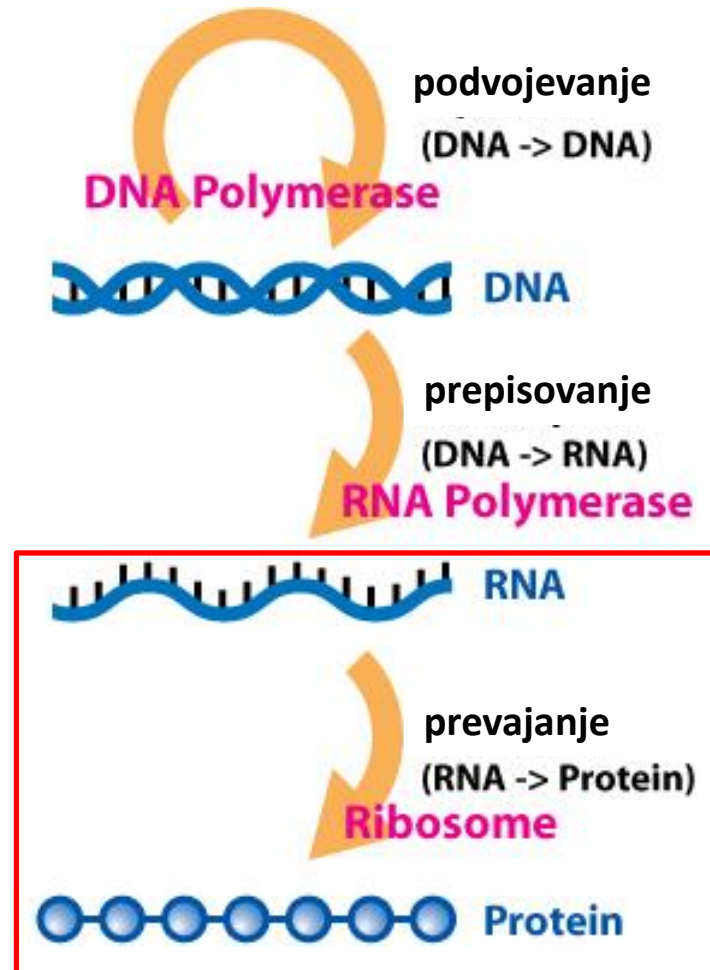


Prevajanje RNA: genetski kod in metabolizem proteinov

Velika predavalnica IJS, 24. 4. 2014

Izražanje genetske informacije

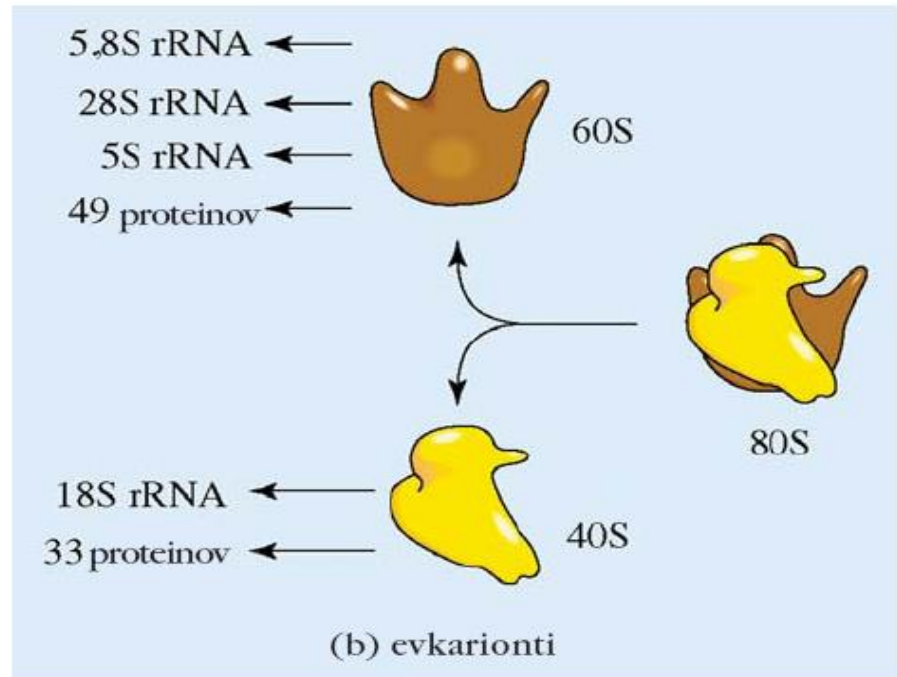
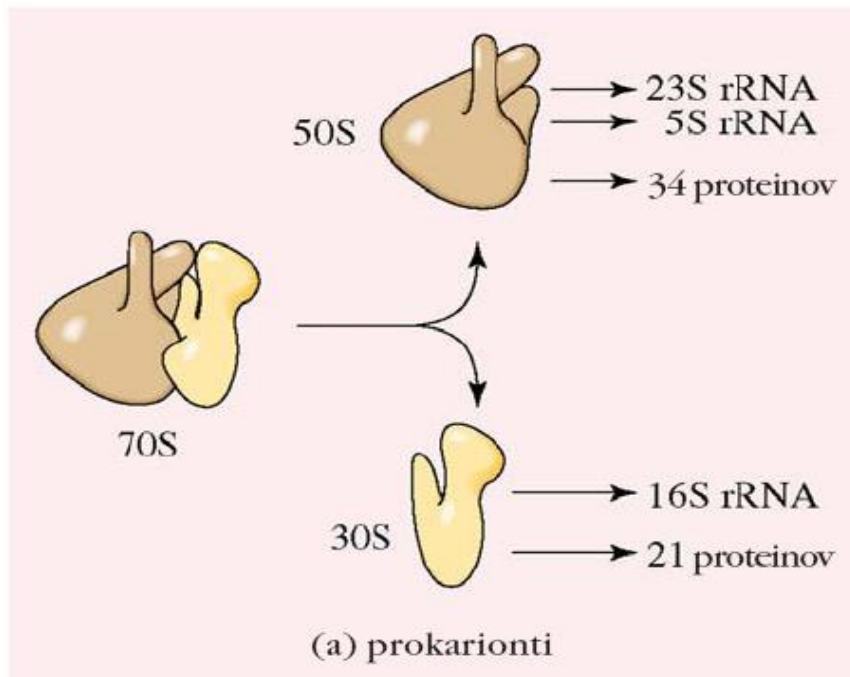
Prenos biološke informacije:



Proces: prevajanje ali translacija

Prevajanje RNA

Sinteza proteinov poteka na **ribosomih**, ki se nahajajo v **citoplazmi**, matriksu mitohondrijev in stromi kloroplastov.



E. coli:

značilnost	celotni ribosom	velika podenota	mala podenota
sedimentacijski količnik	70 S	50 S	30 S
molekulska masa (kDa)	2 520	1 590	930
vsebnost RNA	66 %	23 S (2 904 baze) 5 S (120 baz)	16 S (1 542 baz)
vsebnost proteinov	34 %	34 različnih proteinov	21 različnih proteinov

Genetski kod

Triplet = niz treh nukleotidnih baz na mRNA, ki določajo eno AK.

Triplet = kodon

Degeneriranost = posamezno AK lahko kodira več kot en tripletni kod.

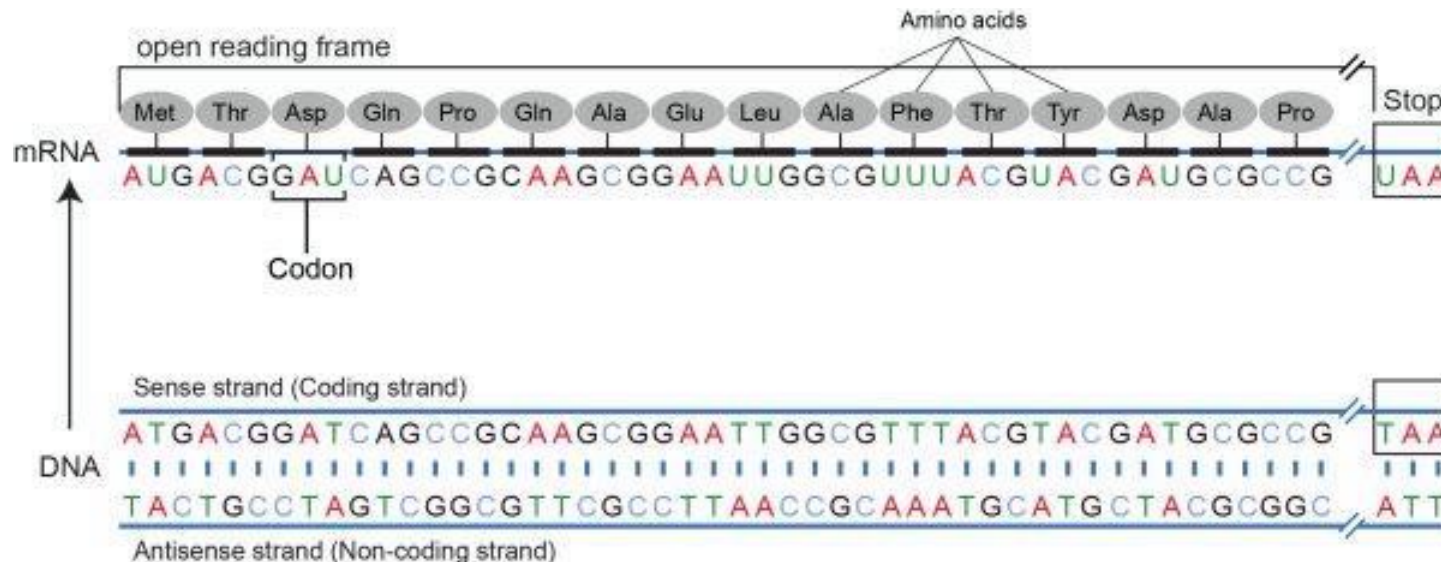
Univerzalnost = enak genetski kod pri vseh organizmih.

Prevajanje se začne na prvem AUG kodonu in se nadaljuje po tripletih do stop kodona.

		druga baza kodona			
		U	C	A	G
prva baza kodona (5'-konec)	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } STOP UAG }	UGU } Cys UGC } UGA } STOP UGG } Trp
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG } Met (START)	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }

Bralni okvirji

- **Branje** (translacija) mRNA poteka od **5'-konca proti 3'-koncu**.
- Prevajanje se začne na START kodonu AUG in se nadaljuje po tripletih do STOP kodona.
- Sinteza proteinov se nadaljuje v istem **bralnem okvirju** do stop kodona.
- **Odprt bralni okvir** je zaporedje, ki se začne se z Met, vsebuje 50 ali več kodonov in se konča s stop kodonom. Daljši bralni okvir je zelo verjetno del gena, ki kodira protein.
- Pri bakterijah je prva aminokislina vedno **N-formilmetionin (fMet)**.



Bralni okvirji

- **Bralni okvirji se ne prekrivajo:** vsi trije nukleotidi enega tripleta se uporabijo le enkrat – kodoni si nukleotidov ne delijo.

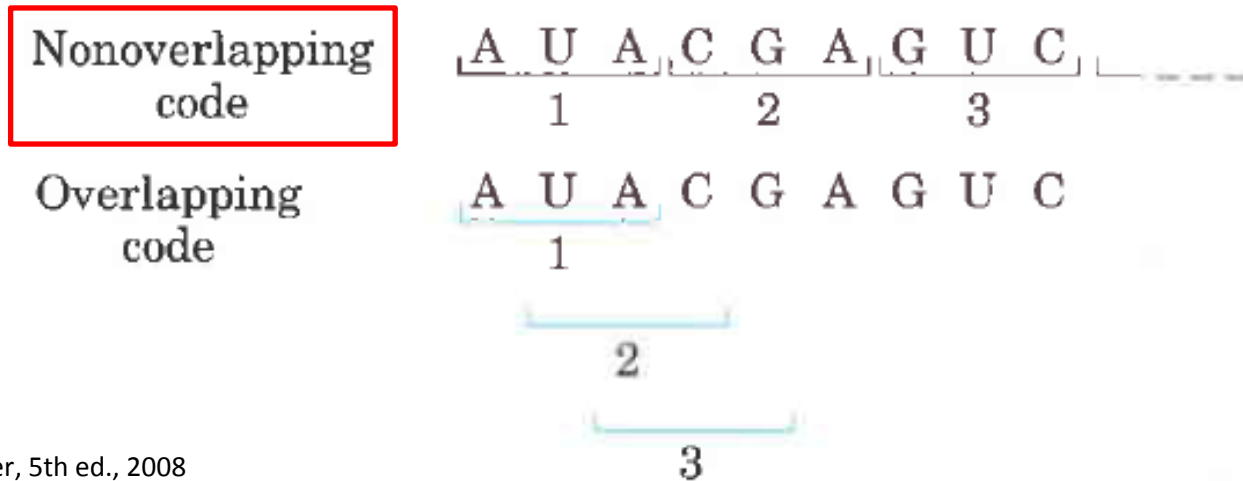
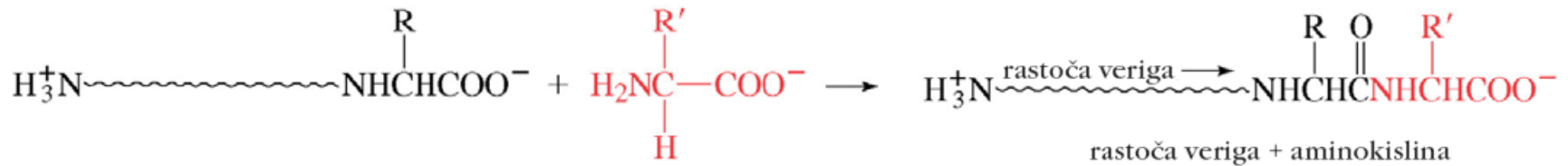


Fig. 27-3, Lehninger, 5th ed., 2008

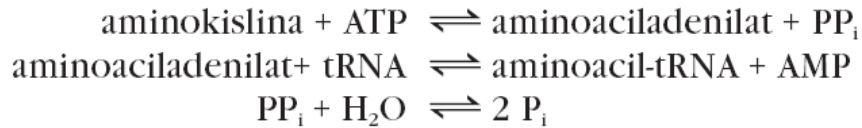
- **Sinteza proteinov** teče od **aminskega proti karboksilnemu** koncu proteina.



Aminoacil-tRNA

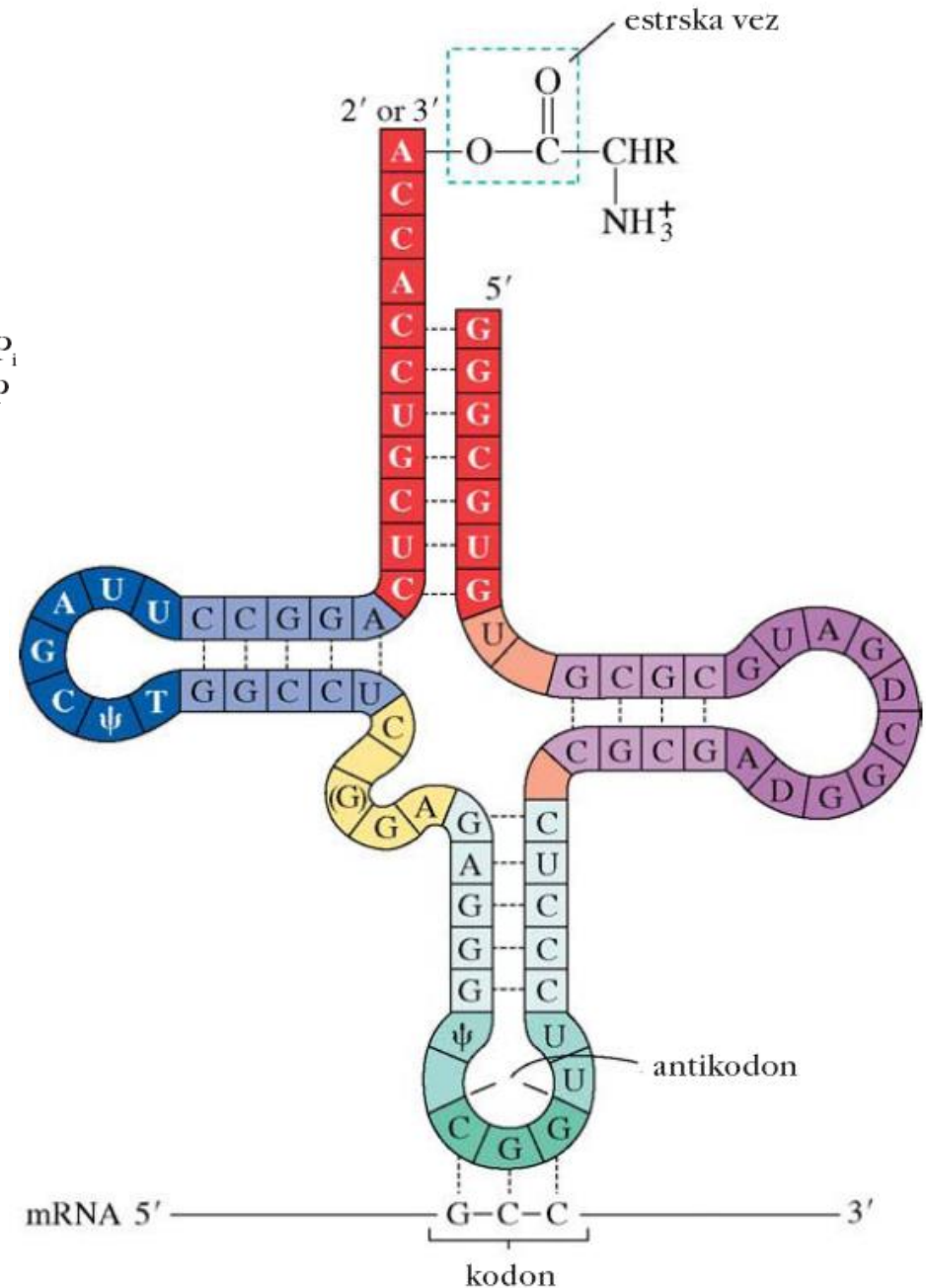
- Aminokislina s tRNA povezujejo encimi **aminoacil-tRNA-sintetaze**.

- Reakcija sinteze:



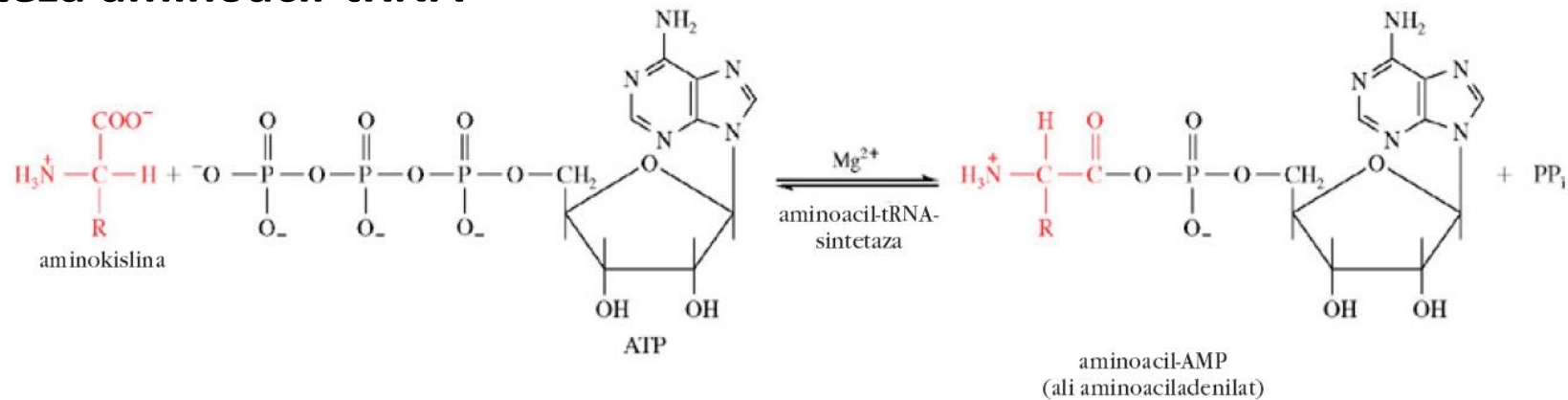
- V vsakem organizmu je 20 različnih aminoacil-tRNA-sintetaz.

- **Za specifičnost vezave sta najpomembnejši prvi dve bazi kodona.**

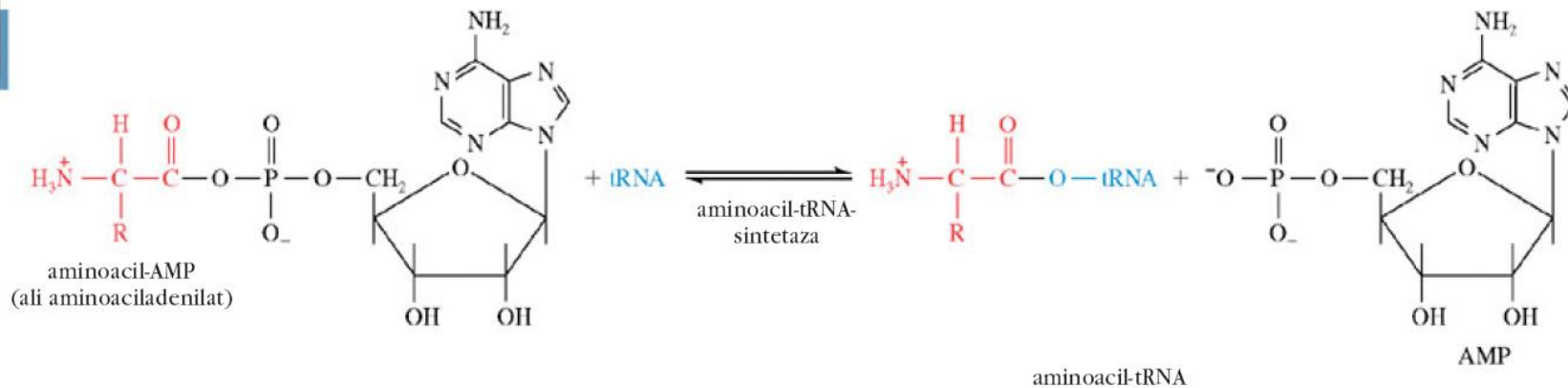


Sinteza aminoacil-tRNA

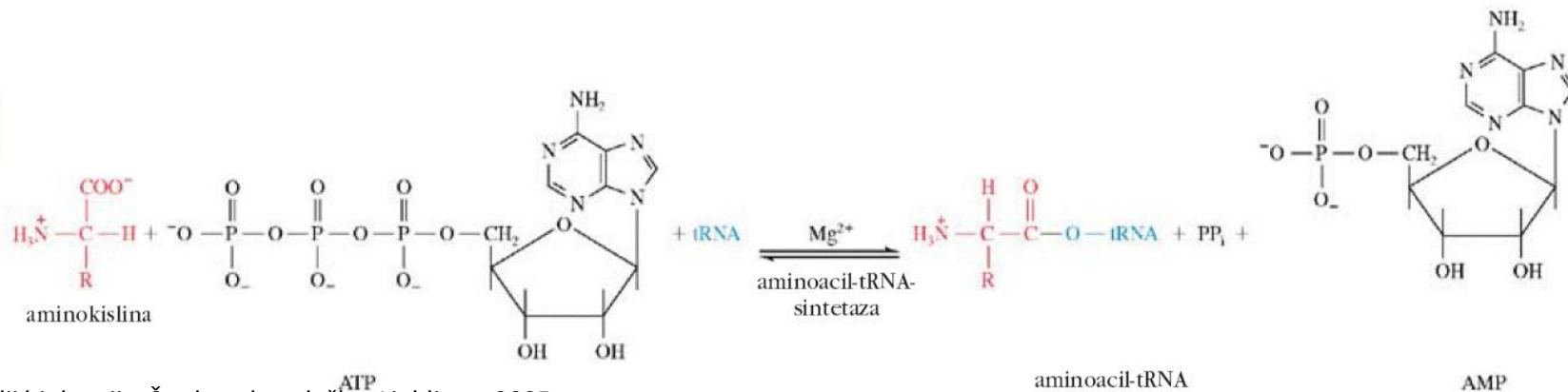
1. stopnja



2. stopnja



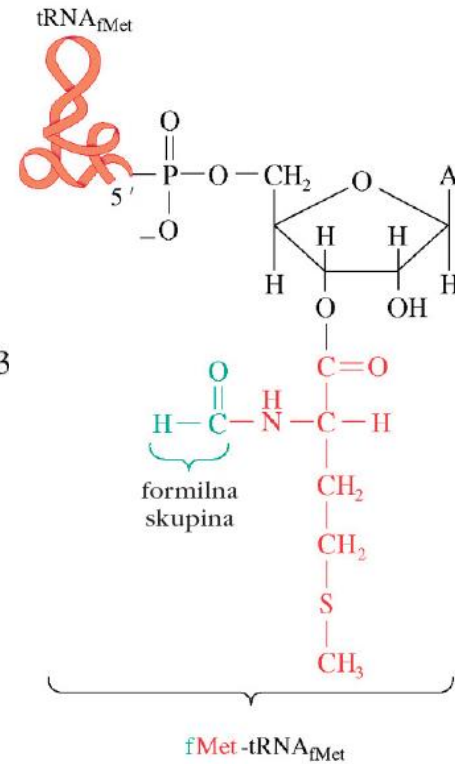
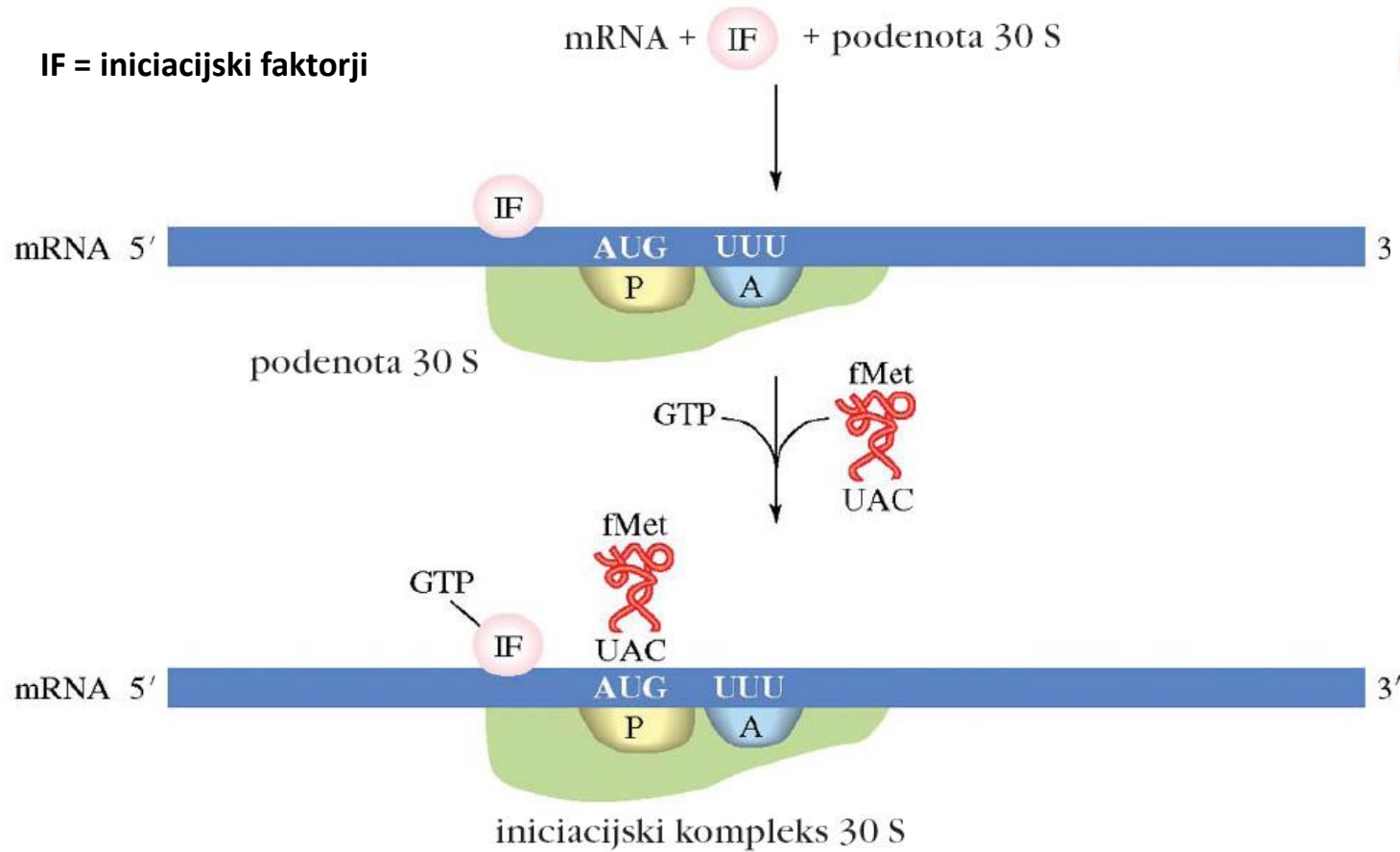
skupaj



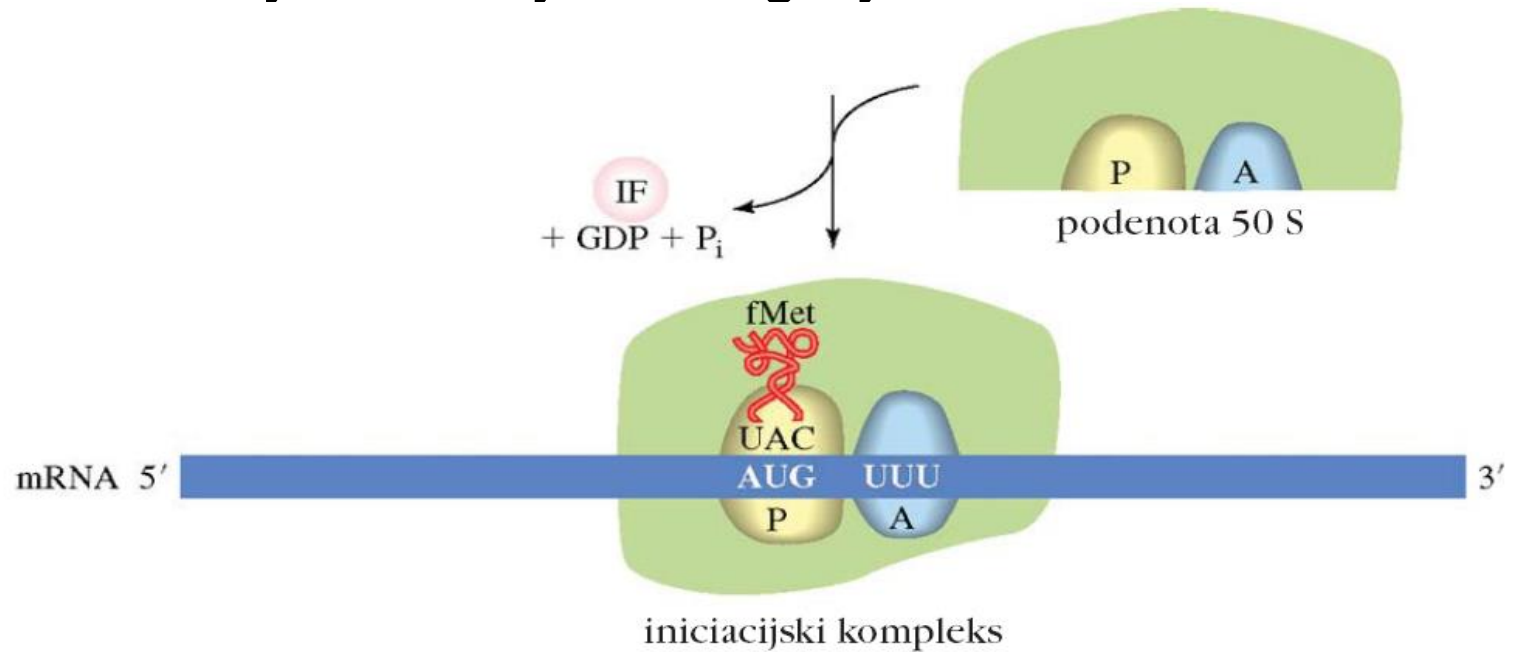
Potek translacije - iniciacija

- Ribosom prepozna začetno mesto na mRNA in v ribosom vstopi N-formilmertonin (fMet).
- fMet je prva AK na N-koncu v bakterijskih celicah.

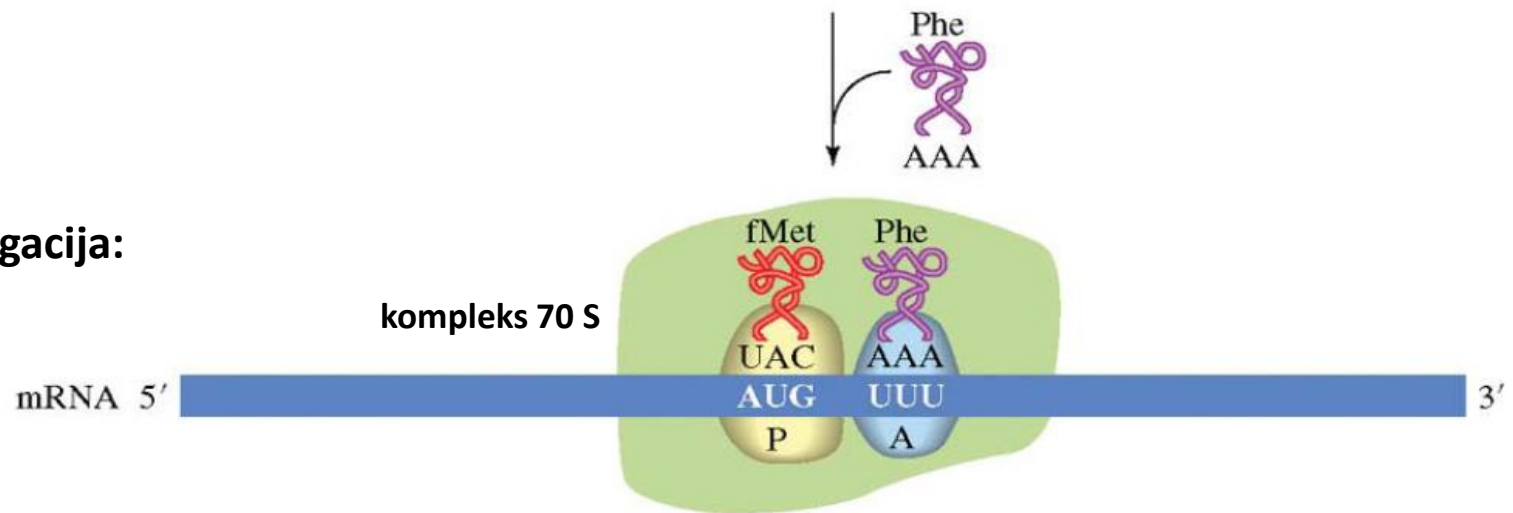
IF = inicijski faktorji



Potek translacije – iniciacija → elongacija



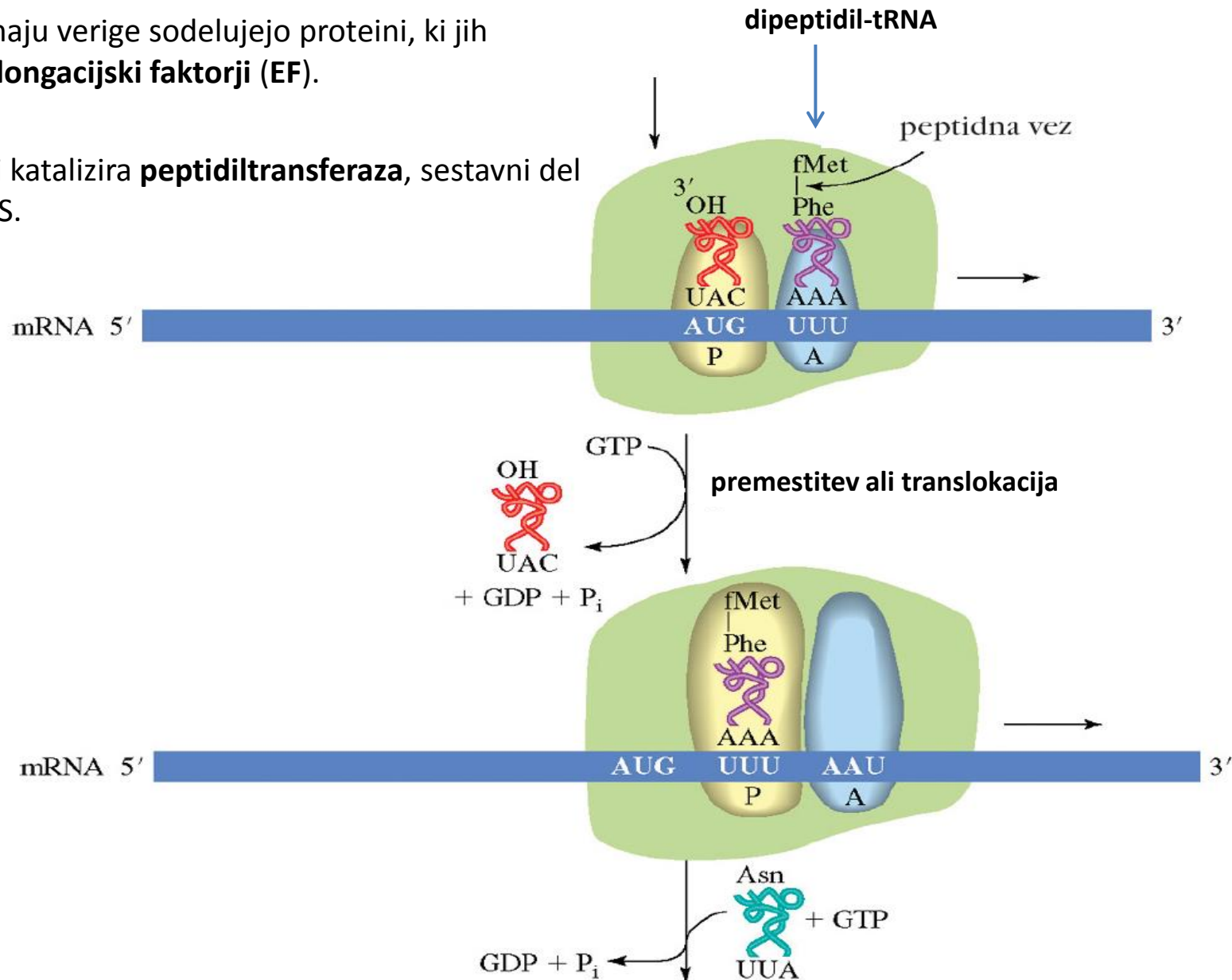
Elongacija:

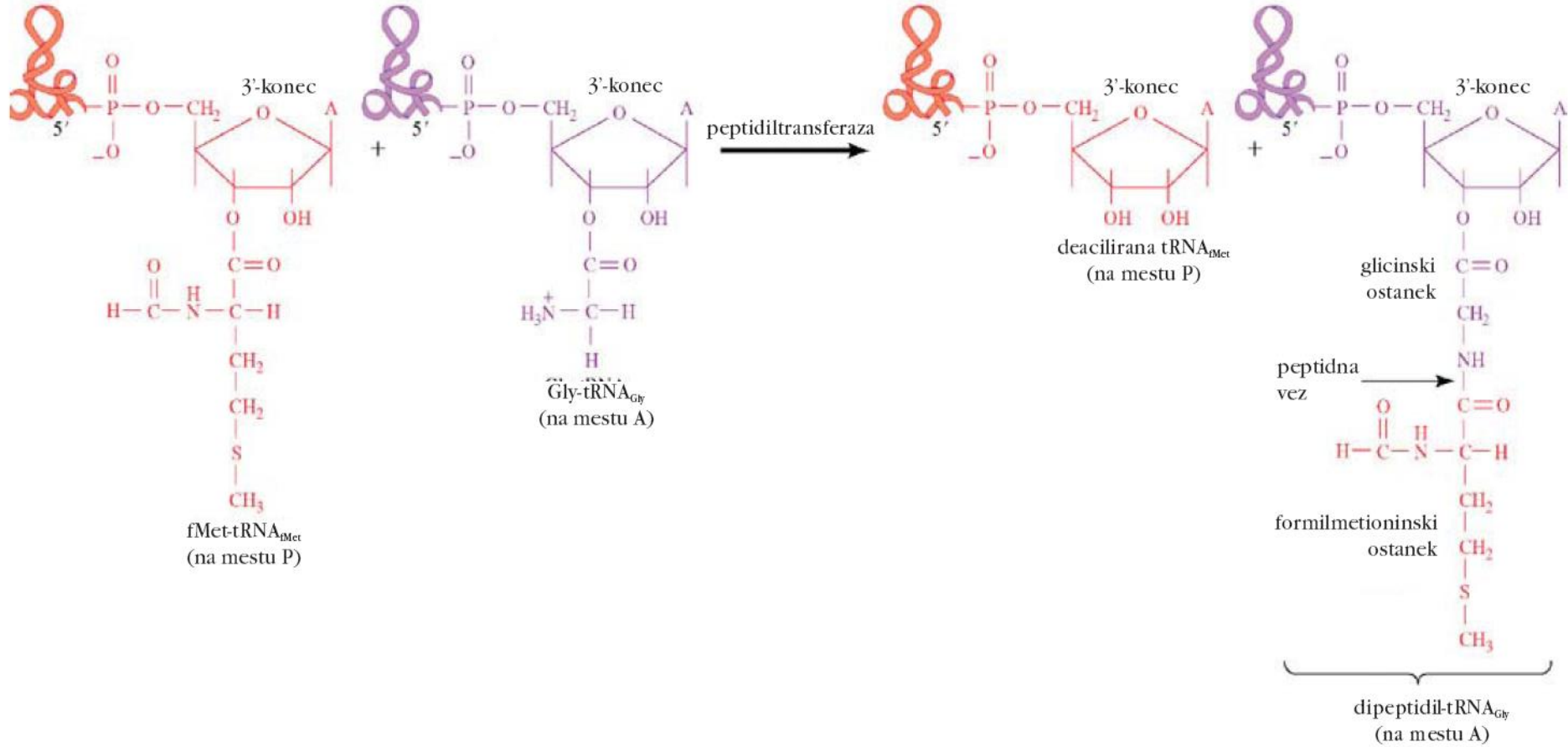
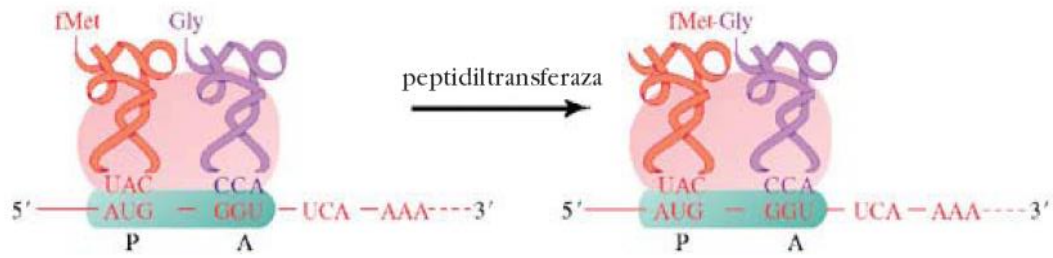


Potek translacije - elongacija

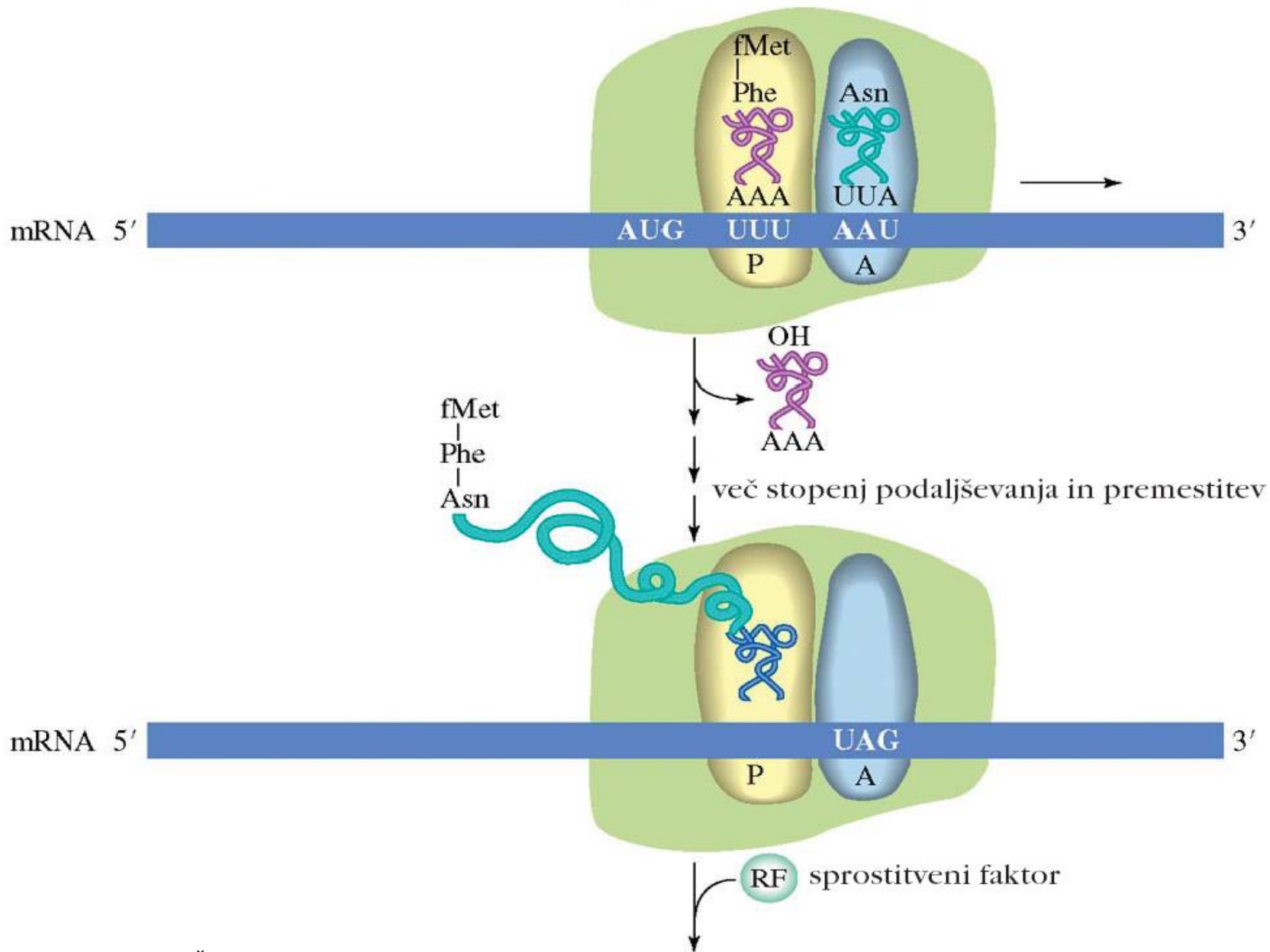
Pri podaljševanju verige sodelujejo proteini, ki jih imenujemo **elongacijski faktorji (EF)**.

Nastanek vezi katalizira **peptidiltransferaza**, sestavni del podenote 50 S.

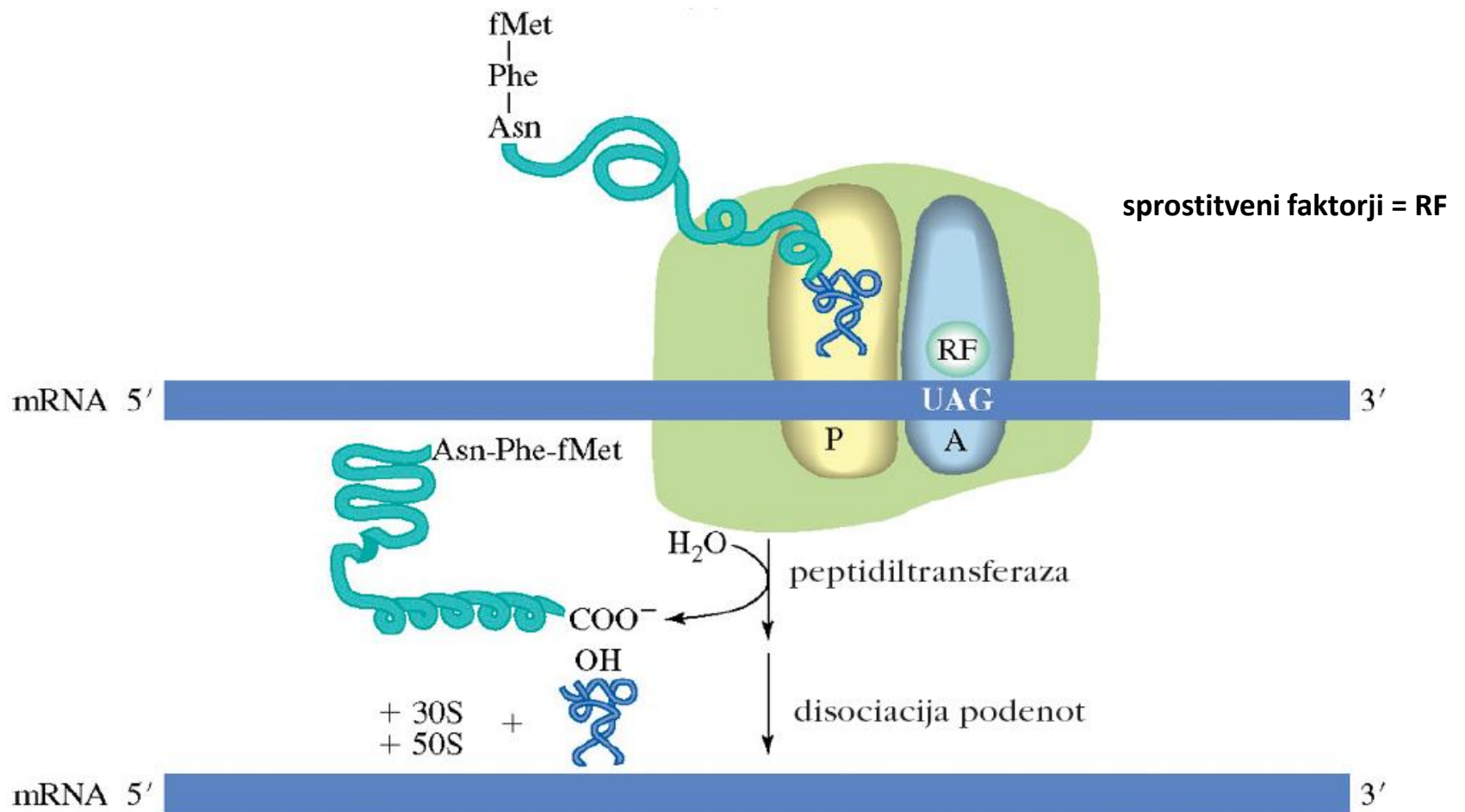




Potek translacije - elongacija



Potek translacije - terminacija



Molekule, ki so vključene v translacijo

Za sintezo proteinov in njihovo dodelavo (procesiranje) pri prokariontih potrebnih več kot 100 različnih proteinov in več vrst molekul RNA.

TABLE 27-5 Components Required for the Five Major Stages of Protein Synthesis in <i>E. coli</i>	
Stage	Essential components
1. Activation of amino acids	20 amino acids 20 aminoacyl-tRNA synthetases 32 or more tRNAs ATP Mg ²⁺
2. Initiation	mRNA <i>N</i> -Formylmethionyl-tRNA ^{Met} Initiation codon in mRNA (AUG) 30S ribosomal subunit 50S ribosomal subunit Initiation factors (IF-1, IF-2, IF-3) GTP Mg ²⁺
3. Elongation	Functional 70S ribosome (initiation complex) Aminoacyl-tRNAs specified by codons Elongation factors (EF-Tu, EF-Ts, EF-G) GTP Mg ²⁺
4. Termination and ribosome recycling	Termination codon in mRNA Release factors (RF-1, RF-2, RF-3, RRF) EF-G IF-3
5. Folding and posttranslational processing	Specific enzymes, cofactors, and other components for removal of initiating residues and signal sequences, additional proteolytic processing, modification of terminal residues, and attachment of acetyl, phosphoryl, methyl, carboxyl, carbohydrate, or prosthetic groups

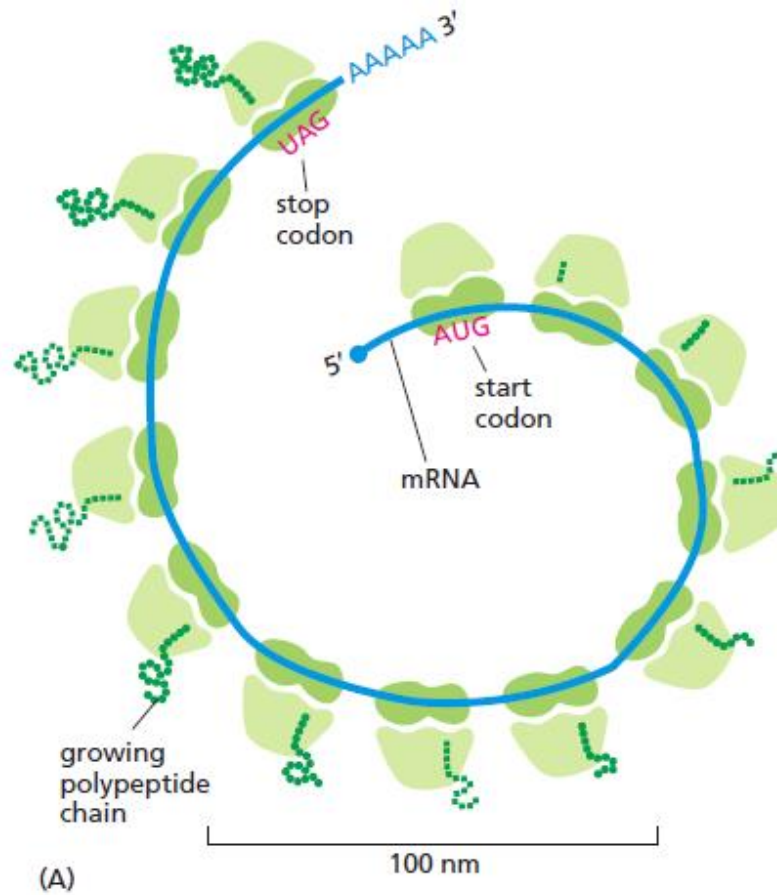
Sinteza proteinov je energijsko drag in zahteven proces:

Potrebna energija za sintezo proteinov

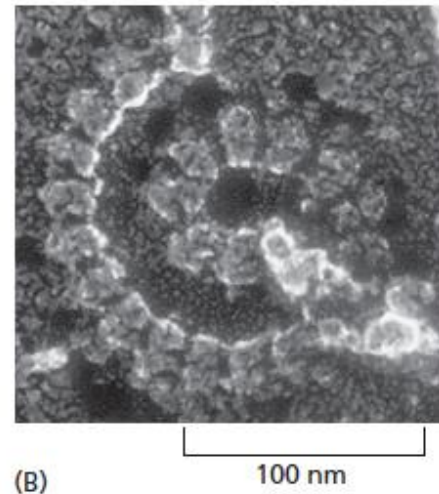
proces	reakcija	število razcepljenih fosfoanhidridnih vezi
1. izbor in aktivacija aminokislina	aminokislina + tRNA → aminoacil-tRNA	
	ATP → AMP + PP _i	1
	PP _i + H ₂ O → 2 P _i	1
2. vstop aminoacil-tRNA na mesto A na ribosomu	GTP + H ₂ O → GDP + P _i	1
3. premestitev	GTP + H ₂ O → GDP + P _i	1
	skupaj:	4

Translacija

Molekulo mRNA hkrati prevajajo gruče ribosomov – **poliribosom**, ki sintetizirajo več enakih proteinskih molekul in s tem povečajo učinkovitost sinteze proteinov.

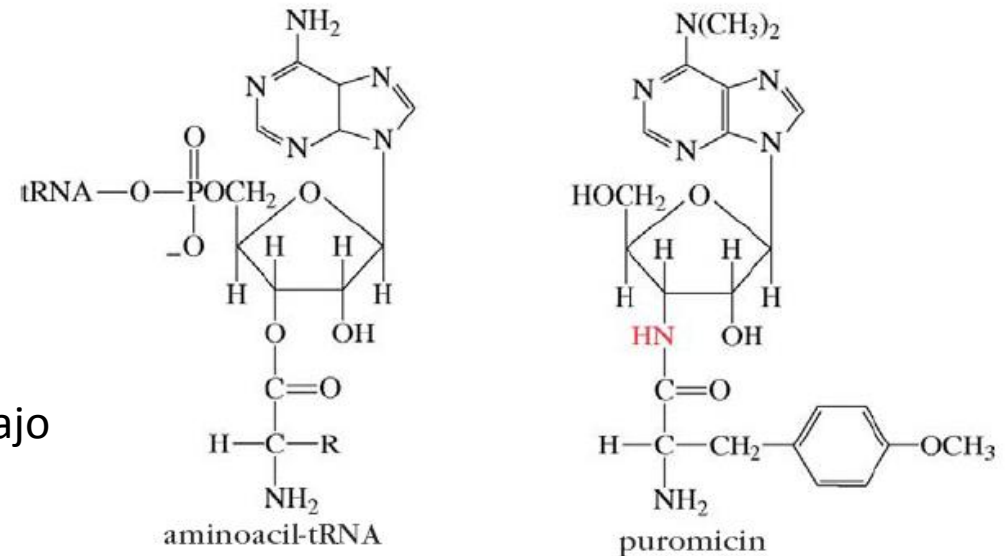


evkariontska celica

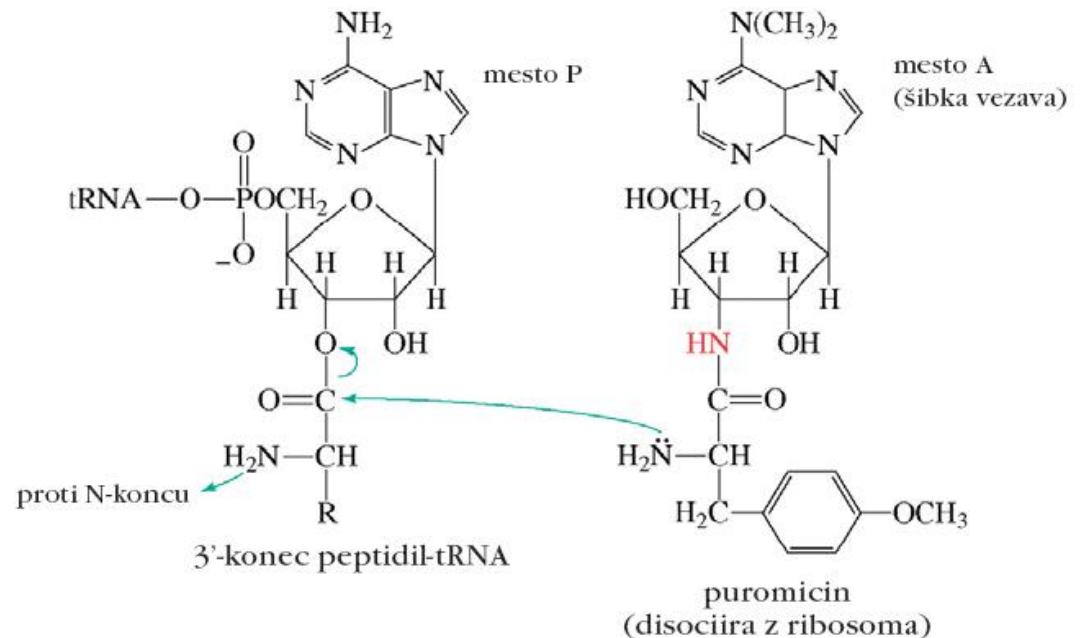


Inhibicija sinteze proteinov

Bakterije rodu *Streptomyces* proizvajajo antibiotik **puromicin**, ki se veže na mesto A, kar povzroči predčasen zaključek sinteze proteina.

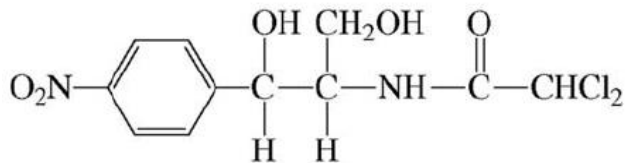


(a)

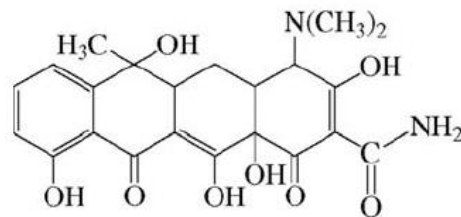


Inhibicija sinteze proteinov

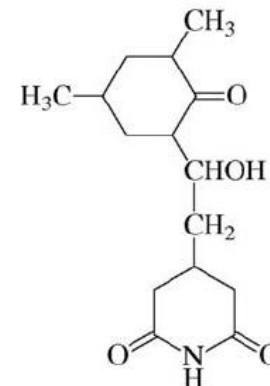
Antibiotični inhibitorji sinteze proteinov pri prokariontih.



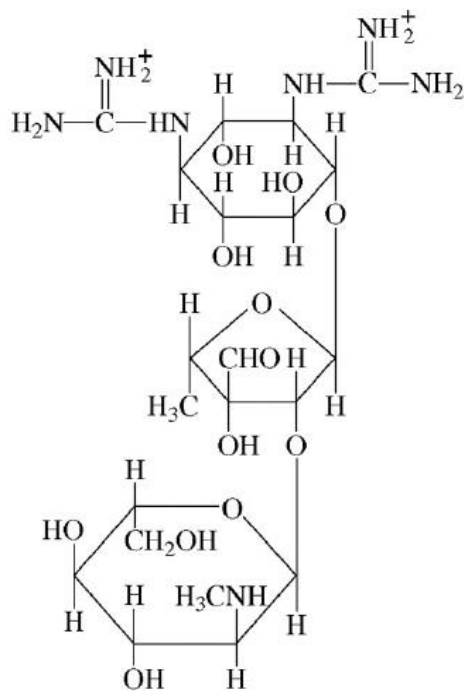
kloramfenikol



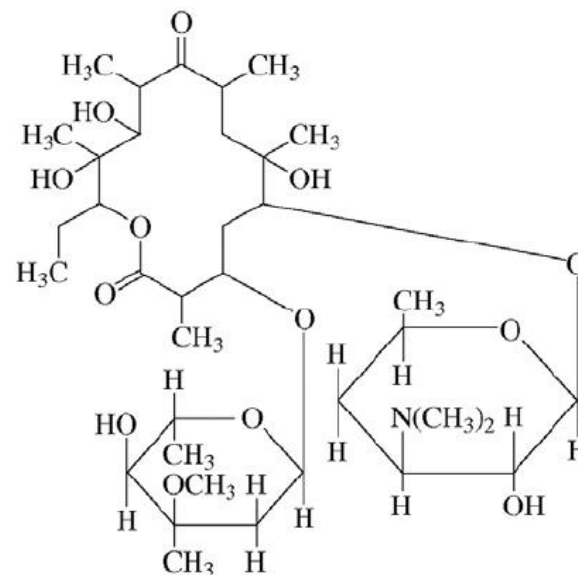
tetraciklin



cikloheksimid



streptomycin



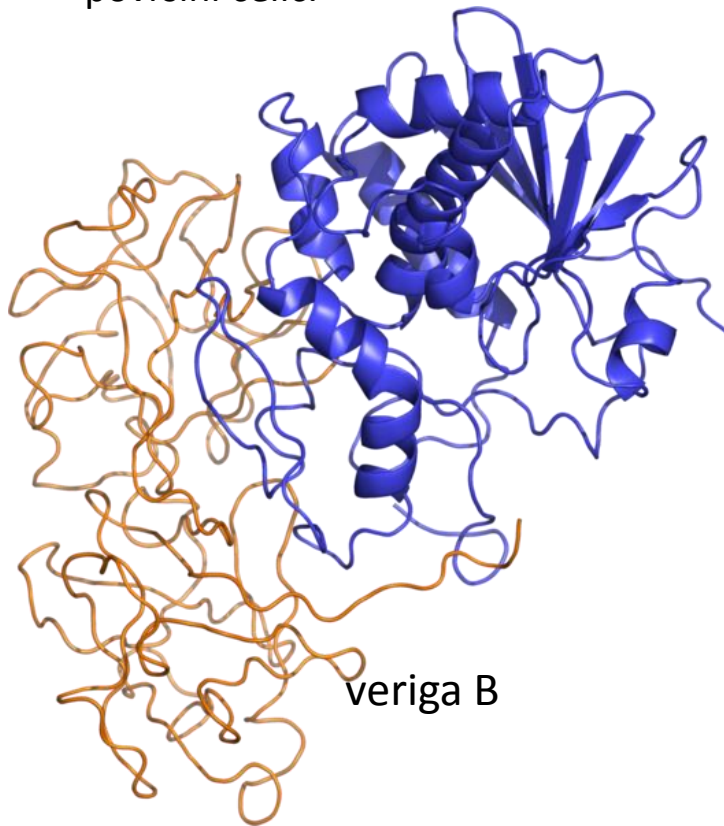
eritromicin

Inhibicija sinteze proteinov

antibiotik	način delovanja
puromicin	povzroča predčasno terminacijo s tem, da oponaša delovanje aminoacil-tRNA; deluje na prokarionte in evkarionte
streptomicin	povzroča napačno branje mRNA in inhibira iniciacijo; deluje na prokarionte
tetraciklin	veže se na mesto A na ribosomu in blokira vstop aminoacil-tRNA; deluje na prokarionte
eritromicin	veže se na ribosome in inhibira translokacijo; deluje na prokarionte
kloramfenikol	inhibira peptidiltransferazno aktivnost podenote 50 S pri prokariontih
cikloheksimid	blokira peptidiltransferazno aktivnost podenote 60 S pri evkariontih

Neantibiotična inhibicija sinteze proteinov

- Ricin je strupen protein iz semen kloščevca.
- Je lektin = protein, ki se veže na ogljikove hidrate.
- $LD_{50} = 22 \mu\text{g}/\text{kg}$ pri inhalaciji ali injiciranju.
- Veriga A je N-glikozidaza, ki odcepi adenin na poziciji 4324 iz 28S rRNA.
- Veriga B je lektin, ki se veže na galaktozne ostanke na površini celic.



veriga A

veriga B



Boyer, Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2005

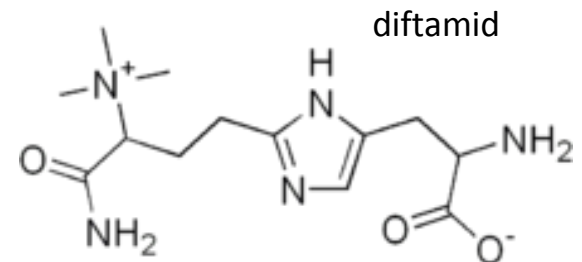


Neantibiotična inhibicija sinteze proteinov

- Bakterija *Corynebacterium diphtheriae* izloča eksotoksin, ki povzroča nalezljivo bolezen zgornjih dihalnih poti **dávico** ali **difterijo**. Eksotoksin povzroči odlaganje psevdomembrane iz fibrina, bakterij in vnetnih celic.
- Povzroča tudi poškodbe srca in jetr ter mielinske ovojnice v osrednjem in obkrajnem živčevju, kar vodi v izgubo nadzora gibanja in zaznavanja.
- Gen za toksin **Tox** je zapisan bakteriofagu β .
- Le sevi, ki imajo lizogen fag, so toksični.
- Je polipeptid, sestavljen iz dveh podenot A in B, ki sta povezani z S-S mostičkom.
- Fragment A ima katalitično aktivnost in **inhibira elongacijski faktor 2** (eEF2) tako da **ADP-ribozilira** aminokislino **diftamid**. Že ena sama molekula fragmenta A ubije celico.
- Fragment B je potreben za translokacijo proteina v celico.



<http://sl.wikipedia.org/wiki/Davica>



http://en.wikipedia.org/wiki/Diphtheria_toxin

Posttranslacijska dodelava proteinov – zvitje proteinov

- Večina proteinov **po končani sintezi še ni v biološko aktivni obliki** (nativni konformaciji).
- Po končani sintezi večinoma sledi zvitje proteinov v **nativno konformacijo**.
- Proces zvijanja je pogosto **kooperativen**.

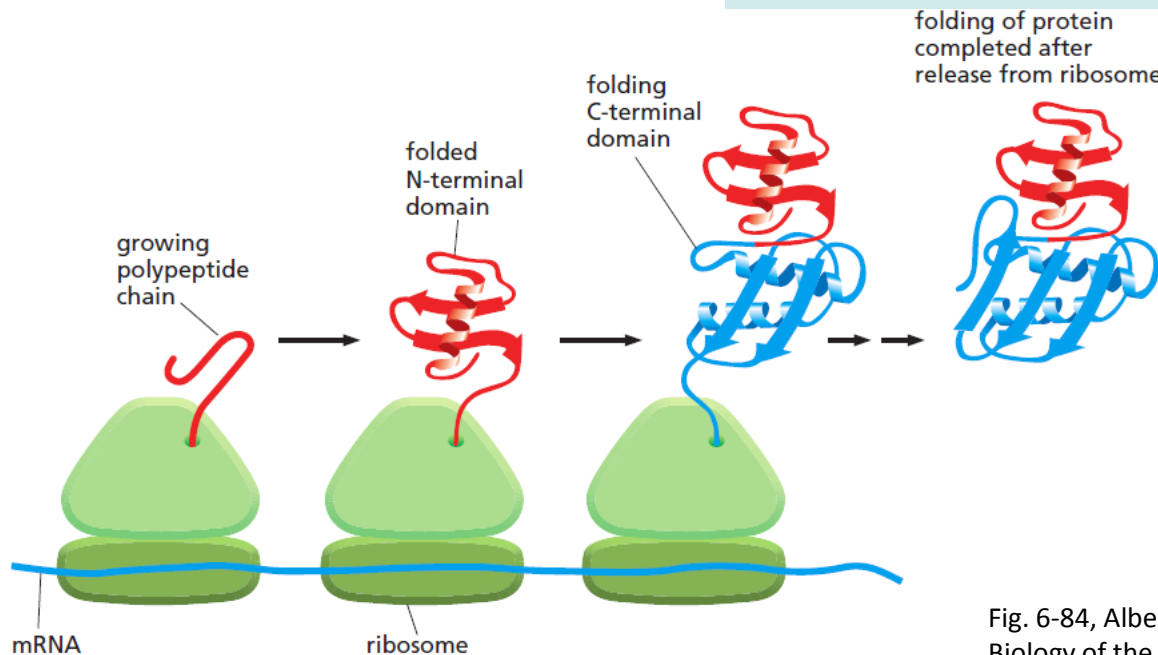
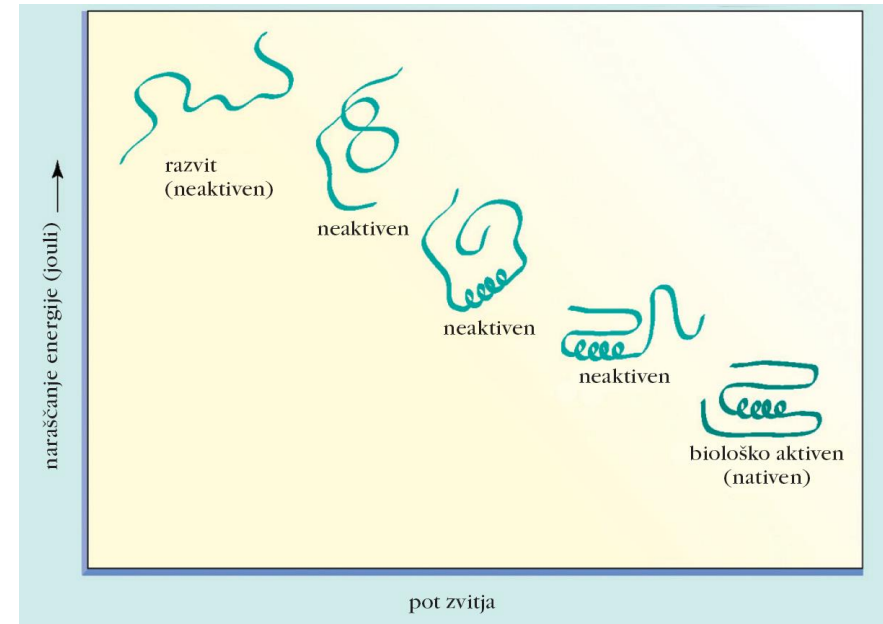
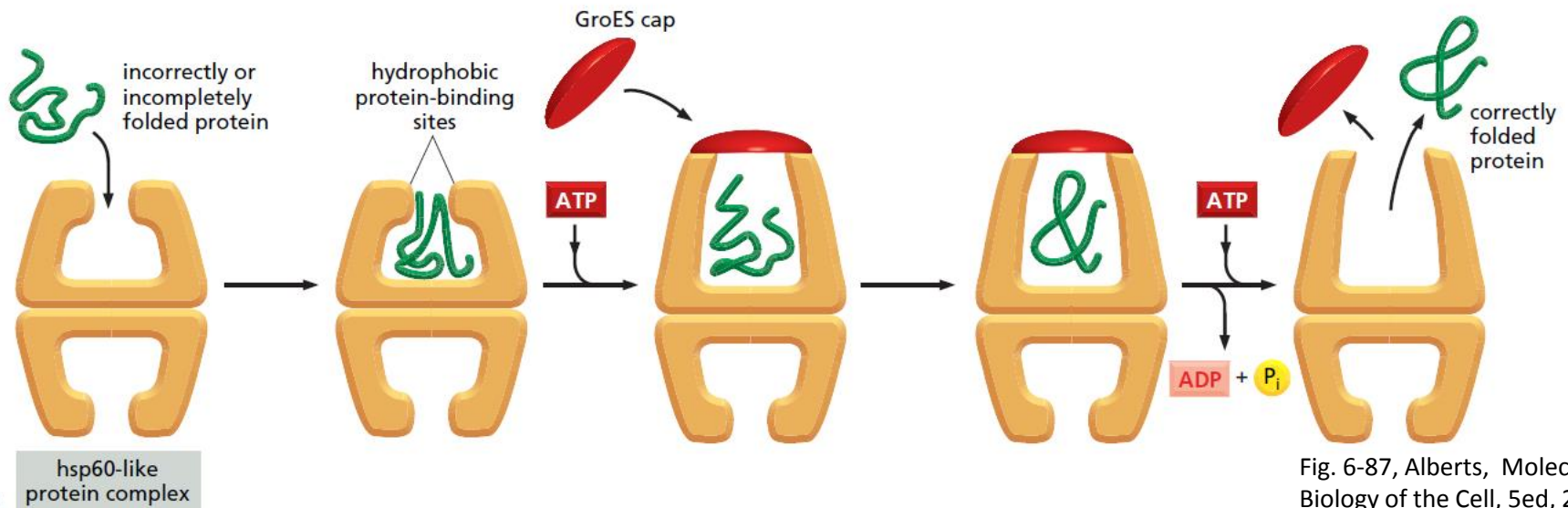
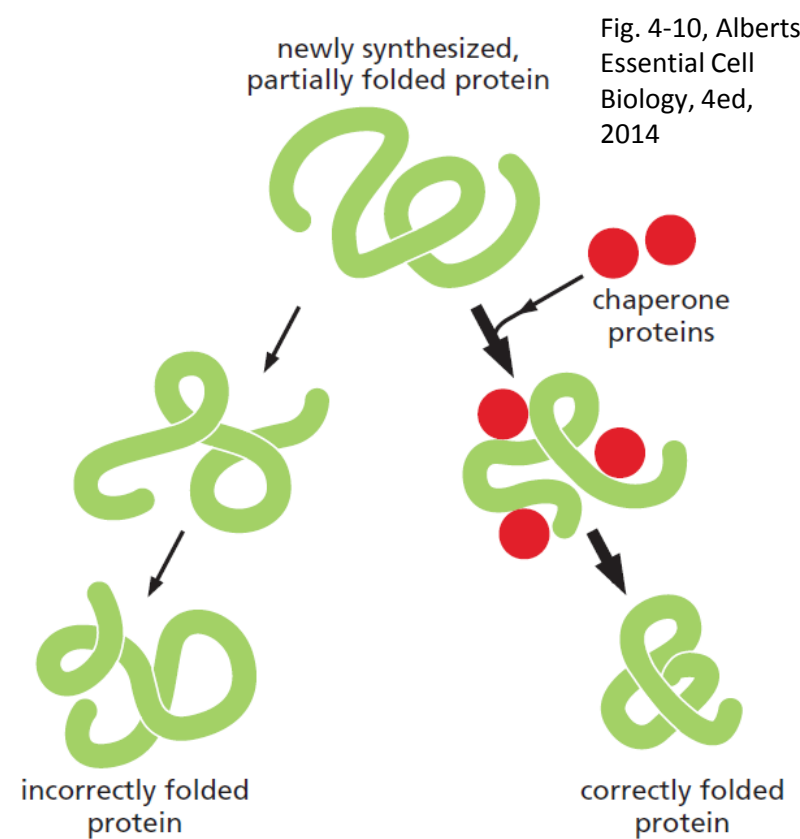


Fig. 6-84, Alberts, Molecular Biology of the Cell, 5ed, 2008

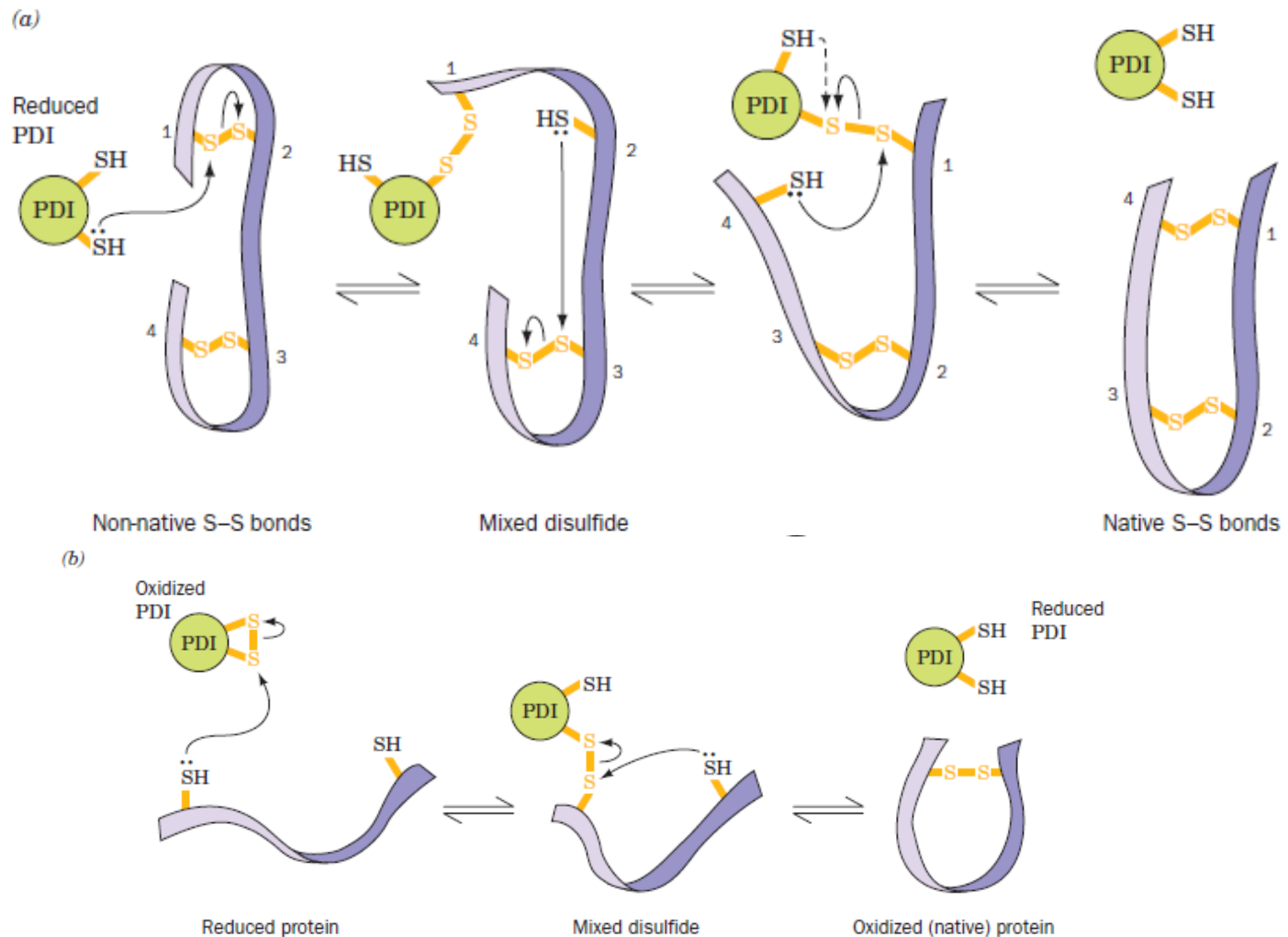
Zvitje proteinov

- Proteini, ki katalizirajo, usmerjajo in pospešujejo zviyanje proteinov so **šaperoni**.
- Poznamo več vrst šaperonov: nekateri so ATPaze in omogočajo zviyanje ob hidrolizi ATP.



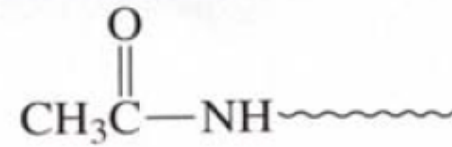
Zvitje proteinov – nastanek S-S vezi

- S-S vezi pogosto prečno povezujejo cisteinske ostanke v proteinu.
- Encim, ki katalizira nastanek S-S vezi je **protein-disulfid-izomeraza (PDI)**.

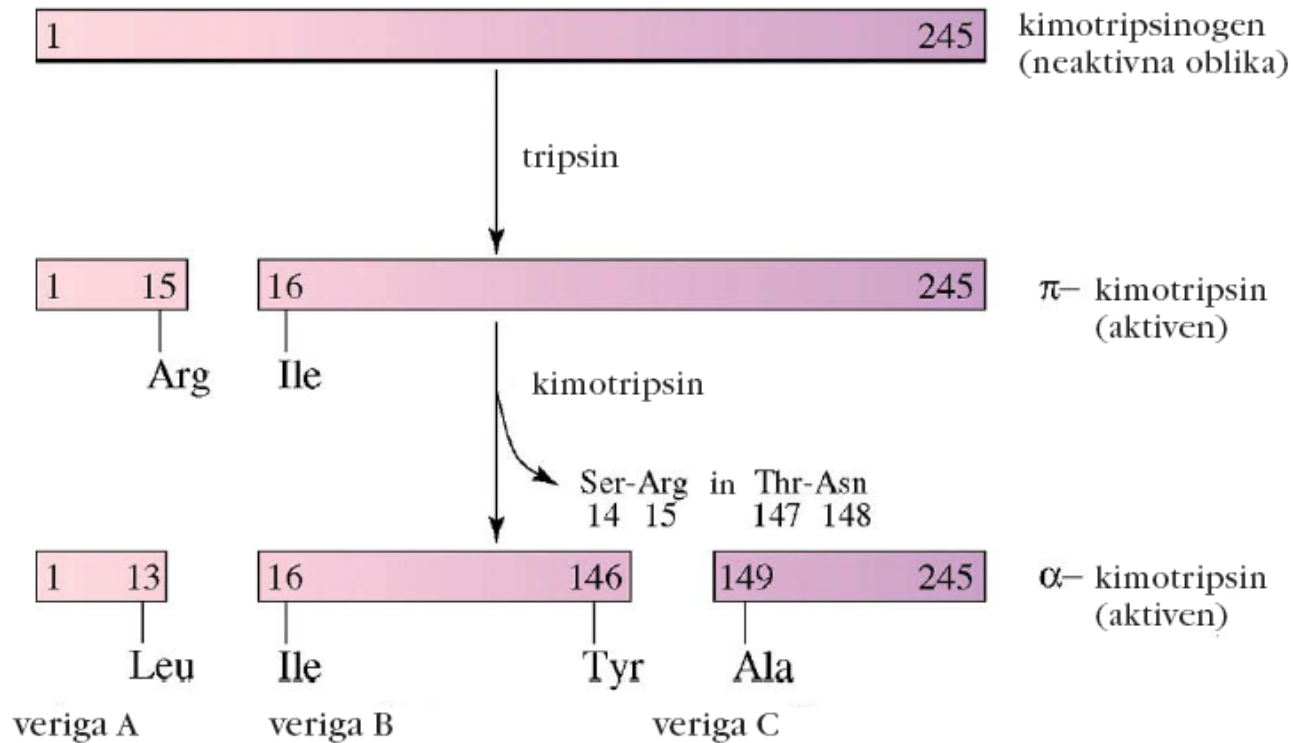


Biokemijske modifikacije

- Dodajanje acetilne skupine na N-konec:

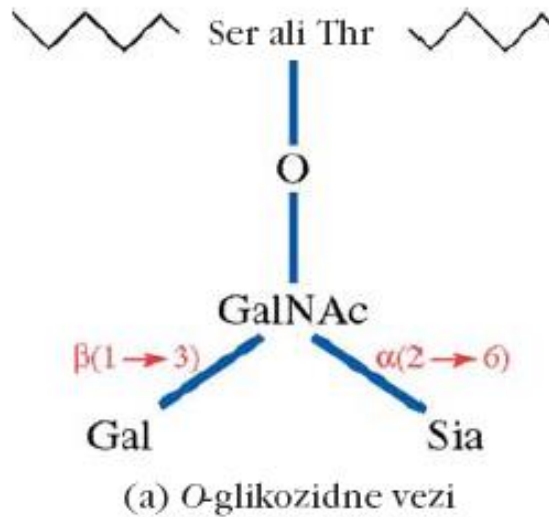


- Proteolitična cepitev verige

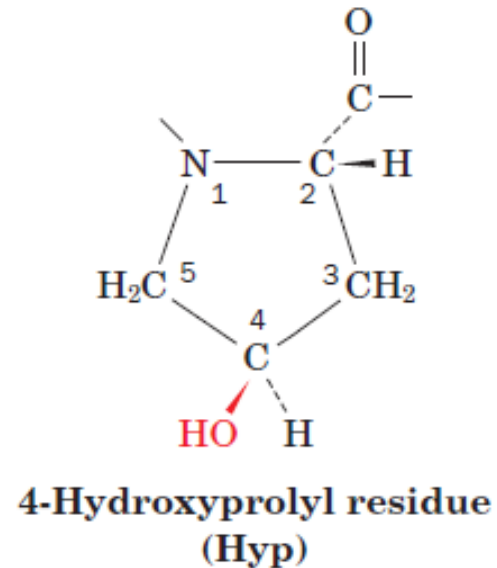


Biokemijske modifikacije

Vezava sladkorjev na AK **Ser, Thr, Asn**.



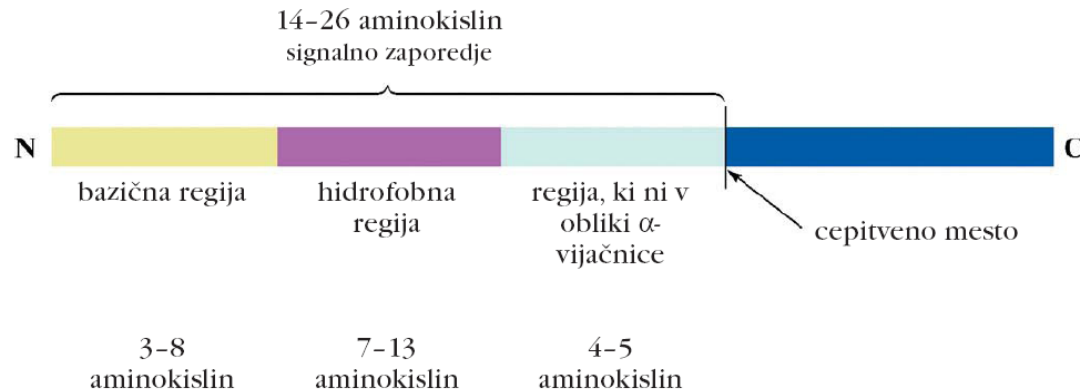
Modifikacija AK: fosforilacija in hidroksilacija.



Dodajanje prostetičnih skupin: hem, FAD, biotin.

Usmerjanje proteinov pri prokariontih

Proteini, ki morajo preiti iz citosola skozi membrane, imajo signalno zaporedje (14 AK – 26 AK na N-koncu).



Boyer, Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2005

Inner membrane proteins

Phage fd, major coat protein

Met Lys Lys Ser Leu Val Leu Lys Ala Ser Val Ala Val Ala Thr Leu Val Pro Met Leu Ser Phe Ala Ala Glu --

Phage fd, minor coat protein

Met Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser His Ser Ala Glu --

Periplasmic proteins

Alkaline phosphatase

Met Lys Gln Ser Thr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Phe Thr Pro Val Thr Lys Ala Arg Thr --

Leucine-specific binding protein

Met Lys Ala Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp --

β -Lactamase of pBR322

Met Ser Ile Gln His Phe Arg Val Ala Leu Ile Pro Phe Phe Ala Ala Phe Cys Leu Pro Val Phe Ala His Pro --

Outer membrane proteins

Lipoprotein

Met Lys Ala Thr Lys Leu Val Leu Gly Ala Val Ile Leu Gly Ser Thr Leu Leu Ala Gly Cys Ser --

LamB

Leu Arg Lys Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Ala Gly Val Met Ser Ala Gln Ala Met Ala Val Asp --

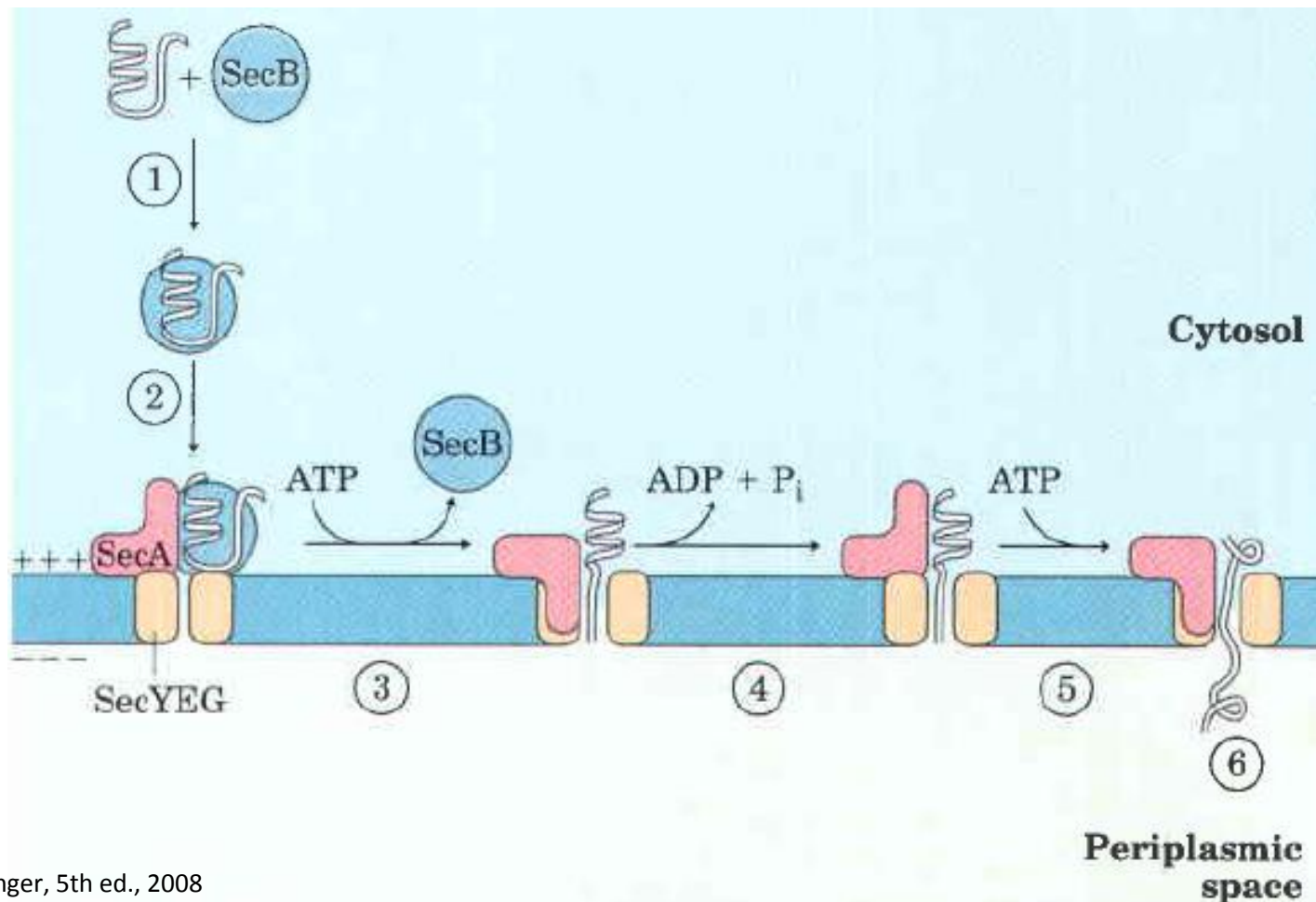
OmpA

Met Met Ile Thr Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Ala Pro --

Fig. 27-39, Lehninger, 5th ed., 2008

Usmerjanje proteinov pri prokariontih

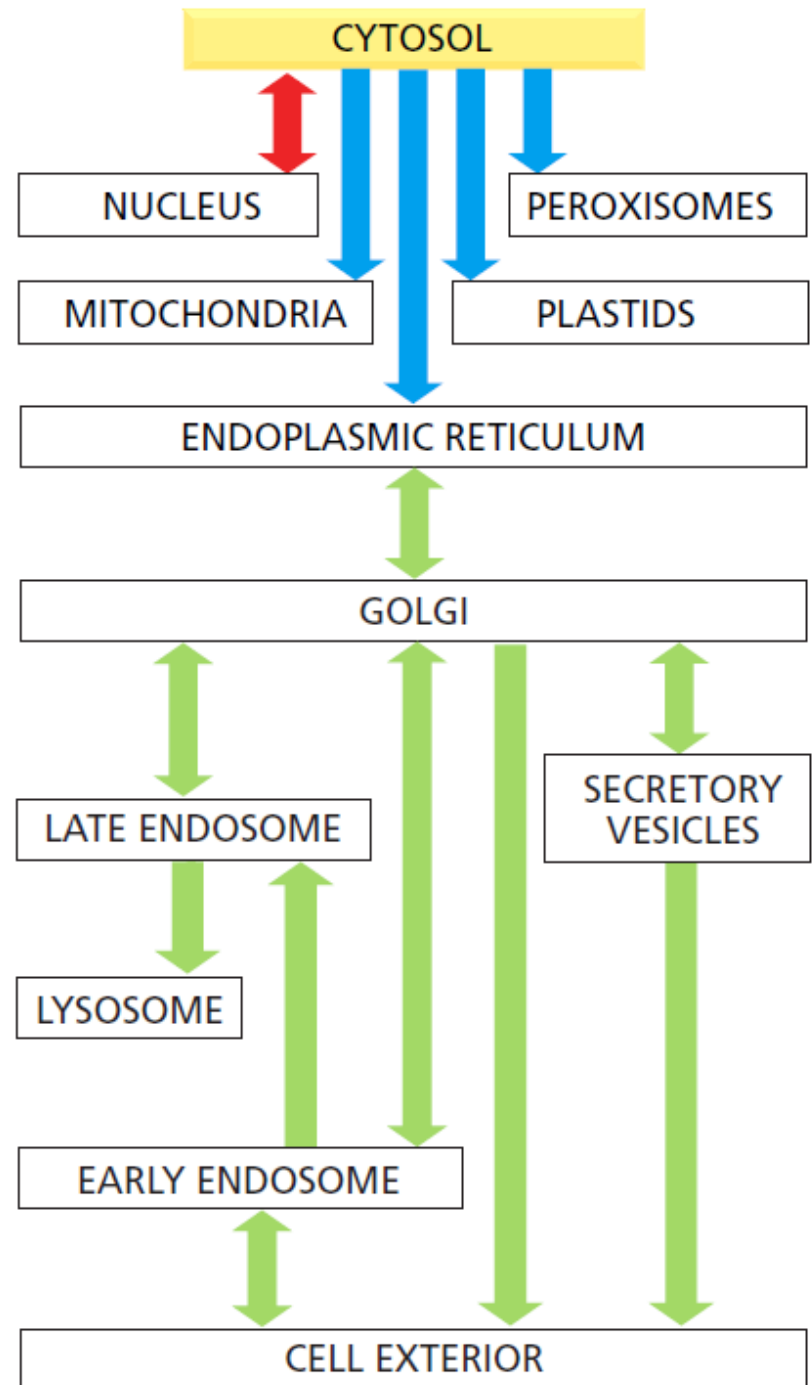
- Pri prokariontih lahko proteini ostanejo v celici ali se iz nje izločijo.
- Šaperon SecB prepozna signalno sekvenco za prenos v periplazmo na N-koncu proteina.
- Energija za translokacijo prihaja iz hidrolize ATP in transmembranskega elektrokemijskega potenciala.



Usmerjanje proteinov pri evkariontih

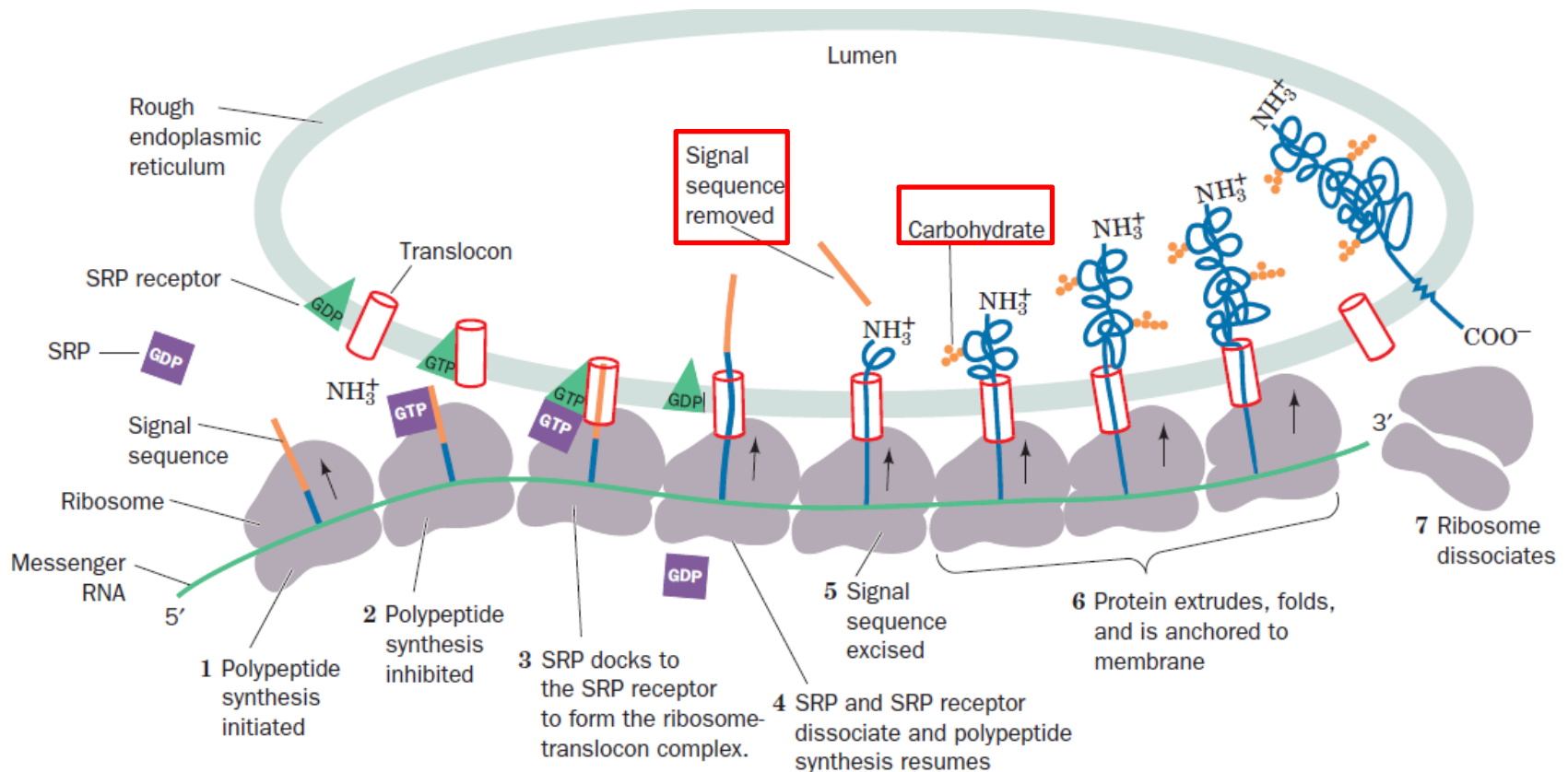
- Proteini, ki so namenjeni **izločanju iz celice** ali pa **v lizosome** imajo skupnih nekaj korakov, ki se **začnejo na ER**.
- Proteini, ki so namenjeni v **mitohondrij, kloroplaste** ali **jedro** imajo tri različne ločene mehanizme.
- Proteini, ki so namenjeni delovanju v **citiosolu**, enostavno ostanejo v njem.

KEY: █ = gated transport
█ = transmembrane transport
█ = vesicular transport



Usmerjanje proteinov v endoplazemski retikulum

- Proteini, ki so namenjeni v membrane, ER, lizosome ali za izločanje iz celice, se sintetizirajo na ribosomih, ki so pritjeni na ER.
- **Proteini, ki morajo preiti iz citosola skozi membrane** (v mitohondrij, kloroplaste ali ER), imajo kratko zaporedje aminokislin, imenovano **signalno zaporedje** na **N-koncu proteina**.



Glikozilacija proteinov

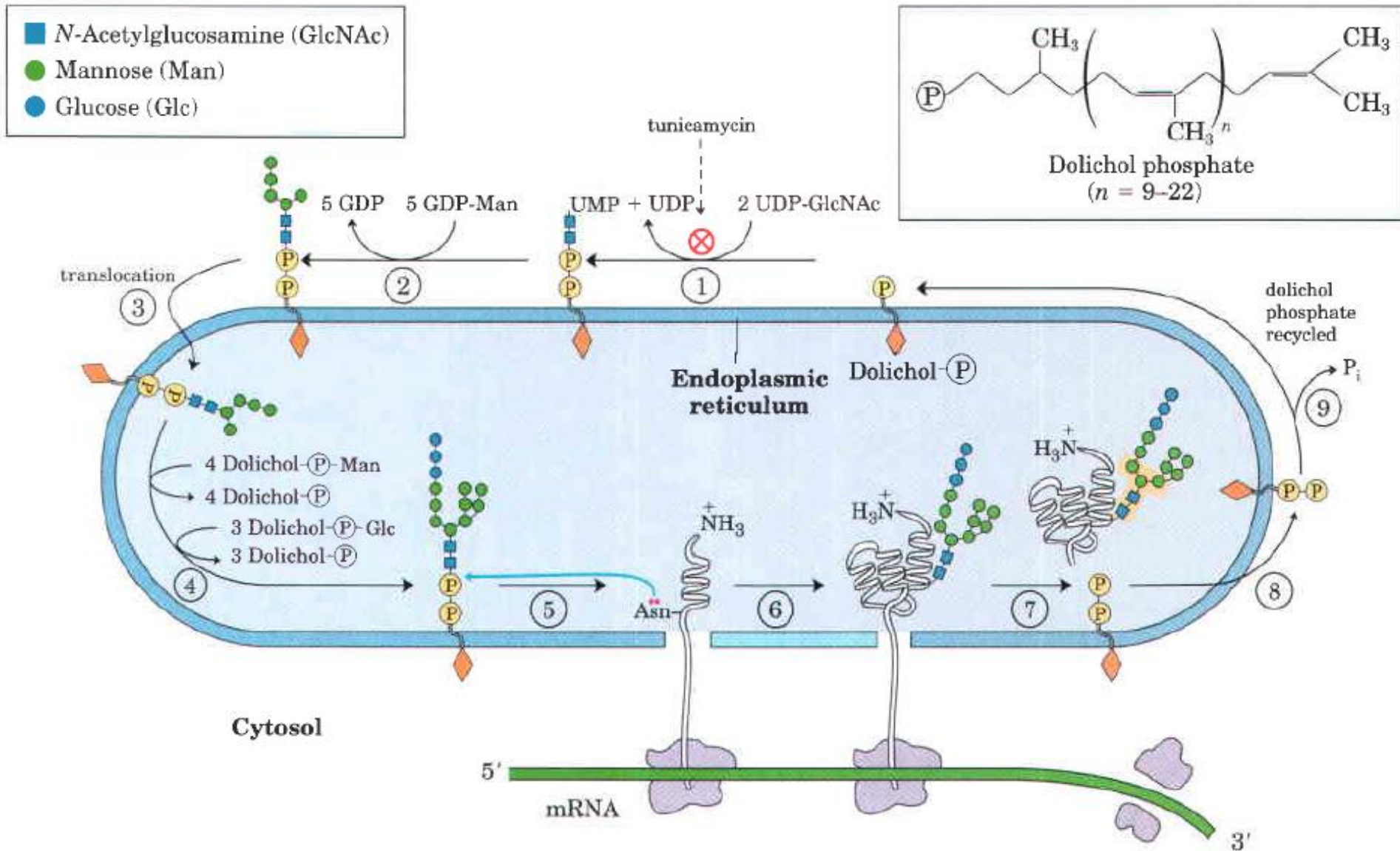
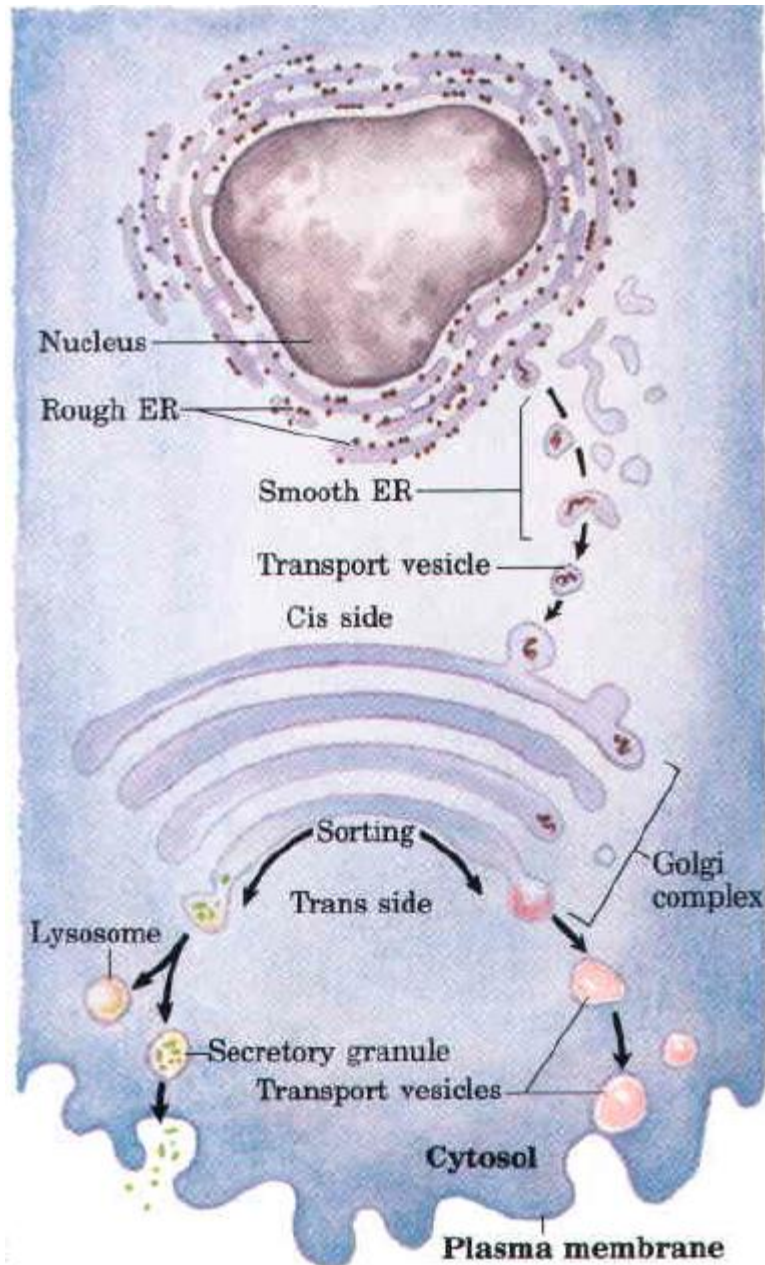


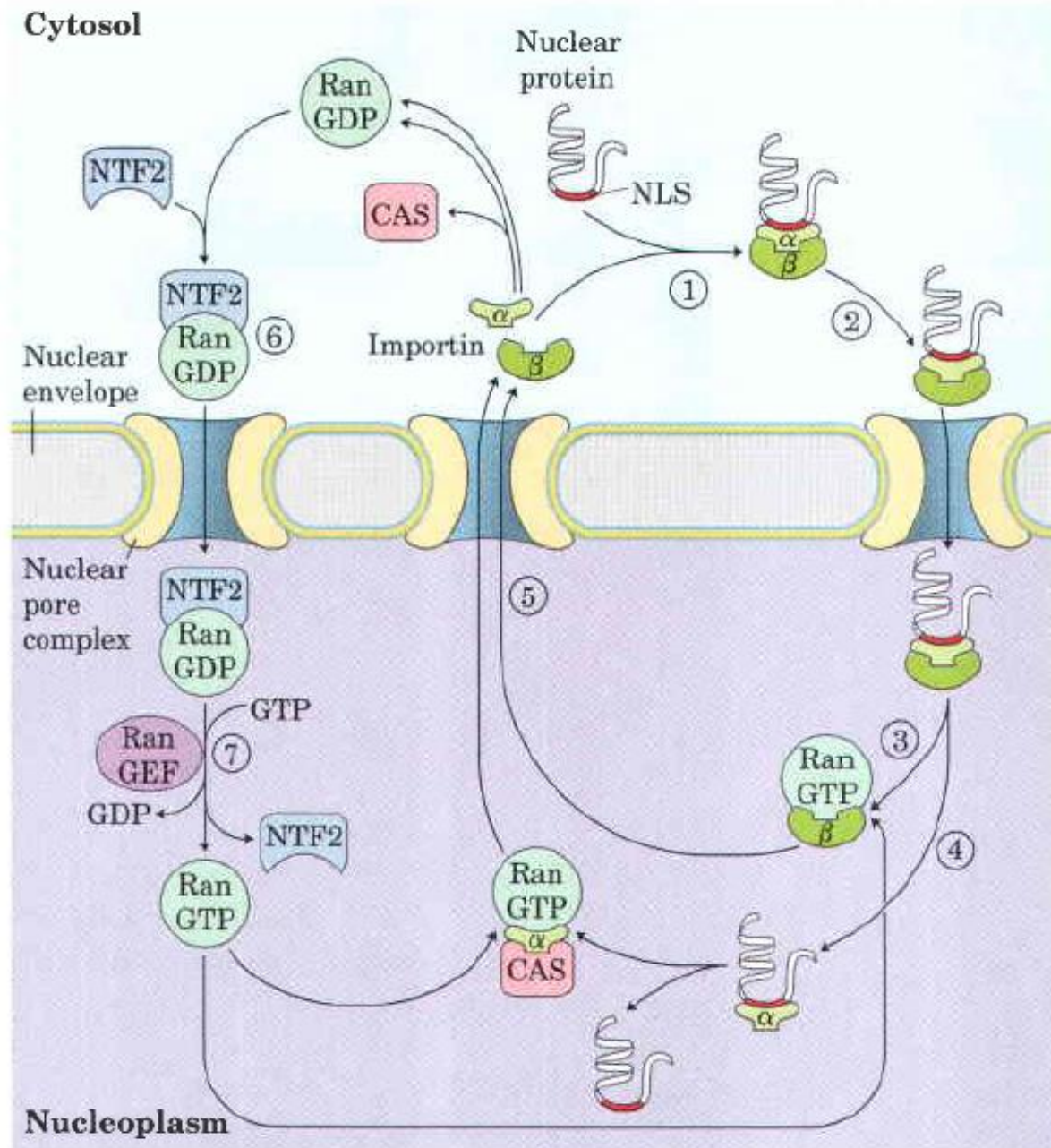
Fig. 27-39, Lehninger, 5th ed., 2008

Razvrščanje proteinov v GA in pakiranje v vezikle: zunajcelični in lizosomski proteini



Proteini namenjeni v jedro

- Proteini se v jedro prenašajo preko **jedrnih por**.
- Proteinom, ki so lokalizirani v jedru, se signalna sekvenca (**NLS**) ne odcepi.
- **NLS** se nahaja **znotraj zaporedja proteinov**.
- Prenos v jedro poteka preko **importinov**, ki krožijo med citosolom in jedrom.



Usmerjanje proteinov v mitohondrij

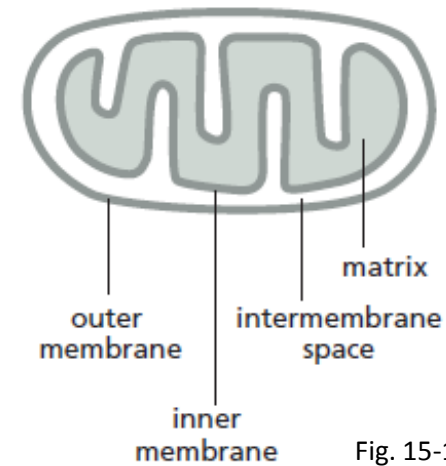
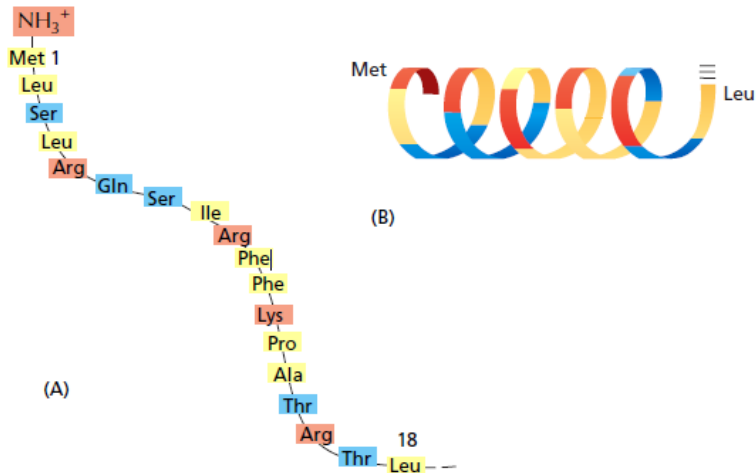
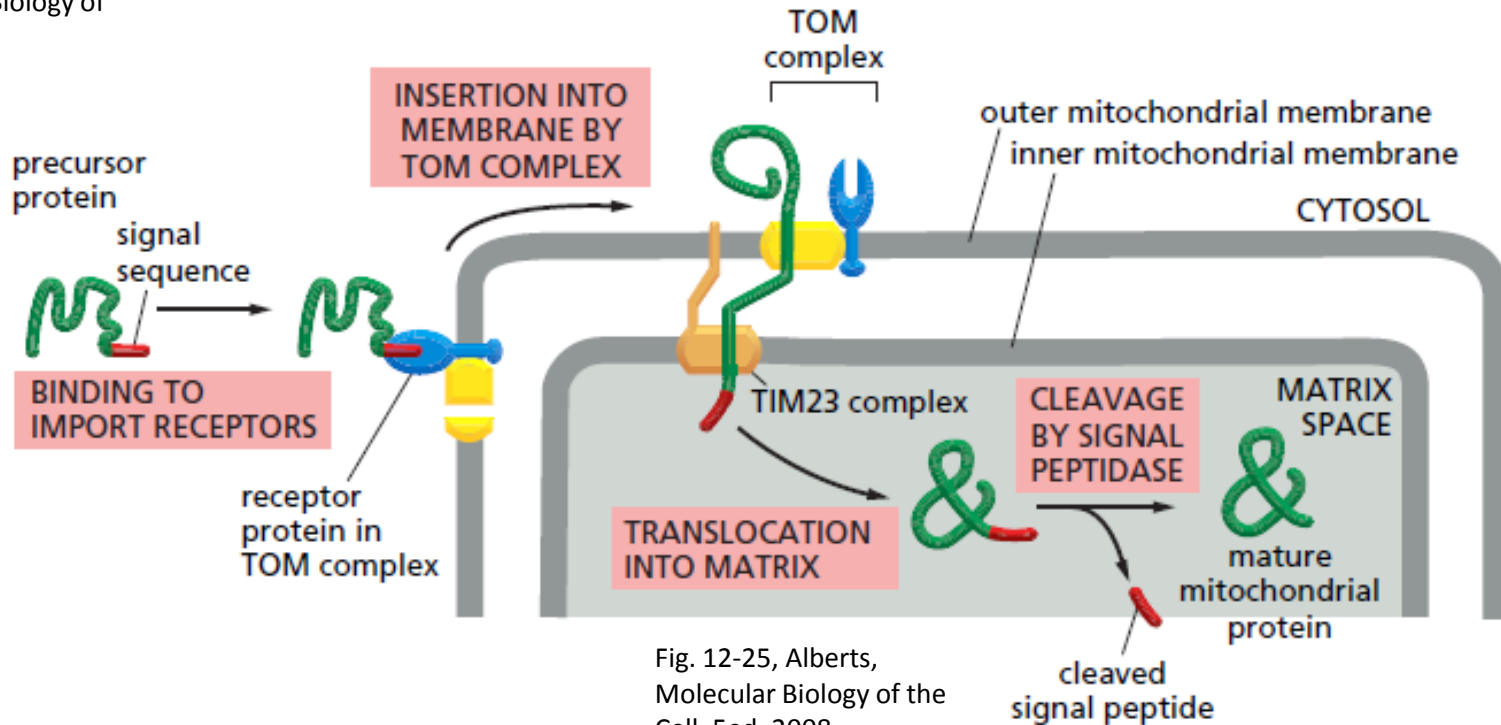


Fig. 15-11, Alberts, Essential Cell Biology, 4ed, 2014

Fig. 12-22, Alberts, Molecular Biology of the Cell, 5ed, 2008

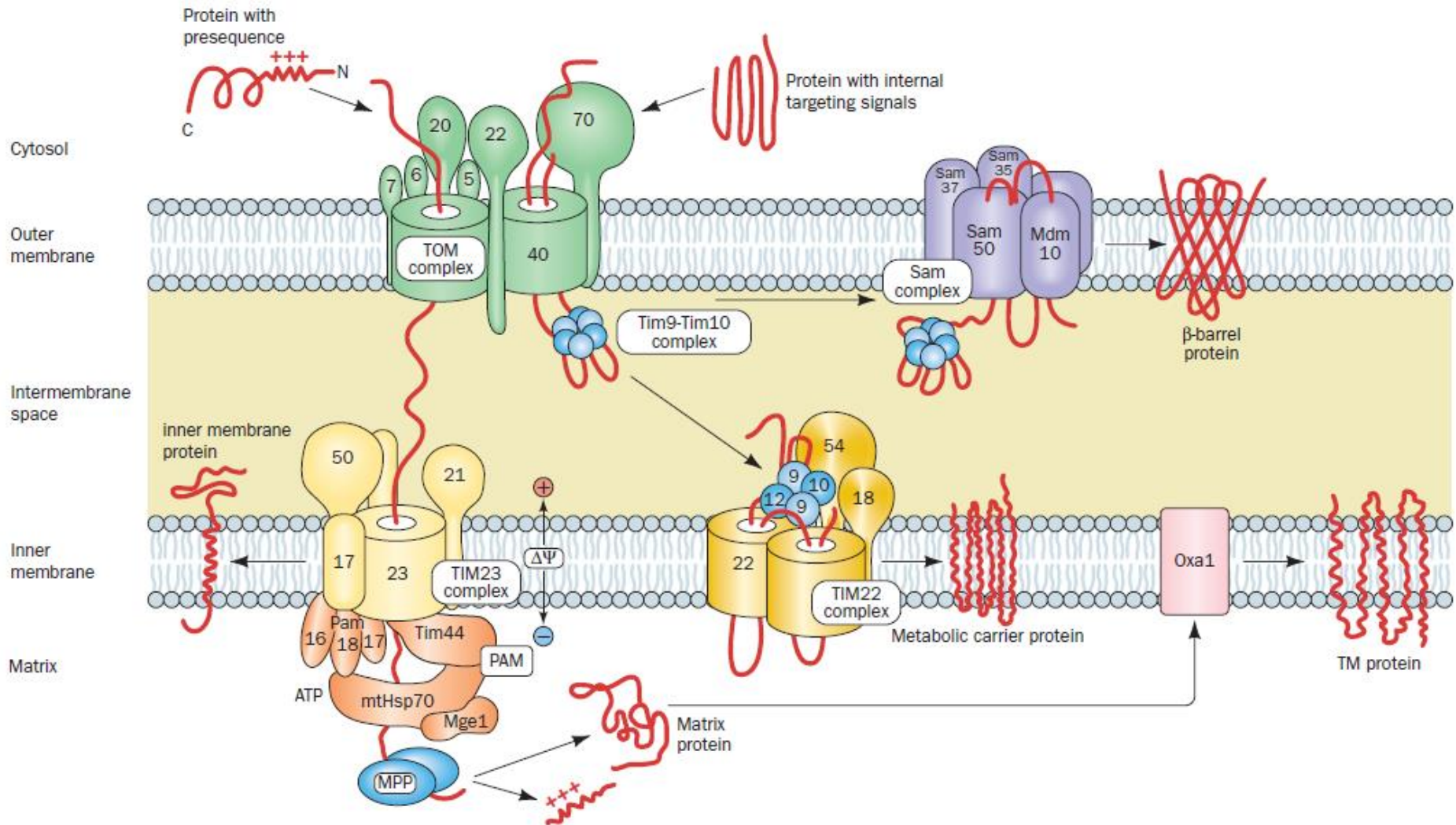


Proteini se prenašajo v razviti obliki.

Fig. 12-25, Alberts, Molecular Biology of the Cell, 5ed, 2008

Usmerjanje proteinov v mitohondrij

Za transport je potrebna energija ATP in transmembranskega potenciala.



Razgradnja proteinov

- Z razgradnjo proteinov se odstranjujejo poškodovani in nepravilno zviti celični proteini.
- Proteini imajo različno dolgo življenjsko dobo.

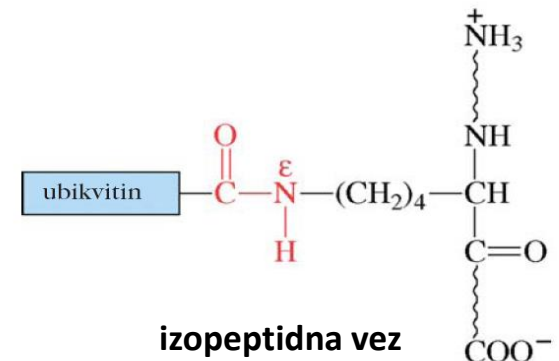
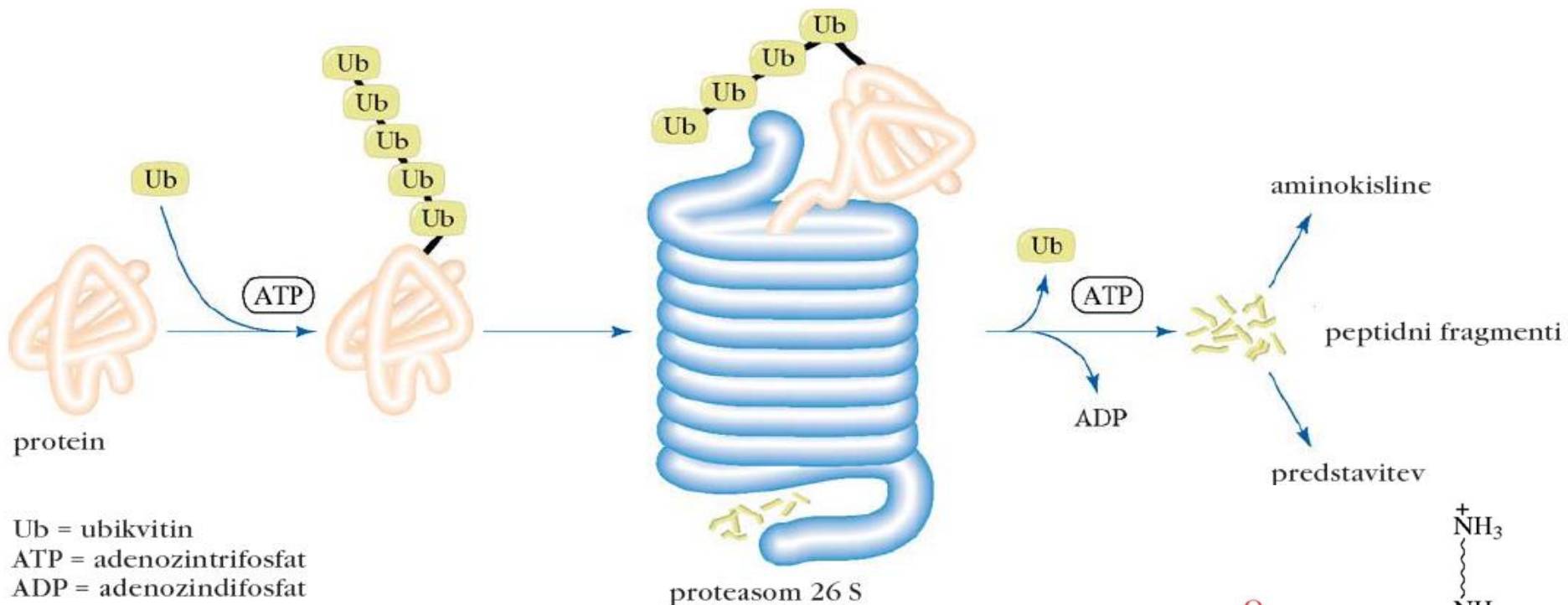
Amino-terminal residue	Half-life*
Stabilizing	
Met, Gly, Ala, Ser, Thr, Val	>20 h
Destabilizing	
Ile, Gln	~30 min
Tyr, Glu	~10 min
Pro	~7 min
Leu, Phe, Asp, Lys	~3 min
Arg	~2 min

Lehninger, 5th ed., 2008

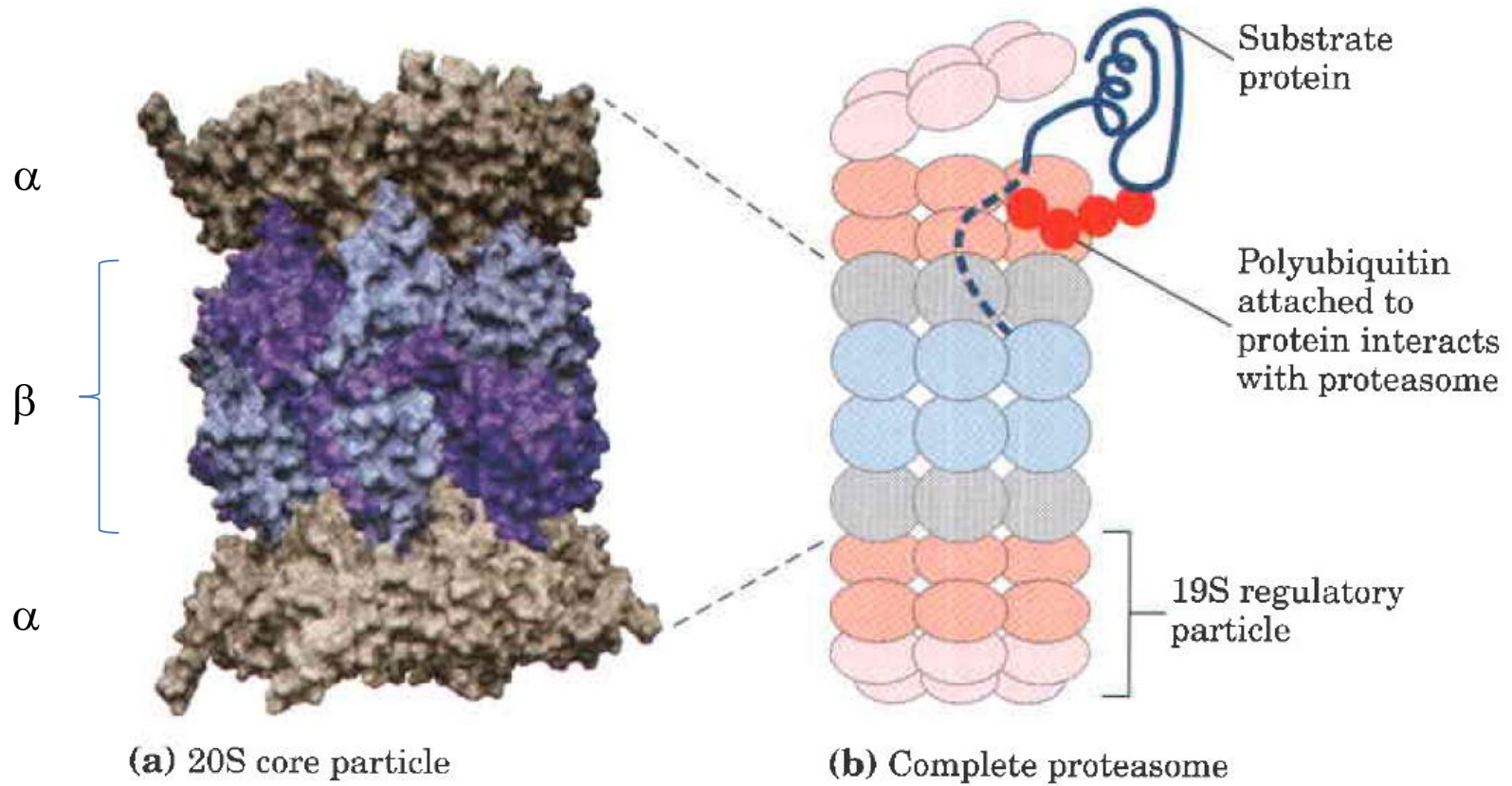
- **Izvencelični** proteini, ki vstopijo v celico se s proteazami razgradijo v **lizosomih**.
- **Znotrajcelični** proteini se razgradijo s pomočjo velikih proteolitičnih proteinskih kompleksov – **proteasomov**.

Razgradnja proteinov - proteasom

- Proteini za razgradnjo so **različno označeni**.
- Primer: označevanje z **ubikvitinom** in razgradnja v proteasomu 26 S v evkariontskih celicah. Za razgradnjo je potrebna energija ATP.

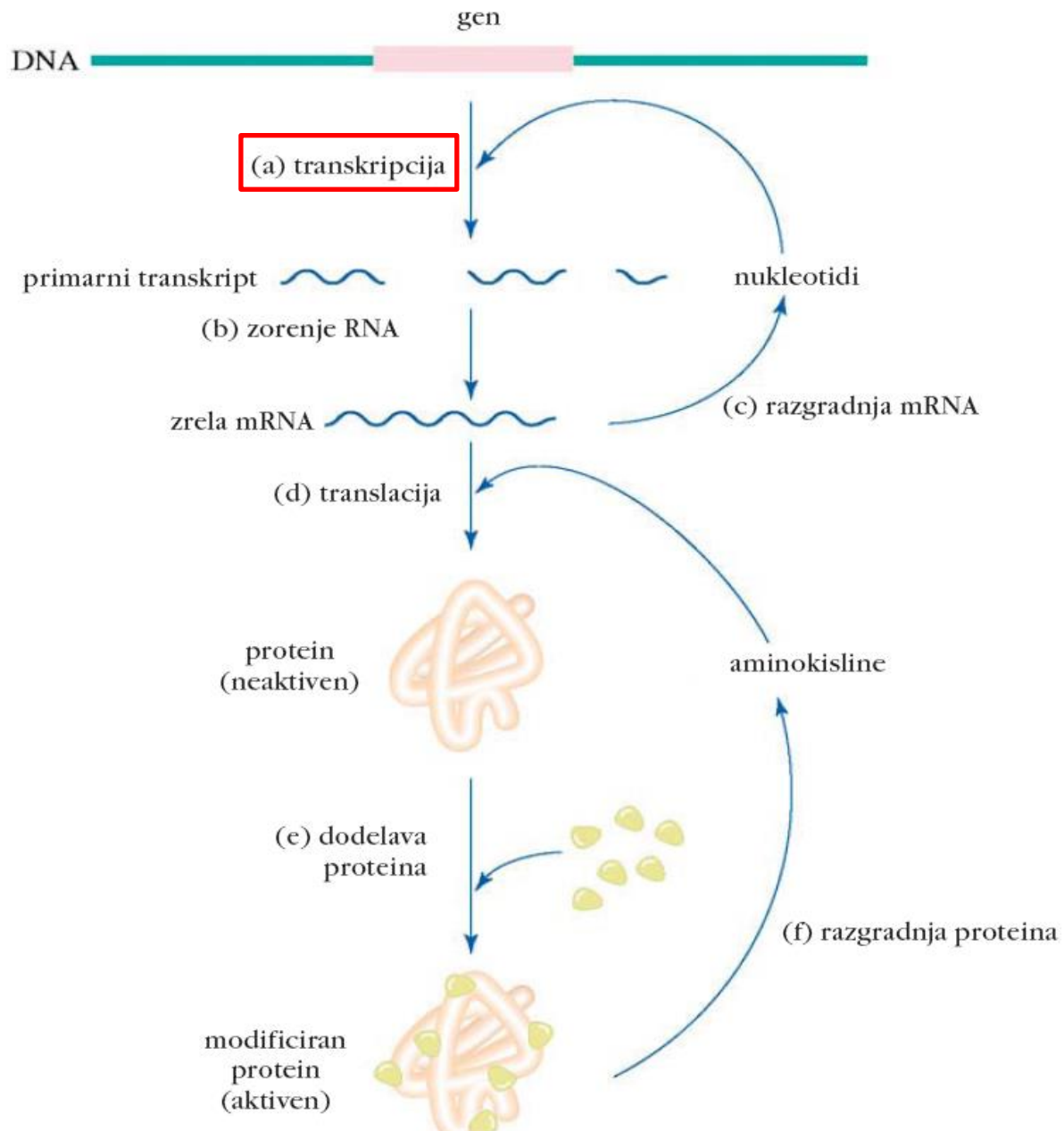


Razgradnja proteinov - proteasom



Upravljanje sinteze proteinov in izražanja genov

Izražanje genov je lahko uravnavaano na več različnih stopnjah (od a do f).

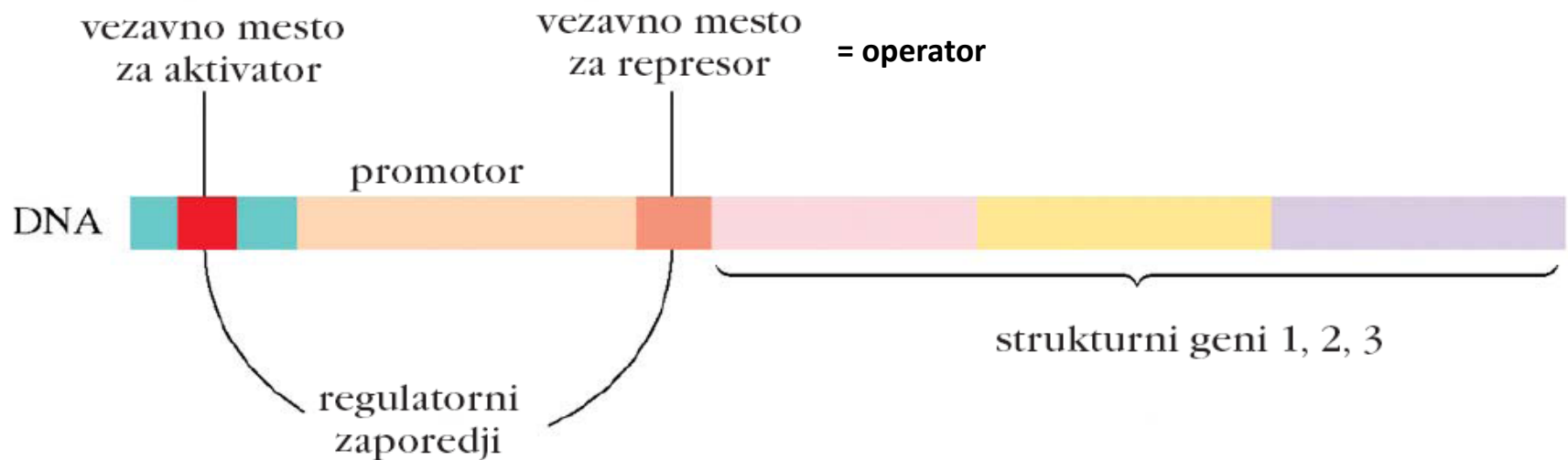


Uravnavanje genov

- **Vsi proteini v celici niso potrebni ves čas.** Izražanje genov je **prilagojeno vrsti celice** in trenutnim **pogojem**.
- Izražanje genov je največkrat omejeno s številom sintetiziranih molekul mRNA, saj je hitrost sinteze proteinov povezana s koncentracijo njihove mRNA.
- Dva načina izražanja genov:
 - Izražanje **konstitutivnih** genov (**hišni geni**):
 - raven proteina je **konstantna**,
 - pomembni za splošno vzdrževanje celice in osrednji metabolizem.
 - Izražanje **reguliranih** genov:
 - **Inducibilni geni:** izražanje je aktivirano (**inducirano**) in koncentracija produkta naraste.
 - **Represibilni geni:** izražanje je deaktivirano (**reprimirano**) in koncentracija produkta pade.
 - Uravnavanje poteka s pomočjo **regulatornih proteinov, hormonov in metabolitov**.
- Tri vrste proteinov uravnavajo iniciacijo transkripcije z RNA-polimerazo:
 - **Represorji**
 - **Aktivatorji**
 - **Specifičnostni dejavniki** (σ -podenota v *E. coli* in TATA-vezani protein v evkariontih)

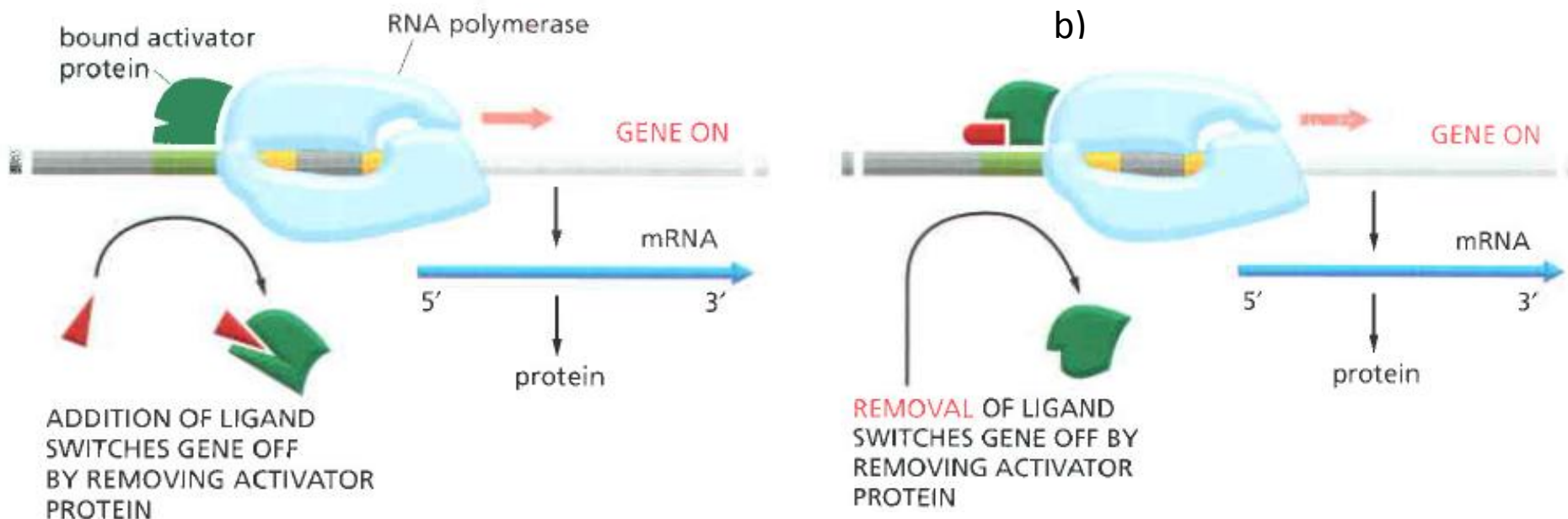
Urnvananje genov

- **Operon** (prokarionti): odsek na kromosomu, ki nosi zapis za proteine, ki so vključeni v isto metabolično pot in so uravnnavani istočasno.
- Sestavljajo ga:
 - **strukturni geni,**
 - **promotorska regija,**
 - **vezavno mesto za regulatorne proteine: - aktivatorje in
- represorje (operator).**



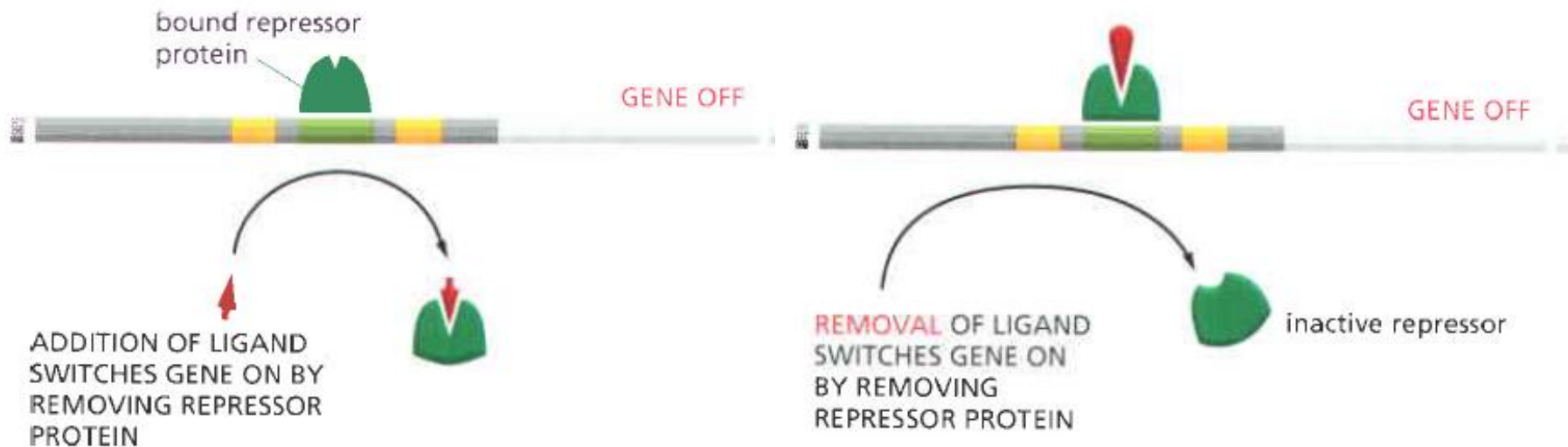
Načini uravnavanja genov- pozitivna regulacija

- **Aktivnost RNA-polimeraze določajo regulatorni proteini**, ki se vežejo na DNA. **Aktivatorji** se vežejo bližino promotorske regije in pomagajo pri vezavi RNA-polimeraze na promotor, kar poveča hitrost transkripcije.
- Na aktivator se veže **regulatorna molekula (proteini, hormoni in metaboliti)**, ki povzroči
 - a) disociacijo aktivatorja z DNA ali
 - b) močno vezavo aktivatorja na DNA.



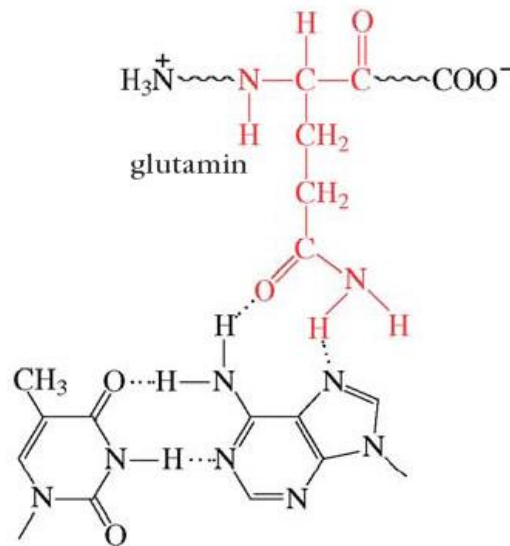
Načini uravnavanja genov - negativna regulacija

- Aktivnost RNA-polimeraze določajo **regulatorni proteini**, ki se vežejo na DNA. **Represorji** se vežejo znotraj promotorske regije in preprečujejo RNA-polimerazi vezavo na promotor kar **inhibira** transkripcijo.
- Na represor se veže **regulatorna molekula (proteini, hormoni in metaboliti)**, ki povzroči
 - a) disociacijo represorja z DNA ali
 - b) močno vezavo represorja na DNA.

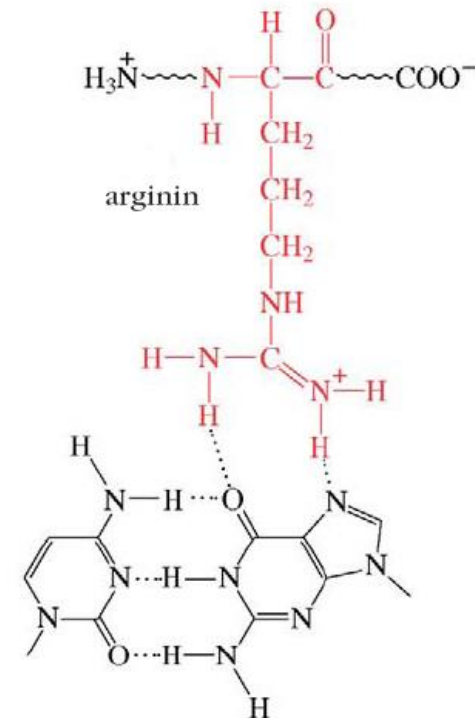


Regulatorni proteini

- Z vezavnimi domenami **prepoznajo** in se **vežejo** na **specifična zaporedja v DNA**.
- Med dušikovimi bazami nukleotidov in stranskimi verigami aminokislinskih ostankov pride do interakcij.
- Regulatorne proteine razvrščamo glede na prisotnost **značilnih strukturnih motivov** v vezavnih domenah:
 - Motiv vijačnica-obrat-vijačnica
 - Motiv cinkovega prsta
 - Motiv levcinske zadrge.



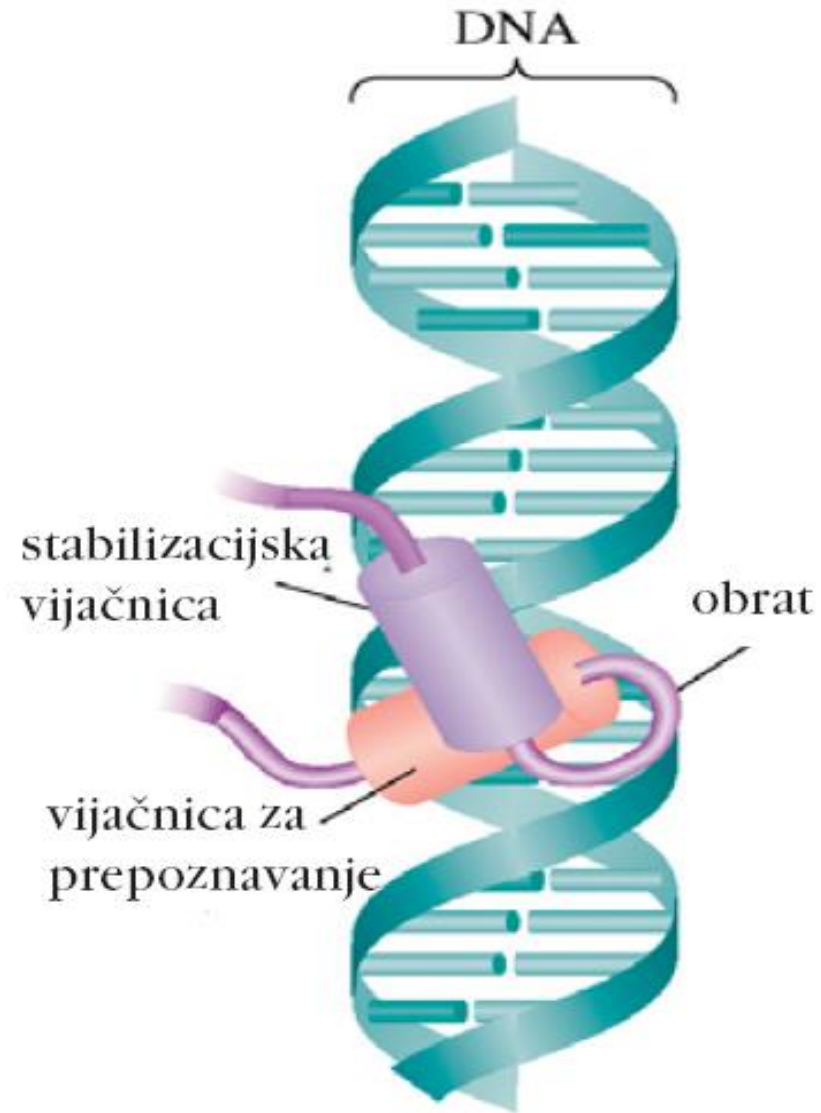
(a) timin : adenin



(b) citozin : gvanin

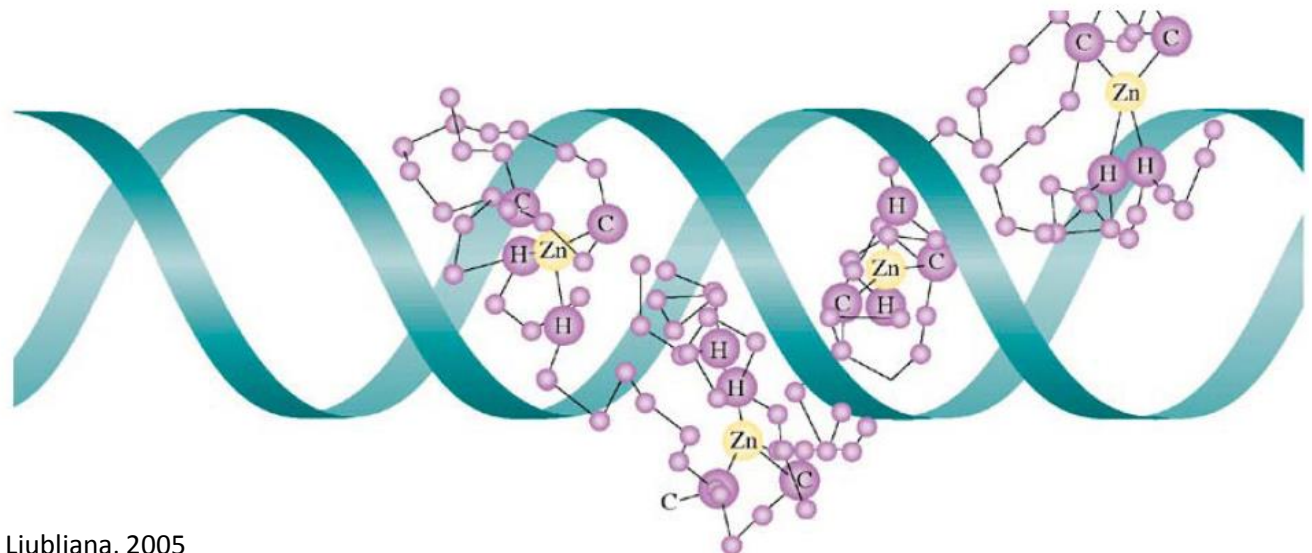
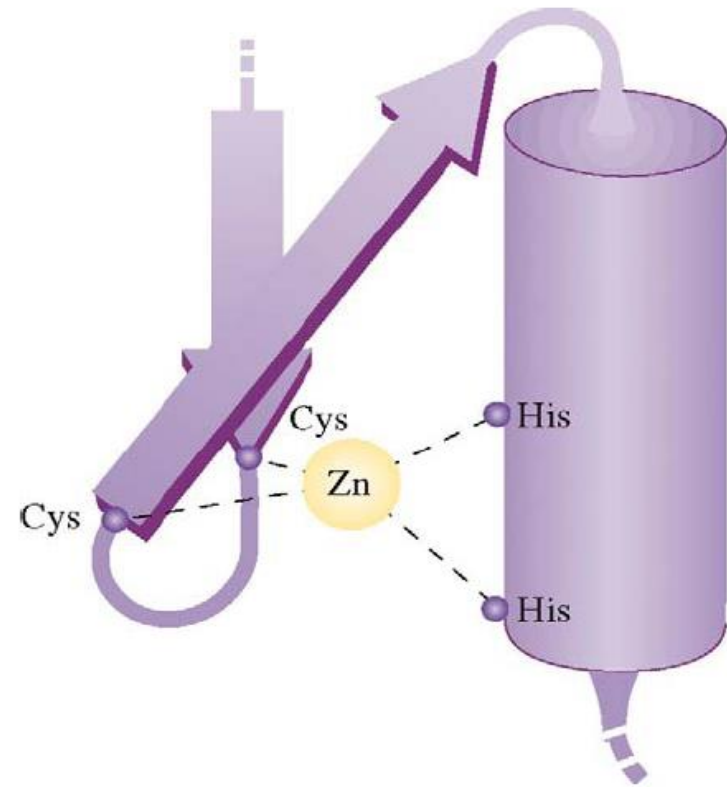
Motiv vijačnica-obrat-vijačnica

- Pri prokariontskih regulatornih proteinih je to najpogostejša domena, ki se veže na DNA.
- **Dve** kratki α -vijačnici (7-9 aminokislinskih ostankov) sta **povezani z β -obratom**, ki vsebuje glicinski ostanek.
- Ena od α -vijačnic se povsem uleže v **veliki žleb** DNA in s tem blokira transkripcijo.



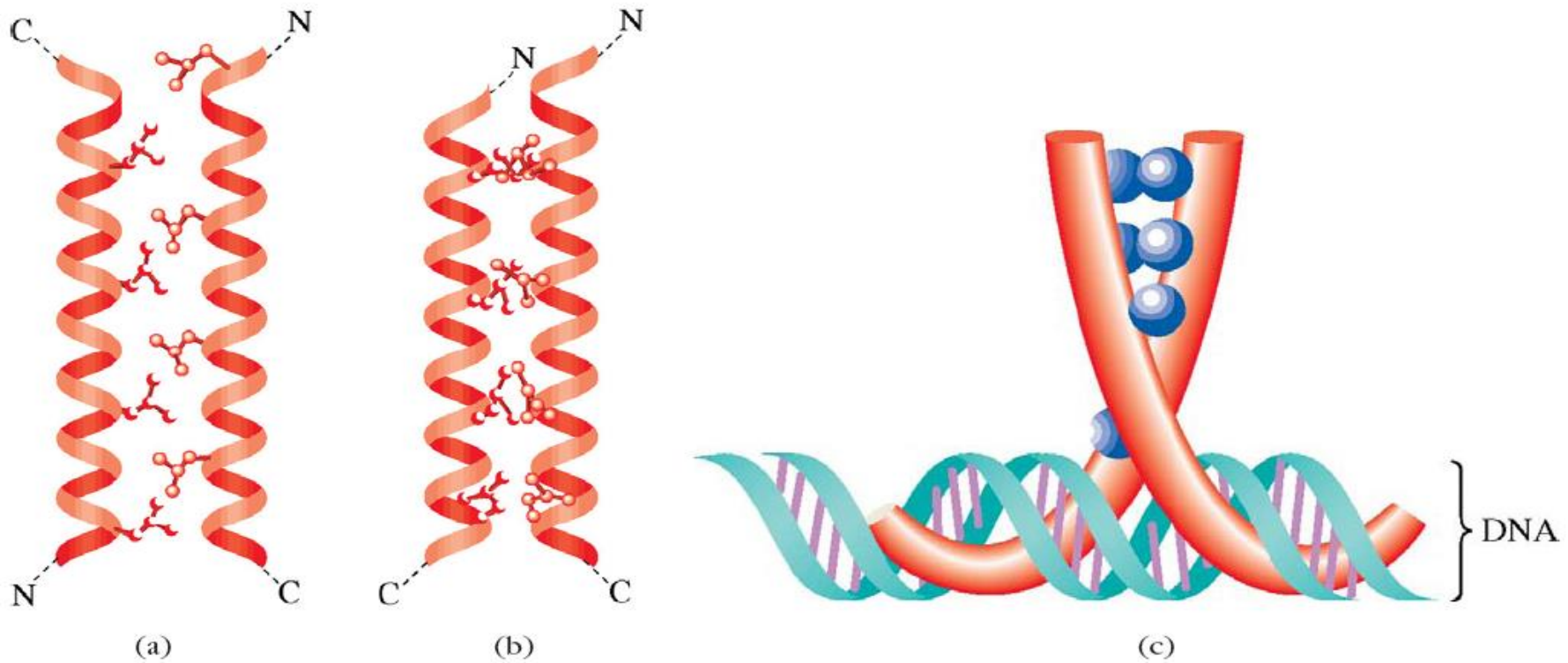
Motiv cinkovega prsta

- Prisoten pri evkariontih.
- Zn^{2+} se koordinativno poveže na 4 aminokislinske ostanke v proteinu.
- Proteini se verjetno vežejo v **veliki žleb** DNA in se ovijejo okrog osi dvojne vijačnice DNA.



Motiv levcinske zadrge

Proteini z levcinsko zadrgo **stopajo v interakcijo z DNA** (veliki žleb) in z drugimi regulatornimi **proteini**.



Upravljanje izražanja genov – operon *lac*

- Operon: V strukturnih genih zapis za tri encime, ki so potrebni pri metabolizmu **laktoze**.
- V odsotnosti laktoze je operon *lac* reprimiran.
- Ob prisotnosti laktoze se je del pretvori v **alolaktozo**, ki se veže na *lac*-repressor in s tem povzroči, da repressor disociira z operatorskega mesta.
- Operon *lac* pa uravnava tudi koncentracija glukoze v gojišču preko regulatornega proteina – **katabolitnega aktivatorskega proteina (CAP)**.

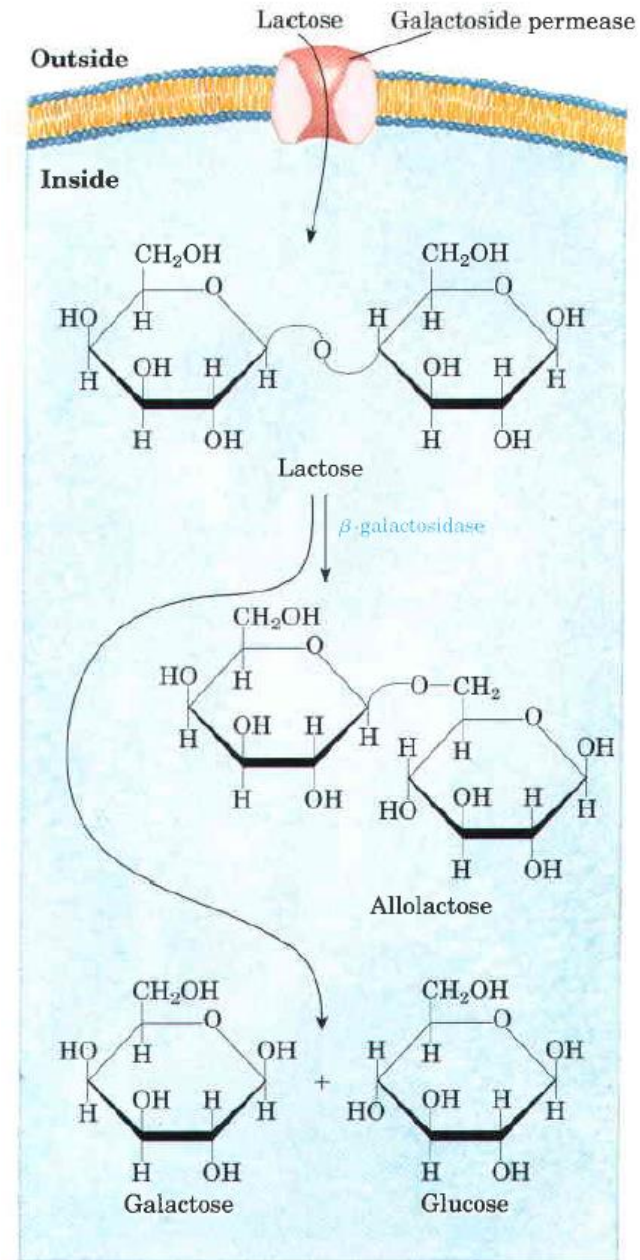
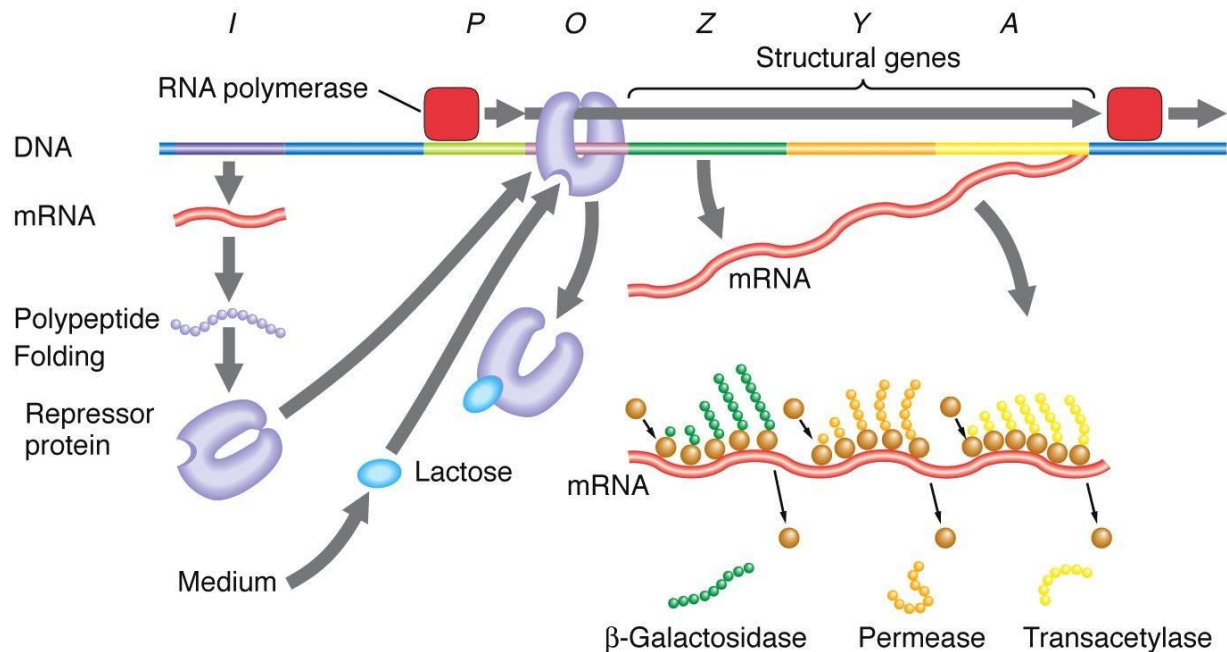


Fig. 28-6, Lehninger, 5th ed., 2008

Urnvananje izražanja genov – operon *trp*

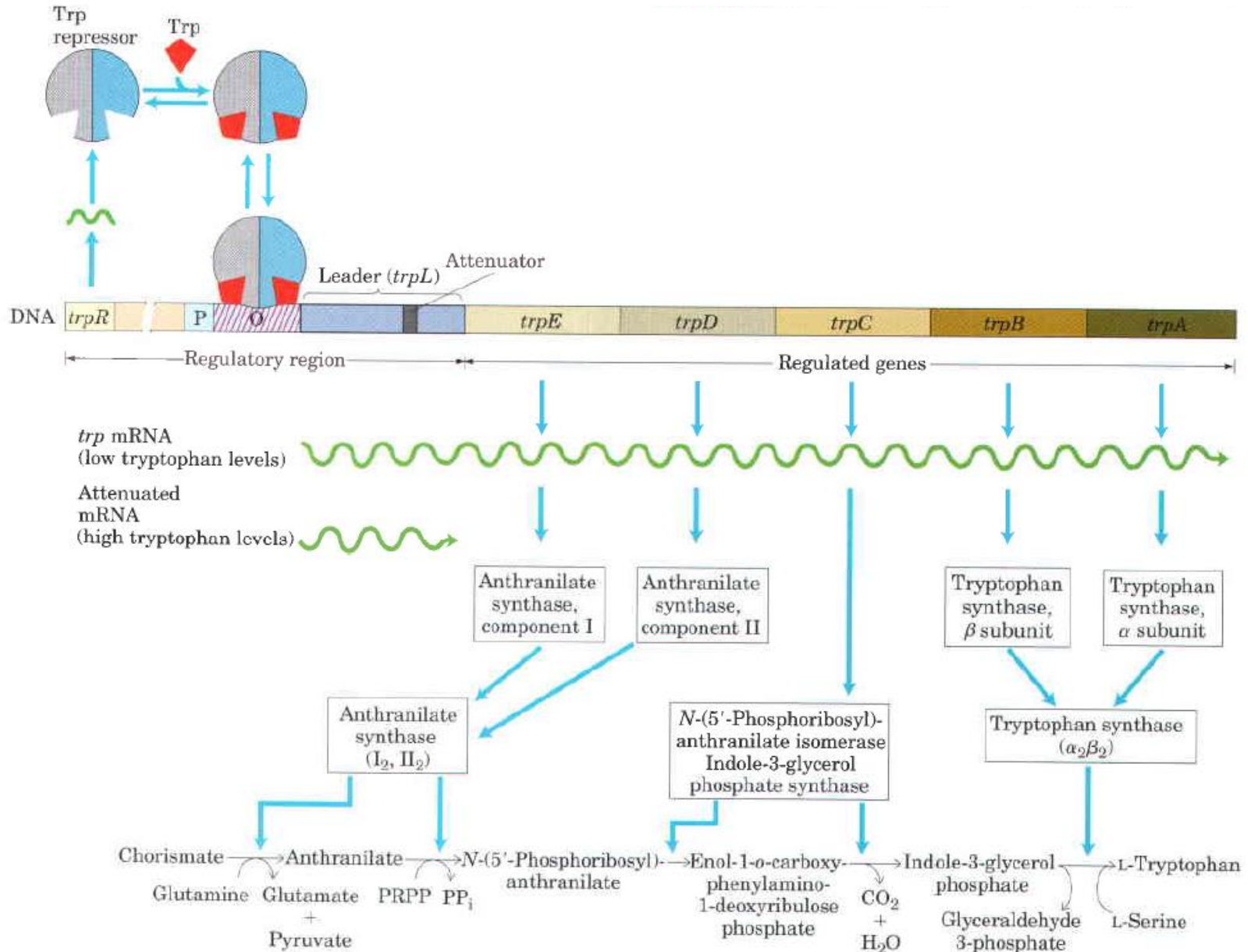
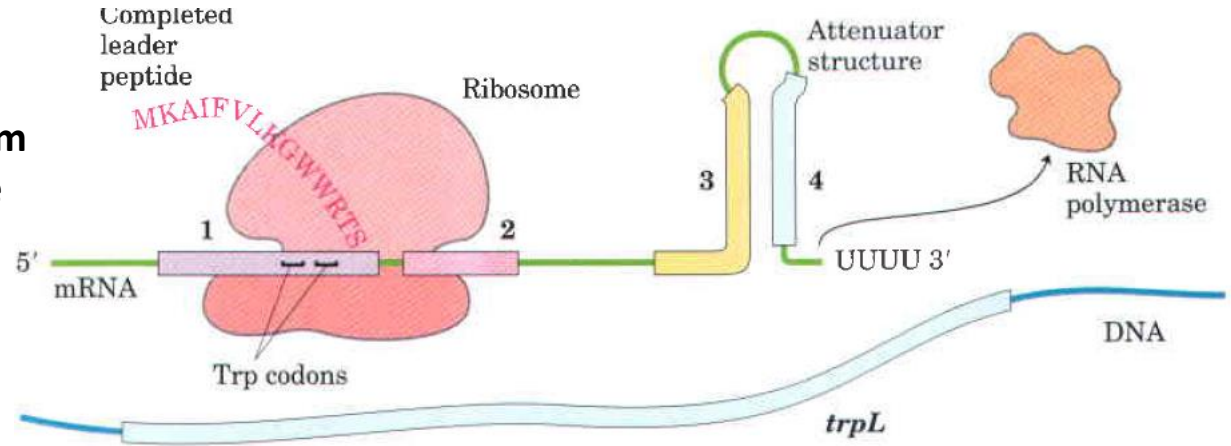


Fig. 28-19, Lehninger, 5th ed., 2008

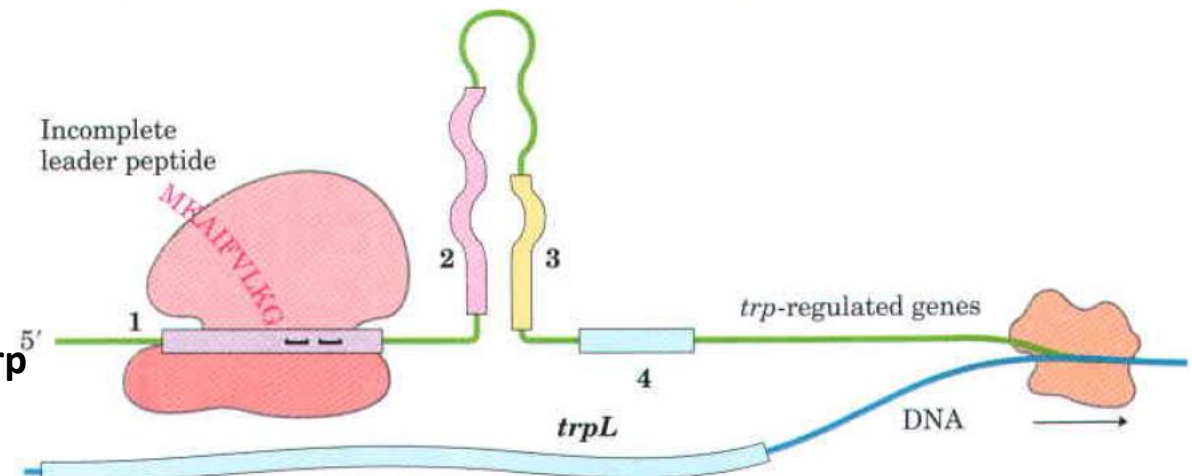
Mehanizam atenuacije



Dovolj Trp – atenuacija (prekinjena sinteza mRNA)

When tryptophan levels are high, the ribosome quickly translates sequence 1 (open reading frame encoding leader peptide) and blocks sequence 2 before sequence 3 is transcribed. Continued transcription leads to attenuation at the terminator-like attenuator structure formed by sequences 3 and 4.

Premalo Trp – sinteza mRNA



When tryptophan levels are low, the ribosome pauses at the Trp codons in sequence 1. Formation of the paired structure between sequences 2 and 3 prevents attenuation, because sequence 3 is no longer available to form the attenuator structure with sequence 4. The 2:3 structure, unlike the 3:4 attenuator, does not prevent transcription.

(h)

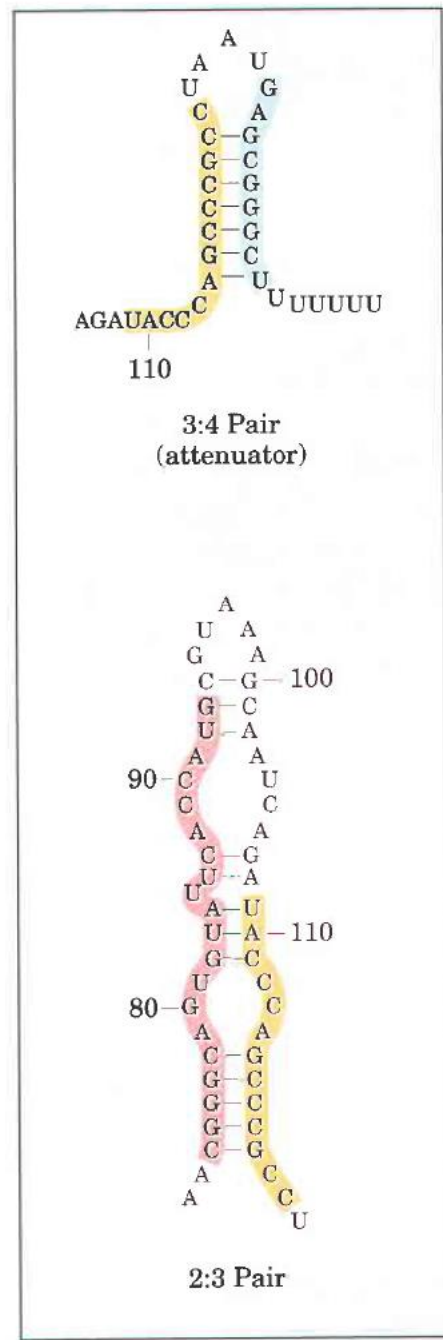


Fig. 28-21, Lehninger, 5th ed., 200

Primeri regulatornih mehanizmov

regulacijski sistem	regulatorni protein in strukturni motiv	signalna molekula	delovanje
operon <i>lac</i> (<i>E. coli</i>)	tetramer identičnih podenot, vijačnica-obrat-vijačnica	alolaktoza	negativno; signalna molekula povzroči disociacijo regulatornega proteina
operon <i>lac</i> (<i>E. coli</i>)	katabolični aktivatorski protein, dimer identičnih podenot, vijačnica-obrat-vijačnica	glukoza in cAMP	prisotnost glukoze reprimira <i>lac</i> -gene, odsotnost glukoze jih stimulira
operon <i>trp</i> (<i>E. coli</i>)	dimer identičnih podenot, vijačnica-obrat-vijačnica	triptofan	negativno; signalna molekula se veže na represor in povzroči njegovo vezavo na operator; inhibira sintezo triptofana
odzivni element za steroidne hormone (evkarionti)	receptorski protein za glukokortikoide; dimer, dva cinkova prsta	glukokorti kosteroid	regulacija metabolizma ogljikovih hidratov
odzivni element za kovine (evkarionti)	MTF-1 (ribe); šest cinkovih prstov	ioni težkih kovin, Zn^{2+} , Hg^{2+} itd.	sinteza metalotioneina, proteina, ki veže ione težkih kovin v kompleks