

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.21; 617-089.5

©Коллектив авторов

МАСС СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ МОНОМЕРНОЙ РЕНАЛАЗЫ В МОЧЕ ЧЕЛОВЕКА

*В.И. Федченко, О.А. Бунеева, А.Т. Копылов, А.А. Калошин, Л.Н. Аксенова,
В.Г. Згода, А.Е. Медведев**

Федеральное государственное бюджетное учреждение Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича Российской академии медицинских наук, 119121 Москва, ул. Погодинская, 10;
эл. почта: professor57@yandex.ru

Реналаза - недавно обнаруженный белок, который, как полагают, играет важную (хотя и не очень понятную в настоящее время) роль в регуляции кровяного давления. Ранее он был выделен из мочи здоровых добровольцев при помощи фракционирования сульфатом аммония и иммуноаффинной хроматографии (Xu et al. (2005) J. Clin. Invest., **115**, 1275). В очищенном таким образом препарате были обнаружены 2 белка с молекулярной массой 35 и 67-75 кДа. Последний, по мнению авторов, представляет продукт димеризации (или агрегации) белка 35 кДа. В настоящей работе реналазу удалось обнаружить в моче 2 из 6 добровольцев только после иммуноаффинного обогащения проб, предварительно фракционированных сульфатом аммония. Электрофорез очищенного препарата также выявил 2 белка с молекулярной массой 35 и 66 кДа, которые были идентифицированы в ходе масс-спектрометрического анализа как реналаза и сывороточный альбумин. Полученные результаты не согласуются с предположением о формировании димеров реналазы и свидетельствуют о том, что экскреция этого белка в мочу подвержена значительным вариациям у людей.

Ключевые слова: реналаза, моча, фракционирование, иммуноаффинное обогащение, масс-спектрофотометрический анализ

ВВЕДЕНИЕ. Реналаза - недавно открытый секреторный белок, который, как полагают, участвует в регуляции артериального давления у человека и животных [1-3]. И хотя на сегодняшний день механизмы, посредством которых этот белок способствует нормализации артериального давления, остаются невыясненными, а первоначальные данные [1, 2] об участии реналазы в деградации циркулирующих катехоламинов не были подтверждены в других лабораториях [4, 5], есть веские основания рассматривать реналазу в качестве нового важного белкового регулятора артериального давления:

1. Крысы линии Dahl с наследственной предрасположенностью к солечувствительной артериальной гипертензии характеризуются дефицитом реналазы [6].

2. Субтотальная нефрэктомия, способствующая развитию хронической почечной недостаточности у крыс, приводила к снижению циркулирующей в крови реналазы [7]. Снижение экспрессии реналазы (мРНК и белка) было обнаружено и в сердце крыс, подвергнутых в новорожденном возрасте (24-48 ч) аналогичной процедуре [8].

3. Торможение реналазы введением антисенс-РНК приводило как к повышению базального артериального давления, так и гиперергическому ответу на адренергический стресс [6].

* - адресат для переписки

4. У нокаутированных по реналазе мышей отмечен повышенный уровень артериального давления и чувствительность к ишемии миокарда [7]. Введение рекомбинантной реналазы человека крысам приводило к снижению частоты сердечных сокращений и артериального давления [4].

5. Выявлена ассоциация между геном реналазы и развитием эссенциальной гипертензии в северокаитайской популяции (Han Chinese) [9].

6. Снижение секреции почечной реналазы обнаружено у больных нейрогенной формой гипертензии (т.е. гипертензии, обусловленной патологией ЦНС) [10].

На сегодняшний день несколько исследовательских групп подтвердили присутствие реналазы в плазме [1, 11-13]. При этом исследование корреляции между уровнем реналазы, значениями артериального давления и функцией почек, проведенное на 130 пациентах после операции трансплантации сердца, выявило зависимость между уровнем сывороточной реналазы и функцией почек, но не артериального давления [12, 13].

Противоречивые данные существуют по детекции реналазы в моче человека. С одной стороны, каталитически активный фермент был выделен из мочи здоровых добровольцев при помощи фракционирования сульфатом аммония и последующей аффинной хроматографии на агарозе с иммобилизованными антителами против реналазы [1]. В очищенном таким образом препарате реналазы были обнаружены 2 белка с молекулярными массами 35 и 67-75 кДа. Последний, как полагают авторы, представляет продукт димеризации (или агрегации) белка 35 кДа.

С другой стороны, по данным протеомного анализа белков мочи [14, 15], проведенных уже после первой публикации по реналазе, в моче здоровых людей было идентифицировано более 1500 индивидуальных белков [15]. Однако реналазы среди них не оказалось, что ставит под сомнение саму возможность экскреции этого белка с мочой.

В настоящей работе мы предприняли попытку детекции реналазы в образцах мочи добровольцев при помощи масс-спектрометрических подходов в сочетании с фракционированием сульфатом аммония и иммуноаффинным обогащением проб, с использованием поликлональных антиреналазных антител.

МЕТОДИКА. Выделение реналазы из мочи взрослых добровольцев обоего пола, давших информированное согласие (6 человек, средний возраст 54 ± 3 года, артериальное давление $(145 \pm 10)/(90 \pm 5)$ мм рт. ст.), осуществляли следующим образом. Образцы 400 мл мочи от каждого участника центрифугировали 15 мин при 4000 об/мин и 4°C (центрифуга Beckman TJ 6, бакет-ротор) для освобождения от клеток; из супернатанта высаливали белки сульфатом аммония (75% насыщения, 4°C). После центрифугирования при 9000 об/мин (30 мин, 4°C), осадок разводили в 60 мл 50 мМ Трис-ацетатного буфера, pH 7,5. Белок концентрировали и освобождали от сульфата аммония, используя 2-3-х кратное центрифугирование при 6000 об/мин, 4°C (с последующим разведением Трис-ацетатным буфером) в пробирках с мембранными фильтрами Amicon Ultra (Ultracel - 10 K, "Millipore", США). Полученный препарат с концентрацией белка 3 мг/мл (по Бредфорд) использовали для иммунопреципитации с поликлональными антителами ("Покард", Москва), полученными при иммунизации барана рекомбинантной реналазой (Федченко и др., готовится к публикации).

Антитела иммобилизовали на протеин А-сефарозе, инкубируя 2 часа при 4°C и перемешивании в PBS. Ковалентную пришивку антител к протеин А-сефарозе осуществляли в течение 4 ч при 4°C и перемешивании, используя в качестве сшивающего агента диметилпимелимидат (50 мМ раствор в 0,2 М боратном буфере, pH 8,6). Реакцию останавливали 0,1 М Трис-HCl, pH 7,4 (1 ч, комнатная температура). Об эффективности сшивки судили при помощи электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (по исчезновению из раствора лёгких (25 кДа) и тяжелых (55 кДа) цепей иммуноглобулинов).

Иммунопреципитацию проводили согласно P.J. Hansen [16] в 50 мМ Трис-ацетатном буфере, pH 7,5, содержащем 1 мМ PMSF, 2% Igepal (по объёму),

1 mM ЭДТА, 0,3 M NaCl, 1 мг/мл БСА, 0,02% NaN_3 , в суспензии 1:1 в течение ночи при 4°C и постоянном перемешивании. Суспензию промывали 10 mM натрий-фосфатным буфером, содержащим 0,3 M NaCl и 5 mM KCl, pH 7,4, до исчезновения поглощения при 280 нм, формировали колонку (1×2,5 см) и элюировали белки, связавшиеся с антителами, 0,1 M глициновым буфером, pH 2,8, контролируя содержание белка в элюате по поглощению при 280 нм. Элюат концентрировали на мембранном фильтре Amicon Ultra, осаждали белок смесью хлороформ-метанол, растворяли в буфере для нанесения образцов на гель (по Лэммли) и разделяли с помощью SDS-электрофореза в 15% ПААГ. Полосы белков после окрашивания Кумасси R-250 и определения молекулярной массы вырезали и подвергали масс-спектрометрическому анализу.

Мелко нарезанные полосы одномерного геля (приблизительно 1 мм³) дважды отмывали от остаточного количества натрия додецилсульфата в 150 мкл раствора 40% метанола и 10% уксусной кислоты по 10 минут при постоянном встряхивании. Затем промывали однократно в бидистиллированной деионизованной воде (18,2 $\Omega \times \text{см}^2$) в течение 5 мин, после чего добавляли 150 мкл раствора 30% ацетонитрила в 100 mM гидрокарбонате аммония (pH=8,2) и инкубировали в течение 20 минут при 60°C и постоянном перемешивании. Обесцвеченные гели промывали дважды в 300 мкл бидистиллированной деионизованной воде и добавляли по 50 мкл водного раствора 70% ацетонитрила. Гели дегидрировали в течение 5 мин при 4°C и высушивали в вакуумном испарителе 15 минут при 30°C и 2500 об/мин. К высушенному гелю добавляли 7 мкл раствора инактивированного трипсина (концентрация 20 нг/мкл) в 30 mM уксусной кислоте и регидрировали в течение 5 минут при 4°C. К регидрированному гелю добавляли 15 мкл раствора 50 mM гидрокарбоната триэтиламония и инкубировали (реакция расщепления) в течение 3 ч при 37°C. Затем добавляли следующую аликвоту трипсина (7 мкл, 20 нг/мкл) и инкубировали ещё 2 ч при 37°C. По окончании реакции расщепления первичный надгелевый раствор отбирали в чистую пробирку. Для экстракции пептидов из геля добавляли трижды по 50 мкл раствора 5% муравьиной кислоты. Кислую экстракцию проводили в два этапа: 10 мин инкубации в ультразвуковой бане (Bandelin Electronic, Sonorex TK52, Германия), после чего 10 мин инкубировали при комнатной температуре и постоянном встряхивании. Надгелевые растворы после каждой экстракции объединяли с первичным надгелевым раствором и объединённую фракцию высушивали при 30°C. Сухой остаток ресуспендировали в 7 мкл раствора 2% муравьиной кислоты для хромато-масс-спектрометрического анализа.

Масс-спектрометрический анализ проводили на квадрупольном времяпролетном масс-спектрометре Q-TOF (Agilent 6520), сопряжённом с нанопотоковой системой высокоэффективной жидкостной хроматографии (Agilent 1200). Пробу в объёме 1 мкл наносили на обогащающую колонку с обращенной фазой Zorbax SB-300C18 (40 нл, размер частиц 5 мкм) при скорости потока 2 мкл/мин в течение 3,5 минут в растворе с изократическим градиентом (5% ацетонитрил, 0,1% муравьиная кислота, 0,003% трифторуксусная кислота, 0,002% гептафтормасляная кислота). Хроматографическое разделение пептидов с аналитической колонки SB-C18 (150 мм × 75 мкм, размер частиц 5 мкм) осуществляли в линейном градиенте подвижной фазы А (0,1% муравьиной кислоты) и В (80% ацетонитрил, 0,1% муравьиной кислоты, 0,003% трифторуксусной кислоты) в течение 50 минут при постоянной скорости потока 0,3 мкл/мин. Элюированные пептиды регистрировали в режиме тандемной масс-спектрометрии при следующих условиях: напряжение на капилляре 1970 В, потенциал на скиммере 172 В, температура осушающего газа (азот) 260°C, скорость осушающего газа 5 л/мин, давление в ячейке соударения $1,17 \times 10^{-6}$ мБар. Регистрацию сигнала проводили при скорости сканирования 3,14 спектров/с на уровне MS и 4,6 спектров/сек на уровне MS/MS. За один цикл сканирования отбирали не более 3 родительских ионов с активным режимом исключения в течение 0,7 минут. Энергию соударения рассчитывали как линейную

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ РЕНАЛАЗЫ В МОЧЕ ЧЕЛОВЕКА

зависимость с тангенсом угла наклона 5,68 и компенсацией в +3,62 эВ. Полученные данные анализировали в системе Spectrum Mill MS Proteomics Workbench Rev A.03.03.078 ("Agilent Technologies", США) по базе данных SwissProt и субпротеому *Homo sapiens*. Белок считался идентифицированным в случае идентификации как минимум двух протеотипических пептидов, принадлежащих одному белку с индексом достоверности для каждого пептида, превышающим значение 7,0, а для всего белка ≥ 13 . В качестве фиксированных модификаций выбирали пропионамидирование, в качестве лабильных модификаций - окисление метионинов и С-концевая конвертация пироглутамата. Толерантность на уровне МС $\pm 0,5$ Да, толерантность на уровне МС/МС $\pm 0,1$ Да.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Прямое введение суммарного препарата белков мочи, выделенного с помощью высокой концентрации сульфата аммония (75% насыщения), обычно используемой для этих целей [17], позволило идентифицировать более 60 отдельных белков (таблица), среди которых реналаза не была обнаружена. Такое небольшое количество идентифицированных в моче белков может быть связано с переходом белковых молекул в раствор при высоких концентрациях сульфата аммония (более 2,7 М) [18, 19]. Этот эффект обусловлен ростом концентрации свободного более гидрофобного сульфат аниона в среде с высокой ионной силой [20, 21].

Очистка фракции белков мочи на иммуноаффинном сорбенте с иммобилизованными на бромциан-активированной сефарозе поликлональными антителами против рекомбинантной реналазы человека и последующий электрофоретический анализ белков, связавшихся с иммуноаффинным сорбентом, выявил ряд белковых полос (рис. 1), молекулярная масса которых соответствовала мономерной реналазе и её димеру, о возможности формирования которого сообщали Хи и соавторы [1]. Однако, прямой масс-спектрометрический анализ этих полос выявил присутствие реналазы только в полосе, соответствующей 38 кДа (рис. 2). Полоса с молекулярной массой ок. 66 кДа была представлена сывороточным альбумином, который, как известно, часто связывается с иммуноглобулинами [22].

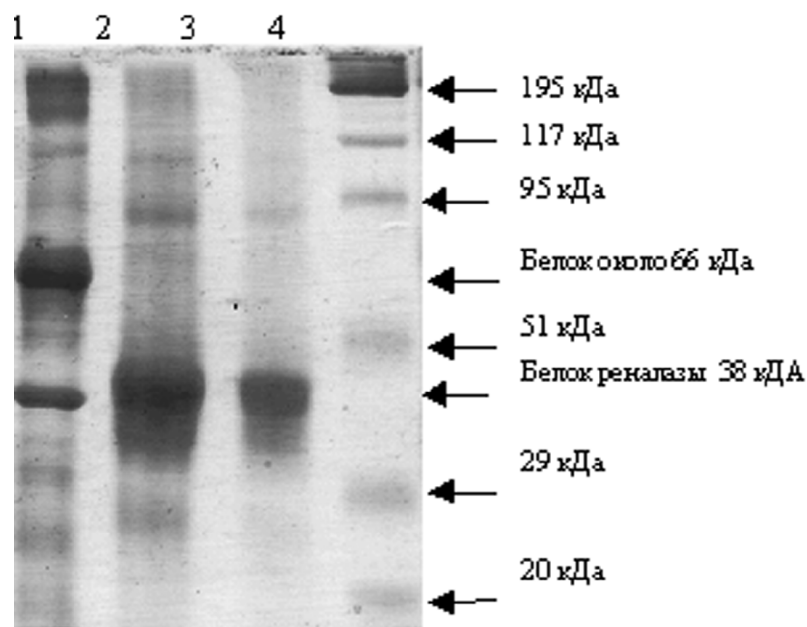


Рисунок 1.

Электрофоретический анализ белков мочи человека, связавшихся с поликлональными антителами против рекомбинантной реналазы человека, иммобилизованными на бромциан-активированной сефарозе. Дорожки: 1- элюат с колонки протеин А-сефарозы с поликлональными антителами к реналазе 1; 2-3 рекомбинантная реналаза 1; 4- маркеры молекулярной массы Prestained Standards Broad Range.

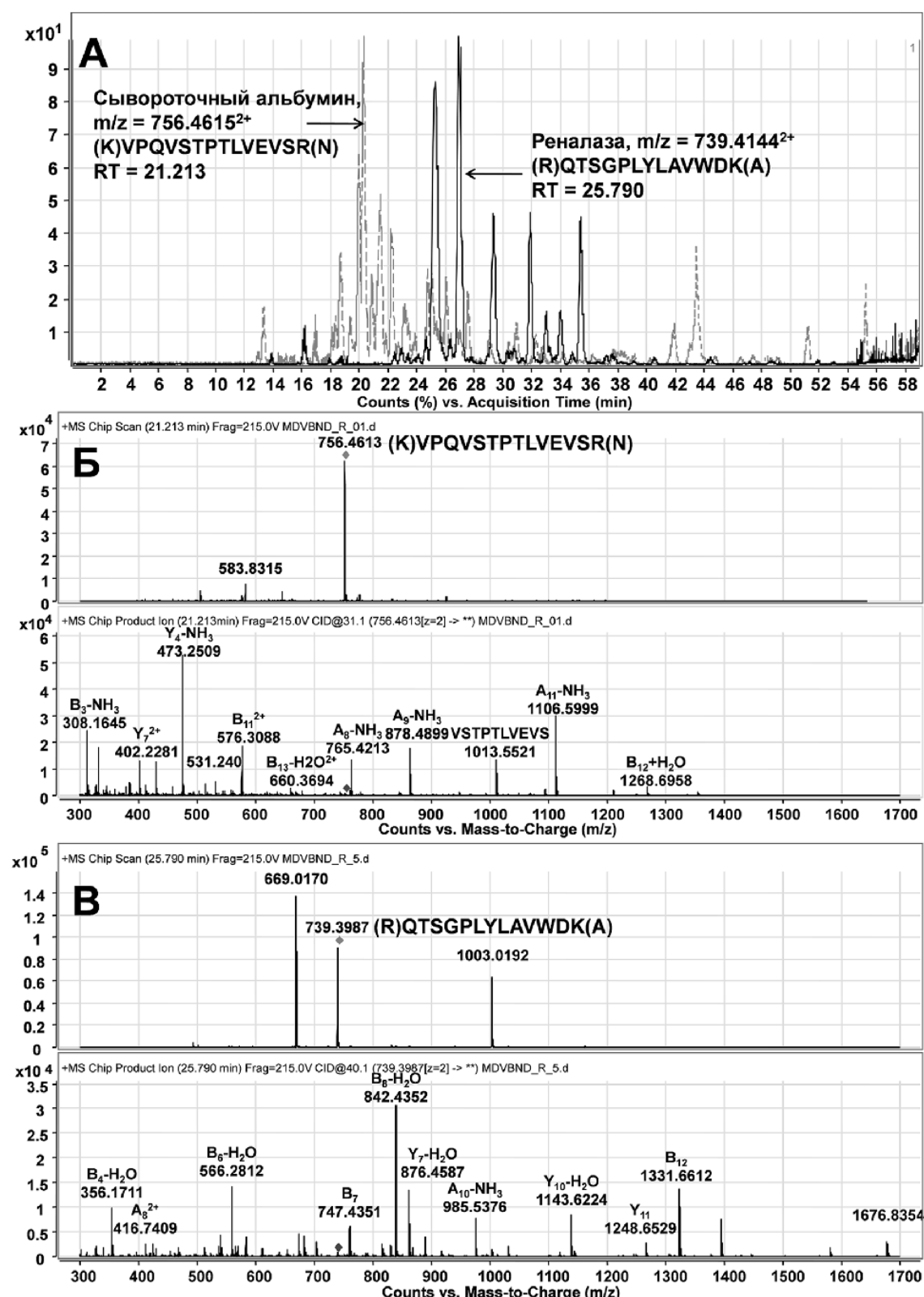


Рисунок 2.

Хроматограмма разделения пептидов (А) сывороточного альбумина (штриховая линия) и реналазы (сплошная линия). По оси ординат масс-спектрометрическая интенсивность пиков представлена в нормированных процентных единицах. Масс-спектр наиболее представленных родительских ионов и их фрагментов для сывороточного альбумина (Б) и реналазы (В).

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ РЕНАЛАЗЫ В МОЧЕ ЧЕЛОВЕКА

Таблица. Белки, идентифицированные в препарате мочи человека, подвергнутой фракционированию сульфатом аммония.

Идентификатор белка в системе Uniprot ID	Рекомендуемое название белка	Молекулярная масса белка, кДа	Индекс достоверности идентификации	pI белка
P02768	Serum albumin	69,367	278,09	5,92
P07911	Uromodulin	69,761	198,76	5,05
P68871	Hemoglobin subunit beta	15,998	156,46	6,74
P02760	Protein AMBP	38,999	142,23	5,95
P98160	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	468,800	137,08	6,06
P02750	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	38,178	135,29	6,45
P01042	Kininogen-1	71,957	133,45	6,34
P10451	Osteopontin	35,422	119,59	4,37
P01834	Ig kappa chain C region	11,608	110,58	5,58
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	39,324	106,48	5,43
P12830	Cadherin-1	97,456	103,23	4,58
P01842	Ig lambda chain C regions	11,236	89,10	6,91
Q12907	Vesicular integral-membrane protein VIP36	40,228	76,41	6,46
P10909	Clusterin	52,494	69,90	5,89
O94919	Endonuclease domain-containing 1 protein	55,016	69,62	5,55
Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	103,357	68,18	6,51
Q6EMK4	Vasorin	71,713	67,92	7,16
P01859	Ig gamma-2 chain C region	35,900	59,63	7,66
P05090	Apolipoprotein D	21,275	52,23	5,06
P02751	Fibronectin	262,607	51,50	5,45
Q8WZ75	Roundabout homolog 4	107,485	49,75	6,18
P11684	Uteroglobin	9,993	46,25	4,99
P30530	Tyrosine-protein kinase receptor UFO	98,336	45,77	5,27
P01009	Alpha-1-antitrypsin	46,736	44,34	5,37
P01876	Ig alpha-1 chain C region	37,645	43,38	6,08
P07602	Proactivator polypeptide	58,113	43,04	5,07
P16070	CD44 antigen	81,554	40,88	5,13
Q08380	Galectin-3-binding protein	65,331	38,05	5,13
P10153	Non-secretory ribonuclease	18,354	37,80	9,10
P04206	Ig kappa chain V-III region GOL	11,830	37,71	9,34
Q15828	Cystatin-M	16,551	33,45	8,32
Q12805	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	54,641	33,26	4,95
P41222	Prostaglandin-H2 D-isomerase	21,028	32,48	7,65
P19320	Vascular cell adhesion protein	81,276	31,47	5,14

Таблица. Продолжение.

Идентификатор белка в системе Uniprot ID	Рекомендуемое название белка	Молекулярная масса белка, кДа	Индекс достоверности идентификации	pI белка
P00734	Prothrombin	70,037	31,03	5,64
P07288	Prostate-specific antigen	28,741	30,79	7,61
Q7Z5L0	Vitelline membrane outer layer protein 1 homolog	21,534	29,43	4,90
P06870	Kallikrein-1	28,889	28,66	4,68
P02763	Alpha-1-acid glycoprotein 1	23,551	28,61	4,93
P61679	Beta-2-microglobulin	13,714	26,84	6,06
P04004	Vitronectin	54,305	25,75	5,55
P14543	Nidogen-1	136,377	25,55	5,12
P01593	Ig kappa chain V-I region AG	11,992	25,44	5,67
P04217	Alpha-1B-glycoprotein	54,272	24,84	5,58
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	66,039	24,55	8,15
Q8WZ42	Titin	3816,206	23,06	6,01
P19652	Alpha-1-acid glycoprotein 2	23,602	22,91	5,03
P69905	Hemoglobin subunit alpha	15,257	21,17	8,72
P06310	Ig kappa chain V-II region RPMI 6410	14,706	20,36	9,34
O75594	Peptidoglycan recognition protein	21,703	20,23	8,92
P05155	Plasma protease C1 inhibitor	55,154	20,11	6,09
P06702	Protein S100-A9	13,242	19,95	5,71
Q9H299	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	10,437	19,18	4,82
Q16661	Guanylate cyclase activator 2B	12,069	19,04	6,02
Q6UXB8	Peptidase inhibitor 16	49,471	18,86	5,24
P01591	Immunoglobulin J chain	18,098	18,27	5,12
P04208	Ig lambda chain V-I region WAH	11,725	18,26	6,29
Q8WVN6	Secreted and transmembrane protein 1	27,039	17,73	7,00
Q02487	Desmocollin-2	99,962	15,29	5,18
P49747	Cartilage oligomeric matrix protein	82,861	15,05	4,36
Q16270	Insulin-like growth factor-binding protein 7	29,130	14,58	8,25
P22105	Tenascin-X	464,459	14,27	5,20
P62988	Ubiquitin	8,654	14,17	6,56
Q9UNN8	Endothelial protein C receptor	26,671	14,07	6,70
O75144	ICOS ligand	33,349	14,04	5,15

Таким образом, результаты нашей работы формально подтверждают данные Ху и соавторов о присутствии реналазы в моче [1], которая, по нашим данным, димеры в этой биологической жидкости не образует. В то же время необходимо отметить, что приведенные выше результаты получены и воспроизведены всего на 2 из 6 проанализированных образцов мочи. В других 4 образцах реналаза не была обнаружена. Последнее позволяет предположить, что экскреция этого белка в мочу подвержена значительным вариациям у людей, которые требуют отдельного изучения.

Данная работа поддержана грантом РФФИ № 11-04-01181-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Xu J., Li G., Wang P., Velazquez H., Yao X., Li Y., Wu Y., Peixoto A., Crowley S., Desir G.V. (2005) J. Clin. Invest., **115**, 1275-1280.
2. Li G., Xu J., Wang P., Velazquez H., Li Y., Wu Y., Desir G.V. (2008) Circulation, **117**, 1277-1282.
3. Медведев А.Е., Веселовский А.В., Федченко В.И. (2010) Биохимия, **75**, 1045-1054.
4. Pandini V., Ciriello F., Tedeschi G., Rossoni G., Zanetti G., Aliverti A. (2010) Protein Expr. Purif., **72**, 244-253.
5. Milani M., Ciriello F., Baroni S., Pandini V., Canevari G., Bolognesi M., Aliverti A. (2011) J. Mol. Biol., **411**, 463-473.
6. Xu J., Desir G.V. (2007) Curr. Opin. Nephrol. Hypertens., **16**, 373-378.
7. Desir G.V. (2008) Curr. Opin. Nephrol. Hypertens., **17**, 181-185.
8. Ghosh S.S., Krieg R.J., Sica D.A., Wang R., Fakhry I., Gehr T. (2009) Pediatr. Nephrol., **24**, 367-377.
9. Zhao Q., Fan Z., He J., Chen S., Li H., Zhang P., Wang L., Hu D., Huang J., Qiang B., Gu D. (2007) J. Mol. Med., **85**, 877-885.
10. Socratous F., Eikelis N., Hennebry S., Schlaich M.P. (2009) Hypertension, **53**, 1117.
11. Malyszko J., Zbroch E., Malyszko J.S., Koc-Zorawska E., Mysliwiec M. (2011) Transplant. Proc., **43**, 3004-3007.
12. Przybylowski P., Malyszko J., Kozłowska S., Malyszko J., Koc-Zorawska E., Mysliwiec M. (2011) Transplant. Proc., **43**, 3888-3891.
13. Zbroch E., Malyszko J., Malyszko J.S., Koc-Zorawska E., Mysliwiec M. (2012) Kidney Blood Press Res., **35**, 395-399.
14. Агрон И.А., Автономов Д.М., Кононихин А.С., Попов И.А., Мошковский С.А., Николаев Е.Н. (2010) Биохимия, **75**, 636-641.
15. Adachi J., Kumar Ch., Zhang Y., Olsen J.V., Mann M. (2006) Genome Biol., **9**, R80. (<http://genomebiology.com/2006/7/9/R80>).
16. Hansen P.J. http://www.protocol-online.org/prot/Molecular_Biology/Protein/Immunoprecipitation_IP_/index.html
17. Doonan S.T. (ed.) (1996) In: Bulk Purification by Fractional Precipitation. New Jersey: Methods in Molecular Biology; pp. 135-150.
18. Mahn A., Ismail M. (2011) J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., **879**, 3645-3648.
19. Soll D. (1995) tRNA: Structure, Biosynthesis and Function, ASM Press, New York.
20. Ward W.W., Swiatek G. (2011) Prot. Purif., Curr. Anal. Chem., **879**, 3645-3648.
22. de Roos B., Duthie S.J., Polley A.C., Mulholland F., Bouwman F.G., Heim C., Rucklidge G.J., Johnson I.T., Mariman E.C., Daniel H., Elliott R.M. (2008) J. Proteome Res., **7**, 2280-2290.
22. Medvedev A.E., Kopylov A.T., Buneeva O.A., Zgoda V.G., Archakov A.I. (2012) Proteomics, **12**, 621-637.

Поступила: 21. 11. 2011.

MASS SPECTROMETRY DETECTION OF MONOMERIC RENALASE IN HUMAN URINE

*V.I. Fedchenko, O.A. Buneeva, A.T. Kopylov, A.A. Kaloshin, L.N. Axenova,
V.G. Zgoda, A.E. Medvedev*

Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences,
ul. Pogodinskaya, 10, 119121 Moscow, Russia; e-mail: professor57@yandex.ru

Renalase is a recently discovered secretory protein, which is suggested to play a role (which still remains elusive) in regulation of blood pressure. Earlier it was purified from urine of healthy volunteers by means of ammonium sulfate fractionation and subsequent affinity chromatography (Xu et al. (2005) J. Clin. Invest., **115**, 1275). The resultant purified preparation of renalase contained 2 proteins with molecular masses of 35 and 67-75 kDa. The authors believed that the latter represents a dimerization (aggregation) product of the 35 kDa protein. In this study we have detected renalase in urinary samples of 2 of 6 volunteers only after immunoaffinity enrichment of urinary samples subjected to ammonium sulfate precipitation. Electrophoresis of the purified preparation also demonstrated the presence of 2 proteins with molecular masses of 35 and 66 kDa, respectively. Mass spectrometry analysis of these proteins identified 35 and 66 kDa proteins as renalase and serum albumin, respectively. Thus, our results do not support suggestion on formation of renalase dimers and they indicate that urinary renalase excretion significantly varies in humans.

Key words: renalase, urine, fractionation, immunoaffinity enrichment, mass spectrometry analysis.