 влияют на экспрессию разных генов; IL-4 регулирует экспрессию 283 генов, а IL-4δ2 – 84 генов, при этом 38 из них регулируются IL-4δ2, но не IL-4. Эти исследования также продемонстрировали, что IL-4δ2 (а не IL-4) активировал IFN γ , тем самым подтверждая, что IL-4δ2 обладает Th1-подобными свойствами [55]. В итоге обе изоформы (IL-4 и IL-4δ2) демонстрируют различные биологические эффекты, реализующиеся по единому IL-4R α /STAT6-сигнальному пути [55]. Чтобы установить, какие молекулярные механизмы лежат в основе биологического эффекта IL-4δ2 *in vivo*, требуются дополнительные исследования.

Примечательно, что, в отличие от экспериментов *in vitro*, в экспериментах *in vivo* IL-4δ2 не ингибировал эффекты полноразмерной формы, т.к. их совместное введение животным не предотвращало эозинофилию легких [55]. Возможно, такое различие обусловлено перекрестными связями между различными типами клеток организма, отсутствующими в клеточной культуре. Также авторы этого исследования считают, что в условиях *in vivo* укороченная изоформа может иметь более высокую стабильность (за счет взаимодействия с другими белковыми факторами) и тем самым оказывает биологический эффект, отсутствующий *in vitro* [55].

Таким образом, ингибирование полноразмерного IL-4 без подавления IL-4δ2 может уменьшить воспаление, опосредованное эозинофилами, и продукцию слизи, но не воспаление, опосредованное другими типами клеток, например, лимфоцитами. Подавление обоих изоформ IL-4, вероятно, будет иметь более выраженный противовоспалительный эффект. С другой стороны, подавление укороченной изоформы (IL-4δ2), которая выступает в роли ингибитора полноразмерного IL-4, может иметь обратный эффект, приводя к усилению IL-4-опосредованного воспаления. Требуются более детальные исследования прежде всего в экспериментах на животных для уточнения биологических эффектов IL-4δ2.

Роль IL-4δ2 в БА. В ранних исследованиях была продемонстрирована экспрессия мРНК IL-4δ2 в мононуклеарных клетках периферической крови, тимоцитах и клетках бронхоальвеолярного лаважа. Эти первичные исследования не выявили связи уровня экспрессии мРНК-транскрипта IL-4δ2 с наличием астмы или ее тяжестью, т.к. мРНК-транскрипты обоих изоформ обнаруживались как у больных, так и у здоровых [35, 50, 56, 57]. В то же время оставалось неясным, продуцируется ли белок IL-4δ2 и какими клетками осуществляется

его секреция, коррелирует ли его уровень с наличием патологии (бронхиальной астмы), а также оказывает ли он регулирующее действие на первичные Т-клетки пациентов и здоровых добровольцев?

Разработка антител, которые селективно распознают изоформу IL-4δ2, позволила провести исследования его возможной роли в различных патологиях человека, включая БА. Было показано, что, несмотря на выявленную экспрессию мРНК-транскрипта IL-4δ2 как у здоровых, так и у пациентов в широком спектре клеток, белок продуцируется в основном активированными Т-клетками пациентов, страдающих БА, а не здоровых добровольцев. При этом дифференцированные Th1-, Th2- и Th17-клетки не являются основными продуцентами IL-4δ2 [35]. Примечательно, что кинетика секреции IL-4δ2 Т-клетками отличалась от таковой для полноразмерной формы. IL-4 имел пик продукции через 12–24 часа после стимуляции и снижался через 48 часов. Напротив, IL-4δ2 не обнаруживался через 12–24 часа, при этом его концентрация достигала максимумов через 48 часов, оставалась высокой через 72 и 96 часов. Таким образом, продукция IL-4δ2 активированными Т-клетками запускается позже, в сравнении с IL-4 [35]; это свидетельствует о том, что в ходе реализации Th2-иммунного ответа происходит переключение продукции с полноразмерной формы на IL-4δ2 путем альтернативного сплайсинга. Вероятнее всего, такое переключение регулируется избыточным Th2-иммунным ответом при БА. В то же время стимулы к переключению на продукцию IL-4δ2 на данный момент не установлены.

Первоначальные исследования в культуре клеток показали, что IL-4δ2 не проявлял собственных биологических эффектов (на пролиферацию Т-клеток, синтез IgE В-клетками и т.д.), а являлся антагонистом полноразмерной формы [34, 37]. Однако в последующих экспериментах на мышах было показано, что IL-4δ2 независимо от IL-4 индуцирует инфильтрацию легких лимфоцитами [36, 55]. В дальнейшем Luzina et al. [35] предположили, что IL-4δ2 активирует лимфоциты, не вызывая их пролиферацию. В действительности Т-клетки как здоровых людей, так и пациентов с астмой после стимуляции этой изоформой продуцировали Th1-цитокин – IFN γ , при этом IL-4δ2 не влиял на продукцию Th2-цитокинов (IL-5, IL-13) и Th17-цитокина (IL-17) [35]. Эти результаты согласуются с предыдущими данными исследований *in vivo* [36, 55], что позволяет считать IL-4δ2 про-Th1-цитокином.

Таким образом, IL-4 δ 2 продуцируется Т-клетками не только в виде мРНК, но и в качестве белка. При этом продукция данной изоформы ассоциирована с аллергической БА, вследствие чего она может выступать в роли биомаркера этой патологии. Выявленные различия в кинетике секреции IL-4 и IL-4 δ 2 позволяют предполагать, что IL-4 δ 2, являясь про-Th1-цитокином, негативно регулирует Th2-иммунный ответ при БА, что позволяет рассматривать ее как потенциальное терапевтическое средство.

РОЛЬ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ВАРИАНТОВ IL-5 В БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

Цитокин IL-5 был впервые описан несколькими независимыми группами ученых как фактор роста В-клеток и фактор дифференциации эозинофилов [58–61]. Несколько позднее был идентифицирован IL-5 человека [30]. IL-5 мыши имеет размер 133 а.о., включая последовательность сигнального пептида (21 а.о.) и три сайта для N-гликозилирования. IL-5 человека размером 134 а.о. имеет сигнальный пептид размером 22 а.о., а также два сайта для N-гликозилирования. Биологически активный IL-5 существует в виде димеров, связанных дисульфидными связями. Именно в форме димера он взаимодействует со своим рецептором, состоящим из двух цепей (IL5R α и IL5R β), и реализует свои биологические эффекты [62]. Этот цитокин индуцирует дифференцировку, рекрутирование и выживание эозинофилов в очаге воспаления, в т.ч. в легких при аллергической БА [63].

Возможная роль альтернативных форм IL-5 в БА. Анализ структуры гена показал, что IL-5 содержит 4 экзона. Соответственно, возможно существование нескольких альтернативных мРНК-транскриптов. Анализ базы данных показал отсутствие альтернативных мРНК-транскриптов IL-5 мыши. Однако имеются сведения о двух альтернативных транскриптах IL-5 человека (таблица). Первый (TranscriptID: ENST00000450655.1) содержит фрагменты трех экзонов (полностью отсутствует экзон-4) и может кодировать белок размером 51 а.о., а второй (TranscriptID: ENST00000462418.1) содержит фрагменты двух экзонов и не имеет ORF, поэтому, скорее всего, не кодирует белкового продукта.

В недавней работе описана идентификация новых мРНК-транскриптов IL-5 человека и мыши, которые лишены экзона-2 (33 нуклеотида) [33]. Альтернативные тран-

скрипты были обозначены как mIL-5 δ 2 (для мыши) и hIL-5 δ 2 (для человека). Важно отметить, что экзон-2 гена человека имеет такой же размер (33 п.н.), что и экзон-2 гена мыши. Следовательно, предполагаемые белковые изоформы на 11 а.о. короче полноразмерных IL-5 человека и мыши. Делеция экзона-2 может происходить в результате альтернативного сплайсинга. Показано, что мРНК IL-5 δ 2 экспрессируется вместе с канонической формой в различных активированных лимфоидных тканях мыши (тимус, селезенка, лимфоузлы и клетки крови). Как и IL-4 δ 2, мРНК-транскрипт IL-5 δ 2 человека наблюдали в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC, peripheral blood mononuclear cell) здоровых добровольцев и пациентов с аллергической астмой [33].

Поскольку отсутствуют коммерческие моноклональные антитела, которые индивидуально распознают укороченную или полноразмерную форму IL-5, были проведены эксперименты по индивидуальному клонированию этих транскриптов в плазмидный вектор с последующей экспрессией соответствующих белков (полноразмерного и укороченного) в клетках млекопитающих. В ходе этих экспериментов продемонстрировано, что новая изоформа IL-5 δ 2 может экспрессироваться в виде белка внутри клеток и секретироваться во внеклеточное пространство, но с меньшей интенсивностью (примерно на 30%) в сравнении с полноразмерным IL-5. С применением поликлональных антител (распознают обе изоформы IL-5) и метода конфокальной микроскопии продемонстрировано, что полноразмерный IL-5 преимущественно локализуется в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), тогда как укороченная изоформа обнаруживается в ЭР в меньшей степени. Обычно сначала цитокины образуются в ЭР, а затем транспортируются в комплекс Гольджи. Такая измененная компартментализация белка IL-5 δ 2 (вне ЭР) может свидетельствовать о его частичной деградации и нарушенной секреции. Тем не менее наблюдаемые различия в экспрессии и секреции полноразмерной и укороченной форм не были существенными [33].

Примечательно, что идентифицированные транскрипты IL-5 δ 2 (человека и мыши) имеют значительное сходство с ранее идентифицированным транскриптом IL-4 δ 2; у обоих происходит делеция второго экзона (который кодирует 11 и 16 а.о. соответственно) [64]. IL-4 δ 2 человека экспрессируется в клетке на уровне белка [50, 55, 56], специфически взаимодействует с рецептором и конкурирует

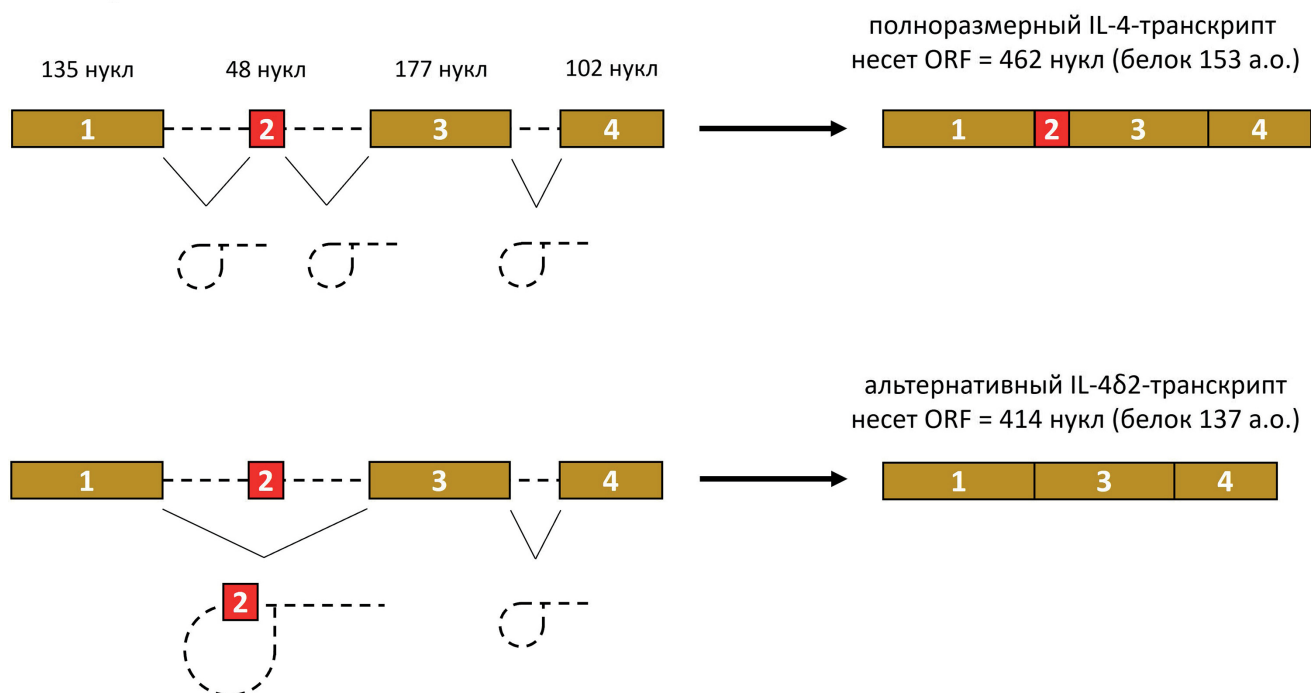
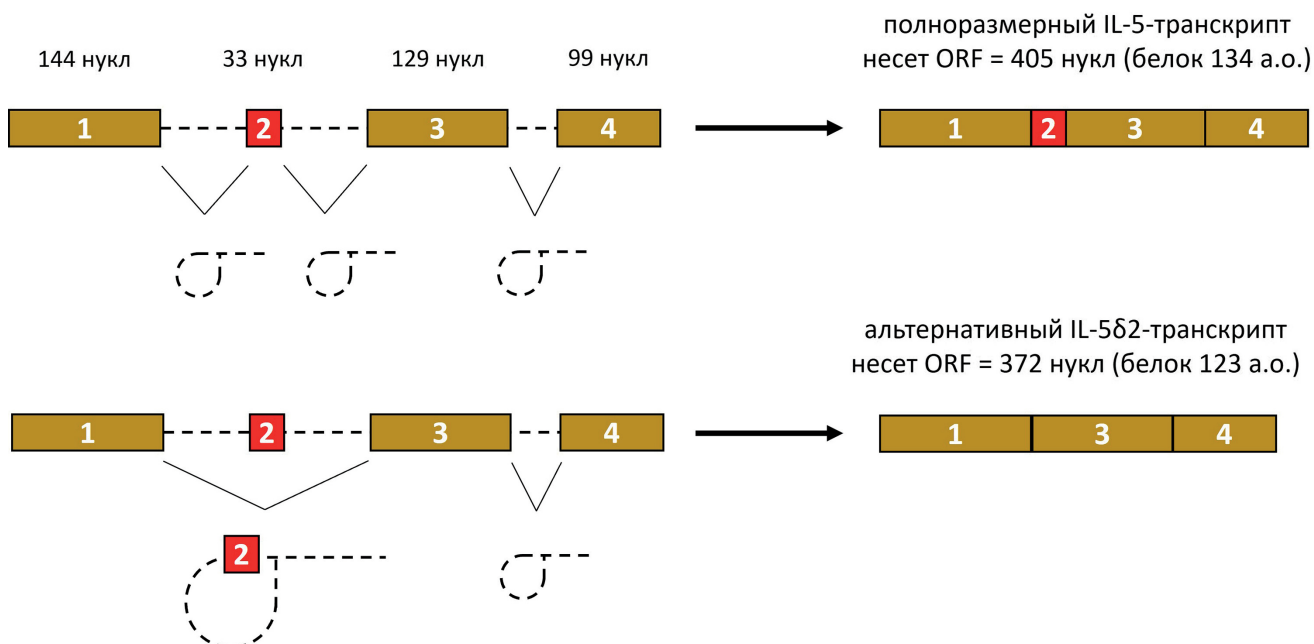
IL-4 пре-мРНК**IL-5 пре-мРНК**

Рис. 3. Механизм альтернативного сплайсинга генов, кодирующих IL-4 и IL-5 человека. На рисунке представлена схема структуры интронов и экзонов генов, кодирующих IL-4 и IL-5. В ходе созревания из пре-мРНК в результате сплайсинга удаляются интроны, а четыре экзона объединяются в зрелый мРНК-транскрипт. Сплайсинг, в ходе которого происходит первый разрыв цепи пре-мРНК на 5'-конце интрона, а второй — на 3'-конце интрона и последующее объединение двух экзонов, осуществляется сплайсосомой (мультисубъединичным комплексом). В результате образуется зрелый мРНК-транскрипт и интрон в циклической форме. В ходе альтернативного сплайсинга происходит удаление самого короткого экзона-2 (альтернативного экзона — отмечен красным) и формирование альтернативного мРНК-транскрипта, включающего экзоны 1, 3 и 4; нукл — нуклеотид

с полноразмерным IL-4 [34, 37]. Таким образом, аффинность IL-4δ2 к рецептору существенно не изменяется, несмотря на делецию 16 а.о. [65].

Размер белка, который транслируется с мРНК IL-5δ2 мыши, должен составлять 122 а.о., а человека — 123 а.о., что на 11 а.о. меньше полноразмерных цитокинов. Ввиду того что происходит делеция самого короткого экзона, предполагаемый белок IL-5δ2 может быть структурно очень похож на полноразмерный IL-5. Однако в проведенном исследовании продемонстрировано, что белок IL-5δ2 мыши обнаруживался с помощью поликлональных, а не моноклональных антител. Это позволяет предположить, что 11 а.о., соответствующие экзону-2, могут быть важны для формирования эпитопной структуры цитокина [33].

Предшествующее исследование [65] показало, что полноразмерный белок IL-5 состоит из четырех α-спиралей (α1–α4), соединенных тремя петлями, содержащими β-тяжи и неупорядоченные участки. Важно отметить, что изоформа IL-5δ2, несмотря на делецию экзона-2, сохраняет консервативный остаток цистеина в положении 62. Этот остаток необходим для образования функционального гомодимера, т.к. он участвует в образовании двух межмолекулярных дисульфидных связей Cys62–Cys104 и Cys104–Cys62. Одиннадцать а.о., отсутствующих в IL-5δ2, полностью локализованы в петле α1–α2. Эти остатки участвуют в образовании межцепочечных водородных связей, тем самым стабилизируют структуру димера IL-5 и формируют правильную ориентацию для взаимодействия с рецептором. Следовательно, делеция этого фрагмента потенциально может влиять на фолдинг белка IL-5δ2 и его взаимодействие с рецептором. Кроме того, показано, что не только петля α3–α4, но и петля α1–α2 принимают непосредственное участие во взаимодействии IL-5 с рецептором [66].

Способен ли IL-5δ2 связываться с рецептором и конкурентно ингибировать полноразмерный IL-5, еще предстоит выяснить. Создание реагентов для специфического обнаружения белка IL-5δ2, очистка рекомбинантного белка, исследования цитокиновых рецепторов, селективный нокдаун мРНК, кодирующих изоформы IL-5, и другие методы позволят уточнить функцию ранее неизвестной изоформы IL-5.

Таким образом, IL-5δ2 образуется в результате альтернативного сплайсинга из пре-мРНК путем делеции самого короткого экзона-2 и включения в зрелый транскрипт экзонов 1, 3 и 4. IL-5δ2 имеет значительное сходство с ранее идентифицированной изоформой IL-4δ2,

которая также в результате альтернативного сплайсинга из четырех экзонов утрачивает самый короткий экзон-2 (рис. 3). Изоформа IL-4δ2 была идентифицирована значительно ранее, чем IL-5δ2, поэтому ее биологические эффекты более изучены. Согласно текущим представлениям, IL-4δ2 негативно регулирует активность полноразмерной формы IL-4, в частности, нивелирует избыточный Th2-иммунный ответ при БА. Учитывая значительное сходство IL-4δ2 и IL-5δ2, можно полагать, что IL-5δ2 также может играть определенную роль в патогенезе БА, например, негативно регулировать активность полноразмерного IL-5 и уменьшать избыточное эозинофильное воспаление в легких. Однако данное предположение требует подтверждения прежде всего в экспериментах *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Аллергическая БА к настоящему времени является самым изученным фенотипом этого заболевания. Многими исследованиями показано, что Th2-цитокины (IL-4, IL-5, IL-9 и IL-13) — это одни из ключевых участников ее патогенеза. Именно они формируют основные проявления патологии: продукцию IgE, эозинофильное воспаление легких, гиперреактивность бронхов и гиперсекрецию слизи респираторным эпителием [4]. Гены, кодирующие эти цитокины, состоят из нескольких экзонов; IL-4, IL-5 и IL-13 имеют четыре экзона, а IL-9 — пять (таблица). Благодаря такому мозаичному строению генов возможно существование альтернативных изоформ этих цитокинов. Анализ научной литературы и баз данных показал наличие альтернативных мРНК-транскриптов для IL-4 [67], IL-5 [33] и IL-13 (база данных строения геномов позвоночных, ensembl.org). При этом у IL-4 и IL-5 выявлены альтернативные транскрипты, которые несут ORF, а следовательно, могут кодировать функциональные белки (таблица).

Для IL-4 была идентифицирована изоформа IL-4δ2, которая в результате альтернативного сплайсинга утратила часть, кодируемую экзонами-2. Т-Клетки пациентов, у которых была диагностирована аллергическая астма, способны секретировать IL-4δ2, тогда как Т-клетки здоровых добровольцев — нет. Это обстоятельство позволяет рассматривать IL-4δ2 в качестве биомаркера этой патологии [67]. Кроме того, обобщив результаты опубликованных исследований, можно полагать, что укороченная изоформа IL-4δ2, скорее всего, является

негативным регулятором полноразмерного IL-4, так как способна конкурировать с ним за связывание с рецептором, а также активировать экспрессию IFN γ , который является антагонистом IL-4 [67]. Учитывая это, IL-4 δ 2 можно рассматривать в качестве потенциального терапевтического средства для подавления избыточного Th2-иммунного ответа, который лежит в основе патогенеза аллергической БА.

Примечательно, что структура экзонов гена, кодирующего IL-5, очень сходна с таковой для IL-4. Оба гена кодируют четыре экзона, при этом самый короткий — это экзон-2. Как и в случае с IL-4, для IL-5 был обнаружен альтернативный мРНК-транскрипт с делецией экзона-2 (IL-5 δ 2). Клонирование этого транскрипта в экспрессионный вектор позволило установить, что IL-5 δ 2 может синтезироваться в виде белка и секретироваться во внеклеточное пространство. Более того, делеция экзона-2 не затрагивает остатки цистеина, необходимые для образования функционального гомодимера. Все эти факты позволяют с высокой степенью вероятности предполагать существование естественной альтернативной изоформы IL-5 δ 2, которая может играть роль негативного регулятора IL-5 в патогенезе БА. Создание моноклональных антител для специфического обнаружения IL-5 δ 2, а также получение рекомбинантного белка позволит в будущем раскрыть его биологическую функцию. В случае подтверждения способности новой изоформы подавлять неблагоприятные эффекты IL-5 она также может выступать в роли потенциального терапевтического средства для лечения аллергической БА.

В настоящее время появляется много лекарственных средств для так называемой антицитокиновой терапии бронхиальной астмы [15]. Суть этого подхода заключается в создании ингибиторов патогенетически значимых цитокинов (прежде всего, Th2-цитокинов). В качестве таких ингибиторов часто

используют моноклональные антитела, которые нейтрализуют либо сам цитокин, либо его рецептор, тем самым прерывая развитие патологического процесса [15]. Многие препараты на основе моноклональных антител, разработанные для терапии БА, имеют ограниченную эффективность [15]. Одним из наиболее успешных препаратов для лечения БА является Dupilumab [68]. Он содержит моноклональное антитело, которое нейтрализует общую цепь рецептора для IL-4 и IL-13 (IL-4R α), тем самым нивелирует патологические эффекты обоих цитокинов одновременно [69]. Клинические исследования подтвердили его эффективность (прежде всего, при лечении пациентов с высоким уровнем эозинофилов) [70–72], а сам препарат одобрен для медицинского применения во многих странах мира, в том числе и в России. Наряду с ограниченной эффективностью [15], один из главных недостатков препаратов на основе моноклональных антител — высокая стоимость [73, 74]. В то же время получение рекомбинантных белковых ингибиторов (например, IL-4 δ 2 и IL-5 δ 2) является более дешевой технологией, чем получение моноклональных антител, что может открыть новые перспективы в создании противовоспалительных препаратов.

Вклад авторов. И.П. Шиловский, М.Р. Хаитов — концепция и руководство работой; В.И. Ковчина — написание текста; Е.Д. Тимофеевич, А.А. Никольский — редактирование текста статьи, подготовка иллюстраций.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-24-00546, <https://rscf.ru/project/23-24-00546/>).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Global Initiative for Asthma (2022) *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*.
2. Soriano, J. B., Abajobir, A. A., Abate, K. H., Abera, S. F., Agrawal, A., Ahmed, M. B., Aichour, A. N., Aichour, I., Eddine Aichour, M. T., Alam, K., Alam, N., Alkaabi, J. M., Al-Maskari, F., Alvis-Guzman, N., Amberbir, A., Amoako, Y. A., Ansha, M. G., Antó, J. M., Asayesh, H., Atey, T. M., Avokpaho, E. F. G. A., Barac, A., Basu, S., Bedi, N., Bensenor, I. M., Berhane, A., Beyene, A. S., Bhutta, Z. A., Biryukov, S., Boneya, D. J., Brauer, M., Carpenter, D. O., Casey, D., Christopher, D. J., Dandona, L., Dandona, R., Dharmaratne, S. D., Do, H. P., Fischer, F., Gebrehiwot, T. T., Geleto, A., Ghoshal, A. G., Gillum, R. F., Mohamed Ginawi, I. A., Gupta, V., Hay, S. I., Hedayati, M. T., Horita, N., Hosgood, H. D.,

- Jakovljevic, M. M. B., James, S. L., Jonas, J. B., Kasaecian, A., Khader, Y. S., Khalil, I. A., Khan, E. A., Khang, Y. H., Khubchandani, J., Knibbs, L. D., Kosen, S., Koul, P. A., Kumar, G. A., Leshargie, C. T., Liang, X., Magdy Abd El Razek, H., Majeed, A., Malta, D. C., Manhertz, T., Marquez, N., Mehari, A., Mensah, G. A., Miller, T. R., Mohammad, K. A., Mohammed, K. E., Mohammed, S., Mokdad, A. H., Naghavi, M., Nguyen, C. T., Nguyen, G., Nguyen, Q. Le, Nguyen, T. H., Ningrum, D. N. A., Nong, V. M., Obi, J. I., Odeyemi, Y. E., Ogbo, F. A., Oren, E., Mahesh, P. A., Park, E. K., Patton, G. C., Paulson, K., Qorbani, M., Quansah, R., Rafay, A., Rahman, M. H. U., Rai, R. K., Rawaf, S., Reinig, N., Safiri, S., Sarmiento-Suarez, R., Sartorius, B., Savic, M., Sawhney, M., Shigematsu, M., Smith, M., Tadese, F., Thurston, G. D., Topor-Madry, R., Tran, B. X., Ukwaja, K. N., van Boven, J. F. M., Vlassov, V. V., Vollset, S. E., Wan, X., Werdecker, A., Hanson, S. W., Yano, Y., Yimam, H. H., Yonemoto, N., Yu, C., Zaidi, Z., Sayed Zaki, M. El, Lopez, A. D., Murray, C. J. L., and Vos, T. (2017) Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015, *Lancet Respir. Med.*, **5**, 691-706, doi: 10.1016/S2213-2600(17)30293-X.
3. Avdeev, S. N., Nenasheva, N. M., Zhudnikov, K. V., Petrakovskaya, V. A., and Izyumova, G. V. (2018) Prevalence, morbidity, phenotypes and other characteristics of severe bronchial asthma in Russian Federation, *Pulmonologiya*, **28**, 341-358, doi: 10.18093/0869-0189-2018-28-3-341-358.
4. Bush, A. (2019) Pathophysiological mechanisms of asthma, *Front. Pediatr.*, **7**, 68, doi: 10.3389/fped.2019.00068.
5. Kuruvilla, M. E., Lee, F. E. H., and Lee, G. B. (2019) Understanding asthma phenotypes, endotypes, and mechanisms of disease, *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **56**, 219-233, doi: 10.1007/s12016-018-8712.
6. Shilovskiy, I. P., Nikolskii, A. A., Kurbacheva, O. M., and Khaitov, M. R. (2020) Modern view of neutrophilic asthma molecular mechanisms and therapy, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 854-868, doi: 10.1134/S0006297920080027.
7. Lambrecht, B. N., Persson, E. K., and Hammad, H. (2017) Myeloid cells in asthma, *Microbiol. Spectr.*, **5**, 1-17, doi: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0053-2016.
8. Barnes, P. J. (2001) Th2 cytokines and asthma: an introduction, *Respir. Res.*, **2**, 64-65, doi: 10.1186/rr39.
9. Choi, J., Lim, J. W., and Kim, H. (2015) Lycopene inhibits house dust mites-induced TLR4 activation and oxidative stress in respiratory epithelial cells, *Free Radic. Biol. Med.*, **86**, S21, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.082.
10. Shin, S. H., Ye, M. K., Lee, D. W., Chae, M. H., and Han, B. D. (2020) Nasal epithelial cells activated with *Alternaria* and house dust mite induce not only Th2 but also Th1 immune responses, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2693, doi: 10.3390/ijms21082693.
11. Wang, C., Liu, Q., Chen, F., Xu, W., Zhang, C., and Xiao, W. (2016) IL-25 promotes Th2 immunity responses in asthmatic mice via nuocytes activation, *PLoS One*, **11**, e0162393, doi: 10.1371/journal.pone.0162393.
12. Eiwegger, T., and Akdis, C. A. (2011) IL-33 links tissue cells, dendritic cells and Th2 cell development in a mouse model of asthma, *Eur. J. Immunol.*, **41**, 1535-1538, doi: 10.1002/eji.201141668.
13. Khaitov, M. R., Gaisina, A. R., Shilovskiy, I. P., Smirnov, V. V., Ramenskaia, G., Nikonova, A. A., and Khaitov, R. M. (2018) The role of interleukin 33 in pathogenesis of bronchial asthma. New experimental data, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 13-25, doi: 10.1134/S0006297918010029.
14. Gurram, R. K., Wei, D., Yu, Q., Butcher, M. J., Chen, X., Cui, K., Hu, G., Zheng, M., Zhu, X., Oh, J., Sun, B., Urban, J. F., Zhao, K., Leonard, W. J., and Zhu, J. (2023) Crosstalk between ILC2s and Th2 cells varies among mouse models, *Cell Rep.*, **42**, 112073, doi: 10.1016/j.celrep.2023.112073.
15. Shilovskiy, I. P., Eroshkina, D. V., Babakhin, A. A., and Khaitov, M. R. (2017) Anticytokine therapy of allergic asthma, *Mol. Biol.*, **51**, 1-13, doi: 10.7868/S0026898416060197.
16. Gersuk, G. M., Underhill, D. M., Zhu, L., and Marr, K. A. (2006) Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states, *J. Immunol.*, **176**, 3717-3724, doi: 10.4049/jimmunol.176.6.3717.
17. Ito, T., Hirose, K., Norimoto, A., Tamachi, T., Yokota, M., Saku, A., Takatori, H., Saijo, S., Iwakura, Y., and Nakajima, H. (2017) Dectin-1 plays an important role in house dust mite-induced allergic airway inflammation through the activation of CD11b⁺ dendritic cells, *J. Immunol.*, **198**, 61-70, doi: 10.4049/jimmunol.1502393.
18. Komlósi, Z. I., van de Veen, W., Kovács, N., Szűcs, G., Sokolowska, M., O'Mahony, L., Akdis, M., and Akdis, C. A. (2022) Cellular and molecular mechanisms of allergic asthma, *Mol. Aspects Med.*, **85**, 100995, doi: 10.1016/j.mam.2021.100995.
19. Habib, N., Pasha, M. A., and Tang, D. D. (2022) Current understanding of asthma pathogenesis and biomarkers, *Cells*, **11**, 2764, doi: 10.3390/cells11172764.
20. Gans, M. D., and Gavrilo, T. (2020) Understanding the immunology of asthma: pathophysiology, biomarkers, and treatments for asthma endotypes, *Paediatr. Respir. Rev.*, **36**, 118-127, doi: 10.1016/j.prrv.2019.08.002.
21. Singh, R. K., and Cooper, T. A. (2012) Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics, *Trends Mol. Med.*, **18**, 472-482, doi: 10.1016/j.molmed.2012.06.006.

22. Sahebi, M., Hanafi, M. M., van Wijnen, A. J., Azizi, P., Abiri, R., Ashkani, S., and Taheri, S. (2016) Towards understanding pre-mRNA splicing mechanisms and the role of SR proteins, *Gene*, **587**, 107-119, doi: 10.1016/j.gene.2016.04.057.
23. Chen, M., and Manley, J. L. (2009) Mechanisms of alternative splicing regulation: Insights from molecular and genomics approaches, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 741-754, doi: 10.1038/nrm2777.
24. Zhang, Y., Qian, J., Gu, C., and Yang, Y. (2021) Alternative splicing and cancer: a systematic review, *Signal Transduct. Target. Ther.*, **6**, 78, doi: 10.1038/s41392-021-00486-7.
25. Hiller, M., Zhang, Z., Backofen, R., and Stamm, S. (2007) Pre-mRNA secondary structures influence exon recognition, *PLoS Genet.*, **3**, 2147-2155, doi: 10.1371/journal.pgen.0030204.
26. De La Mata, M., Alonso, C. R., Kadener, S., Fededa, J. P., Blaustein, M., Pelisch, F., Cramer, P., Bentley, D., and Kornblihtt, A. R. (2003) A slow RNA polymerase II affects alternative splicing *in vivo*, *Mol. Cell*, **12**, 525-532, doi: 10.1016/j.molcel.2003.08.001.
27. Marasco, L. E., and Kornblihtt, A. R. (2023) The physiology of alternative splicing, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **24**, 242-254, doi: 10.1038/s41580-022-00545-z.
28. Peng, Q., Zhou, Y., Oyang, L., Wu, N., Tang, Y., Su, M., Luo, X., Wang, Y., Sheng, X., Ma, J., and Liao, Q. (2022) Impacts and mechanisms of alternative mRNA splicing in cancer metabolism, immune response, and therapeutics, *Mol. Ther.*, **30**, 1018-1035, doi: 10.1016/j.ymthe.2021.11.010.
29. Alms, W. J., Atamas, S. P., Yurovsky, V. V., and White, B. (1996) Generation of a variant of human interleukin-4 by alternative splicing, *Mol. Immunol.*, **33**, 361-370, doi: 10.1016/0161-5890(95)00154-9.
30. Kinashi, T., Harada, N., Severinson, E., Tanabe, T., Sideras, P., Konishi, M., Azuma, C., Tominaga, A., Bergstedt-Lindqvist, S., Takahashi, M., Matsuda, F., Yaoita, Y., Takatsu, K., and Honjo, T. (1986) Cloning of complementary DNA encoding T-cell replacing factor and identity with B-cell growth factor II, *Nature*, **324**, 70-73, doi: 10.1038/324070a0.
31. McKenzie, A. N., Li, X., Largaespada, D. A., Sato, A., Kaneda, A., Zurawski, S. M., Doyle, E. L., Milatovich, A., Francke, U., and Copeland, N. G. (1993) Structural comparison and chromosomal localization of the human and mouse IL-13 genes, *J. Immunol.*, **150**, 5436-5444, doi: 10.4049/jimmunol.150.12.5436.
32. Townsend, M. J., Fallon, P. G., Matthews, D. J., Smith, P., Jolin, H. E., and McKenzie, A. N. J. (2000) IL-9-deficient mice establish fundamental roles for IL-9 in pulmonary mastocytosis and goblet cell hyperplasia but not T cell development, *Immunity*, **13**, 573-583, doi: 10.1016/S1074-7613(00)00056-X.
33. Shilovskiy, I., Andreev, S., Mazurov, D., Barvin-skaia, E., Bolotova, S., Nikolskii, A., Sergeev, I., Maerle, A., Kudlay, D., and Khaitov, M. (2020) Identification of a novel splice variant for mouse and human interleukin-5, *Heliyon*, **6**, e03586, doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03586.
34. Atamas, S. P., Choi, J., Yurovsky, V. V., and White, B. (1996) An alternative splice variant of human IL-4, IL-4 delta 2, inhibits IL-4-stimulated T cell proliferation, *J. Immunol.*, **156**, 435-441.
35. Luzina, I. G., Lockatell, V., Lavanian, S., Pickering, E. M., Kang, P. H., Bashkatova, Y. N., Andreev, S. M., and Atamas, S. P. (2012) Natural production and functional effects of alternatively spliced interleukin-4 protein in asthma, *Cytokine*, **58**, 20-26, doi: 10.1016/j.cyto.2011.12.017.
36. Luzina, I. G., Lockatell, V., Todd, N. W., Keegan, A. D., Hasday, J. D., and Atamas, S. P. (2011) Splice isoforms of human interleukin-4 are functionally active in mice *in vivo*, *Immunology*, **132**, 385-393, doi: 10.1111/j.1365-2567.2010.03393.x.
37. Arinobu, Y., Atamas, S. P., Otsuka, T., Niino, H., Yamaoka, K., Mitsuyasu, H., Niho, Y., Hamasaki, N., White, B., and Izuhara, K. (1999) Antagonistic effects of an alternative splice variant of human IL-4, IL-4delta2, on IL-4 activities in human monocytes and B cells, *Cell. Immunol.*, **191**, 161-167, doi: 10.1006/cimm.1998.1431.
38. Zav'yalov, V. P., Denesyuk, A. I., White, B., Yurovsky, V. V., Atamas, S. P., and Korpela, T. (1997) Molecular model of an alternative splice variant of human IL-4, IL-4delta2, a naturally occurring inhibitor of IL-4-stimulated T cell proliferation, *Immunol. Lett.*, **58**, 149-152, doi: 10.1016/S0165-2478(97)00083-7.
39. Nelms, K., Keegan, A. D., Zamorano, J., Ryan, J. J., and Paul, W. E. (1999) The IL-4 receptor: Signaling mechanisms and biologic functions, *Annu. Rev. Immunol.*, **17**, 701-738, doi: 10.1146/annurev.immunol.17.1.701.
40. Moran, A., and Pavord, I. D. (2020) Anti-IL-4/IL-13 for the treatment of asthma: the story so far, *Expert. Opin. Biol. Ther.*, **20**, 283-294, doi: 10.1080/14712598.2020.1714027.
41. Nur Husna, S. M., Md Shukri, N., Mohd Ashari, N. S., and Wong, K. K. (2022) IL-4/IL-13 axis as therapeutic targets in allergic rhinitis and asthma, *PeerJ*, **10**, e13444, doi: 10.7717/peerj.13444.
42. Eum, S. Y., Maghni, K., Tolloczko, B., Eidelman, D. H., and Martin, J. G. (2005) IL-13 may mediate allergen-induced hyperresponsiveness independently of IL-5 or eotaxin by effects on airway smooth muscle, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **288**, 576-584, doi: 10.1152/ajplung.00380.2003.
43. Otsuka, T., Villaret, D., Yokota, T., Takebe, Y., Lee, F., Arai, N., and Arai, K. I. (1987) Structural analysis of the mouse chromosomal gene encoding interleukin 4 which expresses B cell, T cell and mast cell stimulating activities, *Nucleic Acids Res.*, **15**, 333-344, doi: 10.1093/nar/15.1.333.

44. Arai, N., Nomura, D., Villaret, D., DeWaal Malefijt, R., Seiki, M., Yoshida, M., Minoshima, S., Fukuyama, R., Maekawa, M., and Kudoh, J. (1989) Complete nucleotide sequence of the chromosomal gene for human IL-4 and its expression, *J. Immunol.*, **142**, 274-282, doi: 10.4049/jimmunol.142.1.274.
45. Yatsenko, O. P., Filipenko, M. L., Khrapov, E. A., Voronina, E. N., Kozlov, V. A., and Sennikov, S. V. (2004) Alternative splicing of mRNA of mouse interleukin-4 and interleukin-6, *Cytokine*, **28**, 190-196, doi: 10.1016/j.cyto.2004.08.009.
46. Orsini, B., Vivas, J. R., Ottanelli, B., Amedei, A., Surrenti, E., Galli, A., Milani, S., Pinzani, P., Del Prete, G., Surrenti, C., Baldari, C. T., Touati, E., and D'Elis, M. M. (2007) Human gastric epithelium produces IL-4 and IL-4 δ 2 isoform only upon *Helicobacter pylori* infection, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, **20**, 809-818, doi: 10.1177/039463200702000417.
47. Orsini, B., Ottanelli, B., Amedei, A., Surrenti, E., Capanni, M., Del Prete, G., Amorosi, A., Milani, S., D'Elis, M. M., and Surrenti, C. (2003) *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island is associated with reduced expression of interleukin-4 (IL-4) mRNA and modulation of the IL-4 δ 2 mRNA isoform in human gastric mucosa, *Infect. Immun.*, **71**, 6664-6667, doi: 10.1128/IAI.71.11.6664-6667.2003.
48. Pouliot, P., Turmel, V., G  linas,   ., Laviolette, M., and Bissonnette,   . Y. (2005) Interleukin-4 production by human alveolar macrophages, *Clin. Exp. Allergy*, **35**, 804-810, doi: 10.1111/j.1365-2222.2005.02246.x.
49. Plante, S., Semlali, A. H., Joubert, P., Bissonnette,   ., Laviolette, M., Hamid, Q., and Chakir, J. (2006) Mast cells regulate procollagen I (α 1) production by bronchial fibroblasts derived from subjects with asthma through IL-4/IL-4 δ 2 ratio, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **117**, 1321-1327, doi: 10.1016/j.jaci.2005.12.1349.
50. Glare, E. M., Divjak, M., Rolland, J. M., and Walters, E. H. (1999) Asthmatic airway biopsy specimens are more likely to express the IL-4 alternative splice variant IL-4 δ 2, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **104**, 978-982, doi: 10.1016/S0091-6749(99)70078-3.
51. De Moraes-Pinto, M. I., Vince, G. S., Flanagan, B. F., Hart, C. A., and Johnson, P. M. (1997) Localization of IL-4 and IL-4 receptors in the human term placenta, decidua and amniochorionic membranes, *Immunology*, **90**, 87-94, doi: 10.1046/j.1365-2567.1997.00139.x.
52. Elser, B., Lohoff, M., Kock, S., Giaisi, M., Kirchhoff, S., Krammer, P. H., and Li-Weber, M. (2002) IFN- γ represses IL-4 expression via IRF-1 and IRF-2, *Immunity*, **17**, 703-712, doi: 10.1016/S1074-7613(02)00471-5.
53. Oriss, T. B., McCarthy, S. A., Morel, B. F., Campana, M. A., and Morel, P. A. (1997) Crossregulation between T helper cell (Th)1 and Th2: Inhibition of Th2 proliferation by IFN-gamma involves interference with IL-1, *J. Immunol.*, **158**, 3666-3672, doi: 10.4049/jimmunol.158.8.3666.
54. Gajewski, T. F., and Fitch, F. W. (1988) Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones, *J. Immunol.*, **140**, 4245-4252, doi: 10.4049/jimmunol.140.12.4245.
55. Luzina, I. G., Lockatell, V., Todd, N. W., Highsmith, K., Keegan, A. D., Hasday, J. D., and Atamas, S. P. (2011) Alternatively spliced variants of interleukin-4 promote inflammation differentially, *J. Leukoc. Biol.*, **89**, 763-770, doi: 10.1189/jlb.0510271.
56. Seah, G. T., Gao, P. S., Hopkin, J. M., and Rook, G. A. W. (2001) Interleukin-4 and its alternatively spliced variant (IL-4 δ 2) in patients with atopic asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **164**, 1016-1018, doi: 10.1164/ajrccm.164.6.2012138.
57. Glare, E. M., Divjak, M., Bailey, M. J., and Walters, E. H. (2001) The usefulness of competitive PCR: airway gene expression of IL-5, IL-4, IL-4 δ 2, IL-2, and ifn γ in asthma, *Thorax*, **56**, 541-548, doi: 10.1136/thorax.56.7.541.
58. Schimpl, A., and Wecker, E. (1972) Replacement of t-cell function by a t-cell product, *Nat. New Biol.*, **237**, 15-17, doi: 10.1038/newbio237015a0.
59. Dutton, R. W., Falkoff, R., Hirst, J., Hoffman, M., Kappler, J., Kettman, J. R., Lesley, J. F., and Vann, D. (1971) Is there evidence for a nonantigen specific diffusible chemical mediator from the thymus-derived cell in the initiation of the immune response? *Prog. Immunol.*, **1**, 355-368, doi: 10.1016/B978-0-12-057550-3.50033-8.
60. Howard, M., Farrar, J., Hilfiker, M., Johnson, B., Takatsu, K., Hamaoka, T., and Paul, W. E. (1982) Identification of a T cell-derived b cell growth factor distinct from interleukin 2, *J. Exp. Med.*, **155**, 914-923, doi: 10.1084/jem.155.3.914.
61. Sanderson, C. J., Warren, D. J., and Strath, M. (1985) Identification of a lymphokine that stimulates eosinophil differentiation *in vitro*. Its relationship to interleukin 3, and functional properties of eosinophils produced in cultures, *J. Exp. Med.*, **162**, 60-74, doi: 10.1084/jem.162.1.60.
62. Milburn, M. V., Hassell, A. M., Lambert, M. H., Jordan, S. R., Proudfoot, A. E. I., Graber, P., and Wells, T. N. C. (1993) A novel dimer configuration revealed by the crystal structure at 2.4   resolution of human interleukin-5, *Nature*, **363**, 172-176, doi: 10.1038/363172a0.
63. Foster, P. S., Hogan, S. P., Ramsay, A. J., Matthaei, K. I., and Young, I. G. (1996) Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model, *J. Exp. Med.*, **183**, 195-201, doi: 10.1084/jem.183.1.195.
64. Vasiliev, A. M., Vasilenko, R. N., Kulikova, N. L., Andreev, S. M., Chikileva, I. O., Puchkova, G. Y., Kosarev, I. V., Khodyakova, A. V., Khlebnikov, V. S., Ptitsyn, L. R., Shcherbakov, G. Y., Uversky, V. N.,

- DuBuske, L. M., and Abramov, V. M. (2003) Structural and functional properties of IL-4 α 2, an alternative splice variant of human IL-4, *J. Proteome Res.*, **2**, 273–281, doi: 10.1021/pr025586y.
65. Tavernier, J., Tuijens, T., Plaetinck, G., Verhee, A., Fiers, W., and Devos, R. (1992) Molecular basis of the membrane-anchored and two soluble isoforms of the human interleukin 5 receptor alpha subunit, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 7041–7045, doi: 10.1073/pnas.89.15.7041.
 66. Kusano, S., Kukimoto-Niino, M., Hino, N., Ohsawa, N., Ikutani, M., Takaki, S., Sakamoto, K., Hara-Yokoyama, M., Shirouzu, M., Takatsu, K., and Yokoyama, S. (2012) Structural basis of interleukin-5 dimer recognition by its α receptor, *Protein Sci.*, **21**, 850–864, doi: 10.1002/pro.2072.
 67. Luzina, I. G., Keegan, A. D., Heller, N. M., Rook, G. A. W., Shea-Donohue, T., and Atamas, S. P. (2012) Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of “alternatives”, *J. Leukoc. Biol.*, **92**, 753–764, doi: 10.1189/jlb.0412214.
 68. Grey, A., and Katelaris, C. H. (2019) Dupilumab in the treatment of asthma, *Immunotherapy*, **11**, 859–872, doi: 10.2217/imt-2019-0008.
 69. Harb, H., and Chatila, T. A. (2020) Mechanisms of Dupilumab, *Clin. Exp. Allergy*, **50**, 5–14, doi: 10.1111/cea.13491.
 70. Bacharier, L. B., Maspero, J. F., Katelaris, C. H., Fiocchi, A. G., Gagnon, R., de Mir, I., Jain, N., Sher, L. D., Mao, X., Liu, D., Zhang, Y., Khan, A. H., Kapoor, U., Khokhar, F. A., Rowe, P. J., Deniz, Y., Ruddy, M., Laws, E., Patel, N., Weinreich, D. M., Yancopoulos, G. D., Amin, N., Mannent, L. P., Lederer, D. J., and Hardin, M. (2021) Dupilumab in children with uncontrolled moderate-to-severe asthma, *New Engl. J. Med.*, **385**, 2230–2240, doi: 10.1056/nejmoa2106567.
 71. Castro, M., Corren, J., Pavord, I. D., Maspero, J., Wenzel, S., Rabe, K. F., Busse, W. W., Ford, L., Sher, L., FitzGerald, J. M., Katelaris, C., Tohda, Y., Zhang, B., Staudinger, H., Pirozzi, G., Amin, N., Ruddy, M., Akinlade, B., Khan, A., Chao, J., Martincova, R., Graham, N. M. H., Hamilton, J. D., Swanson, B. N., Stahl, N., Yancopoulos, G. D., and Teper, A. (2018) Dupilumab efficacy and safety in moderate-to-severe uncontrolled asthma, *New Engl. J. Med.*, **378**, 2486–2496, doi: 10.1056/nejmoa1804092.
 72. Busse, W. W., Maspero, J. F., Rabe, K. F., Papi, A., Wenzel, S. E., Ford, L. B., Pavord, I. D., Zhang, B., Staudinger, H., Pirozzi, G., Amin, N., Akinlade, B., Eckert, L., Chao, J., Graham, N. M. H., and Teper, A. (2018) Liberty asthma QUEST: Phase 3 randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study to evaluate Dupilumab efficacy/safety in patients with uncontrolled, moderate-to-severe asthma, *Adv. Ther.*, **35**, 737–748, doi: 10.1007/S12325-018-0702-4.
 73. Tohda, Y., Matsumoto, H., Miyata, M., Taguchi, Y., Ueyama, M., Joulain, F., and Arakawa, I. (2022) Cost-effectiveness analysis of dupilumab among patients with oral corticosteroid-dependent uncontrolled severe asthma in Japan, *J. Asthma*, **59**, 2162–2173, doi: 10.1080/02770903.2021.1996596.
 74. Buendía, J., and Patiño, D. (2022) Dupilumab in children with moderate-to-severe asthma: a cost utility analysis, *Pediatr. Pulmonol.*, **57**, 2313–2319, doi: 10.1002/ppul.26033.

THE ROLE AND MOLECULAR MECHANISMS OF ALTERNATIVE SPLICING OF Th2-CYTOKINES IL-4 AND IL-5 IN ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA

Review

**I. P. Shilovskiy^{1*}, V. I. Kovchina¹, E. D. Timotievich¹,
A. A. Nikolskii¹, and M. R. Khaitov^{1,2}**

¹ *Institute of Immunology, National Research Center, Federal Medical-Biological Agency Russia,
115522 Moscow, Russia; e-mail: ip.shilovsky@nrcii.ru*

² *Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education
“N. I. Pirogov Russian National Research Medical University”
of the Ministry of Health of the Russian Federation,
117997 Moscow, Russia*

Bronchial asthma (BA) is a heterogeneous chronic inflammatory disease of the respiratory tract. Allergic asthma is the most common (up to 80% of cases) phenotype developing through Th2-dependent mechanisms involving cytokines: IL-4, IL-5, IL-9 and IL-13. The genes encoding Th2-cytokines have a mosaic structure (encode exons and introns). Therefore, several mature mRNA transcripts and protein isoforms

can be derived from a single mRNA precursor through alternative splicing, and they may contribute to BA pathogenesis. Analysis of published studies and databases revealed the existence of alternative mRNA transcripts for IL-4, IL-5, and IL-13. Alternative transcripts of IL-4 and IL-5 carry open reading frames and therefore can encode functional proteins. It was shown that not only alternative mRNA transcripts are exist for IL-4, but alternative protein isoforms, as well. Natural protein isoform IL-4 δ 2 lacking part encoded by exon-2 was identified. Similarly, alternative mRNA transcript omitting exon-2 (IL-5 δ 2) was also identified for IL-5. In this review, we summarize current knowledge about identified alternative mRNA transcripts and protein isoforms of Th2-cytokines, first of all IL-4 and IL-5. We have analyzed biological properties of alternative variants of these cytokines, their possible role in the allergic asthma pathogenesis, and considered their diagnostic and therapeutic potential.

Keywords: bronchial asthma, Th2-cytokines, alternative splicing, signaling pathway