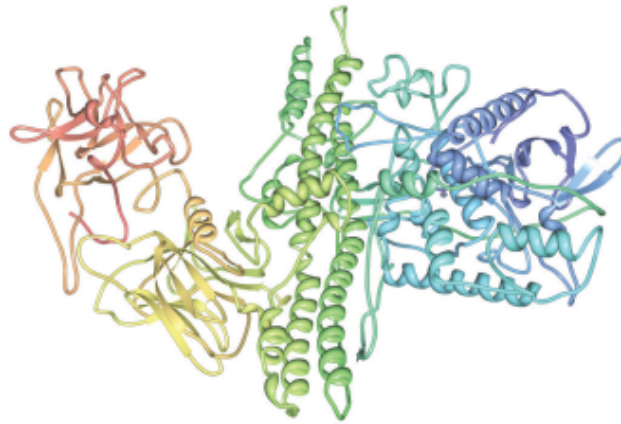


## Opgave 1 Botulinum neurotoksin

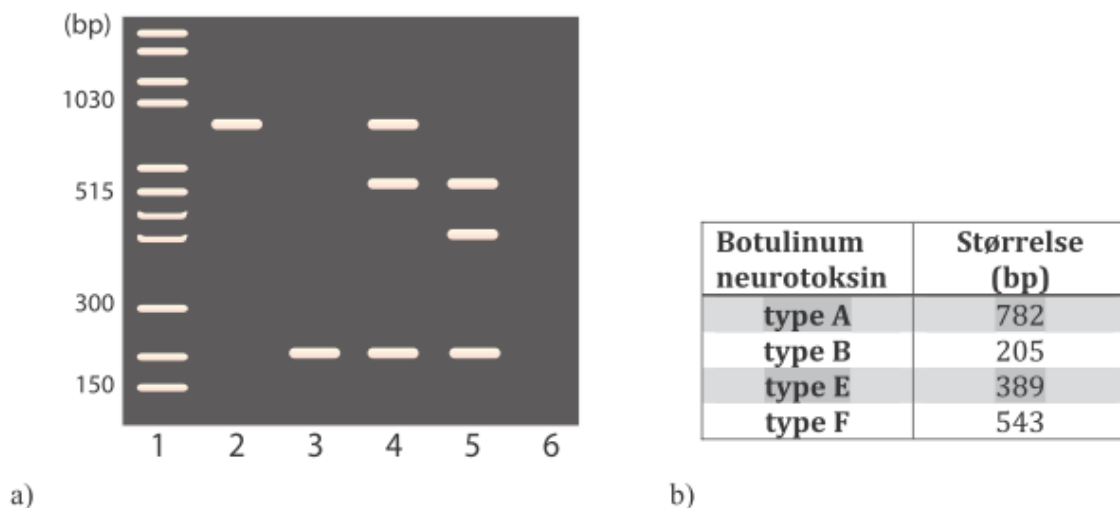
Bakterien *Clostridium botulinum* kan forekomme i fødevarer og under anaerobe forhold danne et protein, der kaldes botulinum neurotoksin. Proteinets rumlige struktur kan ses på figur 1.



Figur 1. Rumlig struktur af et botulinum neurotoksin.

1. Beskriv de sekundære proteinstrukturer, der findes i botulinum neurotoksin, og markér eksempler på disse på bilag 1.

*C. Botulinum* kan danne flere forskellige botulinum neurotoksiner, og bakterien kan derfor have flere forskellige gener, der koder for botulinum neurotoksin. For at identificere hvilke toksingener en kultur af *C. botulinum* indeholder, har man ekstraheret DNA fra kulturen, og opformeret det ved hjælp af PCR. Man har brugt primere, der er specifikke for generne for botulinum neurotoksin type A, B, E og F. Efter PCR har man adskilt DNA-stykkerne ved hjælp af gelelektroforese. Resultatet er vist i figur 2a, og størrelsen af DNA-stykker fra udvalgte botulinum neurotoksin-gener er vist i figur 2b.

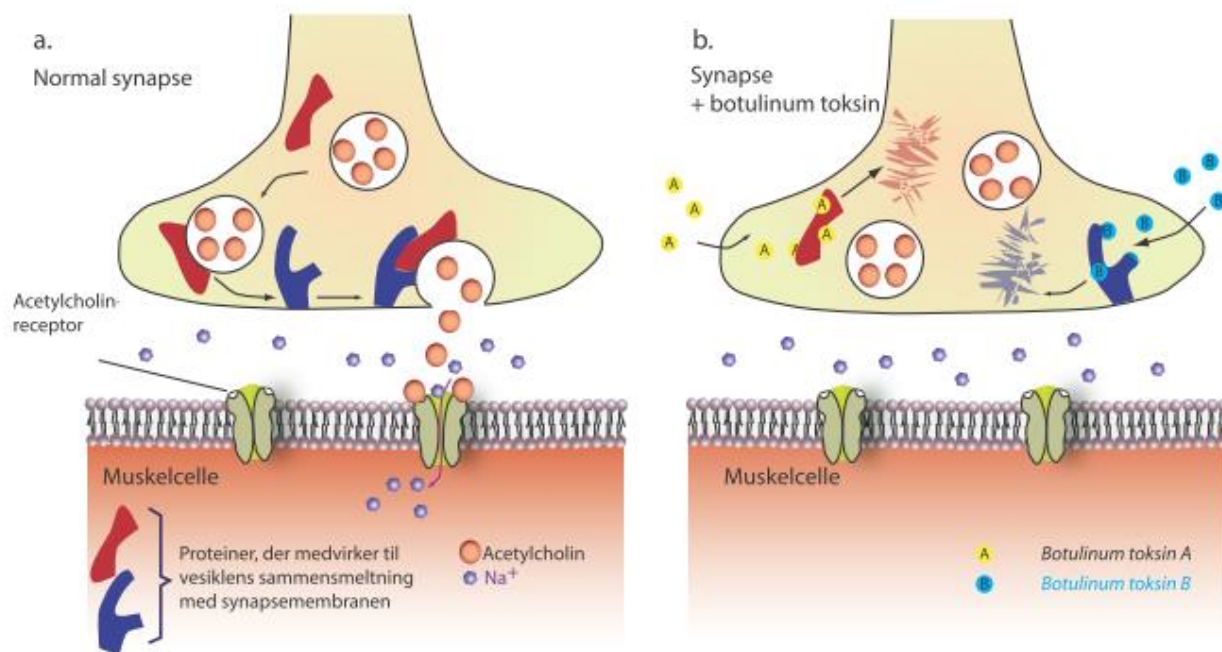


Figur 2. a) Resultat af elektroforese af opformede DNA-stykker fra gener for botulinum neurotoksin. Bane 1: Størrelsesmarkør, bane 2-5: DNA fra forskellige *C. botulinum*-bakterier, bane 6: Negativ kontrol. b) Størrelse af opformede DNA-stykker fra botulinum neurotoksin-gener.

2. Analysér resultaterne vist på gelen i figur 2a.

I kroppen virker botulinum neurotoksin som en nervegift, idet stoffet påvirker kommunikationen mellem neuroner og muskelceller. Tilstanden kaldes botulisme eller pølseforgiftning, og den er i værste fald dødelig.

Figur 3a viser, hvordan den normale kommunikation mellem neuroner og muskelceller foregår, og figur 3b viser, hvordan to forskellige typer botulinum neurotoksin påvirker denne kommunikation.



Figur 3. a) Normal udskillelse af transmitterstoffet acetylcholin i en neuromuskulær synapse. b) Effekt af forskellige botulinum neurotoksiner på udskillelse af acetylcholin i en neuromuskulær synapse.

3. Forklar, hvorfor botulinum neurotoksin uanset type kan være dødeligt giftigt.

Inddrag figur 3.

Botulinum neurotoksin kan i ekstremt fortyndede koncentrationer anvendes til at lindre følgerne af neurologiske sygdomme, og det kan også bruges som anti-rynkemiddel. Man ønsker derfor at oprense stoffet fra kulturer af *C. botulinum* så effektivt som muligt.

Man kan blandt andet oprense botulinum neurotoksin ved søjlekromatografi. Ved metoden benyttes en søjle lavet af et materiale, der er negativt ladet på overfladen. Før brug skylles søjlen igennem med en opløsning af natriumchlorid. Herefter lader man en opløsning af knuste *C. botulinum* celler løbe gennem søjlen. Botulinum neurotoksin binder sig til søjlen, mens urenheder fortsætter igennem. Ved proceduren indstiller følgende ligevægt sig:



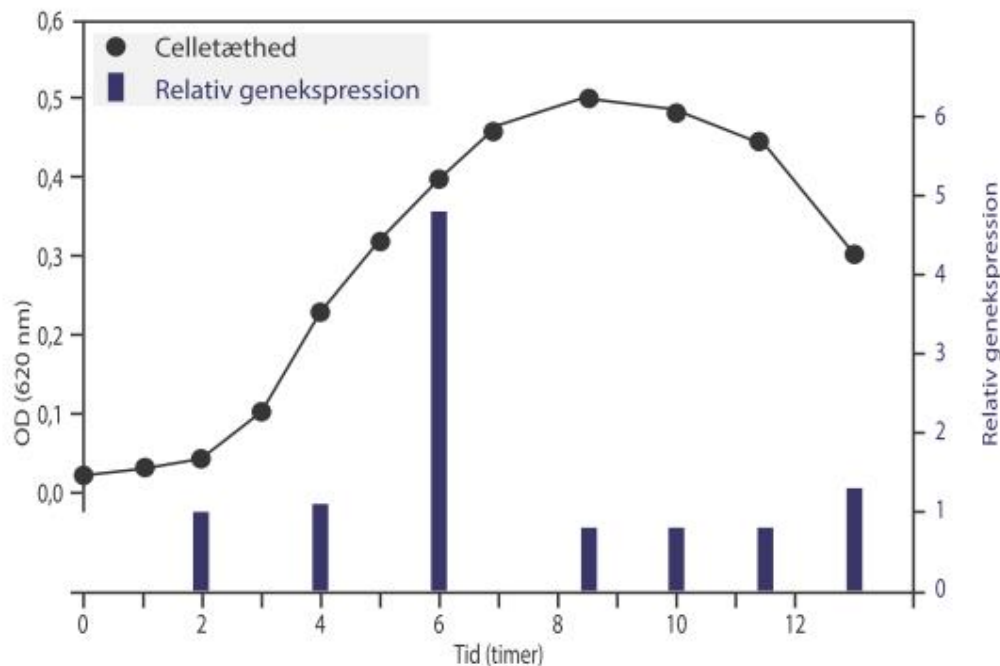
4. Foreslå en metode til at frigive botulinum neurotoksin fra søjlen og dermed oprense det.

Inddrag den viste ligevægt (1).

Opgaven fortsættes næste side

For at finde det optimale tidspunkt at oprense botulinum neurotoksin type B fra en kultur af *C. botulinum* kan man undersøge ekspressionen af genet på forskellige tidspunkter i kulturens vækst. Ekspressionen af genet for botulinum neurotoksin type B måles som mængden af dannede mRNA-molekyler.

Resultaterne fra et forsøg er vist i *figur 4*, hvor celletæthed af *C. botulinum* er målt som absorbans ved 620 nm ( $OD_{620}$ ) i et spektrofotometer. Der antages at være ligefrem proportionalitet mellem celletæthed og absorbans, idet kulturen ikke er for tæt. Værdier for genekspression er omregnet til relative tal.



Figur 4. Celletæthed målt som absorbans ved 620 nm ( $OD_{620}$ ) for kultur af *C. botulinum* som funktion af tid (prikker). Relativ genekspression for botulinum neurotoksin type B som funktion af tid (søjler).

5. Analysér resultaterne vist i *figur 4*, og vurder, hvornår det er mest optimalt at oprense botulinum neurotoksin type B fra kulturen.