

Mikroskopischer Mechanismus der spezifischen Adhäsion von Peptiden an Halbleitersubstraten**

Michael Bachmann, Karsten Goede,* Annette G. Beck-Sickinger, Marius Grundmann, Anders Irbäck und Wolfhard Janke

Das Interesse an den Grenzflächen von Hybridsystemen aus weicher molekularer Materie und harten Festkörpersubstraten ist in den letzten Jahren stark gewachsen, da solche Systeme leicht zugängliche Kandidaten für neuartige Biosensoren oder elektronische Bauelemente sein könnten. Der enorme Fortschritt in hochauflösender Mikroskopie und im biochemischen Konstruieren von Makromolekülen ist die wichtigste Voraussetzung für die Untersuchung von Hybridsystemen und ihren potenziellen Anwendungen.^[1,2] In diesem Zusammenhang interessiert besonders die Selbstorganisation und Adhäsion von Polymeren, Proteinen oder proteinartigen synthetischen Peptiden auf festen Materialien wie Metallen,^[3,4] Halbleitern,^[5–8] Kohlenstoff und Kohlenstoff-Nanoröhren^[9,10] und Siliciumdioxid.^[11,12] Peptid- und substratspezifische Bindungsaffinität ist besonders relevant für Mustererkennungsprozesse.^[13,14] Systematische experimentelle Stu-

dien zur Bindung individueller Aminosäuren auf ausgewählten Materialien wurden bereits durchgeführt,^[15] und grundlegende theoretische Überlegungen anhand vereinfachter Polymer-Substrat- und Protein-Substrat-Modelle haben komplexe Pseudophasendiagramme vorhergesagt.^[16,17]

Durch Bakteriophagen-Display-Experimente wurden nur einige Peptidsequenzen aus einer Bibliothek von 10^9 Sequenzen mit jeweils zwölf Aminosäureresten gefunden, die eine besonders starke Neigung zur Adhäsion an GaAs(100)-Oberflächen aufweisen.^[5] Die Sequenzspezifität der Bindungsstärke ist eine bemerkenswerte Eigenschaft, aber damit bleibt noch die Frage offen, wie diese Eigenschaft mit der individuellen Struktur der Peptidmoleküle zusammenhängt. Wir erwarteten, dass Punktmutationen der Aminosäuresequenz die Bindungsaffinität verändern können, und konnten nun zeigen, dass Prolin ein potenzieller Kandidat ist, um die Adsorptionsneigung auf reinen Si(100)-Oberflächen umzuschalten. Silicium ist einer der technologisch bedeutendsten Halbleiter, da es unter anderem als Trägersubstrat in der Mikroelektronik dient. Daher sind seine elektronischen und Oberflächeneigenschaften, z.B. Oxidationsprozesse an Luft^[18,19] und Wasser,^[20,21] die Bildung von Hybridstrukturen an der Oberfläche und charakteristische Merkmale der Bindung kleiner organischer Verbindungen an seine Oberfläche,^[6,22] gut untersucht.

Um Peptid-Silicium-Grenzflächen kontrolliert aufbauen zu können, haben wir zunächst umfangreiche Computersimulationen eines neuartigen Hybridmodells durchgeführt. Anschließend wurden die theoretisch vorhergesagten, durch selektierte Mutationen hervorgerufenen Trends in der Änderung der Adsorptionsneigung überprüft, indem mittels multipler Festphasenpeptidsynthese die vorgeschlagenen spezifischen Mutanten synthetisiert und rasterkraftmikroskopisch (AFM) untersucht wurden (siehe Abbildung 1 und die detaillierten Beschreibungen in den Hintergrundinformationen).

Das in unseren Computersimulationen genutzte Hybridmodell besteht aus zwei Teilen, die zur Energie $E(X)$ einer Peptidkonformation X beitragen: erstens der Energie des Peptids selbst – repräsentiert durch das alle Atome umfassende Modell mit implizitem Lösungsmittel –,^[23,24] zweitens der Wechselwirkung des Peptids mit dem Substrat, für die ein vereinfachtes Modell verwendet wurde. Das Peptidmodell berücksichtigt die intrinsische Eigenvolumenabstoßung zwischen allen Atomen, ein lokales Potential, das die Wechselwirkung zwischen benachbarten NH- und CO-Teilladungen beschreibt, die Wasserstoffbrückenbindungsenergie und die Wechselwirkung zwischen hydrophoben Seitenketten.^[23,24] Das Substratmodell besteht nur aus atomaren Schichten mit

[*] Dr. M. Bachmann
Institut für Festkörperforschung, Theorie II
Forschungszentrum Jülich (Deutschland)
Dr. K. Goede, Prof. M. Grundmann
Institut für Experimentelle Physik II, Universität Leipzig
Linnéstraße 5, 04103 Leipzig (Deutschland)
Fax: (+49) 341-9732668
E-Mail: goede@physik.uni-leipzig.de
Prof. A. G. Beck-Sickinger
Institut für Biochemie, Universität Leipzig (Deutschland)
Dr. M. Bachmann, Prof. A. Irbäck
Computational Biology & Biological Physics
Department of Astronomy and Theoretical Physics
Lund University (Schweden)
Dr. M. Bachmann, Prof. W. Janke
Institut für Theoretische Physik, Universität Leipzig (Deutschland)

[**] Wir danken Simon Mitternacht für hilfreiche Diskussionen über das Peptidmodell und C. Dammann für die Synthese und Reinigung der Peptide. M.B. dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und der Wenner-Gren-Stiftung (Schweden) für Forschungsstipendien und dem deutsch-israelischen „Umbrella“-Programm für Unterstützung. M.B., A.I. und W.J. erkennen dankbar die Unterstützung des deutsch-schwedischen DAAD-STINT-Personal-Austauschprogrammes an. Diese Arbeit wurde durch die DFG (Fördernr. JA 483/24-1/2/3), die Leipziger Exzellenz-Graduierten-Schule „BuildMoNa“, TR 67A4, und das deutsch-französische DFH-UFA-Graduiertenkolleg (Fördernr. CDFA-02-07) unterstützt. Supercomputer-Rechenzeit wurde am John-von-Neumann-Institut für Computing (NIC) am Forschungszentrum Jülich in Anspruch genommen (Fördernummern hlz11, jiff39 und jiff43).

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (die genaue Modellierung des Hybridsystems, die multikanonische Simulationsmethode und Details zu Peptidsynthese und Probenpräparation sowie zu den AFM-Experimenten) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201000984> zu finden.

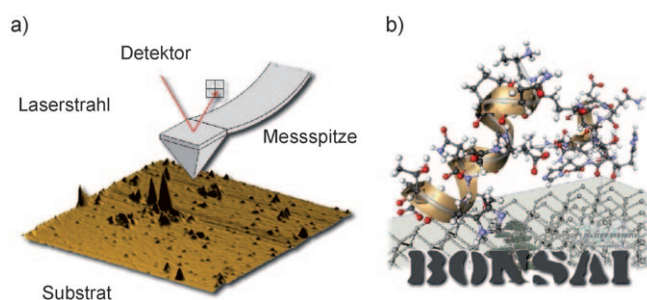


Abbildung 1. a) Prinzip der Rasterkraftmikroskopie. Das wiedergegebene AFM-Bild zeigt S1-Peptid-Cluster auf einer oxidierten, $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ großen Si(100)-Oberfläche. Der höchste Cluster ist 56 nm hoch. b) Computersimulationen wurden mit dem BONSAI-Paket durchgeführt, das wir für Monte-Carlo-Simulationen von Peptidmodellen entwickelt haben. Der Schnappschuss zeigt, wie S1-Peptide nahe einer Si-Oberfläche helicale Segmente bilden. BONSAI: bio-organic nucleation and self-assembly at interfaces.

oberflächenspezifischer atomarer Dichte und ebener Oberflächenstruktur. Die atomare Dichte dieser Schichten hängt von der kristallographischen Orientierung des Substratkristalls an der Oberfläche ab. Basierend auf diesen Annahmen wurde ein generischer, nichtkovalenter Lennard-Jones-Ansatz zur Modellierung der Wechselwirkung zwischen Peptidatomen und Oberflächenschicht verwendet.^[9,25] Wir haben dieses Modell mittels multikanonischer Computersimulationen^[26] studiert, aus denen wir eine kanonische Statistik für jede Temperatur T erhalten. Die Zustandssumme ist damit gegeben durch $Z = \int DX e^{-E(X)/RT}$, wobei DX das formale Integrationsmaß für alle möglichen Zustände X im Raum der Freiheitsgrade ist. Das statistische Mittel jeder Größe O ist $\langle O \rangle = Z^{-1} \int DX O(X) e^{-E(X)/RT}$. In unseren Simulationen wurde das Integral durch Mittelung über eine große Zahl an Konformationen abgeschätzt (in jedem Lauf ungefähr 10^9 Aktualisierungen), die entsprechend ihres multikanonischen Gewichts selektiert wurden. Die präzise Modellierung des Hybridsystems und die multikanonische Simulationsmethode werden in den Hintergrundinformationen beschrieben.

Das Peptid mit der Aminosäuresequenz S1 (Abbildung 2a) ist ein gutes Beispiel für eine substratspezifische Adsorption: In jüngsten vergleichenden Adsorptionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass – trotz starker Bindung von S1 an GaAs(100)-Oberflächen – die Bindung an Si(100)-Oberflächen sehr schwach ausfällt^[7,8] und dass die Adhäsion deutlich stärker wird, wenn das Substrat oxidiert ist. Dies belegen die AFM-Bilder von S1 auf einem desoxidierten (links) und einem oxidierten Substrat (rechts) in Abbildung 2a. Peptidbedeckte Regionen erscheinen in diesen Aufnahmen hell. Ein quantitatives Maß für die Bindungsneigung ist der Peptidadhäsionskoeffizient (PAC), also der von Peptidclustern bedeckte Oberflächenanteil.^[7,8] Die PACs wurden hier durch eine Clusteranalyse der einzelnen AFM-Bilder bestimmt. Um die Abhängigkeit von der jeweiligen Peptidkonzentration in der Lösung zu umgehen, führten wir den kalibrierten PAC (cPAC) ein als das Verhältnis der PACs für das Binden des Peptids an Si(100) und GaAs(100) unter identischen Bedingungen. GaAs wurde als Referenzsubstrat

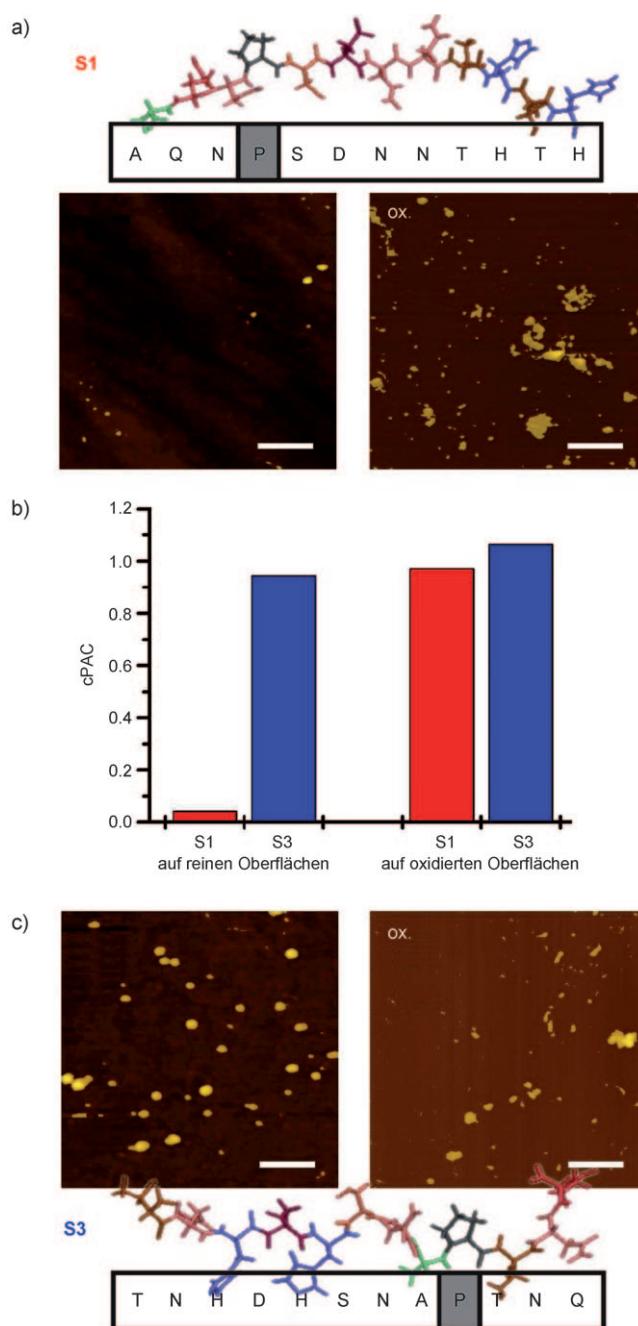


Abbildung 2. Adsorption an reinen und oxidierten Substraten. AFM-Bilder der Peptide a) S1 und c) S3, adsorbiert an reinen (desoxidierten) und oxidierten Si(100)-Oberflächen. Der AFM-Maßstabsbalken ist $1 \mu\text{m}$. b) Kalibrierte Peptid-Adhäsionskoeffizienten (cPACs) für die Adsorption von S1 und S3 an reinem und an oxidiertem Si(100)-Substrat. Verwendete Aminosäuren: A: Alanin, D: Asparaginsäure, H: Histidin, N: Asparagin, P: Prolin, Q: Glutamin, S: Serin, T: Threonin.

gewählt, weil die hier betrachteten Peptide vergleichsweise gut an dieses Substrat binden. Die cPAC-Aufstellungen in Abbildung 2b zeigen deutlich den Unterschied in der Bindungsaffinität zu reinen und oxidierten Substraten.

Ganz anders verhält sich die Sequenz S3 (die Sequenz und die AFM-Bilder sind in Abbildung 2c gezeigt), die eine Zu-

fallspermutation des Aminosäuregehalts von S1 ist. Die Neigung von S3 zur Bindung an Si(100) ist überraschenderweise viel größer als die von S1,^[8] und die Bindungsaffinitäten zu reinen und oxidierten Si(100)-Substraten sind gleich stark, wie die cPAC-Aufstellung für S3 in Abbildung 2b belegt. In jüngsten Computeranalysen der Eigenschaften dieser Peptide in Lösung haben wir gezeigt, dass das Faltungsverhalten in Lösung ebenfalls bemerkenswerte Unterschiede aufweist.^[27] Dies gilt auch für Raumtemperatur, bei der in beiden Fällen die Besetzung der strukturell verschiedenen Grundzustandsfaltungen eher klein ist.

Ein weiteres auffallendes Resultat dieser früheren computerbasierten Studie ist die qualitative Imitierung des Faltungsverhaltens von S1 und S3 durch die jeweils andere Sequenz, wenn diese zuvor einer Paarmutation der einmal auftretenden Aminosäure Prolin unterzogen wurden.^[27] Die mutierte Sequenz S1' unterscheidet sich von S1 nur durch den Austausch von Prolin an Position 4 und Threonin an Position 9 (Abbildung 3a). Entsprechend wurde S3' aus S3 abgeleitet, indem Prolin an Position 9 und Asparaginsäure an Position 4 ausgetauscht wurden (Abbildung 3a). Diese Ersetzungen wurden durch die Erwartung motiviert, dass die besonderen sterischen Eigenschaften von Prolin, und also auch sein Platz in der Sequenz, die Faltung beeinflussen. Tatsächlich kam das Faltungsverhalten von S1' in Lösung dem von S3 nahe, wohingegen sich S3' eher wie S1 verhielt.^[27] Bevor wir die Frage beantworten können, ob diese Ergebnisse auch für das Adsorptionsverhalten auf Si(100) wesentlich sind, müssen wir kurz mikroskopische Eigenschaften von desoxidiertem Si(100) diskutieren.

In unseren Experimenten wurden die Si(100)-Oberflächen zunächst in einer Lösung von Ammoniumfluorid und Flusssäure gereinigt.^[7,8] Anschließend fand der Adsorptionsprozess in entionisiertem Wasser statt. Diese standardisierte Prozedur gewährleistet die weitgehende Oxidfreiheit der Si-Oberfläche, die deshalb stark hydrophob ist^[18,20] (für Probenpräparation und experimentelle Details siehe die Hintergrundinformationen). Die anfänglich nach dem Ätzen vorhandenen Si-F-Bindungen werden während des Abspülens in entionisiertem Wasser durch Si-H-Bindungen ersetzt. Nach dem Trocknen der Proben fanden die AFM-Messungen statt. Wenngleich der Oxidationsprozess auch in Wasser voranschreitet,^[20,21] gab es doch klare Anzeichen dafür, dass die Hydrophobie der Si-Proben während der Peptidadsorption weitgehend intakt blieb (großer Kontaktwinkel von Wassertropfen nach der Probenentnahme aus der Lösung). Ebenfalls bekannt ist die vergleichsweise raue Oberfläche von Si nach der Behandlung mit HF.^[22] Die Reaktivität der Oberfläche wird also von atomaren Stufen beeinflusst, die abhängig sind von der Verkipfung und Ausrichtung des Substrats. Das macht eine atomistische Modellierung schwierig. Dies gilt umso mehr, als Si(100)-2 × 1-Oberflächen auch zur Bildung von Si-Si-Dimeren mit hochreaktiven freien Bindungsarmen an der Oberfläche neigen.^[6] Aufgrund obiger Betrachtungen und Beschreibungen scheint es plausibel, dass diese Bindungsarme hauptsächlich durch Wasserstoff abgesättigt werden und somit Hydridschichten bilden.^[6,20,22] Es ist zu betonen, dass sich unter diesen Bedingungen die Oberflächenstruktur von Si(100) substanziell von der von oxidiertem

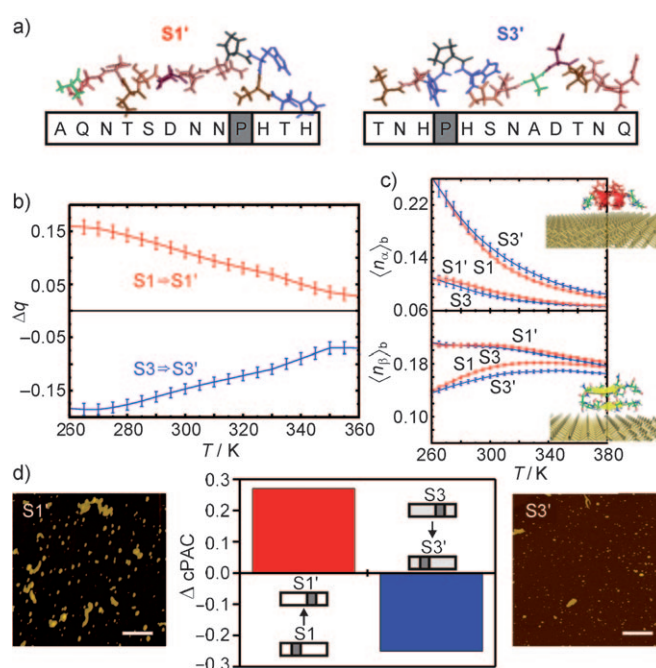


Abbildung 3. Invertierte Adsorptionsneigung prolinmutierter Peptide (für Details siehe Text). a) Prolinmutierte Sequenzen S1' und S3'. b) Adsorptionsparameter Δq als Funktion der Temperatur aus unseren Computersimulationen. c) Anteil an α -helicaler $\langle \eta_\alpha \rangle_\beta$ und β -Faltblattstruktur $\langle \eta_\beta \rangle_\beta$ bei den gebundenen Peptiden. Die in den Einschüben gezeigten Beispielkonformationen sind die in den Simulationen identifizierten Strukturen des energetischen Grundzustands (der allerdings bei Raumtemperatur nur schwach besetzt ist), und sie repräsentieren die vorrangigen Trends in der Sekundärstrukturbildung. d) Bestätigung dieser Vorgänge durch AFM-Experimente bei Raumtemperatur. Der AFM-Maßstabsbalken ist 1 μm .

Si(100) unterscheidet, die polar und damit letztlich hydrophil ist.^[18] Ein wichtiges Ergebnis von Abbildung 2 ist die weitgehende Substratunabhängigkeit der Bindung von S1 und S3 an oxidierte GaAs(100)- oder Si(100)-Oberflächen ($cPAC \approx 1$). Die obenliegende Sauerstoffschicht schirmt also das Substrat gegen das Peptid ab. Die unterschiedlichen Adhäsionsneigungen an reinen Substraten (siehe auch Abbildung 2) führen zu der Feststellung, dass die Oxidation während der Peptidadsorption noch nicht stark vorangeschritten ist. Wir folgern, dass die Schlüsselrolle von Wasser in der Verlangsamung der Oxidation der Si(100)-Oberfläche besteht, dass aber sein Einfluss auf den eigentlichen Bindungsvorgang eher klein ist. Insbesondere erwarten wir keine Bildung von stabilen Wasserschichten zwischen Adsorbat und Substrat.

Diese charakteristischen Eigenschaften von HF-behandelten Si(100)-Oberflächen in entionisiertem Wasser gehen schließlich in die Definition des Hybridmodells der Peptid-Silicium-Grenzfläche ein (für Details siehe den Abschnitt „Modellierung und Computersimulation“ in den Hintergrundinformationen), das als Basis für unsere theoretische Analyse und für die Interpretation der Spezifität der Peptidadhäsion an diesen Oberflächen dient.

Um das Ausmaß der Adsorption zu quantifizieren, definieren wir das Verhältnis aus der Zahl schwerer Atome (=

Nicht-Wasserstoffatome) innerhalb einer Entfernung $z_i \leq 5 \text{ \AA}$ zum Substrat, n_h , und der Gesamtzahl schwerer Atome, N_h , als den Adsorptionsparameter $q = n_h/N_h$. Die Temperaturabhängigkeit seiner relativen Änderung bei Prolinmutation, $\Delta q(Sn \rightarrow Sn') = (\langle q(Sn') \rangle - \langle q(Sn) \rangle) / \langle q(Sn) \rangle$ (mit $n = 1, 3$), ist in Abbildung 3b zu sehen. Zentrales Ergebnis ist der durch diese selektive Mutation bewirkte Anstieg der Adsorptionsaffinität zu Si(100) beim Übergang von S1 nach S1' [$\Delta q(S1 \rightarrow S1') \approx +0.11$ bei $T = 300 \text{ K}$] und die Verringerung derselben um etwa den gleichen Wert beim Übergang von S3 zu S3' [$\Delta q(S3 \rightarrow S3') \approx -0.15$ bei $T = 300 \text{ K}$].

Dieses Resultat steht in direktem Zusammenhang mit der Tendenz, Sekundärstrukturen zu bilden. In Abbildung 3c ist der Gehalt an α -helicaler [Verhältnis der Ramachandran-Diederwinkel der inneren zehn Reste mit $\phi \in (-90^\circ, -30^\circ)$ und $\psi \in (-77^\circ, -17^\circ)$] und an β -Faltblattstruktur [Diederwinkel im Intervall $\phi \in (-150^\circ, -90^\circ)$ und $\psi \in (+90^\circ, +150^\circ)$] für die gebundenen Peptide aufgetragen. Wir definieren ein Peptid in einer bestimmten Konformation als an das Substrat gebunden, wenn zumindest 2% seiner schweren Atome innerhalb von $5 \text{ \AA}$ Entfernung zur Oberfläche vorliegen. Es zeigt sich eine klare Tendenz, dass S1 und S3' eher im α -Zustand und S3 und S1' eher im β -Zustand vorliegen. Allerdings sind die geringen Gehalte an Sekundärstrukturen denen recht ähnlich, die wir für Peptide in Lösung ohne Substrat gefunden haben^[27] und die qualitativ mit der Analyse von CD-Spektren konsistent waren.^[8] Es ist bemerkenswert, dass hier offensichtlich Sekundärstrukturen in der Nähe des Si(100)-Substrats nicht stabilisiert werden, wohingegen in Adsorptionsexperimenten andernorts bei der Bindung eines synthetischen Peptids an Silica-Nanopartikel eine solche Stabilisierung von α -Helices beobachtet wurde.^[12]

Die in Abbildung 3d dargestellten experimentellen Ergebnisse bestätigen im Vergleich mit denen in Abbildung 2a und c eindeutig, dass die Prolinmutation von S1 tatsächlich die Bindungsaffinität zu Si(100) steigert, während eine inverse Mutation die Bindung von S3 um etwa denselben Wert verringert: Die Substratbedeckung für S1' ist erhöht und die für S3' verringert. Eine Messung der zugehörigen cPACs ergibt $\Delta cPAC(S1 \rightarrow S1') = cPAC(S1') - cPAC(S1) \approx +0.27$ und $\Delta cPAC(S3 \rightarrow S3') \approx -0.25$. Dies bestätigt eindrucksvoll unsere theoretische Vorhersage aus den Simulationen des Hybridmodells.

Wir haben somit mittels Computersimulationen und bestätigender AFM-Experimente gezeigt, dass eine ausgewählte Prolinmutation in kurzen Peptiden die Bindungsaffinität zu einem desoxidierten Siliciumsubstrat deutlich, vorhersagbar und spezifisch ändern kann. Wir konnten zudem zeigen, dass dieses Verhalten teilweise in einer qualitativ andersartigen Faltung der mutierten Sequenzen in Substratnähe begründet ist. Die Prolinposition beeinflusst höchstwahrscheinlich auch die Aggregationseigenschaften^[8] der Peptide und dadurch wiederum indirekt ihr Bindungsverhalten. Aufbauend auf Simulationen des Verhaltens von Einzelmolekülen wie den hier diskutierten wird das Simulieren gekoppelten Faltens und Aggregierens während des Bindens demzufolge ein lohnender Gegenstand künftiger Forschung

sein. Ein tieferes Verständnis der allgemeinen Prinzipien von Bindungsspezifität bildet einen ersten entscheidenden Schritt hin zum Design von Nanosensoren mit spezifischen biomedizinischen Anwendungen. Die Ausweitung unserer Studie auf wirkliche Biomoleküle ist daher naheliegend, und eine experimentelle Identifizierung eindeutiger Belege für die Adsorption von Bioproteinen an Nanoarrays wird eine wichtige Voraussetzung für zukünftige Anwendungen solcher Hybridsysteme in der Biotechnologie sein.

Eingegangen am 16. Februar 2010

Online veröffentlicht am 4. November 2010

Stichwörter: Halbleiter · Hybride Grenzflächen · Monte-Carlo-Simulationen · Peptidadsorption · Rastersondenverfahren

- [1] M. Sarikaya, C. Tamerler, A. K.-Y. Jen, K. Schulten, F. Baneyx, *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 577–585.
- [2] J. J. Gray, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 110–115.
- [3] S. Brown, *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15*, 269–272.
- [4] L. Delle Site, C. F. Abrams, A. Alavi, K. Kremer, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, 156103.
- [5] S. R. Whaley, D. S. English, E. L. Hu, P. F. Barbara, A. M. Belcher, *Nature* **2000**, *405*, 665–668.
- [6] J. M. Buriak, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1271–1308.
- [7] K. Goede, P. Busch, M. Grundmann, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 2115–2120.
- [8] K. Goede, M. Grundmann, K. Holland-Nell, A. G. Beck-Sicking, *Langmuir* **2006**, *22*, 8104–8108.
- [9] R. Hentschke, *Macromol. Theory Simul.* **1997**, *6*, 287–316.
- [10] S. Wang, E. S. Humphreys, S.-Y. Chung, D. F. Delduco, S. R. Lustig, H. Wang, K. N. Parker, N. W. Rizzo, S. Subramoney, Y.-M. Chiang, A. Jagota, *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 196–200.
- [11] H. Heinz, H. Koerner, K. L. Anderson, R. A. Vaia, B. L. Farmer, *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 5658–5669.
- [12] M. Lundqvist, P. Nygren, B.-H. Jonsson, K. Broo, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 8349–8353; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 8169–8173.
- [13] A. J. Golumbskie, V. S. Pande, A. K. Chakraborty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 11707–11712.
- [14] T. Bogner, A. Degenhard, F. Schmid, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *93*, 268108.
- [15] R. L. Willett, K. W. Baldwin, K. W. West, L. N. Pfeiffer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 7817–7822.
- [16] M. Bachmann, W. Janke, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *95*, 058102.
- [17] M. Bachmann, W. Janke, *Phys. Rev. E* **2006**, *73*, 020901(R).
- [18] R. G. Frieser, *J. Electrochem. Soc.* **1974**, *121*, 669–672.
- [19] A. Hemeryck, N. Richard, A. Estève, M. Djafari Rouhani, *Surf. Sci.* **2007**, *601*, 2339–2343.
- [20] L. Ling, S. Kuwabara, T. Abe, F. Shimura, *J. Appl. Phys.* **1993**, *73*, 3018–3022.
- [21] M. K. Weldon, B. B. Stefanov, K. Raghavachari, Y. J. Chabal, *Phys. Rev. Lett.* **1997**, *79*, 2851–2854.
- [22] Y. J. Chabal, K. Raghavachari, *Phys. Rev. Lett.* **1984**, *53*, 282–285.
- [23] A. Irback, S. Mohanty, *Biophys. J.* **2005**, *88*, 1560–1569.
- [24] A. Irback, S. Mohanty, *J. Comput. Chem.* **2006**, *27*, 1548–1555.
- [25] W. A. Steele, *Surf. Sci.* **1973**, *36*, 317–352.
- [26] B. A. Berg, T. Neuhaus, *Phys. Rev. Lett.* **1992**, *68*, 9–12.
- [27] S. Mitternacht, S. Schnabel, M. Bachmann, W. Janke, A. Irback, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 4355–4360.