

Historias de la RMN

Jorge Santoro

22. Acoplamiento dipolares residuales

Una de las primeras investigaciones que realizó Isidor Rabi con su método de resonancia magnética en haces moleculares fue el estudio del espectro del hidrógeno en estado gaseoso (1,2). Para el orto- H_2 encontró seis líneas, lo que atribuyó a la existencia del acoplamiento espín-rotación y de un acoplamiento dipolar entre los espines de ambos núcleos de hidrógeno (hay dos transiciones del espín nuclear total, $-1 \rightarrow 0$ y $0 \rightarrow 1$, para cada estado del momento angular de rotación, 1, 0 y -1). Tras la llegada de la RMN en materia condensada el grupo de Edward Purcell reinvestigó el espectro del hidrógeno (3) utilizando gas a temperatura ambiente y a presiones de 10 a 30 atmósferas. En todos los casos encontró una única señal de resonancia. Acertadamente atribuyó el hecho a que, como consecuencia del movimiento browniano, el campo local creado por un espín sobre el otro fluctúa rápidamente y se promedia a un valor nulo. Indicaba, además, que el proceso debía ser una fuente importante de relajación. Sugería, por último, que el mismo proceso debía ocurrir en líquidos y, posiblemente, en sólidos no cristalinos, lo que justificaría el corto tiempo de relajación encontrado para la parafina, la sustancia con la que había llevado a cabo la primera detección de RMN en fase condensada.

La "desaparición" del acoplamiento dipolar en el caso de gases, líquidos y disoluciones permite obtener espectros relativamente sencillos. En sólidos, por el contrario, el acoplamiento dipolar, aunque complica los espectros, puede proporcionar información geométrica valiosa. Esta posibilidad la puso de manifiesto George Pake, un estudiante de Purcell, en un estudio de un monocristal de yeso (4). Puesto que el acoplamiento dipolar depende de la distancia entre los dos espines acoplados y del ángulo entre el eje internuclear y el campo magnético B_0 , estudiando la dependencia del desdoblamiento de la señal de resonancia con la orientación del monocristal de yeso pudo determinar con precisión la distancia entre los dos átomos de hidrógeno del agua de cristalización. En el mismo artículo ponía de manifiesto que en el caso del polvo de yeso, en el que dicho eje internuclear adopta orientaciones diferentes para cada molécula, la señal debía ser un doblete extremadamente ancho, con una forma conocida posteriormente como doblete de Pake. El éxito del estudio de Pake radicaba en el hecho de que en el caso del yeso los espines nucleares se encuentran muy aislados, de modo que el único acoplamiento dipolar a considerar es el existente entre los dos protones de la molécula de agua. La situación general, sin embargo, es más compleja; cada espín se acopla con un número elevado de otros espines, lo que, en general da lugar a señales muy anchas, formadas por multitud de componentes no resueltas.

La situación resultante era que la información que proporciona el acoplamiento dipolar se perdía en el caso de líquidos y gases y que en los sólidos tan solo se podía obtener en unos pocos casos sencillos. En 1963 Alfred Saupe mostró el camino para recuperar la información geométrica que proporcionan los acoplamientos dipolares en el caso de disoluciones (5-7). La solución propuesta consistía en el uso de cristales líquidos nemáticos. En presencia de un campo magnético las moléculas de un cristal líquido tienden a orientarse del mismo modo, con lo que el promediado que se produce en líquidos no es total y el acoplamiento dipolar no se reduce a cero. Los espectros de cristales líquidos, por ello, son complejos con multitud de líneas de muy baja intensidad. La idea de Saupe fue

que podían estudiarse moléculas disueltas en cristales líquidos. El ordenamiento del cristal líquido se transferiría parcialmente a la molécula disuelta, que en las proximidades de una molécula del cristal líquido no podría adoptar todas las orientaciones espaciales por impedimento estérico. El ordenamiento parcial de la molécula se podía describir mediante un tensor de orientación, conocido posteriormente como la matriz de Saupe. El método reunía la ventaja de la RMN de estado sólido, al proporcionar información estructural a través de las interacciones dipolares, con la reducida anchura de línea de la RMN del estado líquido. El alineamiento producido, sin embargo, era muy importante, del orden del 10%, por lo que los espectros eran complejos (aunque reducidos, la mayoría de los acoplamiento dipolares eran mucho mayores que los escalares). Con los cristales líquidos probados en las décadas siguientes los espectros mostraban siempre un acoplamiento fuerte, con lo que su análisis resultaba extremadamente complejo. Debido a ello su uso quedó restringido al estudio de moléculas simples, con no más de una media docena de núcleos diferentes químicamente.

Matriz de Saupe

El acoplamiento dipolar entre los espines i y j es $D_{ij} = D_{\max} \cdot (3\cos^2(\varphi) - 1)/2$, donde φ es el ángulo que forma el eje internuclear r_{ij} con el campo magnético B_0 . Los vectores columna unitarios v y b en la dirección de r_{ij} y B_0 , respectivamente, en un sistema de ejes arbitrario son:

$v^t = (\cos(\alpha_x), \cos(\alpha_y), \cos(\alpha_z))$; $b^t = (\cos(\beta_x), \cos(\beta_y), \cos(\beta_z))$
 donde α_k y β_k son los ángulos que forman r_{ij} y B_0 con el eje k , respectivamente, y t indica transposición. Se cumple:

$$\cos(\varphi) = v^t b = b^t v \quad ; \quad \cos^2(\varphi) = v^t b b^t v$$

Considerando el sistema de ejes fijo en la molécula el vector v es constante y el vector b varía en el tiempo debido al movimiento browniano. El promedio de $(3\cos^2(\varphi) - 1)/2$ es

$$\langle 3\cos^2(\varphi) - 1 \rangle / 2 = \langle 3v^t b b^t v - v^t E v \rangle / 2 = v^t \langle (3b b^t - E) \rangle / 2 = v$$

donde E es la matriz unidad. El término entre corchetes es la matriz de Saupe o matriz de alineamiento, S , de elementos

$$S_{ij} = \langle (3 \cos(\beta_i) \cos(\beta_j) - \delta_{ij}) / 2 \rangle$$

En el sistema de ejes principales, PAS, la matriz S , de traza nula, es diagonal y de elementos

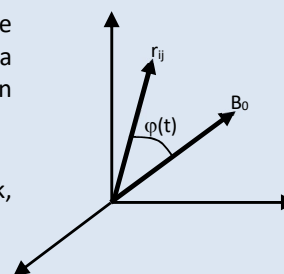
$$S_{ii} = 3A_{ii} / 2$$

donde A_{ii} es la desviación del valor medio de $\cos^2(\beta_i)$ respecto a una reorientación isotrópica, $\langle \cos^2(\beta_i) \rangle = 1/3 + A_{ii}$. Por convención se toma el PAS de modo que $|S_{zz}| \geq |S_{yy}| \geq |S_{xx}|$. Expresando v^t en coordenadas polares, $v^t = (\sin\theta \cos\phi, \sin\theta \sin\phi, \cos\theta)$ se llega a un valor del acoplamiento dipolar residual de

$$D_{ij} = D_a [(3\cos^2\theta - 1) + 3/2 R \sin^2\theta \cos 2\phi]$$

donde $D_a = D_{\max} A_a / 2$, $A_a = 3A_{zz} / 2 = S_{zz}$ y $R = (A_{xx} - A_{yy}) / A_a$ es la ronicidad.

Algunos autores utilizan expresiones equivalentes en función de los S_{ii} y/o del parámetro de asimetría de S , $\eta = (S_{xx} - S_{yy}) / S_{zz}$.



La aplicabilidad general del método de Saupe hacía necesario encontrar métodos de alineamiento del soluto menos drásticos. En este sentido Lohman y MacLean mostraron (8) que las moléculas con anisotropía de la susceptibilidad magnética se orientan parcialmente de modo espontáneo en presencia de un campo magnético. El alineamiento, proporcional a la anisotropía de la susceptibilidad magnética y al cuadrado del campo magnético, es muy pequeño y estos autores, con un campo de 9,3 teslas, tan solo fueron capaces de observar el desdoblamiento debido al acoplamiento cuadrupolar en moléculas deuteradas (8,9). La llegada de espectrómetros con imanes de 14,1 T (600 MHz para el protón) permitió al grupo de Aksel Bothner-By observar acoplamientos dipolares residuales debidos a dicho alineamiento espontáneo (10,11). Años después James

Prestegard, comparando espectros a 500 MHz (11,75 T) y 750 MHz (17,6 T), determinó los acoplamientos dipolares residuales en la mioglobina orientada espontáneamente (12), gracias fundamentalmente al paramagnetismo del átomo de hierro. Desgraciadamente, incluso con campos magnéticos más intensos que los usados por Prestegard, el efecto es muy pequeño salvo en unos pocos sistemas favorables. La gran contribución del artículo de Prestegard fue la de poner de manifiesto que los acoplamientos dipolares residuales proporcionaban una información complementaria a la de los NOEs para la determinación de la estructura molecular. En efecto, mientras que los NOEs proporcionan una información local (a corta distancia), los acoplamientos dipolares residuales tienen un carácter global, ya que restringen las orientaciones de los enlaces en relación con un marco común (el sistema de ejes principales del tensor de alineamiento).

El grupo de Ad Bax decidió comprobar si era posible observar el efecto del alineamiento espontáneo en proteínas diamagnéticas, en las que la anisotropía del tensor de susceptibilidad magnética es muy pequeña. Para ello determinaron los acoplamientos $^1J_{\text{NH}}$ en ubiquitina a tres campos magnéticos, 8,5 T (360 MHz), 11,75 T (500 MHz) y 14,1 T (600 MHz), utilizando un método con el que se alcanza una gran precisión en la medida (13). Las diferencias en los acoplamientos entre los espectros de 360 MHz y de 600 MHz resultaron estar comprendidas entre +0,06 Hz y -0,24 Hz, con una imprecisión que estimaban en tan solo 0,02 Hz. Los resultados estaban de acuerdo con la estructura tridimensional de la ubiquitina determinada por rayos X. La medida de los acoplamientos $^1J_{\text{NH}}$ con tanta precisión en otros sistemas suponía un tremendo desafío, por lo que buscaron un modo de alineamiento alternativo que fuera más eficaz que el espontáneo. Decidieron sondear un sistema desarrollado por Sanders y Prestegard para el estudio de moléculas lipófilas (14,15). El sistema consiste en una mezcla de fosfolípidos de cadena larga con un detergente. En la relación molar adecuada, estos agregados adoptan una fase laminar de bicapas, que se ordenan en el campo magnético con la normal a la bicapa perpendicular al campo magnético. Este tipo de sistema había sido utilizado para estudiar moléculas asociadas a la bicela (15,16). La idea del grupo de Bax fue que al disolver una molécula no esférica en un disolvente que contenga bicelas orientadas en relación al campo magnético se transferiría un grado de alineamiento al soluto, puesto que en las proximidades de la bicela la orientación del soluto estaría restringida por impedimentos estéricos. Probada su idea con ubiquitina (17,18) consiguieron alineamientos del orden de 10^{-3} , lo que daba lugar a acoplamientos dipolares residuales D_{NH} entre +10 y -18 Hz, dos órdenes de magnitud mayores que los correspondientes al alineamiento espontáneo (13). Midieron también los acoplamientos dipolares residuales $D_{\text{CaH}\alpha}$ y $D_{\text{CaC}'}$ (18). En todos los casos los valores obtenidos mostraban una excelente correlación con los calculados a partir de la estructura tridimensional de la proteína. Además, el tensor de alineamiento era prácticamente colineal con el tensor de difusión traslacional, lo que indicaba que el alineamiento se producía por impedimentos estéricos y no por una interacción con las bicelas.

Muy pronto Prestegard mostró la utilidad del método de Tjandra y Bax en moléculas de tamaño intermedio y señaló las posibles ventajas de los acoplamientos dipolares residuales (19). Primero, el acoplamiento depende de la distancia como $1/r^3$, en lugar de la dependencia $1/r^6$ del NOE. Esto hace que el efecto pueda extenderse a un mayor rango de distancias. En segundo lugar, el acoplamiento proporciona también información angular. Además, mostraba que este tipo de información puede obtenerse también de acoplamientos dipolares residuales $^1\text{H}-^1\text{H}$.

Aunque muy útiles, las bicelas también tienen algunas desventajas. Los fosfolípidos se hidrolizan en poco tiempo, días si el pH no se mantiene cercano a 6,5, y la formación del cristal líquido requiere temperaturas elevadas, por encima de 35 °C. Se buscaron por ello otros cristales líquidos compatibles con la RMN, fundamentalmente para el estudio de macromoléculas biológicas. Uno de los más interesantes es el bacteriófago filamentoso Pf1, introducido por Arthur Pardi (20). Pf1 posee una carga superficial neta importante. Como resultado, la interacción electrostática entre el fago y la proteína del soluto suele ser el origen principal del alineamiento. Esto hace que Pf1 sea un complemento ideal de medios que den lugar a alineamiento estérico. Además, el fago se mantiene alineado en un amplio intervalo de temperaturas, 5-45 °C, es muy estable y se puede eliminar de la disolución mediante ultracentrifugación. Casi simultáneamente con la propuesta de Pardi el grupo de Marius Clore mostró la utilidad general de los virus con forma de varilla para el alineamiento (21), presentando ejemplos del uso del fago fd y del virus del mosaico del tabaco.

Un par de años después se propuso otro método de alineamiento que tampoco utiliza cristales líquidos; el uso de geles tensionados. La idea original tenía casi 20 años. Bertrand Deloche y Edward Samulski habían mostrado en 1981 que en el caso de moléculas orgánicas disueltas en un elastómero se observaba la aparición del acoplamiento cuadrupolar en el espectro de deuterio al estirar el polímero (22). Independientemente, los grupos de Robert Tycko (23) y de Stephan Grzesiek (24) propusieron el año 2000 el uso de geles de poliácridamida para inducir el alineamiento de proteínas. El origen del alineamiento es el siguiente. El soluto entra en los poros del gel por difusión. Si a continuación se aplica una tensión al gel, sus cavidades, aproximadamente esféricas, se acortan o alargan en la dirección z (dependiendo de que la tensión se aplique longitudinal o radialmente), lo que genera barreras estéricas anisótropas. Con posterioridad se han propuesto otros geles compatibles con diversos disolventes distintos del agua para el análisis de moléculas orgánicas. Incluso un gel compatible con la mayoría de disolventes (25). Un caso curioso es el uso de geles tensionados obtenidos a partir de golosinas, las conocidas como ositos de goma, o de gelatina alimentaria (26).

Además del desarrollo de medios de alineamiento, otro avance ha sido el desarrollo de métodos capaces de predecir el tensor de alineamiento, y con ello de los acoplamientos dipolares residuales, a partir de la estructura molecular. Su utilidad es múltiple. Algunas aplicaciones han sido las siguientes: la diferenciación entre estados monoméricos y diméricos (27), la determinación de la orientación relativa de dominios de proteínas (28,29), la validación de estructuras tridimensionales (30), la caracterización de proteínas desnaturalizadas o intrínsecamente desordenadas (31) o la caracterización de sistemas dinámicos (32).

El primer avance en ese sentido se debe al grupo de Prestegard, que mostró que si se dispone de la estructura tridimensional de una molécula se puede calcular el tensor de alineamiento a partir de cinco o más acoplamientos dipolares observados (28). El método se ha aplicado para diferenciar enantiómeros (33). El grupo de Bax diseñó un procedimiento de cálculo que no requiere utilizar valores observados (34). El soluto se simula como un conjunto de moléculas distribuidas uniformemente y orientadas al azar, de las cuales se elimina la fracción que choca estéricamente con la matriz ordenada de partículas del medio de orientación. La matriz de alineamiento es el promedio de todas las matrices de orientación individuales. Posteriormente el método se ha extendido al caso en que la orientación incluye interacciones electrostáticas (35). Un método de cálculo más elegante para el caso de alineamiento estérico en proteínas es el que desarrollaron los grupos de Miquel Pons

y José García de la Torre (36). Considerando la proteína como un elipsoide prolato obtuvieron expresiones analíticas para el tensor de alineamiento. Posteriormente se han propuesto otros métodos de cálculo de los acoplamientos dipolares residuales debidos a ordenamiento estérico, bien a partir del tensor de inercia (37), bien a partir del tensor de giro (38). A diferencia de los métodos citados anteriormente (34-36) estos métodos no tienen en cuenta el medio de orientación, por lo que sus resultados deben multiplicarse por un factor de escala para ajustarlos a los valores experimentales.

Referencias

1. J.M.B. Kellog, I.I. Rabi, N.F. Ramsay, J.R. Zacharias, *An Electrical Quadrupole Moment of the Deuteron*, Phys. Rev., 55, 318-319, 1939.
2. J.M.B. Kellog, I.I. Rabi, N.F. Ramsay, J.R. Zacharias, *The Magnetic Moment of the Proton and the Deuteron. The Radiofrequency Spectra of H₂ in Various Magnetic Fields*, Phys. Rev., 56, 728-743, 1939.
3. E.M. Purcell, R.V. Pound, N. Bloembergen, *Nuclear Magnetic Resonance Absorption in Hydrogen Gas*, Phys. Rev., 70, 986-987, 1946.
4. G.E. Pake, *Nuclear Resonance Absorption in Hydrated Crystals: Fine Structure of the Proton Line*, J. Chem. Phys., 16, 327-336, 1948.
5. A. Saupe, G. Englert, *High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Orientated Molecules*, Phys. Rev. Lett., 11, 462-464, 1963.
6. A. Saupe, *Kernresonanzen in kristallinen Flüssigkeiten und in Kristallinlösungen. Teil I*, Z. Naturforsch., 19, 161-171, 1964.
7. G. Englert, A. Saupe, *Hochaufgelöste Protonenresonanzspektren mit direkter magnetischer Dipol-Dipol-Wechselwirkung, Teil II*, Z. Naturforsch., 19, 172-177, 1964.
8. J.A.B. Lohman, C. MacLean, *Alignment Effects on High Resolution NMR spectra, Induced by the Magnetic Field*, Chem. Phys., 35, 269-274, 1978.
9. J.A.B. Lohman, C. MacLean, *The Determination of Magnetic Susceptibility Anisotropies from Quadrupolar Interactions in NMR*, J. Magn. Reson., 42, 5-13, 1981.
10. A.A. Bothner-By, P.J. Dommelle, C. Gayathri, *Ultra-High-Field NMR Spectroscopy: Observation of Proton-Proton Dipolar Coupling in Paramagnetic Bis[tolyltris(pyrazolyl)borato]cobalt(II)*, J. Am. Chem. Soc., 103, 5602-5603, 1981.
11. C. Gayathri, A.A. Bothner-By, P.C.M. VanZijl, C. MacLean, *Dipolar magnetic-field effects in NMR-spectra of liquids*, Chem. Phys. Lett., 87, 192-196, 1982.
12. J.R. Tolman, J.M. Flanagan, M.A. Kennedy, J.H. Prestegard, *Nuclear Magnetic Dipole Interactions in Field-Oriented Proteins: Information for Structure Determination in Solution*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 9279-9283, 1995.
13. N. Tjandra, S. Grzesiek, A. Bax, *Magnetic Field Dependence of Nitrogen-Proton J Splittings in ¹⁵N-Enriched Human Ubiquitin Resulting from Relaxation Interference and Residual Dipolar Coupling*, J. Am. Chem. Soc., 118, 6264-6272, 1996.
14. C.R. Sanders, J.H. Prestegard, *Magnetically Orientable Phospholipid Bilayers containing Small Amounts of a Bile-Salt Analog, CHAPSO*, Biophys. J., 58, 447-460, 1990.
15. C.R. Sanders, B.J. Hare, K.P. Howard, J.H. Prestegard, *Magnetically-Oriented Phospholipid Micelles as a Tool for the Study of Membrane-Associated Molecules*, Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc., 26, 421-444, 1994.

16. G. Metz, K.P. Howard, W.B.S. van Liemt, J.H. Prestegard, J. Lutgenburg, S.O. Smith, *NMR Studies of Ubiquinone Location in Oriented Model Membranes: Evidence for a Single Motionally-Averaged Population*, J. Am. Chem. Soc., 117, 564-565, 1995.
17. A. Bax, N. Tjandra, *High-resolution heteronuclear NMR of human ubiquitin in an aqueous liquid crystalline medium*, J. Biomol. NMR, 10, 289-292, 1997.
18. N. Tjandra, A. Bax, *Direct measurement of distances and angles in biomolecules by NMR in a dilute liquid crystalline medium*, Science, 278, 1111-1114, 1997.
19. P.J. Bolton, J.H. Prestegard, *COSY Cross-Peaks from ^1H - ^1H Dipolar Couplings in NMR Spectra of Field Oriented Oligosaccharides*, J. Am. Chem. Soc., 120, 9366-9367, 1998.
20. M.R. Hansen, L. Mueller, A. Pardi, *Tunable Alignment of Macromolecules by Filamentous Phage yields Dipolar Coupling Interactions*, Nat. Struct. Biol., 5, 1065-1074, 1998.
21. G.M. Clore, M.R. Starich, A.M. Gronenborn, *Measurement of residual dipolar couplings of macromolecules aligned in the nematic phase of a colloidal suspension of rod-shaped viruses*, J. Am. Chem. Soc., 120, 10571-10572, 1998.
22. B. Deloche, E.T. Samulski, *Short-Range Nematic-like Orientational Order in Strained Elastomers: A Deuterium Magnetic Resonance Study*, Macromolecules, 14, 575-591, 1981.
23. R. Tycko, F.J. Blanco, Y. Ishii, *Alignment of Biopolymers in Strained Gels: A New Way to Create Detectable Dipole-Dipole Couplings in High-Resolution Biomolecular NMR*, J. Am. Chem. Soc., 122, 9340-9341, 2000.
24. H.J. Sass, G. Musco, S.J. Stahl, P.T. Wingfield, S. Grzesiek, *Solution NMR of Proteins within Polyacrylamide Gels: Diffusional Properties and Residual Alignment by Mechanical Stress or Embedding of Oriented Purple Membranes*. J. Biomol. NMR, 18, 303-309, 2000.
25. C. Merle, G. Kummerlöwe, J.C. Freudenberger, F. Halbach, W. Stöwer, C.L. v. Gostomski, J.Höpfner, T.Beskers, M. Wilhelm, B. Luy, *Crosslinked Poly(ethylene oxide) as a Versatile Alignment Medium for the Measurement of Residual Anisotropic NMR Parameters*, Angew. Chem. Int. Ed., 52, 10309-10312, 2013.
26. K. Kobzar, H. Kessler, B. Luy, *Stretched Gelatin Gels as Chiral Alignment Media for the Discrimination of Enantiomers by NMR Spectroscopy*, Angew. Chem. Int. Ed., 44, 3145-3147, 2005.
27. M. Zweckstetter, A. Bax, *Prediction of Sterically Induced Alignment in a Dilute Liquid Crystalline Phase: Aid to Protein Structure Determination by NMR*, J. Am. Chem. Soc., 122, 3791-3792, 2000.
28. J.A. Losonczi, M. Andrec, M.W.F. Fischer, J.H. Prestegard, *Order Matrix Analysis of Residual Dipolar Couplings Using Singular Value Decomposition*, J. Magn. Reson., 138, 334-342, 1999.
29. Bewley, C.A. & Clore, G.M. *Determination of the Relative Orientation of the Two Halves of the Domain-Swapped Dimer of Cyanovirin-N in Solution Using Dipolar Couplings and Rigid Body Minimization*, J. Am. Chem. Soc., 122, 6009-6016, 2000.
30. Bewley, C.A. *Rapid Validation of the Overall Structure of an Internal Domain-Swapped Mutant of the Anti-HIV Protein Cyanovirin-N Using Residual Dipolar Couplings*, J. Am. Chem. Soc., 123, 1014-1015, 2001.
31. P. Bernadó, L. Blanchard, P. Timmins, D. Marion, R.W.H. Ruigrok, M. Blackledge, *A Structural Model for Unfolded Proteins from Residual Dipolar Couplings and Small-Angle X-Ray Scattering*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102, 17002-17007, 2005.
32. H.F. Azurmendi, M. Martin-Pastor, C.A. Bush, *Conformational Studies of Lewis X and Lewis A Trisaccharides Using NMR Residual Dipolar Couplings*, Biopolymers, 63, 89-98, 2002.
33. V.M. Marathias, G.J. Tawa, I. Goljer, A.C. Bach II, *Stereochemical Identification of (R)- and (S)-Ibuprofen Using Residual Dipolar Couplings, NMR, and Modeling*, Chirality, 19, 741-750, 2007.

34. M. Zweckstetter, A. Bax, *Prediction of Sterically Induced Alignment in a Dilute Liquid-Crystalline Phase: Aid to Protein Structure Determination by NMR*, J. Am. Chem. Soc., 122, 3791-3792, 2000.
35. M. Zweckstetter, G. Hummer, A. Bax, *Prediction of Charge-Induced Molecular Alignment of Biomolecules Dissolved in Dilute Liquid-Crystalline Phases*, Biophys. J., 86, 3444-3460, 2004.
36. M.X. Fernandes, P. Bernadó, M. Pons, J. García de la Torre, *An Analytical Solution to the Problem of the Orientation of Rigid Particles by Planar Obstacles. Application to Membrane Systems and to the Calculation of Dipolar Couplings in Protein NMR Spectroscopy*, J. Am. Chem. Soc., 123, 12037-12047, 2001.
37. H.F. Azurmendi, C.A. Bush, *Tracking Alignment from the Moment of Inertia Tensor (TRAMITE) of Biomolecules in Neutral Dilute Liquid Crystal Solutions*, J. Am. Chem. Soc., 124, 2426-2427, 2002.
38. A. Almond, J.B. Axelsen, *Physical Interpretation of Residual Dipolar Couplings in Neutral Aligned Media*, J. Am. Chem. Soc., 124, 9986-9987, 2002.