

УДК 573.663

ВОССТАНОВЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ *Serratia marcescens* NucSma(H89G) ГИДРОКСИЛАМИНОМ

Р.Г. Хамидуллина, И.И. Фазлеева, О.А. Гимадутдинов

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Аннотация

Известно, что гистидин играет важную роль в каталитической активности многих нуклеаз. Выполняя функцию общего основания данных ферментов, он активирует образование гидроксила из молекулы воды, который, в свою очередь, атакуя атом фосфора диэфирной связи, вызывает ее разрыв. Ранее было установлено, что у эндонуклеазы *Serratia marcescens* замена гистидина на глицин приводит к инактивации этого фермента. В настоящей работе было показано, что гидроксиламин восстанавливает активность мутантного фермента эндонуклеазы *Serratia marcescens*, у которого гистидин в 89-м положении заменен на глицин.

Ключевые слова: эндонуклеаза, плаزمид, гидроксиламин, гистидин, имидазол

Введение

Эндонуклеаза *Serratia marcescens* относится к ферментам, способным расщеплять как ДНК, так и РНК [1]. Ранее ген эндонуклеазы был клонирован в плазмиде pHisNucSma [2, 3], были получены мутантные белки [4], а также изучен механизм действия этого фермента [5].

В настоящее время широкое распространение получил метод химического восстановления ферментов. При добавлении в среду с неактивным мутантным энзимом низкомолекулярных соединений, сходных по химическим свойствам с утерянными аминокислотными остатками, происходит восстановление активности данного фермента.

Эффект восстановления связан с тем, что в результате мутаций исходные аминокислоты заменяются на более низкомолекулярные. В результате этого в активном центре могут образоваться своеобразные «карманы», в которые диффундируют экзогенные молекулы, содержащие утерянные при мутагенезе необходимые для катализа реакционные группы [6]. Было предположено, что такими молекулами могут служить вещества, содержащие радикалы аминокислот, а также низкомолекулярные амины [7]. Было также показано, что увеличение размера молекулы экзогенного вещества, находящегося в активном центре фермента, уменьшает восстановление его активности [8].

Метод химического восстановления активности для ДНКаз был впервые применен В.-Я. Чен с соавторами [8] к мутантной панкреатической ДНКазе, у которой в активном центре гистидин в положении 134 и 252 замещен на глицин

и аланин. Добавление в реакционную среду имидазола, а также первичных аминов приводило к увеличению активности мутантных ферментов. Такой же эффект наблюдался у мутантного фермента ДНКазы II (H115A и H297A) при добавлении в реакционную среду имидазола [8].

Позже М. Мидон с соавторами [9] выявили возможность восстановления имидазолом каталитической активности ряда эндонуклеаз: *Streptococcus pneumoniae* EndA(H160A), *Anabaena* sp. NucA(H124A) и *Serratia marcescens* NucSma(H89G). Они выдвинули предположение о том, что восстановление активности фермента будет происходить не полностью, так как при замещении утерянного радикала гистидина имидазолом его расположение в активном сайте будет неоптимальным. Ими также было показано, что при базальном уровне экспрессии гена эндонуклеазы *Serratia marcescens* в клетках *E. coli*, небольшое количество фермента может синтезироваться в клетках, вызывая гидролиз хозяйской ДНК и РНК, что приводит к замедлению роста культуры.

Наряду с вышеуказанными веществами некоторые низкомолекулярные амины (этиламин, гидроксиламин, гидрозин и др.) также способны восстанавливать активность ферментов, выполняя функцию общего основания, которую в ферментах дикого типа осуществляет остаток гистидина.

На основании того, что гистидин, имидазол и амины, являющиеся нуклеофилами, могут восстанавливать активность мутантной эндонуклеазы *Serratia marcescens*, у которой в 89-м положении гистидин заменен на глицин [9], мы предположили, что гидроксиламин, как и гистидин, обладает отмеченной способностью.

1. Материалы и методы

1.1. Объекты исследования. В работе были использованы рекомбинантные штаммы *E. coli* TGE900 [4], несущие плазмиды pHisNucSma(H89G) или pHisNucSma(wt). Плазмиды содержат ген мутантного или дикого вариантов NucSma, обладающих 0%-ной или 100%-ной нуклеазной активностью соответственно. Гены в плазмиде pHisNucSma находятся под контролем P_L -промотора фага λ , транскрипционная активность которого в клетках *E. coli* TGE900 регулируется термочувствительным C1-белком-репрессором (рис. 1) [10].

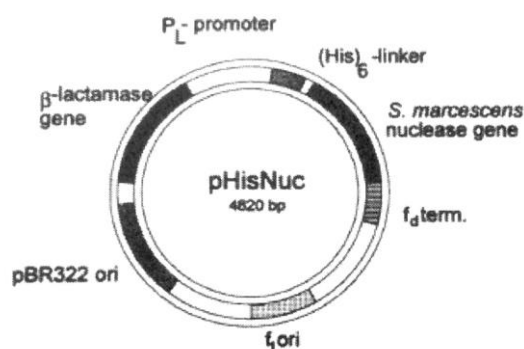


Рис. 1. Структура плазмиды pHisNucSma [4]

1.2. Питательные среды. В работе были использованы жидкая и твердая LB-среды, в которые для создания селективных условий вносили ампициллин в концентрации 100 мкг/мл.

1.3. Влияние гидроксилamina на рост рекомбинантных штаммов *E. coli* TGE900 pHisNucSma(H89G) и *E. coli* TGE900 pHisNucSma(wt). Выращенную при комнатной температуре ночную культуру разводили в LB-бульоне, содержащем ампициллин, до оптической плотности D_{600} 0.05. Полученную культуру разливали в три колбы по 10 мл, в опытные варианты добавляли раствор гидроксилamina так, чтобы конечная концентрация гидроксилamina в среде составляла 0.2 мМ. Штаммы выращивали на качалке при комнатной температуре.

В процессе роста отбирали пробы с интервалом в 1 ч для измерения оптической плотности. Измерение оптической плотности проводили на фотоэлектроколориметре КФК-2 при длине волны 600 нм.

На основании полученных данных построены кривые зависимости оптической плотности от времени культивирования в среде с гидроксилaminом и без него. Статическую обработку данных проводили с использованием программы Microsoft Excel.

1.4. Очистка фермента. К 100 мл среды с ампициллином добавляли 2 мл ночной культуры, выращенной при комнатной температуре, и культивировали при 28°C на качалке до достижения оптической плотности D_{600} 0.5.

Для индукции экспрессии генов эндонуклеазы *S. marcescens* увеличивали температуру выращивания до 42 °С и инкубировали культуру в течение 4–5 ч. После этого клетки осаждали на центрифуге Awell MF20R (Франция) при 5000 об./мин, $t = 4$ °С. Далее осадок ресуспензировали в 20 мл буфера (10 мМ Tris, pH 8.2 + 1 мМ EDTA + 20 мМ имидазол) и разрушали клетки на ультразвуковом дезинтеграторе 6 раз по 1 мин с промежутком 1 мин. Обломки клеток осаждали при 14000 об./мин в течение 30 мин, надосадок отбирали и использовали для очистки фермента.

Колонки с никелевой агарозой промывали 10 мл буфера (10 мМ Tris, pH 8.2 + 1 мМ EDTA + 10 мМ имидазол). На колонки наносили по 20 мкл надосадка, осажденного при 14000 об./мин, затем промывали 10 мкл буфером (10 мМ Tris, pH 8.2 + 1 мМ EDTA + 20 мМ имидазол). Связавшиеся нуклеазы с никелевой агарозой элюировали порциями по 1 мл буфера (10 мМ Tris, pH 8.2 + 1 мМ EDTA + 200 мМ имидазол). Из каждого элюата отбирали по 10 мкл пробы.

Элюаты помещали в диализные мешочки и диализировали против 1000 мл буфера, содержащего 10 мМ Tris, pH 8.2, и 1 мМ EDTA. После диализа определяли концентрацию ферментов на приборе NanoDrop и добавляли к диализату глицерин до конечной концентрации 30%. Ферменты хранили при –20 °С.

1.5. SDS-электрофорез в 15%-ном полиакриламидном геле. Электрофорез вели 2–3 ч при силе тока 35 мА, затем гель окрашивали раствором Кумасси и подвергали дальнейшему анализу.

1.6. Восстановление активности мутантной нуклеазы *Serratia marcescens*(H89G) гидроксиламин. Восстановление активности фермента определяли по гидролизу плазмидной ДНК. В качестве субстрата использовали ДНК плазмиды pBSK размером 3.19 kb.

Очищенный фермент NucSma(wt) разводили в 1000 раз (1 мкл фермента и 999 мкл буфера). Для разведения использовали буфер следующего состава: 1 мкл 2М Tris pH 8.2 + 1 мкл 50 мМ MgCl₂ + 8 мкл дистиллированной воды.

Для реакции готовили смесь, состоящую из 10 мкл буфера, 10 мкл ДНК pBSK (15 нг/мкл), 80 мкл дистиллированной воды. Затем из полученной смеси отбирали 54 мкл и добавляли 5 мкл разведенного фермента (H89G), 1 мкл NH₂OH (200 пМ) и 6 мкл дистиллированной воды в случае контроля или 6 мкл фермента (wt) в качестве контроля для дикого типа. Реакцию проводили в течение 2 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 10 мкл буфера для нанесения на электрофорез.

1.7. Электрофорез в агарозном геле. Электрофорез в агарозном геле проводили при постоянном напряжении электрического тока 8 В/см. Состав геля: 1%-ная агароза; 100 мМ трис-боратный буфер, pH 8.0.

2. Результаты и их обсуждение

Как уже отмечалось ранее, в последнее время находит большое применение метод химического восстановления ферментов, позволяющий активировать неактивные мутантные варианты энзимов путем внесения в реакционную среду веществ, сходных по свойствам с замененной в процессе мутагенеза аминокислотой [7, 9]. В связи с этим мы исследовали возможность восстановления под действием гидроксиламина неактивного мутантного варианта H89G нуклеазы *S. marcescens*, у которой в 89-м положении гистидин заменен на глицин.

Известно, что гидроксиламин является слабым мутагеном, который специфически вызывает дезаминирование цитозина, приводящее к транзиции CG → TA. Поскольку у изучаемого неактивного мутантного варианта гистидин в 89-м положении заменен на глицин, мы проверили, будут ли триплеты, кодирующие глицин, в процессе транзиции заменены на триплет, кодирующий другую аминокислоту. Результаты такого анализа показали, что имеется только один триплет, у которого возможна транзиция, однако она не приводит к замене глицина на другую аминокислоту (табл. 1).

Табл. 1

Генетический код глицина

Кодоны	Аминокислота
GGT	Глицин
GGC → GGT	
GGA	
GGG	

Кроме того, гидроксиламин в экспериментах *in vivo* может не только обладать способностью потенциально восстанавливать активность мутантных нуклеаз

приводя к замедлению роста клеток, но и оказывать токсическое действие на культуру. Поэтому для определения концентрации гидроксиламина, которая не будет оказывать токсического действия на рост культуры рекомбинантного штамма *E. coli* TGE900 pHisNucSma(H89G), мы использовали только рекомбинантный штамм *E. coli* TGE900, несущий ген дикого типа NucSma(wt). В качестве контроля использовали культуру без добавления гидроксиламина.

Нами были использованы следующие концентрации гидроксиламина: 50, 10, 5, 1, 0.2 и 0.1 мМ. В пробирки, содержащие по 1 мл среды с гидроксиламином в указанных концентрациях, засеивали клетки рекомбинантного штамма *E. coli* TGE900 pHisNucSma(wt). В контрольную пробирку гидроксиламин не добавляли. Пробирки оставляли инкубироваться на качалке при комнатной температуре на ночь. На следующий день оценивали рост культуры в пробирках по сравнению с контрольным вариантом. Оказалось, что гидроксиламин при концентрации 0.2 мМ и ниже не оказывал влияния на рост клеток. Поэтому для дальнейших экспериментов нами была выбрана концентрация гидроксиламина, равная 0.2 мМ.

2.1. Влияние гидроксиламина на рост рекомбинантных штаммов *E. coli* TGE900 pHisNucSma(H89G) и *E. coli* TGE900 pHisNucSma(wt). Учитывая то, что вещество, потенциально способное восстанавливать активность мутантной нуклеазы, при добавлении *in vivo* может вызывать замедление роста культуры, мы выращивали рекомбинантные штаммы *E. coli* TGE900 pHisNucSma(H89G) и *E. coli* TGE900 pHisNucSma(wt) при комнатной температуре в присутствии и в отсутствие гидроксиламина. Динамику роста культуры клеток определяли по изменению оптической плотности культуральной жидкости (см. рис. 2).

Как видно из рисунка, культура клеток *E. coli* TGE900 pHisNucSma(H89G) существенно замедляла свой рост в присутствии гидроксиламина. В то же время такой зависимости у рекомбинантного штамма *E. coli* TGE900 pHisNucSma(wt) обнаружено не было.

Мы установили, что гидроксиламин, так же как и гистидин, имидазол и амины, являющиеся нуклеофилами, может восстанавливать активность мутантного фермента. Это можно объяснить тем, что, попав внутрь активного центра инактивированного фермента, гидроксиламин, выполняя функцию общего основания, которую в ферменте дикого типа выполняет остаток His89, может активировать образование гидроксила (ОН⁻). Гидроксил, атакуя атом фосфора фосфоэфирной связи, находящейся в активном центре, вызывает ее разрыв.

2.2. Влияние гидроксиламина на восстановление активности мутантного варианта эндонуклеазы NucSma(H89G). Для изучения влияния гидроксиламина на восстановление активности нуклеазы NucSma(H89G) *in vitro* мы выделяли и очищали исходный и мутантный ферменты с помощью Ni-NTA-агарозы.

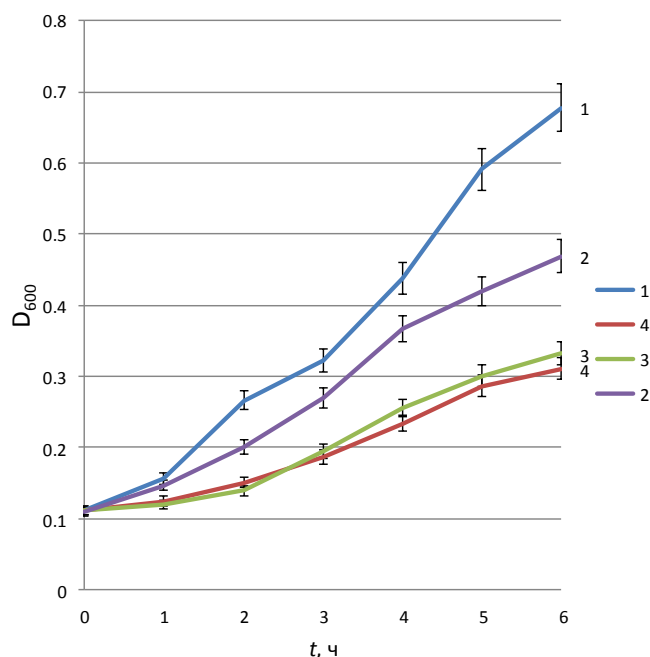


Рис. 2. Зависимость оптической плотности D_{600} от времени культивирования для рекомбинантных штаммов *E. coli*: 1 – *E. coli* TGE900 NucSma(H89G) без гидроксилamina; 2 – *E. coli* TGE900 NucSma(H89G) с гидроксилamiном; 3 – *E. coli* TGE900 NucSma(wt) с гидроксилamiном; 4 – *E. coli* TGE900 NucSma(wt) без гидроксилamina

Поскольку ген эндонуклеазы рекомбинантного штамма *E. coli* TGE900 pHisNucSma(H89G) находится под P_L -промотором, который репрессируется температурочувствительным белком-репрессором C1 бактериофага λ (ген которого находится в хромосоме клетки хозяина), рекомбинантные штаммы сначала выращивали на качалке при температуре 28 °C до оптической плотности 0.5 (600 нм), а затем проводили индукцию синтеза фермента, повысив температуру выращивания до 42 °C, в течение 5 ч. Индукцию анализировали с помощью SDS-электрофореза (рис. 3).

Как видно из рис. 3, после индукции рекомбинантных штаммов клеток *E. coli* TGE900 pHisNucSma(H89G) и *E. coli* pHisNucSma(wt) происходит увеличение белка в области ~ 30 кДа, что указывает на увеличение синтеза эндонуклеазы NucSma под действием температуры. У неиндуцированных рекомбинантных штаммов такого увеличения не наблюдается.

Очистку нуклеазы проводили методом хроматографии на Ni-NTA-колонке. Элюаты очищенных ферментов проверяли на чистоту с помощью SDS-электрофореза в 15%-ном полиакриламидном геле (рис. 4).

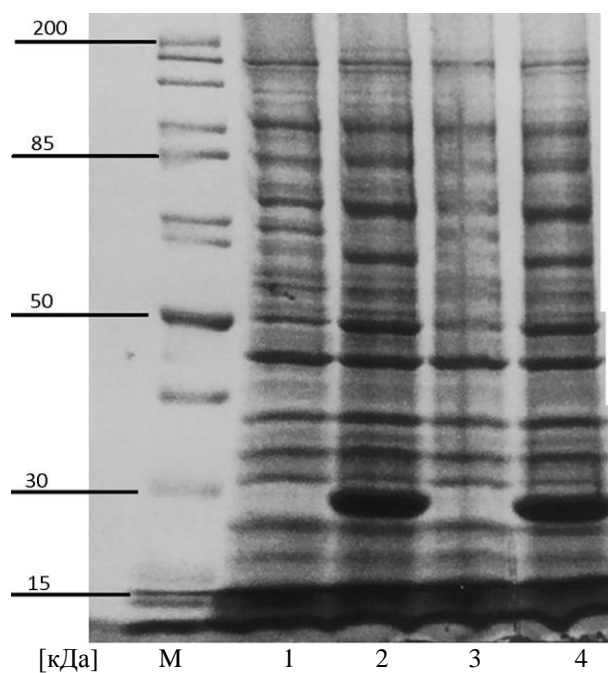


Рис. 3. Электрофореграмма белков рекомбинантных штаммов *E. coli* TGE900 до и после индукции гена эндонуклеазы *S. marcescens*: М – молекулярный маркер RageRuler Unstained Protein Ladder фирмы Fermentas; 1 – NucSma(H89G) до индукции гена эндонуклеазы *S. marcescens*; 2 – NucSma(H89G) после индукции гена эндонуклеазы *S. marcescens*; 3 – NucSma(wt) до индукции гена эндонуклеазы *S. marcescens*; 4 – NucSma(wt) после индукции гена эндонуклеазы *S. marcescens*

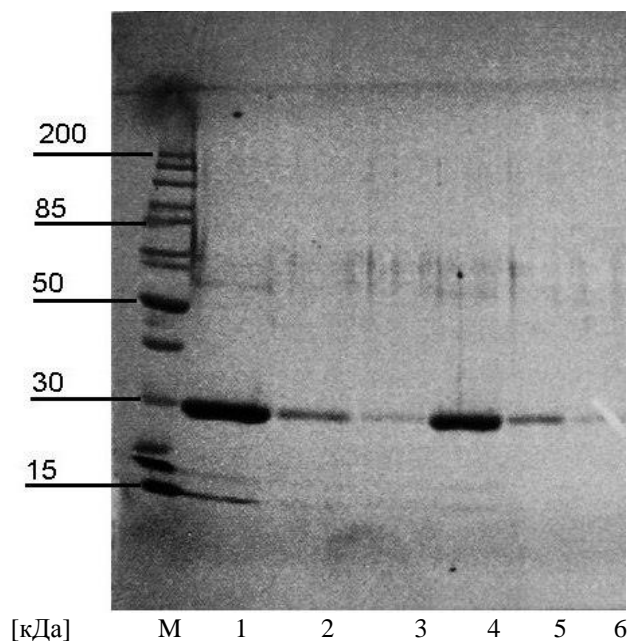


Рис. 4. Электрофореграмма фракций белков после элюции с Ni-NTA-агарозой: М – молекулярный маркер RageRuler Unstained Protein Ladder фирмы Fermentas; 1–3 – NucSma(H89G); 4–6 – NucSma(wt)

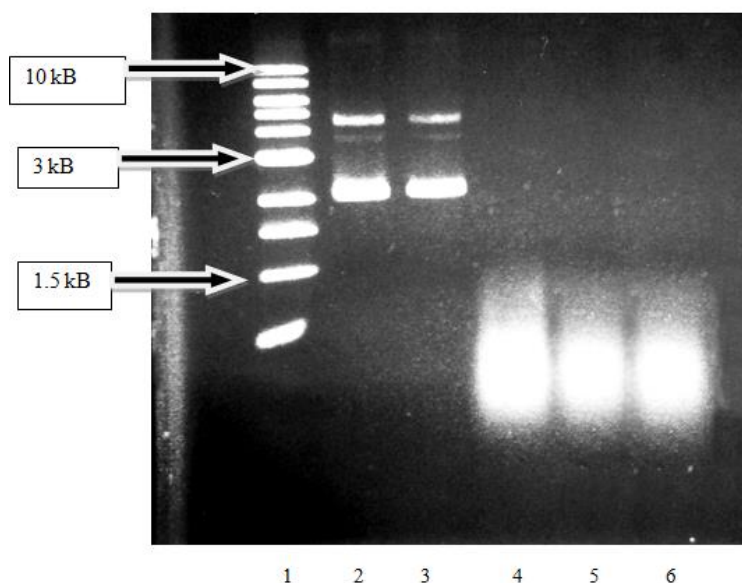


Рис. 5. Электрофореграмма продуктов гидролиза плазмидной ДНК рBSK эндонуклеазой *S. marcescens* исходного и мутантного вариантов в присутствии и в отсутствие гидроксиламина: 1 – маркер фирмы Fermentas; 2 – плазмидная ДНК рBSK(контроль); 3 – NucSma(H89G) без добавления гидроксиламина; 4 – NucSma(H89G) с добавлением гидроксиламина; 5 – NucSma(wt) без добавления гидроксиламина; 6 – NucSma(wt) с добавлением гидроксиламина

Как видно из рис. 4, элюаты очищенных белков на электрофореграмме представлены в виде единственной полосы с молекулярной массой ~ 29 кДа, что соответствует ожидаемой массе нуклеазы NucSma. После диализа концентрацию ферментов измеряли на приборе Nanodrop (A280). Она составляла для NucSma(H89G) 0.025 мкг/мкл, а для NucSma(wt) – 0.022 мкг/мкл.

Восстановление активности мутантного варианта эндонуклеазы NucSma(H89G) определяли с помощью гидролиза плазмидной ДНК

Гидролиз плазмидной ДНК анализировали с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле (см. рис. 5).

Как видно из рис. 5, нуклеазная активность мутантного варианта фермента NucSma(H89G) при добавлении гидроксиламина восстанавливается, что приводит к гидролизу плазмидной ДНК. В то же время в отсутствие гидроксиламина в реакционной среде такого гидролиза не наблюдалось. В отличие от мутантного варианта, исходный тип NucSma(wt) фермента, который являлся контролем, гидролизовал плазмидную ДНК как в присутствии, так и в отсутствие гидроксиламина.

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что гидроксиламин снижает рост рекомбинантного штамма *E. coli* TGE900 pHisNucSma(H89G) по сравнению с контролем без гидроксиламина. Такое уменьшение роста может быть связано с восстановлением активности мутантного фермента, приводящим к расщеплению нуклеиновых кислот в клетке. Это предположение было подтверждено экспериментом по гидролизу плазмидной ДНК очищенным ферментом мутантного варианта эндонуклеазы NucSma(H89G).

Литература

1. *Лецинская, И.Б., Беляева М.И., Гильфанова К.З.* Сравнительное изучение бактериальных фосфомоно- и фосфодиэстераз, гидролизующих нуклеиновые кислоты и нуклеотиды // *Микробиология.* – 1968. – Т. 37. – С. 979–983.
2. *Гимадудинов, О.А., Анцилевич Л.М.* Синтез внеклеточной эндонуклеазы *Serratia marcescens* рекомбинантными штаммами *Escherichia coli* // *Биотехнология.* – 1993. – № 5. – С. 15–18.
3. *Friedhoff P., Gimadutdinow O., Ruter T., Wende W., Urbanke C., Thole H., Pingoud A.* A procedure for renaturation and purification of the extracellular *Serratia marcescens* nuclease from genetically engineered *Escherichia coli* // *Protein Expression Purif.* – 1994. – V. 5, No 1. – P. 37–43.
4. *Friedhoff P., Gimadutdinow O., Pingoud A.* Identification of catalytically relevant amino acids of the extracellular *Serratia marcescens* endonuclease by alignment-guided mutagenesis // *Nucleic Acids Res.* – 1994. – V. 22, No 16. – P. 3280–3287.
5. *Friedhoff P., Kolmes B., Gimadutdinow O., Wende W., Krause K.L., Pingoud A.* Analysis of the mechanism of the *Serratia* nuclease using site-directed mutagenesis // *Nucleic Acids Res.* – 1996. – V. 24, No 14. – P. 2632–2639.
6. *Venkataraman P., Lamb R.A., Pinto L.H.* Chemical rescue of histidine selectivity filter mutants of the M2 ion channel of influenza A virus // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280, No 22. – P. 21463–21472.
7. *Peracchi A.* How (and why) to revive a dead enzyme: the power of chemical rescue // *Curr. Chem. Biol.* – 2008. – V. 2, No 1. – P. 32–49.
8. *Chen W.J., Lai P.J., Lai Y.S., Huang P.T., Lin C.C., Liao T.H.* Probing the catalytic mechanism of bovine pancreatic deoxyribonuclease I by chemical rescue // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – V. 352, No 3. – P. 689–696. – doi: 10.1016/j.bbrc.2006.11.078.
9. *Midon M., Gimadutdinow O., Meiss G., Friedhoff P., Pingoud A.* Chemical rescue of active site mutants of *S. pneumoniae* surface endonuclease EndA and other nucleases of the HNH family by imidazole // *ChemBioChem.* – 2012. – V. 13, No 5. – P. 713–721. – doi: 10.1002/cbic.201100775.
10. *Meiss G., Gimadutdinow O., Friedhoff P., Pingoud A.* Microtiter-plate assay and related assays for nonspecific endonucleases // *Methods Mol. Biol.* – 2001. – V. 160. – P. 37–48. – doi: 10.1385/1-59259-233-3:037.

Поступила в редакцию
21.12.16

Хамидуллина Раиса Гусмановна, кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия

Фазлеева Ильмира Ильдаровна, магистр кафедры генетики

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия

Гимадудинов Олег Александрович, кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: Oleg.Gimadutdinov@kpfu.ru

Reactivation of *Serratia marcescens* Endonuclease NucSma(H89G) by Hydroxylamine*R.G. Khamidullina, I.I. Fazleyeva, O.A. Gimadutdinov***Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia*E-mail: **Oleg.Gimadutdinov@kpfu.ru*

Received December 21, 2016

Abstract

Serratia marcescens endonuclease is the most nonspecific nuclease known. This nuclease refers to enzymes that can cleave both DNA and RNA. The active site of this enzyme is characterized by the H–N–H motif, but more important functions have been shown for the first amino acid of this motif in *Serratia marcescens* nuclease. It is known that histidine is essential in catalytic activity of many nucleases. Histidine functions as a general base that activates a water molecule for a nucleophilic attack at the diester linkages phosphorus atom and causes its rupture. It has been demonstrated that glycine-histidine substitution in *Serratia marcescens* endonuclease leads to inactivation of the enzyme. At present, the method of chemical recovery of enzymes has become very widespread. Upon addition of certain low molecular compounds, which are similar in chemical properties to the lost amino acid residues, to the medium with the inactive mutant enzyme, the activity of this enzyme has been restored. The recovery effect has been observed due to the fact that the original amino acids are replaced by a low molecular weight as a result of mutations. In this work we have been able to restore the activity of *Serratia marcescens* mutant endonuclease by adding hydroxylamine, where histidine at position 89 is replaced by glycine.

Keywords: endonuclease, plasmid, hydroxylamine, histidine, imidazole**Figure Captions**

- Fig. 1. The structure of pHisNucSma plasmid [4].
- Fig. 2. The dependence of optical density D_{600} on time for *E. coli* recombinant strains: 1 – *E. coli* TGE900 NucSma(H89G) without hydroxylamine; 2 – *E. coli* TGE900 NucSma(H89G) with hydroxylamine; 3 – *E. coli* TGE900 NucSma(wt) with hydroxylamine; 4 – *E. coli* TGE900 NucSma(wt) without hydroxylamine.
- Fig. 3. The electropherogram of proteins of *E. coli* TGE900 recombinant strains before and after the induction of *S. marcescens* endonuclease gene: M – RageRuler Unstained Protein Ladder molecular marker produced by Fermentas; 1 – NucSma(H89G) before the induction of *S. marcescens* endonuclease gene; 2 – NucSma(H89G) after the induction of *S. marcescens* endonuclease gene; 3 – NucSma(wt) before the induction of *S. marcescens* endonuclease gene; 4 – NucSma(wt) after the induction of *S. marcescens* endonuclease gene.
- Fig. 4. The electropherogram of protein fractions after the elution with Ni–NTA agarose: M – RageRuler Unstained Protein Ladder molecular marker produced by Fermentas; 1–3 – NucSma(H89G); 4–6 – NucSma(wt).
- Fig. 5. The electropherogram of products of the hydrolysis of pBSK plasmid DNA by *S. marcescens* endonuclease of the initial and mutant variants in the presence of hydroxylamine: 1 – marker produced by Fermentas; 2 – pBSK plasmid DNA (control); 3 – NucSma(H89G) without hydroxylamine; 4 – NucSma(H89G) with hydroxylamine; 5 – NucSma(wt) without hydroxylamine; 6 – NucSma(wt) with hydroxylamine.

References

1. Leshchinskaya I.B., Belyaeva M.I., Gil'fanova K.Z. Comparative study of bacterial phosphomono- and phosphodiesterases hydrolyzing nucleic acids and nucleotides. *Mikrobiologiya*, 1968, vol. 37, pp. 979–983. (In Russian)
2. Gimadutdinov O.A., Antsilevich L.M. The synthesis of *Serratia marcescens* extracellular endonuclease by *Escherichia coli* recombinant strains. *Biotekhnologiya*, 1993, no. 5, pp. 15–18. (In Russian)
3. Friedhoff P., Gimadutdinov O., Ruter T., Wende W., Urbanke C., Thole H., Pingoud A. A procedure for renaturation and purification of the extracellular *Serratia marcescens* nuclease from genetically engineered *Escherichia coli*. *Protein Expression Purif.*, 1994, vol. 5, no. 1, pp. 37–43.
4. Friedhoff P., Gimadutdinov O., Pingoud A. Identification of catalytically relevant amino acids of the extracellular *Serratia marcescens* endonuclease by alignment-guided mutagenesis. *Nucleic Acids Res.*, 1994, vol. 22, no. 16, pp. 3280–3287. (In Russian)
5. Friedhoff P., Kolmes B., Gimadutdinov O., Wende W., Krause K.L., Pingoud A. Analysis of the mechanism of the *Serratia* nuclease using site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res.*, 1996, vol. 24, no. 14, pp. 2632–2639.
6. Venkataraman P., Lamb R.A., Pinto L.H. Chemical rescue of histidine selectivity filter mutants of the M2 ion channel of influenza A virus. *J. Biol. Chem.*, 2005, vol. 280, no. 22, pp. 21463–21472.
7. Peracchi A. How (and why) to revive a dead enzyme: The power of chemical rescue. *Curr. Chem. Biol.*, 2008, vol. 2, no. 1, pp. 32–49.
8. Chen W.J., Lai P.J., Lai Y.S., Huang P.T., Lin C.C., Liao T.H. Probing the catalytic mechanism of bovine pancreatic deoxyribonuclease I by chemical rescue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, vol. 352, no. 3, pp. 689–696. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.11.078.
9. Midon M., Gimadutdinov O., Meiss G., Friedhoff P., Pingoud A. Chemical rescue of active site mutants of *S. pneumoniae* surface endonuclease EndA and other nucleases of the HNH family by imidazole. *ChemBioChem*, 2012, vol. 13, no. 5, pp. 713–721. doi: 10.1002/cbic.201100775.
10. Meiss G., Gimadutdinov O., Friedhoff P., Pingoud A. Microtiter-plate assay and related assays for nonspecific endonucleases. *Methods Mol. Biol.*, 2001, vol. 160, pp. 37–48. doi: 10.1385/1-59259-233-3:037.

Для цитирования: Хамидуллина Р.Г., Фазлеева И.И., Гимадуудинов О.А. Восстановление активности эндонуклеазы *Serratia marcescens* NucSma(H89G) гидроксиламином // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2017. – Т. 159, кн. 2. – С. 272–282.

For citation: Khamidullina R.G., Fazleyeva I.I., Gimadutdinov O.A. Reactivation of *Serratia marcescens* endonuclease NucSma(H89G) by hydroxylamine. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2017, vol. 159, no. 2, pp. 272–282. (In Russian)