

DISS. ETH Nr. 19018

**Probing the Biological Advantages of Selenium: Comparative Kinetic and Thermodynamic Studies of the Redox Reactivity of Selenols and Thiols**

Abhandlung zur Erlangung des Titels  
DOKTOR DER WISSENSCHAFTEN  
der  
ETH ZÜRICH

vorgelegt von

Daniel Steinmann  
Dipl. Chem. ETH  
geboren am 07. Dezember 1978  
von Humlikon ZH

Angenommen auf Antrag von  
Prof. Dr. Willem H. Koppenol, Referent  
Prof. Dr. Antonio Togni, Korreferent

2010

## 2 Summary

Selenocysteine is the selenium analogue of cysteine and found in 25 human protein families. These proteins are thought to catalyze essential redox processes in metabolism such as the reduction of disulfides or oxidation of thiols (1). During its catalytic cycle, selenocysteine undergoes exchange reactions with cysteine (e.g.  $\text{RS}^- + \text{RS-SeR} \rightarrow \text{RS-SR} + \text{RSe}^-$ ) (2-6). The same reactions take place during the reduction of selenocystamine ( $\text{RSe-SeR}$ ) by cysteamine ( $\text{RSH}$ ) which we therefore studied at pH 7 by means of stopped-flow spectrophotometry to better understand the differences in reactivity between selenium and sulfur in biological systems. The reaction proceeds via 2 consecutive equilibria; the first of which is established within 0.1 s with  $k_1 = 1.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{-1} = 2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; and yields a selenylsulfide ( $\text{RSe-SR}$ ), which in turn is converted to a disulfide during the second equilibrium which forms within 30 s with  $k_2 = 11 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  and  $k_{-2} = 1.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Moreover, similar rate constants for the reduction of selenocystine by cysteine were obtained. From the comparison of these rate constants, including those reported for the exchange reactions of selenocysteamine with selenocystamine and of cysteamine with cystamine (7), we derived the reaction rates with selenium as a nucleophile and as an electrophile to be 2 – 3 and 4 orders of magnitude higher, respectively, than with their sulfur analogues. However, sulfides and selenides were found to have comparable leaving group abilities. Tyrosyl radicals are the most inert and thermodynamically more easily formed than others (most favorable amino acid radicals), and are consequently considered to be the radical sink in proteins (8). Therefore, we measured the kinetics of the reduction of free *N*-acetyl-tyrosyl-amine radicals by selenocysteine to investigate whether the latter is capable of protein radical repair. By means of pulse radiolysis, we found a rate constant of  $k = (8 \pm 2) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Furthermore, we generated tyrosyl radicals in insulin with laser-flash photolysis and determined a rate constant for their reduction with selenocysteine of  $k = (1.6 \pm 0.8) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . These high rate constants reflect that selenocysteine is a potent radical scavenger. As a result, selenoenzymes could

potentially function as a protein radical scavenger *in vivo*. In contrast, the reactions of the thiols cysteine and glutathione with free *N*-acetyl-tyrosyl-amine radicals are 3 and 5 orders of magnitude slower than their selenium analogues, and the reactions of tyrosyl radicals in insulin are 3 and 2 orders of magnitude slower with cysteine and glutathione than with selenocysteine and selenogluthathione, respectively.

Selenyl radicals ( $\text{RSe}^\bullet$ ) formed *in vivo* may react with thiols to selenylsulfide radical anions ( $\text{RSe}:\text{SR})^{\bullet-}$ , while the one electron oxidations of selenylsulfides will yield selenylsulfide radical cations ( $\text{RSe}:\text{SR})^{\bullet+}$ .<sup>1</sup> We synthesized oxidized selenothiothreitol,  $\text{SeTT}_{\text{ox}}$ , as model compound for selenylsulfides in order to investigate the properties of these selenylsulfide radicals.  $\text{SeTT}_{\text{ox}}$  is considered most suitable to act as selenylsulfide model, as it is highly soluble, has no other redox-active groups than the selenylsulfide bond. Moreover,  $\text{SeTT}_{\text{ox}}$  does not rearrange to form dimers or oligomers during redox cycling. The selenylsulfide radical anion  $\text{SeTT}_{\text{ox}}^{\bullet-}$  was generated by pulse radiolysis and has a very similar UV-Vis spectrum ( $\lambda_{\text{max}} \sim 404$  nm,  $\epsilon \sim 6000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) to the diselenothreitol radical anion  $\text{DSeT}_{\text{ox}}^{\bullet-}$  ( $\lambda_{\text{max}} \sim 411$  nm,  $\epsilon \sim 6300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) and the dithiothreitol radical anion  $\text{DTT}_{\text{ox}}^{\bullet-}$  ( $\lambda_{\text{max}} \sim 390$  nm,  $\epsilon \sim 5900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (10).  $\text{SeTT}_{\text{ox}}^{\bullet-}$  is in an acid-base equilibrium with the selenyl radical,  $(\text{Se}:\text{S})^{\bullet-} + \text{H}^+ = (\text{Se}^\bullet, \text{SH})$ , that has a  $\text{pK}_a$  value of 7.4, whilst  $\text{DSeT}^\bullet$  has a  $\text{pK}_a$  value of 2.4.  $\text{DTT}^\bullet$  was reported to have a  $\text{pK}_a$  of 5.2 (10). Hence, we conclude that the selenylsulfide radical anion bond is most prone to cleavage and that the selenyl radical is the predominant species at neutral pH. By means of cyclic voltammetry the electrode potential at pH 7 of the couple  $\text{SeTT}^\bullet/\text{SeTT}^-$  was determined to be 0.47 mV and that of  $\text{DSeT}^\bullet/\text{DSeT}^-$  is 0.45 V. We calculated the electrode potentials for the couples:  $E^\circ(\text{SeTT}_{\text{ox}}/\text{SeTT}_{\text{ox}}^{\bullet-}) = -1.29$  V and  $E^\circ(\text{DSeT}_{\text{ox}}/\text{DSeT}_{\text{ox}}^{\bullet-}) = -1.08$  V. The selenylsulfide radical cation  $\text{SeTT}_{\text{ox}}^{\bullet+}$  has a weak and broad absorption ( $\lambda_{\text{max}} \sim 790$  nm,  $\epsilon \sim 650 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) that lies in between the absorption peaks of the disulfide radical

<sup>1</sup> Abbreviations and Systematic Names (according to IUPAC, see Ref. 9):  $(\text{RSe}:\text{SR})^{\bullet-}$  selenylsulfur radical ion(1-) or sulfenylselenium radical ion(1-) (selenylsulfide radical anion);  $(\text{RSe}:\text{SR})^{\bullet+}$ , selenylsulfur radical ion(1+) or sulfenylselenium radical ion(1+) (selenylsulfide radical cation).

cation ( $\lambda_{\max} \sim 370 \text{ nm}$ ,  $\varepsilon \sim 610 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) and diselenide radical cation ( $\lambda_{\max} \sim 550 \text{ nm}$ ,  $\varepsilon \sim 1060 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). The electrode potential of the couple  $\text{SeTT}_{\text{ox}}^{\bullet+}/\text{SeTT}_{\text{ox}}$  was estimated by cyclic voltammetry to be 1.44 V, and is intermediate to those of the  $\text{DSeT}_{\text{ox}}^{\bullet+}/\text{DSeT}_{\text{ox}}$  and  $\text{DTT}_{\text{ox}}^{\bullet+}/\text{DTT}_{\text{ox}}$  couples which are 1.32 V and 1.62 V, respectively. From these measurements we conclude that selenylsulfide radical anions and cations have intermediate spectral and electrochemical properties.

*In vivo* selenyl radical could be reduced by ascorbate, and we therefore measured the rate constant of this reaction at pH 7.4 to determine the kinetic feasibility: with selenocysteinyl radicals  $k = (8 \pm 3) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Since ascorbate is present up to millimolar concentrations in certain cell types (11), this reaction is of biological significance and offers a pathway for the repair of selenyl radicals which could otherwise recombine with another radical to form a covalent bond, react with  $\text{O}_2$  to  $\text{RSeOO}^\bullet$  or add to double bonds.

### 3 Zusammenfassung

Selen ist ein essentielles Spurenelement und wird in allen Domänen der Lebewesen in spezifische Proteine in Form der Aminosäure Selenocystein eingebaut. Im menschlichen Körper werden 25 solche Selenoproteine synthetisiert, die lebensnotwendige Stoffwechselreaktionen wie zum Beispiel die Oxidation von Thiolen oder die Reduktion von Disulfiden katalysieren (1). Während des katalytischen Zyklus der Selenoenzyme finden Austauschreaktionen zwischen Selenocystein und Cystein statt (z.B.  $\text{RS}^- + \text{RS-SeR} \rightarrow \text{RS-SR} + \text{RSe}^-$ ) (2-6). Da diese Reaktionen ebenfalls in der Reduktion von Diseleniden durch Thiole/Thiolate vorkommen, wurde die Reduktion von Selenocystamin ( $\text{RSe-SeR}$ ) durch Cysteamin ( $\text{RSH}$ ) untersucht, um die Reaktivität der Selenoenzyme besser zu verstehen. Die Reduktion verläuft via 2 gekoppelte Gleichgewichte, wobei intermediär Selenylsufide ( $\text{RSe-SR}$ ) gebildet werden. In unseren Experimenten hat sich das erste Gleichgewicht innerhalb von 0.1 s eingestellt, mit den Geschwindigkeitskonstanten  $k_1 = 1.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und  $k_{-1} = 2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , während sich das zweite Gleichgewicht vergleichbar langsam innerhalb von 30 s eingestellt hat mit den Geschwindigkeitskonstanten:  $k_2 = 11 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  and  $k_{-2} = 1.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Die Reduktion von Selenocystein durch Cystein hat vergleichbare Geschwindigkeitskonstanten. Durch den Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten, eingeschlossen diejenige der Thiol-Disulfid Austauschreaktion von Cysteamin/Cystamin und diejenige der Selenide-Diselenide Austauschreaktion von Selenocysteamin/Selenocystamin (7), haben wir folgendes hergeleitet: Reaktionsgeschwindigkeiten sind mit Selen als Nukleophil 2 – 3 Größenordnungen und mit Selen als Elektrophil 4 Größenordnungen schneller als mit Schwefel. Selenolate und Thiolate sind hingegen vergleichbar gute Abgangsgruppen. Wenn in einem Enzym Selenocystein anstelle von Cystein eingebaut wird, werden demnach vorallem Reaktionen beschleunigt bei denen Selen als Elektrophil agiert. Tyrosyl-Radikale sind die inertesten und thermodynamisch stabilsten Aminosäure-Radikale und stehen deshalb am Ende der Radikalmigration innerhalb eines Proteins

(8). Um herauszufinden, ob Selenocystein ein potentieller Radikalfänger für Protein-Radikale ist, wurde deshalb die Reaktionsgeschwindigkeit von *N*-Acetyl-tyrosyl-amin-Radikalen mit Selenocystein bestimmt. Mittels Pulsradiolyse haben wir eine Geschwindigkeitskonstante von  $k = (8 \pm 2) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  erhalten. Zudem haben wir Tyrosyl-Radikale in Insulin mittels Laserblitzlichtphotolyse erzeugt, und es wurde eine Geschwindigkeitskonstanten von  $k = (1.6 \pm 0.8) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  erhalten. Diese hohen Geschwindigkeitskonstanten deuten darauf hin, dass Selenocystein tatsächlich ein potentielles Antioxidanz für Protein-Radikale ist. Die Reduktion von *N*-Acetyl-tyrosin-amin-Radikalen durch Cystein und Glutathion ist hingegen um respektive 3 und 5 Größenordnungen und die Reduktion von Tyrosyl-Radikalen in Insulin durch Cystein und Glutathion um 3 respektive 2 Größenordnungen langsamer als mit den Selenanaloga.

In Anbetracht der beträchtlichen Thiolkonzentration im Zytosol werden Selenyl-Radikale ( $\text{RSe}^\bullet$ ) *in vivo* mit Thiolen zu Selenylsulfid-Radikal-Anionen ( $\text{RSe}:\cdot\text{SR}^{\bullet-}$ ) reagieren. Die Oxidation von Selenylsulfiden ( $\text{RSe-SR}$ ) hingegen wird zu Selenylsulfid-Radikal-Kationen ( $\text{RSe}:\cdot\text{SR}^{\bullet+}$ ) führen. Beide Radikal-Spezies waren bislang komplett unerforscht geblieben mangels einer leicht erhältlichen, stabilen Modellverbindung. Deshalb haben wir oxidiertes Selenothiothreitol  $\text{SeTT}_{\text{ox}}$  als neue Modellverbindung für Selenylsulfide synthetisiert, um dessen Radikale zu untersuchen.  $\text{SeTT}_{\text{ox}}$  hat vorzügliche Eigenschaften, da es in Wasser sowie organischen Lösungsmittel gut löslich ist, keine redoxaktive Gruppe ausser der Selenylsulfid-Bindung aufweist und keine Dimere oder Oligomere während des Redox-Zyklirens bildet. Das Radikal-Anion  $\text{SeTT}_{\text{ox}}^{\bullet-}$  hat ein erstaunlich ähnliches UV-Vis Spektrum ( $\lambda_{\text{max}} \sim 404 \text{ nm}$ ,  $\varepsilon \sim 6000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) wie das analoge Diselenid-Radikal-Anion  $\text{DSeT}_{\text{ox}}^{\bullet-}$  ( $\lambda_{\text{max}} \sim 411 \text{ nm}$ ,  $\varepsilon \sim 6300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und Disulfid-Radikal-Anion  $\text{DTT}_{\text{ox}}^{\bullet-}$  ( $\lambda_{\text{max}} \sim 390 \text{ nm}$ ,  $\varepsilon \sim 5900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).  $\text{SeTT}_{\text{ox}}^{\bullet-}$  steht in einem Säure-Base Gleichgewicht mit dem Selenyl-Radikal  $\text{SeTT}^\bullet$ ,  $(\text{RSe}:\cdot\text{SR})^{\bullet-} + \text{H}^+ = (\text{RSe}^\bullet, \text{RSH})$ , welches einen pKa-Wert von 7.4 hat. Folglich ist bei neutralem pH  $\text{SeTT}^\bullet$  die dominierende Spezies. Zum

Vergleich: DSeT<sup>•</sup> hat einen pKa-Wert von 2.4 und für DTT<sup>•</sup> wurde ein pKa-Wert von 5.2 publiziert (10). Mittels Zyklovoltammetrie haben wir bei pH 7 die Elektrodenpotentiale von 0.47 V für das Redoxpaar SeTT<sup>•</sup>/SeTT<sup>-</sup> und von 0.45 V für das Redoxpaar DSeT<sup>•</sup>/DSeT<sup>-</sup> gemessen. Für das Redoxpaar SeTT<sub>ox</sub><sup>•</sup>/SeTT<sub>ox</sub><sup>-</sup> haben wir ein Elektrodenpotential von -1.29 V berechnet und für das Redoxpaar DSeT<sub>ox</sub><sup>•</sup>/DSeT<sub>ox</sub><sup>-</sup> ein Potential von -1.08 V. Das Selenylsulfid-Radikal-Kation SeTT<sub>ox</sub><sup>•+</sup> hat ein sehr breites Spektrum ( $\lambda_{\max} \sim 490 \text{ nm}$ ,  $\epsilon \sim 650 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) welches zwischen denjenigen des DTT<sub>ox</sub><sup>•+</sup> ( $\lambda_{\max} \sim 370 \text{ nm}$ ,  $\epsilon \sim 610 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und DSeT<sub>ox</sub><sup>•+</sup> ( $\lambda_{\max} \sim 550 \text{ nm}$ ,  $\epsilon \sim 1060 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) liegt. Die Elektrodenpotentiale der Redoxpaare SeTT<sub>ox</sub><sup>•+</sup>/SeTT<sub>ox</sub>, DSeT<sub>ox</sub><sup>•+</sup>/DSeT<sub>ox</sub> und DTT<sub>ox</sub><sup>•+</sup>/DTT<sub>ox</sub> sind 1.42 V, 1.32 V und 1.62V, welche wir mittels Zyklovoltammetrie bestimmt. Diese Messungen zeigten, dass Selenylsulfid-Radikal-Anionen und -Kationen im Vergleich zu den analogen Disulfid und Diselenid Spezies intermediäre spektrale und elektrochemische Eigenschaften haben.

Selenocysteinyl-Radikale sind thermodynamisch gesehen von Ascorbat reduzierbar. Um herauszufinden ob diese Reaktion auch kinetisch relevant ist, haben wir die Geschwindigkeitskonstante dieser Reaktion bei pH 7.4 gemessen:  $k = (8 \pm 3) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Da Ascorbat in einigen Zelltypen millimolare Konzentration hat (11), ist die Reaktion biologisch relevant. Ansonsten könnten Selenyl-Radikale mit anderen Radikalen rekombinieren, eine kovalente Bindung eingehen, an Doppelbindungen addieren, oder mit O<sub>2</sub> zu RSeOO<sup>•</sup> reagieren.

## References

1. Gromer, S., Eubel, J. K., Lee, B. L., and Jacob, J. (2005) Human selenoproteins at a glance. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2414-2437.
2. Aumann, K. D., Bedorf, N., Brigelius-Flohé, R., Schomburg, D., and Flohe, L. (1997) Glutathione peroxidase revisited - Simulation of the catalytic cycle by computer-assisted molecular modelling. *Biomed. Environm. Sci.* 10, 136-155.

3. Dickson, R. C. and Tappel, A. L. (1969) Reduction of selenocystine by cysteine or glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* 130, 547-550.
4. Kim, H. Y. and Gladyshev, V. N. (2005) Different catalytic mechanisms in mammalian selenocysteine- and cysteine-containing methionine-R-sulfoxide reductases. *Plos Biol.* 3, 2080-2089.
5. Zhong, L., Arnér, E. S. J., and Holmgren, A. (2000) Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: The active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 5854-5859.
6. Cheng, Q., Sandalova, T., Lindqvist, Y., and Arner, E. S. J. (2009) Crystal structure and catalysis of the selenoprotein thioredoxin reductase 1. *J. Biol. Chem.* 284, 3998-4008.
7. Pleasants, J. C., Guo, W., and Rabenstein, D. L. (1989) A comparative study of the kinetics of selenol/diselenide and thiol/disulfide exchange reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 6553-6558.
8. Prütz, W. A., Butler, J., Land, E. J., and Swallow, A. J. (1989) The role of sulphur peptide functions in free radical transfer: A pulse radiolysis study. *Int. J. Radiat. Biol.* 55, 539-556.
9. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/ions/>
10. Akhlag, M. S. (1987) Intermolecular H-abstraction of thiyl radicals from thiols and the intramolecular complexing of the thiyl radical with the thiol group in 1,4-dithiothreitol. A pulse radiolysis study. *Z. Naturforsch.* 42c, 134-140
11. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine* Oxford University Press, Oxford.