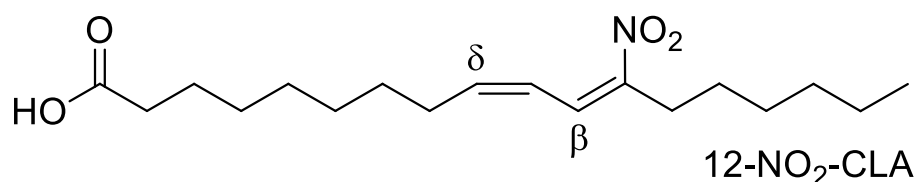
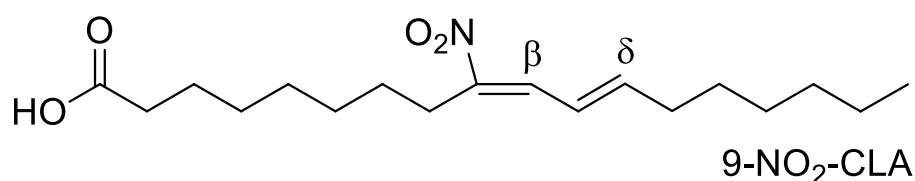


Interacciones del ácido nitrolinoleico conjugado con tioles de bajo peso molecular y albúmina



Lourdes Lebrato

Tesis de Licenciatura en Bioquímica

FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

Tutoras: Beatriz Álvarez y Lucía Turell

Agosto 2018

Índice

1.	Abreviaturas frecuentes	3
1.	Introducción.....	4
1.1	Tioles.....	4
1.1.1	Propiedades	4
1.1.2	Propiedades redox.....	5
1.1.3	Tioles biológicos	6
1.1.4	Concentraciones biológicas.....	10
1.2	Ácidos grasos nitroalquenos	12
1.2.1	Características.....	12
1.2.2	Síntesis.....	12
1.2.3	Propiedades biológicas.....	14
1.2.4	Mecanismos de señalización	15
1.2.5	Ácidos grasos nitroalquenos conjugados	17
1.3	Seroalbúmina humana	17
1.3.1	Estructura	18
1.3.2	Funciones.....	19
2.	Objetivos	20
2.1	Objetivo general	20
2.1.1	Objetivo específico 1	21
2.1.2	Objetivo específico 2	21
3.	Materiales y métodos	21
3.1	Reactivos y equipos	21
3.1.1	Soluciones	21
3.1.2	Reacción entre tioles de bajo peso molecular y NO ₂ CLA.....	23
4.	Resultados y Discusión	23
4.1	Espectros de absorción del NO ₂ CLA	23
4.2	Cinética de la reacción entre NO ₂ CLA y tioles de bajo peso molecular	25
4.3	Obtención de constantes cinéticas para la reacción entre NO ₂ CLA y tioles de bajo peso molecular	28

4.4	Análisis de productos por espectrofotometría UV-Visible.....	32
4.5	Dependencia con el pH.....	35
4.6	Interacción entre NO ₂ CLA y albúmina.....	39
4.6.1	Uniones no covalentes	39
4.6.2	Reacción entre NO ₂ CLA y la cisteína 34	41
5.	Conclusiones.....	43
5.1	Artículo científico	43
6.	Bibliografía	44

1. Abreviaturas frecuentes

RSH	Tiol
RS⁻	Tiolato
E⁺	Electrófilo
RSOH	Ácido sulfénico
RSO₂H	Ácido sulfínico
RSO₃H	Ácido sulfónico
RS[•]	Radical tiilo
RSSR	Disulfuro
HSA	Seroalbúmina humana
-NO₂	Grupo nitro
NO₂⁻	Nitrito
NO₂[•]	Dióxido de nitrógeno
NO[•]	Óxido nítrico
ONOO⁻	Peroxinitrito
LNO₂	Ácido nitrolinoleico
NO₂OA	Ácido nitrooleico
CLA	Ácido linoleico conjugado
NO₂CLA	Ácido nitrolinoleico conjugado
DTNB	5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoato)
TNB	2-nitro-5-tiobenzoato

1. Introducción

1.1 Tioles

Se denomina tiol (RSH) a un compuesto orgánico con un grupo funcional formado por un átomo de azufre y un átomo de hidrógeno donde el azufre se encuentra unido a un carbono y al hidrógeno de forma análoga al oxígeno en un grupo hidroxilo (alcohol). Debido a su estructura electrónica, este grupo tiene numerosas propiedades químicas que le permite cumplir funciones diversas. La versatilidad química es la principal característica de este grupo [1].

1.1.1 Propiedades

1.1.1.1 Acidez

Entre las propiedades del grupo tiol se encuentra su acidez (ecuación 1). El azufre tiene mayor tamaño y menor electronegatividad que el oxígeno, de modo que el enlace entre el azufre y el hidrógeno es débil si es comparado con el enlace entre el oxígeno y el hidrógeno, por lo cual los tioles son mucho más ácidos que los alcoholes. Los tioles tienen un pK_a entre 5 y 6 unidades más bajo que los alcoholes [2] y pueden desprotonarse con mucha más facilidad. La base conjugada que se forma (tiolato, RS^-) es muy estable en comparación a su análogo con oxígeno debido a que, al tener mayor tamaño, el átomo de azufre tiene mayor espacio para la distribución de la carga negativa. El tiolato es un muy buen nucleófilo, aunque una mala base.[3]



1.1.1.2 Nucleofilia

Los tioles son nucleófilos debido a los electrones libres del azufre. La nucleofilia es mayor en la forma desprotonada (tiolato). Los tiolatos son capaces de reaccionar rápidamente con electrófilos [3] formando un enlace covalente (ecuación 2). La nucleofilia es central para la reactividad de los tioles, ya que desde el punto de vista mecanístico prácticamente todas las reacciones de los tioles implican un ataque nucleofílico sobre un electrófilo.



El hecho que la especie que interviene en el ataque nucleofílico sea en realidad el tiolato es compatible con la observación de que las constantes en este tipo

de reacciones suelen aumentar a valores de pH más básicos, donde hay más tiolato disponible. Debido a esto, se suele aseverar que tioles con un pK_a más bajo son más reactivos ya que van a tener más tiolato disponible a un pH neutro. En realidad, la nucleofilia depende de la densidad electrónica del átomo que reacciona, de modo que ésta aumenta con la basicidad. En una reacción entre un tiol y un electrófilo, en una situación hipotética donde todos los tioles se encontraran en la forma de tiolato, la reactividad aumentaría con el pK_a del tiol [4].

1.1.2 Propiedades redox

1.1.2.1 Productos

El átomo de azufre puede adoptar estados de oxidación entre +6 y -2. Los productos de oxidación de los tioles son muy variados [5] entre ellos se encuentran los ácidos sulfénico ($RSOH$), sulfínico (RSO_2H) que suele ser un producto final y sulfónico (RSO_3H) (Figura 1) el cual no puede volver a reducirse. Los tioles se oxidan al reaccionar con oxidantes de dos electrones como los peróxidos ($ROOH$) u oxiácidos de halógenos como el ácido hipocloroso ($HClO$) formando ácido sulfénico, el cual es inestable y suele reaccionar con otro tiol para formar un disulfuro ($RSSR$). Varias semi-reacciones de oxidación de tioles tienen valores de potencial redox estándar que fueron medidos, especialmente en tioles biológicos, por ejemplo: $E^\circ (GSSG, 2 H^+ / 2 GSH) = -0.23 V$ [1].

Los tioles también pueden oxidarse por medio de reacciones de oxidación de un electrón, donde se forman radicales tiilo ($RS\bullet$) que pueden reaccionar entre ellos formando disulfuros o con oxígeno formando radicales peroxilo ($RSOO\bullet$) que pueden llevar a la formación de oxiácidos. También pueden reaccionar con tioles formando anión disulfuro ($RSSR\bullet$), capaz de formar el radical superóxido ($O_2\bullet^-$) a partir de dioxígeno [6].

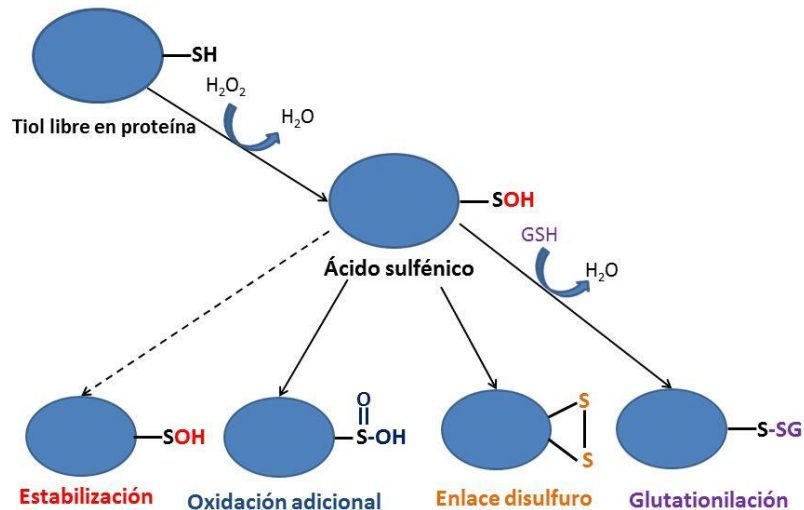
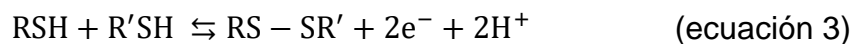


Figura 1. Algunos ejemplos de oxidación de tioles. El tiol de una proteína (izquierda, en negro) reacciona con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) oxidándose a ácido sulfénico (centro, en rojo) el cual puede estabilizarse (abajo a la izquierda, en rojo) volver a oxidarse a ácido sulfínico (abajo, en azul), reaccionar con otro tiol cercano en la proteína formando un disulfuro intramolecular (abajo, en naranja) o reaccionar con otro tiol (en este caso, glutatión) formando un disulfuro intermolecular (abajo, en violeta).

Como se mencionó previamente, los tioles pueden oxidarse al estado de ditioéter, normalmente llamados disulfuros (ecuación 3), donde los átomos de azufre se unen por un enlace covalente muy estable pero que puede ser reducido nuevamente a dos tioles.



Este enlace suele verse mucho entre tioles de proteínas extracelulares a las que les da estabilidad estructural ya que al ser covalente no se rompe en la desnaturalización como ocurre con las interacciones débiles (puentes de hidrógeno, ión-dipolo, dipolo-dipolo, Van der Waals).

Debido a las propiedades redox mencionadas previamente, los tioles pueden encontrarse formando parte de la región catalítica de varias enzimas, principalmente las involucradas en reacciones redox.

1.1.3 Tioles biológicos

1.1.3.1 Funciones

Una de las principales funciones de los tioles biológicos, tanto los que forman parte de proteínas como los que no, es la de regular la homeostasis redox en el ser vivo manteniendo una cierta proporción entre las formas reducidas y oxidadas de las moléculas. Esta homeostasis es muy importante si se tiene en

cuenta que las reacciones redox están involucradas en procesos metabólicos vitales como la fotosíntesis o la respiración celular, donde intervienen cadenas de transporte de electrones formadas por complejos de proteínas y cofactores con distintos estados de oxidación. Su alta versatilidad les permite también cumplir funciones como neutralización de sustancias tóxicas, regulación de procesos como la inflamación y transcripción de genes, y la formación de complejos con iones de zinc, hierro y mercurio entre otros.

1.1.3.2 Cisteína

Los tioles que forman parte de proteínas suelen hacerlo por medio del aminoácido cisteína (Figura 2) y los disulfuros proteicos suelen estar formados por dos de estos aminoácidos que se encuentren a una distancia apropiada (2.5 Å aproximadamente). También pueden encontrarse tioles de bajo peso molecular os, éstos son mayoritariamente cisteína y derivados como el glutatión, homocisteína y cisteinilglicina entre otros.

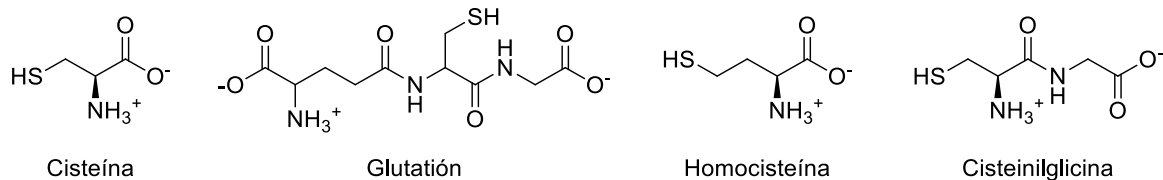


Figura 2. Representación de algunos tioles de bajo peso molecular presentes in vivo.

La cisteína es el segundo aminoácido menos abundante en proteínas. En su síntesis, el azufre se obtiene a partir del aminoácido metionina y su esqueleto carbonado del aminoácido serina. La cisteína suele encontrarse en proteínas únicamente cuando cumple con una determinada función. Mutaciones en la cisteína frecuentemente están asociadas a enfermedades genéticas (conservación funcional) y las cisteínas sin función específica tienden a ser reemplazadas por otro aminoácido. En los casos de cisteínas en proteínas, éstas pueden clasificarse según su función en:

Estructurales: Son cisteínas que forman enlaces disulfuro entre ellas ayudando al plegamiento de la proteína y dándole estabilidad. Los disulfuros suelen encontrarse con frecuencia en proteínas expuestas a medios relativamente oxidados, como las que van a ser excretadas fuera de la célula. En estos casos las proteínas se encuentran más expuestas a la desnaturalización y los enlaces disulfuro les dan estabilidad ayudando a mantenerlas en su forma nativa (Figura 3).

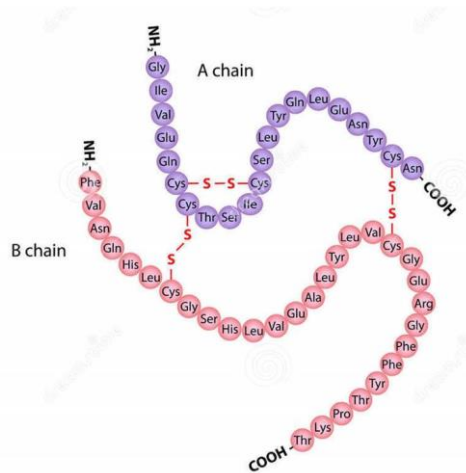


Figura 3. Ejemplo de cisteínas estructurales. Representación de insulina humana donde se pueden apreciar las dos cadenas que forman la proteína en su forma final (cadenas A y B) con cada aminoácido representado con tres letras y sus respectivos extremos N y C-terminales. Las dos cadenas se mantienen unidas por medio de puentes disulfuro (en rojo) que se dan a nivel de sus cisteínas. Además de mantener las cadenas unidas, los puentes disulfuro le dan forma a la proteína y la protegen de la desnaturalización. Tomado de [7].

Catalíticas: Se encuentran en sitios activos de enzimas y pueden catalizar diversos tipos de reacciones redox como intercambios tiol-disulfuro o reducción de peróxidos. También pueden intervenir en reacciones no redox, por ejemplo: peptidasas de cisteína donde el azufre realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono del enlace peptídico (figura 4).

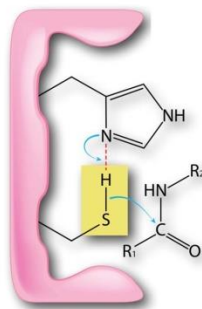


Figura 4. Ejemplo de cisteína catalítica. Representación del sitio activo de una peptidasa con su sustrato (enlace peptídico) donde los electrones del tiol de un residuo de cisteína (pintado con amarillo) realizan un ataque nucleofílico al carbono del enlace peptídico. Tomado de [8]

Regulatorias: Cisteínas que se encuentran en proteínas donde un cambio en este residuo, que puede ser una oxidación u otro tipo de modificación covalente, regula la actividad de la proteína [9]. Estos fenómenos suelen verse en factores de transcripción, como la proteína p53, cuya forma inactiva posee dos cisteínas formando un disulfuro que al ser reducido pasa a la forma activa (figura 5).

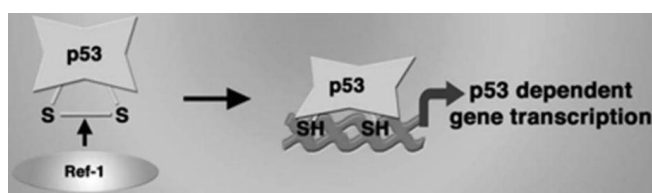


Figura 5. Ejemplo de cisteína regulatoria. Representación del factor de transcripción p53 donde la actividad de la proteína es regulada por el estado de oxidación de sus dos cisteínas (representadas en la parte inferior de la proteína). Cuando las cisteínas se encuentran oxidadas formando un disulfuro, la proteína no se encuentra activa pero cuando la proteína Ref-1 reduce el disulfuro formando dos tioles, la p53 se une al ADN promoviendo la transcripción. Tomado de [10].

1.1.3.3 Homeostasis redox

La gran versatilidad química de los tioles, especialmente en reacciones del tipo redox, ha llevado a que tengan un gran peso en la regulación del estado redox en el organismo mediante una variedad de enzimas que catalizan reacciones como intercambios tiol-disulfuro (tioredoxinas [11], figura 6), transferencias tiol/radicales tiilo (ribonucleótido reductasa), reducción de disulfuros (glutación reductasa) y reducción de peróxidos (peroxirredoxinas).

Las tioredoxinas son enzimas cuya principal función es catalizar la reducción de disulfuros de proteínas. La catálisis se da por medio de dos cisteínas que se encuentran separadas por dos residuos entre medio de ellas en la cadena de aminoácidos (CXXC). Al encontrarse a una distancia óptima, las cisteínas pueden oxidarse y formar un disulfuro, reduciendo así otras proteínas (sustrato) en reacciones de intercambio tiol-disulfuro. Para que la enzima vuelva a ser funcional las cisteínas deben volver a reducirse, esto se logra por medio de otra enzima, la tioredoxina reductasa (TR), en una reacción dependiente de NADPH. Las glutarredoxinas (Grx) tienen también la capacidad de reducir disulfuros, principalmente proteínas glutationiladas, y son reducidas por el glutatiión. El glutatiión oxidado es luego reducido por la glutatiión reductasa (GR), (Figura 7).

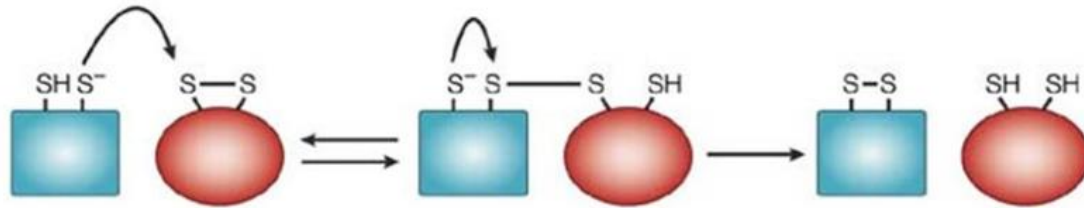


Figura 6. Ejemplo de intercambio tiol/disulfuro entre las cisteínas de dos proteínas representadas en azul y rojo. Uno de los tioles de la proteína en azul previamente desprotonado (izquierda) realiza un ataque nucleofílico sobre el disulfuro de la proteína en rojo rompiéndolo y formando un nuevo enlace (centro) que es resuelto por un nuevo ataque nucleofílico del otro tiolato de la proteína azul (la desprotonación del tiol no se muestra) para dar lugar al estado final donde los tioles de la proteína azul forman un disulfuro (oxidación) y los tioles de la proteína roja se encuentran ambos reducidos. Tomado de [12].

SISTEMA TIORREDOXINA



SISTEMA GLUTATIÓN

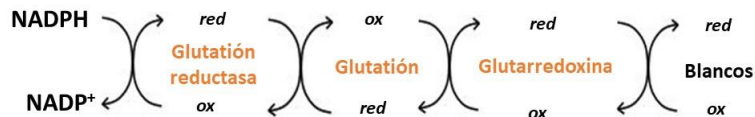


Figura 7. Sistemas de oxidación/reducción para los sistemas de la tiorredoxina (arriba) y el glutatión (abajo) donde se muestran las distintas enzimas/moléculas con capacidad de oxidarse o reducirse entre ellas manteniendo así el estatus redox.

1.1.4 Concentraciones biológicas

En el medio intracelular, los tioles se encuentran a concentraciones altas, que alcanzan el rango milimolar. Los tioles de bajo peso molecular se encuentran representados mayoritariamente por el glutatión, con una concentración entre 2 y 17 mM [13]. En el citosol, el glutatión se encuentra prácticamente en su totalidad reducido [14], [15] y en la célula en general un 91% reducido [16]. Los tioles que se encuentran a mayor concentración en el medio intracelular son los tioles proteicos, que se encuentran también mayoritariamente reducidos (90% [16]).

A diferencia de lo que ocurre en el medio intracelular donde los tioles (principalmente glutatión y tioles proteicos) se encuentran en alta concentración y mayoritariamente reducidos, en el medio extracelular, particularmente en el plasma, los tioles se encuentran en menor concentración y están predominantemente oxidados. El tiol más abundante lo constituye la seroalbúmina humana (HSA) (~0.6 mM) [16], cuya única cisteína libre se encuentra mayoritariamente reducida. Los tioles de bajo peso molecular, representados por el glutatión, cisteína, cisteinilglicina y homocisteína se encuentran a una concentración total de 12-20 μ M [17] [18]. La concentración de tioles reducidos representa un porcentaje minoritario (1-9%) del total de especies oxidadas y reducidas [17] [18], y es considerablemente menor al porcentaje en el medio intracelular [19].

1.1.4.1 Abundancia de tiolato

Como se mencionó previamente, el tiolato es mejor nucleófilo que el tiol pero la abundancia de éste en el medio va a depender, además de la concentración, del pK_a del tiol y el pH del medio [4]. El pH en el medio interno en humanos (pH fisiológico) es 7.4 pero puede cambiar en determinados ambientes (lisosomas) o en determinadas situaciones como en la inflamación. A su vez, el valor del pK_a varía de un tiol a otro (tabla 1) y en tioles proteicos puede variar significativamente respecto a la forma libre ya que en las proteínas el entorno suele ser más hidrofóbico que en solución y los aminoácidos que se encuentren en el entorno inmediato al tiol pueden afectar su pK_a , modificando de esta manera también la nucleofilia. Además, en enzimas el entorno inmediato puede favorecer determinadas reacciones al estabilizar los grupos funcionales con otros residuos y manteniendo a los grupos reaccionantes y al sustrato en una posición favorable (figura 4).

Tabla 1. Valor de pK_a de distintos tioles biológicos para las especies con los carboxilatos ionizados y los aminos protonados [2]

Tiol	pK_a
Homocisteína	9.1
Cisteína	8.29
Glutatión	8.94
Cistenilglicina	7.95

1.2 Ácidos grasos nitroalquenos

1.2.1 Características

Se denomina ácido graso nitroalqueno a cualquier ácido graso que tenga un grupo nitro (NO_2) unido a uno de los carbonos de su cadena (figura 8), el cual se encuentra insaturado, por lo cual se lo clasificara como un nitroalqueno. En éste trabajo se denominarán siempre como ácidos grasos nitroalquenos a partir de la traducción de “nitroalkene fatty acids” [3].

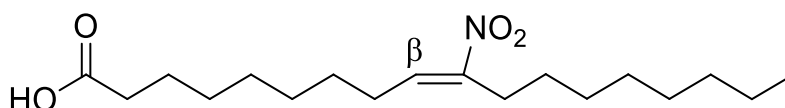


Figura 8. Molécula de ácido 10-nitrooleico (NO_2OA) formada por un ácido graso de 18 carbonos con un doble enlace entre los carbonos 9 y 10 y un grupo nitro en el carbono 10.

1.2.2 Síntesis

Los ácidos grasos nitroalquenos pueden ser sintetizados en el laboratorio a partir de ácidos grasos insaturados y compuestos de nitrógeno como el nitrito (NO_2^-) y peroxinitrito (ONOO^-) [20] [21]. Para su estudio, han sido sintetizados regioisómeros y variantes marcadas isotópicamente [21] [22].

También pueden formarse endógenamente en procesos de digestión e inflamación donde se forman especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno, lo que deriva en la formación de NO_2^\cdot (dióxido de nitrógeno) el cual reacciona con ácidos grasos insaturados [23].

En la digestión, puede formarse luego de la ingesta de ácidos grasos insaturados (por ejemplo en aceites) y nitrito (NO_2^-), presente en varios vegetales y carnes curadas, que luego pueden transformarse en NO_2^\cdot [23]. Los ácidos grasos nitroalquenos también se encuentran presentes en alimentos como las aceitunas y aceite de oliva [24]. Investigaciones sostienen que algunas de las propiedades benéficas de la dieta mediterránea, como la protección contra problemas cardiovasculares, puede deberse a la presencia y formación de ácidos grasos nitrados [25], dado que esta dieta incluye aceitunas, aceite de oliva y vegetales de hoja crudos en gran cantidad.

La formación de ácidos grasos nitroalquenos también puede darse en procesos inflamatorios. La detección de varios isómeros de distintos tipos de lípidos nitrados in vivo lleva a pensar que su formación no es enzimática, dado que este tipo de reacciones suele dar isómeros específicos. Se detectó la presencia

de ácido linoleico nitrado (LNO₂) en plasma humano [26] y varios tipos de ácidos grasos nitrados en fluidos humanos [27] y se encontró que éste y otros lípidos nitrados pueden formarse en la mitocondria de tejido cardíaco luego de varios ciclos cortos de isquemia y reperfusión.

En los episodios de isquemia y reperfusión se producen grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno lo cual favorece la formación de lípidos nitrados y se cree que la protección contra futuras isquemias que se desarrolla luego de sufrir una puede estar relacionada con la formación de estos ácidos grasos, como una respuesta adaptativa [28] [29] [30].

1.2.2.1 Características químicas

El grupo nitro es un grupo fuertemente electrón atrayente y debido a esto, en los nitroalquenos el carbono insaturado en posición β respecto al grupo nitro actúa como un electrófilo blando permitiéndole reaccionar con nucleófilos (figura 9), especialmente nucleófilos blandos. Debido a esta propiedad, estas moléculas reaccionan reversiblemente con tioles formando aductos de Michael [31].

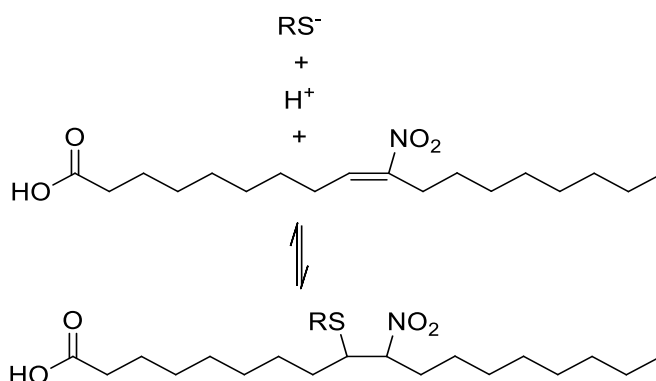


Figura 9. Reacción reversible entre un tiolato genérico (mostrando el hidrogenión liberado en su formación a partir de un tiol) y el ácido 10-nitrooleico (arriba) dando como producto un aducto de Michael (abajo).

Estas reacciones se pueden dar tanto con tioles de bajo peso molecular como tioles que forman parte de proteínas. Al ser reversibles pueden ser moduladas por la presencia de nucleófilos competidores como el glutatión (GSH) y otros tioles de bajo peso molecular, lo que hace que sean fácilmente regulables.

En el caso de tioles que forman parte o se encuentran cerca del sitio catalítico de una enzima, la reacción con un ácido graso nitroalqueno podría dar lugar a su inhibición.

1.2.3 Propiedades biológicas

Las características químicas de los ácidos grasos nitroalquenos les permiten reaccionar con nucleófilos de proteínas, principalmente mediante procesos de alquilación de tioles [32]. Las modificaciones postraduccionales introducidas pueden regular la estructura, función y distribución subcelular de las proteínas y por ende son capaces de mediar respuestas de señalización [25].

1.2.3.1 Propiedades antihipertensivas

El óxido nítrico (NO^*) actúa como vasodilatador por medio de la activación de la enzima guanilato ciclasa transformando la guanosina trifosfato (GTP) en guanosina monofosfato cíclico, (cGMP) que por fosforilación de proteínas activa vías de señalización que llevan a la relajación de vasos sanguíneos [33]. Es conocido que puede ser liberado por óxidos de nitrógeno orgánicos como la nitroglicerina, la cual debe sus propiedades vasodilatadoras a la liberación de NO^* [34]. Los ácidos grasos nitroalquenos pueden también tener la capacidad de liberar NO^* , el mecanismo por el cual se libera no está del todo claro pero se ha observado que ocurre espontáneamente y podría tratarse de una forma de reserva de NO^* empleada por el organismo.

Se le ha encontrado actividad vasodilatadora al LNO_2 y otros ácidos grasos nitroalquenos [20] [35], la cual es inhibida por atrapadores de NO^* , sugiriendo que la actividad puede darse por liberación de éste. No obstante, por más que estudios evidencian la liberación de NO^* por parte de ácidos grasos nitroalquenos [36] [30], no se ha encontrado evidencia de que esta liberación se dé en cantidades significativas [29] y las condiciones donde se puede dar no suelen encontrarse in vivo por lo que se puede concluir que la liberación de NO^* como mecanismo por el cual los ácidos grasos nitroalquenos tienen propiedades antihipertensivas es minoritario.

El LNO_2 puede disminuir la presión arterial al inhibir la enzima epóxido hidrolasa soluble uniéndose a la cisteína 521, que se encuentra cerca del sitio catalítico. Esto provoca la acumulación del sustrato de la enzima (ácido epoxieicosatrienoico) bajando la presión arterial [21].

1.2.3.1.1 Propiedades antiinflamatorias

Se ha encontrado que los ácidos grasos nitroalquenos tienen también propiedades antiinflamatorias, donde actúan interviniendo en procesos de señalización actuando como electrófilos [32].

Se encontró que el LNO₂ inhibe la agregación de las plaquetas por medio de movilización de ión calcio y aumentando el AMP cíclico (cAMP) [37], y estimula la expresión de la hemo oxigenasa 1 (HO-1) a nivel transcripcional en las células endoteliales [38]. La HO-1 es una enzima que degrada al grupo hemo formando biliverdina, ión hierro y monóxido de carbono (CO). Esta enzima está asociada a la protección contra los efectos de la inflamación y algunos de sus productos (como el CO) poseen también propiedades antiinflamatorias [38].

Los ácidos grasos nitroalquenos también inhiben la liberación de citoquinas proinflamatorias, proteínas reguladoras de la respuesta inflamatoria que estimulan varias respuestas del sistema inmunológico. Esta capacidad fue hallada para el ácido oleico nitrado (NO₂OA por su nombre en inglés, como el resto de las siglas mostradas a continuación) para citoquinas como la interleucina 6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) [39].

El LNO₂ y el NO₂OA también inhiben la expresión génica en la vía Nf-κB [27], otros nitrolípidos como el nitro-colesterol-linoleato (CLNO₂) comparten esta propiedad [40]. Además, el LNO₂ inhibe la liberación de citoquinas y otras acciones pro-inflamatorias estimuladas por lipopolisacáridos en macrófagos [37] e induce la expresión de HO-1 [38].

El LNO₂ y el CLNO₂, en menor cantidad, tienen también la capacidad de inhibir la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa 2 [40]. Esta enzima cataliza la síntesis de NO· el cual tiene efectos regulatorios sobre la inflamación.

Las propiedades de los ácidos grasos nitroalquenos previamente mencionadas son benéficas para el tratamiento y prevención de enfermedades y hacen de éstos un blanco interesante para combatir enfermedades como la diabetes, hipertensión, restenosis, arterioesclerosis, endotoxemia, síndrome metabólico, lesión renal y daño por isquemia y reperfusión [32] [41] [42] [43] [35] [36] [30] [29].

1.2.4 Mecanismos de señalización

La modificación postraducciona l de proteínas por alquilación de sus cisteínas con ácidos grasos nitroalquenos en reacciones de adición de Michael parece

ser el mecanismo principal por el cual éstos ejercen su potente bioactividad. Teniendo en cuenta su fuerte naturaleza electrofílica, la abundancia de nucleófilos críticos como residuos catalíticos y regulatorios en proteínas de vías de señalización, este mecanismo debe ser considerado al evaluar estos aspectos de la actividad de ácidos grasos nitroalquenos.

1.2.4.1 NF-κB

Los ácidos grasos nitroalquenos pueden inhibir la liberación de citoquinas estimulada por lipopolisacáridos [30] y una de las principales vías de señalización donde éstos actúan es por medio del factor de transcripción NF-κB el cual cumple un rol importante en la orquestación de procesos inflamatorios al regular genes que codifican citoquinas proinflamatorias como IL-6, TNFα, MCP-1.

El NF-κB se encuentra asociado a la proteína inhibitoria IκB. Al recibir estimulación la IκB se degrada liberando al NF-κB, que migra al núcleo donde media la expresión génica [31]. El factor NF-κB está compuesto por dos subunidades llamadas p50 y p65, ambas contienen un residuo de cisteína en el bolsillo de unión al ADN capaces de reaccionar covalentemente con electrófilos como los ácidos grasos nitroalquenos resultando en la inhibición de la expresión génica mediada por NF-κB [44] [45]. Tanto el NO₂OA como el LNO₂ reaccionan con la subunidad p65 inhibiendo la unión al ADN [37].

1.2.4.2 Keap1 y Nrf2

La proteína Keap1 tiene un rol importante en la regulación de respuestas antiinflamatorias ya que actúa como un inhibidor de la proteína Nrf2 al unirse a ésta, reprimiendo su activación al promover su degradación por el proteasoma e impedir su traslocación al núcleo [46]. Al activarse, el Nrf2 genera una respuesta antioxidante y antiinflamatoria coordinada, al unirse al elemento de respuesta antioxidante (ARE) que regula la expresión génica.

Keap1 es una proteína rica en cisteínas, con 27 residuos en humanos y 25 en ratones [47]. Tiene cuatro dominios funcionales, donde la región intermedia (IVR) es la que posee la mayor cantidad de cisteínas propensas a alquilación, por ejemplo, por ácidos grasos nitroalquenos. Los procesos de alquilación de cisteínas en Keap1 llevan a la inactivación de ésta, activando así a la Nrf2 [48] [49]. Seis residuos de cisteína fueron identificados como susceptibles de modificación por nitroalquilación en Keap1 a las concentraciones de NO₂OA más bajas utilizadas. De los seis residuos de Cys reactivos con nitroalqueno identificados, los residuos Cys257, Cys273 y Cys288 han sido frecuentemente reportados como blancos para la modificación [47] [50] [51].

1.2.4.3 HSF

Los ácidos grasos nitroalquenos pueden inducir la expresión génica por alquilación de cisteínas proteicas en las vías mencionadas anteriormente, no obstante, se encontró que la mayoría de los genes activados por el NO₂OA no lo son por medio de éstas vías sino por el factor de transcripción de choque térmico (HSF). Dado que la respuesta de choque térmico media acciones antiinflamatorias y citoprotectoras, se propone que este mecanismo contribuya a las funciones protectoras de los ácidos grasos nitroalquenos y otros ácidos grasos electrofílicos [52].

1.2.5 Ácidos grasos nitroalquenos conjugados

Los ácidos grasos nitroalquenos conjugados poseen dos dobles enlaces conjugados (dienos) y un grupo nitro. El CLA, por Conjugated Linoleic Acid) es un blanco preferencial de nitración ya que se obtienen varios órdenes de magnitud más de derivados nitrados en comparación al derivado bis-alílico. El producto de la nitración del CLA es llamado ácido nitrolinoleico conjugado (NO₂CLA). El NO₂CLA fue detectado en el plasma de humanos sanos y se ve incrementado en tejidos que sufren episodios de isquemia-reperfusión [53]. Los isómeros más abundantes encontrados en humanos, son los ácidos 9- y 12-nitro-octadeca-(9,11)-dienoico (Figura 10).

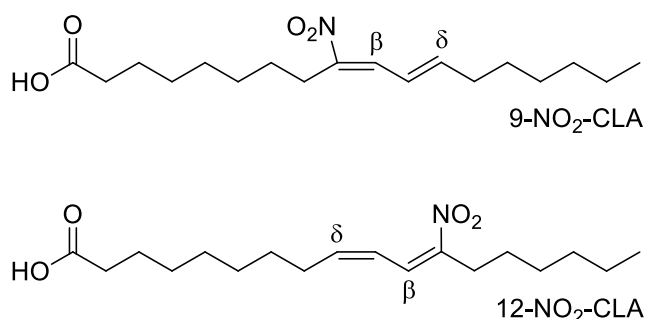


Figura 10. Ácido nitrolinoleico conjugado. El ácido 9-nitro-octadeca(9,11)-dienoico (arriba) y el ácido 12-nitro-octadeca-(9,11)-dienoico (abajo). Ambos ácidos grasos tienen 18 carbonos y dos dobles enlaces conjugados en los carbonos 9 y 11 diferenciándose únicamente en la posición del grupo nitro. En este trabajo, la mezcla de ambos ácidos es llamada NO₂CLA.

1.3 Seroalbúmina humana

La seroalbúmina humana (HSA por Human Serum Albumin) es una proteína sintetizada en el hígado a partir de un único gen y presente en el plasma

humano, donde constituye el 60% de las proteínas totales, con una concentración de 43 g/L (0.6 mM) [54].

1.3.1 Estructura

La HSA es una proteína monomérica, no glicosilada con tres dominios. Tiene 585 aminoácidos (66438 Da) y 17 puentes disulfuro. Sólo una de sus cisteínas (Cys34) se encuentra libre. A pH 7.4, la HSA tiene 215 iones con una carga neta de -19 haciendo de ésta una proteína altamente soluble y el principal anión en el plasma [54]. Su estructura cristalina indica que se trata de una proteína con forma de corazón con un 67% de α -hélices y carente de hojas β . La HSA tiene tres dominios denominados I, II y III, divididos en subdominios A y B (figura 11). A pesar de que los tres dominios son homólogos su distribución es asimétrica. La Cys34 se encuentra en la superficie del dominio I con el azufre orientado hacia el interior de la proteína [55]. La unión de ligandos genera cambios conformacionales en la HSA, por ejemplo, la unión de ácidos grasos induce cambios globales y locales. Globalmente, promueven rotaciones relativas de los tres dominios. Los cambios locales son más sutiles pero relevantes a nivel de la Cys34. La HSA es capaz de unir varios ácidos grasos por molécula. Los sitios de unión se encuentran distribuidos de manera asimétrica por toda la proteína.

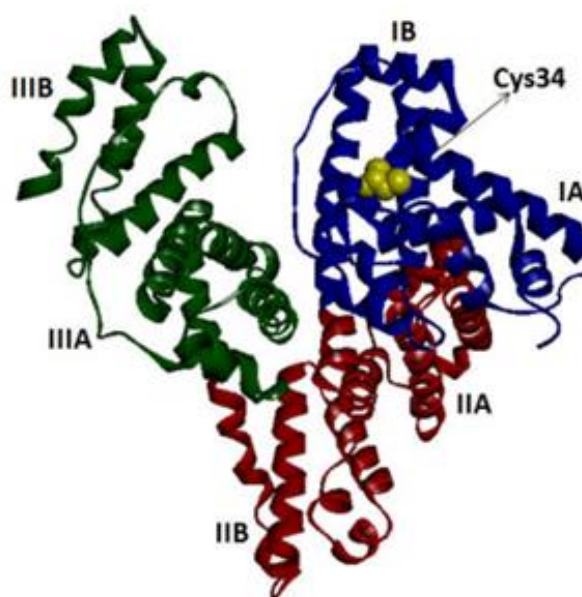


Figura 11. Molécula de HSA donde se puede apreciar sus tres dominios y subdominios, su estructura con forma de corazón, alto porcentaje de hélices- α y ausencia de hojas- β . La cisteína 34 (Cys 34) se encuentra representada en color amarillo. Tomado de [56]. Código de acceso en PDB: 4EMX.

1.3.2 Funciones

Una de las principales funciones de la HSA es el transporte de sustancias en el torrente sanguíneo por medio de uniones no específicas lo cual le permite unirse a un amplio rango de moléculas principalmente hidrofóbicas como lípidos, metabolitos o sustancias exógenas como medicamentos. ácidos grasos de cadena larga y mediana son ligandos endógenos principales dado que la HSA posee varios “bolsillos hidrofóbicos” que interactúan con las cadenas hidrocarbonadas acompañados de residuos polares o básicos que interactúan con los ácidos carboxílicos [55] [56]. Al ser altamente insolubles lo que dificulta su transporte en el plasma, y activos metabólicamente precisan ser transportados por la HSA para poder alcanzar sus tejidos blanco. El transporte ocurre fundamentalmente desde el tejido adiposo en condiciones de ayuno o ejercicio intenso hacia los tejidos blanco, principalmente tejido muscular cardíaco. En condiciones fisiológicamente normales la HSA une entre 0.3 y 1 ácido graso por molécula [57] pero esto aumenta en enfermedades como la diabetes, durante ejercicio intenso o estimulación adrenérgica [54].

Además de ácidos grasos, la HSA también une otras moléculas endógenas como hormonas, vitaminas, hemina, metales, bilirrubina y sales biliares además de moléculas exógenas como drogas, péptidos y proteínas. Los medicamentos, luego de ingresar al organismo, suelen ser transportados en el torrente sanguíneo unidos a la HSA, la cual facilita su llegada al sitio donde actuarían. Debido a esto es importante al proponer una sustancia como un potencial medicamento estudiar su afinidad con la HSA a modo de comprender cómo se daría su transporte en el organismo. En el caso del NO_2CLA , al tratarse de un ácido graso, es de esperar que se una de manera no covalente con la HSA pero además de esto también es posible que reaccione con el tiol libre de la HSA por medio de una adición de Michael.

Otra función de la HSA es la regulación de la presión coloidosmótica. Es responsable del 80% de la presión oncótica (tipo de presión osmótica causada por proteínas) en plasma [54]. También se ha propuesto que puede ejercer un papel como antioxidante lo cual se debe en parte a algunos de sus ligandos como los iones de cobre que al estar unidos a la HSA no pueden promover procesos oxidativos [58]. Otro ligando es la bilirrubina, que tiene la capacidad de captar radicales de naturaleza lipídica [59]. La cisteína 34, que va a ser mencionada en el próximo punto, contribuye también al rol de la HSA como antioxidante al tener la capacidad de reaccionar con oxidantes.

1.3.2.1 Cisteína 34

La cisteína 34 es la única cisteína de la HSA que no se encuentra formando un enlace disulfuro intramolecular, dejando el tiol libre y apto para participar en reacciones químicas con su entorno [55]. La presencia de esta cisteína le da propiedades antioxidantes a la HSA independientemente de sus ligandos, haciéndola una de las pocas proteínas en plasma con esa capacidad, además de ser el tiol reducido mayoritario en este compartimento [60].

La cisteína 34 puede encontrarse reducida (75% en condiciones normales) u oxidada, en su mayoría formando un disulfuro con tioles de bajo peso molecular [60] como, ordenados por su abundancia, cisteína, cisteinilglicina, homocisteína y glutatión. Existe un porcentaje de HSA minoritario que se encuentra en estados de oxidación mayores como sulfínico o sulfónico [60] [61]. Además de la oxidación, el tiol de la cisteína 34 puede sufrir otros tipos de reacciones como nitrosilación y adición de Michael con electrófilos.

El tiol de la cisteína 34 tiene una reactividad baja al compararlo con tioles de bajo peso molecular, lo cual puede deberse a impedimento estérico por el gran volumen y forma de la HSA, además de su ubicación en una hendidura que también limita su exposición al medio [19].

2. Objetivos

Las propiedades benéficas y roles regulatorios previamente mencionados que se han encontrado en los ácidos grasos nitroalquenos los vuelve compuestos muy interesantes para su uso en tratamiento de varias afecciones. Sin embargo, se sabe poco acerca de su distribución y transporte en la circulación y se conoce muy poco sobre la interacción de estos compuestos con los tioles plasmáticos y con la HSA como proteína transportadora de ácidos grasos. Éstos son aspectos que resultan fundamentales a la hora de utilizar estos compuestos como drogas dado que repercutirán en sus propiedades farmacológicas. En este contexto se definen los siguientes objetivos.

2.1 Objetivo general

Estudiar la interacción del NO₂CLA con los tioles de bajo peso molecular presentes en el plasma y con la albúmina.

2.1.1 Objetivo específico 1

Estudiar la reactividad del NO₂CLA con tioles de bajo peso molecular presentes en plasma buscando obtener las constantes cinéticas de la reacción y proponiendo un posible mecanismo.

2.1.2 Objetivo específico 2

Caracterizar las interacciones entre el NO₂CLA y la albúmina, tanto en uniones no covalentes como con el tiol libre de la albúmina.

3. Materiales y métodos

3.1 Reactivos y equipos

En este trabajo, los tioles de bajo peso molecular que se utilizaron fueron glutatión correspondiente a Acros, cisteína correspondiente a Amrasco y la homocisteína y cisteinilglicina correspondientes a Sigma. El ácido 5-5'-ditio-2-nitrobenzoico (DTNB) usado para medir el estado de oxidación de los tioles corresponde a Applichem, la 4,4'-ditiodipiridina corresponde a Acros, y la HSA utilizada a Sigma.

Para la separación de HSA en los ensayos de la reacción de su tiol libre con NO₂CLA se utilizaron microcolumnas de gel filtración SpinTrap G-25 y filtros de ultrafiltración Vivaspin 500 de General Electric Healthcare, y la centrífuga Eppendorf Centrifuge 5424.

Los espectros de absorción y el seguimiento de las reacciones entre NO₂CLA y tioles, además de las medidas de cuantificación, fueron realizados en un espectrofotómetro UV-Visible Cary 50 Tablet. En los casos en que las reacciones eran rápidas, éste fue acoplado con un aparato de flujo detenido (Applied Photophysics RX2000). Los espectros de absorción para el seguimiento de las interacciones entre HSA y NO₂CLA fueron realizados en un espectrofotómetro UV-Visible Shimadzu UV-1603.

3.1.1 Soluciones

Excepto que se indique lo contrario, todas las reacciones fueron realizadas en amortiguador fosfato 0.1 M, pH 7.4 con ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) 0.1 mM, a 25 °C. Para el estudio de la relación de la reacción con el

pH, el NO₂CLA (10 μM) fue mezclado con glutatión a distintas concentraciones (1–4 mM) usando soluciones amortiguadoras con igual fuerza iónica y distintos valores de pH (ácido 2- (N-morfolino) etanosulfónico (MES) 100 mM, Tris 52 mM y etanolamina 52 mM).

3.1.1.1 Tioles

Las soluciones de tioles fueron preparadas y utilizadas en el día en agua nanopura para evitar su oxidación. Su concentración se confirmó antes de cada experimento utilizando DTNB y midiendo luego la absorbancia del TNB (producto formado) a 412 nm con un coeficiente de absorptividad de 14,150 M⁻¹ cm⁻¹ [62].

3.1.1.2 NO₂CLA

El NO₂CLA, formado por la mezcla 1:1 de los ácidos 9-nitro-octadeca-(9,11)-dienoico y 12-nitro-octadeca-(9,11)-dienoico (figura 10) fue gentilmente cedido por Francisco Schopfer de la Universidad de Pittsburgh. El mismo se almacenó y es conservado en alícuotas con una concentración de 2 mM en metanol a -80 ° C. Para este trabajo se utilizó el coeficiente de absorptividad 6,490 M⁻¹cm⁻¹ que fue determinado para el NO₂CLA a 330 nm en amortiguador fosfato, 0.1 M, pH 7.4, 0.1 mM DTPA.

3.1.1.3 HSA

La HSA deslipidada se obtuvo siguiendo el protocolo de Chen [63]. La HSA con su tiol libre reducido se preparó incubándola con 2-mercaptoetanol (BME) 10 mM, por 30 minutos a temperatura ambiente y con agitación seguida de una gel filtración en columnas PD-10 previamente equilibrada con amortiguador fosfato. Para bloquear el tiol de la HSA, se incubó HSA deslipidada con 2-mercaptoetanol (BME) 10 mM, agregándole luego N-etilmaleimida (NEM) 150 mM, por 15 minutos a temperatura ambiente con agitación, seguido por una gel filtración. La HSA lipídada y con su tiol libre reducido se preparó incubando HSA deslipidada con ácido esteárico con una relación 5:1 ácido esteárico/HSA por 30 minutos a temperatura ambiente con agitación, agregándole luego BME seguido de una gel filtración. La concentración de HSA se obtuvo midiendo su absorbancia a 279 nm considerando un coeficiente de absorptividad de 0.531 (gramos/litro)⁻¹ cm⁻¹, y una masa molecular de 66,438 Dalton. La concentración de tiol libre en la HSA fue medida con DTNB en solución amortiguadora de pirofosfato 0.1 M, pH 9, 5 minutos.

3.1.2 Reacción entre tioles de bajo peso molecular y NO₂CLA

Se siguió la reacción del NO₂CLA (10 μM) con glutatión (0.2–15 mM), cisteína (0.5–7 mM), homocisteína (0.5–12 mM) y cisteinilglicina (1.5–7 mM). Los cambios fueron seguidos a 330 nm. En algunos experimentos se hicieron medidas a 250, 290 y 412 nm (para el TNB). Para el estudio de la relación de la reacción con el pH, el NO₂CLA (10 μM) fue mezclado con glutatión a distintas concentraciones (1–4 mM) usando soluciones amortiguadoras con igual fuerza iónica y distintos valores de pH.

4. Resultados y Discusión

4.1 Espectros de absorción del NO₂CLA

El NO₂CLA tiene dos dobles enlaces conjugados por lo que se espera que absorba luz en UV o visible. Para utilizar esta propiedad es necesario conocer el espectro de absorción de la molécula en el medio que se vaya a utilizar para determinar la longitud de onda y concentraciones adecuadas para trabajar. Muchas veces, los cromóforos como el NO₂CLA cambian su absorbancia al cambiar la polaridad del medio en el que son disueltos. Esta característica puede ser aprovechada experimentalmente, por ejemplo, siguiendo el cambio en la absorbancia cuando el cromóforo se une a una proteína, lo que provoca que el entorno de la molécula pase a ser más hidrofóbico.

Para estudiar estas propiedades se realizaron dos espectros con la misma concentración de NO₂CLA 10 μM entre 250 y 500 nm en amortiguador fosfato y en metanol, un medio más hidrofóbico que el anterior. En amortiguador, la absorbancia presentó un pico a aproximadamente 330 nm con una absorbancia máxima de 0.084 mientras que en el metanol el pico fue más alto con una absorbancia máxima de 0.108 a 313 nm, concluyendo que para el NO₂CLA hay un corrimiento de la absorbancia hacia el UV al aumentar la hidrofobicidad del medio. En ambos casos las medidas se repitieron luego de 15 minutos para detectar un posible decaimiento en la absorbancia por descomposición y en ambos casos se vio una caída poco significativa (Figura 12).

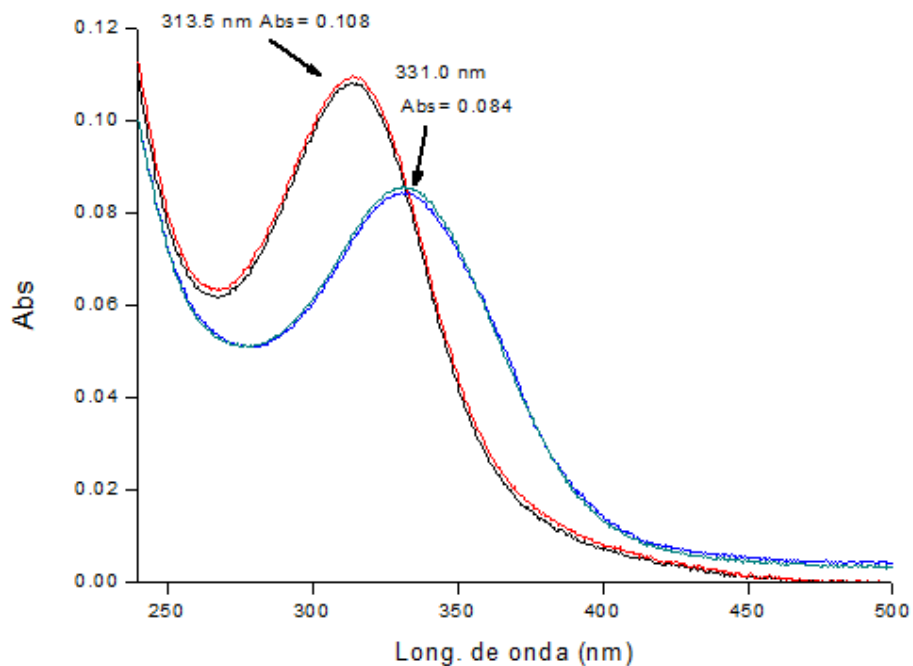


Figura 12. Espectro de absorción de NO_2CLA $10 \mu\text{M}$ en amortiguador fosfato (verde y azul 15 min después) y en metanol (rojo y negro 15 min después) donde se observa la absorbancia (eje y) en longitudes de onda entre 250 y 500 nanómetros (eje x) inmediatamente luego del mezclado y al cabo de 15 minutos.

Por otro lado, se espera que el NO_2CLA forme aductos de Michael con tioles, donde el azufre del tiol realiza un ataque nucleofílico sobre un carbono electrófilo del NO_2CLA uniéndose covalentemente a éste y originando una nueva molécula con propiedades espectroscópicas diferentes. Para ver esto se realizaron varios espectros a distintos tiempos de una mezcla de NO_2CLA y cisteína donde se observó que el máximo de absorbancia del NO_2CLA a 330 nm disminuye a medida que avanza la reacción debido a la desaparición de los dobles enlaces conjugados por el consumo de reactivo, mientras que se ve un aumento de absorbancia a 290 nm aproximadamente donde se asume que absorbe el producto formado (Figura 13).

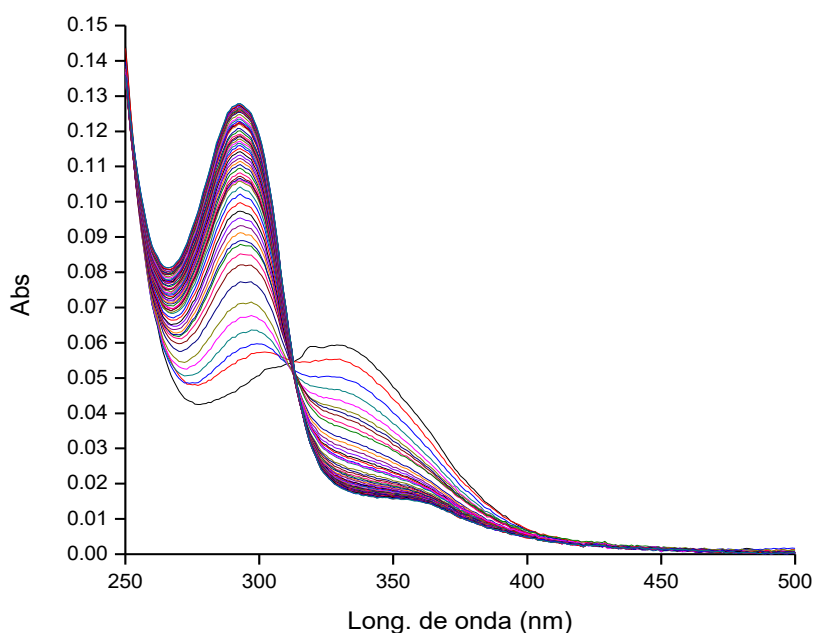


Figura 13. Espectros de absorción de una mezcla de NO₂CLA 10 μM y cisteína 25 mM en amortiguador fosfato a distintos tiempos (cada un minuto) durante 61 minutos. Se observa una disminución en la absorbancia a 330 nm debido al consumo de reactivo (correspondiente al NO₂CLA) y un aumento en la absorbancia a 290 nm debido a la formación de producto.

4.2 Cinética de la reacción entre NO₂CLA y tioles de bajo peso molecular

Para el estudio de la reacción se siguió la caída en la absorbancia a 330 nm con distintas concentraciones de tiol. La reacción se realizó en condiciones de pseudo primer orden, con una concentración fija de NO₂CLA de 10 μM y concentraciones de tiol en el rango de milimolar. Inicialmente se utilizó un espectrofotómetro convencional, sin accesorio de flujo detenido.

Se obtuvieron curvas correspondientes a una caída exponencial que ajusta con la ecuación $Abs = Amplitud * e^{(-k_{obs} * t)} + offset$ (Figura 14).

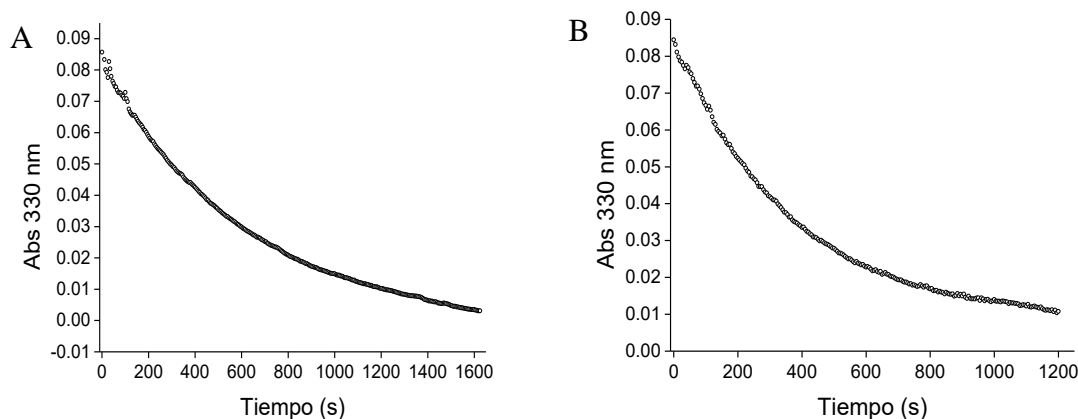


Figura 14. Gráficas de absorbancia a 330 nm en función del tiempo (en segundos) de una mezcla de NO₂CLA 10 μM con glutatión (A) y cisteinilglicina (B) a concentración de 2 mM en solución amortiguadora fosfato. Se observa una caída en la absorbancia a 330 nm debido al consumo de NO₂CLA en forma de exponencial simple.

Todos los tioles analizados muestran el mismo comportamiento menos la homocisteína, donde en lugar de una exponencial simple se observó una doble exponencial (Figura 15), lo que indicaría dos fases en la reacción, una rápida seguida de una lenta.

Después de varias repeticiones donde se descartó la presencia de un contaminante como la homocisteína tiolactona o errores en la medición se llegó a la conclusión de que la reacción entre NO₂CLA y tioles tiene dos fases pero la fase rápida sólo pudo verse en la homocisteína porque es el tiol de los estudiados que reacciona más lento. En los otros tioles (cisteína, cisteinilglicina y glutatión) la fase rápida ocurre en la cubeta antes de que ésta sea colocada en el espectrofotómetro por lo cual no llega a observarse.

Para poder estudiar la fase rápida se acopló un aparato de flujo detenido al espectrofotómetro el cual permite medir la absorbancia con un tiempo muerto de sólo 10 milisegundos.

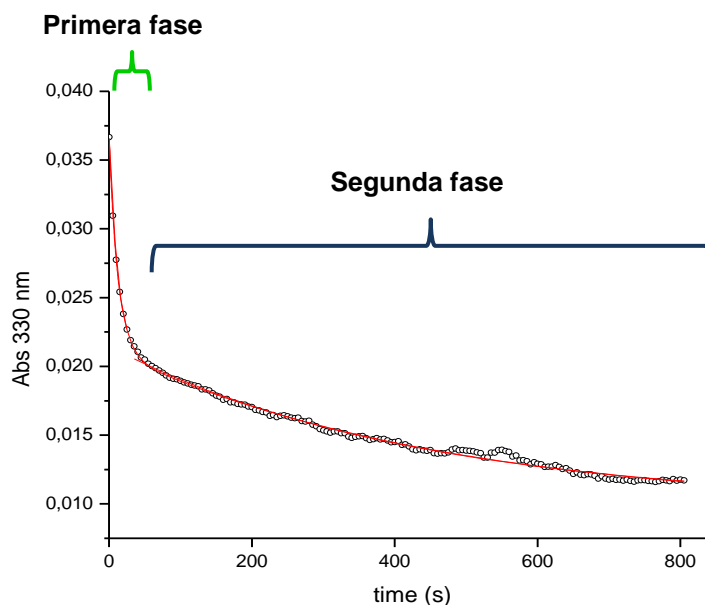


Figura 15. Absorbancia a 330 nm en función del tiempo (en segundos) de la reacción entre NO₂CLA (10 μM) y homocisteína 2.4 mM en solución amortiguadora fosfato. Se observa una caída en la absorbancia a 330 nanómetros pero a diferencia de la figura 14 se ve una doble exponencial con una primera fase rápida (señalada con verde) seguida de una segunda fase más lenta (señalada con azul). En rojo se muestra el mejor ajuste a una función doble exponencial.

Luego del hallazgo de las dos fases se repitieron las reacciones con todos los tioles en las mismas condiciones pero con un sistema de flujo detenido y efectivamente se observó una primera fase rápida en todos los casos (Figuras 16 y 17). Con el objetivo de obtener constantes cinéticas las curvas se ajustaron a una doble exponencial ($Abs = Amplitud1 * e^{(-k_{obs1}*t)} + Amplitud2 * e^{(-k_{obs2}*t)} + offset$) y a una exponencial más recta ($Abs = Amplitud * e^{(-k_{obs1}*t)} + S*x + offset$) al estudiar únicamente la fase rápida (Figura 16). Las gráficas se ajustaron a sus respectivas ecuaciones utilizando el programa Origin pro 8.

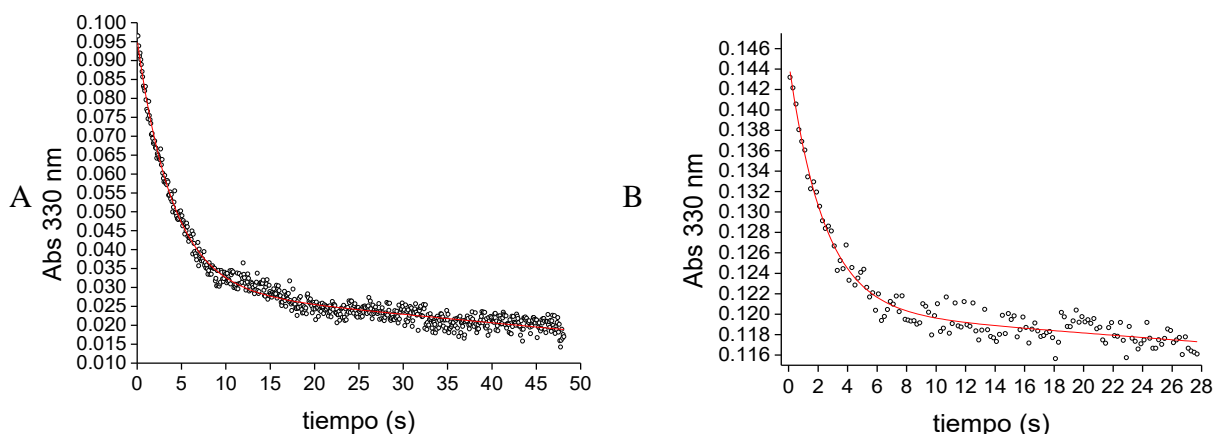


Figura 16. Gráficas de absorbancia a 330 nm en función del tiempo de reacciones entre NO₂CLA (10 μM) y cisteína 7 mM (A), glutatión 5 mM (B) medidas utilizando el accesorio de flujo detenido donde se observan los primeros segundos de la reacción que es donde transcurre la fase rápida. Las gráficas fueron ajustadas a exponenciales más recta definiendo distintos intervalos de tiempo a ajustar (trazo rojo).

4.3 Obtención de constantes cinéticas para la reacción entre NO₂CLA y tioles de bajo peso molecular

Dado que las constantes cinéticas obtenidas de los ajustes a las funciones exponenciales (representadas con la letra k o k_1 y k_2 en los ajustes a dobles exponencial) fueron obtenidas en condiciones de pseudo primer orden respecto al tiol, se pueden denominar “ k_{obs} ” al ser valores observables experimentalmente y a partir de ellas se pueden obtener las constantes cinéticas de la reacción.

Para esto, se hacen gráficas de los valores de k_{obs} obtenidas para cada tiol en función a las concentraciones del mismo a las que fueron obtenidas. La k_{obs} varía con el tipo de tiol, como se puede apreciar en las gráficas anteriores y aumenta de manera directamente proporcional con la concentración de éste.

En las gráficas de las constantes de la fase rápida se obtuvieron funciones lineales (figura 17) donde la pendiente corresponde a la k_{on} (constante en el sentido de formación de producto) y el intercepto a la k_{off} (constante en el sentido de la reacción reversa) siguiendo la ecuación:

$$k_{obs\ 1} = k_{on\ 1}[\text{tiol}] + k_{off\ 1} \quad (\text{ecuación 4})$$

Las gráficas de la fase lenta, corresponden a funciones hiperbólicas que no interceptan en cero, (figura 18). En este caso la cinética, además de las constantes propias de la fase lenta, se ve afectada por la reacción rápida ya que ésta ocurre primero y de ella depende la cantidad de reactivos disponibles. La k_{obs} va a depender de la suma de las constantes de velocidad efectiva de la reacción rápida en ambos sentidos. La constante en el sentido de formación de producto viene dada por la $k_{on} * [tiol]$ multiplicada por la fracción de NO_2CLA disponible, que aumenta hiperbólicamente con la concentración de tiol siguiendo la ecuación:

$$k_{obs\ 2} = k_{on\ 2} * K_{eq\ 1} * [tiol] / (*K_{eq1} + [tiol]) + k_{off\ 2} \text{ (ecuación 5)}$$

Para varios de los tioles, las k_{on} y k_{off} de la fase lenta se determinaron por el ajuste a una recta de los valores obtenidos a concentraciones relativamente bajas de tiol (menores que K_{eq} de la fase rápida).

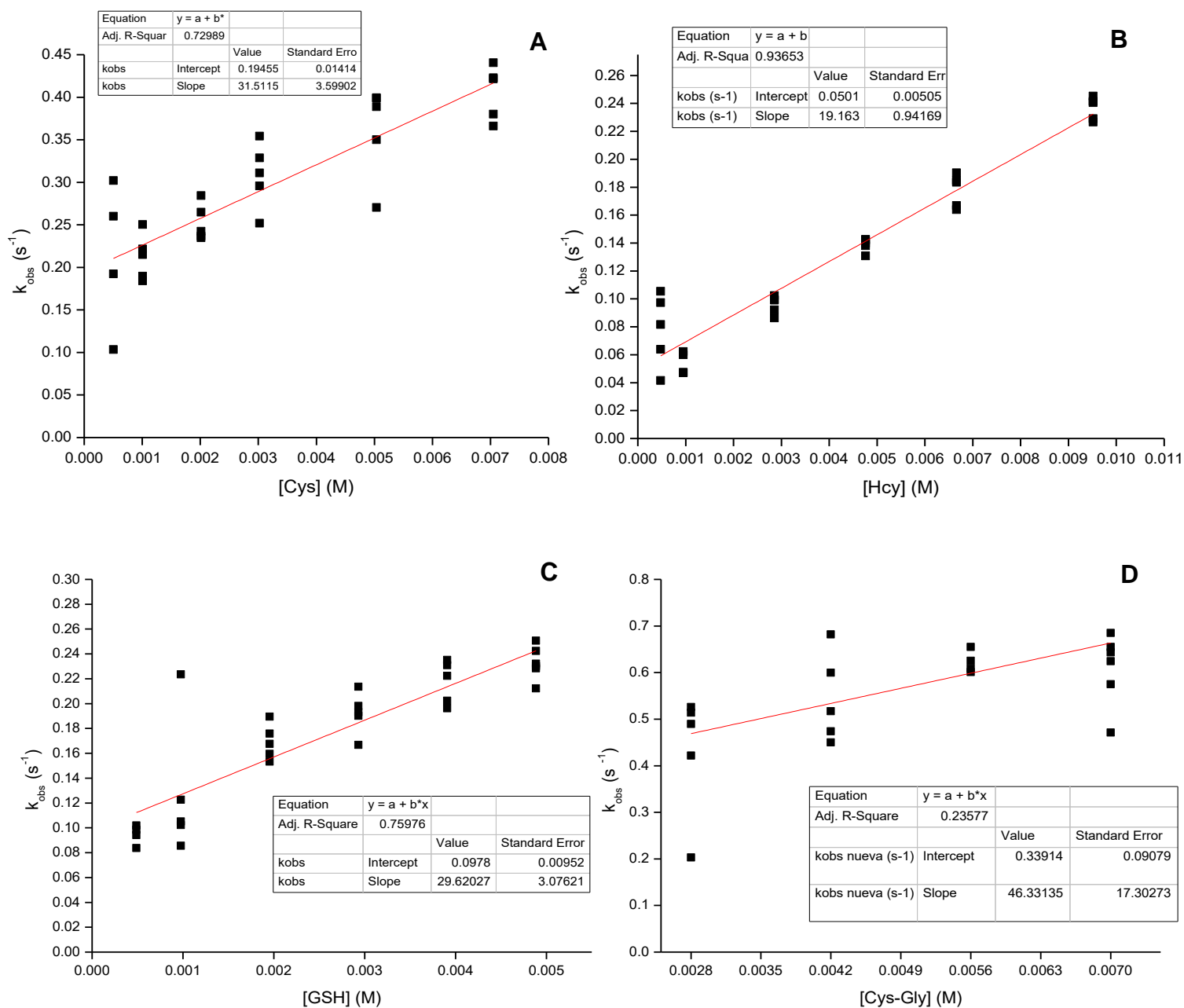


Figura 17. Constantes k_{obs} (s^{-1}) de la fase rápida de la reacción entre NO_2CLA y tioles obtenidas en pseudo primer orden en función de la concentración de tiol (M) para cisteína (A), homocisteína (B), glutatión (C) y cisteinilglicina (D). Las gráficas fueron ajustadas a funciones lineales donde la pendiente corresponde a la constante de la formación de producto (k_{on} , $M^{-1} s^{-1}$) y el intercepto a la constante de la reacción reversa (k_{off} , s^{-1}).

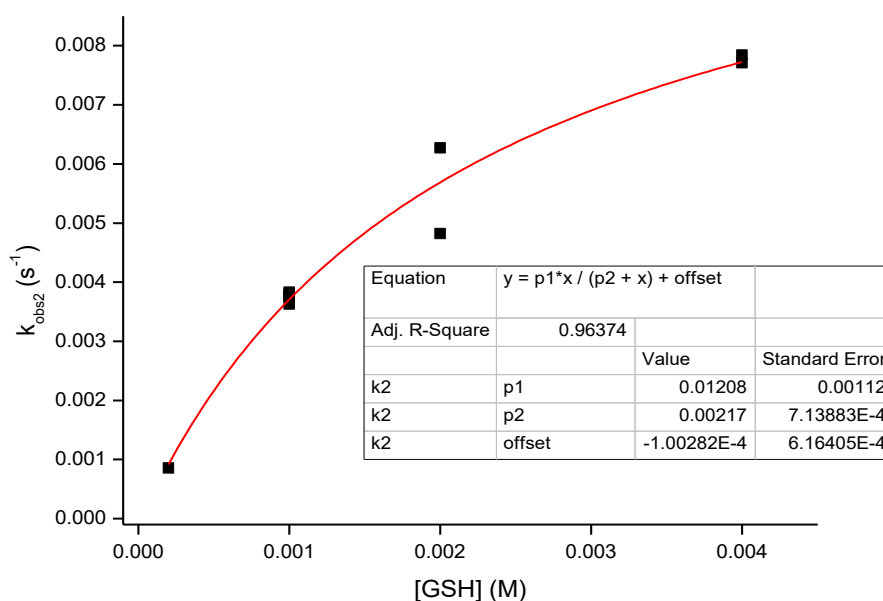


Figura 18. Constantes k_{obs} (s^{-1}) de la fase lenta de la reacción entre NO_2CLA y tioles obtenidas en pseudo primer orden en función de la concentración de tiol (M) para glutatión donde se observa una función de tipo hiperbólica.

Las constantes cinéticas k_{on} y k_{off} se obtuvieron realizando los ajustes con las ecuaciones anteriores para varios ensayos y promediando los resultados obtenidos de las distintas repeticiones para cada tiol (tabla 2).

Tabla 2. Constantes k_{on} y k_{off} con sus desvíos estándar de las fases rápida y lenta de la reacción entre NO_2CLA y tioles a pH 7.4 y 25° C, indicando en cada caso el respectivo tiol (izquierda). Los desvíos estándar son mayores en las k_{off} debido a los valores pequeños y que fueron determinados a partir del intersepto con el eje y, no de la pendiente.

Tiol	Fase rápida		Fase lenta	
	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})
Homocisteína	18.9 ± 0.5	0.03 ± 0.02	0.37 ± 0.02	$7 \times 10^{-4} \pm 4 \times 10^{-4}$
Cisteína	33 ± 1	0.200 ± 0.002	2.8 ± 0.2	$(5.5 \pm 0.5) \times 10^{-4}$
Glutatión	32 ± 3	0.11 ± 0.010	3.10 ± 0.05	$(3 \pm 1) \times 10^{-4}$
Cistenilglicina	50 ± 4	0.28 ± 0.06	12.2 ± 0.3	$5 \times 10^{-5} \pm 5 \times 10^{-5}$

Estos resultados son compatibles con la presencia de dos reacciones reversibles que se dan en conjunto, lo que podría explicarse debido a la presencia de dos centros electrofílicos en el NO_2CLA .

Estos dos centros serían el carbono insaturado que se encuentra en posición β (beta) respecto al grupo nitro, que está presente también en otros nitroalquenos

mencionados como el NO₂OA, y el carbono insaturado que se encuentra en posición δ (delta) (figura 13) respecto al grupo nitro, este último es también un centro electrofílico debido a que los dobles enlaces en la molécula se encuentran conjugados, lo que permite movimiento de electrones entre ambos carbonos y el grupo nitro. La velocidad y cinética distintas de la fase rápida y la fase lenta indicarían que los centros electrofílicos no son equivalentes [3].

4.4 Análisis de productos por espectrofotometría UV-Visible

Una vez resuelta la cinética de las dos fases de la reacción es necesario también comprenderla del punto de vista mecanístico. Se parte de la base, por el tipo de reactivos, que se trata de dos adiciones de Michael donde el tiol, en forma de tiolato realiza un ataque nucleofílico a uno de los carbonos electrofílicos del NO₂CLA.

Esta hipótesis trae consigo preguntas como a qué carbono del NO₂CLA corresponde cada fase, por qué uno reacciona considerablemente más rápido que el otro y si el producto final es uno sólo o una mezcla.

Para intentar responder estas preguntas se midió la absorbancia de la reacción con cisteína a otras longitudes de onda distintas a 330 nm. Ya se observó al realizar el espectro de la reacción a distintos tiempos (figura 13) que a tiempos de reacción largos existe una absorbancia considerable a 290 nm.

Se siguió la reacción entre NO₂CLA 10 µM y glutatión 3 mM a longitudes de onda entre 240 y 330 nm (no se muestran) observándose cambios importantes a 250 y 290 nm (Figuras 19 y 20). A 250 nm se vio un incremento rápido en la absorbancia (Figura 19) que se correspondió con la caída en la absorbancia a 330 nm en la fase rápida. A 290 nm en cambio, en los primeros segundos de la reacción no se observan cambios en la absorbancia (Figura 20) pero transcurridos entre 10 y 30 segundos se observó un incremento que se correspondió con el cambio en la absorbancia a 330 nm en la fase lenta. Estos resultados indicarían que el producto de la fase rápida absorbe a 250 nm y el de la fase lenta absorbe a 290 nm (Figura 13).

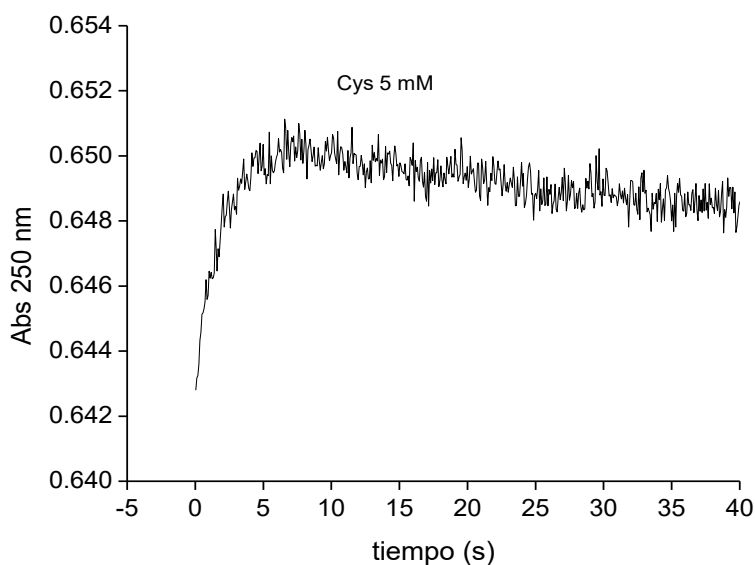


Figura 19. Absorbancia a 250 nm en función del tiempo de la reacción entre NO_2CLA ($10 \mu\text{M}$) y cisteína (5 mM) donde se puede apreciar un incremento rápido en la absorbancia en los primeros segundos y a partir de los 10 segundos un cese del aumento y un decrecimiento lento. Este comportamiento es compatible con que el producto de la primera absorbe a 250 nm. Éste se forma rápidamente pero luego su concentración decrece dando lugar a la formación del producto de la segunda fase, que es más estable.

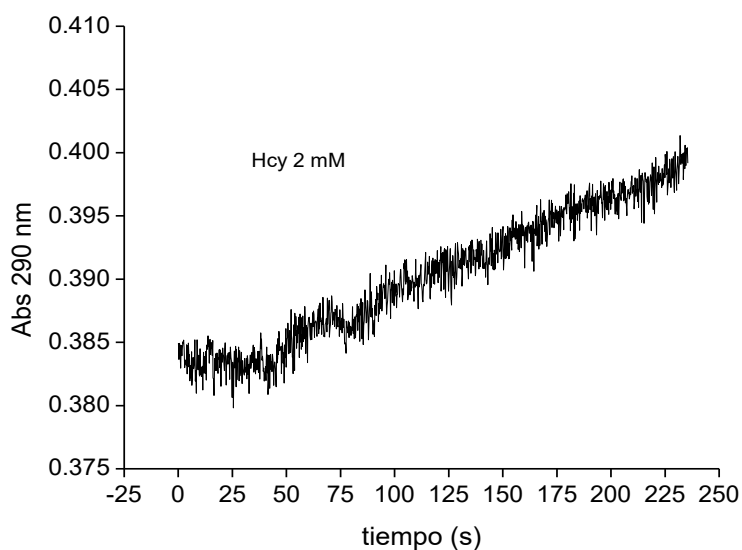


Figura 20. Absorbancia a 290 nm en función del tiempo de la reacción entre NO_2CLA ($10 \mu\text{M}$) y homocisteína (2 mM). Se observa que la absorbancia no varía hasta los 25 segundos aproximadamente. Luego comienza a aumentar lentamente. Este comportamiento es compatible con que el producto de la segunda fase absorbe a 290 nm.

El perfil de cambios en la absorbancia a distintas longitudes de onda indicaría que el producto de la segunda fase conserva un nitroalqueno y que el producto

de la primera fase no lo conserva, lo cual significa que el ataque nucleofílico en la segunda fase (reacción lenta) se da en el carbono δ , manteniendo así el doble enlace continuo al grupo nitro. El ataque nucleofílico en la primera fase (reacción rápida) se da en el carbono β , eliminando el doble enlace continuo al grupo nitro y por ende al nitroalqueno (Figura 21).

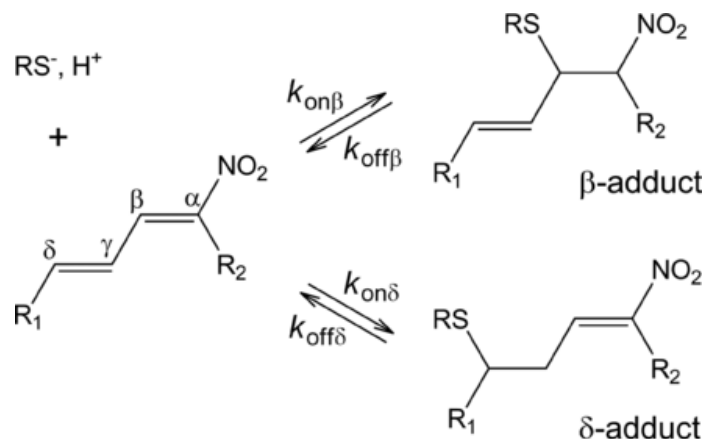


Figura 21. Productos formados en la reacción entre NO_2CLA y tioles. El aducto β (arriba) se forma cuando el tiolato realiza un ataque nucleofílico en el carbono β y el aducto δ (abajo) se forma cuando el tiolato realiza un ataque nucleofílico en el carbono δ . Ambas reacciones son reversibles teniendo cada una sus respectivas constantes para el aducto β y para el aducto δ . Tomado de [3].

El hecho de que las constantes de velocidad fueron siempre más altas para los productos del carbono β indican que la formación de este producto es favorable en su cinética respecto a los del carbono δ .

Estos resultados son coherentes con modelos moleculares para los dos isómeros del NO_2CLA realizados por Laura Coitiño (UdelaR) donde se observa una diferencia en la densidad electrónica y dureza de ambos núcleos electrófilos cuyos resultados fueron coherentes con la distinta cinética de ambas fases y la cinética más rápida en el carbono β [3].

También se realizaron estudios de espectrometría de masa de la reacción por parte de Darío Vitturi y Francisco Schopfer (Universidad de Pittsburgh) y HPLC por parte de Lucía Turell y Matias Moller (UdelaR) obteniéndose resultados correspondientes con lo observado en la tesina y llegando a la conclusión de que la reacción comienza como una reacción rápida donde se forma inicialmente el aducto β y debido a la reversibilidad de esta reacción, ocurre una eliminación del carbono β liberándose NO_2CLA que vuelve a reaccionar hasta que finalmente se da la acumulación del aducto δ que es el más estable [3].

4.5 Dependencia con el pH

Como se discutió previamente, al tratarse de una adición de Michael, el ataque nucleofílico por parte del tiol se da con éste en su forma desprotonada (tiolato). Dado que la disponibilidad de tiolato depende del pH, la reacción entre NO_2CLA y tioles va a ser afectada por el pH del medio.

Para confirmar esto, se estudiaron las reacciones entre NO_2CLA 10 μM y glutatión milimolar (poner rango) a distintos pH esperando una correlación entre el cambio de pH y las constantes de la reacción, aumentando la velocidad al aumentar el pH debido a la mayor disponibilidad de tiolato.

En este estudio se utilizaron soluciones amortiguadoras de tres componentes y con igual fuerza iónica entre ellas. Se hicieron gráficas de k_{obs} en función a la concentración de GSH a cada pH y se ajustaron con las mismas ecuaciones que se utilizaron en los estudios a pH 7.4 (ecuaciones 4 y 5) y a partir de éstas se obtuvieron los correspondientes valores de k_{on} aparente, y k_{off} aparente, tanto para las reacciones rápidas como para las lentas a cada pH. Para la reacción rápida, la k_{on} aparente del aducto β aumentó con el pH de acuerdo a la ecuación:

$$k_{\text{on}} \text{ aparente} = k_{\text{on}} \text{ independiente del pH} * \frac{K_a}{(K_a + [\text{H}^+])} \text{ (ecuación 6)}$$

Esta ecuación permite calcular la k_{on} independiente del pH que representa el valor de la constante en una situación hipotética donde todos los tioles se encuentran en forma de tiolato. La gráfica resultante de k_{on} aparente versus pH es una función sigmoidea (Figura 22) donde el $\text{p}K_a$ (punto de inflexión) fue de 8.78 ± 0.02 , valor consistente con el $\text{p}K_a$ del glutatión previamente mostrado (8.94, tabla 1) lo cual se alinea con el requerimiento de que haya una rápida ionización previa del tiol a tiolato antes de la reacción.

La gráfica de la k_{off} aparente para el aducto β presentó una curva hacia arriba (Figura 23) lo que indica que el proceso de eliminación se produce por medio de dos vías independientes. A un pH de 7.4 (pH fisiológico y al cual se hicieron los demás experimentos) la eliminación parece ser unimolecular o asistida con agua. El aumento por encima de pH 9 probablemente refleja la asistencia de bases alternativas debido a que a valores de pH altos un mayor número de sustancias se van a encontrar en su forma desprotonada. Se observaron dependencias parecidas para la fase lenta, cuyos datos no son mostrados, lo que sugiere que los mecanismos que ocurren son similares.

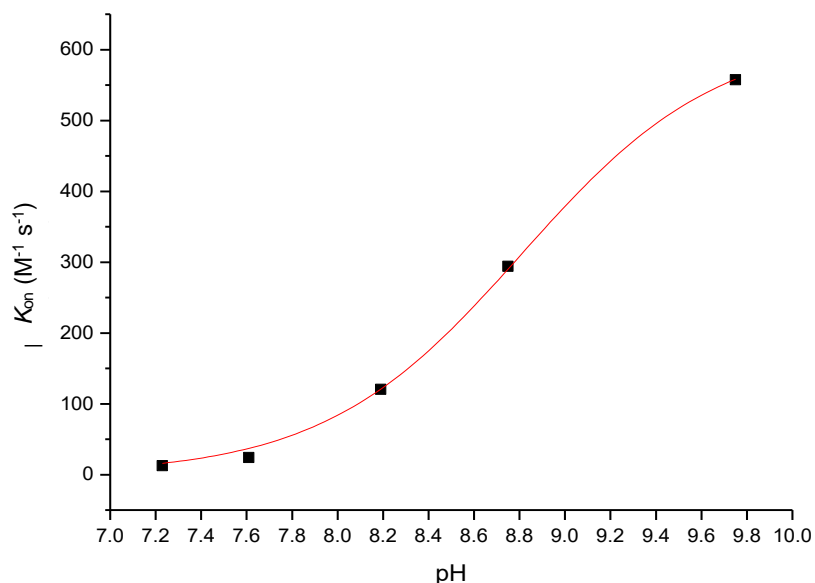


Figura 22. Constantes aparentes k_{on} de la reacción entre NO_2CLA ($10 \mu M$) y glutatión a concentraciones milimolares en función al pH donde se observa un ajuste a una función sigmoidea cuyo punto de inflexión ($8,78 \pm 0,02$) es consistente con el pK_a del glutatión lo cual sugiere que en la reacción, el ataque nucleofílico se da por medio de la forma desprotonada del tiol (tiolato).

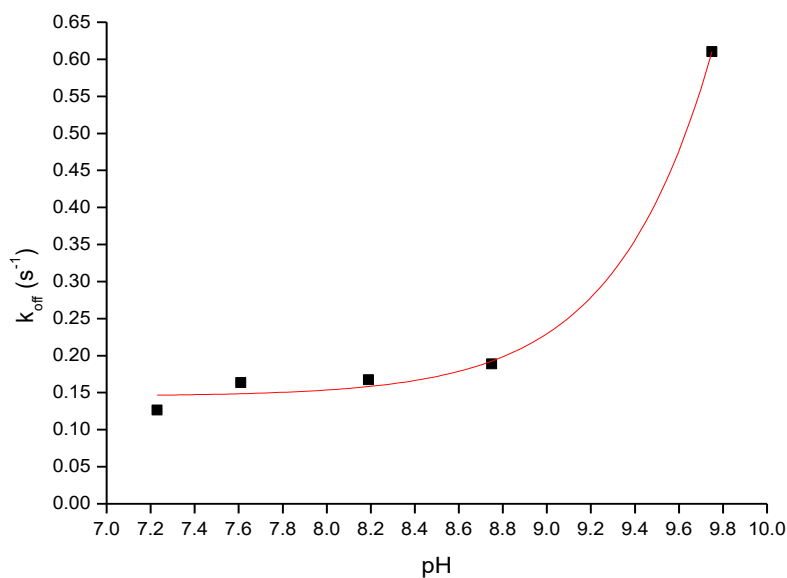


Figura 23. Constantes aparentes k_{off} de la reacción entre NO_2CLA ($10 \mu M$) y glutatión a concentraciones milimolares en función al pH. La forma de la gráfica sugiere que el proceso de eliminación ocurre a través de dos vías independientes.

Para estudiar la relación entre la k_{on} y la basicidad del tiolato se calculó la k_{on} independiente del pH ($k_{on \text{ ind. pH}}$) para los demás tioles estudiados además del glutatión (cisteína, homocisteína, cisteinilglicina, 2-mercaptoetanol) y se graficaron sus logaritmos en función al pK_a de cada uno obteniendo una gráfica de Brønsted correspondiente a la k_{on} (figura 24) la cual sigue la ecuación:

$$\log k_{\text{on ind.pH}} = \beta_{\text{nuc}} * pK_{\text{a}} + C_{\text{on}} \quad (\text{ecuación 7})$$

En esta función, la pendiente (β_{nuc}) corresponde al coeficiente nucleofílico de Brønsted y el intercepto (C_{on}) a una constante de -2.4. Estos valores sugieren que el tiolato participa en la formación de un estado de transición con un grado alto de transferencia de carga y que la nucleofilia del tiol está asociada con la basicidad de Brønsted.

También se graficó el logaritmo de la k_{off} para pH menores a 9 en función del pK_{a} (figura 25) el cual sigue la ecuación:

$$\log k_{\text{off}} = \beta_{\text{gs}} * pK_{\text{a}} + C_{\text{off}} \quad (\text{ecuación 8})$$

En este caso, la pendiente (β_{gs}) corresponde al coeficiente del grupo saliente de Brønsted y el intercepto (C_{off}) a una constante de 4.9. Para esta función el valor de β_{gs} indica que la reactividad del aducto se correlaciona con la acidez del protón del tiol saliente lo cual es consistente con la presencia de un paso que controla la velocidad del proceso donde hay eliminación de un tiolato formándose una carga parcial lo cual es consistente con un mecanismo inverso al propuesto para la reacción directa.

Dado que en ambos casos se obtuvieron funciones lineales con β_{nuc} y β_{gs} de 0.6 y -0.7 aproximadamente, se pudo demostrar que el tiolato está involucrado en las etapas limitantes la velocidad en el mecanismo e influye en la velocidad de reacción.

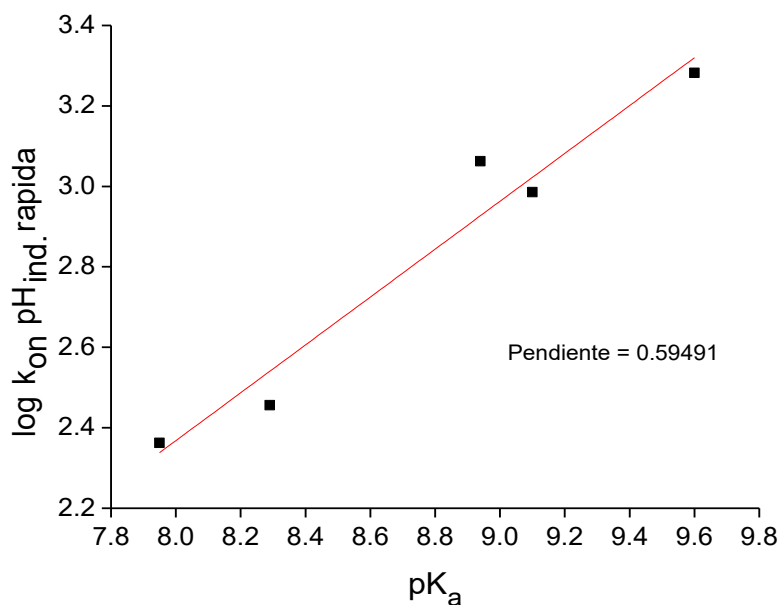


Figura 24. Gráfica de Brønsted para la fase rápida de la reacción donde se grafica el logaritmo de la k_{on} independiente del pH calculada previamente para cada tiol (cistenilglicina, cisteína, homocisteína, glutatión y 2-mercaptoetanol respectivamente) en función del respectivo pK_a . La función resultante es lineal donde la pendiente corresponde al coeficiente nucleofílico de Brønsted, que da información de la nucleofilia del tiolato y el mecanismo de la reacción, y el intercepto corresponde a una constante (ecuación 7).

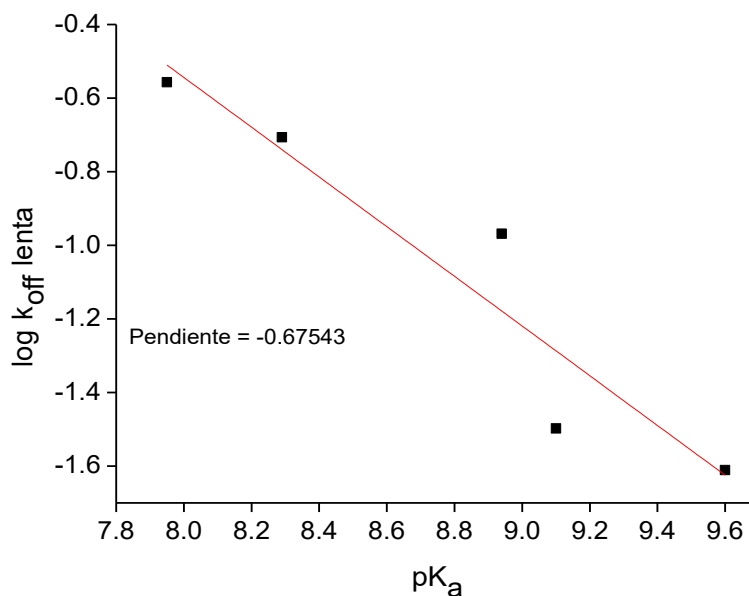


Figura 25. Gráfica de Brønsted para la fase lenta de la reacción donde se grafica el logaritmo de la k_{off} independiente del pH calculada previamente para cada tiol (cistenilglicina, cisteína, glutatión, homocisteína, y 2-mercaptoetanol respectivamente) en función a su respectivo pK_a . La función resultante es lineal donde la pendiente corresponde al coeficiente del grupo saliente de Brønsted, que da información del mecanismo de la eliminación, y el intercepto corresponde a una constante (ecuación 8).

4.6 Interacción entre NO₂CLA y albúmina

4.6.1 Uniones no covalentes

Para aproximarse al estudio del transporte del NO₂CLA en el organismo se estudió su interacción con la HSA, que es la proteína encargada del transporte de sustancias en plasma, región a la que iría luego de su ingesta. Para determinar si hay unión entre el NO₂CLA y las regiones hidrofóbicas de la HSA se midió la absorbancia de una solución de NO₂CLA 10 μ M a la cual se le fue agregando HSA en pequeñas cantidades aumentando así su concentración de a poco y volviendo a medir la absorbancia luego de cada adición de HSA (figura 26).

Para este experimento se esperaba ver cambios en la absorbancia con la adición de HSA porque ya se había observado que la polaridad del medio donde se encuentra el NO₂CLA afecta a la absorbancia, corriéndose hacia longitudes de onda menores en medios más hidrofóbicos (figura 12). En caso que el NO₂CLA se una a la HSA, pasaría a tener un entorno cercano más hidrofóbico que el medio acuoso donde se encontraba previamente de modo que su absorbancia debería correrse hacia longitudes de onda menores también.

Para garantizar que las uniones observadas sean no covalentes, todos los ensayos se realizaron con HSA con su tiol libre bloqueado con NEM. En algunos de ellos la HSA se encontraba deslipidada y en otros previamente lipidada con ácido esteárico en una relación 5:1 con el HSA con el fin de comparar la unión en ambos casos.

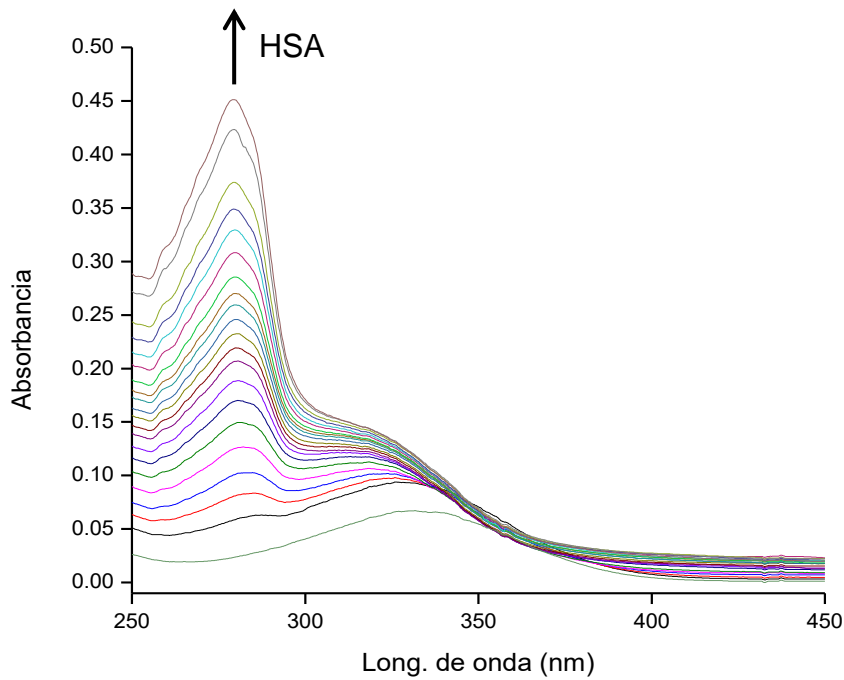


Figura 26. Espectro de absorbancia de una solución de NO₂CLA (10 μM) a la cual se agregaron sucesivamente alícuotas de HSA bloqueada y deslipidada hasta llegar a una concentración de 15 μM.

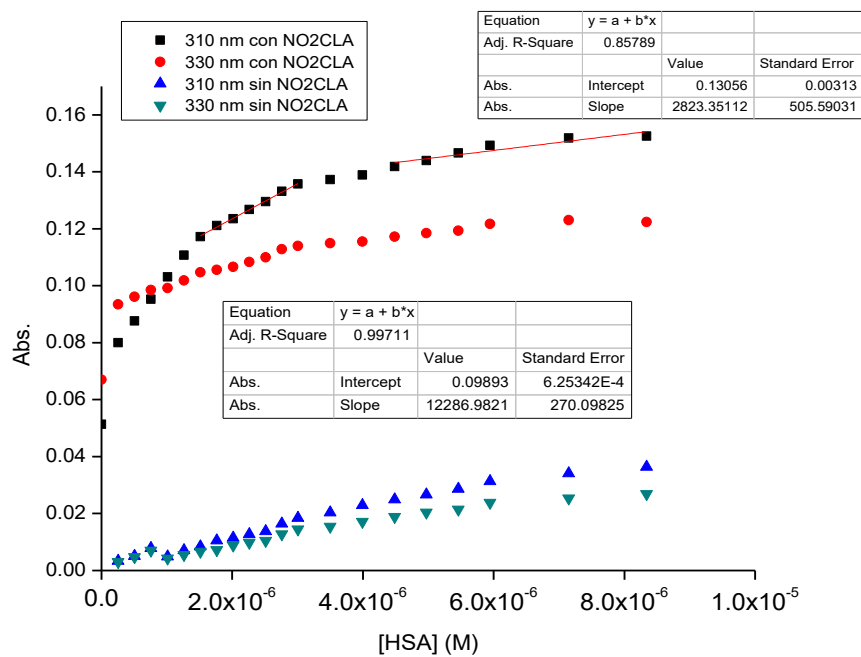


Figura 27. Absorbancia en función de la concentración de HSA donde se visualiza el cambio de absorbancia a 310 y 330 nm.

En los espectros UV-Visible, efectivamente se observó un corrimiento en el máximo de 330 a 310 nm y la absorbancia en esta longitud aumentó al

aumentar la concentración de HSA (Figura 27). Se debe tener en cuenta que en las condiciones iniciales del experimento el NO₂CLA se encuentra a una concentración mayor que la de HSA, lo cual favorecería un intercambio entre el NO₂CLA y el ácido esteárico unido a la HSA, pero estas condiciones no se darían en el plasma.

También se graficó la absorbancia en función a la concentración de HSA (Figura 27) donde en ausencia de NO₂CLA se observó un aumento lineal. En cambio, en presencia de NO₂CLA se observó un cambio en la pendiente debido al cambio en la absorbancia por la unión no covalente. A partir del cambio de pendiente se estimó que se unen 3.8 ± 0.5 moléculas de NO₂CLA por HSA bloqueada cuando se encuentra deslipidada. Para la HSA lipídada se estimaron 3.2 ± 0.2 NO₂CLA por HSA. El ajuste de los datos de titulación a ecuaciones hiperbólicas produjo constantes de disociación aparentes globales de $(0.9 \pm 0.3) \times 10^{-6}$ y $(1.2 \pm 0.3) \times 10^{-6}$ M para HSA deslipidada y lipídada, respectivamente.

4.6.2 Reacción entre NO₂CLA y la cisteína 34

La reactividad entre el NO₂CLA y el tiol libre de la cisteína 34 de la HSA no pudo ser evaluada siguiendo cambios en la absorbancia a 330 nm, como se hizo en el caso de los tioles de bajo peso molecular, debido a la interferencia de las uniones no covalentes. Por lo tanto, se diseñó un experimento en varios pasos donde se incubó HSA reducida y lipídada (50 μM) con NO₂CLA (300 μM) a temperatura ambiente con agitación, luego se realizó una gel filtración donde se separó la HSA del NO₂CLA restante que no reaccionó. La fracción con la HSA luego se incubó con 4,4'-ditiodipiridina (DTDP) a pH 7.0 como es requerido para que la reacción se dé correctamente [64], permitiendo que la HSA que tenga su tiol libre reaccione con la DTDP pero en caso de haberse unido covalentemente con el NO₂CLA en la incubación previa, el tiol no se encontraría libre impidiendo que se dé la reacción.

La tiopiridona es uno de los productos formados en la reacción entre DTDP y tioles, de modo que su presencia es un indicador de la reacción y midiendo su concentración se puede cuantificar la cantidad de tiol libre en el medio. Para aprovechar esta propiedad evitando la interferencia de la absorbancia de la HSA, se separó por medio de ultrafiltración la tiopiridona formada luego la reacción de la HSA con DTDP y se midió su concentración a partir de su absorbancia a 324 nm. Con esta concentración se calculó la cantidad de tiol libre de HSA que, por ende, no reaccionó con el NO₂CLA y se comparó con la de un ensayo realizado en las mismas condiciones en ausencia de NO₂CLA.

En el ensayo sin NO₂CLA se espera que toda la HSA reaccione con la DTDP, mientras que en el ensayo con NO₂CLA, de haber unión covalente entre el tiol de la HSA y el NO₂CLA se espera una menor concentración de tiopiridona ya que habría menos tiol disponible para esa reacción (figura 28).

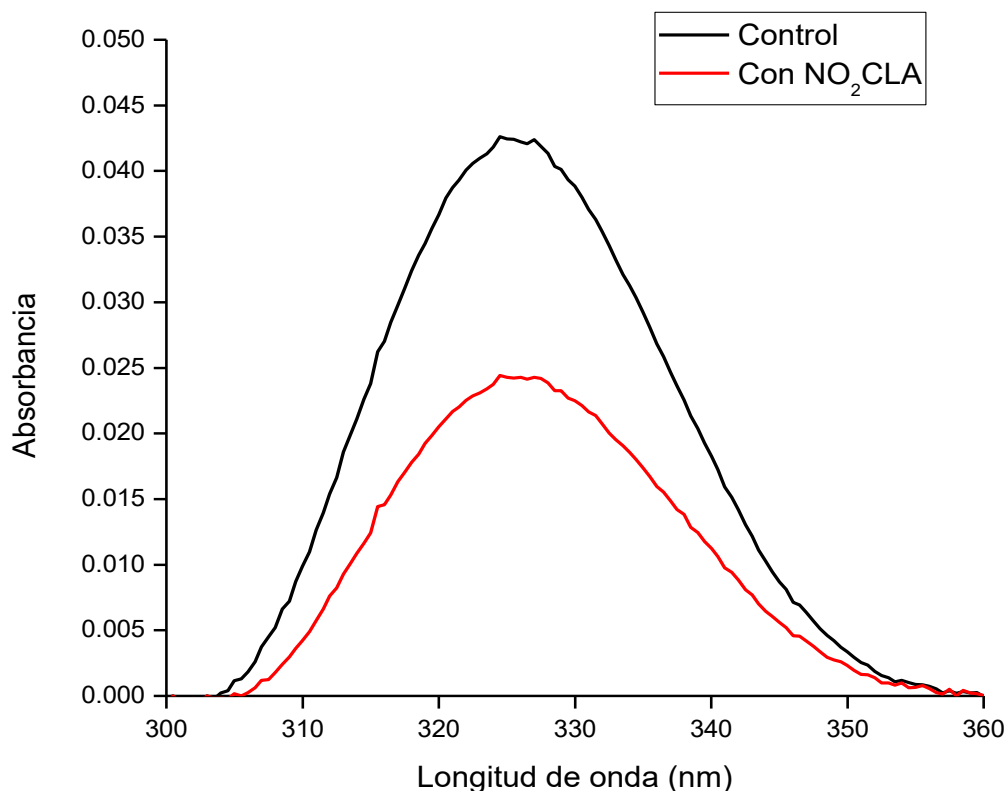


Figura 28. Espectro donde se mide la absorción de tiopiridona seleccionándose un rango de longitudes de onda en torno a 324 nm (longitud donde absorbe la tiopiridona) en presencia de NO₂CLA (rojo) y sin NO₂CLA (control, en negro).

En las medidas de absorción se observó una disminución en la concentración del tiol libre de HSA. La cantidad de tiol libre por mol de HSA se pudo obtener a partir de la absorción a 324 nm de la tiopiridona (Figura 28) que fue 0.47 en ausencia de NO₂CLA y 0.25 en presencia de NO₂CLA. Teniendo en cuenta las concentraciones utilizadas y el tiempo de incubación se estimó para la constante de velocidad un límite inferior de 0.5 M⁻¹ s⁻¹ en las condiciones de reacción (25° C y pH 7.4).

5. Conclusiones

Los objetivos generales y específicos planteados para el trabajo pudieron cumplirse. Se logró describir la reacción entre NO₂CLA y tioles de bajo peso molecular obteniendo las constantes cinéticas de las dos fases encontradas para la reacción y proponiendo un mecanismo. Se pudieron describir a nivel molecular los productos obtenidos en la reacción midiendo la absorbancia a distintas longitudes de onda e interpretando los resultados, asociándolos con los productos posibles.

También se estudió la relación con el pH de la reacción entre NO₂CLA y glutatión y se encontraron correlaciones con el pK_a del tiol.

Se determinó la unión no covalente del NO₂CLA con la HSA con su tiol bloqueado. También se pudo observar la unión covalente entre el NO₂CLA y el tiol libre de la cisteína 34 de la HSA.

Los estudios realizados por otros investigadores con métodos como espectrometría de masa, química computacional y otras medidas espectrofotométricas permitieron obtener resultados compatibles con los obtenidos en este trabajo [3].

5.1 Artículo científico

Los resultados de este trabajo forman parte, junto con otros resultados realizados por colegas, de un artículo científico titulado “The Chemical Basis of Thiol Addition to Nitro-conjugated Linoleic Acid, a Protective Cell-signaling Lipid” publicado en la revista JBC en enero del 2017 [3]. Este artículo se adjunta al final. Debido a que en el artículo se utilizaron otros resultados para promediar, los valores de las constantes varían levemente respecto a los obtenidos para esta tesina.

6. Bibliografía

- [1] L. B. Poole, «The Basics of Thiols and Cysteines in Redox Biology and Chemistry», *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 0, pp. 148-157, mar. 2015.
- [2] S. Portillo-Ledesma *et al.*, «Deconstructing the catalytic efficiency of peroxiredoxin-5 peroxidatic cysteine», *Biochemistry*, vol. 53, n.º 38, pp. 6113-6125, sep. 2014.
- [3] L. Turell *et al.*, «The Chemical Basis of Thiol Addition to Nitro-conjugated Linoleic Acid, a Protective Cell-signaling Lipid», *J. Biol. Chem.*, vol. 292, n.º 4, pp. 1145-1159, ene. 2017.
- [4] G. Ferrer-Sueta, B. Manta, H. Botti, R. Radi, M. Trujillo, y A. Denicola, «Factors Affecting Protein Thiol Reactivity and Specificity in Peroxide Reduction», *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 24, n.º 4, pp. 434-450, abr. 2011.
- [5] P. Eaton, «Protein thiol oxidation in health and disease: Techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures», *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 40, n.º 11, pp. 1889-1899, jun. 2006.
- [6] S. Carballal, B. Alvarez, L. Turell, H. Botti, B. A. Freeman, y R. Radi, «Sulfenic acid in human serum albumin», *Amino Acids*, vol. 32, n.º 4, pp. 543-551, 2007.
- [7] «estructura-de-la-insulina-humana-27081204.jpg (400×400)». [En línea]. Disponible en: <https://thumbs.dreamstime.com/x/estructura-de-la-insulina-humana-27081204.jpg>. [Accedido: 08-jun-2017].
- [8] «1ProteaseCategories.jpg (2388×1500)». [En línea]. Disponible en: <http://oregonstate.edu/instruct/bb450/450material/OutlineMaterials/13EnzymeMechanism/1ProteaseCategories.jpg>. [Accedido: 08-jun-2017].
- [9] D. E. Fomenko, S. M. Marino, y V. N. Gladyshev, «Functional diversity of cysteine residues in proteins and unique features of catalytic redox-active cysteines in thiol oxidoreductases», *Mol. Cells*, vol. 26, n.º 3, pp. 228-235, sep. 2008.
- [10] «F3.medium.gif (440×287)». [En línea]. Disponible en: <http://circres.ahajournals.org/content/circresaha/97/10/967/F3.medium.gif>. [Accedido: 14-jun-2017].
- [11] J. Nordberg y E. S. Arnér, «Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system», *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 31, n.º 11, pp. 1287-1312, dic. 2001.
- [12] «nrm954-i1.jpg (600×222)». [En línea]. Disponible en: <https://www.nature.com/article-assets/npg/nrm/journal/v3/n11/images/nrm954-i1.jpg>. [Accedido: 14-jun-2017].

- [13] R. Requejo, T. R. Hurd, N. J. Costa, y M. P. Murphy, «Cysteine residues exposed on protein surfaces are the dominant intramitochondrial thiol and may protect against oxidative damage», *FEBS J.*, vol. 277, n.º 6, pp. 1465-1480, mar. 2010.
- [14] M. Gutscher *et al.*, «Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential», *Nat. Methods*, vol. 5, n.º 6, pp. 553-559, jun. 2008.
- [15] H. Østergaard, C. Tachibana, y J. R. Winther, «Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol», *J. Cell Biol.*, vol. 166, n.º 3, pp. 337-345, ago. 2004.
- [16] R. E. Hansen, D. Roth, y J. R. Winther, «Quantifying the global cellular thiol-disulfide status», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, n.º 2, pp. 422-427, ene. 2009.
- [17] Andersson, A.;Isaksson,A.;Brattstrom,L.;Hultberg,B., «Homocysteine and other thiols determined in plasma by HPLC and thiol-specific postcolumn derivatization.», *Clin Chem*, vol. 39, pp. 1590–1597, 1993.
- [18] M. A. Mansoor, A. M. Svardal, y P. M. Ueland, «Determination of the in vivo redox status of cysteine, cysteinylglycine, homocysteine, and glutathione in human plasma», *Anal. Biochem.*, vol. 200, n.º 2, pp. 218-229, feb. 1992.
- [19] J. Bonanata *et al.*, «The thiol of human serum albumin: Acidity, microenvironment and mechanistic insights on its oxidation to sulfenic acid», *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 108, n.º Supplement C, pp. 952-962, jul. 2017.
- [20] V. B. O'Donnell *et al.*, «Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive nitrogen species peroxynitrite, nitrous acid, nitrogen dioxide, and nitronium ion», *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 12, n.º 1, pp. 83-92, ene. 1999.
- [21] D. G. Lim *et al.*, «Nitrolinoleate, a nitric oxide-derived mediator of cell function: synthesis, characterization, and vasomotor activity», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, n.º 25, pp. 15941-15946, dic. 2002.
- [22] P. R. S. Baker, F. J. Schopfer, S. Sweeney, y B. A. Freeman, «Red cell membrane and plasma linoleic acid nitration products: synthesis, clinical identification, and quantitation», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, n.º 32, pp. 11577-11582, ago. 2004.
- [23] M. Delmastro-Greenwood *et al.*, «Nitrite and nitrate-dependent generation of anti-inflammatory fatty acid nitroalkenes», *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 89, pp. 333-341, dic. 2015.
- [24] M. Fazzari *et al.*, «Olives and olive oil are sources of electrophilic fatty acid nitroalkenes», *PLoS One*, vol. 9, n.º 1, p. e84884, 2014.

- [25] R. L. Charles *et al.*, «Protection from hypertension in mice by the Mediterranean diet is mediated by nitro fatty acid inhibition of soluble epoxide hydrolase», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, n.º 22, pp. 8167-8172, jun. 2014.
- [26] E. S. Lima, P. Di Mascio, H. Rubbo, y D. S. P. Abdalla, «Characterization of linoleic acid nitration in human blood plasma by mass spectrometry», *Biochemistry*, vol. 41, n.º 34, pp. 10717-10722, ago. 2002.
- [27] P. R. S. Baker *et al.*, «Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: multiple nitrated unsaturated fatty acid derivatives exist in human blood and urine and serve as endogenous peroxisome proliferator-activated receptor ligands», *J. Biol. Chem.*, vol. 280, n.º 51, pp. 42464-42475, dic. 2005.
- [28] F. J. Schopfer *et al.*, «Detection and Quantification of Protein Adduction by Electrophilic Fatty Acids: Mitochondrial Generation of Fatty Acid Nitroalkene Derivatives», *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 46, n.º 9, may 2009.
- [29] V. Rudolph *et al.*, «Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion», *Cardiovasc. Res.*, vol. 85, n.º 1, pp. 155-166, ene. 2010.
- [30] H. Liu *et al.*, «Nitro-oleic acid protects the mouse kidney from ischemia and reperfusion injury», *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 295, n.º 4, pp. F942-949, oct. 2008.
- [31] F. J. Schopfer, C. Cipollina, y B. A. Freeman, «Formation and signaling actions of electrophilic lipids», *Chem. Rev.*, vol. 111, n.º 10, pp. 5997-6021, oct. 2011.
- [32] M. Delmastro-Greenwood, B. A. Freeman, y S. G. Wendell, «Redox-dependent anti-inflammatory signaling actions of unsaturated fatty acids», *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 76, pp. 79-105, 2014.
- [33] D. J. Marletta MA, «Guanylate cyclase and the ·NO/cGMP signaling pathway.», *Biochim Biophys Acta*, vol. 1999;1411(2-3), pp. 334-350.
- [34] P. J. Parker JO, «Nitrate therapy for stable angina pectoris.», *N Engl J Med*, vol. 1998;338(8), n.º 520-531.
- [35] T. K. Rudolph *et al.*, «Nitro-fatty acids reduce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 30, n.º 5, pp. 938-945, may 2010.
- [36] H. Wang *et al.*, «Nitro-oleic acid protects against endotoxin-induced endotoxemia and multiorgan injury in mice», *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 298, n.º 3, pp. F754-762, mar. 2010.
- [37] T. Cui *et al.*, «Nitrated fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators», *J. Biol. Chem.*, vol. 281, n.º 47, pp. 35686-35698, nov. 2006.

- [38] S. W. Ryter y L. E. Otterbein, «Carbon monoxide in biology and medicine», *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.*, vol. 26, n.º 3, pp. 270-280, mar. 2004.
- [39] S. Ghosh, M. J. May, y E. B. Kopp, «NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses», *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 16, pp. 225-260, 1998.
- [40] «Modulation of nitrated lipid signaling by multidrug resistance protein 1 (MRP1): glutathione conjugation and MRP1-mediated efflux inhibit nitroli... - PubMed - NCBI». [En línea]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16784241>. [Accedido: 08-ene-2019].
- [41] F. J. Schopfer *et al.*, «Covalent peroxisome proliferator-activated receptor gamma adduction by nitro-fatty acids: selective ligand activity and anti-diabetic signaling actions», *J. Biol. Chem.*, vol. 285, n.º 16, pp. 12321-12333, abr. 2010.
- [42] E. E. Kelley *et al.*, «Fatty acid nitroalkenes ameliorate glucose intolerance and pulmonary hypertension in high-fat diet-induced obesity», *Cardiovasc. Res.*, vol. 101, n.º 3, pp. 352-363, mar. 2014.
- [43] L. Villacorta *et al.*, «Electrophilic nitro-fatty acids inhibit vascular inflammation by disrupting LPS-dependent TLR4 signalling in lipid rafts», *Cardiovasc. Res.*, vol. 98, n.º 1, pp. 116-124, abr. 2013.
- [44] E. Cernuda-Morollón, E. Pineda-Molina, F. J. Cañada, y D. Pérez-Sala, «15-Deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 inhibition of NF-kappaB-DNA binding through covalent modification of the p50 subunit», *J. Biol. Chem.*, vol. 276, n.º 38, pp. 35530-35536, sep. 2001.
- [45] Y. Han, J. A. Englert, R. Yang, R. L. Delude, y M. P. Fink, «Ethyl pyruvate inhibits nuclear factor-kappaB-dependent signaling by directly targeting p65», *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 312, n.º 3, pp. 1097-1105, mar. 2005.
- [46] Mina Königsberg Fainstein, «Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo», 2007. [En línea]. Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb/numeros/2007/01/g_HisNuevoFactor.pdf. [Accedido: 13-oct-2017].
- [47] G. Rachakonda, Y. Xiong, K. R. Sekhar, S. L. Stamer, D. C. Liebler, y M. L. Freeman, «Covalent modification at Cys151 dissociates the electrophile sensor Keap1 from the ubiquitin ligase CUL3», *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 21, n.º 3, pp. 705-710, mar. 2008.
- [48] A. T. Dinkova-Kostova *et al.*, «Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, n.º 18, pp. 11908-11913, sep. 2002.

- [49] A. Kobayashi *et al.*, «Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1», *Mol. Cell. Biol.*, vol. 26, n.º 1, pp. 221-229, ene. 2006.
- [50] M. Kobayashi *et al.*, «The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds», *Mol. Cell. Biol.*, vol. 29, n.º 2, pp. 493-502, ene. 2009.
- [51] D. C. Liebler, «Protein damage by reactive electrophiles: targets and consequences», *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 21, n.º 1, pp. 117-128, ene. 2008.
- [52] E. Kansanen *et al.*, «Nrf2-dependent and -independent Responses to Nitro-fatty Acids in Human Endothelial Cells», *J. Biol. Chem.*, vol. 284, n.º 48, pp. 33233-33241, nov. 2009.
- [53] G. Bonacci *et al.*, «Conjugated linoleic acid is a preferential substrate for fatty acid nitration», *J. Biol. Chem.*, vol. 287, n.º 53, pp. 44071-44082, dic. 2012.
- [54] Peters, T., *All about albumin. Biochemistry, genetics and medical applications.* San Diego: Academic Press, 1996.
- [55] Sugio, S.;Kashima,A.;Mochizuki,S.;Noda,M.;Kobayashi,K., «Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution», *Protein Eng* 12439-- 4461999.
- [56] Rodrigo Lombide, «Expresión y purificación de albúmina sérica humana recombinante en *Pichia Pastoris*», Facultad de Ciencias - Universidad de la República, 2014.
- [57] Spector, A.A., *Structure and lipid binding properties of serumalbumin.*, Methods Enzymol. 1986.
- [58] Gryzunov, Y.A.;Arroyo,A.;Vigne,J.L.;Zhao,Q.;Tyurin,V.A.;Hubel,C.A.; Gandley, R.E.;Vladimirov,Y.A.;Taylor,R.N.;Kagan,V.E., «Binding of fatty acids facilitates oxidation of cysteine-34 and converts copper-albumin complexes from antioxidants to prooxidants.», *Arch.Biochem.Biophys.*, vol. 413, pp. 53–66, 2003.
- [59] R. Stocker, Y. Yamamoto, A. F. McDonagh, A. N. Glazer, y B. N. Ames, «Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance», *Science*, vol. 235, n.º 4792, pp. 1043-1046, feb. 1987.
- [60] L. Musante *et al.*, «Characterization of oxidation end product of plasma albumin “in vivo”», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 349, n.º 2, pp. 668-673, oct. 2006.
- [61] Bar-Or,D.;Bar-Or,R.;Rael,L.T.;Gardner,D.K.;Slone,D.S.;Craun,M.L., «Heterogeneity and oxidation status of commercial human albumin preparations in clinical use.», *Crit CareMed*, vol. 33, pp. 1638–1641, 2005.

- [62] C. K. Riener, G. Kada, y H. J. Gruber, «Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine», *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 373, n.º 4-5, pp. 266-276, jul. 2002.
- [63] R. F. Chen, «Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment», *J. Biol. Chem.*, vol. 242, n.º 2, pp. 173-181, ene. 1967.
- [64] J. R. Winther y C. Thorpe, «Quantification of Thiols and Disulfides», *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1840, n.º 2, feb. 2014.

The Chemical Basis of Thiol Addition to Nitro-conjugated Linoleic Acid, a Protective Cell-signaling Lipid^{*†}

Received for publication, August 30, 2016, and in revised form, November 23, 2016. Published, JBC Papers in Press, December 6, 2016, DOI 10.1074/jbc.M116.756288

Lucía Turell^{‡§1,2}, Darío A. Vitturi^{¶1}, E. Laura Coitiño^{||2}, Lourdes Lebrato^{‡§}, Matías N. Möller^{§**2}, Camila Sagasti^{||}, Sonia R. Salvatore[¶], Steven R. Woodcock[¶], Beatriz Alvarez^{‡§2,3}, and Francisco J. Schopfer^{¶4}

From the Laboratorios de [‡]Enzimología, ^{||}Química Teórica y Computacional, and ^{**}Fisicoquímica Biológica, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, and [§]Center for Free Radical and Biomedical Research, Universidad de la República, Montevideo 11400, Uruguay and the [¶]Department of Pharmacology and Chemical Biology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, Pennsylvania 15213

Edited by F. Peter Guengerich

Nitroalkene fatty acids are formed *in vivo* and exert protective and anti-inflammatory effects via reversible Michael addition to thiol-containing proteins in key signaling pathways. Nitro-conjugated linoleic acid (NO₂-CLA) is preferentially formed, constitutes the most abundant nitrated fatty acid in humans, and contains two carbons that could potentially react with thiols, modulating signaling actions and levels. In this work, we examined the reactions of NO₂-CLA with low molecular weight thiols (glutathione, cysteine, homocysteine, cysteinylglycine, and β-mercaptoethanol) and human serum albumin. Reactions followed reversible biphasic kinetics, consistent with the presence of two electrophilic centers in NO₂-CLA located on the β- and δ-carbons with respect to the nitro group. The differential reactivity was confirmed by computational modeling of the electronic structure. The rates (*k*_{on} and *k*_{off}) and equilibrium constants for both reactions were determined for different thiols. LC-UV-Visible and LC-MS analyses showed that the fast reaction corresponds to β-adduct formation (the kinetic product), while the slow reaction corresponds to the formation of the δ-adduct (the thermodynamic product). The pH dependence of the rate constants, the correlation between intrinsic reactivity and thiol p*K*_a, and the absence of deuterium solvent kinetic isotope effects suggested stepwise mechanisms with thiolate attack on NO₂-CLA as rate-controlling step. Computational modeling supported the mechanism and revealed additional features of

the transition states, anionic intermediates, and final neutral products. Importantly, the detection of cysteine-δ-adducts in human urine provided evidence for the biological relevance of this reaction. Finally, human serum albumin was found to bind NO₂-CLA both non-covalently and to form covalent adducts at Cys-34, suggesting potential modes for systemic distribution. These results provide new insights into the chemical basis of NO₂-CLA signaling actions.

Nitroalkene fatty acids are endogenous adaptive signaling mediators formed *in vivo* upon addition of nitric oxide (NO) or nitrite (NO₂⁻)-derived nitrogen dioxide (NO₂) to unsaturated fatty acids (1–3). The presence of the electron-withdrawing nitro group renders the nitroalkene β-carbon electron-deficient and thus susceptible to attack by nucleophiles in reversible Michael addition reactions (4). The electrophilicity of nitroalkene fatty acids is critical to the biological actions of these molecules, as demonstrated by the inhibitory effects of increased nitroalkene reductase activity (5). Nitroalkene fatty acids exhibit potent anti-inflammatory and cytoprotective properties and thus are beneficial in many models of disease, including atherosclerosis, restenosis, ischemia reperfusion, renal injury, diabetes, metabolic syndrome, and endotoxemia (6–13). Furthermore, endogenous formation of nitroalkene fatty acids has been associated with the cardioprotective effects of the Mediterranean diet (14, 15). Notably, the potential application of soft electrophiles as pharmacological agents is underscored by the Food and Drug Administration approval of dimethyl fumarate for the treatment of multiple sclerosis (16, 17).

Thiols are excellent nucleophiles and are able to react with different electrophiles, including oxidants. This property constitutes the basis of the fundamental roles of particular thiols in signaling, detoxification, and antioxidant response processes. For most chemical and enzymatic reactions, thiol reactivity involves the nucleophilic attack of the thiolate (RS⁻) on the electrophile. The intracellular compartment presents an elevated concentration of reduced thiols. Glutathione (GSH) is the main low molecular weight thiol in the cytosol (2–17 mM), and protein thiols represent ~70% of the total reduced intracellular pool (18–21). In contrast, plasma has much lower total thiol concentrations that, in addition, are predominantly oxidized.

* This work was supported by grants and fellowships from Comisión Sectorial de Investigación Científica (Universidad de la República, Uruguay) (to L. T., M. N. M., and B. A.), Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, Uruguay) (to L. L.), National Institutes of Health Grants K01-HL133331 (to D. A. V.) and R01-AT006822 (to F. J. S.), and American Heart Association Grant in Aid 14GRNT20170024 (to F. J. S.). D. A. V., S. R. W., and F. J. S. acknowledge financial interest in Complexa Inc. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health.

† This article was selected as one of our Editors' Picks.

‡ This article contains supplemental Figs. S1 and S2 and Table S1.

¹ Both authors contributed equally to this work.

² Active members of the National System of Researchers and of PEDECIBA (Uruguay).

³ To whom correspondence may be addressed: Laboratorio de Enzimología, Facultad de Ciencias, Iguá 4225, Montevideo 11400, Uruguay. Tel: 598-2-525-0749; E-mail: beatriz.alvarez@fci.edu.uy.

⁴ To whom correspondence may be addressed: Dept. of Pharmacology and Chemical Biology, Thomas E. Starzl Biomedical Science Tower E1340, 200 Lothrop St., University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15213. Tel: 412-648-0193; Fax: 412-648-2229; E-mail: fjs2@pitt.edu.

Nitro-conjugated Linoleic Acid and Thiols

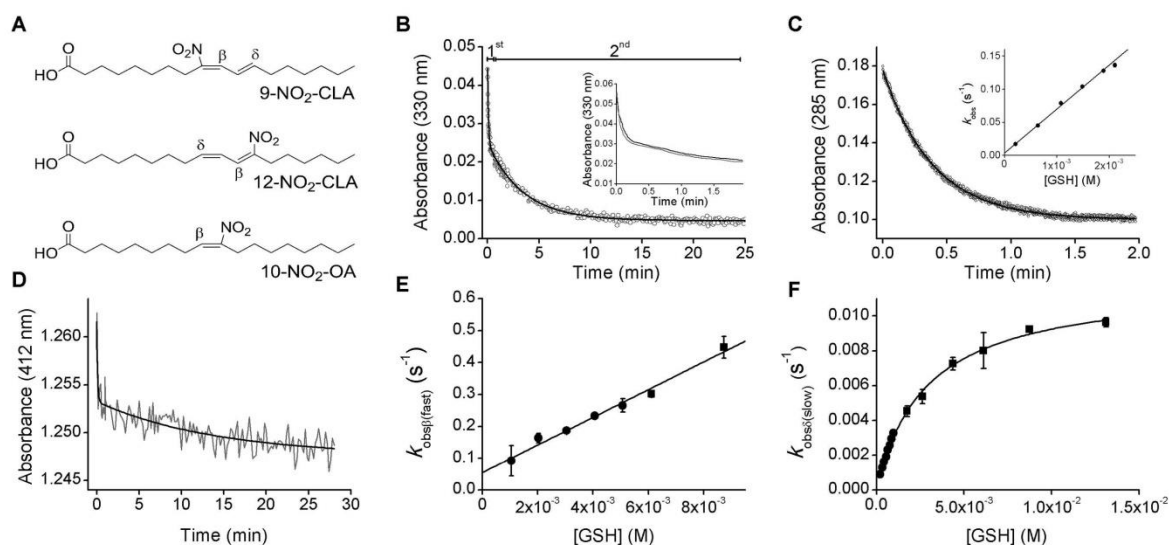


FIGURE 1. Reactions of NO₂-CLA with thiols at pH 7.4. *A*, structures of 9- and 12-NO₂-CLA and of 10-NO₂-OA showing the electrophilic β - or δ -carbons. *B*, a mixture of 9- and 12-NO₂-CLA ($\sim 10 \mu\text{M}$) was mixed with GSH (3 mM) in phosphate buffer (0.1 M) containing DTPA (0.1 mM) at pH 7.4 and 25 °C, and the absorbance at 330 nm was registered. The black trace represents the best fit to a bi-exponential function. *Inset*, purified 9-NO₂-CLA (black trace) or 12-NO₂-CLA (gray trace) were mixed with GSH as in *B*. *C*, NO₂-OA (10 μM) was mixed with GSH (0.6 mM), and the absorbance at 285 nm was registered. *Inset*, k_{obs} values at increasing GSH concentrations (0.2–2 mM) were determined from the best fit to single exponential functions. The symbols represent the means \pm S.E. ($n = 4$). Some error bars are smaller than the symbols. *D*, NO₂-CLA ($\sim 10 \mu\text{M}$) was mixed with TNB (90 μM), and the absorbance at 412 nm was recorded. *E*, k_{obs} values for the fast phase of the reaction between NO₂-CLA and GSH were determined from kinetic traces as in *B*. Different symbols represent the means \pm S.E. of representative independent experiments; squares, $n = 3$; circles, $n = 4$. *F*, same as in *E* but k_{obs} correspond to the slow phase; circles, $n = 1$; squares, means \pm S.E., $n \geq 3$.

Low molecular weight plasma thiols include cysteine, cysteinylglycine, GSH, homocysteine, and γ -glutamylcysteine, which together constitute a total of 12–20 μM reduced thiol. The most abundant thiol in this compartment is cysteine 34 in human serum albumin (HSA)⁵ which is $\sim 600 \mu\text{M}$ and 75% reduced (22).

From a kinetic, mechanistic, and structure-reactivity relationship aspect, Michael addition and β -elimination reactions between various activated olefins and nucleophiles have received considerable attention in the literature. Depending on the nucleophilic and electrophilic partners as well as on the reaction conditions, two types of mechanisms have been proposed, concerted or stepwise, with the latter involving intermediate carbanions (23–26).

Conjugated linoleic acid (CLA) is a preferential substrate for biological nitration leading to the formation of 9- and 12-nitro-octadecadienoic acid (9- and 12-NO₂-CLA) (27). Nitroalkene derivatives of CLA are present in plasma and urine of healthy individuals with and without CLA supplementation and are generated during digestion, metabolic stress, and inflammation (1, 2, 27). The reaction between thiols and NO₂-CLA has implications for the modulation of not only signaling actions but also circulating levels and bio-elimination pathways (2, 6, 28).

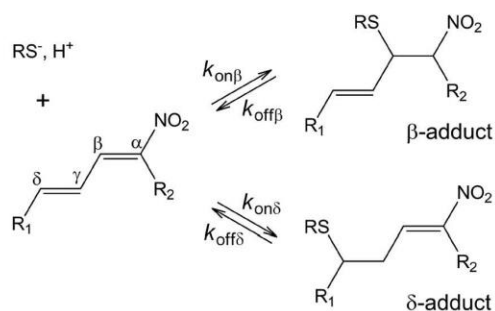
⁵ The abbreviations used are: HSA, human serum albumin; CLA, conjugated linoleic acid; BME, β -mercaptoethanol; NO₂-CLA, nitro-conjugated linoleic acid; NO₂-OA, nitro-oleic acid; DTNB, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoate); TNB, 5-thio 2-nitrobenzoate; DTDP, 4,4'-dithiodipyridine; DTPA, diethylenetriaminepentaacetic acid; NEM, *N*-ethylmaleimide; MRM, multiple reaction monitoring; TS, transition state; au, atomic unit; WBI, Wiberg bond index; NPA, natural population analysis; PA, proton affinity; MEP, molecular electrostatic potential; RC, reactants complex.

Importantly, in the case of NO₂-CLA, both the β - and δ -carbons with respect to the nitro group are, in principle, electrophilic and thus susceptible to reaction with nucleophiles.

Herein, we provide an experimental and computational study of the reaction of NO₂-CLA, the most abundant endogenous nitroalkene, with biological thiols. We found that two reversible products are formed, the β -adducts and the δ -adducts. The β -adducts are formed with faster kinetics, but the δ -adducts are more stable. The reaction mechanisms are stepwise, with thiolate attack on the nitroalkene being the rate-controlling step. In addition, HSA is able to bind NO₂-CLA non-covalently. Our findings contribute to the understanding of the chemical basis of the signaling and pharmacological actions of nitroalkene fatty acids.

Results

NO₂-CLA Reacts Biphaseically and Reversibly with Low Molecular Weight Thiols—Stopped-flow mixing of a solution consisting of 9- and 12-NO₂-CLA (Fig. 1A) with excess GSH led to a reduction in absorbance at 330 nm, consistent with loss of double bond conjugation. The decrease was biexponential and included a fast phase that lasted ~ 0.5 min followed by a second phase that was slower by a factor of ~ 30 (Fig. 1B). No significant changes in absorbance occurred in the absence of thiols. Although the NO₂-CLA stock contains an $\sim 1:1$ mixture of the positional isomers 9- and 12-NO₂-CLA, the existence of two phases could not be explained by a differential reactivity of the isomers, as purified 9- and 12-NO₂-CLA yielded comparable biphasic kinetics (Fig. 1B, inset). In contrast, the reaction with the monounsaturated derivative nitro-oleic acid (NO₂-OA),



SCHEME 1. Reactions between NO_2 -CLA and low molecular weight thiols. $\text{R}_1 = (\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ for 9- NO_2 -CLA or $(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$ for 12- NO_2 -CLA; $\text{R}_2 = (\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$ for 9- NO_2 -CLA or $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ for 12- NO_2 -CLA, $\text{RS}^- = \text{thiolate}$.

which has only one electrophilic site, was monophasic (Fig. 1C) (29). When NO_2 -CLA was mixed with the yellow thiol thionitrobenzoate (TNB), which allows us to follow changes in thiol concentration due to its absorbance at 412 nm, the kinetics were also biphasic, confirming that thiol consumption occurred in both phases (Fig. 1D). Regarding the concentration dependence of the reaction between NO_2 -CLA and excess GSH, a linear dependence with a non-zero y axis intercept was observed between the pseudo-first order rate constant (k_{obs}) of the fast phase and GSH concentration (Fig. 1E), while a hyperbolic dependence with a non-zero intercept was observed for the slow phase (Fig. 1F).

Taken together, the kinetic results are consistent with two parallel and reversible processes involving two non-equivalent electrophilic centers in NO_2 -CLA. These centers react with thiols forming two products that we hypothesize are the β - and the δ -adducts as shown in to Scheme 1, where $k_{\text{on}\beta}$ and $k_{\text{on}\delta}$ are second-order rate constants at pH 7.4 for the forward addition reaction of the fast and slow processes, respectively, and $k_{\text{off}\beta}$ and $k_{\text{off}\delta}$ correspond to first-order rate constants for the reverse elimination reactions.⁶

The coupled differential equations derived from Scheme 1 can be solved in matrix form yielding complex biexponential concentration functions. The relation of the exponential constants k_{obs} with the rate constants and concentrations is simplified when one phase is faster than the other (30, 31). In this case, the larger exponential constant, $k_{\text{obs(fast)}}$, increases linearly with thiol concentration according to Equation 1 (Fig. 1E).

$$k_{\text{obs(fast)}} = k_{\text{on}\beta}[\text{thiol}] + k_{\text{off}\beta} \quad (\text{Eq. 1})$$

For GSH reactions, $k_{\text{on}\beta} = 34 \pm 4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ was determined from the slope of the plot, whereas $k_{\text{off}\beta} = 0.10 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ was obtained from the y axis intercept. The equilibrium dissociation constant ($K_{\text{eq}\beta}$) was calculated by dividing $k_{\text{off}\beta}$ by $k_{\text{on}\beta}$ and its value was $(2.8 \pm 0.9) \times 10^{-3} \text{ M}$ (25 °C, pH 7.4).

The smaller exponential constant, $k_{\text{obs(slow)}}$, is given by the sum of the forward and reverse effective rate constants, where the former is $k_{\text{on}\delta} [\text{thiol}]$ multiplied by the fraction of free NO_2 -CLA, and it increases hyperbolically with thiol concentration according to Equation 2 (Fig. 1F).

⁶ $k_{\text{on}\beta}$ and $k_{\text{on}\delta}$ are $k_{\text{on}\beta, \text{pH } 7.4}$ and $k_{\text{on}\delta, \text{pH } 7.4}$, the apparent rate constants at pH 7.4. The same applies to $k_{\text{off}\beta}$ and $k_{\text{off}\delta}$. The notation was simplified for clarity.

$$k_{\text{obs(slow)}} = \frac{k_{\text{on}\delta} K_{\text{eq}\beta} [\text{thiol}]}{K_{\text{eq}\beta} + [\text{thiol}]} + k_{\text{off}\delta} \quad (\text{Eq. 2})$$

From fits to this equation, the $k_{\text{on}\delta}$ for the reaction with GSH was determined to be $3.5 \pm 0.5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ whereas $K_{\text{eq}\beta}$ was $(3.0 \pm 0.2) \times 10^{-3} \text{ M}$, in excellent agreement with the value determined from the fast phase. The $k_{\text{off}\delta}$ was obtained using data at relatively low thiol concentrations and was $(3 \pm 1) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. The $K_{\text{eq}\delta}$ was $(9 \pm 4) \times 10^{-5} \text{ M}$.

Similar determinations were carried out for cysteine, homocysteine, cysteinylglycine, and β -mercaptoethanol (BME), and the rate and equilibrium constants are shown in Table 1. The rate constants were higher for the presumed β -adducts in all cases. The equilibrium constants were lower by factors of 20–65 for the δ -adducts, reflecting higher stability. It is worth mentioning that at higher cysteine concentrations (30 mM) a third slow phase became evident ($k_{\text{obs}} = (1.33 \pm 0.01) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), which was not further characterized. No reaction was observed with histidine ($\leq 40 \text{ mM}$), suggesting that additions of α -amino and imidazole groups were not significant, consistent with nitrogenous bases being weaker nucleophiles toward Michael acceptors than thiolates (23, 26).

NO_2 -CLA Has Two Non-equivalent Electrophilic Carbon Centers in C_β and C_δ —The electrophilic Fukui $f^+(r)$ function, which measures the propensity of NO_2 -CLA to gain electron density in a nucleophilic attack, is shown in Fig. 2, mapped on a total electronic density isosurface calculated at the PCM-DFT level in aqueous solution. Two well defined and distinct soft electrophilic regions (Fig. 2, depicted in blue) involving the C_β and C_δ centers are found in both isomers. Whereas the region around C_β appears extended over the molecular surface and connected to the electrophilic nitro group envelope, the region enclosing C_δ is considerably smaller. These features would make C_β more prone to nucleophilic attack by thiols. Atomic softness data calculated from global softness and condensed Fukui f_A^+ (Table 2) completes the picture enabling a quantitative comparison, showing that C_β is significantly softer than C_δ , establishing the non-equivalency of the electrophilic C_β and C_δ centers and contributing to consolidate the hypothesis of their association with the fast and slow reactions, respectively.

The β -Adduct Is the Kinetic Product and the δ -Adduct Is the Thermodynamic Product—To define the products generated in each phase of the reaction, spectrophotometric, LC-UV-Visible, and LC-MS/MS experiments were performed. First, the time course of the reaction with GSH was followed at three different wavelengths. During the fast phase, the decrease in absorbance at 330 nm correlated with an increase at 250 nm, although no changes were observed at 290 nm. In the slow phase, however, the decrease at 330 nm correlated with an increase at 290 nm (Fig. 3A). These results suggest that the product formed during the slow reaction contains an intact nitroalkene moiety due to thiol addition at the δ -carbon (29, 32) whereas that formed during the fast reaction does not.

LC-UV-Visible analyses were performed using BME as a model thiol due to its slower addition kinetics and better chromatographic separation (33, 34). 9- NO_2 -CLA eluted at a retention time of 15.5 min (peak 1, λ_{max} 320 nm) (Fig. 3, B and C).

Nitro-conjugated Linoleic Acid and Thiols

TABLE 1

Apparent rate and equilibrium constants at pH 7.4 (25 °C) of the reaction of NO₂-CLA with thiols

Thiol ^a	Fast reaction (β)			Slow reaction (δ)			pK_a^b
	$k_{on\beta}$ $M^{-1} s^{-1}$	$k_{off\beta}$ s^{-1}	$K_{eq\beta}$ $M (\times 10^{-3})$	$k_{on\delta}$ $M^{-1} s^{-1}$	$k_{off\delta}$ $s^{-1} (\times 10^{-4})$	$K_{eq\delta}$ $M (\times 10^{-4})$	
Glutathione	34 ± 4^c	0.10 ± 0.02^c	2.8 ± 0.9	3.5 ± 0.5^d	3 ± 1^e	0.9 ± 0.4	8.94
Glutathione (9-NO ₂ -CLA)	33 ± 7^f	0.12 ± 0.02^f	4 ± 1	3.5 ± 0.3^f	ND ^g	ND ^g	
Glutathione (12-NO ₂ -CLA)	31 ± 8^f	0.15 ± 0.02^f	5 ± 2	5.6 ± 0.6^f	ND ^g	ND ^g	
Glutathione (NO ₂ -OA)	64 ± 1^f	$(6 \pm 1) \times 10^{-3f}$	0.09 ± 0.02	Absent	Absent		
Cysteine	32.6 ± 0.2^h	0.196 ± 0.002^h	6.0 ± 0.1	2.8 ± 0.4^e	6 ± 3^e	2 ± 1	8.29
Homocysteine	18.9 ± 0.5^e	0.03 ± 0.02^e	2 ± 1	1.4 ± 0.2^e	1 ± 1^e	1 ± 1	9.10
Cysteinylglycine	51 ± 4^h	0.28 ± 0.06^h	5 ± 2	10 ± 2^e	10 ± 5^f	1.0 ± 0.7	7.95
β -Mercaptoethanol	15 ± 2^h	0.019 ± 0.005^h	1.3 ± 0.6	3.0 ± 0.4^e	0.6 ± 0.5^e	0.2 ± 0.2	9.60
Thionitrobenzoate ⁱ	~ 800	ND ^g		~ 50	ND ^g		

^a A mixture of 9- and 12-NO₂-CLA was used unless otherwise specified.

^b Thiol pK_a values reported in Ref. 36.

^c Values are the means \pm S.E. of $n = 4$ independent experiments.

^d Values are the means \pm S.E. of $n = 5$ independent experiments.

^e Values are the means \pm S.E. of $n = 3$ independent experiments.

^f $n = 1$, values are the parameter \pm error of the fit.

^g ND is not determined.

^h Values are the means \pm S.E. of $n = 2$ independent experiments.

ⁱ Because of the high absorptivity of TNB, only rough estimates of k_{on} could be obtained.

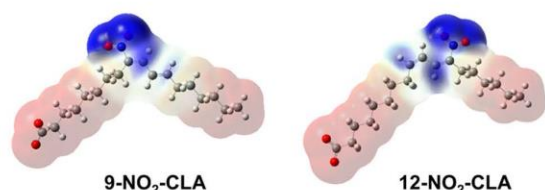


FIGURE 2. Electrophilic centers in 9-/12-NO₂-CLA regioisomers. Fukui $f^+(r)$ function for nucleophilic attack mapped on a total electron density surface of 0.0004 au as determined in aqueous solution at the PCM(IEF)- ω B97X-D/6-31+G(d,p) level of theory. Positive areas depicted in blue represent the electrophilic regions. The coloring scheme spans from -6.0×10^{-7} au in red to 1.1×10^{-4} au in blue.

TABLE 2

Atomic softness s_A^+ for the carbon centers in the conjugated nitroalkene moieties embedded in each NO₂-CLA regioisomer (in au)

Data were determined according to Equation 10. Positive values correspond to atoms more prone to receive electrons, acting as electrophilic centers. The softest and most reactive C _{β} site in each isomer is underlined.

Regioisomer	Carbon center			
	C _{α}	C _{β}	C _{γ}	C _{δ}
9-NO ₂ -CLA	-0.036	<u>0.684</u>	-0.113	0.462
12-NO ₂ -CLA	-0.029	<u>0.699</u>	0.117	0.523

The peak at 15.1 min (peak 1*) corresponds to contaminant 12-NO₂-CLA (data not shown). In the first 10 s of the reaction with BME, a peak appeared at 8.8 min (peak 2, λ_{max} 240 nm) (Fig. 3, B, inset, and C) that was still present after 5 min but disappeared after 1 h due to the reverse elimination process and further reactions of NO₂-CLA, and it was thus assigned to the fast reaction product (β -addition). After 5 min of reaction, another peak appeared at 8.2 min (peak 3, λ_{max} 280 nm) (Fig. 3B), became dominant as the reaction progressed, and was assigned to the δ -addition product. This peak was not symmetric, suggesting the presence of two diastereomers, both with maximum absorbances at 280 nm (Fig. 3C). The secondary peaks at 8.6 (peak 2*) and 7.7 min (peak 3*) were assigned to the products of the fast and slow processes for the reaction between contaminant 12-NO₂-CLA and BME.

To obtain further mechanistic insight, the reaction between purified 9-NO₂-CLA and BME was monitored by LC-MS/MS.

Fig. 4, A and B, shows that 9-NO₂-CLA consumption (MRM 324/46, retention time: 8.6 min) leads to the formation of an early addition product (MRM 402/324, retention time: 6.9 min, β -adduct), which decays and becomes undetectable at 60 min. The disappearance of this product coincides with the formation of two isobaric species (MRM 402/324, retention times: 6.5 and 6.8 min, δ_1 - and δ_2 -adducts, respectively) that become the dominant products during the slow phase of the reaction and likely represent diastereomers as further discussed below (Figs. 6C and 7B). To confirm the relative rates of elimination from the adducts formed during the different phases of the reaction, aliquots were incubated with excess NEM (100 mM, 30 min) to efficiently trap BME ($k = 7 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ at pH 7.4 (35)) (Fig. 4, C and D). Consistent with the measured $k_{off\beta}$ and $k_{off\delta}$ values (Table 1), NEM incubation completely reversed adducts formed at early time points but had no effect on the late products. Similar results were obtained with the purified 12-NO₂-CLA isomer, with the particularity that only one δ -addition product could be resolved to such an extent as to allow reliable peak integration (supplemental Fig. S1).

Overall, LC-MS/MS results and UV-Visible analysis were in excellent agreement, and it was concluded that the fast reaction corresponded to the β -addition of the thiol and the slow reaction to the δ -addition (Scheme 1). No evidence for the formation of other products was obtained. The results are consistent with a fast reaction of NO₂-CLA with the thiol to form initially the β -adduct. Because of the reversibility of this reaction, the β -adduct undergoes elimination and releases free NO₂-CLA, which engages in further reactions finally leading to the slow accumulation of the more stable δ -adduct.

Addition Requires a Thiolate and Elimination Occurs through Two Independent Pathways—The pH dependence of the reaction kinetics of NO₂-CLA with GSH was studied using three-component buffers of constant ionic strength. Plots of k_{obs} versus GSH concentration were constructed at each pH, from which the corresponding apparent $k_{on,app}$ and $k_{off,app}$ values were obtained for both fast and slow processes. For the fast reaction, the $k_{on\beta,app}$ increased with pH (Fig. 5A) according to a single pK_a equation (Equation 3),

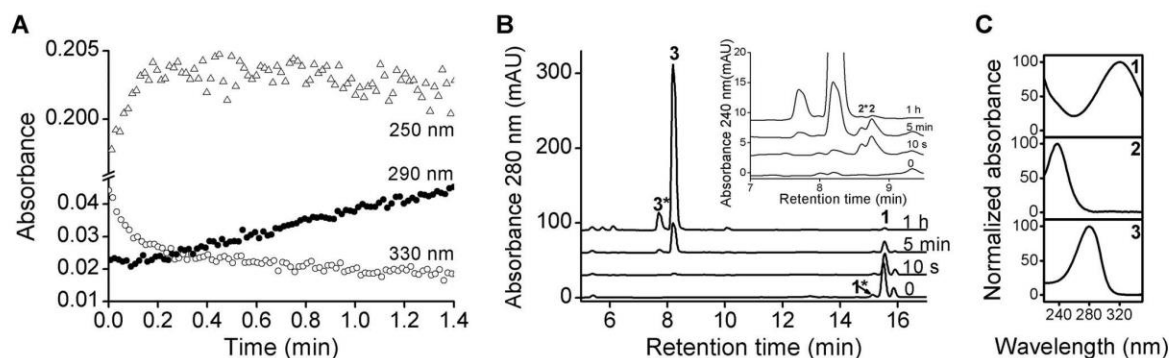


FIGURE 3. UV-Visible analysis of the reaction between $\text{NO}_2\text{-CLA}$ and thiols. *A*, time course changes in absorbance at 330 (open circles), 290 (black circles), and 250 nm (open triangles) for the reaction between $\text{NO}_2\text{-CLA}$ ($10 \mu\text{M}$) and GSH (3 mM). *B*, representative LC-UV-visible traces of the reaction between purified 9- $\text{NO}_2\text{-CLA}$ ($100 \mu\text{M}$) and BME (1.76 mM). Aliquots were obtained at the indicated time points before LC-UV-visible analysis. *C*, UV-visible spectra for 9- $\text{NO}_2\text{-CLA}$ (panel 1) and both β - (panel 2) and δ -adducts (panel 3). Asterisks indicate minor peaks derived from contaminant 12- $\text{NO}_2\text{-CLA}$.

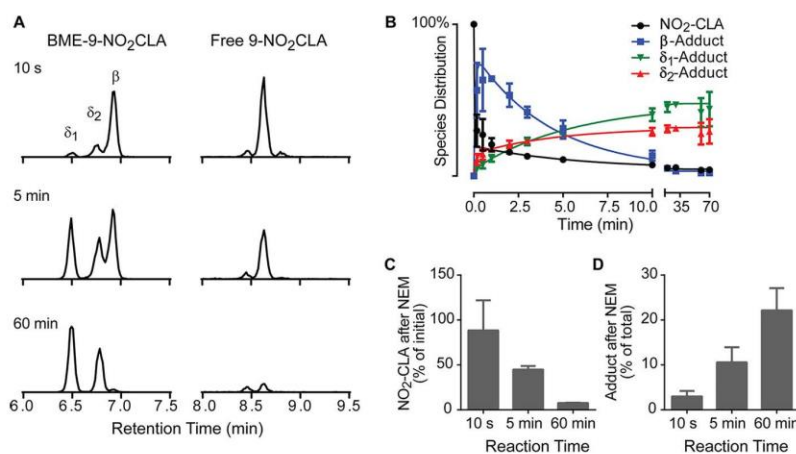


FIGURE 4. LC-MS/MS analysis of the reaction between $\text{NO}_2\text{-CLA}$ and BME. *A*, purified 9- $\text{NO}_2\text{-CLA}$ ($10 \mu\text{M}$) was reacted with BME (1.76 mM), and aliquots were obtained at 10 s (top), 5 min (middle), and 60 min (bottom) for analysis of free $\text{NO}_2\text{-CLA}$ (right) and BME- $\text{NO}_2\text{-CLA}$ adducts (left). *B*, representative time course for 9- $\text{NO}_2\text{-CLA}$ reaction with BME. *C* and *D*, aliquots collected at the indicated times were incubated with NEM (100 mM), and the percentage of free $\text{NO}_2\text{-CLA}$ with respect to that at time 0 (*C*) and the percentage of BME- $\text{NO}_2\text{-CLA}$ adduct with respect to NEM-untreated controls (*D*) were determined. Data are representative of three independent experiments.

$$k_{\text{on, app}} = k_{\text{on, pH-indep}} \frac{K_a}{K_a + [\text{H}^+]} \quad (\text{Eq. 3})$$

where $k_{\text{on, pH-indep}}$ represents the rate constant for the completely ionized thiol. The $\text{p}K_a$ was 8.78 ± 0.02 , in agreement with the reported $\text{p}K_a$ of GSH (8.94) (36) and consistent with the requirement for rapid prior ionization of the thiol to thiolate in the forward addition process. The $k_{\text{off}, \text{app}}$ presented an upward bend indicating that the elimination process occurs through two independent pathways (Fig. 5B) (37). At biologically relevant pH values, elimination appears to be unimolecular or water-assisted. The increase above pH 9 likely reflects the assistance of alternative bases. Similar pH dependences were observed for the slow phase (data not shown), suggesting that comparable mechanisms are operative.

Correlations with Thiol $\text{p}K_a$ Suggest That the Thiolate Participates in the Rate-controlling Step—Because the thiolate is the reactant in the forward addition process, the $k_{\text{on, app}}$ values at pH 7.4 (Table 1) were corrected according to Equation 3 to obtain pH-independent values ($k_{\text{on, pH-indep}}$), that reflect the

intrinsic reactivity of each thiolate toward $\text{NO}_2\text{-CLA}$. For the fast reaction, the log of $k_{\text{on, pH-indep}}$ increased with thiol $\text{p}K_a$ according to Equation 4,

$$\log k_{\text{on, pH-indep}} = \beta_{\text{nuc}} \text{p}K_a + C_{\text{on}} \quad (\text{Eq. 4})$$

where β_{nuc} is the Brønsted nucleophilic coefficient, and C_{on} is a constant. According to the slope and the y axis intercept of the plot, β_{nuc} was 0.64 ± 0.08 , and C_{on} was -2.8 ± 0.7 (Fig. 5C, top trace). The β_{nuc} value of 0.64 indicates that thiolate nucleophilicity correlates with proton basicity and is consistent with thiolate participation in transition state formation. It also suggests a relatively high degree of charge transfer at the transition state level. For comparison, β_{nuc} values of 0.45 and 0.16 were reported for the addition of thiols to acrylonitrile (26) and α -nitrostilbene, respectively (23).

For the reverse reaction (pH < 9), inverse correlations between the log k_{off} and thiol $\text{p}K_a$ were obtained, consistent with Equation 5,

$$\log k_{\text{off}} = \beta_{\text{lg}} \text{p}K_a + C_{\text{off}} \quad (\text{Eq. 5})$$

Nitro-conjugated Linoleic Acid and Thiols

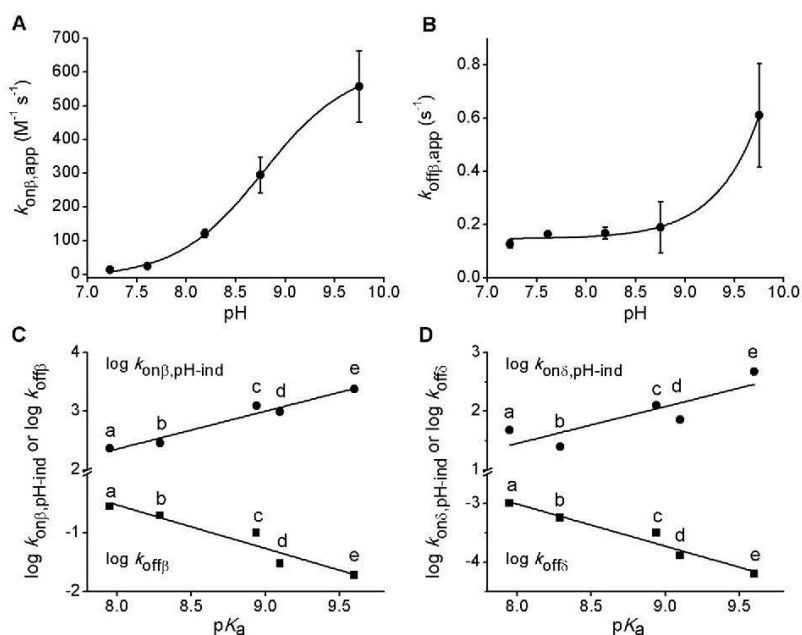


FIGURE 5. **pH-dependence and correlations with thiol pK_a .** A and B, fast reaction between GSH and NO_2 -CLA was studied at different pH values using three-component constant ionic strength buffers. Apparent $k_{\text{on}\beta}$ (A) and $k_{\text{off}\beta}$ (B) values were obtained as in Fig. 1E and Equation 1 from the fit of plots of k_{obs} versus GSH concentration to a straight line; the error bars represent the standard error of the fit. C and D, Brønsted plots for fast (C) and slow (D) reactions. The logarithm of $k_{\text{on}\beta}$, $k_{\text{on}\delta}$, $k_{\text{off}\beta}$, and $k_{\text{off}\delta}$ rate constants (circles, calculated from k_{on} values at pH 7.4) and $k_{\text{off}\beta}$ (squares) were plotted against thiol pK_a values. Data are from Table 1; a, cysteinylglycine; b, cysteine; c, GSH; d, homocysteine; e, BME.

where β_{lg} is the Brønsted leaving group coefficient, and C_{off} is a constant. The values of β_{lg} and C_{off} were determined from the slope and y axis intercept of the plot to be -0.73 ± 0.12 and 5.3 ± 1.1 , respectively (Fig. 5C, bottom trace). The β_{lg} value of -0.73 indicates that the reactivity of the adduct correlates with the proton acidity of the thiol that is eliminated. This is consistent with a rate-controlling step that involves thiolate departure and partial charge formation, with considerable amount of C–S bond breaking in the transition state, in agreement with a reversal of the mechanism proposed for the forward reaction. Values of β_{lg} of -0.68 and -0.54 were reported for the elimination of thiols from α -nitrostilbene and acrylonitrile adducts, respectively, with leaving group expulsion argued to be the rate-controlling step in the latter case (23, 25). For the slow reaction, similar trends were observed, with $\beta_{\text{nuc}} = 0.6 \pm 0.2$, $C_{\text{on}} = -4 \pm 2$, $\beta_{\text{lg}} = -0.72 \pm 0.09$, and $C_{\text{off}} = 2.7 \pm 0.8$ (Fig. 5D).

Lack of Solvent Kinetic Isotope Effects—The reaction of $20 \mu\text{M}$ NO_2 -CLA with 4 mM GSH exhibited k_{obs} of 0.23 ± 0.03 and $(6.4 \pm 0.2) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ for the fast and slow processes, respectively. When H_2O was replaced by D_2O (92%) and the pD was adjusted for similar GSH ionization fractions, k_{obs} values were 0.25 ± 0.04 and $(6.1 \pm 0.3) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, indicating the absence of significant deuterium solvent kinetic isotope effects. This rules out rate-controlling steps that involve protonation and suggests that concerted addition-elimination processes are not involved. Instead, the reactions likely occur through stepwise mechanisms involving anionic intermediates and thiolate attack as the rate-limiting step, in agreement with the Brønsted correlations shown in Fig. 5, C and D.

Main Features of the Transition States and Anionic Intermediates for Thiolate Addition on C_β/C_δ Centers—In line with the experimental results, PCM-DFT modeling provided a detailed characterization of the transition states ($\text{TS}_\beta/\text{TS}_\delta$) and anionic intermediates ($\text{I}_\beta/\text{I}_\delta$) for a stepwise attack by a thiolate on C_β/C_δ electrophilic centers embedded at the common central moiety of both NO_2 -CLA isomers (Fig. 6 and structural data in supplemental Table S1). No evidence was found here for a concerted four-membered ring TS as reported for the attack of thiols on α,β -unsaturated carbonyls (38). Both $\text{TS}_\beta/\text{TS}_\delta$ resemble the open structures found for thio-Michael addition on that kind of acceptor (39, 40), taking place after fast deprotonation of the thiolate in solution.

Reactions at C_β and C_δ proceed both through entropically disfavored loose reactant complexes ($\text{RC}_\beta/\text{RC}_\delta$, Fig. 6, A and B) leading to transition states ($\text{TS}_\beta/\text{TS}_\delta$) with a more asymmetric distribution of charge in the acceptor and associated free-energy barriers of 18.9 and 20.2 kcal/mol, respectively, calculated with respect to the isolated reactants in solution (Table 3). This supports the assignment of β -/ δ -addition processes, respectively, to the fast/slow phases observed in the experiments. In fact, a difference of 1.3 kcal/mol in activation free-energy translates into a 9-fold increase in the k_{on} rate for β -addition with respect to δ -addition, in excellent agreement with the kinetic experiments (Table 1). Charge transfer of 0.33 and 0.28 atomic units (au) between reacting moieties is respectively found at TS_β and TS_δ (mainly accommodated at the NO_2 group) reflecting the similarity between β_{nuc} parameters for both fast and slow NO_2 -CLA reactions. The R1/R2 substituents at the conju-

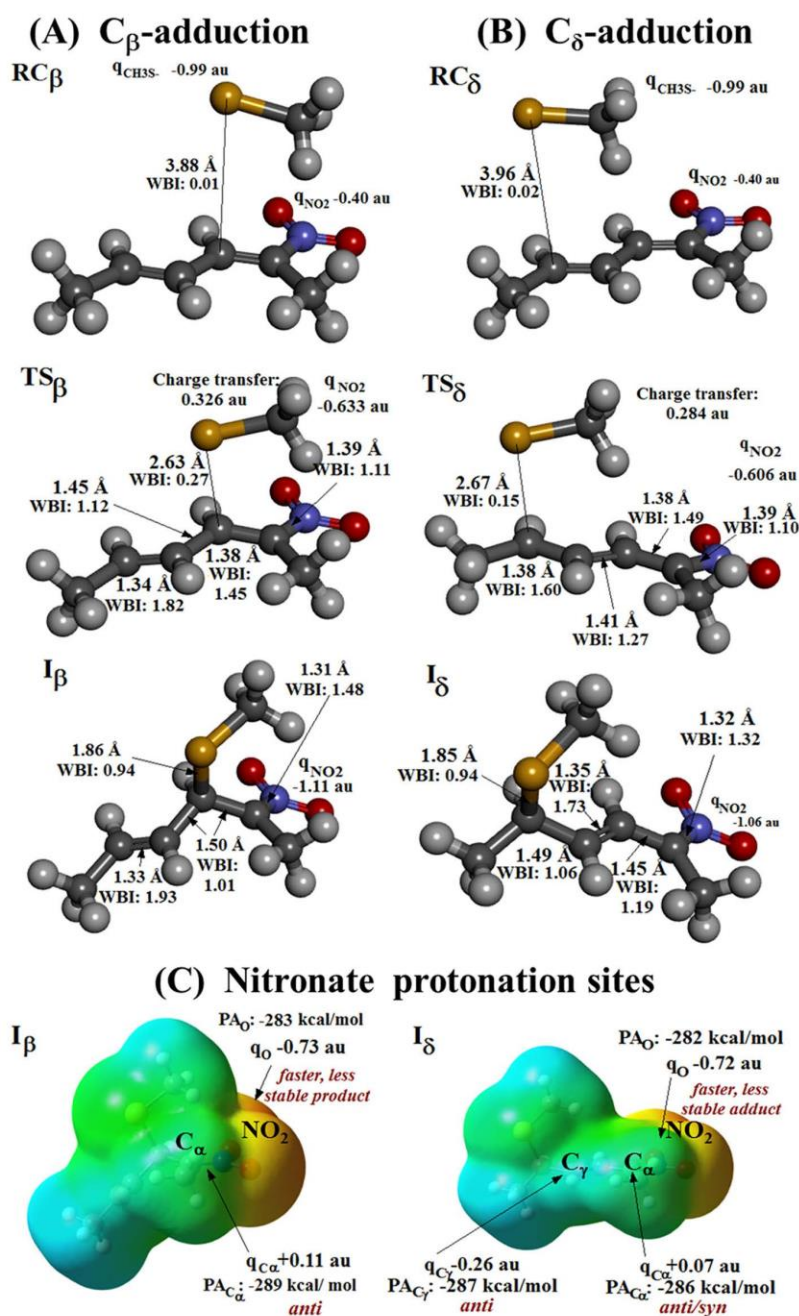


FIGURE 6. Structural features of the species involved in β - and δ -adduction as determined by PCM-DFT modeling in aqueous solution using CH_3S^- as representative thiol and a model 2-nitrohexa-2,4-diene compound containing the reactive region of NO_2 -CLA. A and B, reactants complex, transition state, and nitronate intermediate, respectively, characterized for thiolate β -adduction (RC_β , TS_β , and I_β) or δ -adduction (RC_δ , TS_δ , and I_δ). Atoms are colored by element, and a selection of relevant bond lengths, WBI, and NPA atomic/group charges labeled as q_X (X represents an atom or group of atoms) featuring geometrical and electronic reorganization along each reaction channel is highlighted in proximity to the structures. Net charge transfer between reactants is evidenced at each TS. C, relevant properties toward $\text{I}_\beta/\text{I}_\delta$ nitronate protonation: MEP mapped on a total electron density surface of 0.004 au (notice that the underlying structures retain the orientation shown immediately above in A and B for each species), NPA atomic charges, and proton affinities (PA) at each O/C protonation site. All properties calculated at the PCM(IEF)- ω B97X-D/6-31+G(d,p) level in aqueous solution. MEP coloring scheme spans from -0.245 (red) to -0.04 (cyan-blue). Although electrostatics favor a faster protonation at NO_2 oxygens in both cases, $\text{C}_{\alpha/\gamma}$ targets lead to more stable products, displaying mostly anti stereochemistry due to steric restrictions, as evidenced in red labels.

TABLE 3

Relative energetics of the species participant in β/δ -channels using a representative conjugated nitroalkene model

Enthalpy and Gibbs free-energy at 298 K and 1 atm relative to isolated reactants for each species involved in the stepwise mechanism for the thio-Michael addition and further protonation are calculated at the PCM(IEF, water)- ω B97X-D/6-31+G(d,p) level and expressed in kilocalories/mol. Free-energy reaction barrier for the first step and stability of the main Michael adduct(s) corresponding to each of the reaction channels are highlighted in boldface.

Reaction Channel	Property	Thiolate addition step ^a				Protonation step, final products ^b		
		RC _X	TS _X	I _X		Aci-Nitro (O-protonated)	Nitroalkane (C α -protonated)	Nitroalkene (C γ -protonated)
β -Adduction	ΔH	2.6	6.5	-8.4	Kinetic product	-289.5	-297.3	Not formed
	ΔG	12.5	18.9	3.9		-278.7	-284.9	
δ -Adduction	ΔH	2.8	7.6	-14.5	Thermodynamic product	-294.8	-299.8	-300.4
	ΔG	11.6	20.2	-1.5		-283.1	-287.7	-288.4

^a X = β or δ , see the corresponding structures in Fig. 6.

^b See the corresponding structures in Fig. 7.

gated nitroalkene moiety (Scheme 1) modulate its intrinsic reactivity toward thiolate attack (23, 26). In particular, for nitroalkene fatty acids the alkyl/carboxyl(ate) chains are expected to increase the reactivity toward thio-Michael addition with respect to the model system studied here, without altering the mechanism⁷ leading to a more pronounced charge reorganization between partners at the C β /C δ addition TSs, closer to the expectations from the β_{nuc} values derived from experimental data. A similar rationale applies to bond forming/breaking at each TS, for which Wiberg bond indices (WBIs) of 0.27/0.15 for the nascent S \cdots C β /S \cdots C δ bonds imply advances of 28 or 16% at each reaction involving the model compounds. A lag in S-C δ bond formation with respect to the advance in charge transfer from thiolate to nitroalkene moieties (not found in TS β) may explain the higher barrier found for the slower reaction leading to the δ -adduct (41).

Concerning the anionic intermediates (I β /I δ , Fig. 6), they both would be nitronate species, sharing a strengthened C α -N bond (WBIs: 1.48 and 1.32 au, respectively) and a net charge of -1 au localized at the NO $_2$ moiety in their structures. Whereas the second NO $_2$ -CLA unsaturation remains intact at C α =C δ in I β , it appears shifted into C γ =C β , in I δ enabling a more extended electron delocalization that translates in a more stable δ -intermediate (Table 3). No evidence of formation of any stable carbanion was found. The NO $_2$ group progressively captures all the electronic density transferred between reactants up to completion of each of these two parallel addition processes, resulting in completely formed C-S single bonds (1.85–1.86 Å and WBIs 0.94 au) and loss of planarity at C β /C δ . Thus, whereas a thermodynamically disfavored nitronate I β is obtained through a faster and slightly endoergic (but exothermic) process, the more stable I δ would be the prevalent outcome of the addition step in the longer timescales. Reverse free-energy reaction barriers in the range of 15–22 kcal/mol (Table 3) are indicative of reversible processes leading in both cases to elimination of a thiolate, more facilitated from the β -intermediate (once again a result qualitatively in line with the relationship between k_{off} values obtained for the fast/slow processes).

As a required step in reaching neutral products for these processes, protonation of the anionic intermediates has to be placed in the mechanistic scheme. Natural population analysis (NPA) atomic charges at C α /C γ /O, the corresponding proton

affinities (PA $_{C\alpha}$, PA $_{C\gamma}$, and PA $_O$), and the molecular electrostatic potential (MEP) mapped on the molecular surface are shown in Fig. 6C as the properties of I β /I δ nitronates that determine the kinetics and thermodynamics of proton capture in aqueous solution. Two possibilities arise here (Fig. 7) as follows: O-protonation leading to an aci-Nitro R'CR=NO $_2$ H derivative (aci-Nitro β -/ δ -adducts) and C α / γ -protonation leading to nitroalkane/nitroalkene products (tautomers of the former). A protonation preference for the O-site over the C α -site has been shown for phenylnitromethanes both by experiments under acidic and neutral conditions in aqueous solution and methanol (42–44) and by computational modeling at the B3LYP/6-31+G(d,p) level in gas phase (42) or mimicking aqueous solution by including two water molecules in the system (45). The latter study also presented a water-assisted mechanism for conversion of aci-Nitro species toward a nitroalkane C α tautomer, more stable by 8.3 kcal/mol (45). PCM(IEF)- ω B97X-D/6-31+G(d,p) modeling in the aqueous solution conducted here on the protonation of I β and I δ showed both species to be more prone for O-protonation (aci-Nitro would be thus a kinetic outcome of protonation), but all the C-protonated tautomers were found to be more stable by 5–6 kcal/mol than their aci-Nitro counterparts. Among the final species derived from I δ , a small 0.7 kcal/mol difference in stability would favor a C γ -protonated nitroalkene over a C α -protonated and unsaturated nitroalkane, with the former being the most stable product achievable by all means.

Regarding stereoisomerism, while protonation at C α must be anti-periplanar to the C β -S bond linking the thiolate moiety that blocks any *syn* approach to I β (only (*R,S*) or (*S,R*) enantiomers can be obtained among β -adducts), both *syn/anti* protonation appears feasible at the more accessible C α position in I δ (Fig. 6) yielding either (*R,R*), (*R,S*), (*S,R*), or (*S,S*) stereoisomers, an outcome that makes it possible to find enantiomers and diastereomers among the final δ -adducts.

Thus, on the basis of our calculations, a faster O-protonation of I β /I δ that would be followed by water-assisted tautomerization into the corresponding more stable counterparts complete the mechanism of reaction leading to the final products. According to modeling, the expected products would be then a β -thio-Michael-unsaturated adduct in nitroalkane form (Fig. 7A) in the short timescale and a mix of δ -thio-Michael adducts, including a prevalent nitroalkene form and two companion diastereomeric unsaturated nitroalkane species (Fig. 7B), in the long timescale.

⁷ E. L. Coitiño, D. Pérez-Escanda, and F. Ferraro, unpublished data.

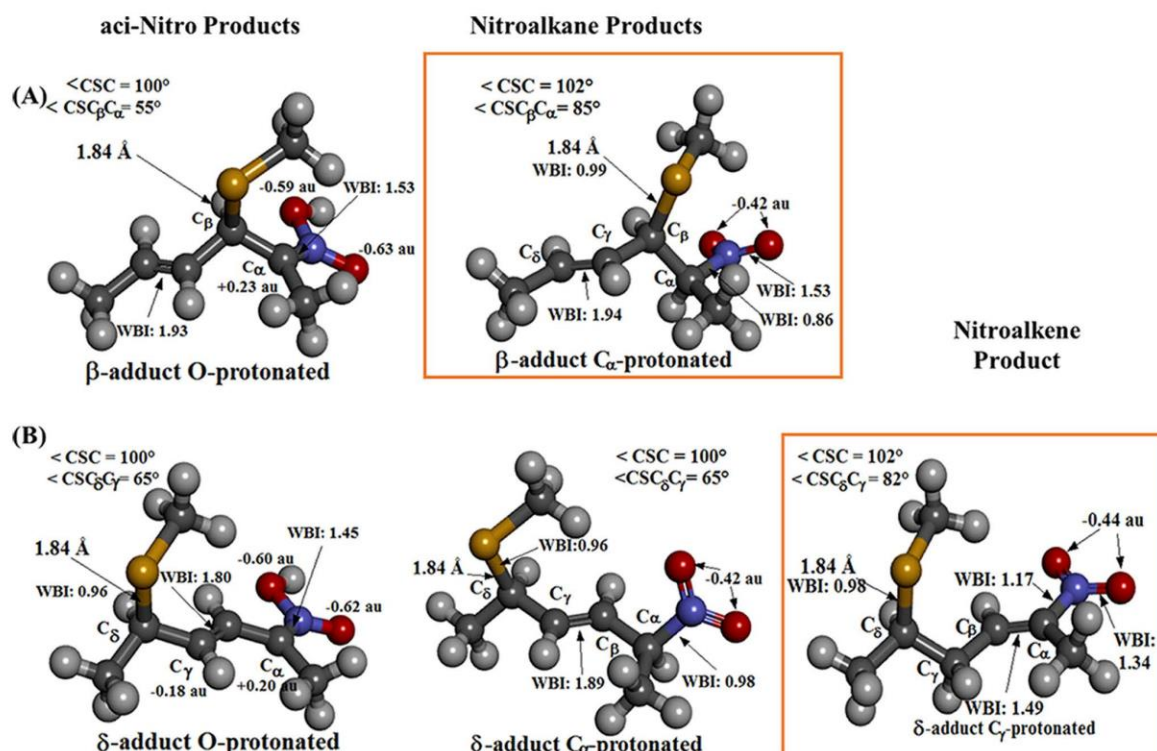


FIGURE 7. Structural features of the possible neutral products characterized at the PCM(IEF)- ω B97X-D/6-31+G(d,p) level in aqueous solution. A, O-protonated aci-Nitro and C_α -protonated nitroalkane β -adducts. B, O-protonated aci-Nitro, C_α -protonated nitroalkane, and C_γ -protonated nitroalkene δ -adducts. Atoms are colored by element, and a selection of the more relevant bond lengths and angles, WBIs, and NPA atomic charges on O, C_α , and C_γ obtained at the same level of theory are reported in the proximity of relevant bonds and atoms at each structure. The expected kinetic and thermodynamic prevalent products (C_α -protonated nitroalkane β -adduct and C_γ -protonated nitroalkene δ -adduct, respectively) are framed in orange.

NO₂-CLA-Cysteine δ -Addition Products Are Found in Human Urine—Based on experimental and modeling results, endogenous Cys-NO₂-CLA in human urine is expected to be primarily represented by the more stable δ -addition products. Isotopically labeled Cys-9-NO₂-CLA and Cys-12-NO₂-CLA enriched in δ -adducts were synthesized, mixed in a 1:1 ratio, and compared with urinary Cys-NO₂-CLA (Fig. 8). LC-MS/MS analysis is consistent with a predominant presence of the Cys- δ -adducts of 9- and 12-NO₂-CLA versus the corresponding β -products, which presented a different chromatographic profile (supplemental Fig. S2).

NO₂-CLA Reactions with HSA—Cys-34 in HSA is the most abundant reduced thiol in plasma and is therefore a potential target for reaction with NO₂-CLA. In addition, HSA has a central role in fatty acid binding and transport; therefore, both covalent and non-covalent interactions with NO₂-CLA might occur. The absorbance of NO₂-CLA changes with solvent polarity (λ_{\max} 330 nm in aqueous solution versus 312 nm in methanol), and thus it is expected to also change upon interaction with the hydrophobic binding sites in HSA. NO₂-CLA incubation with delipidated thiol-blocked HSA resulted in a blue shift in absorbance (Fig. 9A). Titrations performed by adding aliquots of delipidated thiol-blocked HSA to a fixed amount of NO₂-CLA allowed us to estimate up to 3.8 ± 0.5 NO₂-CLA bound per delipidated thiol-blocked HSA (Fig. 9B). When titrations were carried out using lipidated (stearic acid/HSA, 5:1)

thiol-blocked HSA, a similar value of 3.2 ± 0.2 NO₂-CLA per HSA was obtained indicating that NO₂-CLA was able to displace stearic acid (data not shown). Fitting of the titration data to hyperbolic equations yielded global apparent dissociation constants of $(0.9 \pm 0.3) \times 10^{-6}$ and $(1.2 \pm 0.3) \times 10^{-6}$ M for delipidated and lipidated HSA, respectively, consistent with reported values for non-nitroalkene fatty acids (46).

The reactivity of Cys-34 toward NO₂-CLA could not be evaluated following changes in absorbance at 330 nm because of interference from non-covalent binding. Therefore, the decay in HSA thiol concentration after incubation of reduced and lipidated HSA (50 μ M) with NO₂-CLA (300 μ M) for 1 h was assessed using 4,4'-dithiodipyridine (DTDP). The mole of thiol per mol of HSA were 0.47 and 0.25 in the absence and presence of NO₂-CLA, respectively. Considering the concentrations used and the incubation time, a lower limit of $0.5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (25 °C, pH 7.4) was estimated for the rate constant.

Discussion

NO₂-CLA reacts reversibly with thiols forming Michael adducts. In agreement with the presence of two electrophilic centers in NO₂-CLA, two products were detected, the β -adducts and the δ -adducts. The β -adducts are formed at faster rates and are thus the kinetic products. In contrast, the δ -adducts are formed with slower kinetics but present higher stabil-

Nitro-conjugated Linoleic Acid and Thiols

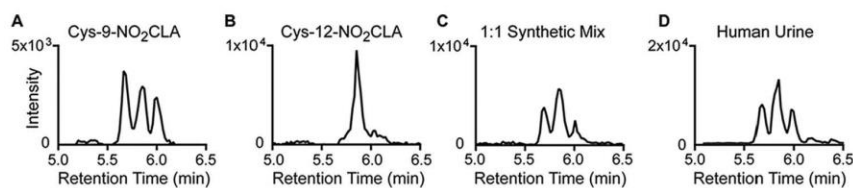


FIGURE 8. LC-MS/MS profile of endogenous δ -Cys-NO₂-CLA addition products in human urine. Comparison of isotopically labeled standards generated from the δ -addition of cysteine to 9-NO₂-CLA (A), 12-NO₂-CLA (B), a 1:1 mixture of both standards (C), and urine Cys-NO₂-CLA (D). Data were obtained from a single urine donor with LC-MS/MS profiles consistent with published reports (1, 2).

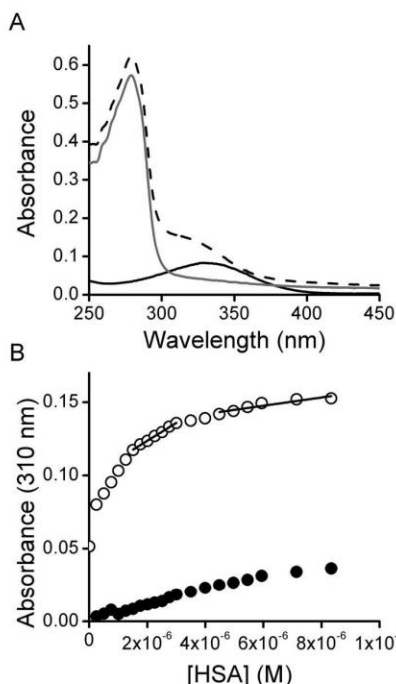


FIGURE 9. NO₂-CLA binding to HSA. A, UV-Visible spectra of 16 μ M thiol-blocked delipidated HSA (gray trace), 10 μ M NO₂-CLA (black trace), and the combination of both reagents (dashed trace). B, thiol-blocked delipidated HSA (0.2–10 μ M) was mixed with NO₂-CLA (10 μ M), and UV-visible spectra were recorded. The absorbance at 310 nm was plotted against HSA concentration, and the amount of NO₂-CLA bound was determined from the change in the slope (open circles). A control without NO₂-CLA was included (black circles).

ity and are thus the thermodynamic products. In the case of GSH, the δ -adduct is 30 times more stable than the β -adduct.

From a mechanistic viewpoint, our experimental and computational results are consistent with a stepwise addition process where the rate-controlling step involves the nucleophilic attack of the thiolate on NO₂-CLA to form an anionic intermediate, followed by proton incorporation, and the reverse process would be involved in elimination. Although nitroalkanes possess relatively high carbon acidity (pK_a 10.28 for nitromethane (43, 47)), deprotonation rates can be outstandingly slow, with rate constants for proton transfer from nitromethane to OH⁻ measured at $27.6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (43, 47). In fact, deprotonation has been proposed to control the rate of elimination of other activated alkanes (25). However, in the case of the reaction between NO₂-CLA and thiols, the Brønsted correlations obtained together with the lack of a solvent deuterium kinetic

isotopic effect rule out protonation as the rate-controlling step in the addition process (or deprotonation in the elimination).

The results obtained in this study can be generalized to predict the stability of NO₂-CLA adducts as a function of thiol pK_a . If specific aspects of protein thiol reactivity and steric constraints are dismissed, the K_{eq} at a certain pH can be calculated from dividing k_{off} and k_{on} and combining Equations 3–5 to obtain Equation 6.

$$\log K_{\text{eq}} = (\beta_{\text{lg}} - \beta_{\text{nuc}} + 1)pK_a + C_{\text{off}} - C_{\text{on}} + \log(K_a + [\text{H}^+]) \quad (\text{Eq. 6})$$

For both the β - and the δ -adducts, substitution in Equation 6 with the β_{lg} , β_{nuc} , C_{off} and C_{on} values obtained from Fig. 5 allows the generalization that, at pH 7.4, the stability of the adducts increases as the pK_a increases, so that adducts formed with relatively less acidic thiols (higher pK_a) are the more stable at neutral pH (Fig. 10).

Considering the wide variety of thiols present in the biological context and the reversibility of the reactions described herein, it is likely that NO₂-CLA will exist as part of a dynamic pool alternating between free and bound forms. Our study predicts that under intracellular conditions, NO₂-CLA will quickly react with GSH and other low and high molecular weight thiols to initially form β -adducts. Because of the reversibility of these reactions, the β -adducts will undergo elimination, and the free NO₂-CLA will eventually give rise to the more stable δ -adducts. Thus, the transient formation of β -adducts could contribute to establish a dynamic buffer of NO₂-CLA. Considering the high concentrations of GSH (2–17 mM) and protein thiols inside cells (10–50 mM) (18, 19), we can predict that if equilibrium is achieved >99% of the NO₂-CLA pool will correspond to covalently bound forms (assuming similar reactivity for protein thiols and free cysteine). Furthermore, <4% of these products will correspond to β -adducts and >96% to δ -adducts, given the higher stability of the latter. In plasma, considering the lower concentrations of thiols ($\sim 450 \mu\text{M}$), it can be predicted that a significant fraction of the NO₂-CLA pool will be non-covalently bound to HSA, probably impacting its transport and storage. Nevertheless, it is important to understand that the interaction of NO₂-CLA with a particular protein thiol will be affected by the environment of the nucleophilic residue.

The adducts formed with GSH can be exported out of the cell through multi-drug resistance protein channels, which is a prominent pathway for nitroalkene fatty acid cell clearance. Once in the extracellular milieu, GSH-NO₂-CLA adducts are processed by γ -glutamyl transpeptidases and dipeptidases/aminopeptidases. The resulting cysteine conjugates are ex-

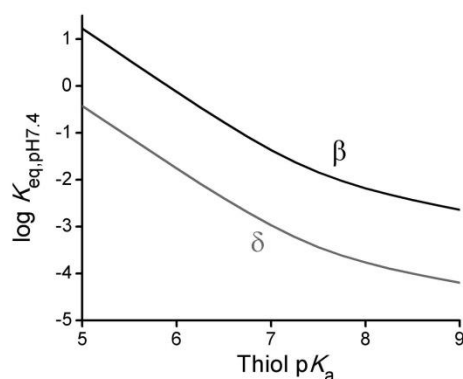


FIGURE 10. Predicted stability of the adducts at pH 7.4 as a function of thiol pK_a . The logarithm of the apparent dissociation equilibrium constant (K_{eq}) at pH 7.4 of β - (black) and δ - (gray) adducts was calculated from Eq. 6 using parameters obtained from Fig. 5.

creted in the urine. A small portion of the cysteine conjugates can be *N*-acetylated intracellularly forming mercapturic acid derivatives (2, 28, 48).

The finding of adducts of NO_2 -CLA with cysteine in urine provides evidence for the *in vivo* reaction of NO_2 -CLA with thiols. Moreover, it is likely that these adducts originated intracellularly by conjugation with GSH followed by cell export, removal of the glutamyl and glycyl moieties, and excretion. The fact that the Cys- NO_2 -CLA adducts found in urine correspond to δ -addition products is consistent with the higher stability of the δ - versus β -adducts of cysteine and GSH.

Overall, we have performed an in-depth study of the interactions of NO_2 -CLA with biological thiols and HSA. As the beneficial health effects of nitroalkene fatty acids continue to be unveiled, our study contributes to the understanding of the chemistry that underlies the protective actions of these endogenously formed potential drug candidates.

Experimental Procedures

General Solutions—All experiments were performed in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.4, containing 0.1 mM DTPA unless otherwise specified. Low molecular weight thiol solutions were prepared in nanopure water and used on the same day. TNB was synthesized as described previously (49). Thiol concentrations were determined with DTNB before and after experiments using an absorption coefficient at 412 nm of $14,150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (50). Stearic acid solutions (100 mM) were freshly prepared in methanol (80 °C, with agitation). DTDP solution (0.25 mM) was prepared in phosphate buffer, 0.1 M, pH 7.0.

Nitroalkene Fatty Acid and Adduct Solutions—10-Nitrooctadec-9-enoic acid (nitrooleic acid, NO_2 -OA), 9- and 12-nitrooctadeca-9,11-dienoic acids (9- and 12- NO_2 -CLA), or purified isomer solutions were synthesized as described (51, 52). For kinetic experiments, a 1:1 mixture of 9- and 12- NO_2 -CLA or purified isomer solutions were prepared (2 mM in methanol) and kept at -80 °C until use. An absorption coefficient for NO_2 -CLA at 330 nm in phosphate buffer of $6,490 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ was determined based on the previously reported absorption coefficient at 312 nm in methanol ($11,200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (52). The extinction coefficient used for NO_2 -OA was $8,220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at

270 nm in phosphate buffer (29). Isotopically labeled Cys- δ -adducts of 9- and 12- NO_2 -CLA standards were synthesized by reacting an excess of $^{13}\text{C}_3,^{15}\text{N}$ -Cys (500 μM) with either 9- or 12- NO_2 -CLA (10 μM) for 60 min in 10 mM sodium phosphate buffer at pH 7.4, 25 °C. The reaction was stopped by 1:3 dilution in 10% formic acid, followed by addition of 7 volumes of methanol.

HSA Solutions—HSA was delipidated with activated charcoal as described (53). Reduced HSA was prepared by incubation with BME (10 mM, for 30 min at room temperature with agitation) followed by gel filtration on PD-10 columns equilibrated with phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4, 0.1 mM DTPA). Thiol-blocked HSA was prepared by incubating delipidated HSA with BME followed by addition of NEM (150 mM, for 15 min at room temperature with agitation), followed by gel filtration against phosphate buffer. Lipidated and reduced HSA was prepared by incubating delipidated HSA with 5:1 stearic acid (stearic acid/HSA) (30 min at room temperature with agitation) followed by addition of BME and subsequent gel filtration. The HSA concentration was determined from the absorbance at 279 nm ($\epsilon = 0.531 \text{ (g/liter)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 66,438 Da) (46). HSA thiols were measured with DTNB in sodium pyrophosphate buffer (0.1 M, pH 9, 5 min) (54).

UV-Visible Assessment of Nitroalkene Fatty Acid Reactions with Thiols— NO_2 -CLA (10 μM) was reacted with GSH (0.2–15 mM), cysteine (Cys, 0.5–7 mM), homocysteine (0.5–12 mM), cysteinylglycine (1.5–7 mM), BME (1–8 mM), and TNB (60–100 μM). Changes in absorbance were followed at 330 nm (25 °C, pH 7.4). In some experiments, absorbance at 250, 290, or 412 (for TNB) nm, was also followed. For pH-dependence experiments, NO_2 -CLA (10 μM) was mixed with GSH (1–4 mM) using buffers of constant ionic strength and varying pH values (100 mM MES, 52 mM Tris, and 52 mM ethanolamine) (55). The reaction of NO_2 -OA (10 μM) with GSH (0.2–2 mM) was followed at 285 nm. Absorbance determinations were done in a Varian Cary 50 spectrophotometer equipped with an Applied Photophysics RX2000 Rapid Kinetics accessory.

Kinetics in Deuterium Oxide—For comparison of the kinetics of the reaction of NO_2 -CLA with GSH in D_2O (Millipore, 92% final concentration) versus H_2O (50 mM phosphate buffer, pH 7.4), the fraction of ionized thiolate in D_2O was equaled to that in H_2O by calculating the pK_a in D_2O (56) and adjusting the pD. The value of pD was obtained by adding 0.4 to the measured pH.

Reactivity Patterns in 9-/12- NO_2 -CLA as Explored by Electronic Structure Computational Modeling—Aqueous solution structures of 9-/12- NO_2 -CLA were fully optimized and verified by inspection of the Hessian eigenvalues at the PCM(IEF)- $\omega\text{B97X-D}/6\text{-31+G(d,p)}$ level (57–59), including non-electrostatic contributions to solvation as implemented in Gaussian09 revision D.01 (60). Each solute was contained in a molecular shaped cavity constructed with Bondi's radii (61). $\omega\text{B97X-D}$ density functional was chosen based on its known superior performance in modeling thio-Michael additions (62). Energies of the highest occupied and lowest unoccupied Kohn-Sham orbitals (ϵ_{HOMO} and ϵ_{LUMO} , respectively) were used to assess global softness S as the inverse of the global chemical hardness η , calculated as follows:

Nitro-conjugated Linoleic Acid and Thiols

$$S^{-1} = \eta = \epsilon_{\text{LUMO}} - \epsilon_{\text{HOMO}} \quad (\text{Eq. 7})$$

The electrophilic Fukui function $f^+(r)$, measuring the propensity of NO_2 -CLA to gain electron density in a nucleophilic attack, was also evaluated for each regioisomer within a finite difference approach (63), as shown in Equation 8,

$$f^+(r) = \rho_{N+1}(r) - \rho_N(r) \quad (\text{Eq. 8})$$

where $\rho_N(r)$ and $\rho_{N+1}(r)$ represent the electron density at each point r around the molecule, respectively, obtained for NO_2 -CLA in the anionic state of reference (N) and after gaining one extra electron at the ground-state geometry ($N + 1$) determined by single-point calculations at the same level of theory. Electrophilic sites were thus inspected by mapping $f^+(r)$ on a molecular surface of 0.0004 au isodensity by using Gaussview5 for generating the molecular graphics represented in Fig. 2 (64). To further assess differences among carbon electrophilic sites within each molecule, condensed Fukui function for each atom A (65) was also obtained by applying a Natural Bond Orbital (NBO) calculation and deriving NPA atomic charges q_A from the corresponding population analysis (66) as expressed in Equation 9,

$$f_A^+ = q_A^{N+1} - q_A^N \quad (\text{Eq. 9})$$

Electrophilic atomic indices (condensed atomic softness, s_A^+) were finally obtained as shown in Equation 10,

$$s_A^+ = S \cdot f_A^+ \quad (\text{Eq. 10})$$

Computational Modeling of the Detailed Mechanism of Thio-Michael Additions at C_β/C_δ Using Representative Model Species—Geometries of the RC, TS, and the anionic intermediate products (I) for the addition of methane thiolate at the C_β/C_δ positions of a representative conjugated nitroolefin moiety (2-nitrohexa-2,4-diene) were fully optimized and verified at the same level of theory as previously applied for NO_2 -CLA 9-/12-regioisomers. IRC reaction paths (67) correspondingly interconnecting them were generated with the HPC algorithm (68). Thermochemistry was calculated at 298 K and 1 atm under the usual statistical thermodynamics approaches (unscaled harmonic vibrational frequencies and rigid rotors) as implemented in Gaussian09 D.01 (60). NPA atomic charges (66) and WBIs (69) were also extracted from the corresponding electronic structures. The structure and relative stability of the tautomeric products further obtained after protonation of the anionic intermediate outcoming from each thiolate direct addition on C_β/C_δ were also characterized at the same level of theory, assessing the corresponding PA as Gibbs free-energy differences between the protonated and deprotonated form of each species. This approach has been recently validated by Taunton and co-workers (70) in an integrated kinetic and computational characterization of thio-Michael adducts established between activated acrylonitriles and β -mercaptoethanol. Molecular graphics representing the 3D structure of the species characterized were prepared with Discovery Studio Visualizer 4.0 (Accelrys). Molecular electrostatic potential was mapped for both nitronate intermediates on a total electronic density

surface of 0.004 au, obtaining graphical representations with Gaussview5 (Semichem Inc.) (64).

LC-MS/MS Analysis of the Reaction between NO_2 -CLA and β -Mercaptoethanol—9- or 12- NO_2 -CLAs (10 μM) were reacted with BME (1.76 mM) in phosphate buffer, pH 7.4, at 25 °C. Aliquots were removed at different time points, and the reaction was stopped by dilution into 2 volumes of either 10% formic acid or 100 mM NEM. Samples were allowed to react for 30 min, diluted in 15 volumes of methanol, and subjected to LC-MS/MS analysis.

LC-MS/MS Analysis of NO_2 -CLA-thiol Conjugates— NO_2 -CLA and its conjugates were resolved by LC via reversed phase chromatography on an analytical C18 Luna column (2 \times 100 mm, 5- μm particle size, Phenomenex) at a 0.65 ml/min flow rate using a water, 0.1% acetic acid (solvent A), and acetonitrile, 0.1% acetic acid (solvent B) solvent system. For BME- NO_2 -CLA experiments, samples were loaded at 35% B for 0.3 min, and then % B was increased to 90% in 9.7 min. At 10 min the column was washed using 100% B for 2 min before equilibrating at 35% B for an additional 3 min. For urinary Cys- NO_2 -CLA measurements, lipid extracts were loaded at 5% B for 0.5 min, and then the organic phase was increased to 35% over 3 min before being increased to 100% in 12 min. The column was washed for 3 min before re-equilibrating at 5% B for 2 min. MS analysis of BME- NO_2 -CLA adducts was performed using an API Qtrap 4000 (Applied Biosystems, Framingham, MA) in the negative ion mode with the following settings: source temperature, 550 °C; curtain gas, 40; ionization spray voltage, -4500; GS1, 40; GS2, 40; declustering potential, -70 V; entrance potential, 4 V; collision energy, -17 and -35 V (BME conjugates and free NO_2 -CLA respectively), and collision cell exit potential, -5 V. Analysis of urinary lipid extracts was performed using an API 5000 (Applied Biosystems) with the following settings: source temperature 650 °C; curtain gas, 50; ionization spray voltage, -4,500; GS1, 55; GS2, 50; declustering potential, -70 V; entrance potential, 4 V; collision energy, -20 and -35 V (cysteine conjugates and free NO_2 -CLA respectively); collision cell exit potential, -5 V. The following transitions (m/z) were used: NO_2 -CLA (324.3 \rightarrow 46), BME- NO_2 -CLA (402.3 \rightarrow 324.3), Cys- NO_2 -CLA (445.3 \rightarrow 120), and $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}$ Cys- NO_2 -CLA (449.3 \rightarrow 124).

LC-UV-Visible Analysis of the Reaction between NO_2 -CLA and BME—High performance liquid chromatography experiments were performed in an Agilent 1260 Infinity instrument. 9- NO_2 -CLA (100 μM) was mixed with BME (1.76 mM) in phosphate buffer at 25 °C. At increasing times (10 s, 5 min, and 1 h), aliquots (70 μl) were mixed with 50% acetonitrile, 10% formic acid (140 μl). Samples (150 μl) were injected in a C18 column (Zorbax Eclipse Plus C18, 4.36 \times 100 mm; 3.5 μm) and resolved using a linear gradient from 35 to 90% solution B in 19 min at a flow rate of 1 ml/min (solution B, acetonitrile, 0.1% acetic acid; solution A, H_2O , 0.1% acetic acid). The absorbance was registered using a diode array detector.

Determination of Non-covalent NO_2 -CLA Binding to HSA—Increasing concentrations of thiol-blocked delipidated or lipitated HSA (0.2–10 μM) were mixed with NO_2 -CLA (10 μM) in phosphate buffer, and the UV-Visible spectra

were recorded. Control procedures were performed in the absence of NO₂-CLA.

Reaction between NO₂-CLA and HSA Thiol—Lipidated reduced HSA (50 μM) was mixed with NO₂-CLA (300 μM) or an equivalent volume of methanol (control) and incubated for 1 h (25 °C, pH 7.4). The samples were gel filtrated to remove excess NO₂-CLA, and protein concentration was determined using both absorbance measurements at 279 nm and the bicinchoninic acid assay (71). The remaining free thiols were quantified using DTDP (215 μM). Protein was first removed via ultrafiltration. Thiopyridone concentration was determined at 324 nm ($\epsilon = 21,400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (50) in the ultrafiltrate after baseline subtraction.

Nitroalkene Fatty Acid Extraction from Human Urine—Urine samples were collected from healthy human volunteers and used immediately (2) (University of Pittsburgh IRB PRO07110032). Briefly, C18 SEPAK columns were conditioned with 1 column volume of 100% methanol and equilibrated with 2 volumes of 10% methanol, and 5 ml of urine were loaded. Columns were then washed with 2 volumes of 10% methanol and dried under vacuum, and lipids eluted with 1 volume of methanol. The solvent was evaporated, and the samples were resuspended in 100 μl of methanol for LC-MS/MS analysis.

Data Processing—Data were plotted and analyzed using OriginPro 8.0 (OriginLab) or Prism 6 (GraphPad). Unless specified, results are expressed as the means ± S.E. of independent experiments.

Author Contributions—L. T. and D. A. V. prepared the manuscript, contributed to writing, designed, performed, and analyzed experiments. L. L. performed experiments. E. L. C. designed, performed, and analyzed (with the assistance of C. S. in characterizing 12/9-NO₂-CLA local softness) computational modeling and wrote the corresponding sections of the manuscript. M. N. M. designed and performed LC-UV-Visible experiments. S. R. S. contributed to LC-MS/MS method development. S. R. W. synthesized nitrated fatty acids. B. A. and F. J. S. contributed to the overall concept, experimental design, data interpretation, and manuscript preparation. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Acknowledgments—We are grateful to Jenner Bonanata for technical assistance and to Andrés Abella (Universidad de la República) for help with the mathematics of the kinetic analysis.

References

- Delmastro-Greenwood, M., Hughan, K. S., Vitturi, D. A., Salvatore, S. R., Grimes, G., Potti, G., Shiva, S., Schopfer, F. J., Gladwin, M. T., Freeman, B. A., and Gelhaus Wendell, S. (2015) Nitrite and nitrate-dependent generation of anti-inflammatory fatty acid nitroalkenes. *Free Radic. Biol. Med.* **89**, 333–341
- Salvatore, S. R., Vitturi, D. A., Baker, P. R., Bonacci, G., Koenitzer, J. R., Woodcock, S. R., Freeman, B. A., and Schopfer, F. J. (2013) Characterization and quantification of endogenous fatty acid nitroalkene metabolites in human urine. *J. Lipid Res.* **54**, 1998–2009
- Vitturi, D. A., Minarrieta, L., Salvatore, S. R., Postlethwait, E. M., Fazzari, M., Ferrer-Sueta, G., Lancaster, J. R., Jr, Freeman, B. A., and Schopfer, F. J. (2015) Convergence of biological nitration and nitrosation via symmetrical nitrous anhydride. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 504–510
- Schopfer, F. J., Cipollina, C., and Freeman, B. A. (2011) Formation and signaling actions of electrophilic lipids. *Chem. Rev.* **111**, 5997–6021
- Vitturi, D. A., Chen, C. S., Woodcock, S. R., Salvatore, S. R., Bonacci, G., Koenitzer, J. R., Stewart, N. A., Wakabayashi, N., Kensler, T. W., Freeman, B. A., and Schopfer, F. J. (2013) Modulation of nitro-fatty acid signaling: prostaglandin reductase-1 is a nitroalkene reductase. *J. Biol. Chem.* **288**, 25626–25637
- Delmastro-Greenwood, M., Freeman, B. A., and Wendell, S. G. (2014) Redox-dependent anti-inflammatory signaling actions of unsaturated fatty acids. *Annu. Rev. Physiol.* **76**, 79–105
- Kelley, E. E., Baust, J., Bonacci, G., Golin-Bisello, F., Devlin, J. E., St Croix, C. M., Watkins, S. C., Gor, S., Cantu-Medellin, N., Weidert, E. R., Frisbee, J. C., Gladwin, M. T., Champion, H. C., Freeman, B. A., and Khoo, N. K. (2014) Fatty acid nitroalkenes ameliorate glucose intolerance and pulmonary hypertension in high-fat diet-induced obesity. *Cardiovasc. Res.* **101**, 352–363
- Liu, H., Jia, Z., Jia, Z., Soodvilai, S., Guan, G., Wang, M. H., Dong, Z., Symons, J. D., and Yang, T. (2008) Nitro-oleic acid protects the mouse kidney from ischemia and reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **295**, F942–F949
- Rudolph, T. K., Rudolph, V., Edreira, M. M., Cole, M. P., Bonacci, G., Schopfer, F. J., Woodcock, S. R., Franek, A., Pekarova, M., Khoo, N. K., Hastay, A. H., Baldus, S., and Freeman, B. A. (2010) Nitro-fatty acids reduce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 938–945
- Rudolph, V., Rudolph, T. K., Schopfer, F. J., Bonacci, G., Woodcock, S. R., Cole, M. P., Baker, P. R., Ramani, R., and Freeman, B. A. (2010) Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc. Res.* **85**, 155–166
- Schopfer, F. J., Cole, M. P., Groeger, A. L., Chen, C. S., Khoo, N. K., Woodcock, S. R., Golin-Bisello, F., Motanya, U. N., Li, Y., Zhang, J., Garcia-Barrio, M. T., Rudolph, T. K., Rudolph, V., Bonacci, G., Baker, P. R., et al. (2010) Covalent peroxisome proliferator-activated receptor γ adduction by nitro-fatty acids: selective ligand activity and anti-diabetic signaling actions. *J. Biol. Chem.* **285**, 12321–12333
- Villacorta, L., Chang, L., Salvatore, S. R., Ichikawa, T., Zhang, J., Petrovic-Djergovic, D., Jia, L., Carlsen, H., Schopfer, F. J., Freeman, B. A., and Chen, Y. E. (2013) Electrophilic nitro-fatty acids inhibit vascular inflammation by disrupting LPS-dependent TLR4 signalling in lipid rafts. *Cardiovasc. Res.* **98**, 116–124
- Wang, H., Liu, H., Jia, Z., Jia, Z., Olsen, C., Litwin, S., Guan, G., and Yang, T. (2010) Nitro-oleic acid protects against endotoxin-induced endotoxaemia and multiorgan injury in mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **298**, F754–F762
- Charles, R. L., Rudyk, O., Pryszyzhna, O., Kamynina, A., Yang, J., Morisseau, C., Hammock, B. D., Freeman, B. A., and Eaton, P. (2014) Protection from hypertension in mice by the Mediterranean diet is mediated by nitro fatty acid inhibition of soluble epoxide hydrolase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 8167–8172
- Fazzari, M., Trostchansky, A., Schopfer, F. J., Salvatore, S. R., Sánchez-Calvo, B., Vitturi, D., Valderrama, R., Barroso, J. B., Radi, R., Freeman, B. A., and Rubbo, H. (2014) Olives and olive oil are sources of electrophilic fatty acid nitroalkenes. *PLoS ONE* **9**, e84884
- Fox, R. J., Miller, D. H., Phillips, J. T., Hutchinson, M., Havrdova, E., Kita, M., Yang, M., Raghupathi, K., Novas, M., Sweetser, M. T., Vigiotta, V., Dawson, K. T., and CONFIRM Study Investigators (2012) Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1087–1097
- Gold, R., Kappos, L., Arnold, D. L., Bar-Or, A., Giovannoni, G., Selmaj, K., Tornatore, C., Sweetser, M. T., Yang, M., Sheikh, S. I., Dawson, K. T., and DEFINE Study Investigators (2012) Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1098–1107
- Hansen, R. E., Roth, D., and Winther, J. R. (2009) Quantifying the global cellular thiol-disulfide status. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 422–427
- Requejo, R., Hurd, T. R., Costa, N. J., and Murphy, M. P. (2010) Cysteine residues exposed on protein surfaces are the dominant intramitochondrial thiol and may protect against oxidative damage. *FEBS J.* **277**, 1465–1480

Nitro-conjugated Linoleic Acid and Thiols

20. Gutscher, M., Pauleau, A. L., Marty, L., Brach, T., Wabnitz, G. H., Samstag, Y., Meyer, A. J., and Dick, T. P. (2008) Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nat. Methods* **5**, 553–559
21. Østergaard, H., Tachibana, C., and Winther, J. R. (2004) Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol. *J. Cell Biol.* **166**, 337–345
22. Turell, L., Radi, R., and Alvarez, B. (2013) The thiol pool in human plasma: the central contribution of albumin to redox processes. *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 244–253
23. Bernasconi, C. F., and Killion, R. B. (1988) High intrinsic rate constant and large imbalances in the thiolate ion addition to substituted α -nitrostilbenes. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 7506–7512
24. Cann, P. F., and Stirling, C. J. (1974) Elimination and addition reactions. Part XXIII. Mechanisms of elimination in nitro-compounds bearing phenoxy and phenylthio leaving groups. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 820–823
25. Fishbein, J. C., and Jencks, W. P. (1988) Elimination reactions of b -cyano thioethers. Evidence for a carbanion intermediate and a change in rate-limiting step. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 5075–5086
26. Friedman, M., Cavins, J. F., and Wall, J. S. (1965) Relative nucleophilic reactivities of amino groups and mercaptide ions in addition reactions with α , β -unsaturated compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 3672–3682
27. Bonacci, G., Baker, P. R., Salvatore, S. R., Shores, D., Khoo, N. K., Koenitzer, J. R., Vitturi, D. A., Woodcock, S. R., Golin-Bisello, F., Cole, M. P., Watkins, S., St Croix, C., Batthyany, C. I., Freeman, B. A., and Schopfer, F. J. (2012) Conjugated linoleic acid is a preferential substrate for fatty acid nitration. *J. Biol. Chem.* **287**, 44071–44082
28. Alexander, R. L., Bates, D. J., Wright, M. W., King, S. B., and Morrow, C. S. (2006) Modulation of nitrated lipid signaling by multidrug resistance protein 1 (MRP1): glutathione conjugation and MRP1-mediated efflux inhibit nitro-linoleic acid-induced, PPAR γ -dependent transcription activation. *Biochemistry* **45**, 7889–7896
29. Baker, L. M., Baker, P. R., Golin-Bisello, F., Schopfer, F. J., Fink, M., Woodcock, S. R., Branchaud, B. P., Radi, R., and Freeman, B. A. (2007) Nitro-fatty acid reaction with glutathione and cysteine. Kinetic analysis of thiol alkylation by a Michael addition reaction. *J. Biol. Chem.* **282**, 31085–31093
30. Fersht, A. (1999) *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*, pp. 150–153, W. H. Freeman & Co., New York
31. Fierke, C. A., and Hammes, G. G. (1995) Transient kinetic approaches to enzyme mechanisms. *Methods Enzymol.* **249**, 3–37
32. Baker, P. R., Lin, Y., Schopfer, F. J., Woodcock, S. R., Groeger, A. L., Batthyany, C., Sweeney, S., Long, M. H., Iles, K. E., Baker, L. M., Branchaud, B. P., Chen, Y. E., and Freeman, B. A. (2005) Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: multiple nitrated unsaturated fatty acid derivatives exist in human blood and urine and serve as endogenous peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *J. Biol. Chem.* **280**, 42464–42475
33. Schopfer, F. J., Batthyany, C., Baker, P. R., Bonacci, G., Cole, M. P., Rudolph, V., Groeger, A. L., Rudolph, T. K., Nadochiy, S., Brookes, P. S., and Freeman, B. A. (2009) Detection and quantification of protein adduction by electrophilic fatty acids: mitochondrial generation of fatty acid nitroalkene derivatives. *Free Radic. Biol. Med.* **46**, 1250–1259
34. Rudolph, V., Schopfer, F. J., Khoo, N. K., Rudolph, T. K., Cole, M. P., Woodcock, S. R., Bonacci, G., Groeger, A. L., Golin-Bisello, F., Chen, C. S., Baker, P. R., and Freeman, B. A. (2009) Nitro-fatty acid metabolome: saturation, desaturation, β -oxidation, and protein adduction. *J. Biol. Chem.* **284**, 1461–1473
35. Bednar, R. A. (1990) Reactivity and pH dependence of thiol conjugation to N -ethylmaleimide: detection of a conformational change in chalcone isomerase. *Biochemistry* **29**, 3684–3690
36. Portillo-Ledesma, S., Sardi, F., Manta, B., Tourn, M. V., Clippe, A., Knoops, B., Alvarez, B., Coitiño, E. L., and Ferrer-Sueta, G. (2014) Deconstructing the catalytic efficiency of peroxiredoxin-5 peroxidic cysteine. *Biochemistry* **53**, 6113–6125
37. Espenson, J. H. (1995) *Chemical Kinetics and Reaction Mechanisms*, 2nd Ed., pp. 142–145, McGraw Hill, Inc., New York
38. Mulliner, D., Wondrousch, D., and Schüürmann, G. (2011) Predicting Michael-acceptor reactivity and toxicity through quantum chemical transition-state calculations. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 8400–8412
39. Thomas, B. E., and Kollman, P. A. (1995) An *ab initio* molecular orbital study of the first step of the catalytic mechanism of thymidylate synthase: the Michael addition of sulfur and oxygen nucleophiles. *J. Org. Chem.* **60**, 8375–8381
40. Krenske, E. H., Petter, R. C., Zhu, Z., and Houk, K. N. (2011) Transition states and energetics of nucleophilic additions of thiols to substituted α,β -unsaturated ketones: substituent effects involve enone stabilization, product branching, and solvation. *J. Org. Chem.* **76**, 5074–5081
41. Bernasconi, C. F. (1991) in *Advances in Physical Organic Chemistry* (Bethell, D., ed) pp. 119–238, Academic Press
42. Ando, K., Shimazu, Y., Seki, N., and Yamataka, H. (2011) Kinetic study of proton-transfer reactions of phenylnitromethanes. Implication for the origin of nitroalkane anomaly. *J. Org. Chem.* **76**, 3937–3945
43. Bernasconi, C. F., Kliner, D. A. V., Mullin, A. S., and Ni, J. X. (1988) Kinetics of ionization of nitromethane and phenylnitromethane by amines and carboxylate ions in Me₂SO water mixtures—evidence of ammonium ion nitronate ion hydrogen-bonded complex-formation in Me₂SO-rich solvent mixtures. *J. Org. Chem.* **53**, 3342–3351
44. Moutiers, G., Thuet, V., and Terrier, F. (1997) The nitroalkane behaviour of (4-nitrophenyl)nitromethane: a kinetic and structural study in H₂O-Me₂SO mixtures. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1479–1486
45. Sato, M., Kitamura, Y., Yoshimura, N., and Yamataka, H. (2009) Proton-transfer reactions of nitroalkanes: the role of aci-nitro species. *J. Org. Chem.* **74**, 1268–1274
46. Peters, T. (1996) *All About Albumin. Biochemistry, Genetics and Medical Applications*, pp. 79–95, Academic Press, San Diego
47. Bell, R. P., and Goodall, D. M. (1966) Kinetic hydrogen isotope effects in the ionization of some nitroparaffins. *Proc. R. Soc. Lond. A Math. Phys. Sci.* **294**, 273–297
48. Ramsay, E. E., and Dilda, P. J. (2014) Glutathione S -conjugates as prodrugs to target drug-resistant tumors. *Front. Pharmacol.* **5**, 181
49. Turell, L., Botti, H., Carballal, S., Ferrer-Sueta, G., Souza, J. M., Durán, R., Freeman, B. A., Radi, R., and Alvarez, B. (2008) Reactivity of sulfenic acid in human serum albumin. *Biochemistry* **47**, 358–367
50. Rieger, C. K., Kada, G., and Gruber, H. J. (2002) Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal. Bioanal. Chem.* **373**, 266–276
51. Woodcock, S. R., Bonacci, G., Gelhaus, S. L., and Schopfer, F. J. (2013) Nitrated fatty acids: synthesis and measurement. *Free Radic. Biol. Med.* **59**, 14–26
52. Woodcock, S. R., Salvatore, S. R., Bonacci, G., Schopfer, F. J., and Freeman, B. A. (2014) Biomimetic nitration of conjugated linoleic acid: formation and characterization of naturally occurring conjugated nitrodienes. *J. Org. Chem.* **79**, 25–33
53. Chen, R. F. (1967) Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment. *J. Biol. Chem.* **242**, 173–181
54. Alvarez, B., Carballal, S., Turell, L., and Radi, R. (2010) Formation and reactions of sulfenic acid in human serum albumin. *Methods Enzymol.* **473**, 117–136
55. Ellis, K. J., and Morrison, J. F. (1982) Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes. *Methods Enzymol.* **87**, 405–426
56. Jencks, W. P., and Salvesen, K. (1971) Equilibrium deuterium isotope effects on the ionization of thiol acids. *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 4433–4436
57. Chai, J. D., and Head-Gordon, M. (2008) Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom-atom dispersion corrections. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10**, 6615–6620
58. Ditchfield, R., Hehre, W. J., and Pople, J. A. (1971) Self-consistent molecular-orbital methods. IX. An extended Gaussian-type basis for molecular-orbital studies of organic molecules. *J. Chem. Phys.* **54**, 724–728
59. Tomasi, J. (2011) Selected features of the polarizable continuum model for the representation of solvation. *Wiley Int. Rev. Comput. Mol. Sci.* **1**, 855–867
60. Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov,

- A. F., et al. (2013) *Gaussian 09*, Revision D.01 Ed., Gaussian, Inc., Wallingford, CT
61. Bondi, A. (1964) van der Waals volumes and radii. *J. Phys. Chem.* **68**, 441–451
 62. Smith, J. M., Jami Alahmadi, Y., and Rowley, C. N. (2013) Range-separated DFT functionals are necessary to model Thio-Michael additions. *J. Chem. Theory Comput.* **9**, 4860–4865
 63. Geerlings, P., De Proft, F., and Langenaeker, W. (2003) Conceptual density functional theory. *Chem. Rev.* **103**, 1793–1873
 64. Dennington, R., Keith, T., and Millam, J. (2009) *GaussView*, Version 5, Semichem Inc., Shawnee Mission, KS
 65. Yang, W., and Mortier, W. J. (1986) The use of global and local molecular parameters for the analysis of the gas-phase basicity of amines. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 5708–5711
 66. Glendening, E. D., Landis, C. R., and Weinhold, F. (2012) Natural bond orbital methods. *Wires Comput. Mol. Sci.* **2**, 1–42
 67. Fukui, K. (1981) The path of chemical reactions—the IRC approach. *Acc. Chem. Res.* **14**, 363–368
 68. Hratchian, H. P., and Schlegel, H. B. (2005) Using Hessian updating to increase the efficiency of a Hessian based predictor-corrector reaction path following method. *J. Chem. Theory Comput.* **1**, 61–69
 69. Wiberg, K. B. (1968) Application of the Pople-Santry-Segal CNDO method to the cyclopropylcarbinyl and cyclobutyl cation and to bicyclobutane. *Tetrahedron* **24**, 1083–1096
 70. Krishnan, S., Miller, R. M., Tian, B., Mullins, R. D., Jacobson, M. P., and Taunton, J. (2014) Design of reversible, cysteine-targeted Michael acceptors guided by kinetic and computational analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 12624–12630
 71. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76–85

The Chemical Basis of Thiol Addition to Nitro-conjugated Linoleic Acid, a Protective Cell-signaling Lipid

Lucía Turell, Darío A. Vitturi, E. Laura Coitiño, Lourdes Lebrato, Matías N. Möller, Camila Sagasti, Sonia R. Salvatore, Steven R. Woodcock, Beatriz Alvarez and Francisco J. Schopfer

J. Biol. Chem. 2017, 292:1145-1159.

doi: 10.1074/jbc.M116.756288 originally published online December 6, 2016

Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M116.756288](https://doi.org/10.1074/jbc.M116.756288)

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

Supplemental material:

<http://www.jbc.org/content/suppl/2016/12/06/M116.756288.DC1>

This article cites 65 references, 12 of which can be accessed free at <http://www.jbc.org/content/292/4/1145.full.html#ref-list-1>