دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال نوزدهم، شماره ۵، صفحه ۸۳۸– ۸۳۲ (آذر و دی ۱۳۹۵)

Iran South Med J 2016; 19(5): 832-838

بررسی برهم‌کنش سوربیتول و لیزوزیم به‌وسیله روش رزونانس مغناطیسی هسته (Nuclear Magnetic Resonance): از دینامیک تا ساختار

محمدرضا رمضانی [۱]، حسین نادری‌منش [۱*]، مجید عرفانی‌مقدم [۱]

[۱] گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۹۴/۲/۱۹- پذیرش مقاله: ۹۴/۹/۱۴)

چکیده

زمینه: مطالعه دینامیک مولکولی پروتئین‌ها بر اساس حرکت‌های درون مولکولی برای درک مکانیسم عملکرد پروتئین ضروری است. حرکت‌های درون مولکولی در پروتئین‌ها، نقش بسیار مهمی در فرآیند تاخوردن و همچنین عملکرد آنزیم‌ها بازی می‌کنند. اسمولیت‌ها مولکول‌های آلی هستند که توسط همه موجودات ساخته می‌شوند و تحت شرایط تنش به حفظ پایداری و فعالیت مولکول‌های زیستی کمک می‌کنند.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش اثر سوربیتول به عنوان افزودنی (اسمولیت) تعدیل کننده بر آنزیم لیزوزیم سفیده تخم مرغ به‌وسیله طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته تعویض هیدروژن – دوتریوم مطالعه شد. پس از حل کردن آنزیم در محلول حاوی دوتریوم، طیف‌های متعددی در حضور و عدم حضور سوربیتول در بازه زمانی ۴۰ ساعت ثبت شد. طیف‌های دو بعدی TOCSY با اختلاط زمانی ۱۲۰ میلی‌ثانیه و زمان آسایش ۲ ثانیه ثبت شد. آزمایش در دمای ۳۵ درجه و pH برابر با ۳/۵ انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند که اثر سوربیتول در نقاط مختلفی از ساختار توزیع شده است و بیشتر باقیمانده‌هایی که تحت تأثیر سوربیتول قرار گرفتند در معرض حلال قرار داشتند. محاسبه ثابت سرعت تعویض نشان داد حضور سوربیتول سبب کند شدن حرکت در زنجیره‌های جانبی باقیمانده‌هایی شد که در معرض حلال قرار داشتند. نتایج این تحقیق همچنین نشان داد حضور سوربیتول سرعت تعویض پروتون را کاهش داده است.

نتیجه‌گیری: جابه‌جایی‌های شیمیایی در حضور سوربیتول تغییر نکردند در نتیجه می‌توان گفت سوربیتول بدون تغییر ساختار سه بعدی آنزیم و با کاهش پویایی آن، سبب حفظ پایداری ساختار در شرایط تنش می‌گردد.

واژگان کلیدی: رزونانس مغناطیسی هسته، تعویض هیدروژن- دوتریوم، اسمولیت سوربیتول، لیزوزیم سفیده تخم مرغ

* تهران، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

E-mail:Naderman@modares.ac.ir

مقدمه

حرکات پروتئین نقش مهمی در تاخوردن، ثبات و عملکرد آن دارد. حرکات درون ساختاری در پروتئین‌ها دارای دامنه گسترده و بازه‌های زمانی متنوعی هستند (۱ و ۲). نتایج تحقیقات گذشته نشان داده این حرکات نقش کلیدی در عملکرد دارند. به عنوان مثال در روند کاتالیز آنزیمی، مدهای حرکتی آهسته و سریع به ترتیب در اتصال و کاتالیز از اهمیت بالایی برخوردارند (۳). در اغلب موارد اصلاحات اعمال شده برای افزایش پایداری پروتئین، منجر به کاهش انعطاف‌پذیری و عملکرد می‌گردد. بنابراین تحقیقات بیشتری برای درک تداخل بین ثبات، انعطاف‌پذیری و عملکرد در مهندسی پروتئین و طراحی آن لازم است. سلول‌های زنده از اسمولیت‌ها برای افزایش پایداری پروتئین‌های خود با حفظ تعادل بین انعطاف‌پذیری و عملکرد، و بدون ایجاد هیچ گونه اثرات منفی بر روی آنها استفاده می‌کنند (۴). دو نوع اسمولیت سازگار و ناسازگار وجود دارد که سبب پایداری و ناپایداری پروتئین‌ها می‌شوند (۵).

به طور کلی به نظر می‌رسد نحوه اثر اسمولیت‌ها برای همه پروتئین‌ها مشترک است (۳). اسمولیت‌های سازگار اثر پایدارکنندگی خود را از طریق مکانیسم‌هایی مانند هیدراتاسیون ترجیحی و کاهش انعطاف‌پذیری اعمال می‌کنند (۲). بت و تیماشف (Bath & Timasheff) نشان دادند هیدراتاسیون ترجیحی با بالا بردن کشش سطحی آب و یا با افزایش آب‌گریزی باقی مانده‌های سطحی صورت می‌گیرد. کاهش انعطاف‌پذیری یکی از برجسته‌ترین اثرات اسمولیت‌هاست. همچنین تحقیقات قبلی نشان داده‌اند اسمولیت‌ها نوسانات ساختاری در پروتئین را کاهش می‌دهند (۶).

سوربیتول نوعی پلی‌ال بوده و از اسمولیت‌های سازگار است. تحقیقات نشان داده سوربیتول انعطاف‌پذیری ساختار را کاهش داده و تعادل بین حالت دناتوره و طبیعی را به سمت ساختار طبیعی سوق می‌دهد. در حالی که تأثیری بر المان‌های ساختاری دوم و سوم ندارد (۲ و ۷). در این پژوهش از روش رزونانس مغناطیسی هسته برای بررسی سرعت تعویض هیدروژن- دوتریوم در حضور سوربیتول استفاده شد (۸ و ۹). در این روش ثابت سرعت تعویض (kex) هیدروژن‌های آمیدی زنجیره اصلی تعیین شد. kex تحت تأثیر پیوند هیدروژنی و سطح در دسترس می‌باشد. کاهش ثابت سرعت تعویض می‌تواند منجر به کاهش انعطاف‌پذیری مولکول گردد، در نتیجه از این پارامتر به‌صورت غیرمستقیم برای ارزیابی انعطاف‌پذیری پروتئین می‌توان استفاده نمود. محدودیت این روش ناتوانی در شناسایی تعویض‌های سریع در نواحی فوق‌العاده انعطاف‌پذیر است. در بیشتر موارد و به‌خصوص در مورد آنزیم‌ها کاهش انعطاف‌پذیری منجر به کاهش فعالیت آنزیم می‌گردد. در این بررسی نحوه توزیع اثر سوربیتول بر انعطاف‌پذیری نواحی مختلف پروتئین نشان داده شده است. به نظر می‌رسد نواحی که تحت تأثیر سوربیتول قرار می‌گیرند نقش کلیدی در حفظ انعطاف‌پذیری و دینامیک آنزیم دارند.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی نمونه جهت طیف‌گیری

آنزیم لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ (EC۳,۲,۱,۱۷) و سوربیتول از شرکت مرک خریداری و در دمای ۴ درجه نگهداری شد. برای حذف ناخالصی از روش دیالیز با کیسه‌های ۳ کیلودالتونی استفاده شد. نمونه پس از دیالیز لیوفلیزه و در دمای ۴ درجه نگهداری شد. استات سدیم و اسید استیک، از شرکت مجللی خریداری شد. آنزیم لیزوزیم سفیده تخم مرغ (۳ میلی‌مولار) در محلول بافر

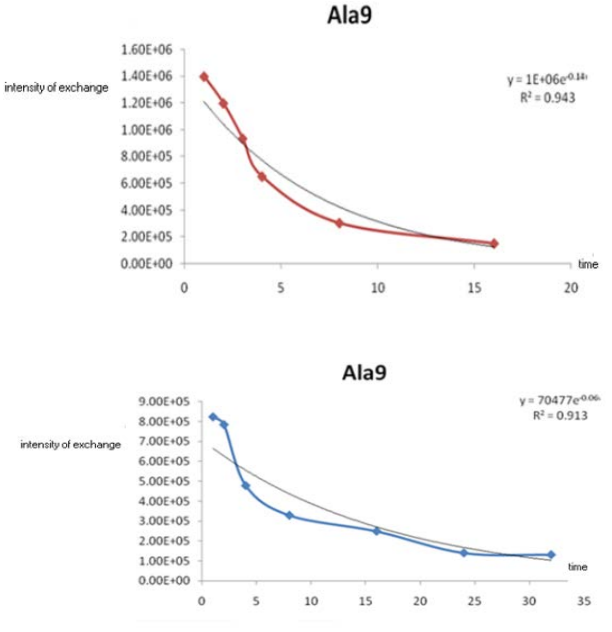
استات (۱۰ میلی‌مولار) حاوی سوربیتول (۲۵۰ میلی‌مولار) و بافر استات بدون سوربیتول حل شد. به منظور انجام آزمایش تعویض، هیدروژن دوتریوم، D_2O به بافر استات اضافه شد. pH محلول آنزیم ۳/۵ و طیف‌گیری در دمای ۳۵ درجه انجام شد. حجم نهایی ۵۰۰ میکرولیتر بود.

طیف‌گیری

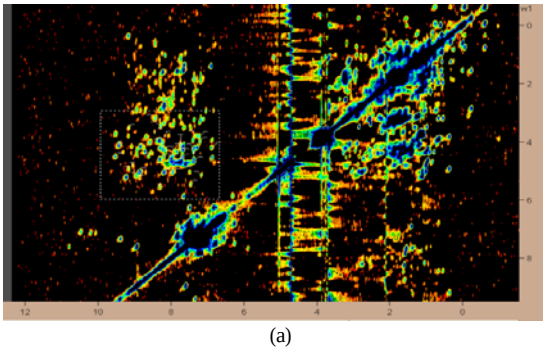
طیف‌گیری رزونانس مغناطیسی هسته به‌وسیله دستگاه Bruker 500 MHz انجام شد. پس از افزودن D_2O، هر دو محلول آنزیمی (دارای سوربیتول و فاقد سوربیتول) به سرعت به دستگاه منتقل شدند. پس از آن طیف‌گیری در دوره زمانی ۴۰ ساعت انجام شد. در این بازه زمانی ۷ نقطه- زمان به دست آمد که ثابت‌های سرعت تعویض از آن محاسبه شدند. طیف دوبعدی TOCSY با زمان اختلاط ۱۲۰ میلی‌ثانیه و زمان آسایش ۲ ثانیه ثبت شد. پیک مربوط به حلال از طریق فرآیند پیش اشباع فرونشانده شد.

یافته‌ها

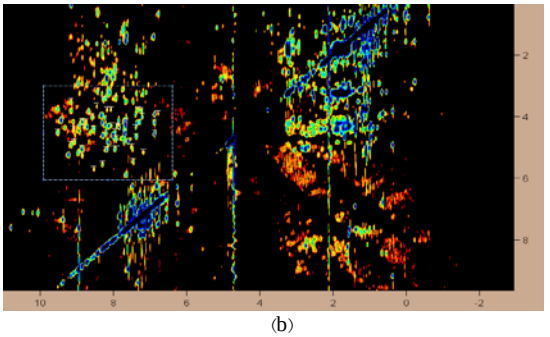
تعویض هیدروژن- دوتریوم به عنوان تابعی از زمان و با توجه به روند کاهشی شدت پیک‌های اسیدهای آمینه تعیین شد. یافتن نقطه پیک‌ها و تعیین مساحت آنها در طیف‌های TOCSY به‌وسیله نرم‌افزار SPARKY انجام شد. شکل ۲ پنجره طیف TOCSY در منطقه آمین آلفا را نشان می‌دهد. درجه تعویض هیدروژن‌های آمید به عنوان تابعی از زمان مورد بررسی قرار گرفت. شدت پیک‌های آمین آلفا از طریق محاسبه انتگرال پیک‌های مربوطه با شعاع ۳۰ هرتز به‌دست آمد(جدول ۱ و ۲). شکل ۱ نحوه محاسبه ثابت سرعت تعویض از طریق برازش یک معادله درجه اول در نمودار تغییرات حجم پیک نسبت به زمان را نشان می‌دهد. برای برازش از یک تابع نمایی استفاده شد. ثابت تعویض در واقع ضریب زمان در معادله خطی حاصل از برازش است.



شکل ۱) تصویر از بخش آمید آلفا قبل (قرمز) و بعد (آبی) از افزودن سوربیتول برای رزیدو آلانین ۹.

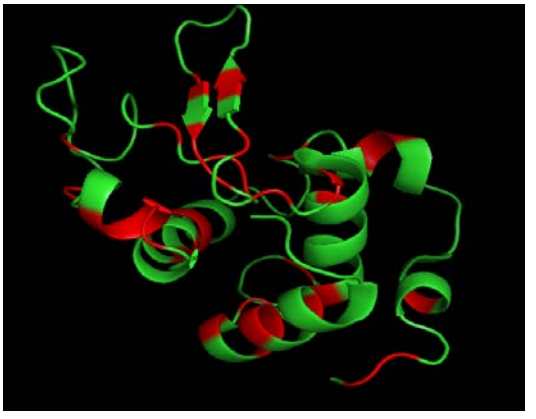


(a)



(b)

شکل ۲) نمایی از جابه‌جایی شیمیایی در منطقه آمین آلفا در عدم حضور(a) و حضور (b) سوربیتول.



شکل ۳) برخی از نواحی آنزیم لیزوزیم که تحت تأثیر سوربیتول قرار می‌گیرند.

سرعت تعویض هیدروژن در انواع رزیدوها به‌دلیل قرارگیری آن‌ها در جایگاه‌های مختلف و ایجاد پیوند هیدروژنی متفاوت است (۱۰). برای سرعت تعویض هیدروژن ۳ حالت وجود دارد: حالت‌های سریع، متوسط و کند. حالت تعویض سریع مربوط به رزیدوهایی است که در طیف طبیعی پروتئین وجود دارند اما در همان مرحله اول از ثبت طیف، از منطقه آمین آلفا حذف می‌شوند و نمی‌توان آنها را ردیابی کرد. حالت کند مربوط به رزیدوهایی است که در داخل ساختار و یا در پیوند هیدروژنی قرار گرفته‌اند، این رزیدوها در برابر تعویض مقاومت نشان می‌دهند و در نتیجه هیچ ثابت تعویض مشخصی ندارند در واقع، می‌توان گفت که آنها در منطقه حفاظت شده از پروتئین قرار گرفته‌اند (۱۱ و ۱۲). رزیدوهای دارای سرعت تعویض متوسط در نواحی مختلف از ساختار پروتئین مثل مارپیچ آلفا (رزیدوهای ۹، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۵، ۱۷، ۲۵، ۳۱، ۹۲، ۹۵، ۹۶ و ۱۰۸) صفحه‌های بتا (رزیدوهای ۳۷، ۳۹، ۴۱، ۵۲، ۵۳، ۵۶، ۵۷، ۴۲، ۴۴، ۴۸ و ۵۱) مارپیچ‌های 3_{10} (رزیدوهای ۸۲، ۸۳، ۸۴، ۱۲۱، ۱۲۵) و حلقه‌ها (رزیدوهای ۶۵، ۶۶، ۷۴، ۷۶، ۷۷ و ۷۸) توزیع شده‌اند. جدول ۱ برخی از رزیدوهای با سرعت تعویض متوسط را در حضور و عدم حضور سوربیتول نشان می‌دهد. رزیدوهای ۵۱، ۵۲، ۵۳، ۵۷ و ۱۲۵ از طریق زنجیره‌های جانبی خود در ایجاد پیوند هیدروژنی شرکت می‌کنند. با توجه به تحلیل ساختاری آنزیم لیزوزیم رزیدوهای ۳۶-۲۳ و ۹۹-۸۸ در برابر تعویض به شدت محافظت شده‌اند.

جدول ۱) فهرستی از رزیدوها با ثابت تعویض متوسط در حضور و غیاب سوربیتول

رزیدو	ثابت تعویض در غیاب سوربیتول	ثابت تعویض در حضور سوربیتول
گلوتامات ۴۱	۰/۳۴۳	۰/۱۴۳
آلانین ۸۲	۰/۰۵۲	۰/۰۴۹
آرژنین ۱۲۵	۰/۰۱۵	۰/۰۴۲
آسپاراژین ۳۹	۰/۰۴۰	۰/۰۷۱
سیستئین ۷۶	۰/۰۷۰	۰/۰۴۶
سیستئین ۹۴	۰/۰۳۳	۰/۰۸۰
هیستیدین ۱۵	۰/۰۳۶	۰/۰۵۳
لوسین ۸۳	۰/۰۸۳	۰/۰۱۱
لوسین ۸۴	۰/۱۳۲	۰/۰۵۱
متیونین ۱۲	۰/۰۶۵	۰/۰۹۰
والین ۹۲	۰/۰۶۲	۰/۰۶۵
آلانین ۱۱	۰/۰۶۱	۰/۰۳
آلانین ۳۱	۰/۱۷۴	۰/۰۶۱
آلانین ۴۲	۰/۲۴۲	۰/۰۷۶
آسپاراژین ۴۴	۰/۰۶۵	۰/۰۳۱
آسپاراتات ۵۲	۰/۱۳۱	۰/۰۴۵
آسپاراژین ۶۵	۰/۱۳۱	۰/۰۶۴
ایزولوسین ۷۸	۰/۰۹۲	۰/۰۲۵
لوسین ۱۷	۰/۰۸۸	۰/۰۵۳
لوسین ۸۳	۰/۰۸۳	۰/۰۱۱
آلانین ۹	۰/۱۴۲	۰/۰۶۵

جدول ۲) فهرست رزیدهایی که در حضور سوربیتول فاقد ثابت تعویض قابل اندازه‌گیری هستند.

رزیدو	ثابت تعویض در غیاب سوربیتول
الانین ۹۵	۰/۰۳۱
آرژنین ۱۱۲	۰/۰۳۰
آسپاراژین ۳۷	۰/۱۳۳
آسپاراژین ۵۹	۰/۱۷۷
آسپاراژین ۷۷	۰/۲۱۰
گلوتامین ۵۷	۰/۰۷۳
گلوتامین ۱۲۱	۰/۰۸۵
لوسین ۲۵	۰/۱۶۸
لوسین ۵۶	۰/۱۴۵
لیزین ۱۳	۰/۰۹۹
لیزین ۹۶	۰/۰۴۷
سرین ۸۵	۰/۱۴۹
ترئونین ۵۱	۰/۲۰۵
تریپوفان ۱۰۸	۰/۰۵۵
تیروزین ۲۳	۰/۱۹۵
تیروزین ۵۳	۰/۱۴۳

بحث

تأثیر سوربیتول بر رزیدوها متفاوت است (۱۳)، به عنوان مثال رزیدوهایی که در غیاب سوربیتول دارای سرعت تعویض سریع بودند در حضور سوربیتول سرعت تعویض آنها بسیار کند شده و ثابت سرعت آنها شناسایی نشد. همچنین سرعت تعویض برخی رزیدوها از متوسط به کند تغییر یافت که مورد محاسبه قرار نگرفت (جدول ۲) نتایج نشان داد سوربیتول بیشتر روی رزیدوهایی که در پیوند هیدروژنی قرار دارند و به خصوص رزیدوهایی که ثابت تعویض بالایی دارند اثر می‌گذارد (جدول ۱ و شکل ۱). شکل ۱ نمودار تعویض هیدروژن- دوتریوم را در مورد رزیدوهای ۹، ۱۱ و ۷۸ نشان می‌دهد. به عبارت دیگر کاهش سرعت تعویض به دلیل کاهش جنبش‌های برد کوتاه و نوسانات زنجیره جانبی است. در نتیجه می‌توان گفت سوربیتول حرکت پیوند هیدروژنی را محدود می‌کند. در حضور سوربیتول عمر پیوند هیدروژنی افزایش پیدا کرده و اتم‌ها مدت زمان بیشتری را در غالب پیوند هیدروژنی حضور می‌یابند. همچنین به نظر می‌رسد تعداد پیوندهای هیدروژنی افزایش یافته و ساختارهای ثانویه پایدارتر می‌شوند. پیوند هیدروژنی و سطح در دسترس دو فاکتور مهمی است که بر روی سرعت تعویض تأثیرگذار است و سوربیتول از طریق یکی از این دو فاکتور یا هر دوی آنها و بدون ایجاد آشفتگی شدید در ساختار ۳ بعدی سبب پایداری ساختار می‌شود (شکل ۳)(۱۴ و ۱۵). کاهش سطح در دسترس به معنی محدود شدن میزان تحرک ساختار است. به نظر می‌رسد بخش‌هایی از ساختار که تحت تأثیر سوربیتول قرار دارند نقش برجسته‌ای در تحرک و پایداری آنزیم دارند (۱۶ و ۱۷).

نتیجه‌گیری

مقایسه مطالعات ما با کارهای صورت گرفته در این حوزه که شامل بررسی تأثیر اسمولیت‌ها بر پایداری و عملکرد آنزیم‌های تأثیرگذار در مسیرهای متابولیکی بود (۱، ۲ و ۴)، نشان داد که بین نتایج به‌دست آمده همخوانی وجود دارد. ما دریافتیم که در حضور سوربیتول تعادل ساختاری لیزوزیم به سمت حالت سخت‌تر پیش رفته و در نتیجه بخش اعظم ساختار از تعویض مصون ماند. سوربیتول نوسان برخی نواحی آنزیم لیزوزیم را کاهش می‌دهد. کاهش نوسان و دینامیک به اسمولیت کمک می‌کند بدون تغییر در فعالیت‌های کاتالیتیک و ساختار (به‌صورت کلی)، آنزیم را پایدارتر کند (۱۸). نکته دیگری که باید مورد توجه قرار گیرد این است که بخش‌هایی که تحت تأثیر سوربیتول قرار می‌گیرند نقش مهمی در میزان تحرک آنزیم دارند چرا که پایداری آنزیم از طریق کاهش میزان تحرک تحت تأثیر سوربیتول رخ می‌دهد. همچنین نتایج این کار نشان داد که در مقایسه با سایر روش‌های بررسی تأثیر اسمولیت‌ها (به‌ویژه از نوع دارویی آنها) که بیشتر شامل روش‌های ترمودینامیکی است (بررسی هیدراتاسیون ترجیحی)، روش رزونانس مغناطیسی هسته دقیق‌تر عمل می‌کند چون اطلاعاتی در سطح رزیدوها و ارتباط فضایی بین آنها ارائه می‌دهد (۷ و ۱۹).

تضاد منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1.Yang LQ, Sang P, Tao Y, et al. Protein dynamics and motions in relation to their functions: several case studies and the underlying mechanisms. J Biomol Struct Dyn 2014, 32(3): 372-93.
2.DuBay KH, Bowman GR, Geissler PL. Fluctuations within folded proteins: implications for thermodynamic and allosteric regulation. Acc Chem Res 2015; 48(4): 1098-105.
3.Aioanei D, Lv S, Tessari I, et al. Single-molecule-level evidence for the osmophobic effect. Angew Chem Int Ed Engl 2011; 50(11): 4394-7.
4.Timasheff SN. Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99(15): 9721-6.
5.Finney JL, Poole PL. Solvent effects on the structure, dynamics and activity of lysozyme. J Biosci 1985; 8(1-2): 25-35.
6.Knubovets T, Osterhout JJ, Connolly PJ, et al. Structure, thermostability, and conformational flexibility of Hen Egg-White Lysozyme dissolved in glycerol. Biochemistry 1999; 96(4): 1262-7.
7.Vogtt K, Winter R. Pressure-assisted cold denaturation of hen egg white lysozyme: the influence of co-solvents probed by hydrogen exchange nuclear magnetic resonanc. Braz J Med Biol Res 2005; 38(8): 1185-93.
8.Clark J, Itzhaki LS. Hydrogen exchange and protein folding. Curr Opin Struct Boil 1998; 8(1): 112-8.
9.Li R, Woodward C. The hydrogen exchange core and protein folding. Protein Sci 1999; 8(8): 1571-90.
10.Chung EW, Nettleton EJ, Morgan CJ, et al. Hydrogen exchange properties of proteins in native and denatured states monitored by mass spectrometry and NMR. Protein Sci 1997; 6(6): 1316-24.
11.Foord RL, Leather barrow RJ. Effect of osmolytes on the exchange rates of backbone amide protons in proteins. Biochemistry 1998; 37(9): 2969-78.
12.Maity H, Lim WK, Rumbley JN, et al. Protein hydrogen exchange mechanism: Local fluctuations. Protein Sci 2003; 12(1): 153-60.
13.Back JF, Oakenfull D, Smith MB. Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. Biochemistry 1979; 18(23): 5191-6.
14.Buck M, Boyd J, Redfield C, et al. Structural determinants of protein dynamics: analysis of ^{15}N NMR relaxation measurements for main-chain and side-chain nuclei of hen egg white Lysozyme. Biochemistry 1995; 34(12): 4041-55.
15.Combes D, Graber M, Ye WN. Stabilizing effects of polyhydric alcohols. Influence of the enzyme. Ann N Y Acad Sci 1990; 613: 559-63.
16.Shimaki N, Hamaguchi K. Interaction of alcohols with lysozyme. I. Studies on circular dichroism. J Biochem 1970; 68(6): 785-94.
17.Redfield C, Dobson CM. Sequential 1H NMR assignments and secondary structure of hen egg white lysozyme in solution. Biochemistry 1988; 27(1): 122-36.
18.Baharloei M , khodabandeh S. Assessment of hemolytical activity of proteins from tentacles of sea anemone, Stichodactyla haddoni. Iran South Med J 2016, 19(1); 27-36.
19.Amini Khoei Z. Venoms and medicinal properties of cnidarians. Iran South Med J 2015 ;18(4):898-916.

Iran South Med J 2016; 19(5): 832-838

Original Article

Interaction between Sorbitol and Hen Egg White Lysozyme: From Dynamics to Structure

MR. Ramezani [1]. H. Naderi Manesh [1*]. M. Erfani Moghadam [1]

[1] Department of Biophysics, School of Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received 5 Dec, 2015 Accepted 9 May, 2015)

Abstract

Background: The study of the molecular dynamics of proteins based on internal motions is crucial for understanding the mechanism of protein function. Internal movements of proteins play an important role in both protein folding processes and the mechanism of action of enzyme. Knowledge about these movements will help us in understanding these processes correctly. Osmolites are small organic molecules which are utilized by the cells of all organisms, except hallobacteria. Osmolites are produced under extreme stressful conditions in order to help in stabilizing macro-molecules and retaining their biological function. They interact directly with macromolecules, but they exert their effect only when the characteristics or conditions of the solvent present around the cell change. Therefore, their presence affects the stability of the protein indirectly.

Materials and Methods: In this work we studied the effect(s) of the osmolite Sorbitol on the dynamics of Hen Egg White Lysozyme, and through our study we used NMR Hydrogen-Deuterium Exchange to characterize the effect(s). We performed spectrometery in two different conditions, in the absence and presence of sorbitol. The extent of peptide hydrogen exchange was assigned as a function time and in a decreasing manner in the intensity of the peak corresponding to amino acids. The resulting TOCSY spectra were assigned using SPARKY software, as well as we integrated the peaks using this software.

Results: The speed of hydrogen exchange, hydrogen atoms of the peptide bond, will give us information about the local structural oscillations where the exchange is taking place. The rate of hydrogen exchange varies from one amino acid to another, and the intensity of the peak of these hydrogen decreases as time passes by.

Conclusion: We found that the presence of sorbitol causes a decrease in proton exchange rate, and since there is no noticeable chemical shifts in the peaks of the spectra, in the presence or absence of sorbitol, we can conclude that sorbitol did not cause any change in the three dimensional structure. It seems that the decrease in the rate of exchange is a representative of a decrease in the accessible surface area or to strengthening of hydrogen bonds, and sorbitol caused one of these two possibilities.

Key word: Nuclear Magnetic Resonance (NMR), Hydrogen deuterium exchange, Osmolyte (sorbitol), Hen egg white lysozyme

©Iran South Med J. All rights reserved.

Cite this article as: Ramezani MR, Naderi Manesh H, Erfani Moghadam M. Interaction between Sorbitol and Hen Egg White Lysozyme: From Dynamics to Structure. Iran South Med J 2016; 19(5): 832-838.

Copyright © 2016 Ramezani, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

**Address for correspondence:* Department of Biophysics, Tarbiat Modares University, Tehran. Iran. E.mail: Naderman@modares.ac.ir