

MARÍLIA MEIRA DIAS

A S-NITROSAÇÃO DO mTORC1 REDUZ A
PROLIFERAÇÃO DE LINHAGENS TUMORAIS
HUMANAS

Campinas

2012

A S-NITROSAÇÃO DO mTOR REDUZ A PROLIFERAÇÃO DE LINHAGENS TUMORAIS HUMANAS

MARÍLIA MEIRA DIAS

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas – UNICAMP – para Obtenção de título de
Doutor em Ciências, sob orientação do Prof. Dr. José
Barreto Campello Carvalheira e co-orientação do Prof. Dr.
Marcelo Ganzarolli de Oliveira.*

CAMPINAS
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

D543s Dias, Marília Meira, 1984 -
 A S-Nitrosação do mTORC1 reduz a proliferação de
 linhagens tumorais humanas / Marília Meira Dias. --
 Campinas, SP : [s.n.], 2012.

 Orientador : Jose Barreto Campello Carvalheira.
 Coorientador : Marcelo Ganzarolli de Oliveira.
 Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
 Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

 1. Câncer. 2. Óxido nítrico. 3. Células. I.
 Carvalheira, Jose Barreto Campello. II. Oliveira,
 Marcelo Ganzarolli de. III. Universidade Estadual de
 Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: S-nitrosation of mTORC1 reduces cancer cell proliferation.

Palavras-chave em inglês:

Cancer

Nitric oxide

Cells

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Jose Barreto Campello Carvalheira [Orientador]

Francisco Rafael Martins Laurindo

José Andrés Yunes

Roger Chammas

Sara Teresinha Ollala Saad

Data da defesa: 24-02-2012

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

Banca examinadora de Tese de Doutorado

Marília Meira Dias

Orientador: Prof. Dr. Jose Barreto Campello Carvalheira

Membros:
Professor (a) Doutor (a) Francisco Rafael Martins Laurindo
Professor (a) Doutor (a) Roger Chammas - USP
Professor (a) Doutor (a) José Andrés Yunes
Professor (a) Doutor (a) Sara Teresinha Olalla Saad
Professor (a) Doutor (a) Jose Barreto Campello Carvalheira

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 24/02/2012

DEDICATÓRIA

*Este trabalho é dedicado aos meus pais, Acácio e
Carmenia, aos meus irmãos, Olívia e Felipe, e ao meu
querido Guilherme.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer inicialmente a Deus por me iluminar e guiar meus caminhos e principalmente por ter permitido a vida, vida esta que não apenas dá nome à minha profissão como é também meu “objeto” de estudo.

Agradeço imensamente aos meus queridos pais, Acácio e Carmenia, pela dedicação incondicional de suas vidas aos filhos. Vocês são meus grandes exemplos de garra, honestidade, humildade e perseverança. Agradeço especialmente às orações da minha mãe, fundamentais para que os experimentos funcionassem mesmo que não compreendesse bem as razões de sua torcida! Agradeço também aos meus irmãos por cada segundo compartilhado, pelas brigas, risadas e pelos momentos de cumplicidade. É impossível traduzir em palavras o amor que sinto por vocês!

Agradeço a toda a minha família pela torcida e pelo apoio a uma bióloga convicta e apaixonada que nem sempre se faz entender em meio a tantas proteínas de nomes por vezes impronunciáveis, vias de sinalização, plasmídeos e Western blots!

Agradeço ao meu querido Guilherme pela parceria, dedicação, carinho, paciência e por ser o meu porto seguro incondicional no laboratório e na vida. Poder contar com o seu sorriso é um privilégio.

Agradeço aos meus amigos Nana, Dudi, Joe, Birr e Rafão pela amizade e histórias compartilhadas desde os tempos da escola. Obrigada por fazerem os meus dias mais felizes, por serem apoio incondicional nos momentos difíceis e por aceitarem ser testemunhas e torcedores da minha vida. Crescer com vocês é uma honra!

Agradeço aos meus amigos da BIO UNICAMP pela companhia ao longo dos quatro anos da graduação. Com vocês dividi sonhos, convivi em salas de aula, laboratórios, bandejões, praias, matas e montanhas e aprendi a respeitar opiniões e ideais tão diversos! A presença de vocês tornou as chuvas menos geladas e o colchonete das sempre improvisadas barracas mais confortáveis!

Agradeço aos meus professores que me ensinaram a ler e escrever, que se dedicaram para que pudesse escolher o melhor caminho profissional, que torceram para que concretizasse sonhos e que foram meus exemplos de desprendimento e amor à profissão.

Agradeço ao meu orientador, José Barreto, pelas discussões científicas e por me aceitar como aluna desde a iniciação científica, quando me descobri irreversivelmente apaixonada pela ciência e por laboratórios.

Agradeço ainda ao meu co-orientador, Marcelo Ganzarolli de Oliveira, pelas sugestões e cooperação durante a realização do trabalho.

Agradeço ao Prof. Mario José Abdalla Saad por disponibilizar o laboratório de forma tão generosa e por me ensinar que a pesquisa é feita com parcerias e portas abertas.

Agradeço com carinho especial à minha amiga Dioze por cada conversa, sorriso, lágrimas, pelas experiências e experimentos! Você é o meu exemplo de competência, equilíbrio, paciência e doação.

Agradeço aos meus queridos amigos do laboratório Alexandre (amigo de almoço, de açaí e dos momentos mais difíceis), Bruno, Natália (ah, o PBS!), Verônica, Angélica e Francine pelo companheirismo e por entenderem (ou pelo menos tentarem entender) as minhas manias de organização e limpeza (eu não tenho TOC!). Com vocês os dias no laboratório são mais divertidos e até os filmes queimados de Western blot ficam mais bonitos!

Agradeço também à minha amiga e irmã Gabi (Cabeção!) pela GSNO sempre linda, fresca e rosa, pelas risadas, pelos sonhos malucos, pelas conversas luminosas e por ser prova concreta de que é possível ser chique e fashion mesmo trabalhando com jaleco, sapato fechado e cabelo preso.

Agradeço à Sandra e ao André, pelas discussões científicas, por abrirem as portas de seus laboratórios de forma tão generosa e por me ajudarem a trilhar novos caminhos.

Agradeço aos meus colegas de trabalho pelas experiências trocadas, pelas conversas e convivência diária.

Agradeço aos funcionários e amigos Senhor Luís e Senhor Jósimo pela dedicação em nos ajudar em cada experimento, na preparação de reagentes e na resolução dos problemas (seja a troca de um parafuso da autoclave ou o conserto do ar condicionado)! Ao meu querido Gerson pelas

conversas, risadas e por cada “não!” e “acabou” que depois de alguns segundos sempre se transformavam em “sim”!

Agradeço às agências de fomento que permitiram que esse trabalho fosse desenvolvido: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Agradeço também à UNICAMP por ter me acolhido desde a graduação.

E finalmente agradeço a todos os apaixonados, malucos e sonhadores que acreditam poder mudar o mundo. Vocês são os responsáveis por tornar a vida mais bonita. E ao poeta Fernando Pessoa pela inspiração das palavras abaixo:

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”*

RESUMO

A S-nitrosação é uma modificação pós-traducional dinâmica e reversível de proteínas que controla importantes funções celulares através da alteração de resíduos tióis de cisteínas pelo óxido nítrico (NO). Assim como a fosforilação, a S-nitrosação é capaz de alterar a conformação, a atividade e a função de proteínas e contribui em grande parte para a influência ubíqua do NO nas vias de transdução de sinal celulares. Inúmeras evidências apontam para um papel crucial da S-nitrosação não apenas na fisiologia dos organismos, mas também em inúmeras doenças humanas, entre elas o câncer. Entretanto, trata-se de um mecanismo ainda pouco explorado de modulação de proteínas envolvidas com a progressão tumoral, como as presentes na via do mTOR. Assim, o objetivo do trabalho é analisar os mecanismos pelos quais o NO afeta a função do mTOR.

A análise da S-nitrosação do mTOR foi realizada através do *Biotin Switch Method* e demonstra que o doador exógeno de NO, GSNO, aumenta os níveis de mTOR S-nitrosada. Além disso, a GSNO reduz a fosforilação das proteínas mTOR, p70S6K e 4EBP-1 de forma tempo- e dose-dependente. A fosforilação da proteína p70S6K, reduzida pela exposição ao NO, é restaurada pela adição do agente redutor e denitrosante DTT. Entretanto, o pré-tratamento das linhagens celulares PC-3, DU145 e MCF-7 com o inibidor da guanilil ciclase, ODQ, ou com o sequestrador de NO livre, PTIO, não reverte o efeito da GSNO na fosforilação das proteínas mTOR, p70S6K e 4EBP-1, corroborando a hipótese de que o mTORC1 é modulado por S-nitrosação. A viabilidade das linhagens tumorais humanas PC3, DU145, MDA-MB-468, MCF-7, HT-29, CACO-2 e A549 também diminui após exposição aos doadores de NO, sendo observada redução da proliferação e aumento da morte celular. As linhagens

PC-3, MCF-7 e MDA-MB-468, que apresentam mutações ativadoras na cascata de sinalização PI3K-mTOR, são mais sensíveis à presença do NO.

Assim, a S-nitrosação do mTORC1 é uma importante modificação pós-traducional capaz de modular a atividade quinase da proteína mTOR e reduzir a proliferação de células tumorais humanas, apresentando potenciais implicações terapêuticas.

ABSTRACT

S-Nitrosation is a dynamic and reversible post-translational modification of proteins that controls important cellular functions through the modification of cysteine thiol side chains by nitric oxide (NO). mTOR signaling pathway deregulation is involved in various cancer types and contributes to cancer cell proliferation as well as growth factor independence. The aim of this work was to analyze the mechanisms by which *S*-nitrosogluthatione (GSNO) affects mTOR function. *S*-nitrosation of mTOR was assessed by the Biotin Switch Method. GSNO was shown to *S*-nitrosate mTOR with a consequent time- and dose-dependent decrease in the phosphorylation of mTOR and S6K proteins, which were reversed by the addition of the denitrosating agent DTT. Pre-treatments of cells with the inhibitor of soluble guanylyl cyclase, ODQ, or with the NO scavenger, PTIO, had no effect on the GSNO-mediated decrease in phosphorylation of mTOR and its substrates p70S6K and 4EBP-1. Results also demonstrated that cancer cell line viability decreased after exposure to the NO donors GSNO and *S*-nitroso-N-acetyl-cysteine (SNAC), altering proliferation and increasing cell death. PC-3, MCF-7 and MDA-MB-468 cell lines, which have mutations in the PI3K-mTOR pathway, showed a greater response to GSNO. Therefore, *S*-nitrosation is a novel post-translational modification capable of modulating mTOR activity, with possible therapeutic implications.

LISTA DE ABREVIATURAS

4E-BP1	<i>eIF4E-binding protein 1</i>	Proteína 1 associada ao eIF4E
ADH3	<i>S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase</i>	
AGC	<i>cAMP-dependent, cGMP-dependent and protein kinase C</i>	
AMP	<i>Adenosine monophosphate</i>	Monofosfato de adenosina
AMPK	<i>5'AMP-activated protein kinase</i>	Proteína quinase ativada por AMP
ATG13	<i>Autophagy-related 13</i>	Proteína 13 relacionada à autofagia
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>	Trifosfato de adenosina
CBP80	<i>80kDa nuclear cap-binding protein</i>	Proteína nuclear cap-associada de 80kDa
cNOS	<i>Constitutive NOS</i>	NOS constitutivas
DEPTOR	<i>DEP domain-containing mTOR-interacting protein</i>	Proteína contendo domínio DEP que interage com a mTOR
EDRF	<i>Endothelium-derived relaxing factor</i>	Fator de relaxamento derivado do endotélio
eEF2K	<i>Eukaryotic elongation factor 2 kinase</i>	Quinase do fator 2 de elongação em eucariotos
eIF4E	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i>	Fator 4E de iniciação da tradução em eucariotos
eNOS	<i>Endothelial NOS</i>	NOS endotelial
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>	Quinase regulada por sinal extracelular
FAS	<i>Fatty acid synthase</i>	Sintetase de ácidos graxos
FIP200	<i>200kDa FAK family kinase-interacting protein</i>	Proteína que interage com a quinases da

		família FAK de 200kDa
FKBP12	<i>12kDa FK506-binding protein</i>	Proteína associada à FK506 de 12kDa
FOXO	<i>Forkhead family of transcription factors</i>	
FOXO1	<i>Forkhead box protein O1</i>	
GAP	<i>GTPase activating protein</i>	Proteína ativadora de GTPase
GDP	<i>Guanosine diphosphate</i>	Difosfato de guanosina
GSK3 β	<i>Glycogen synthase kinase 3β</i>	Quinase 3 β sintetase de glicogênioGDP
GSNO	<i>S-nitrosogluthatione</i>	S-nitrosoglutationa
GTP	<i>Guanosine triphosphate</i>	Trifosfato de guanosina
Hsp90	<i>Heat-shock protein 90</i>	
HIF1 α	<i>Hypoxia-inducible factor 1α</i>	Fator 1 α induzido por hipóxia
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>	Fator de crescimento análogo à insulina
IGFR	<i>Insulin-like growth factor receptor</i>	Receptor do fator de crescimento análogo à insulina
iNOS	<i>Inducible NOS</i>	NOS induzível
IR	<i>Insulin receptor</i>	Receptor de insulina
IRS1	<i>Insulin receptor substrate 1</i>	Substrato 1 do receptor de insulina
MAP4K3	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3</i>	
mLST8	<i>mammalian lethal with SEC13 protein 8</i>	
MP1	<i>MAPK scaffold protein 1</i>	
mSIN1	<i>mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1</i>	
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>	Alvo mecânico da rapamicina
mTORC1	<i>mTOR complex 1</i>	Complexo 1 do mTOR
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e

		adenina
nNOS	<i>Neuronal NOS</i>	NOS neuronal
NO	<i>Nitric oxide</i>	Óxido nítrico
NOS	<i>NO synthase</i>	Sintetase do NO
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>	Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas
PDK1	<i>Phosphoinositide-dependent protein kinase 1</i>	Proteína quinases 1 dependente de fosfoinosítídeo
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>	Quinase do fosfoinosítídeo 3
PRAS40	<i>40kDa Pro-rich Akt substrate</i>	Subtrato da Akt rico em prolina de 40kDa
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homologue</i>	Proteína homóloga à fosfatase e à tensina
PROTOR1	<i>Protein observed with RICTOR 1</i>	Proteína observada com RICTOR 1
RAPTOR	<i>Regulatory-associated protein of mTOR</i>	Proteína do mTOR associada ao domínio regulatório
RICTOR	<i>Rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>	Companhia da mTOR insensível à rapamicina
RHEB	<i>Ras homologue enriched in brain</i>	GTPase homóloga de Ras enriquecida em cérebro
RNAPI	<i>RNA polymerase I</i>	Polimerase I do RNA
RNAi		RNA de interferência
RNA _m		RNA mensageiro
RNA _r		RNA ribossomal
Rom2	<i>Rho1 GDP-GTP exchange protein 2</i>	
p70S6K1	<i>S6 kinase 1</i>	Quinase 1 da S6
SGK	<i>Serum- and glucocorticoid-regulated kinase</i>	
STE20	<i>Sterile 20</i>	
TSC	<i>Tuberous sclerosis complex</i>	Complexo

		esclerosa tuberosa
ULK1	<i>Unc-51-like kinase 1</i>	
VPS34	<i>PI3K catalytic subunit type 3</i>	Subunidade catalítica tipo 3 da PI3K

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema dos componentes dos complexos mTORC1 e mTORC2. Os complexos mTORC1 e mTORC2 apresentam em comum as proteínas mTOR, mLST8 (G β L) e DEPTOR. As proteínas RAPTOR e PRAS40 compõem exclusivamente o complexo mTORC1; RICTOR, mSIN1 e PROTOR são específicas do complexo mTORC2..... 23

Figura 2. O complexo mTORC1 atua como integrador de sinais. A integração de sinais pelo mTORC1 baseia-se na regulação de suas interações físicas e de sua localização. Fatores de crescimento favorecem a ativação da Rheb, induzindo sua ligação física com mTORC1. Os aminoácidos, por sua vez, geram o deslocamento do mTORC1 mediado pela Rag para a endomembrana lisossomal, onde a proteína Rheb reside; **a)** Na ausência de aminoácidos e fatores de crescimento, Rag e Rheb GTPases encontram-se inativas e o mTORC1 é fisicamente dissociado de Rheb; **b)** Fatores de crescimento ativam a Rheb, mas os aminoácidos necessários para a interação do mTORC1 com Rheb estão ausentes e mTORC1 permanece inativo; **c)** Aminoácidos ativam as Rags, recrutando o mTORC1 e permitindo sua interação com Rheb. Entretanto, na ausência de fatores de crescimento, Rheb encontra-se inativa, assim como mTORC1; **d)** Na presença de aminoácidos e fatores de crescimento, mTORC1 é recrutado para Rheb ativa e, portanto, ativado; **e)** Se o mTORC1 encontra-se ativo, o aumento na concentração de aminoácidos e fatores de crescimento contribuem para maior ativação do complexo; **f)** A hiperexpressão de Rheb ou localização forçada de mTORC1 na membrana lisossomal tornam desnecessária o recrutamento de mTORC1 mediado pela Rag, permitindo a ativação do complexo mesmo na ausência de aminoácidos..... 29

Figura 3. O mTOR regula processos celulares que apresentam papel fundamental no câncer. O mTORC1 favorece a tumorigênese através da tradução de oncogenes ao liberar o fator de alongação eIF4E da proteína 4E-BP1; aumenta a angiogênese a partir da regulação da proteína HIF1 α ; favorece o acúmulo de lipídios através da ativação da SREBP1c. O complexo mTORC2 participa da tumorigênese ativando a Akt e outras proteínas da família AGC como a SGK, que promove a proliferação e sobrevivência celulares. Além disso, através do aumento da captação de glicose pela ativação da Akt, o mTORC2 alimenta o metabolismo das células tumorais 35

Figura 4. A inibição do mTOR pela rapamicina e pelo NO como ferramenta terapêutica. **a)** A via de sinalização PI3K-Akt-mTOR e a alça de retroalimentação negativa da proteína p70S6K; **b)** A rapamicina inibe parcialmente as funções do mTORC1, suprimindo a p70S6K mas não o eIF4E e, portanto, bloqueando apenas parcialmente a tradução de proteínas. Entretanto, considerando a alça de retroalimentação negativa da p70S6K, a rapamicina indiretamente aumenta a atividade da PI3K, promovendo a sobrevivência celular; **c)** O NO reduz a atividade das proteínas IRS-1, Akt e do complexo mTORC1, inibindo a tradução de proteínas e a viabilidade celular de forma mais eficiente do que a rapamicina..... 37

Figura 5. As óxido nítrico sintases e a produção de óxido nítrico. As diferentes isoformas de óxido nítrico sintases catalisam a produção de óxido nítrico e L-citrulina a partir de L-arginina, oxigênio e de NADPH 39

Figura 6. Diagrama esquemático do ensaio de S-nitrosação. Uma proteína hipotética é indicada com cisteínas em conformação de tiol livre, nitrosotiol e formando pontes dissulfeto. No passo preliminar (passo 1), os tióis livres são bloqueados por metiltiolação com MMTS. O MMTS excedente é removido no passo subsequente (passo 2) através de precipitação com acetona. O nitrosotiol é então reduzido com ácido ascórbico formando novamente um tiol livre que reage com a biotin-HPDP (passo 3). As proteínas marcadas são então purificadas com estreptavidina, uma proteína que se liga à biotina, e detectadas por *Western blot* utilizando anticorpo específico 42

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
O CÂNCER	18
A PROTEÍNA mTOR	21
OS COMPLEXOS mTORC1 E mTORC2	22
<i>Os substratos e as ações do complexo mTORC1</i>	<i>24</i>
<i>Os substratos e as ações do complexo mTORC2</i>	<i>26</i>
REGULADORES UPSTREAM DOS COMPLEXOS mTOR	27
<i>A regulação do complexo mTORC1 por nutrientes</i>	<i>27</i>
<i>A regulação do complexo mTORC1 por fatores de crescimento</i>	<i>30</i>
<i>A regulação do complexo mTORC1 por energia e estresse</i>	<i>31</i>
<i>A regulação upstream do complexo mTORC2</i>	<i>33</i>
A PROTEÍNA mTOR NA ETIOLOGIA DO CÂNCER E COMO ALVO TERAPÊUTICO	33
<i>A Rapamicina como terapia para os cânceres centrados na mTOR</i>	<i>35</i>
O ÓXIDO NÍTRICO COMO MOLÉCULA DE SINALIZAÇÃO CELULAR	37
OS MECANISMOS DE AÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO	40
<i>A via de sinalização cGMP dependente</i>	<i>40</i>
<i>A S-nitrosação</i>	<i>40</i>
<i>S-nitrosação: determinantes de especificidade</i>	<i>43</i>
<i>Óxido nítrico: nova ferramenta de combate ao câncer?</i>	<i>44</i>
OBJETIVOS	46
CAPÍTULO	47
CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

O CÂNCER

Ao contrário do que muitos acreditam, o câncer é provavelmente uma doença tão velha quanto a própria humanidade. A descrição mais antiga do câncer humano foi encontrada em papiros egípcios escritos entre os anos 3000-1500 a.c. Dois deles, conhecidos como os papiros “Edwin Smith” e “George Ebers”, apresentam detalhes de condições consistentes com as descrições modernas da doença. O papiro Edwin Smith, por exemplo, descreve 8 casos de tumores ou úlceras de mama, recomendando a cauterização como medida paliativa para o tratamento da moléstia. Hoje, o câncer é a principal causa de morte em países desenvolvidos e a segunda principal causa de morte nos países em desenvolvimento, e a busca por novas terapias para a doença mobiliza a comunidade médica e científica de todo o mundo.

Segundo relatório recente da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (1), o impacto global do câncer no mundo mais do que dobrou nos últimos 30 anos. Aproximadamente 12,7 milhões de casos novos de câncer e 7,6 milhões de mortes pela doença ocorreram em 2008 em todo o globo, com 56% dos casos e 64% das mortes ocorrendo em países em desenvolvimento (2). No Brasil, as estimativas de 2012 se assemelham às de 2013 e apontam para a ocorrência de 518.510 novos casos de câncer (3). Os tipos mais incidentes no território nacional, à exceção do câncer de pele não melanoma, são os cânceres de próstata e pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e colo de útero no sexo feminino. As fronteiras do câncer têm se expandido nos países em desenvolvimento não apenas como resultado do crescimento e envelhecimento da população,

mas também pela adoção de hábitos de vida associados ao câncer como fumo, inatividade física e o consumo crescente da chamada dieta “ocidentalizada”.

Os números alarmantes geralmente associados ao câncer demandam estratégias que propiciem detecção precoce, melhor estratificação do tumor para guiar terapias e o desenvolvimento de métodos preventivos mais eficazes. O aumento do conhecimento acerca da biologia do câncer nas últimas duas décadas permitiu a identificação de circuitos moleculares característicos em tumores sólidos. Essas vias refletem anormalidades específicas que se acredita levar à progressão de malignidades.

Diferentes estudos sobre cânceres humanos e modelos murinos apontaram a importância de aberrações genéticas que contribuem para o comportamento do tumor. Diversos oncogenes e proteínas supressoras tumorais, mais especificamente a *phosphatidylinositol-3-OH kinase* (PI3K), MYC, RAS, p53, *phosphatase and tensin homologue* (PTEN) e a proteína retinoblastoma (RB), são frequentemente associadas a diversos cânceres, apesar dos perfis de mutação dos diferentes tipos de câncer variarem consideravelmente.

Em termos de importância, a cascata de sinalização da PI3K é mais apropriadamente denominada como super-rodovia do que como simples via de sinalização tumoral, uma vez que se encontra alterada de múltiplas formas em diversos tipos de malignidades humanas (4,5). Mutações somáticas no gene *PIK3CA*, que codifica a subunidade catalítica p110 α da PI3K, ocorrem em mais de 30% de alguns dos tipos mais comuns de cânceres epiteliais, incluindo câncer de mama, cólon, próstata e endométrio (6). A ativação genética e epigenética frequente por mecanismos moleculares diversos sugere que a ativação da via PI3K é provavelmente um passo crítico na oncogênese. A PI3K é elemento fundamental nas vias de

transdução de sinal e apresenta papel importante na regulação de diferentes características celulares, incluindo crescimento, sobrevivência e metabolismo.

O gene *PTEN*, que codifica a fosfatase que antagoniza a PI3K, é o segundo gene supressor tumoral mais afetado em tumores, após a p53 (7,8). A atividade de fosfatase lipídica do PTEN desfosforila os produtos 3-fosfoinosítídeos da PI3K, importantes ativadores de quinases relacionadas com sobrevivência celular, como a *phosphoinositide-dependent kinase 1* (PDK1) e Akt.

A proteína Akt tem o potencial para fosforilar mais de 9000 proteínas em mamíferos (9), entretanto, ainda é necessário determinar os seus efetores críticos para a gênese do câncer. As principais linhas de evidência apontam para dois efetores evolutivamente conservados: a *forkhead family of transcription factors* (FOXO) e o *mechanistic target of rapamycin* (mTOR). Os fatores transcricionais FOXO, que inibem a proliferação de células em mamíferos, são diretamente fosforilados e inativados pela Akt (10), enquanto o mTOR, que associa-se ao aumento da proliferação celular, é indiretamente ativado pela Akt. Além das mutações inativadoras e deleção do PTEN, outros mecanismos também contribuem para a hiperativação da Akt no câncer, como a amplificação do gene da Akt e o aumento da ativação de receptores tirosina quinase, como a ativação dos receptores heterodiméricos ErbB-2/ErbB-3.

Acredita-se que os cânceres dependentes da ativação da oncoproteína Akt contam com a subsequente ativação do mTORC1 para promover a tumorigênese. A via de sinalização do mTOR integra sinais intra- e extracelulares e atua como um regulador central do metabolismo e crescimento celular, proliferação e sobrevivência. Durante a proliferação a célula precisa aumentar sua biomassa e replicar o seu genoma antes de dividir-se para gerar

duas células filhas. Assim, a célula necessita gerar energia suficiente e adquirir ou sintetizar biomoléculas que atendam a demanda da proliferação.

Em cerca de 40-90% dos dez tumores humanos mais freqüentes a via de sinalização do mTOR encontra-se ativada de forma aberrante (11). O câncer é essencialmente uma doença na qual as células precisam perder seus pontos de checagem de proliferação normais, e as células tumorais inevitavelmente adquirem mutações oncogênicas em vias relacionadas a fatores de crescimento e nutrientes, desconectando a regulação metabólica dos sinais fisiológicos. Assim, por ser um regulador chave do crescimento e proliferação celulares, o mTOR tem sido alvo de intensa investigação por seu papel no desenvolvimento e progressão tumorais.

A PROTEÍNA mTOR

Em todos os eucariotos, a via de sinalização do mTOR conecta a abundância de energia e nutrientes à execução de atividades celulares como crescimento e divisão celular através da sua habilidade em perceber, simultaneamente, a presença de energia, nutrientes, estresse e, nos metazoários, de fatores de crescimento (12). “Crescer” relaciona-se a um conjunto de processos bioquímicos – intimamente ligados com a disponibilidade de nutrientes e energia – pelo qual os organismos aumentam seus tamanhos e número de células através da síntese de novos componentes celulares como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. As células contam, ainda, com um conjunto de programas para lidar com momentos de escassez de nutrientes e baixa energia. Assim, para evitar o desequilíbrio energético e a morte as células rapidamente reprimem os programas de biossíntese durante o jejum (diminuindo ou

suspendendo a proliferação), aumentam a reciclagem de proteínas e organelas mais velhas, e provêm uma fonte interna de metabólitos.

Assim, o mTOR apresenta implicações importantes em doenças nas quais o crescimento encontra-se desregulado e a homeostase comprometida como o câncer, doenças metabólicas e o envelhecimento. Uma vez desregulada, a sinalização do mTOR alimenta o crescimento destrutivo de tumores. A hiper-estimulação da via do mTOR pelo consumo excessivo de alimento pode ser fator crucial para a epidemia do diabetes. Finalmente, acredita-se que a via do mTOR apresenta papel central no controle do envelhecimento de células e tecidos, e a inibição da proteína representaria uma nova forma de aumentar a longevidade (12).

OS COMPLEXOS mTORC1 E mTORC2

A proteína mTOR é uma serina/treonina quinase evolutivamente conservada que apresenta papel fundamental na reprogramação do metabolismo tumoral. O mTOR é a subunidade catalítica de dois complexos distintos denominados *mTOR complex 1* (mTORC1) e mTORC2 (**Figura 1**). As duas principais proteínas acessórias que distinguem esses complexos são a *regulatory-associated protein of mTOR* (RAPTOR) e a *rapamycin-insensitive companion of mTOR* (RICTOR), que definem o mTORC1 e o mTORC2, respectivamente (13-15). Essas proteínas acessórias atuam não apenas como ancoradouros para a constituição dos complexos, mas também para a ligação aos seus substratos e às proteínas regulatórias (13,14,16-21).

Os componentes exclusivos do mTORC1 incluem também um regulador negativo, a 40 kDa *Pro-rich Akt substrate* (PRAS40, também denominada AKT1S1) (20,22). Já o mTORC2 é

composto pelas proteínas *protein observed with RICTOR 1* (PROTOR1) e PROTOR2, que atuam na formação do complexo, e a *mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1* (mSIN1, também denominada MAPKAP1), responsável pela ligação do mTORC2 em membranas (21,23,24). Os dois complexos também compartilham proteínas comuns como a *mammalian lethal with SEC13 protein 8* (mLST8 ou G β L) e *DEP domain-containing mTOR-interacting protein* (DEPTOR), que atuam como reguladores positivos e negativos, respectivamente (25,26). Há evidências bioquímicas e estruturais de que tanto o mTORC1 quanto o mTORC2 apresentam-se sob a forma de dímeros no interior celular (18,27).

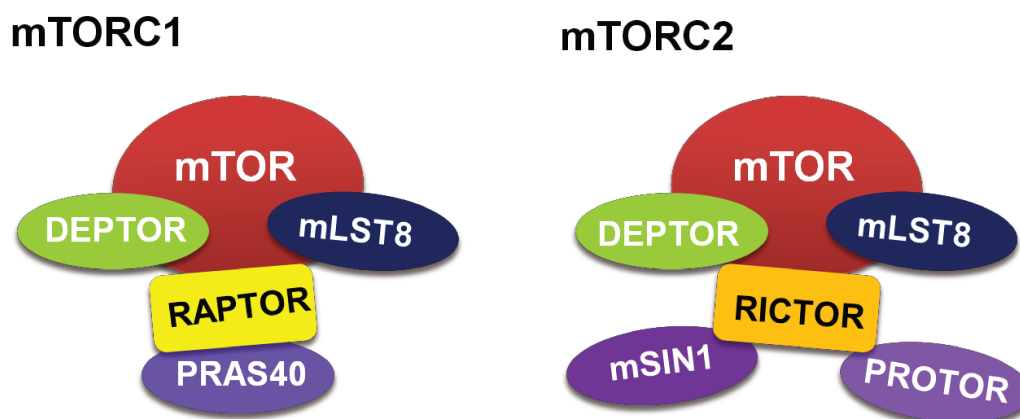


Figura 1. Esquema dos componentes dos complexos mTORC1 e mTORC2. Os complexos mTORC1 e mTORC2 apresentam em comum as proteínas mTOR, mLST8 (G β L) e DEPTOR. As proteínas RAPTOR e PRAS40 compõem exclusivamente o complexo mTORC1; RICTOR, mSIN1 e PROTOR são específicas do complexo mTORC2.

Um dos inibidores clássicos do complexo mTORC1 é a rapamicina, macrolídeo que se liga à proteína 12 kDa *FK506-binding protein* (FKBP12) e inibe a habilidade do mTORC1 de fosforilar seus substratos (15,25). A rapamicina também é capaz de inibir o mTORC1 através da dissociação da interação entre RAPTOR e mTOR, impedindo o acesso do mTOR a alguns de seus substratos (14,27). O tratamento prolongado com rapamicina pode ainda inibir o

mTORC2 em alguns tecidos e linhagens celulares (28). Esse efeito provavelmente envolve o sequestro progressivo do “reservatório” interno de mTOR através da associação com o complexo rapamicina-FKBP12, tornando-o inacessível para formação do complexo mTORC2.

Os substratos e as ações do complexo mTORC1

A composição das subunidades de cada mTORC é o que dita a especificidade de seus substratos. O complexo mTORC1 relaciona-se com mecanismos chave envolvidos na biogênese ribossomal, tradução de RNA mensageiro (RNAm), autofagia, síntese de lipídeos e metabolismo mitocondrial.

A biogênese ribossomal é um processo que demanda um dispêndio energético importante, e é por isso intimamente ligado ao *status* energético da célula. A síntese de RNA ribossomal (RNAr) e de proteínas ribossomais é também regulada pelo mTORC1. O mTORC1 aumenta a atividade transcricional da proteína polimerase de RNAr *RNA polymerase I* (RNAPI) através da *S6 kinase 1* (p70S6K1) (29). Além de aumentar a capacidade de síntese protéica da célula pelo aumento do número de ribossomos, a sinalização por mTORC1 também controla aspectos específicos da tradução do RNA mensageiro (RNAm) através de pelo menos duas classes de substratos diretos: as quinases ribossomais S6 (p70S6K) e a *eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein* (4E-BP).

Os substratos do mTORC1, p70S6K1 e 4E-BP1, associam-se com o RNAm e regulam o início e o progresso da tradução, controlando as taxas de síntese protéica. Em seu estado não fosforilado, a proteína 4E-BP1 inibe a tradução do RNAm através de sua associação inibitória ao *eukaryotic translation initiation factor 4E* (eIF4E). Entretanto, uma vez fosforilada pelo mTORC1, a 4E-BP1 dissocia-se do eIF4E, permitindo que a proteína recrute o fator de

iniciação da tradução eIF4G para a porção 5' final da maioria dos RNAm (30,31). A proteína p70S6K1, ao ser fosforilada pelo mTORC1, promove a tradução do RNAm através da fosforilação ou da ligação à diversas proteínas incluindo a *eukaryotic elongation factor 2 kinase* (eEF2K)(32), *80kDa nuclear cap-binding protein* (CBP80) (33) e eIF4B (34), que atuam conjuntamente na iniciação da tradução e no alongamento do RNAm. Enquanto a tradução de alvos específicos do mTORC1 (ciclina D1, c-Myc, *Hypoxia-inducible factor 1 α* (HIF1 α)) contribui para o desenvolvimento e progressão tumorais, a estimulação da biogênese ribossomal é um dos principais mecanismos pelos quais o mTORC1 promove crescimento celular e proliferação nas células tumorais.

A autofagia, mecanismo fundamental para prover substratos para a produção de energia durante períodos de escassez de nutrientes externos, é também regulada pelo mTORC1. A autofagia é a auto-degradação controlada de componentes celulares danificados, redundantes e até mesmo perigosos que envolvem proteínas individuais (microautofagia) e organelas (macroautofagia). O mTORC1 inibe a autofagia (35,36) através da fosforilação das proteínas *autophagy-related 13* (ATG13) e *unc-51-like kinase 1* (ULK1), desfazendo o complexo ULK1-ATG13-FIP200 (*200kDa FAK family kinase-interacting protein*)-ATG101. O complexo ULK1-ATG13-FIP200-ATG101 é responsável pela formação do autofagossomo (37), uma vesícula de membrana transitória que envolve e digere os componentes celulares. Acredita-se que a autofagia apresente efeitos pró-sobrevivência nas células submetidas a estresse metabólico e nutricional em tumores estabelecidos, permitindo que evadam a apoptose (38). Entretanto, a autofagia também apresenta efeito supressor tumoral, uma vez que defeitos na iniciação da autofagia promovem a tumorigênese. Assim, a ativação aberrante

do mTORC1 e a inibição da autofagia nos estágios iniciais da tumorigênese podem promover a progressão tumoral.

O mTORC1 também controla a atividade de diversos fatores transcricionais implicados na síntese de lipídios e no metabolismo mitocondrial.

Os substratos e as ações do complexo mTORC2

O mTORC2 foi inicialmente identificado em *Saccharomyces cerevisiae* como mediador da organização do citoesqueleto de actina e polarização celular (15,25,39). O complexo controla diversos reguladores do citoesqueleto, incluindo *Rho1 GDP-GTP exchange protein 2* (Rom2) e a proteína quinase *cAMP-dependent, cGMP-dependent and protein kinase C* (AGC) Ypk2 (40,41).

Estudos recentes revelaram novas funções para o mTORC2 na fosforilação de membros da família de proteínas quinase AGC. O complexo mTORC2 fosforila e ativa a Akt, a *serum- and glucocorticoid-regulated kinase* (SGK) e a *protein kinase C* (PKC), que regulam a sobrevivência celular, a progressão do ciclo celular e o anabolismo (42-45). Entre as quinases AGC, a Akt é especialmente importante devido ao seu papel na patogênese do câncer e do diabetes. Através de RNA de interferência (RNAi) em células S2 de *Drosophila melanogaster*, o TORC2 foi descrito como o complexo responsável por mediar a fosforilação da Akt em Ser505, resíduo homólogo à Ser473 em mamíferos (42,44,45). Trata-se de um achado chave, uma vez que a fosforilação em Ser473 prepara a Akt para a subsequente fosforilação em Thr308, no domínio catalítico, pela PDK1. Juntos, esses dois eventos fosforilativos geram a ativação completa da Akt. A fosforilação dos fatores transcricionais FOXO1 e FOXO3 pela Akt inibe seus deslocamentos para o núcleo e a ativação de programas de expressão gênica que

promovem a apoptose (46). Assim, o mTORC2 favorece a sobrevivência celular através da inibição de FOXO1 e FOXO3 mediada pela Akt.

De forma geral, os achados localizam o mTORC2 acima de uma série de processos celulares chave como a progressão do ciclo celular, anabolismo e sobrevivência da célula.

REGULADORES *UPSTREAM* DOS COMPLEXOS mTOR

O mTORC1 atua como um integrador de sinais das quatro principais fontes regulatórias das células de eucariotos: nutrientes, fatores de crescimento, energia e estresse. Esses fatores podem cooperar ou antagonizar os efeitos uns dos outros, permitindo à célula controlar finamente a atividade do mTORC1. A regulação do mTORC2 é ainda pouco conhecida, mas as evidências existentes sugerem que, ao contrário do controle do mTORC1, apenas os fatores de crescimento regulam esse complexo (15,39).

A regulação do complexo mTORC1 por nutrientes

Aminoácidos são como os blocos construtores das proteínas, sendo também empregados na síntese de DNA, glicose e ATP. Diversos estudos demonstram que os aminoácidos são absolutamente necessários para a sinalização através do mTORC1 em cultura de células, e não podem ser compensados por outros estímulos (19,47,48). Nos vertebrados, os aminoácidos podem ser sentidos intracelularmente (49) e um sistema de transporte de aminoácidos participa de forma importante na sinalização dependente do mTORC1. Esse sistema importa a leucina, aminoácido chave na ativação do mTORC1, para o interior celular (50). Apesar da identidade e da ação do sensor do aminoácido primário ainda permanecerem desconhecidas, vários candidatos a mediadores têm sido apontados, como a

proteína *sterile 20 (STE20) family kinase mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 3 (MAP4K3)*(51,52) e a *PI3K catalytic subunit type 3*, também denominada VPS34 (53,54).

A relação mais forte entre os aminoácidos e o mTORC1 é, sem dúvida, a família Rag de pequenas GTPases (19,55). As Rag GTPases são heterodímeros compostos por RAGA ou RAGB com RAGC ou RAGD; os dois membros do heterodímero apresentando estados distintos de nucleotídeos. Na ausência de aminoácidos, as Rag GTPases encontram-se em sua conformação inativa na qual RAGA ou RAGB ligam-se ao GDP e RAGC ou RAGD ligam-se ao GTP. A presença de aminoácidos faz com que as Rag GTPases tornem-se conformacionalmente ativas, e RAGA ou RAGB liguem-se ao GTP e RAGC ou RAGD liguem-se ao GDP. O heterodímero Rag ativo interage fisicamente com a proteína RAPTOR, fazendo com que mTORC1 associe-se à superfície de endossomos e lisossomos tardios, onde as Rag GTPases residem (19,55,56). Essa realocização permite que o mTORC1 interaja com a pequena GTPase *Ras homologue enriched in brain (RHEB)* (em seu estado associado à GTP), um ativador essencial do mTORC1 que é controlado por fatores de crescimento (19,57,58).

As proteínas Rag não apresentam nenhum alvo de sinalização óbvio. Entretanto, três pequenas proteínas – p14, *MAPK scaffold protein 1 (MP1)* e p18, coletivamente denominadas *Ragulator* – ancoram as Rag GTPases na superfície dos lisossomos. Quando a *Ragulator* é geneticamente inativada, as Rag GTPases tornam-se citoplasmáticas, o recrutamento do mTORC1 para os lisossomos falha, e a sinalização dos aminoácidos para o mTORC1 é inibida (56). Em geral, esses achados demonstram que as endomembranas apresentam papel fundamental no controle da atividade do complexo mTORC1 e sugerem que os seus alvos

subcelulares medeiam sua capacidade de integrar os sinais gerados por nutrientes e pelos fatores de crescimento.

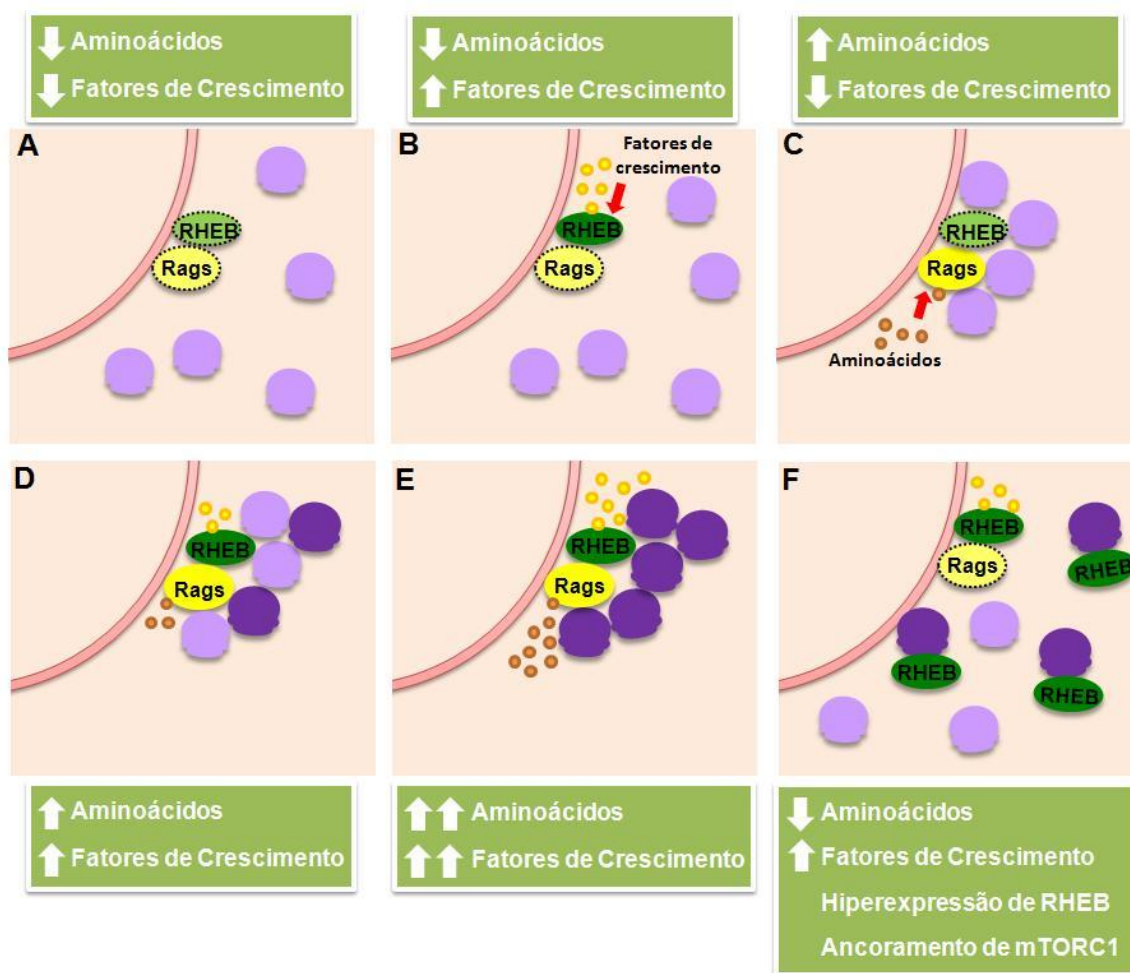


Figura adaptada de: Zoncu, R., Efeyan, A. & Sabatini, D.M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 21-35.

Figura 2. O complexo mTORC1 atua como integrador de sinais. A integração de sinais pelo mTORC1 baseia-se na regulação de suas interações físicas e de sua localização. Fatores de crescimento favorecem a ativação da Rheb, induzindo sua ligação física com mTORC1. Os aminoácidos, por sua vez, geram o deslocamento do mTORC1 mediado pela Rag para a endomembrana lisossomal, onde a proteína Rheb reside; **a)** Na ausência de aminoácidos e fatores de crescimento, Rag e Rheb GTPases encontram-se inativas e o mTORC1 é fisicamente dissociado de Rheb; **b)** Fatores de crescimento ativam a Rheb, mas os aminoácidos necessários para a interação do mTORC1 com Rheb estão ausentes e mTORC1 permanece inativo; **c)** Aminoácidos ativam as Rags, recrutando o mTORC1 e permitindo sua interação com Rheb. Entretanto, na ausência de fatores de crescimento, Rheb encontra-se inativa, assim como mTORC1; **d)** Na presença de aminoácidos e fatores de crescimento, mTORC1 é recrutado para Rheb ativa e, portanto, ativado; **e)** Se o mTORC1 encontra-se ativo, o aumento na concentração de aminoácidos e fatores de crescimento contribuem para maior ativação do complexo; **f)** A hiperexpressão de Rheb ou localização forçada de mTORC1 na membrana lisossomal tornam desnecessária o recrutamento de mTORC1 mediado pela Rag, permitindo a ativação do complexo mesmo na ausência de aminoácidos.

É importante ressaltar que os nutrientes e a energia não devem ser considerados interruptores “liga-desliga” das vias de sinalização: suas concentrações variam suavemente em função dos ciclos de alimentação. Assim, o mTORC1 provavelmente percebe pequenas variações desses parâmetros e ajusta continuamente a taxa dos processos biossintéticos. Uma vez que mTORC1 encontra-se ativo, aumentos na concentração de aminoácidos e fatores de crescimento podem ativá-lo ainda mais. Outros sinais regulatórios, como os gerados pela *AMP-activated protein kinase* (AMPK) e mecanismos envolvendo alças de retroalimentação, podem modular ou completamente inibir esses sinais recebidos pelo mecanismo de integração, garantindo que os nutrientes, fatores de crescimento e energia não gerem sinais conflitantes. Assim, a regulação do mTORC1 é um processo que envolve decisões com diversos passos que considera múltiplos indicadores do estado energético da célula antes de comprometê-la com o crescimento e proliferação.

A regulação do complexo mTORC1 por fatores de crescimento

Os organismos multicelulares dependem de meios de comunicação amplos para coordenar a distribuição dos nutrientes e o crescimento de populações celulares do corpo. Com o surgimento dos metazoários, a via do mTOR tornou-se essencial para a sinalização de vias iniciadas por fatores de crescimento, como a insulina, capaz de informar o estado nutricional do organismo como um todo. Um dos pontos chave para a sinalização por fatores de crescimento para o mTORC1 é a pequena GTPase RHEB que, associada ao GTP, estimula a atividade quinase do complexo (57,58). Nos metazoários a RHEB apresenta um papel fundamental, e sua perda elimina a ativação do mTORC1 por fatores de crescimento e nutrientes. Por outro lado, a expressão elevada de RHEB é capaz de manter a atividade do mTORC1 mesmo na ausência de fatores de crescimento e nutrientes.

Como os fatores de crescimento modulam a atividade da RHEB? A ligação da insulina ou do *insulin-like growth factor* (IGF) aos seus receptores ativa a via da PI3K, gerando a fosforilação e ativação da proteína Akt. A Akt, por sua vez, fosforila a proteína *tuberous sclerosis complex 2* (TSC2) (também denominada tuberina) que, juntamente com TSC1 (também conhecida como hamartina), forma o complexo TSC1-TSC2 (59-61). O complexo TSC1-TSC2 age como uma *GTPase activating protein* (GAP) para a Rheb (62-65); uma vez que RHEB-GDP é incapaz de ativar o mTORC1, TSC1-TSC2 efetivamente inibe a via de sinalização do mTORC1. Assim, a fosforilação da proteína TSC2 mediada pela Akt (59-61) inibe a atividade GTPase da RHEB, promovendo assim a ativação do complexo mTORC1. A Akt fosforila, ainda, a proteína PRAS40 (66), levando a sua ligação com a proteína 14-3-3 e impedindo-a de inibir o mTORC1 (20,22).

Os fatores de crescimento também podem sinalizar para o mTORC1 por vias alternativas ao eixo PI3K-Akt. Por exemplo, a proteína *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), componente da via de sinalização Ras-Raf-MAPK/ERK kinase (MEK)-ERK, fosforila a proteína TSC2, inibindo-a (67). Mais, a via Wnt também tem sido implicada na sinalização por mTORC1 (68,69). A proteína *glycogen synthase kinase 3 β* (GSK3 β) atua como um regulador negativo da mTOR através da fosforilação de TSC2; assim, através da inibição da GSK3 β , Wnt ativa a via do mTORC1.

A convergência de múltiplas vias de sinalização iniciadas por fatores de crescimento no mTORC1 permite que o complexo participe de diversos processos fisiológicos e de desenvolvimento. Assim, o mTORC1 é indispensável já no início do desenvolvimento embrionário (46,70,71).

A regulação do complexo mTORC1 por energia e estresse

A inibição química da glicólise e da função mitocondrial inibem a atividade do mTORC1, indicando que o complexo percebe o estado energético da célula (14,72). Esse papel é crucial uma vez que os processos de crescimento mediados pelo mTORC1 consomem grande parte da energia celular e poderiam ser fatais para as células em jejum.

A glicólise e a respiração mitocondrial convertem os nutrientes em energia, que é estocada sob a forma de adenosina trifosfato (ATP). Em situações de privação energética, os níveis celulares de ATP rapidamente diminuem. A via do mTORC1 percebe indiretamente a queda dos níveis de ATP por mecanismos centrados na proteína *5'AMP-activated protein kinase* (AMPK) (73). Ambos adenosina monofosfato (AMP) e ATP são reguladores alostéricos da AMPK; quando a razão AMP:ATP aumenta, a AMPK fosforila a proteína TSC2 (69,74). Assim, através da estimulação da atividade GAP do complexo TSC1-TSC2 sobre a proteína RHEB, a AMPK inibe a sinalização por mTORC1. Mais, a AMPK também fosforila a proteína RAPTOR, fazendo com que se ligue à proteína 14-3-3 e gerando a inibição do mTORC1 por mecanismos alostéricos (75).

Numerosos agentes causadores de estresse afetam os níveis de ATP, podendo regular o mTOR através do eixo AMP-AMPK. Por exemplo, durante períodos de hipóxia, a respiração mitocondrial é alterada, diminuindo os níveis de ATP e causando a ativação da AMPK. Por outro lado, outros agentes causadores de estresse não se baseiam primariamente na AMPK para sinalizar os níveis energéticos celulares. Os danos causados no DNA resultam na inibição da atividade do mTORC1 através da ativação da AMPK dependente da proteína p53 (76,77). A p53 apresenta como alvos transcricionais Sestrina 1 e Sestrina 2, proteínas implicadas na resposta aos danos ao DNA. Artigos recentes demonstram que as sestrinas

ativam a AMPK de forma potente, mediando a inibição da atividade do mTORC1 após danos ao DNA (78).

A regulação upstream do complexo mTORC2

Surpreendentemente pouco é sabido sobre a ativação *upstream* do complexo mTORC2. Em decorrência do papel do complexo na regulação das proteínas Akt, SGK e PKC, infere-se que os fatores de crescimento possam controlar mTORC2 tanto diretamente quanto indiretamente. De fato, a estimulação de cultura celular com insulina promove a fosforilação da Akt em Ser473 pelo mTORC2 (45).

Uma vez que as proteínas Akt, SGK e PKC respondem a diferentes fatores de crescimento, a gama de reguladores *upstream* do mTORC2 pode ser bem ampla. Assim, como a especificidade do sinal é alcançada? Uma solução potencial pode ser a existência de múltiplas isoformas de mSIN1. Três das cinco variantes conhecidas de mSIN1 fazem parte do mTORC2, definindo efetivamente três complexos distintos dos quais apenas dois são regulados pela insulina (23). Assim, mSIN1 atua como um adaptador entre mTORC2 e fatores de crescimento específicos.

A PROTEÍNA mTOR NA ETIOLOGIA DO CÂNCER E COMO ALVO TERAPÊUTICO

A evidência mais direta de que a proteína mTOR pode controlar a tumorigênese vem da síndrome do câncer familiar, fenômeno gerado por mutações nos reguladores negativos do mTOR como TSC1-TSC2, LKB1 e a proteína PTEN. Dados epidemiológicos indicam que mutações esporádicas ou desregulação da PI3K, Akt e PTEN são, juntamente com a p53, as alterações mais prevalentes nos cânceres humanos (4).

A proteína 4E-BP1 também vem sendo apontada como uma reguladora chave da proliferação celular. A 4E-BP1 situada-se abaixo do mTORC1 (**Figura 3**), e sua inativação pode contribuir diretamente com o crescimento de cânceres esporádicos. Células MEFs que não apresentam 4E-BP1 e 4E-BP2 apresentam aumento da proliferação mas não alteram seus tamanhos, indicando que a inibição das 4E-BPs pelo mTORC1 comanda a progressão do ciclo celular mas não o crescimento da célula (79). Mecanicamente, a inibição da 4E-BP1 mediada pelo mTORC1 gera ativação do eIF4E e permite a tradução de RNAm de genes pró-tumorigênicos, incluindo reguladores do ciclo celular.

O complexo mTORC1 também aumenta, ainda que indiretamente, a enzima *fatty acid synthase* (FAS), um alvo transcrricional de SREBP1 envolvido na biogênese de lipídios que favorece a rápida proliferação das células tumorais (80) (**Figura 3**).

Evidências crescentes sugerem ainda que a autofagia participa da supressão tumoral. Os dados mais diretos que sustentam o papel anti-câncer da autofagia vem de ratos heterozigotos para a proteína autofágica beclina (81,82) e de ratos que apresentam deficiência na proteína ATG4C (83), ambos favoráveis ao tumor. Assim, a ativação constitutiva do mTORC1 pode favorecer indiretamente a tumorigênese através da supressão da autofagia. Além disso, o mTORC1 promove a angiogênese através da regulação da proteína HIF1 α ; assim, a sinalização por mTORC1 favorece o crescimento tumoral por fornecer ao tumor nutrientes e oxigênio(84) (**Figura 3**).

Através da ativação da Akt (45) e SGK (43), o mTORC2 controla diretamente a tumorigênese (**Figura 3**). A proteína Akt promove a proliferação, sobrevivência e a captação de nutrientes pelas células cancerosas. Os tumores que apresentam inativação do supressor tumoral PTEN (um inibidor da sinalização pela Akt) ou por mutações oncogênicas da PI3K

(que promovem a sinalização pela Akt) são especialmente dependentes da atividade pró-sobrevivência da Akt. Assim, as terapias que apresentam o mTORC2 como alvo são bastante úteis.

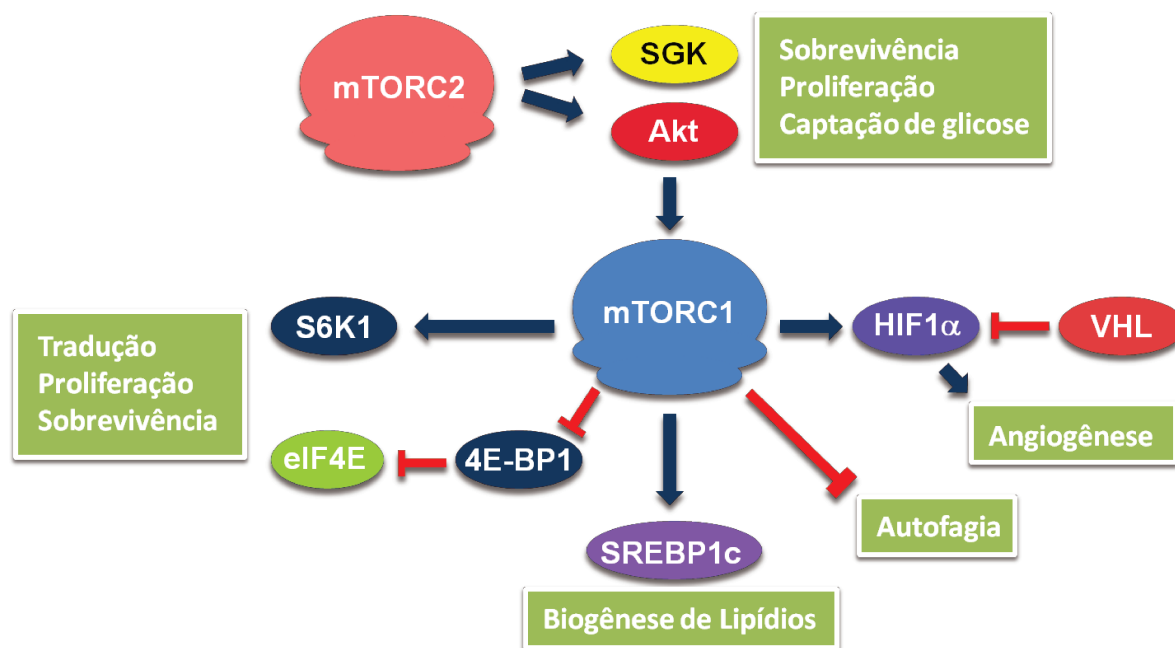


Figura adaptada de: Zoncu, R., Efeyan, A. & Sabatini, D.M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 21-35.

Figura 3. O mTOR regula processos celulares que apresentam papel fundamental no câncer. O mTORC1 favorece a tumorigênese através da tradução de oncogenes ao liberar o fator de elongação eIF4E da proteína 4E-BP1; aumenta a angiogênese a partir da regulação da proteína HIF1 α ; favorece o acúmulo de lipídios através da ativação da SREBP1c. O complexo mTORC2 participa da tumorigênese ativando a Akt e outras proteínas da família AGC como a SGK, que promove a proliferação e sobrevivência celulares. Além disso, através do aumento da captação de glicose pela ativação da Akt, o mTORC2 alimenta o metabolismo das células tumorais.

A Rapamicina como terapia para os cânceres centrados na mTOR

A rapamicina é um inibidor natural do mTOR e surgiu como droga potencial para o tratamento do câncer. Entretanto, até o momento, o sucesso limitado da rapamicina como droga anti-câncer em ensaios clínicos geraram desapontamento na comunidade científica. Assim, há limitações no uso da droga e os esforços correntes buscam compostos para desenvolvimento de terapias mais eficazes para os tumores centrados na proteína mTOR.

As terapias baseadas na droga rapamicina encontraram um problema desafiador em decorrência da alça de retroalimentação negativa mediada pela proteína p70S6K1. A hiperativação do complexo mTORC1 inicia a alça de retroalimentação negativa através da ativação da proteína p70S6K1, dificultando o funcionamento do *insulin receptor substrate 1* (IRS1), uma proteína adaptadora responsável pelo recrutamento de efetores do *receptor de insulina* (IR). Assim, a fosforilação do IRS1 mediada pela p70S6K1 resulta em insensibilidade à insulina e na diminuição da ativação da Akt em Thr308 mediada pela PDK1. A rapamicina, ao inibir o mTORC1 e conseqüentemente a ativação da p70S6K1, gera um aumento significativo da sinalização mediada pela PI3K e oferece importantes sinais de sobrevivência e proliferação através da ativação da Akt e das demais quinases AGC (85). Além disso, a inibição da p70S6K1 ativa a cascata de sinalização MEK-ERK (86), assim como a transcrição do *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) (87). Esses mecanismos geram alças de retroalimentação antagônicas à ação da rapamicina, diminuindo a eficácia da droga em modelos animais de câncer e pacientes (85,86) (**Figura 4**).

Apesar de doses elevadas de rapamicina ou o seu uso prolongado bloquear o mTORC2 em algumas linhagens celulares (28,88), a rapamicina é seletiva ao mTORC1. Considerando o papel do mTORC2 e, especialmente, dos seus alvos promotores da tumorigênese (como a Akt) (89), o problema é preocupante. A rapamicina também não é capaz de inibir completamente todas as funções do mTORC1; por exemplo, a droga afeta apenas parcialmente e de forma transitória a fosforilação da proteína 4E-BP1 (36,88,90-92).

Assim, através da inibição da alça de retroalimentação p70S6K1-IRS1 e a hiperativação da via PI3K-Akt, a rapamicina pode estimular a fosforilação da 4E-BP1 (e, portanto, a ativação do eIF4E e a tradução) ou outras funções do mTORC1 favoráveis aos

tumores. Esses dois fatores têm estimulado a comunidade científica pela busca de novos inibidores da função do complexo mTORC1. Nossos dados apontam para o óxido nítrico (NO) como importante mecanismo de regulação da via de sinalização PI3K-Akt-mTOR.

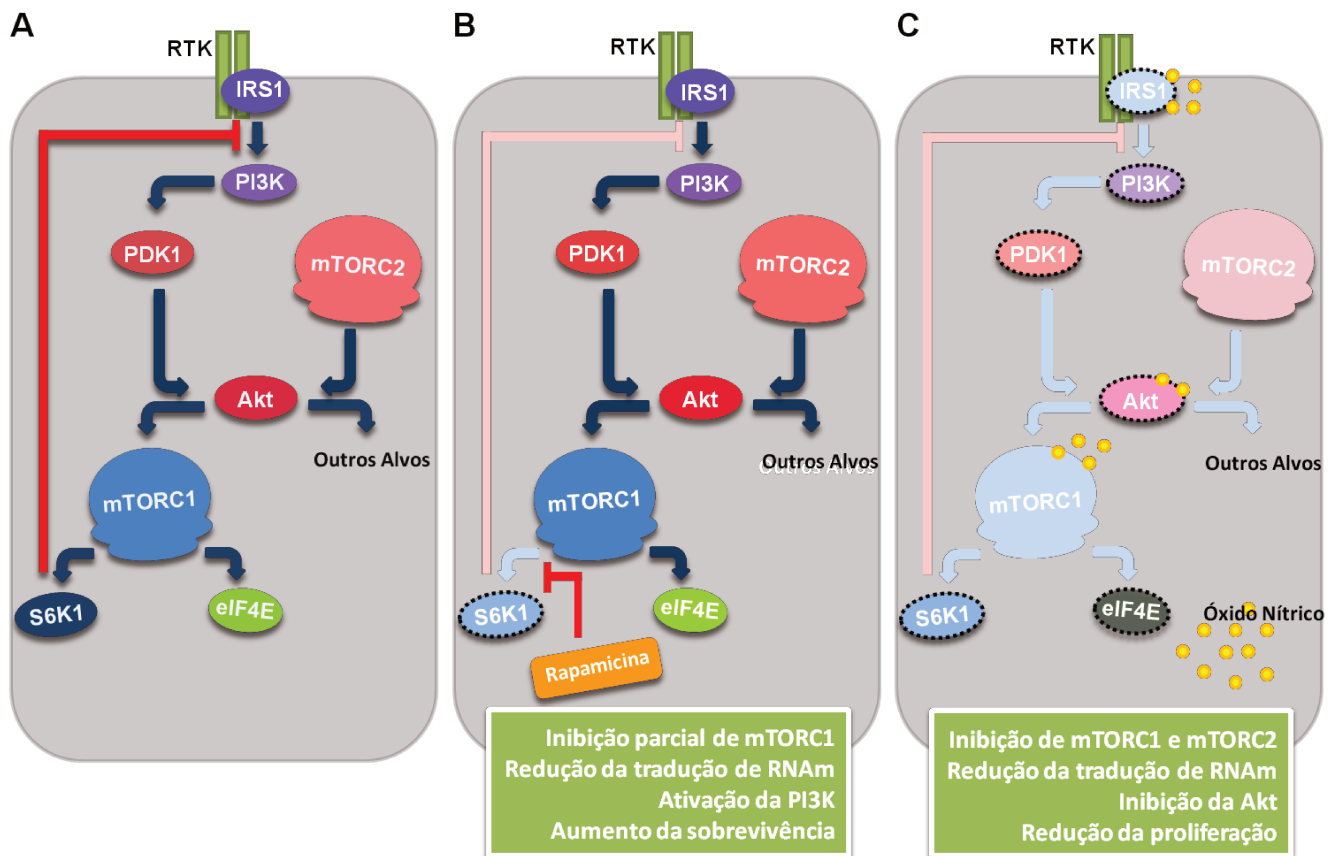


Figura 4. A inibição do mTOR pela rapamicina e pelo NO como ferramenta terapêutica. a) A via de sinalização PI3K-Akt-mTOR e a alça de retroalimentação negativa da proteína p70S6K; b) A rapamicina inibe parcialmente as funções do mTORC1, suprimindo a p70S6K mas não o eIF4E e, portanto, bloqueando apenas parcialmente a tradução de proteínas. Entretanto, considerando a alça de retroalimentação negativa da p70S6K, a rapamicina indiretamente aumenta a atividade da PI3K, promovendo a sobrevivência celular; c) O NO reduz a atividade das proteínas IRS-1, Akt e do complexo mTORC1, inibindo a tradução de proteínas e a viabilidade celular de forma mais eficiente do que a rapamicina.

O ÓXIDO NÍTRICO COMO MOLÉCULA DE SINALIZAÇÃO CELULAR

Até meados da década de 1980, o NO era considerado apenas mais uma molécula tóxica a figurar em uma extensa lista de poluentes ambientais. Destruidor da camada de

ozônio, suspeito carcinógeno e precursor da chuva ácida, o gás apresentava uma péssima reputação. Entretanto, em 1987, com a descoberta de que este radical livre gasoso é um produto do metabolismo celular de mamíferos (93,94), os pesquisadores perceberam que a molécula até então dita venenosa era também um componente fundamental para o organismo humano. Desde então, o NO tem se mostrado uma importante molécula de sinalização celular presente em diferentes tipos de células e com diversas funções fisiológicas e patofisiológicas.

Em contraste com moléculas de sinalização previamente caracterizadas que atuam através da ligação não-covalente a seus receptores, o NO e suas espécies derivadas exercem suas atividades biológicas por modificações químicas de seus alvos – preferencialmente interagindo com radicais livres, metais de transição e grupamentos tióis de proteínas. As descobertas iniciais da sinalização celular mediada pelo NO focaram suas atenções nas reações com metais. O reconhecimento da enorme importância da reação do NO-heme com a guanilato ciclase veio em 1998, quando os pioneiros Robert Furchgott, Louis Ignarro e Ferid Murad foram agraciados com o prêmio Nobel em fisiologia e medicina. O NO, entretanto, recebeu reconhecimento mundial já em 1992, quando foi eleito “molécula do ano” pela revista *Science* (95).

O NO é um gás incolor multifuncional de natureza lipofílica, ou seja, ele é capaz de difundir-se facilmente entre as células. Na célula, o NO é sintetizado a partir da L-arginina por diversas enzimas NADPH dependentes denominadas *NO sintases* (NOS) (**Figura 5**). São descritas três isoformas de NOS: a *NOS neuronal* (nNOS ou NOS1), a *NOS induzível* (iNOS ou NOS2) e a *NOS endotelial* (eNOS ou NOS3). As isoformas nNOS e eNOS são constitutivamente expressas (predominantemente nas células neuronais e em células do endotélio vascular, respectivamente) e são denominadas como *NOS constitutivas* (cNOS). A

atividade de cNOS é dependente da concentração de cálcio (Ca^{2+}) citossólico (96), que aumenta em decorrências de diversos estímulos fisiológicos, facilitando a ligação da calmodulina à cNOS. Os dímeros ativos de cNOS ligados à calmodulina produzem NO a partir da L-arginina na presença de co-fatores.

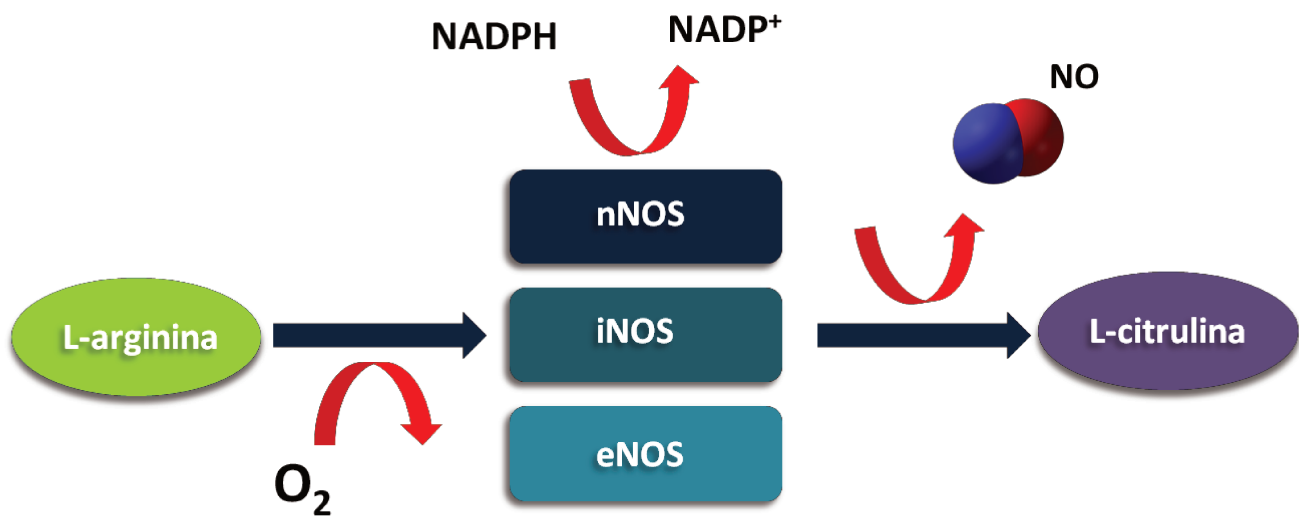


Figura 5. As óxido nítrico sintases e a produção de óxido nítrico. As diferentes isoformas de óxido nítrico sintases catalisam a produção de óxido nítrico e L-citrulina a partir de L-arginina, oxigênio e de NADPH.

A atividade da eNOS é regulada através da localização intracelular pelo tráfego de caveolae, interação com moléculas regulatórias como a proteína estimuladora *heat-shock protein 90* (Hsp90) e do inibidor *caveolin 1*, e por fosforilação (97). Por outro lado, a isoforma iNOS é transcricionalmente regulada e induzida por citocinas inflamatórias, endotoxinas, hipóxia e estresse oxidativo. A iNOS não depende dos níveis intracelulares de Ca^{2+} e produz mais NO do que as cNOS (96).

OS MECANISMOS DE AÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO

Muitos dos processos fisiológicos promovidos pelo NO são mediados por vias de sinalização dependentes de cGMP (98). O NO e seus metabólitos como nitrito, nitrato, S-nitrosotiol, nitrosaminas e peroxinitrito também apresentam papel importante na mediação dos efeitos citotóxicos e/ou genotóxicos do NO como a inibição da respiração mitocondrial, danos à proteínas e ao DNA que resultam em mutações gênicas, perda da função protéica, necrose e apoptose (99,100).

A via de sinalização dependente de cGMP

O NO liga-se com avidéz à subunidade β da enzima *soluble guanylyl cyclase* (sGC), ativando-a (101,102). A ativação da NO-GC aumenta a conversão de GTP em cGMP, que inicia a via de sinalização cGMP resultando em alterações fisiológicas (103,104) como relaxamento vascular e do músculo gastrointestinal liso, inibição da agregação plaquetária, proteção cardíaca contra isquemia/reperfusão e melhora nas funções cognitivas. Evidências sugerem que grande parte desses efeitos são mediados pela ativação da *cGMP-dependent protein kinase* (PKG) (105).

A S-nitrosação

O NO (ou, de forma mais correta, as espécies reativas de NO) também atua através da S-nitrosação dos resíduos de cisteína de proteínas alvo. Essa modificação pós-traducional já era reconhecida há 20 anos para a albumina por pesquisadores que acreditavam em sua implicação no controle da função protéica e na atividade celular, mas as pesquisas na área eram desfavorecidas em decorrência de dificuldades metodológicas (106). Na última década,

porém, com o estabelecimento de um novo método para identificar proteína S-nitrosadas, o número descrito de substratos passíveis de serem S-nitrosados aumentou surpreendentemente (107,108), corroborando a hipótese de uma regulação ubíqua e da presença de sítios tióis ativos nas diferentes classes de proteínas.

O “*Biotin Switch Method*” ou “método da troca por biotina” foi desenvolvido por Samie Jaffrey e Solomon Snyder em 2001 para a detecção de proteínas S-nitrosadas(109). O método é composto por 3 passos principais (**Figura 6**). No **passo 1**, os tióis livres presentes nas proteínas são bloqueados pela incubação com o agente metil metanotiosulfonato (MMTS). Nas condições utilizadas, o MMTS não é capaz de reagir com os nitrosotióis ou com as pontes dissulfeto pré-existent. Após o bloqueio dos tióis livres, as ligações dos nitrosotióis são seletivamente decompostas pela adição de ácido ascórbico (**passo 2**), resultando na redução dos nitrosotióis em tióis livres. No **passo 3**, os tióis recém formados reagem com o agente sulfidril-biotinilante específico *N*-[6-(biotinamido)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)propionamide (biotin-HPDP). Uma vez que o MMTS compete com a biotin-HPDP pelos grupamentos tióis, é necessário remover o MMTS completamente através da precipitação das proteínas com acetona. As proteínas marcadas podem ser facilmente precipitadas com estreptavidina e detectadas por *immunoblotting* com os anticorpos específicos.

As pesquisas mais recentes envolvendo a biologia do NO refletem uma noção cada vez mais clara de que a S-nitrosação é uma modificação pós-traducional de proteínas precisamente regulada no tempo e no espaço (110,111). A regulação temporal (relacionada ao estímulo) da S-nitrosação e denitrosação e a regulação espacial (alvo) desse processo entre as proteínas conferem especificidade para os efeitos derivados do NO.

A GSNO é considerada a principal SNO não-protéica da célula, tendo sido inicialmente identificada nas vias aéreas humanas (112). Liu e colaboradores (113) descobriram que a proteína *S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase (ADH3)* funciona como uma *GSNO reductase* (GSNOR) específica que metaboliza GSNO. É importante ressaltar que apesar dessa enzima não agir em substratos proteína-SNO, a deficiência de GSNOR resulta em aumento dos níveis intracelulares de proteína-SNO em condições basais, demonstrando a existência de um equilíbrio celular baseado na transferência de grupamentos NO entre as populações de proteínas tióis e SNO de baixo peso molecular. A denitrosação pode ser conduzida pela *oxidoreductase thioredoxin* (TRX) e pela SOD, proteínas capazes de liberar NO de SNO de baixo peso molecular *in vivo*.

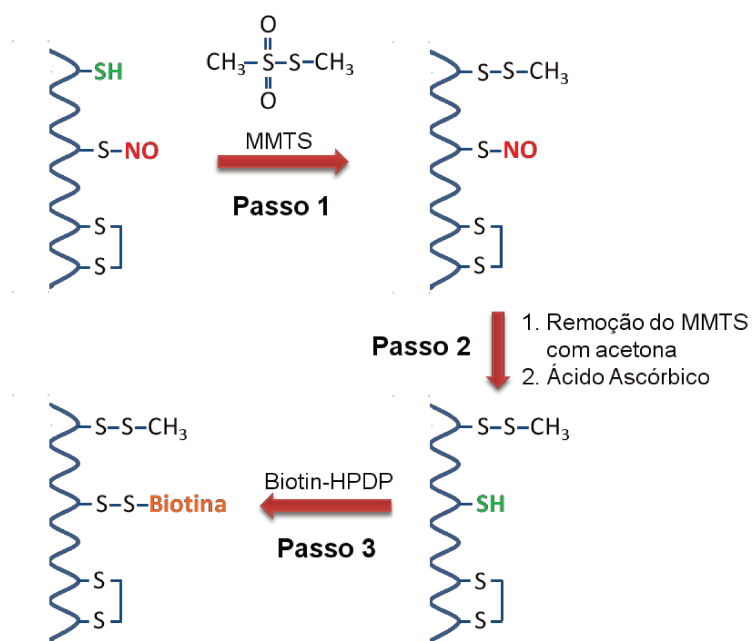


Figura adaptada de: Jaffrey, S.R. & Snyder, S.H. The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Sci STKE* 2001, p11 (2001).

Figura 6. Diagrama esquemático do ensaio de S-nitrosação. Uma proteína hipotética é indicada com cisteínas em conformação de tiol livre, nitrosotiol e formando pontes dissulfeto. No passo preliminar (passo 1), os tióis livres são bloqueados por metiltiolação com MMTS. O MMTS excedente é removido no passo subsequente (passo 2) através de precipitação com acetona. O nitrosotiol é então reduzido com ácido ascórbico formando novamente um tiol livre que reage com a biotin-HPDP (passo 3). As proteínas marcadas são então purificadas com estreptavidina, uma proteína que se liga à biotina, e detectadas por *Western blot* utilizando anticorpo específico.

Considerando as vias de transdução de sinal, a denitrosação não deve ser considerada unicamente como mecanismo de “desligamento” protéico uma vez que algumas proteínas apresentam-se constitutivamente *S*-nitrosadas em seu estado basal e tornam-se denitrosadas em resposta a um estímulo específico, facilitando a transmissão do sinal.

***S*-nitrosação: determinantes de especificidade**

Considerando a possibilidade de reações químicas ocorrerem em praticamente todas as moléculas contendo grupamento tiol nas células, no passado não se acreditava que o NO poderia modular tióis de proteínas com especificidade suficiente para funcionar com um regulador pós-traducional eficiente da função protéica. Entretanto, nos últimos anos tornou-se clara a presença de mecanismos que impõem barreiras temporais e espaciais para o acesso do NO aos seus alvos protéicos apropriados. Assim, apesar de uma ou mais isoformas de NOS residirem na maioria dos tipos celulares e grande parte das proteínas apresentarem resíduos de cisteína, a especificidade de substrato é uma característica marcante da *S*-nitrosação endógena de proteínas. Além disso, nas proteínas nas quais o sítio (ou sítios) de *S*-nitrosação foi identificado, a modulação de suas funções em condições fisiológicas resulta da modificação de uma ou de poucas cisteínas (108,114). Os principais determinantes de especificidade caracterizados são: interações eletrostáticas que controlam o pKa (nucleofilia) de tióis, compartimentalização hidrofóbica (114), reguladores alostéricos (por exemplo, Ca^{2+} , Mg^{2+} , e O_2 /redox) que modulam a acessibilidade ou reatividade do tiol (115) e interações entre NOS e proteínas que são alvos da *S*-nitrosação. Assim, a seletividade da *S*-nitrosação entre proteínas é determinada também pela co-localização das fontes de NO e seus alvos em compartimentos subcelulares (108).

Estudos recentes apontam, ainda, para a transnitroação cisteína-cisteína, na qual o grupamento NO é transferido também entre proteínas *S*-nitrosadas. Trata-se, portanto, de um novo mecanismo no qual proteínas-SNO são consideradas nitrosilases (116). Assim, as NOS ligam-se aos seus substratos, que são *S*-nitrosados. A nitroação das proteínas induz novas interações proteína-proteína. Em contrapartida, novas proteínas nitrosadas são sujeitas a regulação alostérica e podem funcionar como nitrosilases, propagando o sinal baseado no NO. A analogia com a fosforilação é direta: modificação pós-traducional que regula a função protéica e, em particular, a interação proteína para a propagação de sinal através de outras modificações pós-traducionais à jusante. Além disso, a disparidade entre o trio de enzimas NOS e o grande número de proteínas quinase é resolvida pelas numerosas possibilidades combinatórias entre as cisteína-nitrosilases e seus substratos.

Óxido nítrico: nova ferramenta de combate ao câncer?

Apesar de suas funções fisiológicas em mecanismos envolvendo o vasorelaxamento, neurotransmissão, inibição da agregação plaquetária e defesa imune serem bem estudadas, o NO também atua como uma molécula mensageira intracelular em diversas células de praticamente todos os sistemas do organismo. Diversos estudos têm reportado uma função importante, ainda que discrepante, do NO tanto na promoção quanto na inibição da progressão tumoral e metástase (117). O efeito do NO nas células, em especial nas células tumorais, depende da atividade e localização das isoformas NOS, da concentração e duração da exposição ao NO, e da sensibilidade celular ao NO. Assim, enquanto a ativação da sinalização pelo NO é capaz de induzir citotoxicidade de células tumorais e de sensibilizar as

células tumorais a outros tratamentos, como a radiação, o bloqueio da sinalização pelo NO pode inibir a transformação neoplásica e a angiogênese.

Em meados da década de 50, Krebs e Fischer fizeram a descoberta seminal de que as fosforilases a e b do glicogênio eram de fato as formas fosforilada e nativa, respectivamente, da mesma enzima (118). Apesar da importância dessa descoberta não ter sido reconhecida prontamente, ela serviu como ímpeto para mais de meio século de pesquisas que estabeleceram a *O*-fosforilação dos resíduos de serina, treonina e tirosina como tendo papel crucial na regulação de essencialmente todas as funções celulares (119). Dezenas de milhares de artigos publicados têm desde então revelado as implicações da *O*-fosforilação no controle da atividade protéica e atestaram o aparecimento evolutivo desse modelo de modificação pós-traducional de proteínas. Esse conhecimento e as descobertas recentes no campo do NO forneceram idéia de como a especificidade da *S*-nitrosação de proteínas celulares de mamíferos é alcançada. Assim como a semente plantada por Krebs e Fischer no campo da fosforilação de proteínas, a *S*-nitrosação tem revelado ser uma modificação pós-traducional ubíqua e fundamental que influencia inúmeras funções celulares chave. Neste sentido, considerando que via de sinalização intracelular PI3K-Akt-mTOR é classicamente relacionada não apenas ao controle de processos como crescimento e proliferação celular, mas também à sobrevivência da célula, o entendimento das alterações geradas pela presença do NO nas proteínas da via, principalmente na proteína mTOR, é fundamental para compreender o papel do gás no comportamento das células cancerígenas.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Analisar os efeitos do óxido nítrico na proliferação e viabilidade de linhagens tumorais humanas e avaliar o efeito da S-nitrosação da proteína mTOR em sua atividade quinase.

Objetivos específicos

- ✓ Verificar se a proteína mTOR é passível de S-nitrosação por doadores de óxido nítrico;
- ✓ Analisar os efeitos de doadores exógenos de NO na viabilidade celular de linhagens tumorais humanas;
- ✓ Analisar os efeitos de doadores exógenos de NO na proliferação de linhagens tumorais humanas;
- ✓ Analisar os efeitos de doadores exógenos de NO na apoptose de linhagens tumorais humanas;
- ✓ Analisar o efeito de doadores exógenos de NO na fosforilação das proteínas mTOR e p70S6K;
- ✓ Analisar os efeitos da S-nitrosação do mTOR na atividade protéica e seus impactos na via de sinalização Akt-mTOR-p70S6K.

S-nitrosation of mTORC1 reduces cancer cell proliferation

Marília M. Dias¹, Guilherme Z. Rocha¹, Gabriela F. P. de Souza², Mario J. A. Saad¹, Marcelo G. Oliveira², José B. C. Carvalheira¹.

¹Internal Medicine Department, State University of Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

²Institute of Chemistry, State University of Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

Running title: S-nitrosation of mTORC1 reduces cancer cell proliferation

Keywords: cancer, nitric oxide, mTOR

Financial support: *Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq).*

Please address correspondence to: José B. C. Carvalheira, M.D., Departamento de Clínica Médica, FCM-UNICAMP, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, SP, Brazil, 13081-970, Phone: +55 19 3521 9589, Fax: +55 19 35218950, e-mail: carvalheirajbc@uol.com.br

Disclosure of potential conflicts of interest: The authors declare no potential conflict of interest.

ABSTRACT

S-Nitrosation is a dynamic and reversible post-translational modification of proteins that controls important cellular functions through the modification of cysteine thiol side chains by nitric oxide (NO). mTOR signaling pathway deregulation is involved in various cancer types and contributes to cancer cell proliferation as well as growth factor independence. The aim of this work was to analyze the mechanisms by which *S*-nitrosogluthatione (GSNO) affects mTOR function. *S*-nitrosation of mTOR was assessed by the Biotin Switch Method. GSNO was shown to *S*-nitrosate mTOR with a consequent time- and dose-dependent decrease in the phosphorylation of mTOR and S6K proteins, which were reversed by the addition of the denitrosating agent DTT. Pre-treatments of cells with the inhibitor of soluble guanylyl cyclase, ODQ, or with the NO scavenger, PTIO, had no effect on the GSNO-mediated decrease in phosphorylation of mTOR and its substrates p70S6K and 4EBP-1. Results also demonstrated that cancer cell line viability decreased after exposure to the NO donors GSNO and *S*-nitroso-*N*-acetyl-cysteine (SNAC), altering proliferation and increasing cell death. PC-3, MCF-7 and MDA-MB-468 cell lines, which have mutations in the PI3K-mTOR pathway, showed a greater response to GSNO. Therefore, *S*-nitrosation is a novel post-translational modification capable of modulating mTOR activity, with possible therapeutic implications.

INTRODUCTION

Nitric oxide (NO) is a biological signaling molecule synthesized from L-arginine, NADPH and oxygen by the enzyme NO synthase (NOS) (1). NO was first described as a powerful pulmonary vasodilator (2, 3) and neurotransmitter. It reacts with different molecules to form reactive nitrogen species (RNS) that can induce potent cytotoxic effects and post-translational protein modifications, such as nitration and S-nitrosation (4-6). NO also has diverse physiological and pathophysiological roles and molecules capable of transferring the nitrosonium cation (NO^+) to cysteine residues of proteins can lead to their inactivation as already shown to various metabolic enzymes (7, 8), cysteine proteases (9), and phosphatases (10, 11). The accumulation of experimental findings of these reactions has led to the proposal that S-nitrosation may be a post-translational process similar to phosphorylation, capable of regulating a large array of biological processes including tumorigenesis (5, 12, 13).

NO/RNS has a central role in the promotion of inflammation-induced diseases, such as cancer (5, 6). Depending on the cancer genetic background, the microenvironment and the subcellular levels of NO/RNS, NO/RNS induces pro- or anti-tumorigenic effects (4, 5). Therefore, evaluating the post-translational modifications induced by S-nitrosation in signaling pathways involved in carcinogenesis, such as the mTOR signaling pathway, is essential to better understand the opposite outcomes of NO/RNS in carcinogenesis.

Deregulation of the mTOR pathway occurs in diverse human diseases where growth is deregulated and homeostasis is compromised, such as cancer and metabolic diseases (14). In mammalian cells mTOR is regulated by growth factors and hormones. Association of growth factors to their receptors results in phosphorylation and recruitment of IRS1 to cell membrane (15), creating recognition motifs for the binding of key molecules such as the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K).

PI3K activation regulates the phosphorylation and activation of Akt, the protein kinase that directly phosphorylates and inhibits TSC2 (16, 17). Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) lipid phosphatase counteracts PI3K signals(18), and is considered an important tumor suppressor in the PI3K-Akt pathway. Inactivation of the TSC1-TSC2 complex by Akt allows Rheb-GTP to accumulate and activate mTOR (17).

The target or rapamycin (TOR) proteins are evolutionarily conserved protein kinases that assembles two distinct multiprotein complexes responsible for the regulation of different branches of the mammalian TOR (mTOR) network. The mTOR complex 1 (mTORC1) consists of mTOR, the regulatory-associated protein of mTOR (raptor), the G protein β -subunit-like protein ($G\beta L$) (19) and the proline-rich protein kinase B (PKB, also known as Akt) substrate 40 kDa (PRAS40) (20), and regulates cell growth through effectors such as p70S6K1 (15) and eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4EBP-1). The mTOR complex 2 (mTORC2) contains mTOR, the rapamycin-insensitive companion of mTOR (rictor) (21), the mammalian stress-activated protein kinase (SAPK)-interacting protein-1 (mSIN1) (22) and $G\beta L$, and is critical for the regulation of the pro-survival kinase Akt/PKB (23).

S-nitrosation modulates the activity of various upstream proteins involved in mTOR cascade signaling, such as IRS-1 (24), Akt (25) and phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) (26, 27) activity, however, the role of NO on the mTOR kinase remains unclear. In the present study, we report that mTOR is sensitive to NO and that its enzymatic activity is reduced by S-nitrosation, which leads to reduced cancer cell proliferation.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Anti-phospho-ACC(Ser79), anti-phospho-Akt(Ser473), anti-phospho-AMPK(Thr172), anti-phospho-mTOR (Ser2448), anti-phospho-mTOR (Ser2481), anti-phospho-PRAS40(Thr246), anti-phospho-p70S6K(Thr389), anti-phospho-raptor(Ser792), anti-phospho-4EBP-1(Thr37/46), and other antibodies were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA) unless otherwise specified. Anti-iNOS (C-12) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). CHAPS, Biotin-HPDP, methanethiosulfonate (MMTS), and NeutrAvidin-agarose resins were from Pierce Biotechnology (Rockford, IL). Compound C was from Calbiochem (La Jolla, CA). 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ), 3-[4,5-dimethylthazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), and PTIO were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). K-LISATMmTOR (Recombinant) Activity Kit was purchased from EMD Chemicals USA (Gibbstown, NJ). FITC Annexin V and propidium iodide (PI) were purchased from BD Biosciences Pharmingen (Franklin Lakes, NJ). CFSE and fetal bovine serum (FBS) were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA).

Cell lines and cell culture. MCF-7, PC-3, CACO-2, HT-29, and A549 were obtained from Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ). DU145 and MDA-MB-468 were obtained from American Type Cell Culture Collection (ATCC). MCF-7, MDA-MB-468, DU145, and CACO-2 were maintained in DMEM, PC-3 and A549 in RPMI 1640, and HT-29 in McCoy's 5A supplemented with 10% FBS. All cell lines were grown in humidified atmosphere at 37°C in 5% CO₂.

Synthesis of GSNO and SNAC. GSNO was synthesized through the S-nitrosation of reduced GSH by an equimolar amount of acidified (HCl) sodium nitrite. GSNO formed in the reaction was precipitated with

acetone, vacuum filtered and washed firstly with cold water and finally with acetone (28). The solid GSNO obtained was freeze-dried for 24 hours, stored -20°C, and used to prepare fresh solutions at the desired concentrations. SNAC was synthesized in a similar process through the S-nitrosation of NAC by acidified (HCl) sodium nitrite. The solutions were always prepared immediately before use. Freshly prepared GSNO and SNAC solutions in DMEM medium, pH 7.4, were added to the cell cultures to attain the final concentrations desired.

Immunoblotting. Protein samples were homogenized in extraction buffer (10 mM EDTA, 100 mM Tris base, 10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 5 mM sodium orthovanadate, 2 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinin, 1% Tween-20), and protein concentration was determined by 600nm assay from Pierce Biotechnology (Rockford, IL). Before immunoblotting, 5x Laemmli sample buffer was added, and samples were boiled for 5 min. Protein samples were separated by SDS-PAGE and blotted onto a nitrocellulose membrane. The membrane was incubated under stirring with a specific antibody overnight at 4°C, followed by incubation for 2 h with the horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, and visualized using the ECL Western blotting substrate from Pierce Biotechnology (Rockford, IL).

MTT viability assay. Cell viability was measured by quantitative colorimetric MTT assay. Approximately 2×10^4 cells were seeded in 24-well plates containing 1mL of specific complete medium. Cells were allowed to attach overnight before treatment at the indicated dose and time. Subsequently, cells were treated with 0.3 mg/mL of MTT for 4 h at 37°C. The supernatant was removed, and the insoluble

Formazan product dissolved in ethanol with gentle shaking at room temperature. The absorbance was measured using a microplate reader at 570 nm.

Flow cytometry. For the cell death assay, exponentially growing cells were exposed to various treatments as indicated in the legend of Figure 6, trypsinized and centrifuged at 200g for 5 min. The cell pellet was resuspended in binding buffer (10 mM Hepes, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2) and stained with 5 μl propidium iodide (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 5 μl FITC annexin V (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 15 min at room temperature. Cell death was determined by flow cytometry analysis using FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA). For the CFSE proliferation assay, approximately 1×10^5 exponentially growing cells were seeded in 6-well plates and allowed to adhere overnight. The culture medium was removed and cells labeled with 2 μM CFSE by incubation for 15 minutes at 37°C. Labeling was quenched with DMEM supplemented with 10% FBS and the cells were exposed to specific treatments. FACS analysis was performed after 72 hours of incubation.

Co-immunoprecipitation and Western Blotting. For co-immunoprecipitation studies, whole-cell extracts were prepared in 0.3% CHAPS buffer (10 mM EDTA, 100 mM Tris base, 10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 5 mM sodium orthovanadate, 2 mM PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 0.3% CHAPS) and immunoprecipitated with the anti-mTOR antibody. Precipitated proteins were washed four times in washing buffer (2 mM sodium orthovanadate, 100 mM Tris base, 1 mM EDTA, 0.3% CHAPS), loaded onto 8% SDS-PAGE gels, transferred onto a nitrocellulose membrane and detected with ECL Western blotting detection substrate from Pierce Biotechnology (Rockford, IL).

Biotin switch assay. The Biotin Switch Method was performed as previously described (29). In brief, protein samples were homogenized in extraction buffer (250 mM Hepes-NaOH pH 7.7, 1 mM EDTA, 0.1 mM neocuproine, 0.4% CHAPS, 1% [v/v] protease inhibitor cocktail), and all free SH groups were chemically blocked by treatment with MMTS. Subsequently, nitrosothiols were reduced to free SH group by treatment with ascorbate. The resulting newly formed SH groups were then biotinylated with a sulfhydryl-specific reagent, biotin-HPDP. The introduced biotin serves as a placeholder that identifies thiol residues that had been S-nitrosylated in proteins at the time of cell lysis and helps to concentrate the proteins by affinity precipitation with immobilized NeutrAvidin-agarose beads. The biotinylated proteins obtained were then resolved by SDS-PAGE.

mTOR kinase assay. The assay was performed following the manufacturer's procedure. Briefly, 100 μ l of recombinant p70S6K-GST fusion protein was incubated in the glutathione-coated 96-well plate for 1 hour, at room temperature. 100 ng of human recombinant mTOR kinase in the presence of 10 μ M wortmannin (positive control), 1 mM GSH or GSNO at concentrations 10 μ M, 100 μ M, 1000 μ M was added to each well. The reaction was initiated by the addition of 50 μ l kinase assay buffer containing 100 μ M ATP, and incubated for 30 min at 30°C. After being washed, the plate was treated with 100 μ l of anti-p70S6K-T389 for 1 hour and then with 100 μ l of HRP-conjugated antibody to detect the T389-phosphorylated p70S6K. Finally, 100 μ l of TMB was added and incubated for 20 minutes. The reaction was stopped by the addition of 100 μ l ELISA stop solution. Absorbance was measured at 450nm and 595nm using a microplate spectrophotometer.

Statistical analysis. Unless otherwise stated, all experiments were repeated three times after experimental conditions were optimized. Statistical analysis was performed by using one-way ANOVA and *Bonferroni* post hoc test for comparison of means. The level of significance adopted was $p < 0.01$.

RESULTS

S-nitrosation of mTOR reduces the kinase activity of the protein

The biotin switch method was used to characterize the possible post-translational modification of mTOR associated with its S-nitrosation by GSNO. Figure 1 shows that exposition of human breast cancer MCF-7 cell line, and prostate cancer PC-3 and DU145 cell lines to increasing doses of GSNO led to a dose-response increase in the S-nitrosation of mTOR compared to basal levels. Cells treated with the highest dose of GSNO were also blocked and labeled in the absence of ascorbate to confirm that signals in the assay were S-nitrosation specific (Figure 1A). Moreover, cells treated with glutathione (GSH) showed no S-nitrosated mTOR, as expected, while the S-nitrosation observed by the addition of GSNO was reversed by the incubation with the reducing agent dithiothreitol (DTT) in both PC-3 and DU145 cell lines (Figure 1B).

To investigate the role of S-nitrosation in the regulation of mTOR kinase activity, the immunopurified protein was treated with increasing concentrations of GSNO, in the range 10-1000 μ M, and the kinase activity towards p70S6K was analyzed (Figure 1C). Treatment with GSNO resulted in a dose-dependent inhibition of mTOR kinase activity, and at the concentration of 1 mM GSNO led to a 43% decrease in the kinase activity of mTOR compared to the vehicle.

Exogenous NO donors decrease the viability of human cancer cell lines

Activation of the Akt/mTOR pathway is fundamental to the proliferation program. To determine whether GSNO affects cancer cell viability, human tumor cell lines were incubated with increasing doses of GSNO for 48 hours and the MTT assay performed. All the cell lines showed significant reduction of cell viability ($p < 0.01$) when treated with doses higher than 250 mM GSNO compared with

the control group (Figure 2A). Although all cell lines analyzed showed a dose-dependent decrease in cell viability, the reduction of cell viability of MDA-MB-468 (79%), MCF-7 (86%) and PC-3 (87%) cell lines after 2 mM GSNO treatment compared to the untreated group was particularly elevated. Interestingly, PC-3 and MDA-MB-468 cell lines are both PTEN-negative while MCF-7 harbors an activating mutation of the *PIK3CA* gene that encodes phosphoinositide 3-kinase (PI3K). PTEN is the tumor suppressor that acts as an antagonist of PI3K (30) and its deletion or increased PI3K activation are both related to promotion of mTOR phosphorylation.

The MCF-7, PC-3, and DU145 cell lines were also exposed to another NO donor, S-nitroso-N-acetyl-cysteine (SNAC), and, again, a dose-dependent decrease in cell viability was observed (Figure 2B). GSH (Figure 2C) and N-acetyl-cysteine (NAC) (Figure 2D) showed no effect on cell viability compared to the control group.

We next asked if the decreased cell viability observed after cell exposure to NO donors was related to an increase in cell death or a decrease in cell proliferation. The MCF-7, PC-3 and DU145 cell lines were analyzed by flow cytometry. The NO donor decreased cell proliferation, as shown by the CFSE proliferation assay (Figure 2E). For apoptosis analysis, cells were simultaneously stained with FITC annexin V and propidium iodide (PI) following 72 hours GSNO treatment. Cells in the lower-right quadrant (PI-negative / FITC annexin positive) were considered as early apoptotic and cells in the upper-right quadrant (both PI and FITC annexin positive) were considered as late apoptotic. As shown in Figure 2F, all cell lines showed a dose-dependent increase in the apoptotic cell death levels compared to the untreated group.

NO inhibits the Akt/mTOR pathway in a time- and dose-dependent manner

To further support a role for S-nitrosation in regulating mTOR kinase activity, we next analyzed whether exposure of cells to GSNO led to decreased phosphorylation of mTOR substrates. Phospho-Akt (Ser473), phospho-mTOR (Ser2448), phospho-p70S6K (Thr389), and phospho-4EBP-1 (Thr37/46) levels were analyzed by Western blot after treatment of MCF-7, PC-3, and DU145 cells with 1 mM GSNO for 30 minutes, 1, 2, or 4 hours. As shown in Figure 3A, treatment with the NO donor resulted in a time-dependent reduction of mTOR, p70S6K, and 4EBP-1 phosphorylation. The Akt phosphorylation slightly increased after NO exposure in PC-3 and DU145 cell lines, but further decreased compared with the untreated group.

Cells were also treated with increasing concentrations of GSNO for 1 hour and the phosphorylation levels of proteins were analyzed by Western blot. The GSNO also attenuated the mTOR and p70S6K phosphorylation in a dose-dependent manner (Figure 3B). The Akt protein showed a dose-dependent increase in its Ser473 phosphorylation in all cell lines studied after addition of the compound; phosphorylation was dramatically blunted when high concentrations were used.

NO inhibition of the mTORC1 complex is independent of cGMP and is not related to NO derivatives

NO promotes many physiological processes—including smooth-muscle relaxation, inhibition of platelet aggregation and adhesion—through the activation of the NO-cGMP signaling pathway (31). In order to verify if the effect of NO on phosphorylation of Akt, mTOR, and p70S6K is related to the activation of the NO-cGMP pathway, the cell lines were incubated with the inhibitor of guanylyl cyclase, ODQ. As shown in figure 4A, ODQ failed to block the effects of the GSNO on the reduced mTOR

and p70S6K phosphorylation, indicating that the inhibitory effect of the NO donor is cGMP-independent. However, inhibition of guanylyl cyclase resulted in significant attenuation of the GSNO effect on Akt phosphorylation, indicating the involvement of cGMP in GSNO-mediated Akt inactivation. As mTORC2 regulates Akt by phosphorylation on Ser473, these results reveal that the complex activity is probably not affected by NO through S-nitrosation.

Several cytotoxic and/or genotoxic effects of NO in the cells are mediated by NO and NO metabolites such as nitrite, nitrate, nitrosamines, S-nitrosothiols and peroxynitrite. The NO donor GSNO spontaneously decomposes at physiological pH to produce NO. To eliminate the possibility that the observed inhibition of the p70S6K activity by GSNO is due to NO release from the GSNOs or other NO_x species subsequently formed, the effects of the NO scavenger PTIO (32) on the GSNO effect was tested (Figure 4B). PTIO is an effective scavenger of NO, and as such, exposure to PTIO should scavenge all free NO available in the cell culture medium and eliminate the direct participation of NO in the regulation of the mTORC1. S-nitrosation of the target proteins, however, could escape the scavenging of NO in the cells and subsequently, in appropriate physiological conditions, may deliver NO to the proteins as needed for the signaling cascade. Cells treated in the absence and presence of PTIO together with GSNO showed no difference in the phosphorylation of p70S6K, demonstrating that this effect is not related to NO metabolites.

To further substantiate our conclusion that inactivation of mTOR after exposure to high concentrations of NO is dependent on S-nitrosation, we investigated the effect of DTT on the phosphorylation of p70S6K. DTT is a reducing agent that reverses the SNO bond to SH. Cells were pre-treated with 1 mM GSNO for 1 hour in DMEM and then washed with PBS. DTT was then added for 20 minutes before cell extraction. The excess of DTT competes with endogenous thiols for S-nitrosation.

As shown in Figure 4C, the incubation with DTT restored the kinase activity of the mTOR for its substrate, p70S6K. Inhibition of the mTOR kinase activity by the NO donor and its reversal by DTT correlates well with simultaneous S-nitrosation and denitrosation of the kinase (Figure 4C). Moreover, the addition of DTT not only decreased the effect of the GSNO on the phosphorylation of Akt, mTOR and S6K but also reversed the effect of the NO donor over the proliferation of the cell lines.

The inhibitory effect of NO over mTOR is independent of PI3K/Akt and AMPK proteins

To further test if the inhibitory effect of the NO donor is independent of the decreased Akt activity we activated mTORC1 by the addition of leucine. PC-3 cell lines were pre-treated with leucine for 3 hours before treatment with GSNO for another 2 hours (Figure 5A). As expected, addition of leucine increased the phosphorylation of mTOR, p70S6K, and 4EBP-1, and slightly decreased the phosphorylation of Akt. Treatment with GSNO, however, inhibited leucine-induced activation of p70S6K. This finding shows that the reduced phosphorylation of p70S6K by GSNO is not related to upstream signaling from Akt. Surprisingly, the addition of GSNO to the leucine pre-treated cell lines increased phospho-Akt levels. The phosphorylation of 40kDa Pro-rich Akt substrate (PRAS40) Thr246, a substrate of Akt, was also increased by the presence of both GSNO and leucine compared to GSNO treatment alone. Dibble and colleagues (33) showed that S6K mediates the phosphorylation of rictor on Thr1135, another mechanism of feedback regulation between mTORC1 and Akt signaling. The reduction on p70S6K phosphorylation by NO may release this negative feedback, allowing leucine to increase Akt phosphorylation by an unknown mechanism. It also explains the increased phosphorylation of mTOR in both Ser2481 and Ser2448 in the presence of leucine and GSNO. These observations indicate that the inhibitory effect of the NO donor over mTOR and p70S6K is Akt-

independent, yet it also affects the Akt activity. Our data reveal that S-nitrosation of mTOR decreases the activity of the mTORC1 besides the phosphorylation status of the protein by Akt upstream signaling.

The GSNO treatment also increased raptor phosphorylation, which coincides with the observed increase in the 5'AMP-activated protein kinase (AMPK) activation, the kinase responsible for the raptor phosphorylation in Ser792. Thus, we hypothesized that if GSNO increases AMPK activity, the mTOR-mediated decrease in phosphorylation could be related to the inhibitory effect of the AMPK kinase. To determine if AMPK is required for the NO activity, we pre-treated cells with compound C, an AMPK inhibitor, and treated them with the NO donor for 2 hours. As expected, pre-treatment with compound C inhibited AMPK (Thr172) phosphorylation, reducing phospho-Acetyl CoA Carboxylase (Ser79) and phospho-Raptor (Ser792) levels. Nevertheless, pre-treatment with compound C did not reverse the effect of GSNO on the mTOR substrate phosphorylation (Figure 5C). These findings are consistent with the hypothesis that the decreased p70S6K phosphorylation results from mTOR S-nitrosation and is not related to AMPK activation by NO.

mTOR interacts with iNOS and decreases the kinase activity of the protein

Amino acid availability and mitochondrial function regulate the activity of p70S6K and 4EBP-1 (34, 35) as well as the strength of the interaction between raptor and mTOR (34). It was also demonstrated that thiol oxidants induced activation of the mTORC1 pathway by inducing a destabilization of the raptor-mTOR interaction, whereas a reducing reagent inhibited the pathway, stabilizing this interaction (36). We next asked if the raptor-mTOR complex is sensitive to an NO donor. We analyzed the amount of raptor in mTOR complexes immunopurified from cells treated with 1 mM

GSNO for 4 hours. The amount of raptor associated to the mTOR complexes treated with GSNO was lower compared with the untreated group (Figure 6A). Thus, our results show that GSNO disrupts the interaction between mTOR and raptor, and this might contribute to the decreased activity of the mTORC1.

Substrate specificity in protein S-nitrosation depends on close proximity of the substrate protein to iNOS. We therefore tested the interaction of mTOR and iNOS by co-immunoprecipitation (Figure 6B). mTOR immunoprecipitate was obtained from MCF-7 cell lines treated with L-NIL hydrochloride—a relatively selective inhibitor of iNOS—or LPS for 8 hours and the amount of expressed iNOS was analyzed by Western blotting. Supporting the specific interaction between mTOR and iNOS, iNOS was not detected in mTOR immunoprecipitate obtained using control antibodies. iNOS was detected in the LPS-treated immunoprecipitate but not in L-NIL hydrochloride-treated group. Our finding of decreased interaction between mTOR and iNOS after treatment with L-NIL led us to look for phosphorylation of p70S6K in the presence of the iNOS inhibitor. Increasing doses of L-NIL enhanced the phosphorylation of mTOR substrates, p70S6K, and 4EBP-1 in a dose-dependent manner (Figure 6C).

DISCUSSION

The TOR protein kinase has the ability to simultaneously sense energy, nutrients, stress and—in metazoans—growth factors. For this reason, the TOR signaling pathway is responsible for linking energy and nutrient abundance to the execution of cell growth and division in all eukaryotes. mTORC1 and mTORC2 exert their actions by regulating other important kinases such as p70S6K and Akt, respectively, and deregulation of the mTOR pathway occurs in diverse human diseases.

Reactive nitrogen species (RNS) and reactive oxygen species (ROS) are generated by

mammalian cells as by-products of metabolism and can elicit electrophilic and oxidative modifications of protein cysteine thiols, affecting the physiological function of proteins and impacting upon diverse physiological pathways as well as contributing to pathological states (5, 37-40). Reversible modifications of cysteines are associated with homeostatic maintenance by means of cellular redox state. Here we show, for the first time, that mTOR is affected by its *S*-nitrosation after incubation with GSNO. Because *S*-nitrosation of mTOR reduces its enzymatic activity, it can be considered that GSNO might contribute to the decreased proliferation of different human cancer cell lines, and that at local milimolar concentrations GSNO may also increase cell death.

The generation of reactive nitrogen species such as nitrosonium ion (NO^+) and peroxynitrite (OONO^-) by oxidative stress facilitates nitrosative post-translational modifications including *S*-nitrosylation, *S*-nitrosation, and tyrosine nitration(41); these mechanisms have been classified as cGMP-independent. Endogenous NO or free NO released by exogenous NO donors modify the activity of enzymes through mechanisms that are dependent on cGMP signaling via coordination of NO with the heme group of guanylyl cyclase (an *S*-nitrosylation reaction).

The absence of *S*-nitrosation of mTOR without treatment of the homogeneized proteins with ascorbate is an evidence for the existence of reactive cysteine residues in mTOR that were *S*-nitrosated by GSNO (Eq. 1). The consequent loss of kinase activity after incubation of the cells with GSNO also shows that such cysteine residues are fundamental for the activity of the catalytic subunit of the mTOR complexes.



It must be noted that a certain amount of *S*-nitrosated mTOR is already present in the cells that were not incubated with GSNO, although this amount is clearly smaller than the amount obtained in incubation with 10 μ M GSNO (Figure 1A). This basal level of *S*-nitrosated mTOR is probably assigned to the basal level of nitrosative processes present in the cells, in normal culture conditions. These results are reinforced by the observation in Figure 1B that the extent of *S*-nitrosation of mTOR is greatly reduced after treatment with DTT, meaning that *S*-nitrosated mTOR is reduced back to mTOR-Cys-SH by DTT, as expected. It must also be noted that an equivalent decrease in the kinase activity of mTOR compared to the vehicle was achieved for 100 μ M GSNO and 10 μ M Wortmannin. As Wortmannin is a direct inhibitor of mTOR (42), GSNO can be considered to exert a relatively strong inhibition of mTOR activity.

Here, we show that the presence of the selective inhibitor of NO-sensitive guanylyl cyclase or the addition of a NO scavenger did not reverse the inhibition of the mTOR caused by GSNO; these findings further corroborate the hypothesis that GSNO modulates the mTORC1 by *S*-nitrosation, and not by the presence of free NO found inside the cell.

Different cell lines treated with increasing doses of GSNO showed decreased p70S6K and 4EBP-1 phosphorylation. The Akt phosphorylation increased when exposed to concentrations as high as 500 μ M GSNO. However, the Akt activity decreased after exposure to higher concentrations of GSNO (> 1 mM), and this is consistent with recent reports showing that the protein can also be modulated by *S*-nitrosation (25, 27). Numajiri and colleagues (27) showed that PTEN is highly sensitive to relatively low concentrations of NO and that the enzymatic activity of the phosphatase is inhibited by the resulting *S*-nitrosation of Cys-83. Because *S*-nitrosation of PTEN inhibits its enzymatic activity, they also observed that low concentrations of NO result in increased Akt activity. However, *S*-nitrosation of Akt results in

inhibition of its activity (24, 25, 43). As such, high concentrations of NO are necessary to S-nitrosate both Akt and PTEN. Thus, in the presence of low (physiological) concentrations of NO, SNO-PTEN formation would enhance Akt signaling activity, whereas high (pathological) levels of NO would S-nitrosate Akt to directly inhibit its function. Importantly, the reduced kinase activity of mTORC1 was not related to the impairment of the upstream signaling by the Akt S-nitrosation, once NO reduces the complex activity towards p70S6K even when activated by leucine, through an Akt-independent mechanism (44).

The presence of an NO donor also activated the AMPK pathway. Under conditions of energy deprivation, when AMPK is activated by the elevated AMP/ATP intracellular ratio, mTOR activity becomes repressed (45, 46). The link between mTOR inhibition and AMPK activation was first demonstrated with the use of the AMPK activator AICAR (5'-phosphoribosyl-5-aminoimidazole-4-carbox-amide ribonucleoside) (45), connecting protein synthesis and energy sensing functions. However, inhibition of AMPK was not able to reverse the GSNO-dependent reduction of the mTOR kinase activity, further excluding the role of the AMPK on the mTOR inhibition by GSNO.

Recent studies demonstrated that the mTORC1 can be regulated by a redox-sensitive mechanism (36, 47), and that it possibly exists in both reduced and oxidized forms in the cellular environment. Typical intracellular redox regulators (glutathione, thioredoxin, glutathione S-transferase, etc.) can modulate the ratio of oxidized to reduced mTOR during the cellular life cycle depending on the metabolic activities in response to nutrients, the action of growth hormones, or on the influence of stress (47). In our work, the oxidation of the thiol by GSNO decreased the activity of the mTORC1. In summary, although there have been other reports that oxidation increases mTOR activity, our results demonstrate the unique finding that high concentrations of GSNO affect mTOR through S-nitrosation

and hinders cell survival and proliferation.

As mTORC1 activity is elevated in many human tumors (48), there has been much interest in targeting this kinase complex with highly specific inhibitors, such as rapamycin (sirolimus) and its analogues (e.g., temsirolimus and everolimus) (49-51). However, although studies are on-going, these inhibitors have had limited success as cancer therapeutics thus far, and they elicit cytostatic rather than cytotoxic responses. An important recent finding is that rapamycin-derived compounds, which are allosteric inhibitors of mTOR, only partially inhibit mTORC1 function (52). The activation of the upstream proteins of PI3K-Akt pathway by blocking mTORC1-dependent feedback mechanisms is another potential contributing factor to the limited effectiveness of these compounds as single anti-tumor agents (33). The effects of NO over the PI3K-Akt-mTOR pathway are particularly interesting as GSNO is not only capable of decreasing mTORC1 complex activity but in high concentrations it also attenuates IRS-1 (24) and Akt (25) phosphorylation, reversing the feedback loop triggered by p70S6K inactivation on PI3K-Akt signaling (Figure 7). Moreover, GSNO also activates the AMPK signaling pathway, further contributing to the inhibition of mTORC1.

In conclusion, our data highlight an important effect of GSNO on the mTOR signaling pathway. Thus, targeting the mTORC1 with NO donors may be an interesting therapeutic option for cancer therapy as NO can circumvent the main resistance mechanisms triggered by clinically used mTOR inhibitors.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dioze Guadagnini, Luís Janeri and Jósimo Pinheiro for excellent technical assistance.

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

GRANT SUPPORT

Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq).

REFERENCES

1. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994;78(6):915-8.
2. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327(6122):524-6.
3. Pepke-Zaba J, Higenbottam TW, Dinh-Xuan AT, Stone D, Wallwork J. Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. *Lancet* 1991;338(8776):1173-4.
4. Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol* 2002;53(4 Pt 1):503-14.
5. Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2006;6(7):521-34.
6. Lancaster JR, Jr., Xie K. Tumors face NO problems? *Cancer research* 2006;66(13):6459-62.
7. Hao G, Xie L, Gross SS. Argininosuccinate synthetase is reversibly inactivated by S-nitrosylation in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry* 2004;279(35):36192-200.
8. Bauer PM, Buga GM, Fukuto JM, Pegg AE, Ignarro LJ. Nitric oxide inhibits ornithine decarboxylase via S-nitrosylation of cysteine 360 in the active site of the enzyme. *The Journal of biological chemistry* 2001;276(37):34458-64.
9. Mannick JB, Schonhoff C, Papeta N, *et al.* S-Nitrosylation of mitochondrial caspases. *The Journal of cell biology* 2001;154(6):1111-6.
10. Xian M, Wang K, Chen X, *et al.* Inhibition of protein tyrosine phosphatases by low-molecular-weight S-nitrosothiols and S-nitrosylated human serum albumin. *Biochemical and biophysical research communications* 2000;268(2):310-4.
11. Li S, Whorton AR. Regulation of protein tyrosine phosphatase 1B in intact cells by S-nitrosothiols. *Archives of biochemistry and biophysics* 2003;410(2):269-79.
12. Rahman MA, Senga T, Ito S, Hyodo T, Hasegawa H, Hamaguchi M. S-nitrosylation at cysteine 498 of c-Src tyrosine kinase regulates nitric oxide-mediated cell invasion. *The Journal of biological chemistry*;285(6):3806-14.
13. Li F, Sonveaux P, Rabbani ZN, *et al.* Regulation of HIF-1 α stability through S-nitrosylation. *Molecular cell* 2007;26(1):63-74.

14. Dann SG, Selvaraj A, Thomas G. mTOR Complex1-S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer. *Trends in molecular medicine* 2007;13(6):252-9.
15. Um SH, D'Alessio D, Thomas G. Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1. *Cell metabolism* 2006;3(6):393-402.
16. Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Molecular cell* 2002;10(1):151-62.
17. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature cell biology* 2002;4(9):648-57.
18. Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *The Journal of biological chemistry* 1998;273(22):13375-8.
19. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, *et al.* GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Molecular cell* 2003;11(4):895-904.
20. Vander Haar E, Lee SI, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nature cell biology* 2007;9(3):316-23.
21. Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, *et al.* Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 2004;14(14):1296-302.
22. Frias MA, Thoreen CC, Jaffe JD, *et al.* mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol* 2006;16(18):1865-70.
23. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, NY)* 2005;307(5712):1098-101.
24. Carvalho-Filho MA, Ropelle ER, Pauli RJ, *et al.* Aspirin attenuates insulin resistance in muscle of diet-induced obese rats by inhibiting inducible nitric oxide synthase production and S-nitrosylation of IRbeta/IRS-1 and Akt. *Diabetologia* 2009;52(11):2425-34.

25. Yasukawa T, Tokunaga E, Ota H, Sugita H, Martyn JA, Kaneki M. S-nitrosylation-dependent inactivation of Akt/protein kinase B in insulin resistance. *The Journal of biological chemistry* 2005;280(9):7511-8.
26. Lim S, Clement MV. Phosphorylation of the survival kinase Akt by superoxide is dependent on an ascorbate-reversible oxidation of PTEN. *Free radical biology & medicine* 2007;42(8):1178-92.
27. Numajiri N, Takasawa K, Nishiya T, *et al.* On-off system for PI3-kinase-Akt signaling through S-nitrosylation of phosphatase with sequence homology to tensin (PTEN). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*;108(25):10349-54.
28. Shishido SM, Seabra AB, Loh W, Ganzarolli de Oliveira M. Thermal and photochemical nitric oxide release from S-nitrosothiols incorporated in Pluronic F127 gel: potential uses for local and controlled nitric oxide release. *Biomaterials* 2003;24(20):3543-53.
29. Jaffrey SR, Snyder SH. The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Sci STKE* 2001;2001(86):pl1.
30. Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96(8):4240-5.
31. Friebe A, Koesling D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circulation research* 2003;93(2):96-105.
32. Akaike T, Maeda H. Quantitation of nitric oxide using 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide (PTIO). *Methods in enzymology* 1996;268:211-21.
33. Dibble CC, Asara JM, Manning BD. Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1. *Molecular and cellular biology* 2009;29(21):5657-70.
34. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, *et al.* mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 2002;110(2):163-75.
35. Hara K, Yonezawa K, Weng QP, Kozlowski MT, Belham C, Avruch J. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *The Journal of biological chemistry* 1998;273(23):14484-94.
36. Sarbassov DD, Sabatini DM. Redox regulation of the nutrient-sensitive raptor-mTOR pathway and complex. *The Journal of biological chemistry* 2005;280(47):39505-9.

37. Liu L, Yan Y, Zeng M, *et al.* Essential roles of S-nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock. *Cell* 2004;116(4):617-28.
38. Foster MW, McMahon TJ, Stamler JS. S-nitrosylation in health and disease. *Trends in molecular medicine* 2003;9(4):160-8.
39. Gaston B, Reilly J, Drazen JM, *et al.* Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993;90(23):10957-61.
40. Chung KK, Thomas B, Li X, *et al.* S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function. *Science (New York, NY)* 2004;304(5675):1328-31.
41. Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nature reviews* 2005;6(2):150-66.
42. Brunn GJ, Williams J, Sabers C, Wiederrecht G, Lawrence JC, Jr., Abraham RT. Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *The EMBO journal* 1996;15(19):5256-67.
43. Wu M, Katta A, Gadde MK, *et al.* Aging-associated dysfunction of Akt/protein kinase B: S-nitrosylation and acetaminophen intervention. *PloS one* 2009;4(7):e6430.
44. Greiwe JS, Kwon G, McDaniel ML, Semenkovich CF. Leucine and insulin activate p70 S6 kinase through different pathways in human skeletal muscle. *American journal of physiology* 2001;281(3):E466-71.
45. Bolster DR, Crozier SJ, Kimball SR, Jefferson LS. AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *The Journal of biological chemistry* 2002;277(27):23977-80.
46. Rocha GZ, Dias MM, Ropelle ER, *et al.* Metformin amplifies chemotherapy-induced AMPK activation and antitumoral growth. *Clin Cancer Res*;17(12):3993-4005.
47. Dames SA, Mulet JM, Rathgeb-Szabo K, Hall MN, Grzesiek S. The solution structure of the FATC domain of the protein kinase target of rapamycin suggests a role for redox-dependent structural and cellular stability. *The Journal of biological chemistry* 2005;280(21):20558-64.
48. Menon S, Manning BD. Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors. *Oncogene* 2008;27 Suppl 2:S43-51.

49. Stallone G, Schena A, Infante B, *et al.* Sirolimus for Kaposi's sarcoma in renal-transplant recipients. The New England journal of medicine 2005;352(13):1317-23.
50. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, *et al.* Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. The New England journal of medicine 2007;356(22):2271-81.
51. Baselga J, Campone M, Piccart M, *et al.* Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. The New England journal of medicine;366(6):520-9.
52. Guertin DA, Sabatini DM. The pharmacology of mTOR inhibition. Science signaling 2009;2(67):pe24.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. S-nitrosation of mTOR by GSNO decreases the kinase activity of the protein. (A) PC-3, DU145 and MCF-7 cell lines were exposed to increasing concentrations of GSNO for 2 hours and the Biotin Switch Method performed. Ascorbic acid was added as a negative control. Representative blots from three independent experiments; (B) PC-3 and DU145 cell lines were exposed to 1 mM GSH and 1 mM GSNO for 2 h, and S-nitrosation of mTOR was detected by the Biotin Switch Method. 10 mM DTT was added to 1 mM GSNO pre-treated cell lines for 15 min. Representative blots from three independent experiments; (C) 100 ng human recombinant mTOR was treated with increasing concentrations of GSNO or 10 μ M Wortmannin (negative control) and the kinase activity of the protein analyzed with K-LISA™ mTOR activity kit. Data are mean values $\pm$ SD from experiments performed three times in triplicate. * $p < 0.01$ *versus* vehicle.

Figure 2. Exogenous NO donors decrease the proliferation and increase cell death of human cancer cell lines. (A) Human tumor cell lines were exposed to increasing doses of (A) GSNO, (B) GSH, (C) SNAC or (D) NAC for 48 h and cell viability measured by MTT assay. Data are mean values $\pm$ SD from experiments performed in triplicate and repeated at least three times. * $p < 0.01$ *versus* untreated group; (E) PC-3, DU145, and MCF-7 cell lines were pre-treated with 2 μ M CFSE for 20 min and then treated with increasing concentrations of GSNO for 72 h. Cell proliferation was analyzed by flow cytometry. Representative histograms from experiments performed in triplicate and repeated three times; (F) PC-3, DU145, and MCF-7 cell lines were treated with increasing concentrations of GSNO for

72 h and stained with annexin V-FITC and propidium iodide for 15 min. Cell death was analyzed by flow cytometry. Representative dot plots from experiments performed three times.

Figure 3. GSNO decreases the mTOR substrate phosphorylation in a time- and dose-dependent manner. (A) PC-3, DU145, and MCF-7 cell lines were exposed to 1 mM GSNO for the indicated times and the mTOR, Akt, p70S6K, and 4EBP-1 phosphorylation detected by Western blot; (B) PC-3, DU145, and MCF-7 cell lines were exposed to increasing doses of GSNO for 1 h and the mTOR, Akt, p70S6K, and 4EBP-1 phosphorylation detected by Western blot. Representative blots of three independent experiments.

Figure 4. GSNO affects mTOR through S-nitrosation and its effect on the mTOR pathway is cGMP-independent. (A) PC-3 cells were pre-treated with 50 μ M of ODQ for 30 min and then treated with 1 mM GSNO for 2 h. The phosphorylation of mTOR, Akt, and p70S6K was detected by Western blot; (B) PC-3, DU145, and MCF-7 cell lines were pre-treated with 1.25 mM PTIO for 30 min and then treated with 1 mM GSNO for 2 h. Phospho-p70S6K was detected by Western blot; (C) PC-3, DU145, and MCF-7 cell lines were pre-treated with 1 mM GSNO for 1 h and then treated with 10 mM DTT for 20 min. Phospho-p70S6K was detected by Western blot. Representative blots of three independent experiments.

Figure 5. GSNO effect on the mTOR activity is independent of the AMPK and Akt signaling pathways.

(A) PC-3 cells were grown in leucine-free medium for 3 h and then treated with 5 mM leucine for 2 h. The cell lines were exposed to 1 mM GSNO for 1 h and the phosphorylation of the mTOR, p70S6K, 4EBP-1, Akt, PRAS40, AMPK, and Raptor detected by Western blot; (B) PC-3, DU145 and MCF-7 cell lines were pre-treated with 50 mM compound C for 3 h and then treated with 1 mM GSNO for 1 h. AMPK, ACC, p70S6K, and Raptor phosphorylation was detected by Western blot. Representative blots of three independent experiments.

Figure 6. iNOS interacts with mTOR decreasing the kinase activity of the protein. (A) PC-3 cells were treated with 1 mM GSNO for 1 h and raptor was immunoprecipitated with protein A-Sepharose. Proteins were loaded onto an SDS-PAGE gel and the amount of Raptor associated with mTOR detected by Western blot; (B) PC-3, and DU145 cell lines were treated with 50 μ M L-NIL or 500 ng/mL LPS for 4 h and the mTOR was immunoprecipitated with protein A-Sepharose. Proteins were loaded into a SDS-PAGE gel and the amount of iNOS associated with mTOR detected by Western blot; (C) PC-3 cells were treated with increasing concentrations of L-NIL for 4 h and the phosphorylation of p70S6K and 4EBP-1 analyzed by Western blot. Representative blots of three independent experiments.

Figure 7. NO inhibits different targets of PI3K-Akt-mTOR pathway. (A) PI3K-Akt-mTOR pathway regulates cellular processes that have an important role in cancer. The negative feedback loop triggered by p70S6K on IRS-1 is shown in the absence of inhibitors; (B) Therapeutic inhibition of mTOR activity by rapamycin only partially suppresses mTORC1 function, efficiently inhibiting p70S6K but not

eIF4E. Moreover, rapamycin relieves the p70S6K-dependent feedback loop and promotes cell survival through the upregulation of the IRS1-Akt pathway; (C) NO blocks IRS-1 (24), Akt (25), and mTORC1 and may be an interesting therapeutic option for cancer therapy as GSNO can circumvent the main resistance mechanisms triggered by clinically used mTOR inhibitors.

Figure 1.

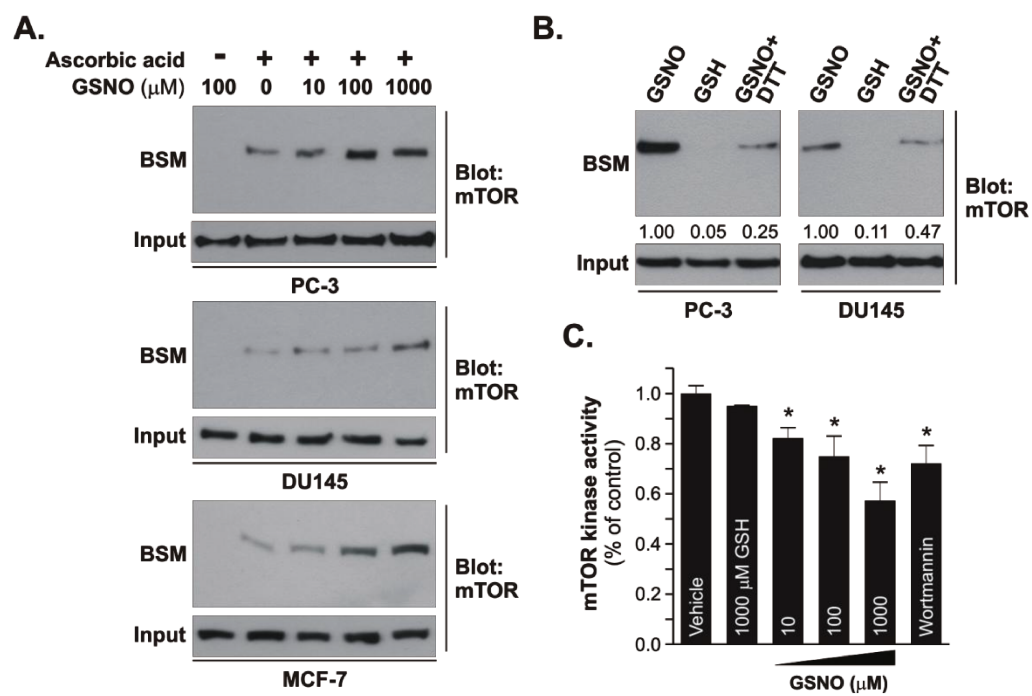
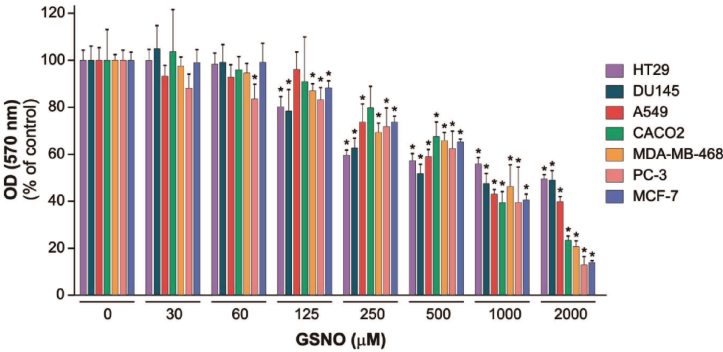
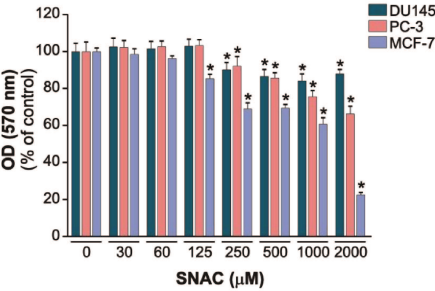


Figure 2.

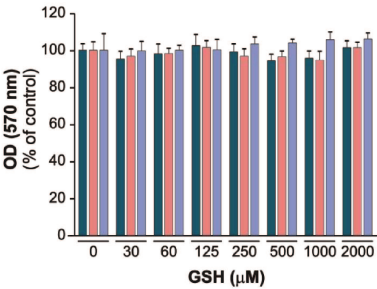
A.



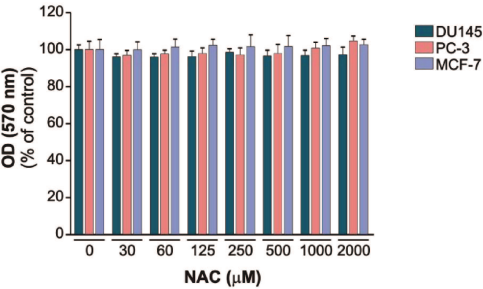
B.



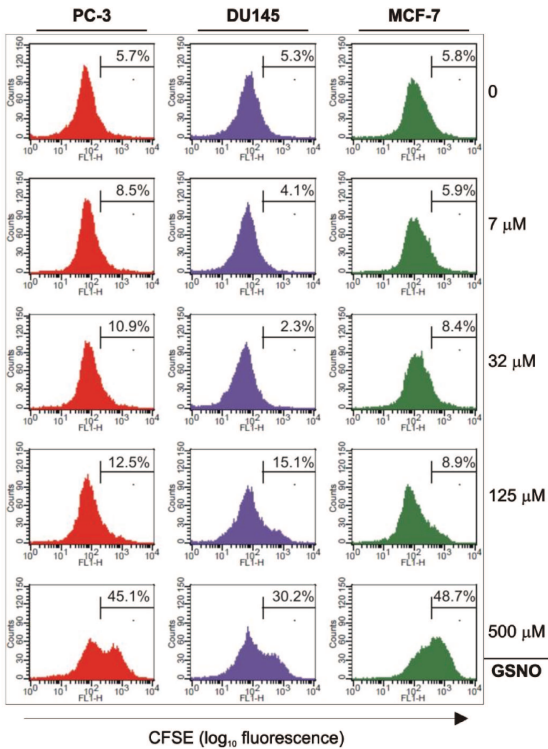
C.



D.



E.



F.

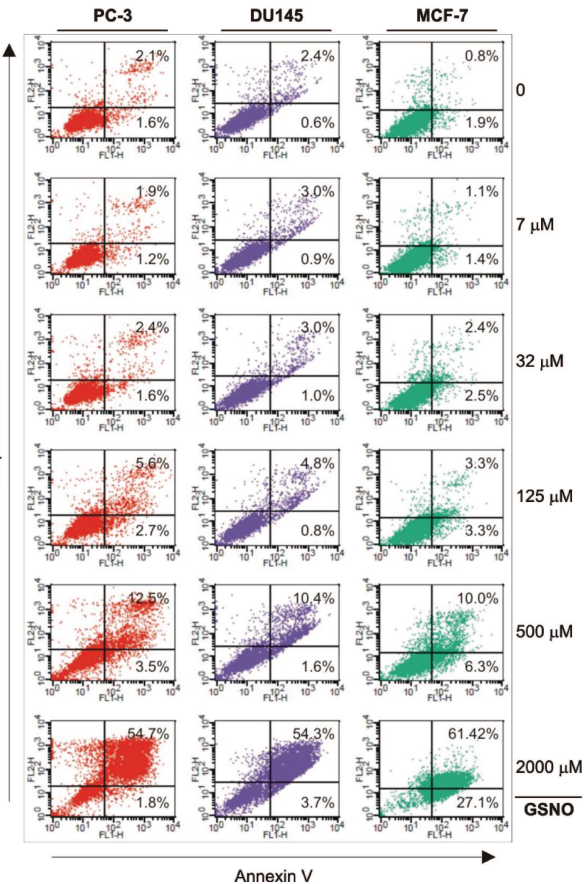


Figure 3.

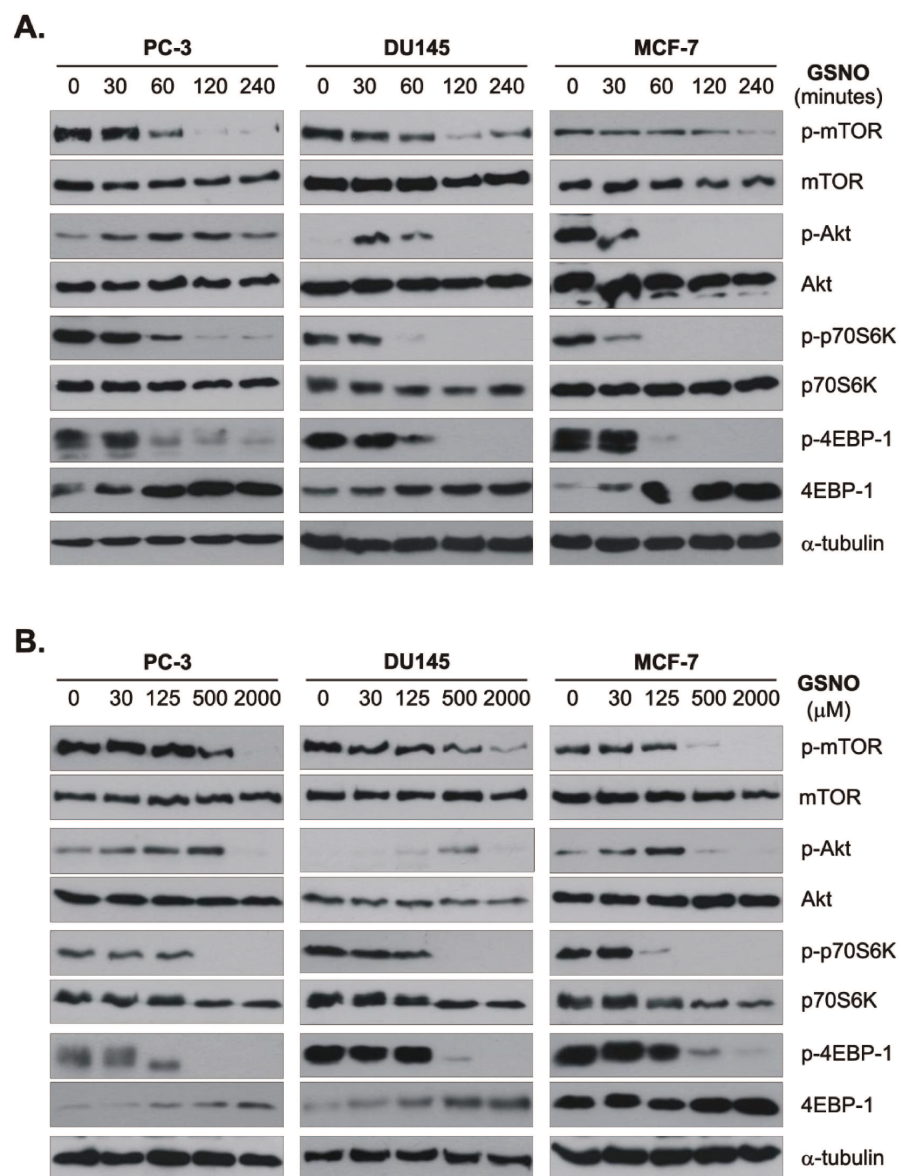


Figure 4.

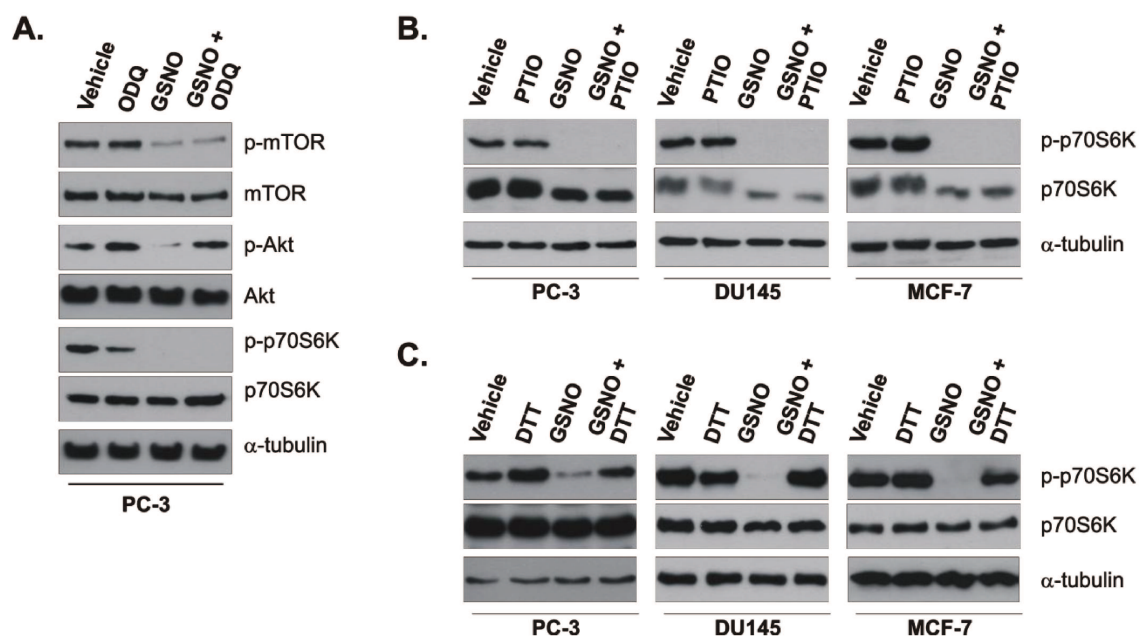
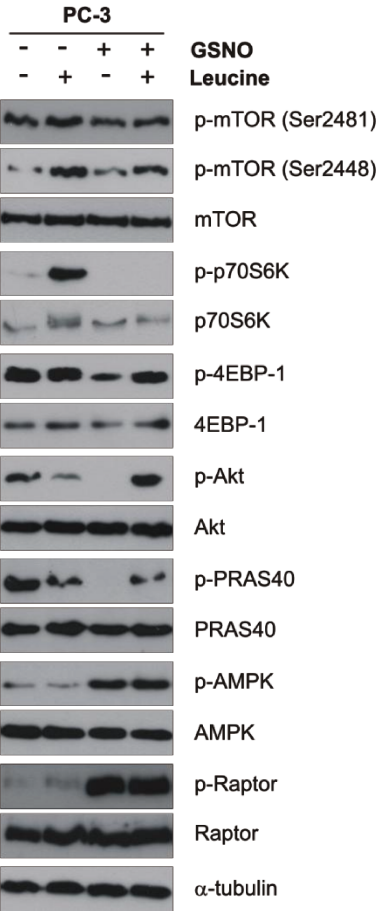


Figure 5.

A.



B.

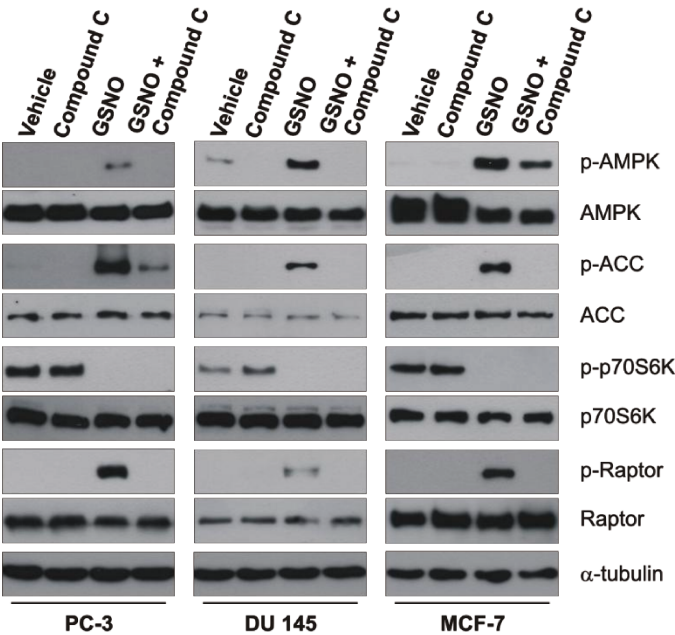


Figure 6.

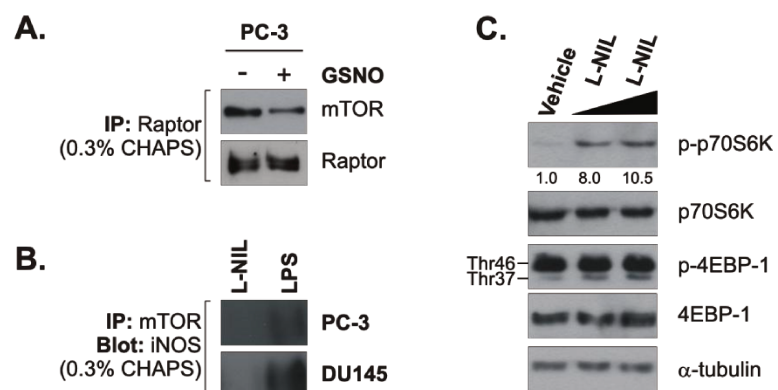
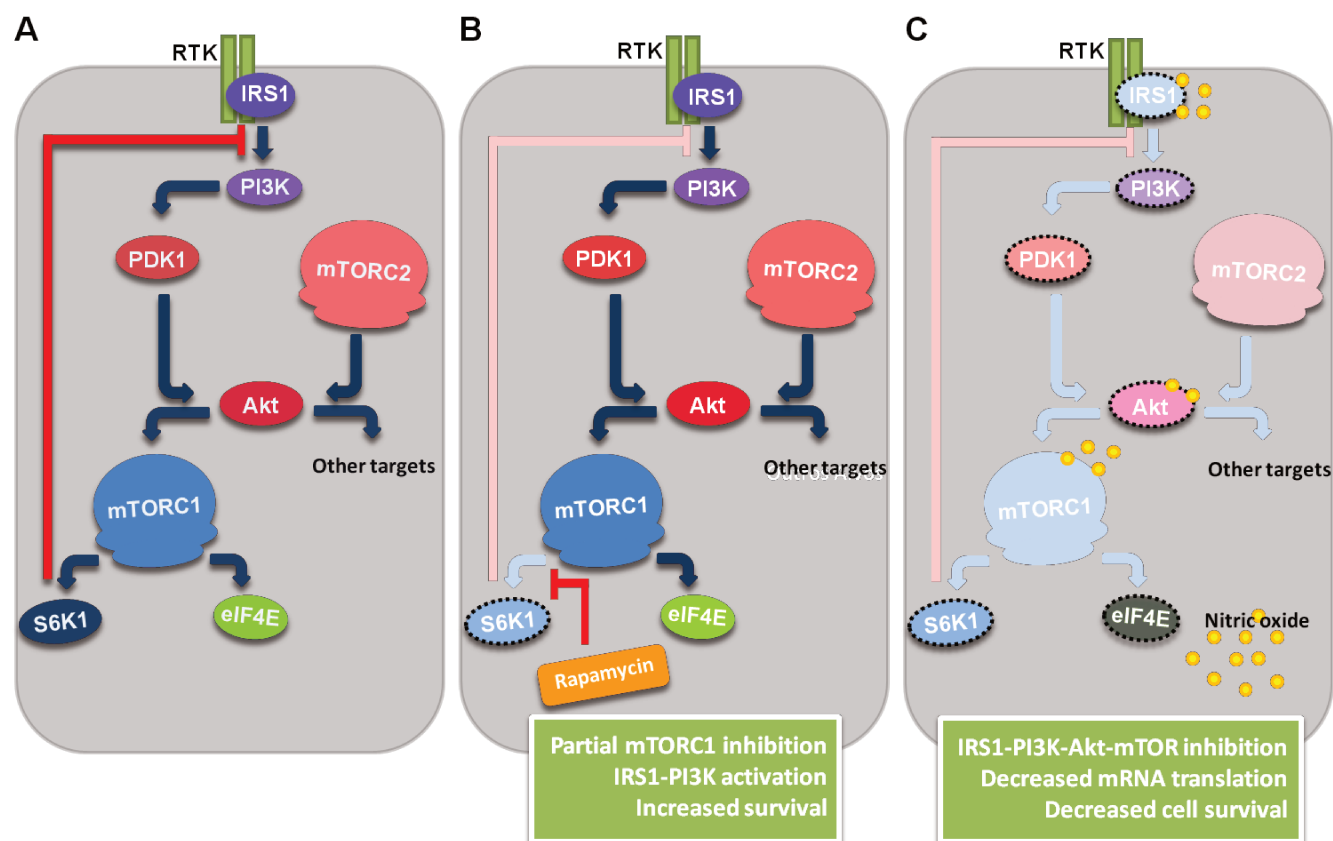


Figure 7.



CONCLUSÃO

É cada vez maior a busca por alvos moleculares específicos para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e menos tóxicas para o câncer. Neste sentido, a descoberta de que a ativação da via PI3K-Akt-mTOR é um dos fatores cruciais para a progressão de diversos tipos de cânceres é de fundamental importância para que estudos mais aprofundados sejam realizados. A identificação recente de novos reguladores da via de sinalização da mTOR e a maneira como atuam fortaleceu o conceito de que a proteína atua como um integralizador de sinais.

Diversos trabalhos envolvendo os diferentes aspectos do NO têm sido publicados, incluindo estudos em tumores (120-123). Esses trabalhos tentam integrar as informações aparentemente conflitantes das funções do NO, uma vez que diferentes estudos demonstram que o NO pode tanto promover quanto inibir a progressão tumoral e a metástase (99,117).

Um dos mecanismos utilizados pelo NO para modular as vias de sinalização celulares é a *S*-nitrosação de proteínas (108,114). Assim como a fosforilação, a *S*-nitrosação é um importante mecanismo de modificação pós-traducional capaz de alterar a conformação, a atividade e a função de proteína (110). Portanto, este pode ser um mecanismo potencial ainda não explorado de modulação de proteínas importantes para a progressão do câncer, como as presentes na via da mTOR.

Nossos resultados demonstram que a *S*-nitrosação é um mecanismo capaz de modular a atividade quinase da proteína mTOR, diminuindo a sua habilidade de fosforilar seus substratos diretos, as proteínas p70S6K e 4EBP-1. Essa alteração afeta a fisiologia celular,

alterando a viabilidade da célula através da diminuição da sua proliferação em doses menores. Além disso, doses elevadas geram aumento da morte celular.

As terapias baseadas na droga rapamicina encontraram barreiras importantes em decorrência da alça de retroalimentação negativa mediada pela proteína p70S6K. A rapamicina ao inibir o mTORC1 e, conseqüentemente, a proteína p70S6K gera um aumento severo da sinalização mediada pela PI3K e oferece importantes sinais de sobrevivência e proliferação através da ativação da Akt e das demais quinases AGC (85), gerando alças de retroalimentação antagônicas à ação da rapamicina e diminuindo a eficácia da droga em modelos animais de câncer e pacientes (85,86). Em concentrações relativamente baixas (< 500 μ M) o NO, assim como a rapamicina, diminui a fosforilação da proteína p70S6K, mas ativa a Akt. No caso do NO, a ativação da Akt é decorrente da S-nitrosação da fosfatase PTEN, mecanismo que reduz sua atividade enzimática (124). Entretanto, em concentrações elevadas, o NO é também capaz de S-nitrosar as proteínas IRS-1 (125) e Akt (126,127), resultando em inibição de suas atividades quinases e reversão dos efeitos da alça de retroalimentação negativa gerada pela inibição da p70S6K. Mais, a presença do NO é também responsável pelo aumento da atividade quinase da AMPK que, apesar de não ser responsável pelo decréscimo da fosforilação observada na proteína p70S6K pelo NO, fortalece a ação inibitória do composto em relação à via de sinalização PI3K-Akt-mTOR.

Assim, nossos dados demonstram que o NO apresenta efeitos significativos sobre a via de sinalização PI3K-Akt-mTOR. A inibição do mTORC1 através da exposição ao NO pode apresentar implicações terapêuticas importantes para o câncer, uma vez que o gás reverte os principais mecanismos de resistência gerados pelos inibidores do mTOR atualmente empregados clinicamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. World Cancer Report, 2008; 2009.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 61(2):69-90.
3. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2012. Incidência de câncer no Brasil; 2011.
4. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene.* 2008; 27(41):5497-5510.
5. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2009; 8(8):627-644.
6. Zhao L, Vogt PK. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene.* 2008; 27(41):5486-5496.
7. Ligresti G, Militello L, Steelman LS, Cavallaro A, Basile F, Nicoletti F E et al. PIK3CA mutations in human solid tumors: role in sensitivity to various therapeutic approaches. *Cell Cycle.* 2009; 8(9):1352-1358.
8. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S E et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science.* 2004; 304(5670):554.
9. Lawlor MA, Alessi DR. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci.* 2001; 114(Pt 16):2903-2910.
10. Tran H, Brunet A, Griffith EC, Greenberg ME. The many forks in FOXO's road. *Sci STKE.* 2003; 2003(172):RE5.
11. Menon S, Manning BD. Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors. *Oncogene.* 2008; 27 Suppl 2(S43-51.
12. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12(1):21-35.
13. Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S E et al. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell.* 2002; 110(2):177-189.

14. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H E et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*. 2002; 110(2):163-175.
15. Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H E et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*. 2004; 14(14):1296-1302.
16. Nojima H, Tokunaga C, Eguchi S, Oshiro N, Hidayat S, Yoshino K E et al. The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *J Biol Chem*. 2003; 278(18):15461-15464.
17. Schalm SS, Fingar DC, Sabatini DM, Blenis J. TOS motif-mediated raptor binding regulates 4E-BP1 multisite phosphorylation and function. *Curr Biol*. 2003; 13(10):797-806.
18. Wullschleger S, Loewith R, Oppliger W, Hall MN. Molecular organization of target of rapamycin complex 2. *J Biol Chem*. 2005; 280(35):30697-30704.
19. Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L E et al. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science*. 2008; 320(5882):1496-1501.
20. Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E E et al. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell*. 2007; 25(6):903-915.
21. Pearce LR, Huang X, Boudeau J, Pawlowski R, Wullschleger S, Deak M E et al. Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem J*. 2007; 405(3):513-522.
22. Vander Haar E, Lee SI, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol*. 2007; 9(3):316-323.
23. Frias MA, Thoreen CC, Jaffe JD, Schroder W, Sculley T, Carr SA E et al. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol*. 2006; 16(18):1865-1870.
24. Yang Q, Inoki K, Ikenoue T, Guan KL. Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity. *Genes Dev*. 2006; 20(20):2820-2832.
25. Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D E et al. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell*. 2002; 10(3):457-468.

26. Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM E et al. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*. 2009; 137(5):873-886.
27. Yip CK, Murata K, Walz T, Sabatini DM, Kang SA. Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Mol Cell*. 38(5):768-774.
28. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF E et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*. 2006; 22(2):159-168.
29. Mayer C, Zhao J, Yuan X, Grummt I. mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev*. 2004; 18(4):423-434.
30. Haghighat A, Mader S, Pause A, Sonenberg N. Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. *Embo J*. 1995; 14(22):5701-5709.
31. Hara K, Yonezawa K, Kozlowski MT, Sugimoto T, Andrabi K, Weng QP E et al. Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *J Biol Chem*. 1997; 272(42):26457-26463.
32. Wang X, Li W, Williams M, Terada N, Alessi DR, Proud CG. Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *Embo J*. 2001; 20(16):4370-4379.
33. Wilson KF, Wu WJ, Cerione RA. Cdc42 stimulates RNA splicing via the S6 kinase and a novel S6 kinase target, the nuclear cap-binding complex. *J Biol Chem*. 2000; 275(48):37307-37310.
34. Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell*. 2005; 123(4):569-580.
35. Noda T, Ohsumi Y. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem*. 1998; 273(7):3963-3966.
36. Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y E et al. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem*. 2009; 284(12):8023-8032.
37. Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol*. 2000; 150(6):1507-1513.

38. Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7(12):961-967.
39. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A E et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*. 2004; 6(11):1122-1128.
40. Kamada Y, Fujioka Y, Suzuki NN, Inagaki F, Wullschleger S, Loewith R E et al. Tor2 directly phosphorylates the AGC kinase Ypk2 to regulate actin polarization. *Mol Cell Biol*. 2005; 25(16):7239-7248.
41. Schmidt A, Bickle M, Beck T, Hall MN. The yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2. *Cell*. 1997; 88(4):531-542.
42. Facchinetti V, Ouyang W, Wei H, Soto N, Lazorchak A, Gould C E et al. The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *Embo J*. 2008; 27(14):1932-1943.
43. Garcia-Martinez JM, Alessi DR. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J*. 2008; 416(3):375-385.
44. Ikenoue T, Inoki K, Yang Q, Zhou X, Guan KL. Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *Embo J*. 2008; 27(14):1919-1931.
45. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 2005; 307(5712):1098-1101.
46. Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J E et al. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell*. 2006; 11(6):859-871.
47. Hara K, Yonezawa K, Weng QP, Kozlowski MT, Belham C, Avruch J. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J Biol Chem*. 1998; 273(23):14484-14494.
48. Wang X, Campbell LE, Miller CM, Proud CG. Amino acid availability regulates p70 S6 kinase and multiple translation factors. *Biochem J*. 1998; 334 (Pt 1):261-267.

49. Christie GR, Hajduch E, Hundal HS, Proud CG, Taylor PM. Intracellular sensing of amino acids in *Xenopus laevis* oocytes stimulates p70 S6 kinase in a target of rapamycin-dependent manner. *J Biol Chem*. 2002; 277(12):9952-9957.
50. Nicklin P, Bergman P, Zhang B, Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B E et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell*. 2009; 136(3):521-534.
51. Findlay GM, Yan L, Procter J, Mieulet V, Lamb RF. A MAP4 kinase related to Ste20 is a nutrient-sensitive regulator of mTOR signalling. *Biochem J*. 2007; 403(1):13-20.
52. Yan L, Mieulet V, Burgess D, Findlay GM, Sully K, Procter J E et al. PP2A T61 epsilon is an inhibitor of MAP4K3 in nutrient signaling to mTOR. *Mol Cell*. 37(5):633-642.
53. Gulati P, Gaspers LD, Dann SG, Joaquin M, Nobukuni T, Natt F E et al. Amino acids activate mTOR complex 1 via Ca²⁺/CaM signaling to hVps34. *Cell Metab*. 2008; 7(5):456-465.
54. Nobukuni T, Joaquin M, Roccio M, Dann SG, Kim SY, Gulati P E et al. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(40):14238-14243.
55. Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan KL. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol*. 2008; 10(8):935-945.
56. Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell*. 141(2):290-303.
57. Saucedo LJ, Gao X, Chiarelli DA, Li L, Pan D, Edgar BA. Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. *Nat Cell Biol*. 2003; 5(6):566-571.
58. Stocker H, Radimerski T, Schindelholz B, Wittwer F, Belawat P, Daram P E et al. Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in *Drosophila*. *Nat Cell Biol*. 2003; 5(6):559-565.
59. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*. 2002; 4(9):648-657.
60. Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell*. 2002; 10(1):151-162.

61. Potter CJ, Pedraza LG, Xu T. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat Cell Biol.* 2002; 4(9):658-665.
62. Garami A, Zwartkruis FJ, Nobukuni T, Joaquin M, Rocco M, Stocker H E et al. Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Mol Cell.* 2003; 11(6):1457-1466.
63. Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev.* 2003; 17(15):1829-1834.
64. Zhang Y, Gao X, Saucedo LJ, Ru B, Edgar BA, Pan D. Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nat Cell Biol.* 2003; 5(6):578-581.
65. Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol.* 2003; 13(15):1259-1268.
66. Kovacina KS, Park GY, Bae SS, Guzzetta AW, Schaefer E, Birnbaum MJ E et al. Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner. *J Biol Chem.* 2003; 278(12):10189-10194.
67. Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell.* 2005; 121(2):179-193.
68. Castilho RM, Squarize CH, Chodosh LA, Williams BO, Gutkind JS. mTOR mediates Wnt-induced epidermal stem cell exhaustion and aging. *Cell Stem Cell.* 2009; 5(3):279-289.
69. Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X E et al. TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell.* 2006; 126(5):955-968.
70. Gangloff YG, Mueller M, Dann SG, Svoboda P, Sticker M, Spetz JF E et al. Disruption of the mouse mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic stem cell development. *Mol Cell Biol.* 2004; 24(21):9508-9516.
71. Murakami M, Ichisaka T, Maeda M, Oshiro N, Hara K, Edenhofer F E et al. mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* 2004; 24(15):6710-6718.

72. Dennis PB, Jaeschke A, Saitoh M, Fowler B, Kozma SC, Thomas G. Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science*. 2001; 294(5544):1102-1105.
73. Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8(10):774-785.
74. Corradetti MN, Inoki K, Bardeesy N, DePinho RA, Guan KL. Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. *Genes Dev*. 2004; 18(13):1533-1538.
75. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS E et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 2008; 30(2):214-226.
76. Feng Z, Hu W, de Stanchina E, Teresky AK, Jin S, Lowe S E et al. The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Res*. 2007; 67(7):3043-3053.
77. Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y E et al. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 2005; 18(3):283-293.
78. Budanov AV, Karin M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell*. 2008; 134(3):451-460.
79. Dowling RJ, Topisirovic I, Alain T, Bidinosti M, Fonseca BD, Petroulakis E E et al. mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. *Science*. 328(5982):1172-1176.
80. Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7(10):763-777.
81. Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A E et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest*. 2003; 112(12):1809-1820.
82. Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(25):15077-15082.
83. Marino G, Salvador-Montoliu N, Fueyo A, Knecht E, Mizushima N, Lopez-Otin C. Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. *J Biol Chem*. 2007; 282(25):18573-18583.

84. Thomas GV, Tran C, Mellinghoff IK, Welsbie DS, Chan E, Fueger B E et al. Hypoxia-inducible factor determines sensitivity to inhibitors of mTOR in kidney cancer. *Nat Med*. 2006; 12(1):122-127.
85. O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D E et al. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res*. 2006; 66(3):1500-1508.
86. Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A E et al. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest*. 2008; 118(9):3065-3074.
87. Zhang H, Bajraszewski N, Wu E, Wang H, Moseman AP, Dabora SL E et al. PDGFRs are critical for PI3K/Akt activation and negatively regulated by mTOR. *J Clin Invest*. 2007; 117(3):730-738.
88. Shor B, Zhang WG, Toral-Barza L, Lucas J, Abraham RT, Gibbons JJ E et al. A new pharmacologic action of CCI-779 involves FKBP12-independent inhibition of mTOR kinase activity and profound repression of global protein synthesis. *Cancer Res*. 2008; 68(8):2934-2943.
89. Guertin DA, Stevens DM, Saitoh M, Kinkel S, Crosby K, Sheen JH E et al. mTOR complex 2 is required for the development of prostate cancer induced by Pten loss in mice. *Cancer Cell*. 2009; 15(2):148-159.
90. Choo AY, Yoon SO, Kim SG, Roux PP, Blenis J. Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(45):17414-17419.
91. McMahon LP, Choi KM, Lin TA, Abraham RT, Lawrence JC, Jr. The rapamycin-binding domain governs substrate selectivity by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol*. 2002; 22(21):7428-7438.
92. Feldman ME, Apsel B, Uotila A, Loewith R, Knight ZA, Ruggero D E et al. Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol*. 2009; 7(2):e38.
93. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327(6122):524-526.
94. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84(24):9265-9269.
95. Culotta E, Koshland DE, Jr. NO news is good news. *Science*. 1992; 258(5090):1862-1865.
96. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*. 1994; 78(6):915-918.

97. Sessa WC. eNOS at a glance. *J Cell Sci.* 2004; 117(Pt 12):2427-2429.
98. Friebe A, Koesling D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res.* 2003; 93(2):96-105.
99. Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *Lancet Oncol.* 2001; 2(3):149-156.
100. Wink DA, Vodovotz Y, Cook JA, Krishna MC, Kim S, Coffin D E et al. The role of nitric oxide chemistry in cancer treatment. *Biochemistry (Mosc).* 1998; 63(7):802-809.
101. Ignarro LJ, Wood KS, Wolin MS. Activation of purified soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982; 79(9):2870-2873.
102. Derbyshire ER, Marletta MA. Biochemistry of soluble guanylate cyclase. *Handb Exp Pharmacol.* 2009; 191):17-31.
103. Waldman SA, Murad F. Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1988; 12 Suppl 5(S115-118.
104. Furchgott RF, Jothianandan D. Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels.* 1991; 28(1-3):52-61.
105. Hofmann F, Bernhard D, Lukowski R, Weinmeister P. cGMP regulated protein kinases (cGK). *Handb Exp Pharmacol.* 2009; 191):137-162.
106. Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T E et al. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89(1):444-448.
107. Stamler JS, Simon DI, Jaraki O, Osborne JA, Francis S, Mullins M E et al. S-nitrosylation of tissue-type plasminogen activator confers vasodilatory and antiplatelet properties on the enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89(17):8087-8091.
108. Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6(2):150-166.
109. Jaffrey SR, Snyder SH. The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Sci STKE.* 2001; 2001(86):pl1.

110. Lane P, Hao G, Gross SS. S-nitrosylation is emerging as a specific and fundamental posttranslational protein modification: head-to-head comparison with O-phosphorylation. *Sci STKE*. 2001; 2001(86):re1.
111. Stamler JS, Lamas S, Fang FC. Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell*. 2001; 106(6):675-683.
112. Gaston B, Reilly J, Drazen JM, Fackler J, Ramdev P, Arnette D E et al. Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(23):10957-10961.
113. Liu L, Hausladen A, Zeng M, Que L, Heitman J, Stamler JS. A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature*. 2001; 410(6827):490-494.
114. Hess DT, Matsumoto A, Nudelman R, Stamler JS. S-nitrosylation: spectrum and specificity. *Nat Cell Biol*. 2001; 3(2):E46-49.
115. Lai TS, Hausladen A, Slaughter TF, Eu JP, Stamler JS, Greenberg CS. Calcium regulates S-nitrosylation, denitrosylation, and activity of tissue transglutaminase. *Biochemistry*. 2001; 40(16):4904-4910.
116. Stamler JS, Hess DT. Nascent nitrosylases. *Nat Cell Biol*. 12(11):1024-1026.
117. Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(7):521-534.
118. Fischer EH, Krebs EG. The isolation and crystallization of rabbit skeletal muscle phosphorylase b. *J Biol Chem*. 1958; 231(1):65-71.
119. Graves JD, Krebs EG. Protein phosphorylation and signal transduction. *Pharmacol Ther*. 1999; 82(2-3):111-121.
120. Hofseth LJ, Hussain SP, Wogan GN, Harris CC. Nitric oxide in cancer and chemoprevention. *Free Radic Biol Med*. 2003; 34(8):955-968.
121. Crowell JA, Steele VE, Sigman CC, Fay JR. Is inducible nitric oxide synthase a target for chemoprevention? *Mol Cancer Ther*. 2003; 2(8):815-823.
122. Thomsen LL, Miles DW, Happerfield L, Bobrow LG, Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. *Br J Cancer*. 1995; 72(1):41-44.

123. Cobbs CS, Brenman JE, Aldape KD, Bredt DS, Israel MA. Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors. *Cancer Res.* 1995; 55(4):727-730.
124. Numajiri N, Takasawa K, Nishiya T, Tanaka H, Ohno K, Hayakawa W E et al. On-off system for PI3-kinase-Akt signaling through S-nitrosylation of phosphatase with sequence homology to tensin (PTEN). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(25):10349-10354.
125. Carvalho-Filho MA, Ropelle ER, Pauli RJ, Cintra DE, Tsukumo DM, Silveira LR E et al. Aspirin attenuates insulin resistance in muscle of diet-induced obese rats by inhibiting inducible nitric oxide synthase production and S-nitrosylation of IRbeta/IRS-1 and Akt. *Diabetologia.* 2009; 52(11):2425-2434.
126. Yasukawa T, Tokunaga E, Ota H, Sugita H, Martyn JA, Kaneki M. S-nitrosylation-dependent inactivation of Akt/protein kinase B in insulin resistance. *J Biol Chem.* 2005; 280(9):7511-7518.
127. Wu M, Katta A, Gadde MK, Liu H, Kakarla SK, Fannin J E et al. Aging-associated dysfunction of Akt/protein kinase B: S-nitrosylation and acetaminophen intervention. *PLoS One.* 2009; 4(7):e6430.