

ТРИГГЕР ФАКТОР-ЗАВИСИМЫЙ РЕФОЛДИНГ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛЮЦИФЕРАЗ В КЛЕТКАХ *Escherichia coli*: КИНЕТИКА И ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕФОЛДИНГА, ВЛИЯНИЕ БИШАПЕРОННОЙ СИСТЕМЫ DnaKJE-ClpB

© 2013 г. О. Е. Мелькина, И. И. Горянин, И. В. Манухов, Г. Б. Завильгельский*

Государственный научный центр “ГосНИИгенетика”, Москва, 117545

Поступила в редакцию 25.01.2013 г.

Принята к печати 28.01.2013 г.

Определены основные параметры рефолдинга термоинактивированных бактериальных люцифераз, осуществляемого Триггер Фактором (ТФ) *Escherichia coli*. ТФ-зависимый рефолдинг по его скорости и уровню значительно уступает DnaKJE-зависимому рефолдингу. Максимальный уровень ТФ-зависимого рефолдинга быстро снижается при увеличении внутриклеточной концентрации ТФ. Показано, что эффективность ТФ-зависимого рефолдинга снижается с повышением термостабильности субстрата. Если у термолабильных люцифераз *Aliivibrio fischeri* и *Photobacterium leiognathi* максимальный уровень ТФ-зависимого рефолдинга составляет 30–40%, то у люциферазы со средней термостабильностью *Vibrio harveyi* он снижен до 10%, а у наиболее термостабильной люциферазы *Photorhabdus luminescens* практически отсутствует. Изучено влияние бишаперонной системы DnaKJE-ClpB на эффективность ТФ-зависимого рефолдинга. Показано, что компонент бишаперонной системы ClpB снижает эффективность действия ТФ: в клетках штамма *E. coli clpB::kan* ТФ-зависимый рефолдинг бактериальных люцифераз протекает более эффективно, чем в штаммах *E. coli clpB⁺*.

Ключевые слова: шаперон, Триггер Фактор, рефолдинг, люцифераза.

TRIGGER FACTOR DEPENDENT REFOLDING OF BACTERIAL LUCIFERASES IN *Escherichia coli* CELLS: KINETICS, EFFICIENCY AND EFFECT OF THE BICHAPERONE SYSTEM, DnaKJE-ClpB, by O. E. Melkina, I. I. Goryanin, I. V. Manukhov, G. B. Zavilgelsky* (State Research Center “GosNIIGenetika”, Moscow, 117545 Russia; *e-mail: zavilgel@genetika.ru). Here were determined the basic parameters of the Trigger Factor (TF) –dependent refolding of thermal inactivated bacterial luciferases. The TF-dependent refolding is less efficient and requires more time than DnaKJE-dependent refolding. The increase in the intracellular concentration of TF leads to an apparent decrease in the level of the thermal inactivated bacterial luciferase refolding. For thermolabile luciferases, the level of TF-dependent refolding is significantly higher, than for thermostable luciferases: 30–40% – for the thermolabile *Aliivibrio fischeri* and *Photobacterium leiognathi* luciferases, and 10 and 0.5% for the thermostable *Vibrio harveyi* and *Photorhabdus luminescens* luciferases, respectively. The negative effect of the ClpB protein on the TF-dependent refolding was shown: in *Escherichia coli clpB::kan* TF-dependent refolding is more efficient than in the *E. coli clpB⁺*.

Keywords: Trigger Factor, chaperone, luciferase, refolding.

DOI: 10.7868/S0026898413030087

В цитоплазме бактериальной клетки в процессах фолдинга и рефолдинга белков участвуют несколько групп АТР-зависимых шаперонов: GroEL/ES, DnaKJE, ClpAB [1–3]. Предполагалось, что основная функция АТР-независимого шаперона – Триггер Фактора (ТФ) – состоит в сборке (фолдинге) вновь синтезируемой полипептидной цепи и тесно связана с работой рибосомы, с 50S субъединицей которой ТФ формирует прочный комплекс [4, 5].

В клетках *Escherichia coli* ТФ экспрессируется конститутивно в количестве, в 2–3 раза превышающем содержание рибосом (50 и 20 мкМ для ТФ и рибосом соответственно) [6, 7]. Согласно основной схеме ТФ, локализованный в рибосоме на месте высвобождения полипептидной цепи в цитоплазму, осуществляет первичную сборку белка, завершают же процесс фолдинга шапероны DnaKJE и GroEL/ES [8–10]. Однако было показано [11], что ТФ соочищается и стабильно ассоциирован с большим количеством цитоплазматиче-

* Эл. почта: zavilgel@genetika.ru

ческих полноразмерных полипептидных цепей. Поэтому предположили, что ТФ участвует не только в котрансляционном фолдинге полипептидной цепи на рибосоме, но и в посттрансляционном процессе сохранения (стабилизации) нативной структуры белков, способствующем эффективному формированию третичной и четвертичной структур, в частности, формированию зрелых рибосомных частиц. В настоящей работе измерена активность ТФ как шаперона, участвующего в процессе рефолдинга термоинактивированных белков — бактериальных люцифераз в клетках *E. coli*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

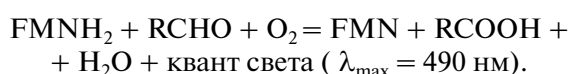
Бактериальные штаммы и плазмиды. Штаммы *E. coli* K12 MG1655 (прототроф) и его делеционный мутант PK202 $\Delta dnaK14 \Delta dnaJ14 dksA::kan$ получены от Е.А. Craig (США) [12]. Штаммы *E. coli* K12 SG20250 $\Delta lacU169 araD flbB relA$ и SG22100 $clpB::kan$ (остальные маркеры как у SG20250) предоставлены S. Gottesman и Y. Zhou (США) [13].

Клетки растили в жидкой или агаризованной среде Луриа-Бертани (LB) с добавлением соответствующих антибиотиков (ампициллин — 100 мкг/мл, канамицин — 40 мкг/мл и хлорамфеникол — 15 мкг/мл) при 28°C.

Гибридная плаزمида pF2 с генами *luxAB Aliivibrio fischeri*, расположенными под *lac*-промото-ром, сконструирована в результате переклонирования фрагмента ДНК XhoI–SalI из плазмиды pF1, содержащей полный *lux*-оперон *A. fischeri* [14]. Плазмида pLeo1 содержит гены *luxCDABE Photobacterium leiognathi* под *lac*-промото-ром [15]. Плазмида pKlux содержит гены *luxAB Vibrio harveyi* [16]. Плазмида pXen4 с генами *luxAB Photorhabdus luminescens* получена путем переклонирования фрагмента ДНК XhoI–PstI из плазмиды pXen7, содержащей полный *lux*-оперон *P. luminescens* [17].

Плазмида pTf16 сконструирована на основе вектора pACYC184, она содержит ген *tig E. coli* под промото-ром *araB*. Плазмиды pG-Tf2 содержат гены *gro* и *tig*, расположенные под промото-ром P_{z1} . Плазмиды pKJE7 содержат гены *dnaKJE* под контролем промото-ра *araB*. Плазмиды pTf16, pG-Tf2 и pKJE7 получены из TAKARA BIO INC collection (Chaperone Plasmid Set; URL: <http://www.takara-bio.co.jp>).

Измерение интенсивности биолюминесценции. Бактериальные люциферазы катализируют реакцию окисления алифатического альдегида (RCHO) кислородом воздуха (O_2) при участии восстановленного флавиномононуклеотида (FMNH₂):



Интенсивность биолюминесценции суспензии клеток (200 мкл) измеряли на люминометре

LM-01T (“Immunotech”) или Biotox 7 (ООО “Екон”) с добавлением в качестве субстрата реакции 2 мкл 0.001%-го спиртового раствора *n*-деканала (“Sigma”). В экспериментах с клетками *E. coli* (pLeo1) добавление *n*-деканала не требуется. Интенсивность биолюминесценции (в мкВ) измеряли при комнатной температуре.

Термоинактивация и рефолдинг люцифераз. Термоинактивацию люцифераз *A. fischeri* и *P. leiognathi* проводили в водяной бане при 46°C, в течение 5 мин; люциферазы *V. harveyi* — при 46°C, 10 мин; люциферазы *P. luminescens* — при 47°C в течение 15 мин. К суспензии клеток для ингибирования синтеза белка добавляли хлорамфеникол в концентрации 167 мкг/мл. Рефолдинг люцифераз проводили при 20–22°C. Через определенные интервалы времени отбирали пробу (200 мкл) и сразу после добавления *n*-деканала (субстрат люциферазной реакции) измеряли интенсивность биолюминесценции.

Предварительный “тепловой шок” проводили, инкубируя клетки *E. coli* в среде LB в термостате при 42°C в течение 30 мин без добавления хлорамфеникола.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Кинетика и уровень ТФ-зависимого рефолдинга термоинактивированных люцифераз

Кинетику и уровень ТФ-зависимого рефолдинга (далее ТФ-рефолдинг) термоинактивированной люциферазы измеряли *in vivo* в клетках *E. coli* PK202 $\Delta dnaKJ14 dksA::kan$, содержащих гибридные плазмиды с генами *luxAB* (pF2) и с геном *tig* (pTf16). Бактерии росли при 28°C до середины

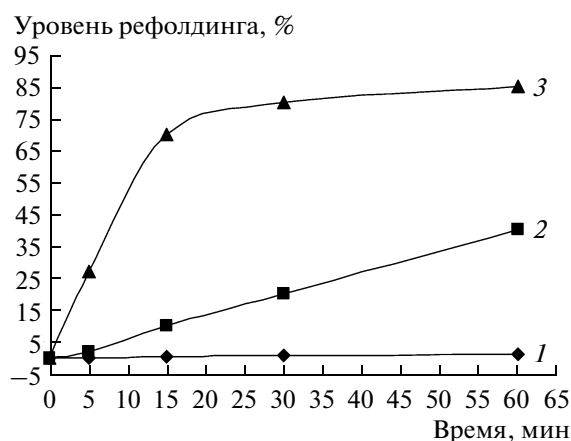


Рис. 1. Кинетика рефолдинга термоинактивированной люциферазы *A. fischeri* в клетках *Escherichia coli* PK202 $\Delta dnaKJ14 dksA::kan$. 1 — PK202 (pF2); 2 — PK202 (pF2, pTf16); 3 — PK202 (pF2, pKJE7). По оси ординат отложена активность люциферазы (в процентах от исходного уровня), по оси абсцисс — время рефолдинга люциферазы при 20°C.

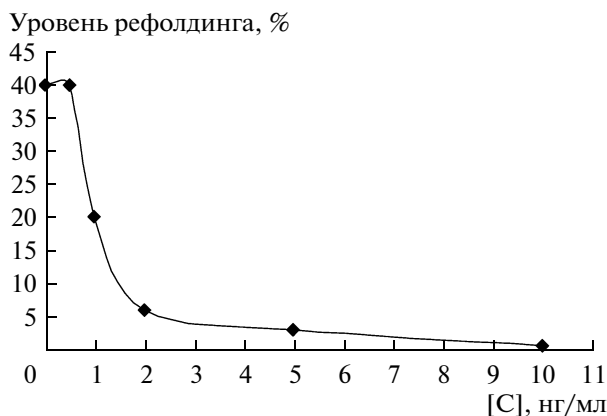


Рис. 2. Зависимость максимального уровня ТФ-рефолдинга термоинактивированной люциферазы *A. fischeri* от концентрации ангидротетрациклина. Клетки *E. coli* РК202 *dnaKJ14 dksA::kan* (рF2, рG-Tf2) росли при 28°C до середины экспоненциальной фазы, затем к суспензии клеток добавляли ангидротетрациклин в различной концентрации, далее клетки инкубировали в течение еще 60 мин при 30°C. Для ингибирования синтеза белка к суспензии клеток добавляли хлорамфеникол (167 мкг/мл), а для инактивации люциферазы клетки помещали на водяную баню (46°C, 5 мин). Рефолдинг инактивированной люциферазы проводили при температуре 22°C. По оси ординат отложена активность люциферазы (в процентах от исходного уровня), по оси абсцисс — концентрация ангидротетрациклина (нг/мл).

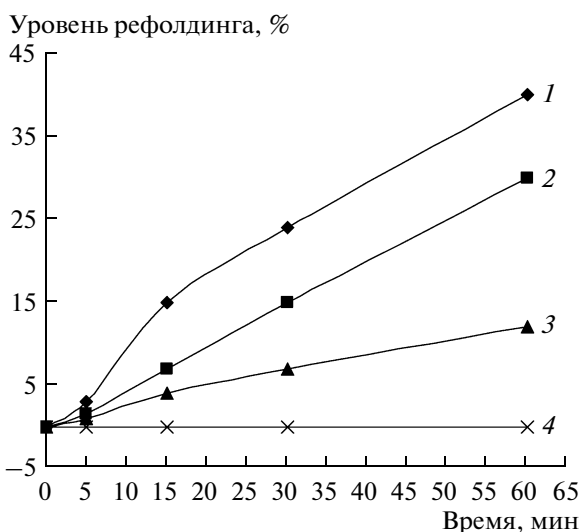


Рис. 3. Кинетика ТФ-рефолдинга термоинактивированных люцифераз в клетках *E. coli* РК202 *dnaKJ14 dksA::kan* (рTf16). 1 — *A. fischeri*; 2 — *P. leiognathi*; 3 — *V. harveyi*; 4 — *P. luminescens*.

экспоненциальной фазы, затем для ингибирования синтеза белка к суспензии клеток добавляли хлорамфеникол (167 мкг/мл), а для инактивации люциферазы клетки помещали на водяную баню (46°C, 5 мин). Рефолдинг инактивированной лю-

циферазы проводили при температуре 22°C. На рис. 1 приведена зависимость степени ренатурации люциферазы *A. fischeri* (в % от исходного) от времени инкубации при 22°C. В клетках РК202 Δ *dnaKJ14 dksA::kan* в отсутствие плазмиды рTf16 рефолдинг люциферазы практически отсутствует (не более 1%). Однако в присутствии плазмиды рTf16 с геном *tig*, кодирующим ТФ, наблюдается эффективный рефолдинг (до 40% от исходного уровня). Для сравнения на рис. 1 представлена кинетическая кривая DnaKJE-зависимого рефолдинга (далее DnaKJE-рефолдинг) той же люциферазы (клетки *E. coli* РК202 вместо рTf16 содержат плазмиду рKJE7). Как видим, кинетические кривые ТФ- и DnaKJE-рефолдинга значительно различаются как по скорости восстановления нативной структуры белка (DnaKJE-рефолдинг происходит с значительно более высокой скоростью), так и по максимальному уровню рефолдинга (40 и 80–90% при ТФ- и DnaKJE-рефолдинге соответственно).

Значительные различия выявлены также при сравнении уровней ТФ- и DnaKJE-рефолдинга в зависимости от внутриклеточной концентрации шаперонов. Как показано ранее, с увеличением концентрации шаперонов DnaKJE уровень рефолдинга быстро возрастает, а затем выходит на плато [18]. На рис. 2 представлена зависимость максимального уровня ТФ-рефолдинга термоинактивированной люциферазы *A. fischeri* от концентрации ангидротетрациклина — индуктора тетрациклинового промотора, под которым в плазмиде рG-Tf2 расположен ген *tig*, кодирующий ТФ. Видно, что с увеличением в среде концентрации индуктора (и соответственно, концентрации ТФ в клетке) уровень рефолдинга быстро снижается практически до нуля.

Как показано нами ранее, эффективность DnaKJE-рефолдинга снижается при увеличении термостабильности люциферазы [19, 20]. На рис. 3 приведены кинетические кривые ренатурации люцифераз, различающихся по термостабильности. Опыты проводили в штамме РК202, содержащем рTf16 вместе с одной из перечисленных ниже плазмид с генами *luxAB*, кодирующими люциферазы с различной термочувствительностью, рF2 (*A. fischeri*), рLeo1 (*P. leiognathi*), рKLux (*V. harveyi*), рXen4 (*P. luminescens*). В случае DnaKJE-рефолдинга термолабильные люциферазы *A. fischeri* и *P. leiognathi* ренатурируют значительно полнее (80–90% от исходного уровня), чем термостабильные люциферазы *V. harveyi* (20–30%) и *P. luminescens* (10%) [19, 20]. На рис. 3 представлены кинетические кривые ТФ-рефолдинга данной группы люцифераз в штамме РК202. Наблюдается такая же закономерность, как и в случае DnaKJE-рефолдинга, т.е. с повышением термостабильности люциферазы уровень ТФ-рефолдинга снижается, причем у наиболее термоста-

бильной люциферазы *P. luminescens* уровень рефолдинга падает практически до нуля.

Влияние шаперона ClpV на ТФ-рефолдинг бактериальных люцифераз

ТФ-рефолдинг можно фиксировать в клетках дикого типа, т.е. содержащих активную систему шаперонов DnaKJE. На рис. 4а представлены кривые ренатурации люциферазы *A. fischeri* в отсутствие и в присутствии плазмиды pTf16 в клетках *E. coli* SG20250 *dnaKJE*⁺. В данном опыте использовали клетки, выросшие при 28°C до ранней экспоненциальной фазы, т.е. когда в клетке синтезируется небольшое количество шаперонов системы DnaKJE. При этом условии в клетках в отсутствие гена *tig* максимальный уровень DnaKJE-рефолдинга составляет примерно 15% от исходного. Однако в присутствии плазмиды pTf16 максимальный уровень рефолдинга повышается до 30%, что примерно в 2 раза превышает уровень DnaKJE-рефолдинга.

Как известно, система DnaKJE действует в клетке в комплексе с шапероном ClpV (бишаперонная система DnaKJE-ClpV) [21]. Мы оценили влияние шаперона ClpV на DnaKJE- и ТФ-рефолдинг, измеряя кинетику и уровень рефолдинга термоинактивированной люциферазы в клетках SG22100, мутантных по гену *clpV* (рис. 4б). Как видим, в отличие от системы DnaKJE, в которой шаперон ClpV помогает проводить рефолдинг (рис. 4в), шаперон ClpV снижает уровень ТФ-рефолдинга: в клетках, мутантных по гену *clpV*, максимальный уровень ТФ-рефолдинга составляет 60%, что примерно на порядок превышает уровень DnaKJE-рефолдинга в этих клетках (6%).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В штамме PK202 $\Delta dnaKJ14 dksA::kan$, хромосома которого содержит активный ген *tig*, уровень ТФ-рефолдинга термоинактивированной люциферазы *A. fischeri* составляет примерно 0.5–1.0%, что указывает на неспособность внутриклеточно ТФ вести эффективный рефолдинг. Количество молекул ТФ при этом в 2–3 раза превышает количество рибосом [6, 7]. Молекулы ТФ в цитоплазме клетки формируют комплексы с рибосомами, а также с цитоплазматическими белками, участвуя при этом не только в котрансляционном фолдинге полипептидной цепи на рибосоме, но и в посттрансляционном процессе сохранения (стабилизации) нативной структуры белка [11]. По-видимому, количества молекул ТФ, образующих комплексы с термоинактивированными люциферазами, недостаточно, чтобы способствовать эффективному рефолдингу. При введении в клетку плазмиды с геном *tig* количество ТФ возрастает, одновременно увеличивается эффектив-

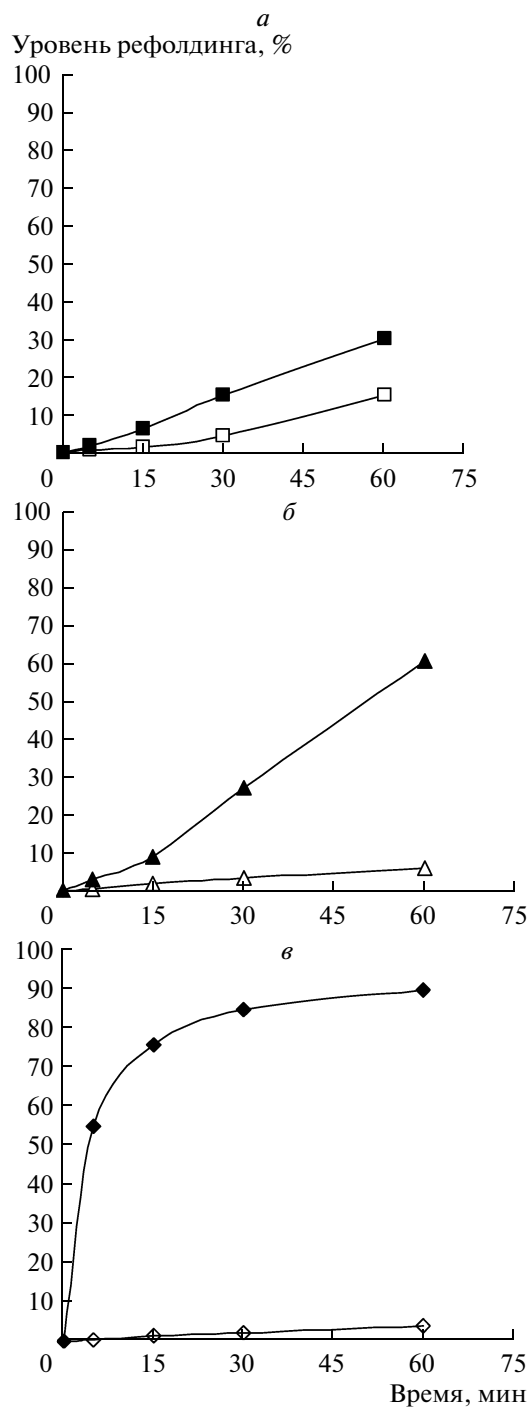


Рис. 4. Кинетика рефолдинга термоинактивированной люциферазы *A. fischeri* в клетках *E. coli* (pF2). а – SG20250 *dnaKJ*⁺ *clpV*⁺, светлые символы – клетки без плазмиды pTf16, темные символы – клетки содержат плазмиду pTf16; б – SG22100 *dnaKJ*⁺ *clpV*⁻, светлые символы – клетки без плазмиды pTf16, темные символы – клетки содержат плазмиду pTf16; в – светлые символы – рефолдинг в клетках штамма SG22100 *dnaKJ*⁺ *clpV*⁺, темные символы – рефолдинг в клетках штамма SG20250 *dnaKJ*⁺ *clpV*⁺ (в данном варианте использовали клетки, предварительно выдержанные при 42°C в течение 30 мин без хлорамфеникола – предварительный “тепловой шок”).

ность рефолдинга. Однако, что характерно именно для ТФ, при дополнительном увеличении концентрации ТФ значительно снижается уровень рефолдинга, что принципиально отличает шаперон ТФ от шаперонов системы DnaKJE (при увеличении концентрации DnaKJE уровень рефолдинга достигает плато и не снижается при дальнейшем увеличении концентрации [21]). Необходимо отметить, что увеличение концентрации ТФ в клетках примерно в 4 раза приводит к снижению их жизнеспособности и даже к гибели [22].

В опытах *in vitro* показали также, что ренатурирующая способность ТФ, выделенного из клеток *E. coli*, критически зависит от концентрации шаперона: при концентрации выше оптимальной уровень рефолдинга глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), денатурированной 5 М мочевиной, значительно снижается [23, 24].

Можно предположить, что эти эффекты обусловлены особенностями взаимодействия ТФ с белками клетки. Так как в зависимости от концентрации ТФ находится в форме мономера или димера, то, по-видимому, при небольших концентрациях в цитоплазме он находится в мономерной форме и проявляет активность в качестве шаперона, формируя комплекс с денатурированным белком, а затем высвобождает этот белок в нативной форме. При повышении концентрации ТФ образует в клетке димер. В результате белки, связанные с ТФ, не способны высвободиться из комплекса, что приводит к снижению эффективности рефолдинга. Если же в этих условиях комплексы с ТФ формируют белки, участвующие в процессе деления клетки, то наблюдается ингибирование роста клеток. Показано, что при высокой концентрации ТФ формирует комплекс с ключевым белком клеточного деления FtsZ [22].

В клетках *E. coli* процессы дезагрегации и рефолдинга белков связаны с активностью АТР-зависимой бишаперонной системы DnaKJE—ClpV [20]. Шаперон ClpV не участвует непосредственно в рефолдинге субстрата, он лишь способствует дезагрегации белков. Эта помощь особенно эффективна в случае крупных агрегатов, которые система DnaKJE самостоятельно не способна разрушить [20]. Как следует из данных, представленных на рис. 4, действие шаперона ClpV на систему DnaKJE и на шаперон ТФ противоположно. Если в присутствии ClpV в клетке значительно увеличивается эффективность DnaKJE-рефолдинга, то ТФ-рефолдинг снижается. Можно предположить, что ClpV конкурирует с ТФ за образование комплексов с субстратом.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 гг. (соглашение № 14.U01.21.0845) и Российского фонда фундаментальных исследований (12-04-31919).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hartl F. U., Hayer-Hartl M. 2009. Identification concepts of protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 574–581.
- Tyedmers J., Mogk A., Bukau B. 2010. Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **11**, 777–788.
- Winkler J., Tyedmers J., Bukau B., Mogk A. 2012. Chaperone networks in protein disaggregation and prion propagation. *J. Struct. Biol.* **179**, 152–160.
- Hoffmann A., Bukau B., Kramer G. 2010. Structure and function of the molecular chaperone Trigger Factor. *Biochim. Biophys. Acta.* **1803**, 650–661.
- Merz F., Boehringer D., Schaffitzel C., Preissler S., Hoffmann A., Maier T., Rutkowska A., Lozza J., Ban N., Bukau B., Deuerling E. 2008. Molecular mechanism and structure of Trigger Factor bound to the translating ribosome. *EMBO J.* **27**, 1622–1632.
- Crooke E., Guthrie B., Lecker S., Lill R., Wickner W. 1988. ProOmpA is stabilized for membrane translocation by either purified *E. coli* trigger factor or canine signal recognition particle. *Cell.* **54**, 1003–1011.
- Lill R., Crooke E., Guthrie B., Wickner W. 1988. The “trigger factor cycle” induces ribosomes, presecretory proteins, and the plasma membrane. *Cell.* **54**, 1013–1018.
- Ferbitz L., Maier T., Patzelt H., Bukau B., Deuerling E., Ban N. 2004. Trigger Factor in complex with the ribosome forms a molecular cradle for nascent proteins. *Nature.* **43**, 590–596.
- Baram D., Pyetan E., Sittner A., Auerbach-Nevo T., Bashan A., Yonath A. 2005. Structure of Trigger Factor binding domain in biologically homologous complex with eubacterial ribosome reveals its chaperone action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 12017–12022.
- Merz F., Hoffmann A., Rudkowska A., Zachmann-Brand B., Bukau B. 2006. The C-terminal domain of *Escherichia coli* trigger factor represents the central module of its chaperone activity. *J. Biol. Chem.* **281**, 31963–31971.
- Martinez-Hackert E., Hendrickson W.A. 2009. Promiscuous substrate recognition in folding and assembly activities of the Trigger Factor chaperone. *Cell.* **138**, 923–934.
- Kang P.-J., Craig E.A. 1990. Identification and characterization of a new *Escherichia coli* gene that is a dosage-dependent suppressor of a *dnaK* deletion mutation. *J. Bacteriol.* **172**, 2055–2064.
- Gottesman S., Roche E., Zhou Y., Sauer R.T. 1998. The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev.* **12**, 1338–1347.
- Чернова Т.А., Завильгельский Г.Б. 1991. Клонирование и экспрессия *lux*-генов морских бактерий *Vibrio fischeri* в клетках *Escherichia coli*. *Биотехнология.* **3**, 37–40.
- Завильгельский Г.Б., Котова В.Ю., Манухов И.В. 2003. Влияние белков регуляторов RcsA и RcsB на экспрессию *lux*-оперона *Vibrio fischeri* в клетках *Escherichia coli*. *Молекуляр. биология.* **37**, 704–711.

16. Манухов И.В., Дюжий Д.Е., Завильгельский Г.Б. 1996. Клонирование генов *luxA* и *luxV* *Vibrio harveyi* и экспрессия биолюминесценции в клетках *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*. *Биотехнология*. **1**, 3–8.
17. Завильгельский Г.Б., Зарубина А.П., Манухов И.В. 2002. Определение и сравнительный анализ последовательности *lux*-оперона *Photorhabdus luminescens*, штамм Zm1. ERIC-элементы как предполагаемые “горячие” точки рекомбинации. *Молекуляр. биология*. **36**, 786–795.
18. Tomoyasu T., Ogura T., Tatsuta T., Bukau B. 1998. Levels of DnaK and DnaJ provide tight control of heat shock gene expression and protein repair in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **30**, 567–581.
19. Manukhov I.V., Eroshnikov G.E., Vyssokikh M.Yu., Zavilgelsky G.B. 1999. Folding and refolding of thermolabile and thermostable bacterial luciferases: the role of DnaKJ heat shock proteins. *FEBS Lett.* **448**, 265–268.
20. Завильгельский Г.Б., Котова В.Ю., Мажуль М.М., Манухов И.В. 2004. Влияние белков семейства Clp на DnaK-зависимый рефолдинг бактериальных люцифераз. *Молекуляр. биология*. **38**, 507–514.
21. Goloubinoff P., Mogk A., Ben-Zvi A.P., Tomoyasu T., Bukau B. 1999. Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 13732–13737.
22. Genevaux P., Keppel F., Schwager F., Langendijk-Genevaux P.S., Hartl F.U., Georgopoulos C. 2004. *In vivo* analysis of the overlapping functions of DnaK and trigger factor. *EMBO rep.* **5**, 195–200.
23. Liu C.P., Perrett S., Zhou J.M. 2005. Dimeric Trigger Factor stable binds folding-competent intermediates and cooperates with the DnaK-DnaJ-GrpE chaperone system to allow refolding. *J. Biol. Chem.* **280**, 13315–13320.
24. Robin S., Togash D.M., Ryder A.G., Wall J.G. 2009. Trigger Factor from Psychrophilic bacterium *Psychrobacter frigidicola* is a monomeric chaperone. *J. Bacteriol.* **191**, 1162–1168.