



УДК 577.112.083

## С-РЕАКТИВНЫЙ БЕЛОК: СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА И СПОСОБЫ ЕГО ВЫДЕЛЕНИЯ

© 1995 г. Е. Г. Зотова<sup>#</sup>, Е. Б. Мысякин, С. Ж. Токсамбаева,  
К. С. Рубцов\*, Г. А. Серебренникова\*\*

Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи РАМН,  
123098, Москва, ул. Гамалеи, 18;

\*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва;

\*\*Московская академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, Москва

Поступила в редакцию 16.12.94 г.

В обзоре представлены данные о структуре С-реактивного белка (CRP), его свойствах и биосинтезе. Значительное внимание уделено специальному связыванию этого белка с так называемыми  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимыми и  $\text{Ca}^{2+}$ -независимыми лигандами: фосфохолинсодержащими соединениями, липопротеинами, хроматином, галактанами, поликатионами и др. Приводятся сведения о взаимодействии CRP с ионами  $\text{Ca}^{2+}$ . Подробно рассмотрены существующие способы его выделения и очистки. Широко освещен метод аффинной хроматографии как наиболее перспективный для получения высокоочищенного CRP.

**Ключевые слова:** С-реактивный белок, выделение, строение, свойства; лиганда С-реактивного белка.

### ВВЕДЕНИЕ

В последние годы внимание исследователей все больше привлекают процессы, развивающиеся в период острой фазы воспаления и представляющие собой комплекс ранних неспецифических защитных реакций организма. Особое место в их ряду занимает сывороточная реакция – чрезвычайно быстрое нарастание концентрации так называемых положительных острофазных протеинов. Среди них наиболее важен для человека С-реактивный белок (CRP), получивший свое название за способность связываться с соматическим полисахаридом клеточной стенки *Streptococcus pneumoniae* (C-PS).

Концентрация CRP, содержащегося в сыворотке крови здорового человека в следовых количествах, в период острой фазы воспаления может возрастать в 1000 - 2000 раз. В связи с этим наблюдение за содержанием CRP в сыворотке крови или других биологических жидкостях чело-

Сокращения: CRP – С-реактивный белок; SAP – сывороточный амилоид P; C-PS – соматический полисахарид клеточной стенки *Streptococcus pneumoniae*; PC – фосфохолин; PEA – фосфоэтаноламин; BSA – бычий сывороточный альбумин; LP – липопротеины; LPVLD – липопротеины очень низкой плотности; LPLD – липопротеины низкой плотности; LPHD – липопротеины высокой плотности; ароВ – аполипопротеин В; ароЕ – аполипопротеин E; PAF – фактор активации тромбоцитов.

<sup>#</sup> Автор для переписки.

века имеет большое значение для диагностики и прогноза развития воспалительного процесса.

Со времени открытия CRP [1] накоплен огромный фактический материал о его строении [2 - 4], биосинтезе [5 - 7], лигандной специфичности [8 - 15], физико-химических [2, 16] и биологических [17 - 19] свойствах. Несмотря на наличие большого количества обзоров и монографий по этой теме, изданных за рубежом [17 - 26], на русском языке опубликован только один обзор [27], посвященный в основном биологическим свойствам CRP и, естественно, не содержащий информации, полученной в последние годы.

В обзоре большое внимание уделено взаимодействию CRP с различными лигандами, во многом обусловливающему его основные биологические функции. Поскольку проблема разработки наиболее эффективных методов получения высокоочищенных препаратов CRP не утратила своей актуальности и сегодня ввиду необходимости изучения свойств и биологических функций CRP, а также создания лечебных препаратов на его основе, значительная часть обзора посвящена способам выделения и очистки CRP.

CRP широко представлен в эволюционном ряду, начиная с беспозвоночных. В зависимости от видовой специфичности отмечены определенные различия его структуры и лигандной специфичности. В данном обзоре основное место отведено CRP человека.

## I. СТРУКТУРА И СВОЙСТВА CRP

### 1.1. Молекулярная организация CRP

CRP человека – пентамер, состоящий из пяти идентичных негликозилированных и нековалентно связанных субъединиц [28]. По данным электронной микроскопии [28, 29], нативная молекула CRP образует кольцеобразную дисковую структуру с циклической пентамерной симметрией, составленную из одинаковых субъединиц глобулярной формы. Максимальный диаметр молекулы CRP равен 10 нм, диаметр субъединицы составляет 3.3 нм [28]. Белки с подобной достаточно редкой структурой принадлежат к так называемому семейству пентаксинов [17, 28]. С помощью метода КД было показано, что CRP содержит значительное количество участков с  $\alpha$ -спиралью (34%) и  $\beta$ -складчатой структурой (45%) [2].

Первичная структура CRP была впервые определена путем его секвенирования (187 аминокислот) [3] и впоследствии уточнена при определении последовательности кДНК CRP (206 аминокислот) [4, 30]. Считается, что результаты последних работ более достоверны [4, 17, 30], поэтому в обзоре порядковые номера аминокислот CRP будут соответствовать именно этой последовательности (рисунок). Молекулярная масса субъединицы CRP, рассчитанная исходя из последовательности в 206 аминокислотных остатков, составляет 23 098 Да [17]. Субъединица CRP представляет собой полипептидную цепь, содержащую одну дисульфидную связь, образуемую

```

1 QTDMSRKAFVFPKESDTSY
20 VSLKAPLTCKPLKAFTVCLHF
40 YTELSSSTRGYSIFSYATKRQ
60 DNEILIFWSKDIGYSFTVGG
80 SEILFEVPEVTVAAPYHICTS
100 WESASGIVEFWWDGKPRVRK
120 SLKKGYTVGAEAS11LGQEQQ
140 DSFGGNFEGSQSLVGDIGNV
160 NMWDFVLSLPDEINTIYLGGP
180 FSPNVLNWRALKYEVQGEVF
200 TKPQLWP

```

Аминокислотная последовательность субъединицы CRP [16, 17].

остатками цистеина в положениях 36 и 97 [4, 30]. С-Концевым остатком субъединицы CRP является пролин [3, 4]. Сведения относительно N-концевой аминокислоты противоречивы. По данным работы [3] на N-конце субъединицы CRP расположен остаток пироглутаминовой кислоты, а в работах [4, 5] указывается остаток глутамина. Гидроксиаминокислоты составляют 15% суммарного аминокислотного состава CRP, кислые – 20% [31].

Обнаружено значительное сходство CRP с нуклеоплазмином – белком, обладающим способностью накапливаться в ядре клетки [32]. CRP, как и нуклеоплазмин, состоит из 5 идентичных субъединиц. Субъединицы обоих белков обладают сходной молекулярной массой и близкими изоэлектрическими точками, термостабильны в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , связываются с гистонами и рибонуклеопротеинами [32]. Нуклеоплазмин содержит специфическую аминокислотную последовательность (так называемый “сигнал локализации в ядре”), которая облегчает проникновение белков с  $M$  более 40 кДа из цитоплазмы в ядро. CRP при микроинъекции в живую клетку способен также проникать из цитоплазмы в ядро, что, по-видимому, объясняется наличием в его аминокислотной последовательности аналогичного “сигнала локализации в ядре”, представляющего собой богатый лизином участок полипептидной цепи белка: Arg<sup>118</sup>-Lys-Ser-Leu-Lys-Lys<sup>123</sup> [32].

CRP может существовать в виде двух форм, обладающих различными физико-химическими свойствами и функциональными активностями: нативной (пентамерной) и моносубъединичной (нео-CRP) [16, 31, 33].

Пентамерная и моносубъединичная формы CRP различаются по подвижности в электрофорезе, выполняемом без обработки белка денатурирующими агентами. В присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  нативный CRP движется в сторону катода в область  $\gamma$ -глобулинов ( $\gamma$ -электрофоретическая подвижность), в то время как нео-CRP – в сторону анода в область  $\alpha$ -глобулинов ( $\alpha$ -электрофоретическая подвижность) [16]. Нативный CRP и его моносубъединичная форма имеют различные изоэлектрические точки:  $pI$  6.4 и 5.4 соответственно [16] (определение проводилось в отсутствии ионов кальция).

Диссоциация нативной молекулы CRP приводит к потере функции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого связывания белка с C-PS [16, 31]. Однако при этом сохраняется способность нео-CRP к  $\text{Ca}^{2+}$ -независимому взаимодействию с поликатионами [16].

С помощью моноклональных антител проведено картирование антигенных эпипотов нативной и моносубъединичной форм CRP. Установлено, что пентамерная форма CRP имеет пять эпипотов, а нео-CRP – три эпипота, один из которых у обеих форм является общим [33]. Таким образом,

выявлены эпитопы, имеющиеся в скрытом виде у нативной молекулы и экспонированные только в случае моносубъединичной формы CRP [33].

В организме нео-CRP обнаруживают ассоциированным с поверхностью периферических лимфоцитов крови [34]. В экспериментальных условиях для получения нео-CRP используют различные приемы. Например, молекула CRP необратимо диссоциирует на субъединицы в растворах с низкой ионной силой и при pH 9.5 [13]. Субъединицы CRP также могут быть получены при диализе раствора белка против 0.1 М трис-буфера (pH 9.0) в течение 36 ч [6]. При этом в пентамерной форме остается только 10% белка. Изменение pH водного раствора CRP до 2 - 3 также приводит к образованию нео-CRP [35, 36], однако в этом случае только 10% мономера остается растворимым, остальная часть необратимо денатурирует. Образование нео-CRP может быть достигнуто и с помощью многократных циклов замораживания-оттаивания или непрерывного нагревания раствора CRP при 63°C [17, 36], обработкой CRP 8 М мочевиной в присутствии 10 mM EDTA [16, 35] или 5 M гуанидин-HCl [31], а также при инкубации раствора CRP с полистирольными шариками [36, 37].

Возможна ли реконструкция нативной молекулы CRP из мономеров и при каких условиях это может произойти – очень важная и интересная проблема, ждущая своего решения.

### 1.2. Биосинтез CRP

CRP синтезируется в виде белка-предшественника, содержащего сигнальный пептид из 18 аминокислот, отсутствующий у зрелого белка [4, 5]. мРНК CRP человека включает 2200 нуклеотидов [5]. Следует отметить, что размер мРНК в 3 раза больше размера, необходимого для кодирования первичного продукта трансляций – белка-предшественника. Ген, кодирующий синтез CRP, локализован в специфической области хромосомы I человека [17, 38]. Он расположен на расстоянии 7700 п. о. от родственного псевдогена [18, 39] и состоит из двух экзонов, разделенных инtronом величиной в 278 п. о. [18]. Нуклеотидная последовательность интрана в гене CRP характеризуется достаточно редкой особенностью. В ней присутствует участок с большим содержанием повторяющихся димеров G-T (30 пар), который составляет 2.5 оборота левосторонней двойной спирали ДНК [4]. Такие последовательности с часто повторяющимся димером G-T, называемые также Z-формой ДНК, довольно редко встречаются в хромосомах, особенно в интроне. В настоящее время проводятся исследования по выяснению роли Z-формы ДНК и poly(A)-последовательности, также присутствующей в структуре гена CRP, в индуцировании экспрессии этого гена [4].

При топологическом анализе генов, кодирующих CRP человека, кролика, подковообразного краба *Limulus polyphemus* и гена сывороточного амилоида P (SAP) человека было показано, что все они могут происходить от общего гена-предшественника [40]. Предполагается, что расхождение генов CRP у человека и *L. polyphemus* произошло около 500 миллионов лет тому назад [41].

Основным местом синтеза CRP является печень, что было впервые продемонстрировано в работе [7], выполненной с использованием <sup>14</sup>C-меченых аминокислот. В последние годы было обнаружено, что отдельные субпопуляции лимфоцитов периферической крови человека также способны синтезировать CRP [42].

Механизмы регуляции биосинтеза CRP до конца не выяснены. По современным представлениям ведущая роль принадлежит цитокинам, которые индуцируют и регулируют синтез подобных протеинов острой фазы воспаления: интерлейкину-1, интерлейкину-6, фактору некроза опухолей, γ-интерферону [8, 43 - 47]. В последнее время становится все более очевидным, что регуляция генов острофазных белков опосредована действием не одного из вышеперечисленных цитокинов, а их комбинацией [47]. Вместе с тем внутри указанной группы соединений существуют сложные положительные и отрицательные автoreгуляторные отношения, обеспечивающие многообразие биологических эффектов, объединенных общим названием “острофазная реакция организма”.

### 1.3. CRP – Ca<sup>2+</sup>-связывающий протеин

Одной из наиболее важных характеристик CRP является его способность связывать ионы Ca<sup>2+</sup>, что приводит к изменению его физико-химических свойств и имеет большое биологическое значение. С помощью метода равновесного диализа установлено, что нативный CRP связывает 2 моль ионов Ca<sup>2+</sup>/моль субъединицы белка ( $K_d$  6 × 10<sup>-5</sup> M) [48]. Насыщение высокоаффинных Ca<sup>2+</sup>-связывающих участков нативного CRP достигается при концентрации ионов кальция, равной 0.3 mM [28].

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей CRP и других Ca<sup>2+</sup>-связывающих белков, таких, как кальмодулин, парвальбумин и тропонин C, позволил авторам работы [48] предположить, что во взаимодействии с ионами кальция в CRP участвуют аминокислотные остатки Glu<sup>138</sup>, Asp<sup>140</sup>, Phe<sup>142</sup>, Gly<sup>144</sup>, Glu<sup>146</sup> и Ser<sup>149</sup>. При этом Glu<sup>138</sup>, Asp<sup>140</sup> и Ser<sup>149</sup> могут включаться в образование координационной связи белка с ионом Ca<sup>2+</sup> при помощи атомов кислорода своих боковых цепей.

Другой группой исследователей [40] при сравнительном анализе аминокислотных последовательностей CRP человека и различных видов животных были обнаружены два высококонсервативных участка, один из которых (51 - 66) содержит РС-связывающий участок, а второй (133 - 147) представляет собой последовательность аминокислот, сходную с соответствующими последовательностями  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих участков кальмодулина и других  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белков.

CRP в присутствии ионов кальция приобретает некоторую устойчивость к структурно-функциональным изменениям в денатурирующих условиях. Ионы  $\text{Ca}^{2+}$  в концентрации 0.7 - 2.0 мМ защищают CRP от термической денатурации при  $63^\circ\text{C}$  в течение 1 ч [16]. Аналогичным образом ионы  $\text{Ca}^{2+}$  в концентрации 0.7 мМ и выше препятствуют диссоциации CRP на субъединицы, которая обычно наблюдается в 8 М мочевине [16]. Присутствие 0.1 - 1.0 мМ  $\text{CaCl}_2$  также защищает CRP от расщепления проназой или Nagarse-протеиназой [48]. Таким образом, способность CRP связываться с ионами  $\text{Ca}^{2+}$  имеет важное физиологическое значение, так как может служить для защиты белка от протеолитической деградации или денатурации в кровотоке в период острой фазы воспаления.

Однако основная физиологическая роль ионов  $\text{Ca}^{2+}$  заключается в их участии в связывании CRP с различными лигандами. Так, существует предположение [49], что  $\text{Ca}^{2+}$  действует как аллостерический эффектор, вызывающий соответствующие конформационные изменения в структуре РС-связывающего участка CRP, способствующие его взаимодействию с РС – одним из наиболее важных лигандов этого белка.

О существенных  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых конформационных перестройках молекулы CRP свидетельствуют значительные изменения в спектре КД белка, полученные после удаления кальция из его раствора [2]. Дополнительное доказательство влияния ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на конформацию CRP – появление у белка в присутствии ионов кальция новых антигенных детерминант, которые обнаруживаются с помощью моноклональных антител [50]. Наличие в геле ионов  $\text{Ca}^{2+}$  влияет на электрофоретическую подвижность CRP [51]. В отсутствие ионов  $\text{Ca}^{2+}$  нативный CRP мигрирует к аноду, а в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  – к катоду, что, по мнению авторов [51], также отражает конформационные изменения, происходящие при связывании CRP с ионами  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### 1.4. Лигандная специфичность CRP

CRP обладает довольно широким спектром лигандной специфичности. Впервые этот белок был обнаружен в сыворотке больных пневмокок-

ковой пневмонией благодаря своей способности связываться в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  с соматическим С-полисахаридом (С-PS) клеточной стенки *S. pneumoniae* [1].

Критическая минимальная концентрация  $\text{Ca}^{2+}$ , необходимая для преципитации CRP С-полисахаридом, равна 0.9 мМ [36] (в норме концентрация ионов кальция в сыворотке крови человека составляет 1.0 - 1.2 мМ).

Процесс преципитации CRP С-полисахаридом можно ингибировать с помощью различных фосфосодержащих соединений, таких, как глицерофосфат, AMP, UMP и *n*-нитрофенилфосфат [8]. При замене фосфатной группы в *n*-нитрофенилфосфате на пространственно сходную сульфогруппу эффект ингибирования не наблюдается [8].

Впоследствии было продемонстрировано, что CRP связывается с входящими в состав С-PS остатками РС [9, 52]. В свою очередь, РС является наиболее эффективным ингибитором связывания CRP с С-PS. Однаковая степень ингибирования данного взаимодействия достигается при добавлении РС в концентрации в 100 раз меньшей, чем в случае AMP или UMP [8, 9].

При помощи равновесного диализа с использованием  $^{14}\text{C}$ -меченого РС была определена константа его ассоциации с CRP, равная  $1.9 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$  при  $15^\circ\text{C}$  [53]. По другим данным [54], значение константы ассоциации CRP с РС при комнатной температуре составляет  $3.72 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$  и остается неизменным в интервале pH 6 - 10. При этих значениях pH РС имеет положительный заряд у четвертичного азота холина и два отрицательных заряда у фосфатной группы. По мере снижения pH (ниже 6) наряду с протонированием фосфатной группы РС протонируются также карбоксильные группы глутаминовой и аспартатовой кислот, входящих в состав РС-связывающего участка CRP [54]. Подобные изменения заряда приводят к резкому снижению константы ассоциации при низких pH, что наглядно отражает электростатическую природу взаимодействия CRP с РС [54].

Изучение связывания CRP белка с модельными фосфосодержащими соединениями свидетельствует о том, что для эффективного связывания важное значение имеют как фосфатный остаток, так и четвертичный амин холина. В качестве модельных фосфосодержащих соединений был применен ряд коньюгатов РС или фосфоэтапамина (PEA) с BSA [55]. При этом оказалось, что PEA-содержащие производные способны реагировать с CRP в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . На основе результатов количественного преципитирования CRP модельными соединениями и ингибирования преципитации с помощью РС и глицерофосфата авторы работы [55] сделали вывод о том, что РС-связывающий участок CRP состоит из двух

локусов: первый локус отвечает за  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимое связывание с фосфатной группой, а второй – за связывание катионной группы холина.

Цвиттер-ионную природу РС-связывающего участка CRP также подтверждают данные о  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимом связывании CRP с дипептидами Arg-Val и Arg-Tyr [56],  $\epsilon$ -аминогексановой кислотой [57], а также с иммобилизованным на агарозном сорбенте аргинином [58]. Взаимодействие осуществляется при участии положительно заряженной гуанидиновой группировки аргинина или аминогруппы  $\epsilon$ -аминогексановой кислоты и карбоксильных групп указанных соединений. При этом средство CRP к РС примерно на два порядка выше, чем к дипептидам [56].

Сведения относительно структуры РС-связывающих участков CRP противоречивы. С помощью реагентов, специфически модифицирующих определенные аминокислотные остатки, было выявлено, что в РС-связывающий участок CRP входят остатки лизина, тирозина; важно также наличие в субъединице CRP S-S-связи [54]. Другие исследователи [59] полагают, что во взаимодействии CRP с РС-содержащими лигандами принимают участие два остатка гистидина, которые в нативном белке оказываются близкорасположенными благодаря дисульфидной связи. Позднее было высказано предположение, что с фосфатной группой РС связываются остатки лизина-57 и аргинина-58, а остатки аспарагиновой и глутаминовой кислот в положениях 60 и 62 взаимодействуют с положительно заряженной холиновой группировкой [60]. Интересно, что данные аминокислотные остатки входят в состав высококонсервативного участка CRP (51 - 66) [41]. Помимо этого, для связывания CRP с РС необходимы конформационные изменения белка, опосредованые взаимодействием ионов  $\text{Ca}^{2+}$  с кислыми аминокислотными остатками, находящимися в рамках второго консервативного участка CRP, включающего последовательность 133 - 147 [41, 60].

Очевидно, окончательные выводы о роли различных аминокислот во взаимодействии CRP с РС можно будет сделать с привлечением данных рентгеноструктурного анализа молекулы CRP. В настоящее время получены кристаллы CRP человека и проведены его предварительные структурные исследования [61].

С использованием техники иммуноэлектронной микроскопии в молекуле CRP обнаружены специфические участки связывания с РС [62]. Показано, что каждая субъединица CRP имеет один РС-связывающий участок, который расположен ближе к центру по отношению к вертикальной оси субъединицы. При этом все участки связывания РС находятся по одну сторону плоскости молекулы CRP.

Средством к РС также определяется взаимодействие CRP с РС-содержащими липидами – лецитином и сфингомиелином [63], широко представленными на поверхности клеточных мембран.

Однако CRP слабо взаимодействует с липосомами, состоящими только из лецитина, включение же лизолецитина в состав липосом приводит к значительному увеличению связывания CRP с ними, которое при соотношении лизолецитин – лецитин 1 : 2 является наибольшим [64]. Авторы предположили, что нарушение плотной упаковки липосомального бислоя, вызванное присутствием лизолипидов, делает РС-группировки фосфолипидов более доступными и способствует таким образом их взаимодействию с CRP. В частности, в условиях, обеспечивающих доступность полярных групп фосфолипидов, связывание CRP с липосомами характеризуется довольно высоким показателем средства:  $K_d = 1 \times 10^{-7} \text{ M}$  [22].

Поскольку связывание CRP с липосомами приводит к активации системы комплемента и последующему их лизису [50, 63, 65], данная система представляет собой удобную модель для изучения процессов, происходящих в организме при взаимодействии CRP с клетками.

При взаимодействии CRP с клетками также необходимо выполнение условий, обеспечивающих доступность белку РС-группировок клеточных липидов. Так, при обработке эритроцитов человека фосфолипазой A<sub>2</sub>, приводящей к увеличению содержания лизолипидов в мемbrane клеток, наблюдали 4 - 5-кратное усиление связывания CRP с обработанными эритроцитами по сравнению с интактными клетками [66]. Предполагается, что эксперименты *in vitro* с обработанными фосфолипазой A<sub>2</sub> эритроцитами человека отражают ситуацию *in vivo*, где CRP может связываться только с активированными или поврежденными клетками, мембранных которых содержат повышенное количество лизолипидов, в то время как взаимодействие CRP с поверхностью живых, интактных клеток не происходит [66].

Среди лигандов CRP наименее изучены галактозосодержащие соединения. Существовало предположение, что связывание CRP с галактозосодержащими полисахаридами [67, 68] и галактанаами улиток [69, 70] является еще одним типом взаимодействия, отличным от связывания с РС. Однако позднее [11] было показано, что это связывание происходит не за счет средства CRP к остаткам галактозы, а благодаря взаимодействию белка с фосфатными группами, присутствующими в незначительном количестве в составе этих полисахаридов.

Наряду с лигандами, взаимодействующими с CRP только в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , существуют соединения, связывание с которыми не только не требует присутствия ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , но даже ими

угнетается. К таким соединениям принадлежат некоторые синтетические и природные поликатионы: поли-*L*-лизин, поли-*L*-аргинин, полигорнитин, протаминсульфат, гистоны, основные белки миелина, катионные белки лейкоцитов и др. [10, 71, 72]. Например, ионы  $\text{Ca}^{2+}$  в концентрации 0.22 мМ вызывают 50%-ное ингибирование взаимодействия CRP с синтетическим поли-*L*-лизином ( $M_r$  2700 Да), полное угнетение процесса связывания происходит при концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , равной 0.31 мМ [71]. Следует отметить, что этот эффект проявляется независимо от времени добавления ионов: до начала взаимодействия CRP с поликатионом или после образования комплекса [71, 73].

### *1.5. Липопротеины, хроматин, фибронектин и другие физиологические лиганды CRP*

Наличие в каждой субъединице CRP двух участков связывания (фосфохолинового и поликатионного) предполагает возможность *in vivo* связывания с белком широкого круга лигандов.

К числу наиболее важных в физиологическом отношении лигандов CRP относятся липопротеины сыворотки крови (LP). Несмотря на то что феномен взаимодействия CRP с LP известен уже в течение полувека [22], вопрос об условиях образования и существования в организме комплексов CRP-LP, а также их роли в норме и при патологии окончательно не решен. Теоретически все LP, поскольку в их состав наряду с белками входят и фосфолипиды (преимущественно лецитин и сфингомиелин), могут связываться с CRP [22]. Тем не менее попытки обнаружить циркулирующие комплексы CRP-LP не дали положительных результатов. Оказалось, что CRP человека образует растворимые комплексы только с аномальными  $\beta$ -LPVLD, содержащими в сыворотке больных с гиперлипопротеинемией III типа [74]. Особенностью  $\beta$ -LPVLD является увеличенное содержание аполипопротеина E (апоД) по сравнению с нормальными LPVLD.

Однако CRP, иммобилизованный на иммuno-сорбенте, содержащем антитела к нему, способен связывать LPLD и незначительное количество LPVLD из нормальной сыворотки человека [12]. Связывание осуществляется в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и является специфичным. Интересен тот факт, что этот процесс наблюдается лишь после достижения определенной плотности иммобилизованного CRP (более 1 мг CRP/мл геля) [12]. Связавшиеся с сорбентом LPLD и LPVLD могут быть элюированы с помощью раствора PC (1 мг/мл) в  $\text{Ca}^{2+}$ -содержащем буфере [12]. По мнению авторов работы [12], это свидетельствует о том, что во взаимодействии с LP вовлечены PC-связывающие участки CRP. Кроме того, PC оказывает регуляторное влияние на образование комплексов

CRP с общей фракцией LP плазмы крови человека в растворе [75]. При низких концентрациях PC липопротеины – достаточно сильные конкуренты и связываются с CRP с образованием непрозрачного раствора. Увеличение концентрации PC приводит к диссоциации комплексов CRP-LP и просветлению непрозрачных растворов [75].

По мнению ряда авторов [12, 76], основным фактором, определяющим связывание LP плазмы крови человека с CRP, является наличие в составе LP положительно заряженного аполипопротеина B (апоБ) и в меньшей степени аполипопротеина E (апоД). Известно, что апоБ входит в состав LPLD и LPVLD, а апоД содержится в LPHD и LPVLD [76]. Как уже упоминалось, CRP в присутствии ионов кальция связывается с LPLD, взаимодействие CRP с LPVLD менее выражено [12]. При этом LPHD, характеризующиеся высоким содержанием фосфолипидов и апоД, но практически не имеющие апоБ, не взаимодействуют с иммобилизованным CRP [12].

Другой не менее важный физиологический лиганд CRP – хроматин. Способность CRP в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  связываться с хроматином была впервые продемонстрирована Роби и соавт. [77]. Флуоресцентномеченный CRP также удалось обнаружить в ядре поврежденных клеток [78], при этом было зарегистрировано его специфическое связывание с хроматином. Константа диссоциации комплекса CRP–хроматин составляет  $8 \times 10^{-7}$  М и свидетельствует о том, что сродство CRP к хроматину гораздо выше, чем к PC [77]. Поскольку добавление PC снижает связывание CRP с хроматином, авторы работы [79] предполагают, что в реакции присоединения к хроматину принимает участие PC-связывающий участок CRP.

Предполагается [13, 79], что в состав CRP-связывающего участка хроматина входят гистон  $H_1$  и расположенные вблизи него части других гистонов – вероятнее всего,  $H_{2a}$  и в меньшей степени  $H_{2b}$ . Попытка локализовать CRP-связывающие участки гистонов  $H_1$  и  $H_{2a}$ , используя расщепление гистонов различными ферментами [14], показала, что CRP связывается с C-концевой областью  $H_1$ , содержащей значительное количество остатков лизина.

Установлено, что связывание CRP с хроматином приводит к активации системы комплемента и в конечном итоге к разрушению ядра [80]. При этом взаимодействие CRP с гистоном  $H_1$  снижает сродство  $H_1$  к хроматину и способствует разворачиванию компактной структуры хроматина, повышая его доступность действию ферментов [13, 81]. При насыщенном связывании CRP с хроматином также отмечено угнетение транскрипции ДНК [81]. Таким образом, взаимодействие CRP с элементами ядер разрушенных клеток *in vivo* может играть значительную роль в процессах

поддержания гомеостаза организма, способствуя угнетению транскрипции поврежденной ДНК и устраниению мертвых клеток.

Наряду со связыванием CRP с хроматином и гистонами было обнаружено его взаимодействие с малым ядерным рибонуклеопротеином U<sub>1</sub> [82], который представляет собой комплекс небольших фрагментов богатой уридином РНК с группой негистоновых белков, в состав которых входят так называемые "белок с M 70 кДа" и "A-G-протеины". С помощью иммуноблоттинга в качестве компонента, непосредственно взаимодействующего с CRP, был выявлен белок с M 70 кДа [82]. Установлено, что связывание с ним осуществляется в присутствии ионов Ca<sup>2+</sup> при участии РС-связывающих участков молекулы CRP и ингибируется при добавлении РС [82].

Авторы работы [82] выдвигают предположение, что CRP может распознавать некую общую детерминанту, инертную некоторым ядерным белкам, в частности гистонам и белку с M 70 кДа. Одной из возможных предпосылок для создания такой детерминанты может быть фосфорилирование белков, так как известно, что белок с M 70 кДа и гистоны фосфорилированы [82].

Взаимодействие CRP с двумя другими физиологическими лигандами – фибронектином и ламинином – также представляет значительный интерес и может иметь важное биологическое значение, поскольку оба лиганда являются белками внеклеточного матрикса и участвуют в процессах прикрепления и взаимодействия клеток. В работе [37] впервые продемонстрировано, что растворимый фибронектин человека связывается с иммобилизованным на полистирольных шариках CRP человека с константой диссоциации, равной  $1.5 \times 10^{-8}$  М. Взаимодействие наиболее эффективно осуществляется в присутствии 0.5 mM Ca<sup>2+</sup> и полностью ингибируется, если концентрация ионов Ca<sup>2+</sup> превышает 2 mM [83]. Наибольшее связывание фибронектина с иммобилизованным CRP наблюдается при физиологической концентрации хлорида натрия и pH 5 - 6 [37]. Вместе с тем взаимодействие растворимого CRP с иммобилизованным на планшете фибронектином приводит к образованию комплекса, характеризующегося более высоким значением константы диссоциации:  $1.47 \times 10^{-7}$  М [84]. Связывание CRP человека с иммобилизованным на планшете фибронектином плазмы происходит при участии РС-связывающего участка молекул CRP, так как этот процесс ингибируется в присутствии РС, фосфосерина и антител, специфичных к РС-связывающему участку CRP [15, 84].

С помощью ферментативного расщепления молекулы фибронектина установлено, что участок, ответственный за связывание CRP, находится в С-концевой области и представляет собой

фрагмент с M 120 - 140 кДа, содержащий связывающий домен фибронектина [37, 84].

Образование комплекса CRP с фибронектином приводит к изменению биологической активности последнего. Фибронектин, связавшийся с CRP, утрачивает способность участвовать в процессах прикрепления клеток [15]. Было показано, что этот эффект пропорционален концентрации CRP и ингибируется РС или антителами, специфичными к РС-связывающему участку CRP [15].

Напротив, ламинин при связывании с CRP не изменяет своих биологических свойств [15], т.е. сохраняет способность участвовать в процессе прикрепления клеток. CRP обладает большим сродством к ламинину, чем к фибронектину [15]. Взаимодействие CRP с иммобилизованным ламинином осуществляется только в присутствии ионов Ca<sup>2+</sup> и является оптимальным при концентрации последних, равной 5 mM [85]. В образовании комплексов CRP с ламинином также участвуют РС-связывающие участки CRP, о чем свидетельствует ингибирование связывания с помощью РС или антител, специфичных к РС-связывающему участку CRP [85]. В настоящее время проводятся исследования по установлению структуры CRP-связывающего участка ламинина [15].

Наряду с вышеописанными высокомолекулярными физиологическими лигандами CRP существуют также низкомолекулярные лиганда этого белка – например, фактор активации тромбоцитов (PAF), 1-О-алкил-2-ацетил-sn-глицеро-3-фосфохолин [17, 86, 87]. Экспериментальные доказательства существования комплексов CRP-PAF получены только для CRP крысы [86]. Предполагается, что степень сродства CRP человека и PAF может быть достаточно высокой [17]. Дополнительным доказательством взаимодействия CRP с PAF в организме являются результаты экспериментов, свидетельствующие о способности CRP блокировать эффекты PAF в отношении тромбоцитов и нейтрофилов человека [17, 88, 89].

## II. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ CRP

Получение высокоочищенных препаратов CRP с целью изучения его физико-химических и иммунобиологических свойств представляет собой непростую задачу. Для выделения CRP используют различные подходы, которые можно разделить на две группы. К первой относятся общепринятые способы очистки белков (высаливание сульфатом аммония [90], гель-фильтрация [90], ионообменная хроматография [91, 92], электрофорез [51]), ко второй – способы, основанные на специфическом свойстве CRP связываться с различными лигандами (преципитация фосфатидилхолином [93, 94], биосорбция [95], аффинная хроматография [55, 57 - 59, 96 - 108]). Поскольку в большинстве случаев для получения CRP применяется

аффинная хроматография, авторам представлялось целесообразным описать этот метод в особом разделе. Исходным сырьем для выделения CRP обычно является острофазная сыворотка [51, 55, 90, 91, 93] или асцитная жидкость [59, 92, 95, 96, 100].

### *II.1. Неспецифические способы выделения CRP*

Фракционирование исходной белковой смеси с помощью сульфата аммония и последующая гельпроникающая хроматография [90] или ионообменная хроматография [91, 92] не нашли широкого применения, так как получаемый CRP не был гомогенен [92] и его выход был незначителен (2.5 - 7%) [90, 92] или же условия элюции в ионообменной хроматографии оказывались настолько жесткими, что вызывали диссоциацию нативной молекулы CRP, хотя выход при этом достигал 50% [91]. Предложенный недавно метод адсорбции CRP с помощью свежеприготовленного геля сульфата бария [51] с последующим preparativным электрофорезом в агарозном геле, хотя и позволял получить CRP с высоким выходом (69%), все же не нашел широкого применения из-за своей сложности.

### *II.2. Специфические методы выделения CRP*

Наряду с традиционными методами выделения белков для получения CRP применялись также методы, основанные на его специфической способности связываться с различными соединениями в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Так, в работе [93] было предложено использовать преципитацию CRP фосфатидилхолином, от которого впоследствии избавлялись экстракцией хлороформом. Однако выделенный данным способом CRP обладал  $\beta$ - и  $\gamma$ -электрофоретической подвижностью, что свидетельствует о наличии наряду с пентамером моносубъединичной формы CRP, возникающей, вероятно, под действием хлороформа [93]. Последующая гель-фильтрация на сепадексе G-200 позволяет получить гомогенный CRP, обладающий только  $\gamma$ -электрофоретической подвижностью, характерной для нативной молекулы [94].

В работе [95] описан оригинальный способ выделения CRP с применением высокоспецифичного микробного сорбента – инактивированной культуры *S. pneumoniae* (штамм Rn II 41). В присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  CRP сорбировали на микробной массе и элюировали хелатирующим агентом – цитратом натрия. Выделенный CRP обладал  $\gamma$ -электрофоретической подвижностью. Однако предложенный метод не получил широкого распространения из-за сложностей в обращении с микробным материалом.

### *II.3. Выделение CRP с помощью аффинной хроматографии*

Несомненно, аффинная хроматография – наиболее эффективный и широкораспространенный метод получения CRP. Развитию этого метода очистки CRP активно способствовали исследования по изучению лигандной специфичности белка. Аффинные сорбенты, используемые для выделения CRP, представлены в таблице. Соединения, применяемые в качестве лигандов при получении аффинных сорбентов, могут быть разделены на три группы: содержащие C-PS [29, 96, 100], содержащие PC [55, 58, 59, 101, 104] и не содержащие PC [57, 98, 102, 103, 105].

#### *II.3.1. Аффинные сорбенты, содержащие C-PS*

Впервые при получении аффинного сорбента для выделения CRP в качестве лиганда был использован C-PS, ковалентно связанный с BrCN-активированной агарозной матрицей биогель A-50m [96]. Выход CRP составлял 68%, однако полученный таким способом белок содержал примеси SAP [96].

В дальнейшем для удаления примесей SAP, как правило присутствующих в препаратах CRP, полученных с помощью аффинных сорбентов на основе агарозных матриц, было предложено использовать дополнительный этап очистки – хроматографию на незамещенной пируватсодержащей агарозе [106]. Указанный способ очистки основывается на свойстве SAP специфически связываться в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  с пируватацетальными галактозы, присутствующими в небольших количествах в составе агарозы, в то время как CRP с немодифицированной агарозой взаимодействует очень слабо [106].

Другой группой исследователей [29, 100] была разработана многостадийная схема получения чистого CRP, включающая также на первом этапе аффинную хроматографию на C-PS-содержащем сорбенте. Далее с целью удаления примесей SAP, сывороточного альбумина и нескольких других "нормальных" белков сыворотки человека была предпринята дополнительная очистка белка при помощи двух иммunoсорбентов, которые в качестве лигандов содержали антисыворотки против "нормальных" белков человека и SAP [29]. Наряду с этим для удаления альбумина использовалась голубая сепароза, а для сорбции SAP – сепароза с иммобилизованным конканавалином A [29]. Заключительным этапом очистки CRP являлась гель-фильтрация на колонке с сепакрилом S-300, служащая для отделения нативного белка от его агрегатов и субъединиц. Суммарный выход CRP составлял 35 - 40% [29].

## Аффинные сорбенты для выделения CRP

Лиганд	Аффинная хроматография			Дополнительные методы очистки	Источник информации
	Тип матрицы	Условия элюции	Выход CRP, %; примеси		
C-PS	BrCN-активированный биогель A-50m	трис-HCl, pH 7.80, NaCl, цитрат Na	68; SAP	Гель-фильтрация на биогеле A-50m	[96]
	BrCN-активированная сепароза 4B	0.01 M трис-HCl, pH 7.50, 0.05 M EDTA, 0.14 M NaCl	65; SAP, белки нормальной сыворотки человека	1. Хроматография на биоспецифических сорбентах (см. текст) 2. Гель-фильтрация на сепакриле S-300	[29, 100]
<i>n</i> -Диазонийфенилfosфохолин	BrCN-активированная сепароза 4B, модифицированная дипептидом Gly-Tyr	0.1 M Na <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , pH 8.50, 0.2 M NaCl, 2 mM EDTA	*; IgG, SAP, компоненты комплемента	1. Ионообменная хроматография на DEAE-целлюлозе 2. Рехроматография на аффинном сорбенте 3. Гель-фильтрация на сепадексе G-200	[59, 107]
		трис-HCl, pH 8.00, CaCl <sub>2</sub> , градиент PC (0.95 - 2.5 mM)	Более 25	Не нуждается	[104]
Капроилфосфохолин	Аминогексил-сепароза 4B	0.02 M трис-HCl, pH 7.00, 0.15 M NaCl, 1 mM CaCl <sub>2</sub> , градиент PC (0 - 0.5 mM)	*	**	[55]
<i>n</i> -Нитрофенилфосфохолин	CH-сепароза 4B	0.05 M трис-HCl, pH 7.00, 0.1 M NaCl, 0.03 M цитрат Na, 10 mM EDTA	*	**	[58]
Конъюгат гликольфосфохолина и BSA	Тиолзамещенная агарозная матрица	0.01 M фосфатный буфер, pH 7.2, 1 mM EDTA	40 - 80	**	[101]
Фосфоэтаноламин	CH-сепароза 4B	0.02 M трис-HCl, pH 8.00, 0.15 M NaCl, градиент 0 - 0.1 M цитрат Na	70	**	[103]
Аргинин	BrCN-активированная сепароза 4B	0.02 M трис-HCl, pH 8.50, 0.1 M NaCl, 0.2 M аминооктановая кислота	95	**	[57]
Моноклональные антитела против CRP	То же	0.5 M CH <sub>3</sub> COONa, pH 5.00, 0.5 M NaCl	90	Ионообменная хроматография на DEAE-сепацеле	[105]

\* Авторами не указано.

\*\* Авторами не предлагается.

При сравнительном анализе эффективности аффинных сорбентов, полученных на основе C-PS, ковалентно связанного с различными матрицами, было выявлено, что концентрация иммобилизованного лиганда оказывалась максимальной при использовании BrCN-активированной сепарозы 4B (2.4 мг/мл геля) [97] или BrCN-активированного биогеля A 50m (2 - 5 мг/мл геля) [96] по сравнению с использованием в качестве матрицы активированных глутаровым альдегидом биогеля P 300 или ультрогеля AcA 34 [97]. В двух последних случаях

концентрация иммобилизованного C-PS составляла 0.30 и 0.33 мг/мл геля соответственно [97].

Необходимо отметить, что использование C-PS в качестве лиганда для аффинной хроматографии осложняется тем, что *S. pneumoniae*, служащий исходным сырьем для его получения, относится к группе патогенных возбудителей. Помимо этого, выращивание *S. pneumoniae* представляет собой непростую задачу, так как данный микроб организм весьма чувствителен к условиям культивирования.

### II.3.2. PC-содержащие аффинные сорбенты

Поскольку CRP связывается с PC, входящим в состав C-PS, с целью замены труднодоступного C-PS в последние годы в качестве лиганда широко используют различные PC-содержащие производные. Так, для выделения CRP предложено использовать аффинный сорбент, в котором лигандом служит *n*-диазонийфенилфосфохолин (*n*-DPPC), ковалентно присоединенный к BrCN-активированной сефарозе 4B, модифицированной дипептидом Gly-Tyr [59]. Способ получения данного сорбента был разработан ранее для выделения PC-связывающих миеломных иммуноглобулинов класса IgA [107]. CRP, выделенный с помощью такого аффинного сорбента, содержал примеси IgG, SAP, компонентов комплемента C<sub>1s</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>1</sub>-ингибитора, плазминогена, а также образующиеся в процессе выделения агрегаты и субъединицы CRP [59]. Для получения чистого препарата CRP авторы [59] использовали дополнительную очистку белка, состоящую из трех этапов: ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе, повторной аффинной хроматографии и гель-фильтрации на седафексе G-200. Суммарный выход CRP составлял в среднем 30 - 35% [59].

В настоящее время фирмой "Pierce" выпускается аффинный сорбент с описанным выше лигандом *n*-DPPC, обладающий высокой сорбционной емкостью (3 - 5 мг CRP/мл геля), с помощью которого при конкурентной элюции PC возможно получение гомогенного CRP в одну стадию, при этом его выход превышает 25% [104].

Недавно был предложен способ получения CRP с использованием аффинного сорбента, содержащего в качестве лиганда коньюгат гликольфосфохолина с BSA [101]. Аффинный сорбент на основе такого PC-содержащего коньюгата связывал 4 - 4.5 мг CRP на 1 мл геля и позволял получать гомогенный белок с выходом 40 - 80% [101].

Существует также ряд других способов выделения CRP с использованием аффинных сорбентов, полученных на основе капрол-PC и аминогексил-сефарозы 4B [55], *n*-нитрофенилфосфохолина и карбоксигексил-сефарозы 4B (CH-сефарозы 4B) [58], а также фосфоколинизотиоцианата и аминометилированной сефарозы [108]. Однако они не обладают значительными преимуществами по сравнению с вышеописанными способами получения CRP.

### II.3.3. Сорбенты, не содержащие PC

Наряду с PC-содержащими аффинными сорбентами для выделения CRP были использованы сорбенты, не содержащие остатков PC [57, 98, 102, 103, 105].

Одним из первых был предложен способ выделения CRP при помощи хроматографии на фосфоцеллюлозе [95]. Однако этот способ характеризовался плохой воспроизводимостью, при этом максимальный выход CRP составлял около 30%.

Одностадийный метод одновременного выделения CRP и SAP с использованием аффинного сорбента на основе фосфоэтаноламина, ковалентно присоединенного к CH-сефарозе 4B, был предложен в работе [103]. Градиентное элюирование цитратным буфером приводило к отделению CRP от SAP, при этом выход CRP был не ниже 70%, а его чистота составляла 80% [103].

Необычный подход к выделению CRP при помощи аффинной хроматографии был реализован в работе [57]. В качестве аффинного сорбента авторы использовали аргинин-сефарозу 4B. Связавшийся с аффинным сорбентом CRP элюировали при помощи ε-аминооктановой кислоты либо путем градиентного повышения концентрации NaCl до 1.5 М. Данный метод позволял получить препарат CRP, чистота которого превышает 95%, с выходом около 95% [57].

В работе [102] также предложен способ выделения CRP с использованием в качестве сорбента CH-сефарозы 4B, характеризующейся высокой сорбционной емкостью: 8.6 мг CRP/мл геля. Полученный в результате такой хроматографии CRP содержал примесь SAP, которую затем отделяли посредством хроматографии на гидроксиапатите. Чистота выделенного данным методом CRP составляла 99% [102].

Известен также способ получения CRP человека посредством иммуноаффинной хроматографии с использованием моноклональных антител к CRP, иммобилизованных на BrCN-активированной сефарозе 4B [105]. Элюцию CRP проводили в достаточно жестких условиях, используя ацетатный буфер (pH 5.0), содержащий 0.5 М NaCl. Выход CRP на этой стадии составлял 90%. Для последующей очистки белка применяли ионообменную хроматографию на DEAE-сефаце. Следует отметить, что данный иммуносорбент обладал невысокой кратностью использования (около 10 раз) и, по мнению авторов работы [105], уступает по эффективности аффинному сорбенту с иммобилизованным C-PS.

Таким образом, совершенно очевидно, что из всего многообразия способов получения CRP наиболее эффективным является метод аффинной хроматографии, предоставляющий исследователю широкие возможности в выборе лиганда и позволяющий в случае градиентного способа элюции получать гомогенные препараты CRP без дополнительной очистки.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные в обзоре данные свидетельствуют о широкой лигандной специфичности CRP, обеспечивающей возможность его взаимодействия с различными молекулярными и клеточными структурами в условиях организма. Совершенно очевидно, что ионы  $\text{Ca}^{2+}$  выступают в качестве универсального эндогенного регулятора взаимодействия CRP с лигандами, как свободными, так и ассоциированными с поверхностью клеток. В этой связи не совсем правомерно часто встречающееся в литературе деление лигандов CRP на  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые и  $\text{Ca}^{2+}$ -независимые.

Присутствие ионов  $\text{Ca}^{2+}$  обязательно для осуществления связывания CRP с лигандами, взаимодействующими с РС-связывающими участками молекулы. Напротив, связывание CRP с лигандами поликатионной природы наиболее эффективно осуществляется в среде, лишенной ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , и ингибируется по мере увеличения их концентрации. Более того, ионы  $\text{Ca}^{2+}$  способны вызывать диссоциацию уже образовавшихся комплексов CRP с поликатионами. Таким образом, оба типа взаимодействия в широком смысле  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимы, но с различным по направленности действием ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на связывающие свойства молекулы CRP.

Способность CRP взаимодействовать с различными лигандами положена в основу метода аффинной хроматографии – наиболее эффективного и широкого используемого способа выделения CRP из различных биологических жидкостей.

Следует отметить, что большинство из предложенных методов сложно адаптировать к производственным условиям ввиду малой доступности используемых лигандов и многостадийности процесса получения аффинного сорбента. Поэтому в настоящее время продолжается разработка экономически эффективных методов получения CRP в промышленных масштабах.

Необходимость этих исследований диктуется все возрастающей потребностью экспериментальной и практической медицины в препаратах CRP. Исследования последних лет свидетельствуют о том, что мониторинг уровня CRP позволяет разработать новые критерии для диагностики различных заболеваний. Помимо этого, исходя из данных о структуре, лигандной специфичности и функциях CRP в организме в самое последнее время начато создание лечебных и профилактических препаратов на его основе.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tillett W.S., Francis T. // J. Exp. Med. 1930. V. 52. P. 561 - 571.
2. Young N.M., Williams R.E. // J. Immunol. 1978. V. 121. P. 1893 - 1898.
3. Oliveira E.B., Gotschlich E.C., Liu T.-Y. // J. Biol. Meth. 1979. V. 254. P. 489 - 502.
4. Lei K.J., Liu T., Zon G., Soravia E. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 13377 - 13383.
5. Tucci A., Goldberger G., Whitehead A.S., Kay R.M., Woods D.E., Colten H.R. // J. Immunol. 1983. V. 131. P. 2416 - 2419.
6. Macintyre S.S., Schultz D., Kushner I. // Biochem. J. 1983. V. 210. P. 707 - 715.
7. Hurlmann J., Thorbecke G.J., Hochwald G.M. // J. Exp. Med. 1966. V. 123. P. 365 - 378.
8. Gotschlich E.C., Edelman G.M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1967. V. 57. P. 706 - 712.
9. Volanakis J.E., Kaplan M.H. // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1971. V. 136. P. 612 - 614.
10. DiCamelli R., Potempa L.A., Siegel J., Suyehira L., Petras K., Gewurz H. // J. Immunol. 1980. V. 125. P. 1933 - 1938.
11. Soelter J., Uhlenbruck G. // Immunology. 1986. V. 58. P. 139 - 144.
12. De Beer F.C., Soutar A.K., Baltz M.L., Trauner I.M., Fernstein A., Pepys M.B. // J. Exp. Med. 1982. V. 156. P. 230 - 242.
13. Du Clos T.W., Marnell L.L., Zlock L.T., Burlingame R.W. // J. Immunol. 1991. V. 146. P. 1220 - 1225.
14. Du Clos T.W., Zlock L.T., Marnell L.L. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 2167 - 2171.
15. Tseng J., Mortensen R.F. // Exp. Cell. Res. 1989. V. 180. P. 303 - 313.
16. Potempa L.A., Maldonado B.A., Laurent P., Zemel E.S., Gewurz H. // Mol. Immunol. 1983. V. 20. P. 1165 - 1175.
17. Gotshlich E.C. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1989. V. 557. P. 9 - 18.
18. Kilpatrick J.M., Volanakis J.E. // Immunol. Res. 1991. V. 10. P. 43 - 53.
19. Kolbbaehofen V. // Immunobiology. 1991. V. 183. P. 133 - 145.
20. Kushner I., Volanakis J.E., Gewurz H. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1982. V. 389. P. 2 - 34.
21. Pepys M.B., Baltz M.L. // Adv. Immunol. 1983. V. 34. P. 141 - 212.
22. Pepys M.B., Rowe I.F., Baltz M.L. // Int. Rev. Exp. Pathol. 1985. V. 27. P. 83 - 111.
23. Hokama Y., Nakamura R.M. // J. Clin. Lab. Analysis. 1987. V. 1. P. 15 - 27.
24. Macintyre S.S. // Meth. Enzymol. 1988. V. 163. P. 383 - 399.
25. Cambau E. // Pathol. Biol. 1988. V. 6. P. 1232 - 1236.
26. Egard T., Gosset D., Savinel P., Devulder B., Delcambre B. // Sem. hop. Paris. 1989. V. 2. P. 237 - 244.
27. Назаров П.Г., Софонов Б.Н. // Иммунология. 1986. № 4. С. 12 - 18.
28. Osmand A.P., Friedenson B., Gewurz H., Painter R.H., Hoffman T., Shelton E. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 739 - 743.
29. De Beer F.C., Pepys M.B. // J. Immunol. Meth. 1982. V. 50. P. 17 - 31.
30. Woo P., Korenberg J.R., Whitehead A.S. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 13384 - 13388.

31. Gotschlich E.C., Edelman G.M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1965. V. 54. P. 558 - 566.
32. Du Clos T.W., Mold C., Stump R.F. // J. Immunol. 1990. V. 145. P. 3869 - 3875.
33. Ying S.C., Siegel J.N., Gewurz H., Kinoshita C.M., Potempa L.A. // J. Immunol. 1989. V. 143. № 1. P. 221 - 228.
34. Samberg N.L., Bray R.A., Gewurz H., Landay A.L., Potempa L.A. // Cell. Immunol. 1988. V. 116. P. 86 - 98.
35. Potempa L.A., Gewurz H., Harris J.E., Braun D.P. // Protides Biol. Fluids Proc. 34th Colloq., Oxford, 1986. P. 287 - 290.
36. Potempa L.A., Siegel J.N., Fiedel B.A., Potempa R.T., Gewurz H. // Mol. Immunol. 1987. V. 24. P. 531 - 541.
37. Salonen E.M., Vartio T., Hedman K., Vaheri A. // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. P. 1496 - 1501.
38. Floyd Smith G., Whitehead A.S., Colten H.R.K., Francke U. // Immunogenetics. 1986. V. 24. P. 171 - 176.
39. Goldman N.D., Lei K.J., Liu T. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 7001 - 7005.
40. Nguyen N.-Y., Suzuki A., Boykins R.A., Liu T.-Y. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 10456 - 10465.
41. Nguyen N.-Y., Suzuki A., Cheng S.-M., Zon G., Liu T.-Y. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 10450 - 10455.
42. Kuta A.E., Baum L.L. // J. Exp. Med. 1986. V. 164. P. 321 - 326.
43. Kushner I., Ganapathi M., Schultz D. // Ann. N.Y. Acad. Sci. USA. 1989. V. 557. P. 19 - 29.
44. Le J., Vilcec J. // Lab. Invest. 1989. V. 61. P. 588 - 603.
45. Yamada Y., Kimball K., Okusawa S. // Ann. N.Y. Acad. Sci. USA. 1990. V. 587. P. 351 - 361.
46. Koj A. // Ann. N.Y. Acad. Sci. USA. 1989. V. 557. P. 1 - 8.
47. Mackiewicz A., Ganapathi M.K., Schultz D. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 1491 - 1495.
48. Kinoshita C.M., Ying S.C., Hugli T.E., Siegel J.N., Potempa L.A., Ying H., Houghten R.A., Gewurz H. // Biochemistry. 1989. V. 28. P. 9840 - 9848.
49. Volanakis J.E., Kearney J.F. // J. Exp. Med. 1981. V. 153. P. 1604 - 1614.
50. Kilpatrick J.M., Kearney J.F., Volanakis J.E. // Mol. Immunol. 1982. V. 19. P. 1159 - 1165.
51. Kindmark C.-O.L., Williams J.C. // APMIS. 1989. V. 97. P. 891 - 896.
52. Robey F.A., Liu T.-Y. // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. P. 3895 - 3900.
53. Anderson J.K., Stroud R.M., Volanakis J.E. // Fed. Proc. 1978. V. 37. P. 1495.
54. Ollivier M., Pontet M., Engler R. // Protides Biol. Fluids Proc. 34th Colloq., Oxford, 1986. P. 271 - 274.
55. Oliveira E.B., Gotschlich E.C., Liu T.-Y. // J. Immunol. 1980. V. 124. P. 1396 - 1402.
56. Barnum S., Narkates A.J., Suddath F.L., Volanakis J.E. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1982. V. 389. P. 431 - 434.
57. Hansson L.-O., Lindquist L. // Symp. sur les Marqueurs de l' inflammation. Lyon, 1987. P. 80.
58. Kuwajima S., Kishida T., Noda T., Izumi Y., Naka K., Okuda K. // Ann. Meet. Jpn. Soc. Clin. Chem. 1987. V. 27. P. 148.
59. Volanakis J.E., Clements W.L., Schrohenloher R.E. // J. Immunol. Meth. 1978. V. 23. P. 285 - 295.
60. Swanson S.J., Lin B.-F., Mullenix M.C., Mortensen R.F. // J. Immunol. 1991. V. 146. P. 1596 - 1601.
61. Delukas L.J., Babu Y.S., Bugg C.E., Greenhough T.J., Myles D.A.A., Rule S.A. // J. Mol. Biol. 1987. V. 196. P. 741 - 742.
62. Roux K.H., Kilpatrick J.M., Volanakis J.E., Kearney J.F. // J. Immunol. 1983. V. 131. P. 2411 - 2415.
63. Kaplan M.H., Volanakis J.E. // J. Immunol. 1974. V. 112. P. 2135 - 2147.
64. Volanakis J.E., Wirtz K.W.A. // Nature. 1979. V. 281. P. 155 - 157.
65. Richards R.L., Gewurz H., Siegel J., Alving C.R. // J. Immunol. 1979. V. 122. P. 1185 - 1189.
66. Narkates A.J., Volanakis J.E. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1982. V. 389. P. 172 - 182.
67. Higginbotham J.D., Heidelberger M., Gotschlich E.C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1970. V. 67. P. 138 - 142.
68. Heidelberger M., Gotschlich E.C., Higginbotham J.D. // Carbohydr. Res. 1972. V. 22. P. 1 - 4.
69. Uhlenbruck G., Soelter J., Janssen E., Haupt H. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1981. V. 362. P. 1167 - 1169.
70. Uhlenbruck G., Soelter J., Janssen E., Haupt H. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1982. V. 389. P. 476 - 481.
71. Potempa L.A., Siegel J.N., Gewurz H. // J. Immunol. 1981. V. 127. P. 1509 - 1514.
72. Siegel J.N., Osmand A.P., Wilson M.F., Gewurz H. // J. Exp. Med. 1975. V. 142. P. 709 - 721.
73. Potempa L.A., Siegel J.N., Gewurz H. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1982. V. 389. P. 128 - 130.
74. Rowe I.F., Soutar A.K., Trayner I.M., Thompson G.K., Pepys M.B. // Clin. Exp. Immunol. 1984. V. 58. P. 237 - 244.
75. Pontet M., Tresca J.P., Ollivier M., Engler R. // Marker Proteins in Inflammation. 1986. P. 165 - 167.
76. Rowe I.F., Soutar A.K., Trayner I.M., Baltz M.L. // J. Exp. Med. 1984. V. 159. P. 604 - 616.
77. Robey F.A., Jones K.D., Tanaka T., Liu T.-Y. // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. P. 7311 - 7316.
78. Robey F.A., Jones K.D. // Protides Biol. Fluids Proc. 34th Colloq., Oxford, 1986. P. 267 - 270.
79. Du Clos T.W., Zlock L.T., Rubin R.L. // J. Immunol. 1978. V. 141. P. 4266 - 4270.
80. Robey F.A., Jones K.D., Steinberg A.D. // J. Exp. Med. 1975. P. 1344 - 1356.
81. Shephard E.G., Van Helden P.D., Strauss M., Bohm L., De Beer F.C. // Immunology. 1986. V. 58. P. 489 - 494.
82. Du Clos T.W. // J. Immunol. 1989. V. 143. P. 2553 - 2559.
83. Tseng J., Mortensen R.F. // Fed. Proc. 1987. V. 46. P. 1035.
84. Tseng J., Mortensen R.F. // Mol. Immunol. 1988. V. 25. P. 679 - 686.
85. Swanson S.J., McPeek M.M., Mortensen R.F. // J. Cell. Biochem. 1989. V. 40. P. 121 - 132.
86. Randell E., Mokerjea S., Nagpurkar A. // Biophys. Biochem. Res. Commun. 1990. V. 167. P. 444 - 449.

87. Hanakahi L.A., Holama Y., Kalaiwaa P.K., Moikeha D.H., Wong P.W.L. // Proc. Amer. Associat. Cancer Res. 1987. V. 28. P. 375.
88. Vigo C. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 3418 - 3426.
89. Tatsumi N., Okuda K., Hasimoto K., Kyogoku T. // Clin. Chim. Acta. 1988. V. 172. P. 85 - 92.
90. Croxatto H.D., Nishimura E.T., Yamada K., Hokama Y. // J. Immunol. 1968. V. 100. P. 563 - 567.
91. Tsujimoto M., Inoue K., Nojima S. // J. Biochem. 1983. V. 94. P. 1367 - 1371.
92. Шкурат О.Е. // Вакцины и сыворотки. 1974. Вып. 22. С. 50 - 55.
93. Hokama L., Jam R., Hirama W., Nakamura R.M., Yamada K. // Clin. Chim. Acta. 1974. V. 50. P. 53 - 62.
94. Bodmer B., Siboo R. // J. Immunol. 1977. V. 118. P. 1086 - 1091.
95. Ликна И.В., Старыгина Г.М., Грачев Б.И., Пашинин П.М. Прикладная иммунология. Л., 1971. С. 176 - 182.
96. Osmand A.P., Mortensen R.F., Siegel J., Gewurz H. // J. Exp. Med. 1975. V. 142. P. 1065 - 1073.
97. Pepys M.B., Dash A.C., Ashley M.J. // Clin. Exp. Immunol. 1977. V. 30. P. 32 - 37.
98. Riley R.F., Coleman M.K. // Clin. Chim. Acta. 1970. V. 30. P. 483 - 496.
99. Bach B.A., Gewurz H., Osmand A.P. // Immunochemistry. 1977. V. 14. P. 215 - 219.
100. De Beer F.C., Baltz M.L., Munn E.A., Feinstein A., Taylor J., Bruton C., Clamp J.R., Pepys M.B. // Immunology. 1982. V. 45. P. 55 - 70.
101. Stults N.L., Lee Y.C., Hoppe C.A., Kawaguchi K., Kohda S., Takagahara I., Koishi T., Liu T.-Y. // Anal. Biochem. 1987. V. 161. P. 567 - 573.
102. Hashimoto K., Tatsumi N. // J. Immunol. Meth. 1989. V. 125. P. 295.
103. Pontet M., Engler R., Jayle M.F. // FEBS Lett. 1978. V. 88. P. 172 - 175.
104. Pruden D.J., Connolly K.M., Stecher V.J. // J. Chromatogr. 1988. V. 437. P. 399 - 410.
105. Nunomura W., Hatakeyama M., Hirai H. // J. Biochem. Biophys. Meth. 1990. V. 21. P. 75 - 80.
106. Maudsley S., Baltz M.L., Munn E.A., Buttress N., Herbert J., Feinstein A., Pepys M.B. // Biochim. Biophys. Acta. 1987. V. 924. P. 7580 - 7589.
107. Chesebro B., Metzger H. // Biochemistry. 1972. V. 11. P. 766 - 771.
108. Rifai A., Wong S.S. // J. Immunol. Meth. 1986. V. 94. P. 25 - 30.

## C-Reactive Protein: Structure, Properties, and Isolation

E. G. Zotova\*,<sup>1</sup> E. B. Misyakin\*, S. Zh. Toksambaeva\*,  
K. S. Rubtsov\*\*, and G. A. Serebrennikova\*\*\*

\* Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Russian Academy of Medical Sciences,  
ul. Gamalei 18, Moscow, 123098 Russia

\*\* Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117871 Russia

\*\*\* Lomonosov Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, 117571 Moscow

**Abstract** – Data on the structure, properties, and biosynthesis of C-reactive protein (CRP) are summarized. Special attention is paid to the specific interaction of C-reactive protein with  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent and  $\text{Ca}^{2+}$ -independent ligands: phosphorylcholine-containing compounds, lipoproteins, chromatin, galactans, polycations, etc. The data on the interaction of CRP with  $\text{Ca}^{2+}$  are presented. The methods for the CRP isolation and purification are discussed with an emphasis on affinity chromatography as the most promising method for obtaining purified CRP.

**Key words:** C-reactive protein, isolation, purification, properties, ligands.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed.