การติดตามการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างจากการรีดอกซ์ในไซโทโครมซีโดยสเทชันนารี และไทมีรีโซล์วเซอร์เฟสเอ็นฮานซ์อินฟราเรดแอบซอร์บชันสเปกโทรสโกปี

นางสาวณัฐวดี วิสิฐเรืองสกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551

REDOX-LINKED STRUCTURAL CHANGES IN CYTOCHROME C PROBED BY STATIONARY AND TIME-RESOLVED SURFACE ENHANCED INFRARED ABSORPTION SPECTROSCOPY

Miss Nattawadee Wisitruangsakul

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Chemistry
Department of Chemistry
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic year 2008

Thesis Title	REDOX-LINKED STRUCTURAL CHANGES IN CYTOCHROME C PROBED BY STATIONARY AND TIME-RESOLVED SURFACE ENHANCED INFRARED ABSORPTION SPECTROSCOPY
By	Miss Nattawadee Wisitruangsakul
Field of Study	Chemistry
Advisor	Associate Professor Sanong Ekgasit, Ph.D.
Co-Advisor	Ingo Zebger, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

..... Dean of the Faculty of Science
(Professor Supot Hannongbua, Dr. rer. nat.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Associate Professor Sirirat Kokpol, Ph.D.)

..... Advisor
(Associate Professor Sanong Ekgasit, Ph.D.)

..... Co-Advisor
(Ingo Zebger, Ph.D.)

..... Examiner
(Assistant Professor Pornthep Sompornpisut, Ph.D)

..... Examiner
(Assistant Professor Voravee P. Hoven, Ph.D.)

..... Examiner
(Associate Professor Orawon Chailapakul, Ph.D.)

..... External Examiner
(Assistant Professor Toemsak Srikhirin, Ph.D)

ณัฐวดี วิสิฐเรืองสกุล : การติดตามการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างจากการรีดอกซ์ในไซโทโครมซีโดยสเทชันนารีและไทม์รีโซล์วเซอร์เฟสเอ็นฮานซ์อินฟราเรดแอบซอร์บชันสเปกโทรสโกปี. (REDOX-LINKED STRUCTURAL CHANGES IN CYTOCHROME C PROBED BY STATIONARY AND TIME-RESOLVED SURFACE ENHANCED INFRARED ABSORPTION SPECTROSCOPY) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. ดร. สนอง เอกสิทธิ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ดร. อิงโก เซปเกอร์, 136 หน้า.

เซอร์เฟสเอนฮานซ์อินฟราเรดแอบซอร์บชัน (เซียร์รา) สเปกโทรเคมีไฟฟ้าเพื่อศึกษาโปรตีนที่ถูกตรึงอยู่มีข้อได้เปรียบทางด้านความไวของการตอบสนองที่ผิวหน้าและสามารถตรวจสอบโครงสร้างหลักของโปรตีนได้ สำหรับการตรึงแบบไฟฟ้าสถิตนั้น ไซโทโครมซีถูกตรึงอยู่บนขั้วไฟฟ้าที่ทำด้วยทองโดยการยึดจับกับสารประกอบคาร์บอกซิลอัลเคนไทออลที่เรียงตัวกันเป็นชั้นเดียว (SAMs) ในงานวิจัยนี้วิธีเซียร์ราได้ถูกนำมาใช้เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของ SAMs, การเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างและทิศทางการจัดตัวของไซโทโครมซีจากการรีดอกซ์ และเพื่อศึกษาสภาวะที่ผิดธรรมชาติบี 2 ของไซโทโครมซี นอกจากนั้นการประยุกต์ใช้ไทม์รีโซล์วเซียร์ราสเปกโทรสโกปีเพื่อติดตามพลศาสตร์ของไซโทโครมซีที่เกิดควบคู่กับกระบวนการรีดอกซ์ได้ตีพิมพ์เป็นครั้งแรก

การเปลี่ยนแปลงทางสเปกตรัมของ SAMs ภายใต้การควบคุมศักย์ไฟฟ้าแสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงแบบผันกลับภายในช่วงศักย์ไฟฟ้าที่สนใจ (-0.1 ถึง +0.2 โวลต์) ซึ่งไม่รบกวนการตรวจสอบไซโทโครมซีที่ยึดจับกับ SAMs อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงทางสเปกตรัมแบบไม่ผันกลับสามารถตรวจพบที่ศักย์ไฟฟ้านอกช่วงดังกล่าว โดยขึ้นกับความยาวของ SAMs โครงสร้างบีตาเทิร์น 3 (1673 ซม$^{-1}$) และ บีตาเทิร์น 2/แอลฟาฮีลิกซ์ (1660 ซม$^{-1}$) ของเฟร์ริกไซโทโครมซีแสดงการเปลี่ยนแปลงทิศทางการจัดตัวที่พื้นผิวภายใต้อิทธิพลความเข้มของสนามไฟฟ้าซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงทางโครงรูปจากสภาวะธรรมชาติบี 1 สู่สภาวะผิดธรรมชาติบี 2 สเปกตรัมที่ขึ้นกับศักย์ไฟฟ้าของสภาวะผิดธรรมชาติบี 2 แตกต่างจากสเปกตรัมของสภาวะบี 1 อย่างชัดเจน โดยแสดงแถบสเปกตรัมเชิงซ้อนที่กว้าง อันเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างตติยภูมิและการปรับเปลี่ยนอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนซึ่งเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของโครงสร้างบีตาเทิร์น 2/แอลฟาฮีลิกซ์ (1659 ซม$^{-1}$) และโครงสร้างที่ไม่เป็นระเบียบ (1645 ซม$^{-1}$) ในการสร้างโครงรูปที่ผิดธรรมชาติบี 2 ค่าศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์ของสภาวะบี 1 ที่ได้จากเทคนิคเซียร์ราและไซคลิกโวลแทมมิตรี (ซีวี) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากค่าศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์ของไซโทโครมซีในสารละลาย การวัดด้วยวิธีซีวีแสดงให้เห็นกระบวนการถ่ายโอนอิเล็กตรอนแบบผันกลับได้และอัตราการถ่ายโอนอิเล็กตรอนขึ้นกับฟังก์ชันของ SAMs ไม่เป็นแบบเลขชี้กำลัง การเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของโปรตีนที่เกิดจากการถ่ายโอนอิเล็กตรอนถูกติดตามด้วยเทคนิคแรปิดสแกนและสเทปสแกนเซียร์ราสเปกโทรสโกปีร่วมกับเทคนิคการปรับเปลี่ยนศักย์ไฟฟ้าแบบข้ามกระโดด พบว่าการเปลี่ยนแปลงของพีกคู่ที่ 1693 และ 1673 ซม$^{-1}$ มีค่าเท่ากับอัตราการถ่ายโอนอิเล็กตรอน ส่วนอัตราการเปลี่ยนแปลงของพีกที่ 1660 ซม$^{-1}$ จะมีค่าน้อยกว่าสองเท่า จากการศึกษาพบว่าไทม์รีโซล์วเซียร์ราสเปกโทรสโกปีได้ให้ข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับพลศาสตร์และกลไกของกระบวนการรีดอกซ์ของโปรตีนที่บริเวณรอยต่อระหว่างเฟสสองเฟส ดังนั้นจึงเป็นส่วนสมบูรณ์ของผลที่ได้จากการวิเคราะห์ที่ผิวหน้าด้วยเทคนิคอื่นๆ

ภาควิชา เคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เคมี ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

4573814123 : MAJOR CHEMISTRY
KEYWORDS : SEIRA / TIME-RESOLVED SEIRA / PROTEIN DYNAMICS / CYTOCHROME C

NATTAWADEE WISITRUANGSAKUL : REDOX-LINKED STRUCTURAL CHANGES IN CYTOCHROME C PROBED BY STATIONARY AND TIME-RESOLVED SURFACE ENHANCED INFRARED ABSORPTION SPECTROSCOPY. ADVISOR : ASSOC. PROF. SANONG EKGASIT, PH.D., CO-ADVISOR : INGO ZEBGER, PH.D., 136 pp.

The application of surface enhanced infrared absorption (SEIRA) spectro-electrochemistry for studying an immobilized protein yields advantages with respect to its surface sensitivity and probing the whole protein backbone. For an electrostatic immobilization, cytochrome c (Cyt-c) was adsorbed on a Au electrode via a binding to self-assembled monolayers (SAMs) of variable-length ω-carboxyl alkanethiols. In this work, stationary SEIRA measurements were performed to elucidate the structural changes of the SAMs, the redox-linked structural and orientational changes of the immobilized Cyt-c, and to study the non-native B2 state of Cyt-c. For the first time, the application of time-resolved SEIRA spectroscopy was reported to probe the protein dynamics coupled with the redox processes of Cyt-c.

Potential dependent spectral changes of the SAMs revealed only reversible variations within the potential range of interest (-0.1 to +0.2 V), which do not interfere with the investigation of Cyt-c bound to these SAMs. However, depending on the SAM-lengths, irreversible spectral changes could be found also at certain potentials outside the mentioned range. The β-turn III (1673 cm^{-1}) and β-turn II/α-helix (1660 cm^{-1}) segments of ferric Cyt-c revealed orientational changes with respect to the surface under the influence of the electric field strengths, which were found to be correlated with the conformational transition from the native B1 to the non-native B2 state. The potential dependent spectra of the B2 conformation obviously differ from that of the B1 state. It reveals broad complex bands caused by an alteration of the tertiary structure and an arrangement of the hydrogen-bonding interaction involving the movement of peptide backbone of β-turn II/α-helix (ca. 1659 cm^{-1}) and unordered (ca. 1645 cm^{-1}) structures for the formation of non-native B2 conformation. The redox potentials of the B1 state determined by stationary SEIRA spectroscopy and cyclic voltammetry (CV) are not significantly different from that in solution. CV measurements demonstrate a reversible electron transfer (ET) process and a non-exponential distance-dependence of the ET rate. On the basis of characteristic of redox state sensitive amide I bands, the protein structural changes triggered by the ET are monitored by rapid scan and step scan SEIRA spectroscopy in combination with the potential jump technique. Whereas the temporal evolution of the conjugate bands at 1693 and 1673 cm^{-1} displays the same rate constants as ET rate, the time-dependent changes of the 1660-cm^{-1} band are slower by about a factor of 2. The study demonstrates that time-resolved SEIRA spectroscopy provides additional information about the dynamics and mechanism of interfacial processes of redox proteins, thereby complementing the results obtained from other surface-sensitive techniques.

Department : Chemistry Student's Signature .....

Field of Study : Chemistry Advisor's Signature .....

Academic Year : 2008 Co-Advisor's Signature .....

ACKNOWLEDGEMENTS

The financial support via the Royal Golden Jubilee (RGJ) Ph.D. program, grant contract number: PHD/0107/2545, from the Thailand Research Fund (TRF)/Thailand between 2002 to 2008 and the DAAD/RGJ scholarship/Germany between 2004 to 2005 are gratefully acknowledged.

The experiments in this thesis were carried out at Max-Volmer Laboratorium in the Technical University of Berlin (TU-Berlin)/Germany between 2004 and 2008. The financial supports from the Volkswagen-Foundation (I/80816) and the DFG (Cluster of Excellence "Unifying Concepts in Catalyis")/Germany are gratefully acknowledged.

Deepest gratitude to the host at TU-Berlin, Prof. Dr. Peter Hildebrandt, for giving me the great opportunity to work at one of the famous vibrational spectroscopic groups for four years, as well as his excellent advices and comments. I have greatly enjoyed the innovative and challenging atmosphere in his laboratory.

My Ph.D. research would never be successful without my thesis co-advisor, Dr. Ingo Zebger. I would especially like to thank for his invaluable guidance, always available for discussions any time, his patience and strong effort in training me the research work, and providing me such a warm hospitality during my stay in Berlin. His untiring way of encouragement and support will be forever thankful.

Special thanks go to Dr. Jiu-Ju Feng for the critical suggestion in electrochemistry, especially her kindly helpfulness for the EIS measurements and data evaluation. The nice time we had shared at TU-Berlin is sincerely appreciated.

Thanks the colleagues at Hildebrandt group for interesting discussions and creating the great atmosphere in the office and the laboratory. Thanks also the present and former SRU members for the overlasting friendship.

All in all, my Ph.D. would never be successful without my thesis advisor, Assoc. Prof. Dr. Sanong Ekgasit, who always gives me the excellent experienced suggestion in the most important moments of making the right decisions and the great opportunity for scientific life.

Thanks Siroj Payarkawong for the spiritual supports. Finally, I am affectionately grateful to my wonderful parent and the endearing brothers and sister for their wholehearted support, understanding, and unconditional love.

CONTENTS

Pages

Pages

Pages

LIST OF FIGURES

LIST OF TABLES

LIST OF ABBREVATIONS

2^{nd}	:	second
3D	:	three-dimensional
5cHS	:	five-coordinate high spin
6cHS	:	six-coordinate high spin
6cLS	:	six-coordinate low spin
ATR	:	attenuated total reflection
C1	:	mercaptoacetic acid
C2	:	3-mercaptopropionic acid
C5	:	6-Mercaptohexanoic acid
C10	:	11-mercaptoundecanoic acid
C15	:	16-mercaptohexadecanoic acid
CV	:	cyclic voltammogram
Cyt-c	:	cytochrome c
EF	:	electric field
ET	:	electron transfer
FCWD	:	Franck Condon weighted density
FT-IR	:	Fourier transform infrared
His	:	histidine
IR	:	infrared
IRE	:	internal reflection element
Lys	:	lysine
M	:	molarity
Met	:	methyonine
MSEF	:	mean square electric field
Phe	:	phenylalanine

PZC	:	potential of zero charge
RC	:	redox center
RR	:	resonance Raman
SAM	:	self-assembled monolayer
SEIRA	:	surface enhanced infrared absorption
SERR	:	surface enhanced resonance Raman spectroscopy
SER	:	surface enhanced Raman
Si	:	silicone
SNR	:	signal to noise ratio
Try	:	tryrosine
UV-VIS	:	ultra-violet visible
V	:	voltage

LIST OF SYMBOLS

ΔA	:	absorbance change
α	:	alpha
β	:	beta
ω	:	omega
υ	:	scan rate
τ	:	relaxation time
Γ	:	surface coverage
I	:	ionic strength
λ	:	wavelength
$\lambda\!\!\!^{-}$	:	reorganization energy
$\lambda\!\!\!^{-}_{in}$	:	inner reorganization energy
$\lambda\!\!\!^{-}_{out}$	:	outer reorganization energy
θ_c	:	critical angle
$\overset{0}{\text{A}}$	:	angstrom
d_p	:	penetration depth
A_{real}	:	real surface area
A_{geom}	:	geometric area
Ag	:	silver
Au	:	gold
E	:	electrode potential
E^0	:	redox potential
E_{ref}	:	reference potential
E_f	:	final potential

E_p	:	potential of peak separation
E_{PZC}	:	potential of zero charge
I_p	:	average peak current
k_{ET}	:	electron transfer rate constant
k_{prot}	:	protein relaxation constant
k_{rot}	:	protein rotation constant
n	:	number of electron transfer
Q_{exp}	:	experimental charges
Q_{the}	:	theoretical charges
R_f	:	roughness factor