

## بررسی رشته‌های کوتاه پلی پتیدی برای شناسایی آمینواسیدهای ضروری از طریق محاسبه طیف تشدید مغناطیسی هسته

سمیه کاظمی<sup>۱</sup>، محمدرضا رضاییان<sup>۲\*</sup> و علیرضا کوبکی<sup>۳</sup>

اطلاعات مقاله	چکیده
دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۹/۲۴	
پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۰۳/۲۲	
<b>واژگان کلیدی:</b>	
پروتئین و پلی پتید، آمینواسیدهای ضروری، تشدید مغناطیسی هسته.	

پروتئین‌ها به دلیل آنکه نشانگر زیستی بیماری‌های خاصی هستند از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند به نحوی که کاهش یا افزایش آن‌ها در بدن می‌تواند نشانه بیماری باشد. این پژوهش به منظور بررسی و شناسایی رشته‌های پروتئینی کوچک از طریق محاسبه طیف تشدید مغناطیسی هسته انجام شده است. آمینواسیدها واحدهای سازنده پروتئین در بدن هستند و آمینواسیدهای ضروری به آمینواسیدهایی گفته می‌شود که توسط بدن تولید نمی‌شوند و باید از طریق زنجیره غذایی به بدن برسند. از آنجایی که آمینواسیدهای ضروری برای فرآیندهای حیاتی از جمله ساخت پروتئین‌ها و سنتز هورمون‌ها مورد نیاز هستند، از اهمیت بالایی برخوردارند و در این پژوهش مورد مطالعه قرار می‌گیرند. ابتدا رشته‌هایی به طول دو تا شش آمینواسید با مونومرهای یکسان با استفاده از نرم‌افزار Gauss View مدل‌سازی و طیف تشدید مغناطیسی هسته آن‌ها، با استفاده از نرم‌افزار Gaussian 09w محاسبه شده است. این ساختارها به منظور بررسی عواملی چون نوع و طول رشته آمینواسید، بر دامنه و محل پیک ماکزیمم در طیف تشدید مغناطیسی هسته مدل‌سازی شده‌اند. با تحلیل نتایج حاصل از مدل‌سازی طیف تشدید مغناطیسی، می‌توان دریافت هر آمینواسید طیف تشدید مغناطیسی مخصوص به خود را دارد و نوع آمینواسیدهای موجود در یک زنجیره پلی پتیدی بر طیف تشدید مغناطیسی آن اثرگذار است. توانایی روش تشدید مغناطیسی هسته در تشخیص و شناسایی انواع بیماری‌ها، ماهیت غیرتهاجمی آن، و همچنین امکان تکرارپذیری آزمایشات، علاوه بر اینکه هزینه‌های آزمایشات را کاهش می‌دهد، این روش را به عنوان یکی از روش‌های نوین و پیشرفته جهت مطالعه بیماری‌ها تبدیل کرده است.

### ۱- مقدمه

تعیین ساختار مولکولی یک نمونه توسط تشدید مغناطیسی، آن را در طول مدت‌زمان معینی در معرض یک میدان مغناطیسی قوی قرار می‌دهند. در نتیجه، رفتار اتم‌ها تحت تأثیر میدان مغناطیسی اعمالی تحلیل می‌شود [۱]. سیگنال تشدید مغناطیسی هسته امکان مطالعه سیستم‌ها را در سطح اتمی تحت شرایطی بسیار شبیه به سلول‌های

در سال‌های اخیر، روش‌های مختلفی برای اسکن بافت‌های بدن و توصیف و تحلیل ساختارهای مولکولی استفاده شده است که تشدید مغناطیسی یکی از این روش‌هاست. روش‌های مبتنی بر تشدید مغناطیسی، به عنوان ابزار قوی برای کاربردهای تشخیصی پزشکی مطرح شده‌اند. برای

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: rezaeian@hut.ac.ir

۱. فارق التحصیل کارشناسی ارشد، دانشکده مهندسی برق، دانشگاه صنعتی همدان

۲. استادیار، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی همدان

۳. استادیار، دانشکده مهندسی برق، دانشگاه صنعتی همدان

[۱۲ و ۱۱]. با استفاده از ترکیب اطلاعات تصویر تشدید مغناطیسی هسته و اطلاعات به دست آمده از طیف‌سنجی تشدید مغناطیسی هسته می‌توان درک بهتر و عمیق‌تری از بافت‌های بدن داشت و برای کاربردهای پزشکی مورد استفاده قرارداد [۱۳ و ۱۴]. تا کنون روش‌های متعددی برای مطالعه بیماری‌ها بر اساس شناسایی ساختار آمینواسیدها و پروتئین‌ها ارائه شده است [۱۵ و ۱۶]. در یکی از این روش‌ها [۱۷] با استفاده از پیک‌های سیگنال تشدید مغناطیسی هسته به تشخیص و دسته‌بندی تومورهای مغزی بر اساس دامنه NAA<sup>۸</sup>، کراتین<sup>۹</sup>، کولین<sup>۱۰</sup>، لیپید<sup>۱۱</sup>، سطح آلانین<sup>۱۲</sup> و همچنین نسبت NAA به کراتین و نسبت کولین به کراتین پرداخته شده است. از آنجا که NAA به صورت اختصاصی در نورون‌های مغز سالم وجود دارد، بنابراین سیگنال NAA دریافت شده از ناحیه سفید مغز، می‌تواند نشانگر اختصاصی برای سلامتی آکسون باشد [۱۸]. به عنوان نمونه در بیماری MS<sup>۹</sup> سطح پایینی از NAA در ماده سفید مغز مشاهده می‌شود که ناشی از آسیب وارده به آکسون است [۱۹]. همچنین از تکنیک تشدید مغناطیسی هسته<sup>۱۰</sup> در تشخیص اتم‌های یک ترکیب استفاده می‌شود [۲۰ و ۲۱]. روش دیگری برای تعیین میزان پروتون‌ها و کربن‌های آروماتیک هیدروکربن‌های آلی با استفاده از طیف‌سنجی <sup>۱۱</sup>HNMR و <sup>۱۲</sup>CNMR ارائه شده است [۲۲]. نشان داده شده است که قابلیت اطمینان داده‌های طیف‌سنجی پروتون بسیار بالاتر از داده‌های طیف‌سنجی کربن است [۲۳]. الگوریتم <sup>۱۳</sup>FLYA روش دیگری است که برای تعیین خودکار ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها استفاده می‌شود [۲۴]. این الگوریتم با استفاده از بهینه‌سازی ساختار، تعیین موقعیت پیک‌های طیف تشدید مغناطیسی هسته، محاسبه جابجایی شیمیایی و حذف پیک حلال و با توجه به اثر اورهاوزر هسته<sup>۱۴</sup> ساختار پروتئینی آن را محاسبه می‌کند [۲۵ تا ۲۸]. همچنین یک روش خودکار برای تخصیص گروه‌های متیل بر اساس لیست پیک‌های طیف‌سنجی با استفاده از اثر اورهاوزر هسته، ارائه شده است [۲۹]. می‌توان گفت پروتئین‌ها پلیمرهایی از

زنده یا بافت سلولی فراهم می‌کند [۲]. همبستگی الکترون که نشان دهنده برهم کنش میان الکترون‌ها در ساختار الکترونی یک ساختار مولکولی است [۳]. رفتار یک الکترون تحت تأثیر الکترون‌های دیگر موجود در ساختار را تعیین می‌کند نیز در طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته باید در نظر گرفته شود. بعضی از پروتئین‌ها در بدن انسان به عنوان نشانگر زیستی<sup>۱</sup> یک بیماری خاص هستند [۴]. برای مثال، نظارت بر عملکرد پروتئین ویمنتین<sup>۲</sup> می‌تواند روش مؤثری برای آشکارسازی بافت‌های سرطانی باشد [۵]. روش‌های متفاوتی برای نمونه برداری از بافت‌های زنده وجود دارد؛ از جمله روش‌های نمونه برداری می‌توان به آزمایش خون و انواع بیوپسی اشاره کرد که روش‌های تهاجمی هستند؛ این روش‌ها در طول نمونه برداری با آسیب فیزیکی به بافت با درد و خونریزی همراه هستند. با پیشرفت علم و تکنولوژی ابزارها و روش‌های تشخیص پزشکی به سمت غیرتهاجمی شدن می‌روند. این روش‌ها، کمترین آسیب فیزیکی را به بافت‌های زنده وارد می‌کنند [۶]. تحقیقات زیادی بر روی مدل‌سازی در حوزه‌های زیستی صورت گرفته است. به طور مثال برای تشخیص تومورهای سرطانی به صورت غیرتهاجمی، شرایط دمایی بافت زنده را بررسی کرده‌اند [۷]. در پژوهشی دیگر واکنش تخریب پلیمر در بدن انسان شبیه‌سازی شده است [۸]. همچنین با شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برهم‌کنش داروی ضد سرطان با غشای سلولی، تغییرات انرژی و اندروالسی و فاصله مرکز جرم را بررسی کرده‌اند [۹]. با توجه به کاربری وسیع تصویربرداری تشدید مغناطیسی<sup>۳</sup> در زمینه‌های مختلف، می‌توان از این روش در جهت مطالعات طیف‌سنجی نیز استفاده کرد. با استفاده از اطلاعات موجود در طیف تشدید مغناطیسی هسته می‌توان خواص فیزیکی و شیمیایی اتم‌ها یا مولکول‌ها را مشخص کرد و به مطالعه دینامیک و حالت واکنش‌های شیمیایی مولکول‌ها پرداخت [۱۰]. همچنین از تشدید مغناطیسی هسته در تحقیقات زمینه‌های متنوع زیست مولکولی از جمله زیست‌شناسی ساختاری، فیزیولوژی و تشخیص دارویی استفاده می‌شود

<sup>۸</sup> Alanine

<sup>۹</sup> Multiple Sclerosis

<sup>۱۰</sup> NMR

<sup>۱۱</sup> Proton nuclear magnetic resonance

<sup>۱۲</sup> Carbon-13 nuclear magnetic resonance

<sup>۱۳</sup> Fully Automated NMR Structure Determination Algorithm

<sup>۱۴</sup> Nuclear Overhauser Effect

<sup>۱</sup> Biomarker

<sup>۲</sup> Vimentin

<sup>۳</sup> MRI

<sup>۴</sup> N-Acetyl-Aspartat

<sup>۵</sup> Creatinine

<sup>۶</sup> Choline

<sup>۷</sup> Lipid

DFT که روشی مناسب برای انجام محاسبات ساختارهای بزرگ مثل پروتئین‌هاست، ساختار مولکولی را در پایدارترین حالت انرژی قرار داده و اثر همبستگی الکترونی را نیز در نظر می‌گیرد.

## ۲-۲- روش تحقیق

مبنای روش تحقیق بدین صورت است که ابتدا رشته‌های آمینواسیدی مختلف که اجزای سازنده پروتئین‌ها هستند، مدل‌سازی شده‌اند. سپس سیگنال تشدید مغناطیسی هسته برای این رشته‌ها محاسبه شده است. با مدل‌سازی رشته‌های پلی‌پپتیدی شامل آمینواسیدهای ضروری، تغییرات محل و دامنه پیک ماکزیمم تجزیه و تحلیل شده‌اند. روند کلی پژوهش در شکل (۱) آمده است و در ادامه توضیحات هر مرحله به ترتیب مطرح می‌شود.

### ۲-۱- انتخاب آمینواسید

آمینواسیدها که واحدهای سازنده پروتئین در داخل بدن انسان هستند، نقش مهمی در بدن ایفا می‌کنند. بخش بزرگی از سلول‌ها، بافت‌ها و عضلات بدن از آمینواسیدها تشکیل شده است. همچنین اسیدهای آمینه نقش اساسی در انتقال و ذخیره مواد مغذی دارند و در عملکرد غدد، تاندون‌ها و رگ‌ها نیز تأثیر گذارند. آمینواسیدها به‌طور کلی به دودسته آمینواسیدهای ضروری و غیرضروری<sup>۲</sup> تقسیم می‌شوند. با توجه به اهمیت آمینواسیدهای ضروری در بدن و ارتباط پروتئین‌ها با برخی بیماری‌ها، در این پژوهش رشته‌های پلی‌پپتیدی آمینواسیدهای ضروری مورد بررسی قرار گرفته‌اند. رشته‌های پلی‌پپتیدی مورد مطالعه در این پژوهش، شامل آمینواسیدهای ضروری هیستیدین<sup>۳</sup>، ایزولوسین<sup>۴</sup>، لوسین<sup>۵</sup>، متیونین<sup>۶</sup>، فنیل آلانین<sup>۷</sup>، تریئونین<sup>۸</sup>، تریپتوفان<sup>۹</sup> و والین<sup>۱۰</sup> هستند.

### ۲-۲- مدل‌سازی رشته‌های پلی‌پپتیدی

مدل‌سازی ساختارهای پلی‌پپتیدی با استفاده از نرم‌افزار Gauss View انجام شده است. هر آمینواسید یک سر آمین و یک سر کربوکسیل دارد. رشته‌های پلی‌پپتیدی با اتصال سر آمین آمینواسید اول به گروه کربوکسیل آمینواسید بعدی مدل‌سازی می‌شوند.

اسیدهای آمینه هستند. هر آمینواسید از یک کربن نامتقارن به نام کربن آلفا تشکیل شده است که با چهار گروه مختلف کربوکسیل (COOH)، اتم هیدروژن، گروه آمین (NH<sub>3</sub>) و یک گروه جانبی R پیوند برقرار می‌کند. گروه R چندین اتم کربن دارد و آن‌ها را به ترتیبی که از کربن مرکزی آلفا فاصله می‌گیرند  $\beta$ ،  $\gamma$ ،  $\delta$  می‌نامند. اگر گروه آمینی (NH<sub>2</sub>) روی کربن آلفا باشد اسیدآمینه نوع آلفا بوده و در سنتز پروتئین نقش دارد [۳۰]. شناسایی رشته‌های پلی‌پپتیدی در بدن انسان با استفاده از طیف تشدید مغناطیسی می‌تواند کمک زیادی در زمینه پیشبرد اهداف پزشکی داشته باشد؛ زیرا با شناسایی رشته‌های پلی‌پپتیدی در قسمت‌های مختلف بدن توسط سیگنال تشدید مغناطیسی هسته می‌توان با استفاده از دستگاه تصویربرداری تشدید مغناطیسی هسته و هزینه کمتر کمک شایانی در تشخیص برخی بیماری‌ها کرد. همچنین این روش بر خلاف برخی روش‌های مرسوم از جمله انواع بیوپسی که تقریباً همه آن‌ها شامل استفاده از ابزاری تیز برای از برداشتن مقدار کمی از بافت هستند [۳۱]، یک روش غیرتهاجمی را فراهم خواهد کرد. تمایز تحقیق پیش‌رو با مطالعاتی که تاکنون انجام گرفته در این است که ضمن کاهش هزینه‌های آزمایش، علاوه بر استفاده از روش نوین طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته، امکان تکرارپذیری آزمایشات و استفاده مجدد از نمونه‌ها را نیز فراهم می‌کند. روش پیشنهادی اثر همبستگی الکترون‌ها را در نظر می‌گیرد در حالی که در روش HF اثر همبستگی الکترون‌ها در نظر گرفته نشده و این امر موجب ایجاد خطا در تعیین محل پیک‌ها است. همچنین در بستر این پژوهش می‌توان رشته‌های پلی‌پپتیدی با ترکیب آمینواسیدهای مختلف را شبیه‌سازی و طیف NMR ساختار مولکولی مورد نظر را محاسبه کرد. هدف از انجام این پژوهش بررسی رشته‌های کوتاه پلی‌پپتیدی برای شناسایی طیف تشدید مغناطیسی هسته است. به همین منظور طیف رزونانس مغناطیسی هسته برای رشته‌های به طول دو تا شش آمینو اسید ضروری<sup>۱</sup> در بستر نرم افزار Gaussian 09W با روش محاسباتی DFT محاسبه شده است. روش

<sup>۱</sup> آمینواسیدهای ضروری آمینواسیدهایی هستند که در بدن ساخته نمی‌شوند و باید از طریق زنجیره غذایی روزانه به بدن برسند.

<sup>۲</sup> آمینواسیدهایی که وجود آن‌ها در بدن ضروری است اما چون بدن توانایی تولید این آمینواسیدها را دارد به آن‌ها آمینواسید غیرضروری گفته می‌شود.

<sup>۳</sup> Histidine

<sup>۴</sup> Isoleucine

<sup>۵</sup> Leucine

<sup>۶</sup> Methionine

<sup>۷</sup> Phenylalanine

<sup>۸</sup> Threonine

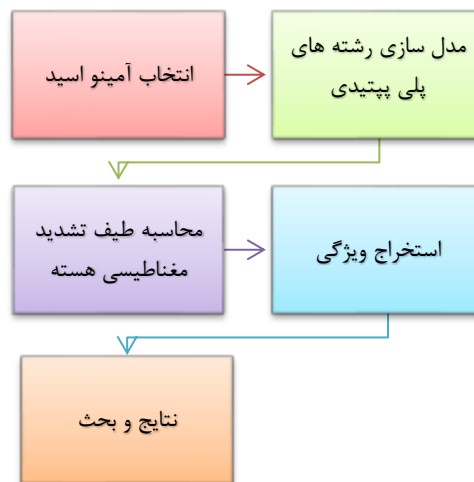
<sup>۹</sup> Tryptophan

<sup>۱۰</sup> Valine

نماینده اکسیژن گروه کربوکسیل است و اتم نیتروژن گروه آمین به رنگ آبی در شکل مشخص شده است.

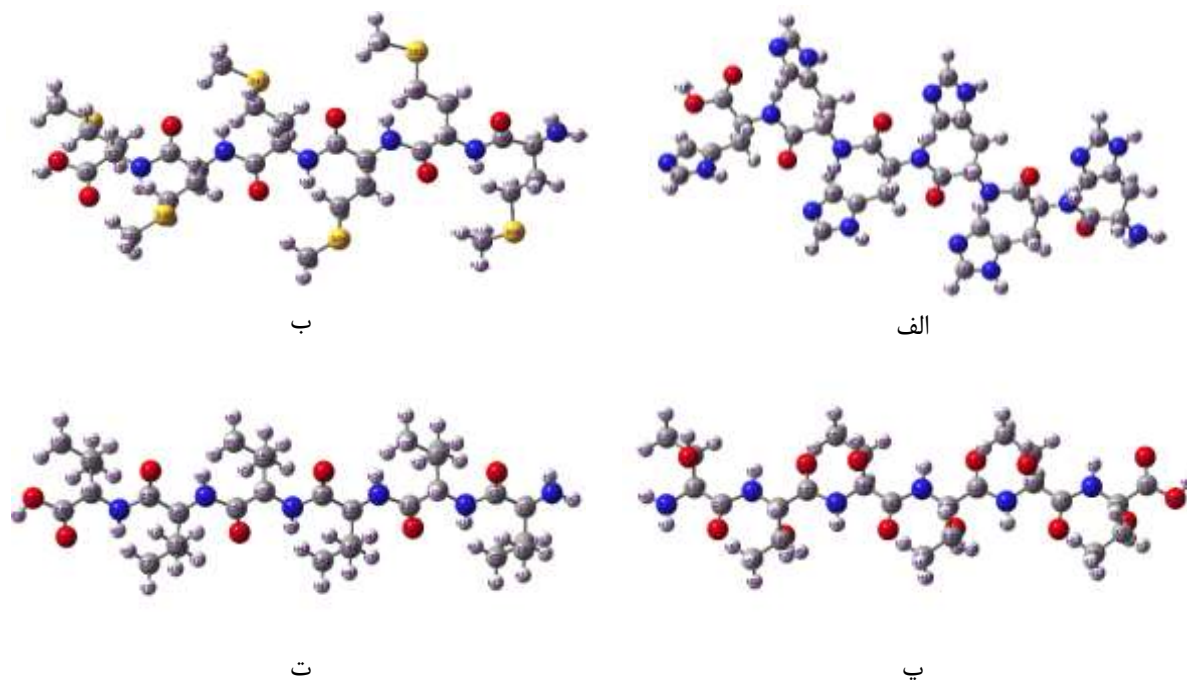
### ۲-۳- محاسبه طیف تشدید مغناطیسی هسته

در این پژوهش محاسبات طیف تشدید مغناطیسی هسته با استفاده از نرم‌افزار Gaussian 09w انجام شده است. روش هارتری-فوک (HF) روش پایه‌ای در انجام محاسبات کوانتومی است. با این حال همبستگی بین الکترون‌ها را به خوبی در نظر نمی‌گیرد. روش‌های ۲DFT همبستگی بین الکترون‌ها را به صورت مناسب‌تری لحاظ می‌کنند و برای کاهش خطای ناشی از همبستگی الکترون-ها بهتر است از روش DFT به جای HF استفاده شود. نرم‌افزار Gaussian 09w طیف گسترده‌ای از مدل‌های نظریه تابع چگالی را ارائه می‌دهد [۳۲ و ۳۳]. محاسبات DFT اغلب از چگالی اتصالات ۳ استفاده می‌کنند. حجم محاسبات کوانتومی با افزایش تعداد الکترون‌ها افزایش می‌یابد؛ در روش‌های DFT که بر اساس چگالی الکترونی عمل می‌کنند، نرخ افزایش حجم محاسبات نسبت به سایر روش‌ها کمتر است و برای انجام محاسبات ساختارهای بزرگ مثل پروتئین‌ها روش مناسب‌تری هستند. لذا در این پژوهش برای محاسبه طیف تشدید مغناطیسی هسته رشته‌های پلی پپتیدی، روش DFT انتخاب شده است.



شکل ۱- مراحل انجام پژوهش

ساختارهای مولکولی ایجاد شده، با استفاده از اتم‌های اکسیژن و هیدروژن به صورتی کامل می‌شود که گروه آمین و کربوکسیل ابتدا و انتهای رشته به درستی تشکیل شوند. می‌توان با تکرار پیوند پپتیدی در ادامه‌ی پیوند اول، رشته‌های پروتئینی به طول دلخواه را ایجاد کرد. ساختارهای پلی پپتیدی مدل‌سازی شده در این پژوهش، شامل شش آمینواسید یکسان برای آمینواسیدهای هیستیدین، متیونین، تریئونین و والین با مدل گلوله و میله، در شکل (۲) نشان داده شده است. اتم نشان داده شده با رنگ قرمز،



شکل ۱- مدل گلوله و میله برای رشته‌های به طول شش آمینواسید (الف) هیستیدین، (ب) متیونین، (پ) تریئونین و (ت) والین

<sup>2</sup> Density Functional Theory

<sup>3</sup> Density Fitting

<sup>1</sup> Hartree\_Fock

با استفاده از مدل سازی رشته‌های کوتاه پلی پتیدی، طیف تشدید مغناطیسی هسته به منظور شناسایی آمینو اسیدهای ضروری محاسبه شده است. این مرحله به روش DFT، با تابع عملکردی هیبریدی B3LYP و تنظیمات پایه ای ۶-۳۱۱G انجام شده است. روش محاسباتی مورد استفاده (DFT)، همبستگی الکترون‌ها را در نظر می‌گیرد و برای انجام محاسبات ساختارهای بزرگ مثل پروتئین‌ها مناسب است. امکان تکرارپذیری آزمایشات و استفاده مجدد از نمونه‌ها این روش را به عنوان یکی از روش‌های نوین پیشرفته جهت مطالعه ساختار رشته‌های کوتاه پلی پتیدی معرفی می‌کند. طیف تشدید مغناطیسی برای رشته‌های با طول متفاوت به دست آمده است؛ این طیف، موقعیت پیک‌های سیگنال تشدید مغناطیسی هسته را برحسب پی‌پی‌ام (Part Per Million) نشان می‌دهد؛ یعنی فرکانس تشدید طیف بر قدرت میدان مغناطیسی دستگاه تقسیم می‌شود. در شکل (۳) طیف تشدید مغناطیسی هسته برای اتم‌های هیدروژن هیستیدین در رشته‌های به طول دو تا شش آمینواسید نشان داده شده است. دو پیک در ۱۲ تا ۱۵ ppm و چندین پیک در ۰ تا ۸ ppm دیده می‌شود. اغلب پیک‌ها در اطراف ۷ ppm ظاهر شده‌اند. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، با افزایش طول رشته پلی پتیدی دامنه پیک‌ها نیز بالا می‌رود. روند تغییر موقعیت پیک‌های طیف تشدید مغناطیسی هسته برای رشته‌های به طول دو تا شش آمینواسید هیستیدین در شکل (۴) آمده است. با توجه به این مشاهده، موقعیت پیک ماکزیمم با افزایش طول رشته، از حدود ۵/۹ ppm به سمت ۵/۷ ppm می‌رود. تغییرات در موقعیت پیک ماکزیمم در افزایش طول رشته از پنج به شش آمینواسید بسیار بیشتر از افزایش طول رشته از سه به چهار یا چهار به پنج آمینواسید است. به عبارت دیگر با افزایش طول رشته‌های پلی پتیدی، موقعیت پیک ماکزیمم به سمت ۰ ppm متمایل می‌شود. به نظر می‌رسد با توجه به موقعیت پیک ماکزیمم برای رشته‌های به طول دو و شش بتوان طول رشته را تشخیص داد، چون موقعیت پیک‌های آن‌ها قابل تفکیک‌تر از رشته‌های به طول سه، چهار و پنج آمینواسید است.

مرحله اول در هر محاسبه الکترونی، پیدا کردن ساختار بهینه است. ساختار بهینه ساختاری است که به ساختار واقعی بسیار نزدیک است. مولکول‌های واقعی در طبیعت تمایل دارند در پایدارترین حالت (کم انرژی‌ترین حالت) خود قرار بگیرند. نرم‌افزار Gaussian 09w جست‌وجوی ساختار بهینه را انجام می‌دهد و برای این کار از الگوریتم‌های مختلف استفاده می‌کند. اغلب روش‌ها نیاز به یک سری تنظیمات پایه‌ای دارند. معمولاً برای اتم‌های ردیف اول و ردیف دوم جدول تناوبی، تنظیمات ۶-۳۱۱G استفاده می‌شود [۳۴ و ۳۵]؛ همچنین برخی پژوهشگران برای اتم‌های دیگر در ردیف سوم از این تنظیمات استفاده کرده‌اند [۳۶ تا ۳۸].

در این پژوهش از تابع عملکردی هیبریدی B3LYP استفاده شده است. نماد B3 به مفهوم استفاده از تابع تبادل الکترونی سه پارامتری بک<sup>۱</sup> [۳۹] و LYP نشان‌دهنده به کارگیری تابع همبستگی الکترونی لی<sup>۲</sup>، یانگ<sup>۳</sup> و پار<sup>۴</sup> است [۴۰]. تابع B3LYP در واقع یک تابع هیبریدی است که در آن انرژی عملکرد تبادلی بک، با انرژی دقیق از نظریه هارتلی - فوک ترکیب می‌شود و سه پارامتر تابعیت هیبریدی را مشخص می‌کند. در این پژوهش رشته‌های پلی پتیدی با دو تا شش آمینواسید در نظر گرفته می‌شوند که شامل مونومرهای یکسان هستند. این مدل سازی برای همه آمینواسیدهای ضروری تکرار می‌شود تا موقعیت و رفتار پیک‌ها و رابطه آن‌ها با طول پلی پتید به دست آید.

## ۲-۴ استخراج ویژگی

از آنجایی که محل پیک ماکزیمم و دامنه طیف تشدید مغناطیسی از ویژگی‌های اختصاصی ساختار مولکولی هستند و مقدار جابجایی شیمیایی نوع اتم هیدروژن تولیدکننده سیگنال را مشخص می‌کند [۴۱] اهمیت بالایی دارند و در این پژوهش مورد بررسی قرار می‌گیرند. پس از محاسبه طیف تشدید مغناطیسی برای رشته‌های پلی پتیدی با مونومرهای یکسان، دامنه و موقعیت پیک ماکزیمم با تغییر طول رشته برای هر آمینواسید مطالعه می‌شود. در ادامه طیف تشدید مغناطیسی رشته‌های پلی پتیدی به تفصیل آمده است.

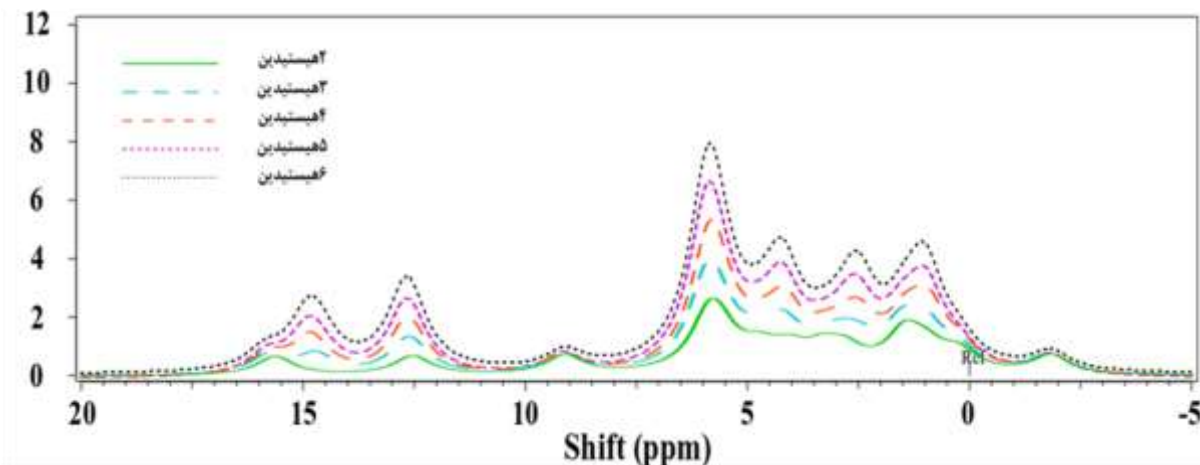
## ۳- نتایج و بحث

<sup>4</sup> Parr

<sup>1</sup> Bake

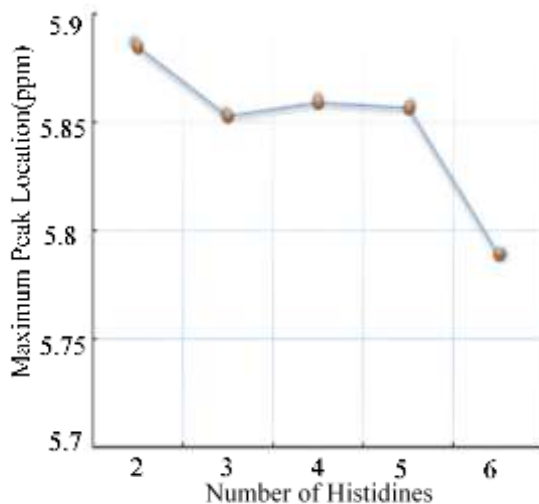
<sup>2</sup> Lee

<sup>3</sup> Yang



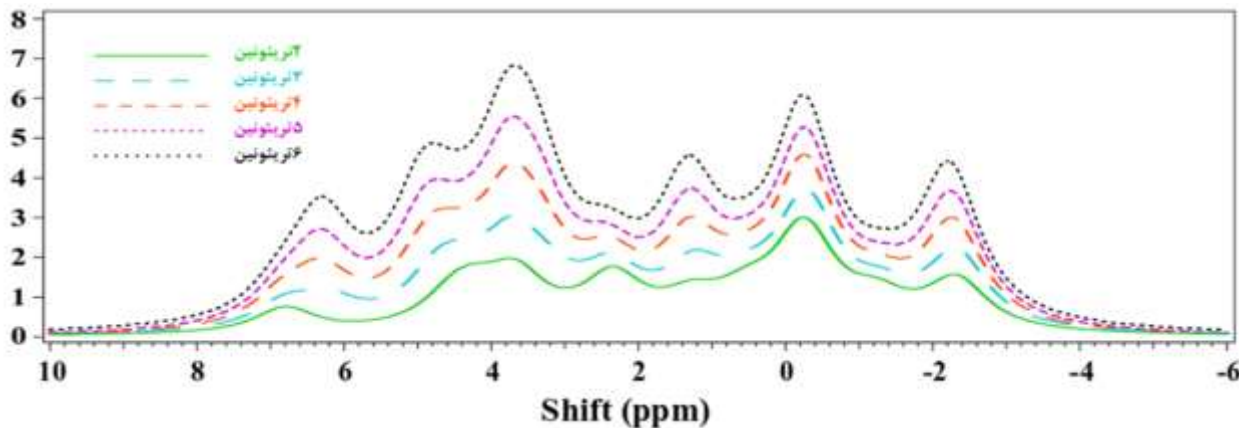
شکل ۲- طیف تشدید مغناطیسی پلی پپتیدهای هیستیدی

است. مطابق با شکل (۵)، دامنه طیف تشدید مغناطیسی برای متیونین با افزایش طول رشته افزایش یافته و پیک ماکزیمم در حوالی ppm5/0 قرار گرفته است. در شکل نشان داده شده است که با افزایش طول رشته، رفتار محل پیک ماکزیمم به صورت زیگ زاک است (به جز برای رشته به طول دو). در این گزارش، تغییرات محل پیک که در بالا به آن اشاره شد، در بازه ppm44/0 تا ppm33/0 رخ داده است. اگرچه با افزایش طول رشته، نمودار محل پیک بر اساس طول رشته به صورت نزولی است، اما برای افزایش طول از چهار به پنج آمینواسید روند صعودی است. طیف تشدید مغناطیسی هسته رشته‌های با دو تا شش آمینواسید تریئونین در شکل (۶) نشان داده شده است، در این طیف چندین پیک در فاصله ۳ppm- تا ۷ppm وجود دارد. بلندترین پیک‌ها در ۴ppm و حوالی ۰ppm واقع شده‌اند. هم‌زمان با افزایش طول رشته، افزایش مورد انتظار در دامنه پیک‌ها مشهود است

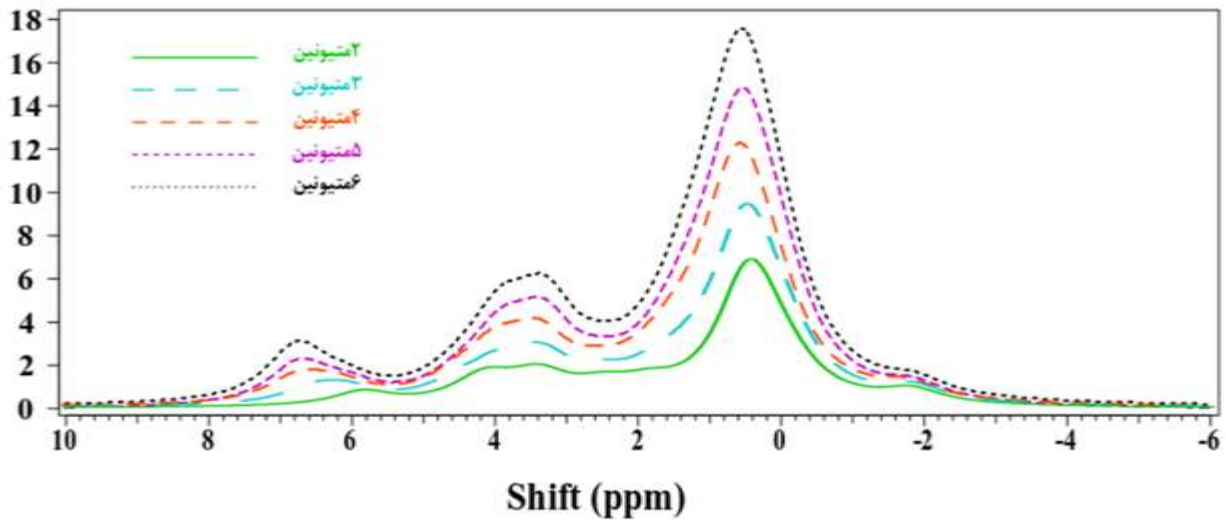


شکل ۳- تغییرات محل پیک ماکزیمم طیف تشدید مغناطیسی با افزایش تعداد آمینواسیدهای هیستیدین

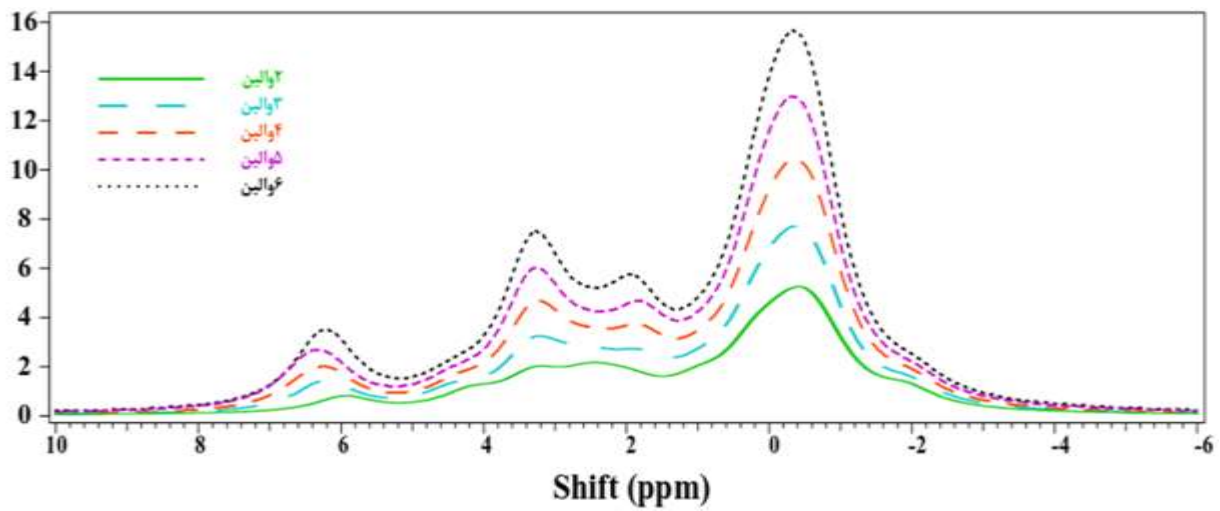
در شکل (۵) طیف تشدید مغناطیسی برای متیونین رسم شده



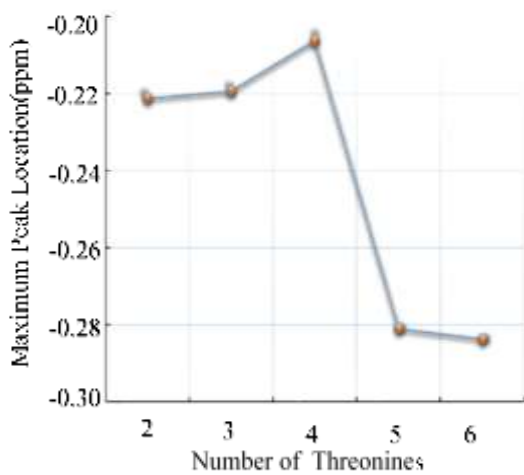
شکل ۴- طیف تشدید مغناطیسی پلی پپتیدهای متیونین



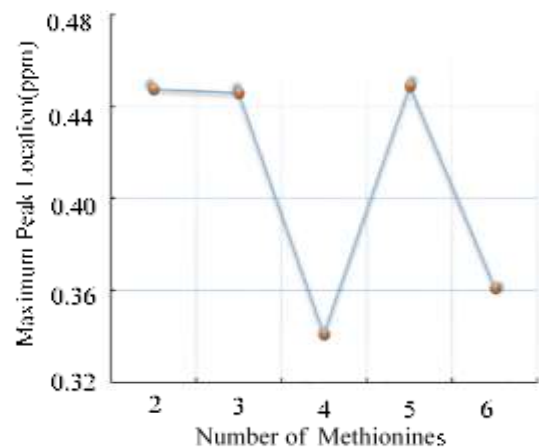
شکل ۵- طیف تشدید مغناطیسی پلی پپتیدهای تریئونین



شکل ۶- طیف تشدید مغناطیسی پلی پپتیدهای والین



شکل ۹- تغییرات محل پیک ماکزیمم طیف تشدید مغناطیسی با افزایش تعداد آمینواسیدهای تریئونین



شکل ۸- تغییرات محل پیک ماکزیمم طیف تشدید مغناطیسی با افزایش تعداد آمینواسیدهای متیونین

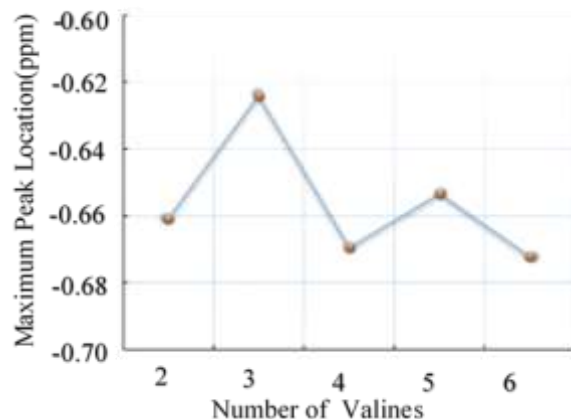


به صورت معکوس، با افزایش طول رشته از سه به چهار و پنج به شش آمینواسید، پیک ماکزیمم از صفر در محور منفی فاصله می‌گیرد. بیشترین تغییرات در موقعیت پیک ماکزیمم برای تغییر طول رشته از سه به چهار آمینواسید است. تغییرات فوق در بازه  $-0/14\text{ppm}$  و  $-0/29\text{ppm}$  رخ داده است.

در طیف تشدید مغناطیسی پلی پپتیدهای فنیل آلانین، چندین پیک در فاصله  $0\text{ppm}$  تا  $7\text{ppm}$  مشاهده می‌شود و پیک ماکزیمم برای تمام طول‌ها در نزدیکی  $6\text{ppm}$  قرار گرفته است. در طیف تشدید مغناطیسی فنیل آلانین نیز رفتار در حال رشد ذکر شده برای طیف تشدید مغناطیسی آمینواسیدهای قبلی، مشهود است. برای آمینواسیدهای فنیل آلانین، پیک ماکزیمم بین  $5/5\text{ppm}$  و  $5/7\text{ppm}$  قرار گرفته است. به صورت کلی موقعیت پیک ماکزیمم، برای رشته‌های پلی پپتیدی به طول دو تا شش آمینواسید فنیل آلانین رفتار نزولی داشته است. در افزایش طول رشته از چهار به پنج آمینواسید، پیک ماکزیمم یک پرش به موقعیت ماکزیمم ( $5/74\text{ppm}$ ) دارد.

در طیف تشدید مغناطیسی رشته‌های پلی پپتیدی تریپتوفان، از  $0\text{ppm}$  تا  $7\text{ppm}$  چندین پیک مشاهده می‌شود. بلندترین پیک در حدود  $4\text{ppm}$  رخ داده است. همان‌طور که انتظار می‌رود، با افزایش طول رشته دامنه سیگنال هم افزایش می‌یابد. پیک ماکزیمم برای رشته‌های با دو تا شش آمینواسید تریپتوفان، بین  $3/7\text{ppm}$  و  $4/02\text{ppm}$  واقع شده است. محل پیک ماکزیمم از  $4\text{ppm}$  به طرف  $0\text{ppm}$  حرکت می‌کند. استثنائی که در این روند مشاهده می‌شود در افزایش طول رشته از سه به چهار پلی پپتید است؛ بنابراین بیشترین تغییر در محل پیک ماکزیمم تریپتوفان، مربوط به رشته به طول چهار است. همان‌طور که در شکل (۱۱) مشاهده می‌شود، محل پیک ماکزیمم برای ایزولوسین و فنیل آلانین در اطراف  $5\text{ppm}$  است، برای هیستیدین در حدود  $4\text{ppm}$ ، متیونین در اطراف  $5/0\text{ppm}$ ، تریئونین و لوسین پیک‌ها در نزدیکی هم، حوالی صفر و در ناحیه منفی قرار گرفته‌اند.

همان‌طور که مشاهده شد، در طیف تشدید مغناطیسی رشته‌هایی با آمینواسیدهای یکسان که با افزایش طول رشته دامنه سیگنال آن‌ها افزایش یافت، محل پیک‌ها تقریباً ثابت بود و این نشان از اختصاصی بودن طیف تشدید مغناطیسی برای یک نوع آمینواسید دارد.



شکل ۱۰- تغییرات محل پیک ماکزیمم طیف تشدید مغناطیسی با افزایش تعداد آمینواسیدهای والین

همان‌طور که در شکل (۹) آمده است، پیک ماکزیمم در اطراف  $0\text{ppm}$  و در محور منفی قرار گرفته است. با تغییر طول رشته، پیک ماکزیمم طیف تشدید مغناطیسی اشاره شده، از  $0/2\text{ppm}$  به سمت  $0/28\text{ppm}$  حرکت می‌کند. بزرگ‌ترین تغییر محل پیک ماکزیمم در این زنجیره آمینواسیدی، در افزایش طول رشته از چهار به پنج آمینواسید رخ داده است؛ که میزان این تغییر  $0/8\text{ppm}$  است. طیف تشدید مغناطیسی هسته اتم‌های هیدروژن پلی پپتیدهای والین، شامل رشته‌هایی با دو تا شش آمینواسید در شکل (۸) نشان داده شده است. این طیف یک پیک در اطراف  $6\text{ppm}$  دارد، همچنین دو پیک در حدود  $2\text{ppm}$  تا  $4\text{ppm}$  و بلندترین پیک در حدود  $0\text{ppm}$  مشاهده می‌شود.

تغییرات محل پیک ماکزیمم برای پلی پپتیدهای والین بین  $0/62\text{ppm}$  و  $0/67\text{ppm}$  واقع شده است (شکل). به‌طور قابل توجهی، در پلی پپتیدهای مدل‌سازی شده با آمینواسیدهای والین، دامنه تغییرات نسبتاً کوچک است و پیک‌های ماکزیمم اغلب بسیار به هم نزدیک هستند.

در طیف تشدید مغناطیسی اتم‌های هیدروژن لوسین که بسیار شبیه به طیف تشدید مغناطیسی ایزولوسین است، برای لوسین پیک‌هایی در اطراف  $7\text{ppm}$  و  $4\text{ppm}$  مشاهده می‌شود؛ اما پیک ماکزیمم در اطراف  $0\text{ppm}$  قرار دارد. همان‌طور که انتظار می‌رود برای ایزولوسین هم با افزایش طول رشته دامنه پیک ماکزیمم افزایش می‌یابد. پیک ماکزیمم برای لوسین در محور منفی و نزدیکی  $0\text{ppm}$  واقع شده است. مشاهده می‌شود، با افزایش طول رشته از دو به سه و از چهار به پنج آمینواسید لوسین، پیک ماکزیمم به سمت بالا حرکت می‌کند (به صفر نزدیک‌تر می‌شود).



که به صورت آزمایشگاهی بدست آمده استفاده شد، در صورتی که در این روش می‌توان رشته‌های کوتاه پلی پپتیدی با ترکیب آمینواسیدهای دلخواه را مدل‌سازی و طیف رزونانس مغناطیسی هسته را برای این ساختارها محاسبه کرد.

#### ۴- نتیجه‌گیری

دامنه پیک طیف رزونانس مغناطیسی هسته وابستگی مستقیم به طول رشته دارد. به طوری که در همه رشته‌های پلی‌پپتیدی با افزایش طول رشته دامنه پیک‌ها افزایش می‌یابد. پس می‌توان نتیجه گرفت مستقل از نوع آمینواسیدهای موجود در یک رشته‌ی پلی‌پپتیدی، با افزایش طول رشته دامنه طیف رزونانس مغناطیسی هسته آن افزایش می‌یابد. افزایش در دامنه سیگنال در اطراف پیک ماکزیمم نسبت به سایر پیک‌ها بیشتر بود و این موضوع اهمیت پیک ماکزیمم را بیشتر آشکار می‌کند. برای بررسی محل پیک‌ها، به طور خاص محل پیک ماکزیمم مورد بررسی قرار گرفت. در رشته‌های با آمینواسیدهای یکسان با افزایش طول رشته محل پیک ماکزیمم تغییر چندانی نداشت و تقریباً ثابت بود به طوری که از روی محل پیک ماکزیمم می‌توان نوع آمینواسید را تشخیص داد.

همین موضوع طیف تشدید مغناطیسی اختصاصی برای اجزا تشکیل‌دهنده مونومرها را مشخص می‌کند. به عبارت دیگر، هر آمینواسید می‌تواند با طیف تشدید مغناطیسی مخصوص خودش شناخته شود. به طور کلی، نتایج به دست آمده نشان داد که پیک ماکزیمم، مستقل از اینکه در سمت منفی یا مثبت محور قرار گرفته باشد، به سمت  $0 \text{ ppm}$  حرکت می‌کند. البته رفتارهای دیگری نیز در این پژوهش گزارش شد. پیک ماکزیمم برای ایزولوسین و فنیل آلانین در اطراف  $5 \text{ ppm}$ ، برای هیستیدین اطراف  $4 \text{ ppm}$ ، برای متیونین حدود  $0.5 \text{ ppm}$  و برای تریئونین در نزدیکی صفر و محور منفی قرار گرفته است. با توجه به این نکته که پیک ماکزیمم هر آمینواسید در فرکانس خاصی دیده می‌شود و با توجه به طیف تشدید مغناطیسی یک ترکیب می‌توان به آمینواسیدهای موجود در آن ترکیب پی برد. صحت عملکرد روش پیشنهادی با استفاده از نرم افزار Gaussian 09w برای محاسبات طیف رزونانس مغناطیسی هسته چند ساختار مولکولی در [۴۲] با مقایسه طیف رزونانس مغناطیسی آزمایشگاهی و طیف محاسبه شده به روش DFT، با تابع عملکردی هیبریدی B3LYP و تنظیمات

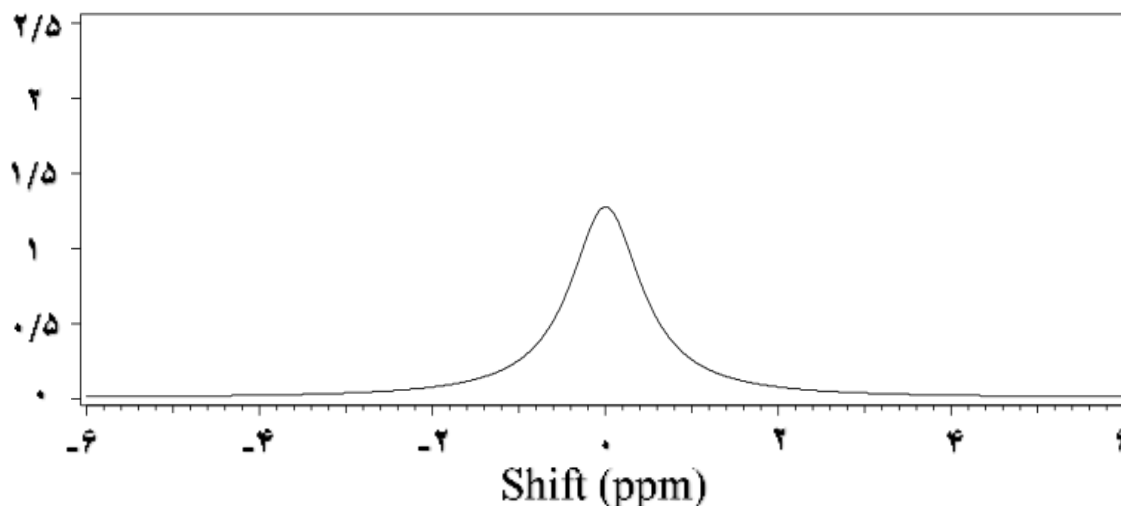
به عبارتی می‌توان به هر آمینواسید یک طیف تشدید مغناطیسی اختصاصی نسبت داد که مستقل از دامنه پیک، محل پیک ماکزیمم تشدید مغناطیسی، برای یک آمینواسید خاص تقریباً ثابت است.



شکل ۷- روند تغییر محل پیک ماکزیمم برای رشته‌های با دو تا شش آمینواسید یکسان

#### ۳- جمع‌بندی

در این پژوهش یک روش خودکار برای شناسایی آمینواسیدهای ضروری در رشته‌های پلی‌پپتیدی، با استفاده از موقعیت پیک ماکزیمم در سیگنال طیف تشدید مغناطیسی هسته مورد مطالعه قرار گرفته است. سیگنال تشدید مغناطیسی پلی‌پپتیدهایی شامل آمینواسیدهای ضروری با دو تا شش مونومر مورد بررسی قرار گرفتند. مشاهده شد طیف تشدید مغناطیسی هسته برای آمینواسیدها تحت تأثیر عواملی مانند نوع آمینواسید و طول رشته‌های پلی‌پپتیدی است. با توجه به نتایج ارائه شده، موقعیت دقیق پیک ماکزیمم در طیف تشدید مغناطیسی می‌تواند به عنوان بارکدی برای تشخیص طول هر رشته پلی‌پپتیدی در نظر گرفته شود. این امر این احتمال را ممکن می‌کند که با آنالیز طیف تشدید مغناطیسی بتوان به صورت غیرتأجمعی به آشکارسازی بایومارکرهای پروتئینی پرداخت. یکی از مزایای این پژوهش تعیین دقیق محل پیک ماکزیمم بر حسب ppm است. مزیت روش DFT که برای انجام محاسبات استفاده شد، بهینه کردن ساختار مولکولی و در نظر گرفتن همبستگی الکترون‌ها در مقایسه با روش HF است. در روش FLYA که برای تعیین ساختار پروتئین‌ها معرفی شد، از طیف رزونانس مغناطیسی هسته



شکل ۸- طیف رزونانس مغناطیسی هسته هیدروژن

بیماری مثلاً سرطان ریه یا تومور مغزی را در نظر گرفت؛ با دستیابی به ساختار مولکولی دقیق نشانگر زیستی پروتئینی، شامل نوع و تعداد آمینواسیدهای آن و ترتیب قرار گرفتن آن‌ها در کنار هم، طیف NMR مربوط به این رشته را به دست آورده و به صورت بارکد برای نشانگرزیستی شناسایی شده معرفی شوند. با شناسایی نشانگرزیستی چند بیماری خاص و دستیابی به ساختار مولکولی آن‌ها می‌توان طیف NMR مربوط به آن نشانگرزیستی را به دست آورد؛ با داشتن طیف NMR بارکد اختصاصی هر بیماری را ایجاد کرده و به این ترتیب یک سیستم تشخیص بیماری از روی طیف NMR طراحی کرد. بنابراین با طراحی بارکد چند بیماری و استفاده از یک سیستم طبقه‌بندی، می‌توان به طبقه‌بندی افراد سالم و بیمار پرداخت. شاید بتوان با استفاده از سیستم طبقه‌بندی دیگری شدت بیماری در افراد بیمار را نیز طبقه‌بندی کرد.

پایه‌ای G311-6 به اثبات رسیده است. برای اطمینان بخشی روش پیشنهادی به محاسبه طیف هسته هیدروژن که مطابق تئوری [44] بایستی در صفر پی‌ام ایجاد پیک کند، مبادرت می‌گردد. طیف رزونانس مغناطیسی محاسبه شده بر اساس روش پیشنهادی در این مقاله که منطبق با روش DFT، تابع عملکردی هیبریدی B3LYP و تنظیمات پایه‌ای G311-6 است، مطابق شکل (۱۲) تطابق خوبی را با تئوری نشان می‌دهد.

#### ۵- پیشنهادات

با توجه به نتایج بدست آمده برای شناسایی پروتئین‌ها در بدن انسان می‌توان از طیف تشدید مغناطیسی هسته‌ی آمینواسیدهای سازنده آن پروتئین، استفاده کرد. برای ادامه مسیر این پژوهش، با توجه به ارتباط نزدیک پروتئین‌ها با برخی بیماری‌ها و نشانگرزیستی بودن پروتئین‌ها، می‌توان به صورت خاص نشانگرزیستی پروتئینی مربوط به یک

مراجع:

- [1] A. G. Rockall, A. Hatrick, Peter Armstrong, and M. Wastie, "Diagnostic Imaging", Diagnostic Imaging, 2013.
- [2] T. Ikeya, A. Sasaki, D. Sakakibara, Y. Shigemitsu, and J. Hamatsu, "NMR protein structure determination in living E. coli cells using nonlinear sampling", nature protocols, 2010, pp. 105-160.
- [3] A. Altun, F. Neese, and G. Bistoni, "The Effect of Electron Correlation on Intermolecular Interactions: A Pair Natural Orbitals Coupled Cluster Based Local Energy Decomposition Study", journal of chemical theory and computation, 2018.
- [4] P. Zarogoulidis, K. Tsakiridis, C. Karapantzou, S. Lampaki, I. Kioumis, G. Pitsiou, A. Papaiwannou, W. Hohenforst-Schmidt, H. Huang, G. Kesisis, I. Karapantzos, S. Chlapoutakis, I. Korantzis, A. Mpakas, V. Karavasilis, I. Mpoukovinas, Q. Li, and K. Zarogoulidis, "Use of proteins as biomarkers and their role in carcinogenesis", Journal of Cancer, pp. 9-18, 2015.

- [5] E. D. Goluch, J. M. Nam, D. G. Georganopoulou, T. N. Chisel, K. A. Shaikh, K. S. Ryu, A. E. Barron, C. A. Mirkin, and C. Liu, "A bio-barcode assay for on-chip attomolar sensitivity protein detection", *Lab. Chip* 6, 2006, pp. 1293–1299.
- [6] C. Westbrook, C. K. Roth, and J. Talbot, "MRI in Practice", A John Wiley and Sons, 2011.
- [۷] فرهاد طالبی، داوود رحیم یار هریس و ال سا اسدیان، "بررسی شرایط دمایی یک بافت زنده به منظور تشخیص تومورهای سرطانی"، *مجله مدل سازی در مهندسی*، ۱۳۸۸، صفحه ۴۵-۵۳.
- [۸] محمودرضا رحیمی و اسماعیل قاسمی کفرودی، "شبیه سازی واکنش تخریب پلیمر زیست تخریب پذیر پلی لاکتیک اسید در بدن انسان"، *مجله مدل سازی در مهندسی*، ۱۳۹۰، صفحه ۲۹-۳۹.
- [۹] مائده رحیم نژاد، بهمن وحیدی، بهمن ابراهیمی حسین زاده و فاطمه یزدیان، "شبیه سازی دینامیک مولکولی برهم کنش داروی ضد سرطان پاکلیتاکس با غشای سلولی: بررسی تغییرات انرژی و اندروالسی و فاصله مرکز جرم"، *مجله مدل سازی در مهندسی*، ۱۳۹۸، صفحه ۱۵-۲۵.
- [10] R. Schmucki, S. Yokoyama, and P. Güntert, "Automated assignment of NMR chemical shifts using peak-particle dynamics simulation with the DYNASSIGN algorithm", Springer, 2009, pp. 97–109.
- [11] A. Rahman, and M. I. Choudhary, "Applications of NMR Spectroscopy", Elsevier, 23 November 2015.
- [12] W. Blackwell, "NMR of Biomolecules: Towards Mechanistic Systems Biology", 2012.
- [13] R. Ross, B. Goodpaster, D. Kelley, and F. Boada, "Magnetic resonance imaging in human body composition research: from quantitative to qualitative tissue measurement", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2000, pp. 12-17.
- [14] L. E. Marbella, S. Zekoll, J. Kasemchainan, S. P. Emge, and P. G. Bruce, "7Li NMR Chemical Shift Imaging To Detect Microstructural Growth of", *Chemistry of Materials*, 2019.
- [15] J. M. Würz, S. Kazemi, E. Schmidt, A. Bagaria, and P. Güntert, "NMR-based automated protein structure determination", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2017, pp. 1-9.
- [16] J. M. Würz, and P. Güntert, "Peak picking multidimensional NMR spectra with the contour geometry based algorithm CYPICK", *Journal of biomolecular NMR* 67, 2017, pp. 63-76.
- [17] A. B. Lara, and M. Castillo, "Adult Brain Tumors Clinical Applications of Magnetic Resonance Spectroscopy", *Magn Reson Imaging Clin N Am* 24, 2016, pp. 781–809.
- [18] L. A. Douglas, G. T. Riess, P. M. Matthews, G. S. Francis, D. L. Collins, C. Wolfson, and J. P. Antel, "Use of Proton Magnetic Resonance Spectroscopy for Monitoring Disease Progression in Multiple Sclerosis", *American Neurological Association*, 1994, pp. 76-82.
- [19] C. A. Davie, C. P. Hawkins, G. J. Barker, A. Brennan, P. S. Tofts, D. H. Miller, and W. I. McDonald, "Serial proton magnetic resonance spectroscopy in acute multiple sclerosis lesions", *Oxford University Press*, 1994, pp. 49-58.
- [20] L. Buchner, E. Schmidt, and P. Güntert, "Peak match: a simple and robust method for peak list matching", Springer, 2013, pp. 267–277.
- [21] J. M. Würz, and P. Güntert, "Peak picking multidimensional NMR spectra with the contour geometry based algorithm CYPICK", Springer, 2016.
- [22] X. Cao and J. Mao, "Characterization of kerogen using solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy: A review", *International Journal of Coal Geology*, 2013, pp. 83-90.
- [23] V. D. Molina, R. Angulo, F. Z. Dueñez, and A. Guzmán, "Partial Least Squares (PLS) and Multiple Linear Correlations between Heithaus Stability Parameters (Po) and the Colloidal Instability Indices (CII) with the 1H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectra of Colombian Crude Oils," *Energ. Fuel*, 2014, pp. 1802-1810.
- [24] B. L. Mendez, and P. Güntert, "Automated Protein Structure Determination from NMR Spectra," *American Chemical Society*, 2006, pp. 13112-13122.
- [25] L. Buchner, E. Schmidt, and P. Güntert, "Peak match: a simple and robust method for peak list matching," *Journal of biomolecular NMR* 55, 2013, pp. 267-277.

- [26] A. Rosato, W. Vranken, H. F. Rasmus, J. R. Timothy, R. Tejero, K. Pederson, H. W. Lee, J. H. Prestegard, A. Yee, B. Wu, A. Lemak, S. Houliston, C. H. Arrowsmith, M. Kennedy, T. B. Action, R. Xiao, G. Liu, G. T. Montelione, and G. W. Vuister, "The second round of critical assessment of automated structure determination of proteins by NMR: CASD-NMR-2013", *Journal of biomolecular NMR* 62, 2015, pp. 413-424.
- [27] E. Schmidt, J. Gath, B. Habenstein, F. Revote, K. Székely, M. Huber, L. Buchner, A. Böckmann, B. H. Meier, and P. Güntert, "Automated solid-state NMR resonance assignment of protein microcrystals and amyloids", *Journal of biomolecular NMR* 56, 2013, pp. 243-254.
- [28] P. S. Skinner, H. R. Fogh, W. Boucher, T. J. Ragan, L. G. Mureddu, and G. W. Vuister, "CcpNmr Analysis Assign: a flexible platform for integrated NMR analysis", *Journal of biomolecular NMR* 66, 2016, pp. 111-124.
- [29] I. Pritisanac, J. M. Wurz, T. R. Alderson, and P. Güntert, "Automatic structure-based NMR methyl resonance assignment in large proteins", *Nature Communications*, 2019.
- [30] M. Arefia, M. Mizrahi, H. Eshtiagh-Hosseiniaand, and A. Frontera, "A survey of the different roles of polyoxometalates in their interaction with amino acids, peptides and proteins", *Dalton Transactions*, 2017.
- [31] H. Wu, A. F. Malone, E. L. Donnelly, I. Y. Kirita, K. Uchimurai, M. Ramakrishnan, J. P. Gaut, and B. D. Humphreys, "The renal biopsy provides critical diagnostic and prognostic information for clinicians when patients develop kidney disease. Today, biopsies are read using a combination of light microscopy", *Journal of the American Society of Nephrology*, 2018, pp. 2069-2080.
- [32] R. G. Parr, and W. Yang, "Density-functional theory of atoms and molecules", Oxford University, 1989.
- [33] W. Kohn, and L. J. Sham, "Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects", *Physical Review*, 1965, pp. 1133-38.
- [34] A. D. McLean, and G. S. Chandler, "Contracted Gaussian-basis sets for molecular calculations. 1. 2nd row atoms, Z=11-18", *Journal of Chemical. Physics*, 1980, pp. 5639-48.
- [35] K. Raghavachari, J. S. Binkley, R. Seeger, and J. A. Pople, "Self-Consistent Molecular Orbital Methods. 20. Basis set for correlated wave-functions", *Journal of Chemical. Physics*, 1980, pp. 650-54.
- [36] R. C. Binning Jr. and L. A. Curtis, "Compact contracted basis-sets for 3rd-row atoms - GA-KR", *Journal of Computational Chemistry*, 1990, pp. 1206-16.
- [37] M. P. McGrath, and L. Radom, "Extension of Gaussian-1 (G1) theory to bromine-containing molecules", *Journal of Chemical. Physics*, 1991, pp. 511-16.
- [38] L. A. Curtiss, M. P. McGrath, J.-P. Blaudeau, N. E. Davis, R. C. Binning Jr, and L. Radom, "Extension of Gaussian-2 theory to molecules containing third-row atoms Ga-Kr", *Journal of Chemical. Physics*, 1995, pp. 6104-13.
- [39] A. D. Becke, "Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange", *Journal of Chemical. Physics*, 1993, pp. 5648-52.
- [40] B. Miehlich, A. Savin, H. Stoll, and H. Preuss, "Results obtained with the correlation-energy density functionals of Becke and Lee, Yang and Parr", *Chemical Physics Letters*, 1989, pp. 200-06.
- [41] E. Alexandri, R. Ahmed, H. Siddiqui, M. Choudhary, C. G. Tsiafoulis, and Ioannis P. Gerothanassis, "High Resolution NMR Spectroscopy as a Structural and Analytical Tool for Unsaturated Lipids in Solution", *Molecules*, 2017.
- [42] N. S. Radulović, M. Z. Mladenović, N. M. Stojanović, P. J. Randjelović, and P. D. Blagojevic, "Structural Elucidation of Presilphiperfolane-7 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -diol, a Bioactive Sesquiterpenoid from *Pulicaria vulgaris*: A Combined Approach of Solvent-Induced Chemical Shifts, GIAO Calculation of Chemical Shifts, and Full Spin Analysis", *Journal of Natural Products*, 2019, pp. 1874-1885.
- [43] R. Schmucki, S. Yokoyama, and P. Güntert, "Automated assignment of NMR chemical shifts using peak-particle dynamics simulation with the DYNASSIGN algorithm", *Journal of biomolecular NMR* 43, 2009, pp. 97-109.
- [44] X. Xue, M. KanzaKi, D. Turner, and D. Lorocho, "Hydrogen incorporation mechanisms in forsterite: New insights from <sup>1</sup>H and <sup>29</sup>Si NMR spectroscopy and first-principles calculation", *American Mineralogist*, vol. 102, 2017, pp. 519-536.