

Historias de la RMN

Jorge Santoro

8. El efecto Overhauser nuclear

En 1953, como consecuencia de los estudios sobre la relajación de los espines de los electrones de conducción en metales que había realizado durante su tesis doctoral, Albert Overhauser tuvo una idea genial: en un metal, la saturación de los espines electrónicos debía incrementar la polarización de los espines nucleares. El efecto se puede entender del modo siguiente, si bien la explicación completa es algo más compleja. En un metal el espín nuclear, I , interactúa con los electrones de la capa de conducción, de espín S , mediante el acoplamiento hiperfino, proporcional a $I \cdot S$. Esta interacción conserva el espín total ($I \cdot S = I_z S_z + I^+ S^- / 2 + I^- S^+ / 2$). Si se satura la magnetización electrónica, un electrón con su espín en el estado de mayor energía (estado α , puesto que γ es negativo para el electrón) intentará volver al estado de menor energía (estado β). Si la relajación paramagnética es debida a la interacción hiperfina se modificará también el espín nuclear (de β a α). Con ello aumenta la población de espines nucleares en el estado α . La polarización inducida en los espines nucleares equivale a asignarles una relación giromagnética efectiva

$$\gamma_{\text{eff}} = \gamma_I + s \cdot |\gamma_S|$$

donde s es el factor de saturación de los espines electrónicos debido a irradiarlos con un campo electromagnético de frecuencia adecuada. Para $s = 1$ la polarización inducida en los espines nucleares con γ_I positiva es unas 2000 veces mayor que la espontánea. Para núcleos con γ_I negativa el comportamiento es más sorprendente; a medida que aumenta el grado de saturación primero se llega a $\gamma_{\text{eff}} = 0$, temperatura de espín nuclear infinita, y luego a una inversión de población, temperatura de spin nuclear negativa.

Overhauser presentó su resultado durante una reunión de la *American Physical Society*, en la que, en palabras de Anatole Abragam, *[The audience] was immediately split into two parts, which, however, overlapped: those who did not understand a single word of his demonstration, and those who did not believe a single word of his conclusions* (1). El escepticismo parecía justificado. En efecto, la irradiación que produce la saturación de la resonancia de los espines electrónicos supone introducir energía en el sistema. El efecto producido, un aumento en la polarización de los espines nucleares, implica una disminución de la energía de los espines nucleares. A pesar de las suspicacias existentes Overhauser envió sus resultados a publicar a *Physical Review* con éxito (2). Norman Ramsey, que actuó de revisor, escribió a Overhauser (1): *After considerable effort in trying to find the fallacy in your argument, I finally concluded that there was no fundamental fallacy to be found. Indeed, my feeling is that this provides a most intriguing and interesting technique for aligning nuclei*. Entre tanto Charles Slichter, que al igual que Overhauser trabajaba en la Universidad de Illinois, por lo que conocía su teoría antes de la publicación, se había puesto a la tarea de verificarla experimentalmente. Utilizando una muestra de litio metálico estimó (3) que había conseguido un incremento de la polarización nuclear del ${}^7\text{Li}$ de unas 100 veces. Interpretó que el valor obtenido fuera claramente menor que el máximo teórico como debido bien a que la saturación de los electrones no era completa, bien a que existía un mecanismo adicional de relajación de los espines nucleares que cortocircuitaba en parte el efecto. Curiosamente el artículo de Slichter, enviado el 17

de agosto de 1953, apareció publicado en *Physical Review* dos semanas antes que el de Overhauser, que había sido enviado el 20 de junio de 1953.

Poco tiempo después Ionel Solomon mostró que era posible obtener un efecto similar, aunque mucho menos intenso, saturando espines nucleares (4). En su artículo Solomon mostraba que para dos espines nucleares acoplados dipolarmente, I y S, la relajación de cada uno de ellos depende del estado de ambos:

$$\begin{aligned}dI_z/dt &= -\rho(I_z - I_0) - \sigma(S_z - S_0) \\dS_z/dt &= -\rho'(S_z - S_0) - \sigma(I_z - I_0)\end{aligned}$$

donde I_z y S_z son las componentes z de la magnetización macroscópica de los espines nucleares I y S, respectivamente, I_0 y S_0 sus valores de equilibrio, ρ la velocidad de relajación longitudinal del espín I, ρ' la del espín S y σ la velocidad de relajación cruzada. A partir de ello deducía que al saturar uno de ellos, $S_z = 0$, el otro alcanza un estado estacionario ($dI_z/dt = 0$) en el que su magnetización longitudinal, I_z , cambia a

$$I_z = I_0 + \sigma/\rho S_0$$

Solomon identificaba este efecto con el descrito por Overhauser, puesto que en ambos casos es debido a un mecanismo de relajación que involucra a dos espines. Además, mostraba que era posible obtener un efecto Overhauser nuclear transitorio. Tras aplicar un pulso de 180° a uno de los dos espines la magnetización longitudinal del otro espín evoluciona con un comportamiento biexponencial. Una de las exponenciales aleja la magnetización de su valor de equilibrio (efecto Overhauser transitorio) mientras que la otra la devuelve a dicho valor. En un segundo artículo (5) mostraba que existe un efecto similar cuando los dos espines están acoplados escalarmente. En este caso debe cumplirse que el acoplamiento escalar varíe en el tiempo. Existe además una diferencia fundamental con respecto a la influencia del acoplamiento dipolar. Mientras que el acoplamiento dipolar es capaz de producir tanto transiciones de cuanto doble ($\alpha\alpha \leftrightarrow \beta\beta$) como de cuanto nulo ($\alpha\beta \leftrightarrow \beta\alpha$), la modulación temporal del acoplamiento escalar sólo produce las segundas. Consecuentemente su contribución al efecto Overhauser es siempre negativa (una disminución de la magnetización longitudinal si las constantes giromagnéticas de I y S son del mismo signo). Este mecanismo, sin embargo, se mostraría después poco relevante, puesto que su contribución es proporcional al cuadrado de la constante de acoplamiento por lo que, en general, es pequeña.

La aplicación práctica del efecto Overhauser nuclear (NOE, de acuerdo con su nombre en inglés: *Nuclear Overhauser Effect*) tardaría años. La primera consistió en utilizarlo para incrementar la relación señal/ruido en espectros de ^{13}C (6). Al desacoplar el ^{13}C de ^1H se produce un incremento de la señal por dos causas: por un lado, el multiplete del ^{13}C colapsa a un singlete; por otro, el efecto Overhauser nuclear incrementa la magnetización longitudinal del ^{13}C hasta en un 200%. Este incremento permitiría la obtención de espectros de ^{13}C en casos que previamente resultaban imposibles. De mayor relevancia fueron los trabajos de Frank Anet (7) y Koji Nakanishi (8), que demostraban el potencial del NOE en determinaciones estructurales. En el caso de Anet intentaba detectar un acoplamiento sin resolver entre dos protones fuertemente comprimidos estéricamente. Al irradiar la señal de uno de los dos protones la altura de la señal del otro aumentaba. Al determinar la variación en la anchura de línea, no se apreciaba ninguna, por lo que no parecía que se hubiese

destruido un acoplamiento no resuelto. Sin embargo, el área de la señal había aumentado. Anet adscribió correctamente este comportamiento al efecto Overhauser nuclear y comprobó que el mismo fenómeno ocurría en el caso del ácido β,β dimetilacrílico y de la dimetilformamida. En ambos casos la irradiación del metilo en *cis* producía un incremento de la señal del protón del grupo CH, mientras que la irradiación del metilo en *trans* (más alejado del grupo CH) no modificaba su intensidad. ¡El efecto NOE desvelaba qué protones se encontraban próximos al irradiado! El caso de Nakanishi fue similar. Estaba estudiando una serie de diterpenos aislados del árbol *Ginkgo biloba*. Durante los experimentos de desacoplamiento que realizaba para intentar asignar el espectro de un derivado de uno de los diterpenos observó un incremento apreciable del área de algunos picos sin que variara su anchura a media altura. Se trataba del mismo efecto que había observado Anet y que permitía deducir qué protones se encontraban próximos espacialmente al irradiado.

Un caso curioso, que se produjo en la misma época, fue el de la observación de un efecto Overhauser nuclear intermolecular (9). Reinhold Kaiser lo detectó en una mezcla de cloroformo y ciclohexano. Eligió el cloroformo puesto que carece de interacciones dipolares protón-protón, con lo que esperaba que su relajación tuviese una contribución importante de la interacción intermolecular con el ciclohexano. Ésta se produce porque las interacciones dipolares entre ambos están moduladas por el movimiento intermolecular relativo. Irradiando los protones del ciclohexano obtuvo un efecto NOE en el cloroformo del 34%. Kaiser apuntaba que este tipo de estudios podía proporcionar información acerca del orden de corto alcance en líquidos, así como acerca de las fuerzas intermoleculares.

A partir del trabajo de Anet el número de aplicaciones del NOE fue creciendo. En 1971 Joseph Noggle y Roger Schirmer publicaron un libro sobre el tema (10), en cuyo capítulo final se dedicaban a revisar las aplicaciones del NOE. Entre éstas destacaban la asignación de señales de los espectros, la determinación de la configuración y de la conformación molecular y diversos estudios de relajación. El capítulo incluía 90 referencias. También aparecía en el libro el tratamiento del NOE en sistemas de varios espines, así como el llamado efecto de tres espines, en los que el NOE mediado por un espín intermedio resultaba ser negativo, un efecto que se había observado experimentalmente (11).

En los años siguientes la aplicación del NOE se vio facilitada por la mejora en la instrumentación, con campos magnéticos más intensos y más estables y con mayores facilidades para la irradiación. Los estudios, sin embargo, se referían siempre a moléculas de baja masa molecular. El primer estudio con una macromolécula se debió a Aksel Bothner-By. Durante un estudio de la unión de la hormona lisina-vasopresina y de algunos análogos peptídicos a la neurofina bovina, observó un ensanchamiento diferencial de ciertas señales de protones peptídicos. Asoció este hecho a la interacción dipolar con protones de la macromolécula, lo que incrementaba la velocidad de relajación transversal. Esto le indujo a suponer que podría observar un efecto NOE intermolecular. En el experimento correspondiente, al irradiar señales de la proteína se producía una disminución de algunas señales del péptido; asimismo se observaban efectos intramoleculares (12). La aparición de un NOE negativo solo parecía posible en alguno de los siguientes casos: los núcleos acoplados dipolarmente tienen constantes giromagnéticas de distinto signo; el NOE se propaga a través de un tercer espín intermedio; los núcleos están acoplados escalarmente y el acoplamiento aparece modulado en el tiempo. Puesto que ninguna de estas condiciones resultaba de aplicación, Bothner-By revisó la teoría del NOE para el caso de dos espines. En el límite de estrechamiento extremo (es decir,

para moléculas de bajo peso molecular que tienen tiempos de correlación τ_c pequeños), el incremento NOE homonuclear es $f_1(S) = (I_z - I_0)/I_0 = 0,5$ ($\sigma = \rho/2$), que corresponde a una mejora máxima del 50%. Para moléculas grandes, como proteínas globulares, con tiempos de correlación más largos, el NOE se acerca al límite $f_1(S) = -1$ ($\sigma = -\rho$), es decir, a la desaparición de la señal. En un sistema multiespín el resultado debía ser del mismo signo, aunque posiblemente de menor intensidad. Bothner-By confirmó este resultado efectuando primero medidas del NOE intramolecular (12) con la neurofisiina aislada, así como con insulina y con lisozima, y luego del NOE intermolecular (13) en mezclas de neurofisiina con diversos péptidos que se unen a ella.

Aparentemente el NOE podía utilizarse para efectuar estudios estructurales en macromoléculas del mismo modo que venía haciéndose con moléculas pequeñas. Sin embargo, un artículo de Herman Berendsen (14) ponía en duda dicha posibilidad. En efecto, si el factor NOE $f_3(I)$ es -1 la irradiación del espín I produce una saturación total del espín S, que a su vez saturará el espín próximo T, que a su vez saturará el espín U, que a su vez ... Finalmente todos los espines de la macromolécula terminarán saturados, en un fenómeno de difusión, independientemente de cuál sea su distancia al espín I irradiado. Incluso aunque no se alcance el valor -1 para el efecto, el NOE perderá su especificidad, puesto que el efecto llega a espines lejanos a I, el espín irradiado. La solución que apuntaba Berendsen consistía en tener en cuenta la disminución inicial de la magnetización, es decir sustituir el NOE de estado estacionario por el NOE transitorio, un experimento que ya había considerado Solomon (4). Puesto que la velocidad inicial de generación del NOE $f_3(I)$ depende exclusivamente del término de relajación cruzada σ_{IS} se recuperaría la especificidad. Kurt Wüthrich puso en práctica esa alternativa con dos experimentos. En el primero de ellos (15), que denominó *transient NOE*, en lugar de irradiar un espín, se invierte su magnetización mediante un pulso selectivo de 180°. Efectuando experimentos en los que la medida de la magnetización se efectúa mediante un pulso de observación aplicado un tiempo variable tras el pulso selectivo de inversión se sigue la cinética de establecimiento del NOE. El experimento resultaba complicado de aplicar en espectros congestionados, puesto que era difícil aplicar un pulso de 180° suficientemente selectivo. La alternativa fue el experimento de NOE truncado (*truncated driven NOE* o TOE) en el que se irradiaba con muy baja intensidad a la frecuencia adecuada durante un tiempo menor que el requerido para que se estableciera el NOE estacionario antes de efectuar la medida (16). De nuevo la repetición del experimento con tiempos de irradiación variables permitía seguir la cinética del NOE. Dada la baja intensidad de la irradiación era posible conseguir una mayor selectividad que en el experimento de NOE transitorio.

Los experimentos propuestos por Wüthrich tuvieron muy poca vida, puesto que casi inmediatamente Jan Jeener y Richard Ernst propusieron un experimento bidimensional (17) que eliminaba la mayor parte de los inconvenientes de los métodos previos. La gestación del experimento, denominado inicialmente 2D NOE y posteriormente NOESY, la cuenta Jeener del modo siguiente (18): *In 1977, Richard Ernst was describing the many different ways of using 2D NMR in such a clear and systematic presentation that it soon struck me that my original goal, investigating spin-lattice relaxation, was absent from the list but could be implemented 'easily' (by the method now called NOESY, much simpler than my original dreams). I mentioned this to Ernst at the NMR Gordon Conference. He asked whether we intended to develop the method in Brussels; the answer was 'no' for lack of practice and of suitable instrumentation, and I was delighted to accept the proposal of developing NOESY as a joint project between Zurich and Brussels.* Curiosamente el artículo publicado como consecuencia de esta colaboración (17) se centraba en la aplicación al estudio del intercambio

químico, aunque contenía un pequeño apartado en el que, identificando la constante de velocidad del intercambio con la velocidad de relajación cruzada, mostraba que también era útil para determinar el efecto Overhauser nuclear. Posteriormente Ernst publicaría la teoría completa del experimento aplicado a la determinación de los NOEs (19) así como, en colaboración con Wüthrich, su aplicación en el caso de una proteína (20).

El experimento NOESY presentaba grandes ventajas sobre los experimentos monodimensionales, tales como la obtención de todos los efectos NOE en un único experimento o la ausencia de problemas de selectividad de la irradiación, por lo que su uso se extendió rápidamente, en especial en el estudio de macromoléculas. Sin embargo, el NOE presenta una limitación. Para moléculas de tamaño intermedio, para las que $\omega\tau_c \approx 1$, el término de relajación cruzada es muy pequeño con lo que el efecto Overhauser es prácticamente inexistente. Para superar esta limitación Bothner-By y colaboradores desarrollaron en 1984 un tipo diferente de experimento en el que se mide la relajación cruzada entre componentes de la magnetización perpendiculares al campo magnético estático (21). El modo de lograrlo consiste en anclar la magnetización a un eje del plano xy mediante la aplicación de un campo de radiofrecuencia. El nombre original del experimento fue el de *Cross relaxation Appropriate for Minimolecules Emulated by Locked SPINs* (CAMELSPIN), destacando el hecho de que independientemente de la masa molecular el signo del efecto es el mismo que el de las moléculas pequeñas en el caso del NOE (*Camel spin* es, además, una de las figuras de giro del patinaje sobre hielo, deporte que había practicado la esposa de Bothner-By). El efecto, además de permitir el estudio de moléculas de tamaño intermedio, presentaba la ventaja de distinguir por su diferente signo el efecto de la relajación cruzada del efecto del intercambio químico, que en el caso de macromoléculas producen señales de correlación del mismo signo en el experimento NOESY. Poco después, en un artículo (22) en el que mostraba la contaminación de este tipo de espectros con señales debidas a transferencia Hartmann-Hahn (TOCSY), Ad Bax propondría para el experimento el nombre de *Rotating-frame Overhauser Enhancement Spectroscopy* (ROESY) para resaltar la semejanza con el experimento NOESY. Este segundo nombre terminaría por imponerse al propuesto por Bothner-By.

Casi exclusivamente los experimentos NOE que se utilizan son del tipo homonuclear en protón. Aunque hace cerca de 50 años que Jun Uzawa propusiera los experimentos NOE heteronucleares (23), estos han tenido poco recorrido por diversas causas. Por un lado, la detección de espines X es menos sensible que la del protón, especialmente si el espín X es de un núcleo de baja abundancia natural. Por otro, la velocidad de crecimiento del NOE heteronuclear, σ_{XH} , es más lenta que la tasa interprotónica correspondiente por un factor de $(\gamma_H/\gamma_X)^2$ para la misma distancia internuclear. Finalmente, en muchos casos la relajación del espín de un núcleo X está dominada por el protón enlazado directamente con él. Por ello los NOEs generados por otros protones más alejados, que son los que aportan información relevante, son débiles. Un caso, sin embargo, en el que estos experimentos proporcionan información significativa es el de los carbonos cuaternarios (23), que no presentan el último de los inconvenientes comentados.

Los procesos de intercambio químico afectan a los espectros de RMN. En el caso de dos resonancias vinculadas por un intercambio químico más rápido que la relajación longitudinal, si una de ellas recibe un efecto NOE, el intercambio transferirá el efecto a la segunda resonancia. Un caso particularmente interesante de la influencia del intercambio es el de la unión de un ligando a una

macromolécula. La velocidad de relajación cruzada de un ligando que intercambia entre el estado libre y el unido viene dada por

$$\langle \sigma \rangle = x_f \sigma_f + x_b \sigma_b$$

donde x_f y x_b son las fracciones molares del ligando libre y del unido. Puesto que σ_b es mucho mayor que σ_f , resulta posible producir situaciones en las que el crecimiento del NOE venga determinado por el estado unido. Además, esto se puede conseguir con relaciones ligando:macromolécula relativamente grandes, con lo que las señales del ligando son estrechas y casi idénticas a las del ligando libre; en consecuencia, se asignan fácilmente. Dado que los NOEs generados en la especie unida se observan en la libre, el experimento (que normalmente es un NOESY convencional) se conoce con el nombre de NOE transferido (*Transferred NOE*). Los NOEs transferidos intraligando se pueden utilizar para derivar la conformación que adopta el ligando en el complejo (24). Si además se observan NOEs intermoleculares macromolécula-ligando se obtiene información sobre los sitios de contacto entre el ligando y la macromolécula en el complejo. El experimento solo es útil en determinado intervalo de constantes de disociación. A valores de K_d inferiores a 1 mM, el TRNOE cae a cero porque no hay suficiente ligando unido para producir un efecto apreciable (x_b próximo a 0). Por el contrario, a valores de K_d superiores a aproximadamente 10 nM, la velocidad de disociación es tan lenta que el ligando unido casi nunca se disocia del complejo, y el NOE debido a σ_b desaparece por efecto de T_1 .

Referencias

1. Citado en A.W. Overhauser, *Dynamic Nuclear Polarization*, en *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance* (D.M. Grant, R.K. Harris, eds), Vol 1: *Historical Perspectives*, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, 1996.
2. A.W. Overhauser, *Polarization of Nuclei in Metals*, *Phys. Rev.*, 92, 411-415, 1953.
3. T.R. Carver, C.P. Slichter, *Polarization of Nuclear Spins in Metals*, *Phys. Rev.*, 92, 212-213, 1953.
4. I. Solomon, *Relaxation Processes in a System of Two Spins*, *Phys. Rev.*, 99, 559-565, 1955.
5. I. Solomon, N. Bloembergen, *Nuclear Magnetic Interactions in the HF Molecule*, *J. Chem. Phys.*, 25, 261-266, 1956.
6. E.G. Paul, D.M. Grant, *Carbon-13 Magnetic Resonance. I. Improved Carbon-13 Magnetic Resonance Spectra Obtained by Proton Decoupling and Rapid Sample Spinning*, *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 2977-2983, 1964.
7. F.A.L. Anet, A.J.R. Bourn, *Nuclear Magnetic Resonance Spectral Assignments from Nuclear Overhauser Effects*, *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 5250-5251, 1965.
8. K. Nakanishi, *The Ginkgolides*, *Pure Appl. Chem.*, 14, 89-113, 1967; M. C. Woods, I. Miura, Y. Nakadaira, A. Terahara, M. Maruyama, K. Nakanishi, *The Ginkgolides. V. Some Aspects of their NMR Spectra*, *Tetrahedron Lett.*, 8, 321-326, 1967.
9. R. Kaiser, *Intermolecular Nuclear Overhauser Effect in Liquid Solutions*, *J. Chem. Phys.*, 42, 1838-1839, 1965.
10. J.H. Noggle, R.E. Schirmer, *The Nuclear Overhauser Effect. Chemical Applications*, Academic Press, New York and London, 1971.
11. R.A. Bell, J.K. Saunders, *Positive and negative intramolecular nuclear Overhauser effects in an all-proton system*, *Can. J. Chem.* 46, 3421-4323, 1968.

12. P. Balaram, A.A. Bothner-By, J. Dadok, *Negative Nuclear Overhauser Effects as Probes of Macromolecular Structure*, J. Am. Chem. Soc., 94, 4015-4017, 1972.
13. P. Balaram, A.A. Bothner-By, E. Breslow, *Localization of tyrosine at the binding site of neurophysin II by negative nuclear Overhauser effects*, J. Am. Chem. Soc., 94, 4017-4018, 1972.
14. A. Kalk, H.J.C Berendsen, *Proton Magnetic Relaxation and Spin Diffusion in Proteins*, J. Magn. Reson., 24, 343-366, 1976.
15. S.L. Gordon, K. Wüthrich, *Transient Proton-Proton Overhauser Effects in Horse Cytochrome c*, J. Am. Chem. Soc., 100, 7094-7096, 1978.
16. G. Wagner, K. Wüthrich, *Truncated Driven Nuclear Overhauser Effect (TOE). A New Technique for Studies of Selective ^1H - ^1H Overhauser Effects in the Presence of Spin Diffusion*, J. Magn. Reson., 33, 675-680, 1979.
17. J. Jeener, B.H. Meier, P. Bachmann, R.R. Ernst, *Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy*, J. Chem. Phys., 71, 4546-4553, 1979.
18. J. Jeener, *Reminiscences about the Early Days of 2D NMR*, en *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance* (D.M. Grant, R.K. Harris, eds), Vol 1: *Historical Perspectives*, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, 1996.
19. S. Macura, R.R. Ernst, *Elucidation of cross relaxation in liquids by two-dimensional N.M.R. spectroscopy*, Mol. Phys., 41, 95-117, 1980.
20. A. Kumar, R.R. Ernst, K. Wüthrich, *A Two-dimensional Nuclear Overhauser Enhancement (2D NOE) Experiment for the Elucidation of Complete Proton-Proton Cross-Relaxation Networks in Biological Macromolecules*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 95, 1-6, 1980.
21. A.A. Bothner-By, R.L. Stephens, J.-M. Lee, C.D. Warren, R.W. Jeanloz, *Structure Determination of a Tetrasaccharide: Transient Nuclear Overhauser Effects in the Rotating Frame*, J. Am. Chem. Soc., 106, 811-813, 1984.
22. A. Bax, D.G. Davies, *Practical Aspects of Two-Dimensional Transverse NOE Spectroscopy*, J. Magn. Reson., 63, 207-213, 1985.
23. J. Uzawa, S. Takeuchi, *Application of Selective ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ Nuclear Overhauser Effects with Low-Power ^1H Irradiation in Carbon-13 NMR Spectroscopy*, Org. Magn. Reson., 11, 502-506, 1978.
24. J.P. Albrand, B. Birdsall, J. Feeney, G.C.K. Roberts, A.S.V. Burgen, *The Use of Transferred Nuclear Overhauser Effects in the Study of the Conformations of Small Molecules Bound to Proteins*, Int. J. Biol. Macromol., 1, 37-41, 1979.