

Alignment change of lipid molecules in lipid bilayers by an antimicrobial peptide protegrin-1

Chul Kim[★]

Department of Chemistry, Hannam University, Daejeon 305-811, Korea

(Received April 4, 2015; Revised April 12, 2015; Accepted April 12, 2015)

지질 이중막에 결합된 항균성 펩타이드 protegrin-1에 의한 지질 분자의 정렬도 변화

김 철[★]

한남대학교 생명나노 과학대학 화학과

(2015. 4. 4. 접수, 2015. 4. 12. 수정, 2015. 4. 12. 승인)

Abstract: Changes in antimicrobial peptide-lipid mixtures were investigated using ³¹P solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. An antimicrobial peptide, protegrin-1, and phosphatidylcholine were deposited on a thin cover glass and incubated under a relative humidity of 95%. The changes in the mixtures were observed after hydration or air-drying. How repetitive hydration and drying changed the phase of the sample was also observed. The degrees of disruption of the well-aligned bilayers of phosphatidylcholine were determined quantitatively by simulating the experimental spectra. The peptide-lipid mixtures changed reversibly after hydration and drying, and the samples reached an equilibrium state after several repetitions.

요 약: 얇은 유리판 위에 인지질과 항균성 펩타이드 protegrin-1을 혼합한 용액을 도포시키고, 95% 상대습도 하에서 방치함으로써 형성된 지질-펩타이드 혼합체의 변화를 ³¹P 고체 핵자기 공명분광법을 이용하여 조사하였다. 수화에 의한 변화와 공기 중에서 건조한 상태에서의 변화 그리고 반복적인 수화와 건조 과정에 의한 시료의 변화를 관찰하였다. 각 과정에서의 지질 이중막의 파괴 정도를 이론적 모사 과정을 통해 정량적으로 확인하였다. 지질-펩타이드 혼합체는 수화와 건조를 통해 가역적인 변화를 일으켰고, 반복과정에 의해 가장 안정한 평형 상태로 접근하고 있음을 확인하였다.

Key words: antimicrobial peptide, protegrin-1, hydration, phase change

1. 서 론

항균성 펩타이드 (antimicrobial peptide)는 생명체의

면역 펩타이드로서 양서류, 균류, 벌의 독, 나방, 그리고 돼지의 내장 등 다양한 생물 중에서 발견되어지고 있다.¹⁻³ 이 펩타이드들은 특정 수용 단백질의 도움 없

[★] Corresponding author

Phone : +82-(0)42-629-8875 Fax : +82-(0)42-629-8811

E-mail : chulkim@hnu.kr

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

이 세균의 세포막에 직접 결합하여 그 세포막을 파괴시키는 것이 매우 중요한 특징이다.⁴

항균성 펩타이드는 지질막에 결합하였을 때의 펩타이드의 2차원 구조, 농도 및 전하 밀도와 같은 펩타이드의 물리화학적 성질과 함께 생체 지질막의 표면전하, 수화도, 지질의 종류 등의 생체 지질막의 성질에 따라 다양한 메커니즘에 의해 생체막을 파괴하는 것으로 알려져 있다.⁵⁻⁷ 이러한 메커니즘으로는 중에는 micellization model, carpet model, membrane thinning model, toroidal pore model, barrel-stave model 등이 제안되었다.^{4,8,9} Micellization model은 항균성 펩타이드가 생체막을 이루는 지질 분자를 micelle 형태로 만드는 과정이며, carpet model은 생체막 표면에 있는 지질 분자의 친수성 부분과 결합하여 지질막을 파괴시키는 과정을 거친다. Membrane thinning model은 생체막에 지질 분자가 결합하여 생체막의 두께를 얇게 만드는 것이며, toroidal pore model은 항균성 펩타이드가 생체막에 원환체 구멍을 만드는 것이고, barrel-stave model은 생체막에 실린더형 구멍을 만드는 것을 말한다.

생체막 표면에서 항균성 펩타이드의 작용을 이해하기 위해 다양한 실험 방법과 분석 방법이 사용되어 오고 있다. 그 중에서도 모델 생체막들은 복잡한 생체막을 단순화하여 생체막의 물리화학적 특성을 이해하는데 매우 효과적이다. 사용되는 생체막의 모델 이중막으로써는 micelle, vesicle, bicelle 등이 있다.¹⁰⁻¹² 항균성 펩타이드의 작용 메커니즘을 확인하고 분석하기 위해서 사용되는 분광법으로는 circular dichroism, neutron diffraction, X-ray diffraction, nuclear magnetic resonance spectroscopy 등으로써 항균작용에 대한 다양한 물리화학적 정보를 제공해주고 있다.^{8,13-16}

본 연구에서는 β -sheet형 구조를 가지는 것으로 알려진 항균성 펩타이드가 지질 이중막에 작용할 때, 지질 이중막이 반복되는 처리과정에 따라 어떠한 상변화를 일으키는지, ³¹P 고체 핵자기공명 (³¹P 고체 NMR) 스펙트럼을 측정하여 연구하였다. 본 연구에서 사용된 protegrin-1 (PG-1, MW = 2154 Da)은 18개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드로서 돼지의 백혈구 등에서 발견되어지는 항균성 펩타이드이다.¹⁷ PG-1은 다양한 세균과 곰팡이에 대한 항균 작용은 물론, HIV-1에 대한 항바이러스 효과도 보여주고 있어 많은 관심을 끌고 있다.¹⁸ PG-1은 생체막에 있는 지질 분자의 종류, 펩타이드의 농도 등에 의해 원환체 구조를 만들 수도 있고, 생체막을 얇게 만드는 효과만을 낼 수도

있는 것으로 알려져 있다.^{13,19-22} 본 연구에서는 PG-1이 잘 정렬된 지질 이중막에 작용할 때, 반복되는 수화/탈수화 과정에 의해 지질 이중막이 어떠한 변화를 일으키는 지 측정함으로써 항균성 펩타이드의 작용에 있어서 수화가 미치는 영향을 파악하고자 하였다.

2. 실험

2.1. 시약

1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (POPC)는 Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA)로부터, 항균성 펩타이드 protegrin-1은 GL Biochem (Shanghai, China)으로부터 구입하여 추가 정제 과정 없이 사용하였다. Trifluoroethanol (TFE), chloroform, 그리고 sodium phosphate dibasic 등은 Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2.2. 시료 제조

4.8 mg POPC 지질을 TFE/chloroform (2/1, v/v) 용액에 녹인 후, 이 용액을 가로와 세로의 길이가 각각 10 mm인 얇은 유리판 위에 떨어뜨린다. 항균성 펩타이드의 지질 파괴 정도를 확인하기 위하여 항균성 펩타이드에 대한 지질 분자의 상대적 농도 비율 (Peptide-to-Lipid ratio, P/L ratio)을 1/80, 1/50, 1/30, 1/20으로 달리하여 실험하였다. 시료를 진공 상태에서 밤새 건조시켜 지질 분자 사이에 남아 있는 극미량의 유기용매를 완전히 제거한다. 건조된 시료에 약 2 μ L의 물을 시료에 직접 첨가한다. 시료를 95%로 상대습도가 유지되는 데시케이터에 약 2 일 간 방치해둔다. 유리판 시료를 10 개 정도를 포개어 준다. 포개어진 유리판을 Parafilm으로 싸고, polyethylene으로 밀봉한다. ³¹P 고체 NMR 스펙트럼을 얻는다. 유리판 시료의 밀봉을 해제하고, 약 2 μ L의 물을 시료에 직접 첨가한다. 시료를 공기 중에서 건조시켜서 ³¹P 고체 NMR 스펙트럼을 얻거나, 95%로 상대습도가 유지되는 데시케이터에서 약 2 일간 방치시킨 후, ³¹P 고체 NMR 스펙트럼을 얻는다. 반복적인 수화-건조 과정의 효과를 확인하기 위해서 유리판 시료의 밀봉을 해제한 후 다시 한번 물을 첨가하고, 데시케이터 안에서 건조한 후, ³¹P 고체 NMR 스펙트럼을 얻는다.

2.3. 고체 핵자기 공명 분광법

³¹P 고체 NMR 스펙트럼은 Bruker MSI-300 분광기

를 이용하여 측정하였다. ^{31}P 스펙트럼의 화학 이동값 (chemical shift)의 기준은 85% H_3PO_4 수용액으로부터 나오는 신호를 0 ppm으로 정하였다. ^{31}P 의 90° 펄스 길이는 5 μs 이고, 쌍극자-쌍극자 상호작용을 없애기 위해 수소핵 채널에 45 kHz 세기의 디커플링(decoupling) 신호를 가했다. 2000번의 반복측정을 통하여 얻어진 스펙트럼의 폭은 17.86 kHz이었다. 고체 NMR 스펙트럼의 측정온도는 25 $^\circ\text{C}$ 이었다.

2.4. 이론적 고찰

지질 분자의 다양한 배향 분포가 만들어 내는 ^{31}P 고체 핵자기 스펙트럼을 다양한 기하학적 분포 모델을 사용하여 모사하였다. 본 연구에서는 유리판 위에서 유리판 방향으로 잘 정렬된 지질 분자와 이 정렬이 깨어진 지질 분자들의 상대적인 분포가 시료의 변화 과정을 통해 어떻게 변해가는지를 확인하고자 하였다. 시료 중에 있는 지질 분자의 방향이 일정하면 하나의 주파수를 가지는 뾰족한 신호선(30 ppm 근처)을 보이지만, 다양한 방향을 가지는 지질 분자들이 분포할 때에는 다양한 형태의 선모양을 나타내게 된다. 따라서, 실험적으로 얻은 스펙트럼의 선모양을 분석함으로써 시료 속의 지질분자들의 배향적 분포를 파악할 수 있다. 특정한 기하학적 모양을 이루는 구조상의 표면에서 지질 분자들이 확산 운동을 함으로써, 분자들의 방향이 시간에 따라 달라지는 상황에서는 핵자기 공명 스펙트럼의 모양이 변하게 되는 부분도 고려하였다.^{22,23} 주어진 스펙트럼을 적절하게 모사하기 위해서는 표면 확산 계수가 10^{-14} m^2/s 정도를 가져야 한다는 것을 모사 과정을 통해 확인하였다. 또한 유리판 표면에서 수직 방향으로 정렬되어 있는 이중막 구조의 경우에도 완벽한 정렬을 가지고 있지 못하고 배향각에 있어서 모자이크 분포를 갖게 된다. 본 연구에서는 가우스 함수로 모자이크 분포를 갖는 것으로 가정하였다. 이 경우 약 30° - 50° 각도의 표준편차를 갖는 것으로 확인되었다. 이론적 모사에 있어서 지질 이중막의 파괴 정도를 계산할 때, 지질 이중막의 배향각이 유리판 수직으로부터 10° 이상 벗어나면 파괴된 것으로 가정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. P/L 비율이 1/80인 시료

이미 지금까지 잘 알려져 있는 바와 같이 1/80의 비율에 있어서도 지질 이중막의 대부분이 파괴되어지는

것을 Fig. 1과 Table 1에서 보는 바와 같이 확인할 수 있었다. Fig. 1은 실험적으로 얻어진 스펙트럼을 이론적으로 모사한 것이고, 그 결과적인 분포는 Table 1에 잘 나와있다. 첫번째의 수화에서는 그 정도가 커서 지질 이중막의 파괴가 컸으나, 반복적인 수화와 방치(95% 상대습도 조건)를 거치면서 지질 이중막의 안정도가 커지는 것을 S80-4 시료로부터 확인할 수 있었다. 30 ppm 근처의 신호는 유리판에 수직 방향으로 잘 정렬되어 있는 POPC 지질 분자로부터 나오는 것이다. 이 신호의 선폭은 지질 이중막의 정렬이 파괴되

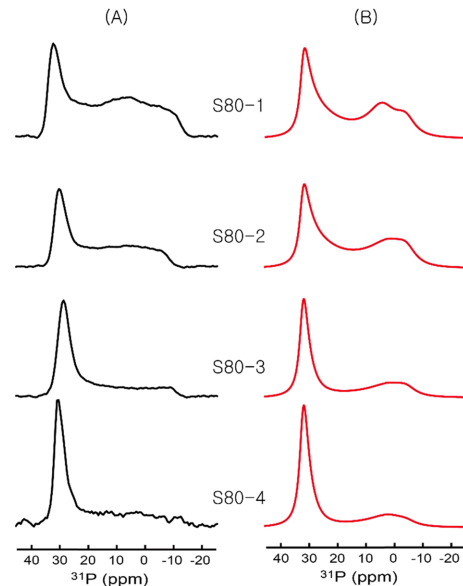


Fig. 1. (A) Experimental and (B) simulated ^{31}P SSNMR spectra of POPC at the P/L ratio of 1/80. Three types of geometrical distributions were used: a mosaic distribution of bilayers, small isotropic micelles, and large aggregates.

Table 1. Percentages of POPC bilayers distorted by a PG-1 at the P/L ratio of 1/80

Phases	Samples			
	S80-1 ^a	S80-2 ^b	S80-3 ^c	S80-4 ^d
Aligned bilayer	19	19	23	48
Disrupted phase	81	81	76	52

^aThe sample that was hydrated and incubated in a desiccator.

^bThe sample that was treated as follows: hydrated, incubated, hydrated, and incubated.

^cThe sample that was treated as follows: hydrated, incubated, hydrated, incubated, and air-dried.

^dThe sample that was treated as follows: hydrated, incubated, hydrated, incubated, air-dried, hydrated, and incubated.

어져 갈수록 커지게 된다. 반복되는 시료의 처리는 PG-1에 의해서 파괴되어지지 않고 남아 있는 지질 이중막의 정렬도를 높인다는 것을 30 ppm 근처 신호의 선풍이 줄어드는 것으로부터 확인할 수 있다. 0 ppm에서 나오는 신호는 무질서한 빠른 속도로 그리고 무질서한 다양한 방향으로 회전하는 지질 분자로부터 나오는 신호이다. 아마도 PG-1과 POPC 분자의 결합체인 작은 micelle 형태의 구조로부터 얻어진다고 예상된다. S80-1 시료에서 0 ppm 신호가 강하게 나오는

것은 초기 시료에서 과도한 수분으로 인해 작은 micelle 형태의 구조물이 만들어지고, 충분한 수용액 조건에서 빠르고 무질서한 회전운동이 이루어지기 때문으로 생각된다. 이 신호는 공기 중에서 건조된 S80-3 시료로부터 얻어진 스펙트럼이 보여주는 것처럼 그 크기가 작아진다. S80-3 시료에서 수분의 감소는 지질 이중막의 형성 및 정렬도의 증가로 이어지는 것을 Table 1을 통해서도 확인할 수 있다.

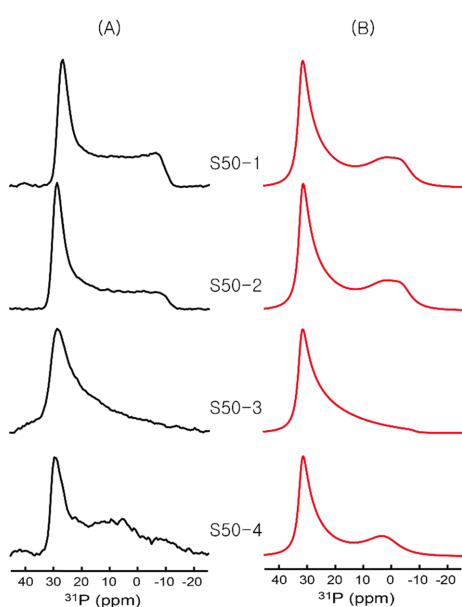


Fig. 2. (A) Experimental and (B) simulated ^{31}P SSNMR spectra of POPC at the P/L ratio of 1/50. Three types of geometrical distributions were used: a mosaic distribution of bilayers, small isotropic micelles, and large aggregates.

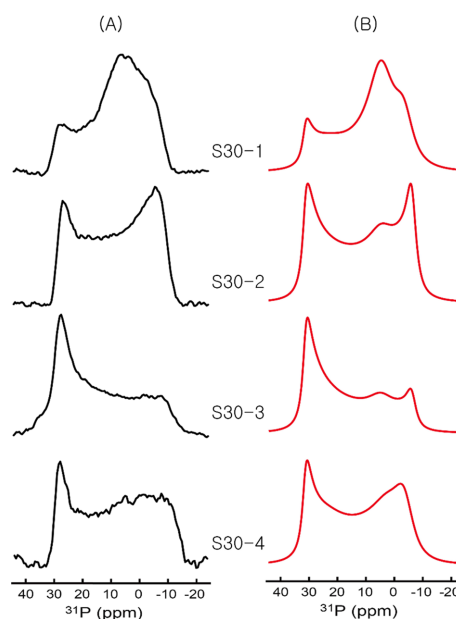


Fig. 3. (A) Experimental and (B) simulated ^{31}P SSNMR spectra of POPC at the P/L ratio of 1/30. Three types of geometrical distributions were used: a mosaic distribution of bilayers, small isotropic micelles, and large aggregates.

Table 2. Percentages of POPC bilayers distorted by a PG-1 at the P/L ratio of 1/50

Phases	Samples			
	S50-1 ^a	S50-2 ^b	S50-3 ^c	S50-4 ^d
Aligned bilayer	20	23	27	27
Disrupted phase	80	76	73	73

^aThe sample that was hydrated and incubated in a desiccator.

^bThe sample that was treated as follows: hydrated, incubated, hydrated, and incubated.

^cThe sample that was treated as follows: hydrated, incubated, hydrated, incubated, and air-dried.

^dThe sample that was treated as follows: hydrated, incubated, hydrated, incubated, air-dried, hydrated, and incubated.

Table 3. Percentages of POPC bilayers distorted by a PG-1 at the P/L ratio of 1/30

Phases	Samples			
	S30-1 ^a	S30-2 ^b	S30-3 ^c	S30-4 ^d
Aligned bilayer	5	9	16	11
Disrupted phase	95	91	84	89

^aThe sample that was hydrated and incubated in a desiccator.

^bThe sample that was treated as follows: hydrated, incubated, hydrated, and incubated.

^cThe sample that was treated as follows: hydrated, incubated, hydrated, incubated, and air-dried.

^dThe sample that was treated as follows: hydrated, incubated, hydrated, incubated, air-dried, hydrated, and incubated.

3.2. P/L 비율이 1/50인 시료

Fig. 2와 Table 2에서 보는 바와 같이 P/L 비율이 1/50로 증가하는 것은 잘 배향된 지질 이중막의 파괴의 증가로 이어지는 못하였다. 하지만, 반복적인 시료 처리에 따른 지질 분자의 배향적 분포의 변화는 크게 일어나지 않는 것을 확인할 수 있었다. S50-3 시료의 경우 30 ppm 근처 신호 선폭의 비대칭적 증가는 지질 이중막의 mosaic 분포의 증가이며, 30~ -15 ppm 사이의 신호 선모양의 특징은 공기 중 건조로 인해 시료 중의 수분이 작아져서 시료 중의 지질 분자의 공간적 회전 운동이 매우 작아져서 생기는 것으로 확인할 수 있었다. 이론적 모사는 이러한 상황을 고려하여 얻어진 것으로 실험적 스펙트럼과 잘 일치하고 있다.

3.3. P/L 비율이 1/30인 시료

P/L 비율을 1/30으로 증가시켰을 때, 스펙트럼의 변화는 Fig. 3에서 보여지는 것처럼 크게 달라지게 된다. Table 3에서 확인할 수 있는 것처럼 지질 이중막의 파

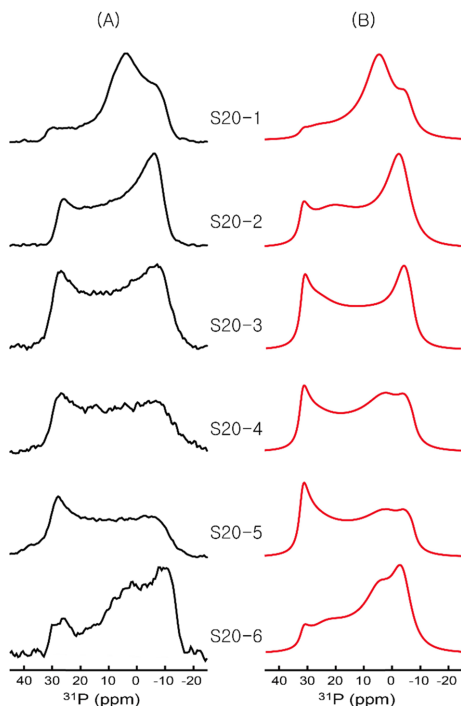


Fig. 4. (A) Experimental and (B) simulated ^{31}P SSNMR spectra of POPC at the P/L ratio of 1/20. Three types of geometrical distributions were used: a mosaic distribution of bilayers, small isotropic micelles, and large aggregates.

Table 4. Percentages of POPC bilayers distorted by a PG-1 at the P/L ratio of 1/20

Phases	Samples					
	S20-1 ^a	S20-2 ^b	S20-3 ^c	S20-4 ^d	S20-5 ^e	S20-6 ^f
Aligned bilayer	1	5	11	5	10	1
Disrupted phase	99	95	89	95	90	99

^aThe sample that was hydrated and incubated in a desiccator.

^bThe sample that was treated as follows: hydrated, incubated, hydrated, and incubated.

^cThe sample that was treated as follows: hydrated, incubated, hydrated, incubated, and air-dried.

^dThe sample that was treated as follows: hydrated, incubated, hydrated, incubated, air-dried, and air-dried.

^eThe sample that was treated as follows: hydrated, incubated, hydrated, incubated, air-dried, air-dried, hydrated, and air-dried.

^fThe sample that was treated as follows: hydrated, incubated, hydrated, incubated, air-dried, air-dried, hydrated, air-dried, hydrated, and incubated.

괴가 90% 이상 이루어진다. 본 연구에서 확인하려고 하였던 대로, 공기 중에서 건조한 이후 시료를 다시 수화시키고 방치시키면 초기 상태와 유사한 상태로 환원되는 것을 확인할 수 있었다.

3.4. P/L 비율이 1/20인 시료

Fig. 4에서 볼 수 있는 바와 같이 P/L 비율이 1/20인 시료의 경우, 1/30인 시료와 매우 유사한 경향을 보여주고 있다. 지질 이중막의 파괴 정도도 약간 크지만 대체적으로 비슷하다. S20-3, S20-4, S20-5 시료처럼 공기 중에서 건조된 시료의 경우에는 30 ppm 근처의 신호가 상대적으로 크다. 이는 지질 이중막이 좀 더 잘 정렬되어져 있다는 의미이다. 그러나 수화시키고 95% 상대습도에서 방치된 경우에는 대부분의 지질 이중막이 파괴되어지는 것을 Table 4로부터 확인할 수 있다. S20 계열의 시료로부터 얻어진 스펙트럼은 반복되는 시료의 처리가 시료 중의 지질 분자들의 상대적 배향에 비가역적인 변화는 일으키지 않는다는 것을 확인시켜주고 있다.

3.5. P/L 비율에 따른 효과 비교

정확한 수치를 제공할 수는 없으나 P/L 비율에 있어서 1/50과 1/30 사이에서 매우 큰 변화를 일으키는 것을 확인하였다. 수분이 충분히 있다하여도 1/50 미만의 P/L 비율에서는 지질 이중막의 상변화가 그 이상의 P/L 비율에 있을 때와 근본적으로 다를 수 확인하였다. 하지만, 충분한 양의 수분은 모든 P/L 비율에

서 굉장히 빠른 속도로 움직이는 micelle 형태의 구조 물을 만들어낸다는 것을 확인할 수 있었다.

4. 결 론

반복적 수화와 건조는 모든 시료를 평형 상태에 도달하게 한다. 반복 과정 중에는 펩타이드-지질 혼합체의 상태가 수분양의 변화에 따라 가역적으로 변한다는 사실을 확인하였다. 지질 이중막의 파괴 정도는 P/L 비율 뿐만 아니라 수분양의 변화에 따라 크게 변한다는 사실을 확인할 수 있었다. 따라서, 수화된 정도에 따른 지질 이중막의 파괴 정도를 좀 더 정량적으로 확인하는 연구를 지속할 필요가 있다고 여겨진다.

감사의 글

이 논문은 2014년도 한남대학교 교비 학술 연구 조성비 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

References

1. R. Latorre and O. Alvarez, *Physiol Rev*, **61**, 77-150 (1981).
2. H. Steiner, D. Hultmark, A. Engstrom, H. Bennich and H. G. Boman, *Nature*, **292**, 246-248 (1981).
3. J. Y. Lee, A. Boman, C. X. Sun, M. Andersson, H. Jornvall, V. Mutt and H. G. Boman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 9159-9162 (1989).
4. M. R. Yeaman and N. Y. Yount, *Pharmacol. Rev.*, **55**, 27-55 (2003).
5. R. Mani, A. J. Waring, R. I. Lehrer and M. Hong, *Biochim. et Biophys. Acta,-biomembr.*, **1716**, 11-18 (2005).
6. Y. Bai, S. Liu, P. Jiang, L. Zhou, J. Li, C. Tang, C. Verma, Y. Mu, R. W. Beuerman and K. Pervushin, *Biochemistry*, **48**, 7229-7239 (2009).
7. Toke, O. *Biopolymers*, **80**, 717-735 (2005).
8. S. J. Ludtke, K. He, W. T. Heller, T. A. Harroun, L. Yang and H. W. Huang, *Biochemistry*, **35**, 13723-13728 (1996).
9. K. Matsuzaki, O. Murase, N. Fujii and K. Miyajima, *Biochemistry*, **35**, 11361-11368 (1996).
10. J. Z. Gesell, M. and S. J. Opella, *J. Biomol. NMR*, **9**, 127-135 (1997).
11. K. Matsuzaki, O. Murase and K. Miyajima, *Biochemistry*, **34**, 12553-12559 (1995).
12. I. Marcotte, L. Wegener Kate, Y.-H. Lam, C. S. Chia Brian, R. R. de Planque Maurits, H. Bowie John, M. Auger and F. Separovic, *Chem. and Phys. of Lipids*, **122**, 107-116 (2003).
13. L. Yang, T. M. Weiss, R. I. Lehrer and H. W. Huang, *Biophys. J.*, **79**, 2002-2007 (2000).
14. C. Munster, A. Spaar, B. Bechinger and T. Salditt, *Biochim. et Biophys. Acta,-biomembr.*, **1562**, 37-44 (2002).
15. R. W. S. Glaser, Durr, C., Wadhwani, U. H. N., Afonin, P., Strandberg, S. E. and A. S. Ulrich, *Biophys. J.*, **88**, 3392-3397 (2005).
16. K. J. Hallock, D. K. Lee and A. Ramamoorthy, *Biophys. J.*, **84**, 3052-3060 (2003).
17. V. N. Kokryakov, S. S. Harwig, E. A. Panyutich, A. A. Shevchenko, G. M. Aleshina, O. V. Shamova, H. A. Korneva and R. I. Lehrer, *FEBS Lett*, **327**, 231-236 (1993).
18. R. L. Fahrner, T. Dieckmann, S. S. L. Harwig, R. I. Lehrer, D. Eisenberg and J. Feigon, *Chem. Biol.*, **3**, 543-550 (1996).
19. S. Yamaguchi, T. Hong, A. Waring, R. I. Lehrer and M. Hong, *Biochemistry*, **41**, 9852-9862 (2002).
20. J. J. Buffy, T. Hong, S. Yamaguchi, A. J. Waring, R. I. Lehrer and M. Hong, *Biophys. J.*, **85**, 2363-2373 (2003).
21. R. Mani, J. J. Buffy, A. J. Waring, R. I. Lehrer and M. Hong, *Biochemistry*, **43**, 13839-13848 (2004).
22. C. Kim, J. Spano, E. K. Park and S. Wi, *Biochim Biophys Acta*, **1788**, 1482-1496 (2009).
23. S. Wi and C. Kim, *J. Phys. Chem. B*, **112**, 11402-11414 (2008).