

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**Instituto de Bioquímica Médica – IBqM**

Laboratório de Química Fisiológica da Contração Muscular

**Transnitroação da miosina pela S-nitrosoglutathione  
promove uma inibição transiente da atividade  
ATPásica, afetando uma população de cisteínas  
mais acessíveis**

Leonardo Nogueira

Rio de Janeiro

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Transnitroação da miosina pela S-nitrosoglutathiona  
promove uma inibição transiente da atividade  
ATPásica, afetando uma população de cisteínas  
mais acessíveis**

Leonardo Nogueira

*Tese de Doutorado apresentada  
ao Programa de Pós-graduação  
em Ciências Biológicas (Química  
Biológica) Instituto de Bioquímica  
Médica da Universidade Federal  
do Rio de Janeiro, como parte dos  
requisitos necessários à obtenção  
do grau de Doutor em Ciências  
(Química Biológica).*

Rio de Janeiro

**Março de 2008**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Química Fisiológica da Contração Muscular, do Instituto de Bioquímica Médica (IBqM) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da professora Martha M. Sorenson, com os auxílios cedidos pelo Programa de Apoio a Núcleos do Excelência (PRONEX) e pelo Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). O doutorando foi bolsista da Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) durante a realização da tese.

## FICHA CATALOGRÁFICA

**Nogueira, Leonardo**

**Transnitroação da miosina pela S-nitrosoglutathione promove uma inibição transiente da atividade ATPásica, afetando uma população de cisteínas mais acessíveis.**

**Leonardo Nogueira/ Rio de Janeiro: CCS, UFRJ, 2008.**

**XIV fls, 120 fls**

**Tese: Doutorado em Ciências Biológicas (Química Biológica)**

- 1. Miosina**
- 2. Atividade ATPásica**
- 3. Estabilidade de S-nitrosotióis**
- 4. Transnitroação**
- 5. S-nitroação**

**I – Universidade Federal do Rio de Janeiro**

**II – Título**

# **Transnitroação da miosina pela S-nitrosoglutationa promove uma inibição transiente da atividade ATPásica, afetando uma população de cisteínas mais acessíveis**

Leonardo Nogueira

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Química Biológica), Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Química Biológica).

## **BANCA EXAMINADORA :**

---

Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo (Examinador)  
Professor Titular do Instituto do Coração/USP

---

Dr. Thereza Christina Barja Fidalgo (Examinador)  
Professor Adjunto do Instituto de Biologia/UERJ

---

Dr. Mario Alberto Cardoso da Silva Neto (Examinador)  
Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica/CCS/UFRJ

---

Dr. Pedro Lagerblad de Oliveira (Revisor/Suplente)  
Professor Titular do Instituto de Bioquímica Médica/CCS/UFRJ

---

Dr. Eleonora Kurtenbach (Suplente)  
Professor Associado do Instituto de Biofísica/CCS/UFRJ

---

Dr. Martha M. Sorenson (Orientador)  
Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica/CCS/UFRJ

Rio de Janeiro

Março de 2008

## Resumo

Nogueira, Leonardo. Transnitroação da miosina pela S-nitrosoglutationa promove uma inibição transiente da atividade ATPásica, afetando uma população de cisteínas mais acessíveis. Rio de Janeiro, 2008. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

A miosina é uma das principais proteínas contráteis em fibras musculares esqueléticas, sendo responsável pela aumentada demanda de ATP durante contração muscular. As fibras musculares sintetizam óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) em repouso e a produção é aumentada durante contração muscular. Uma das ações biológicas da produção de NO<sup>•</sup> intracelular é a S-nitroação de proteínas. Uma vez que a miosina possui um alto conteúdo de tióis livres, foi investigado neste trabalho os efeitos da S-nitroação sobre a atividade ATPásica da miosina e da actomiosina. O agente S-nitrosante fisiológico, S-nitrosoglutationa (GSNO; 5 μM – 8 mM), inibe a atividade Mg<sup>2+</sup>ATPásica da miosina e da actomiosina de maneira tempo e concentração dependente, sem alterar a afinidade da miosina pela actina. A reação da miosina com GSNO promove dois grupos de ligações –SNO distingüíveis quanto à sua estabilidade e o efeito inibitório é associado ao grupo mais instável, que está localizado em cisteínas mais acessíveis na miosina. O grupo estável de ligações –SNO, este que não promove inibição, está localizado em cisteínas menos acessíveis na miosina. Para determinar se a S-nitroação possa ser induzida por NO<sup>•</sup>, a miosina foi tratada com Dietilamina óxido nítrico (DEANO; 10 μM – 1 mM). Entretanto, a miosina não foi S-nitrosada ou inibida por DEANO, o que sugere que a S-nitroação da miosina por GSNO é dependente de transnitroação. Para investigar quais proteínas contráteis são alvo de S-nitroação, fibras musculares "descascadas" foram tratadas com GSNO (10 μM – 1 mM) e foi verificado que actina e miosina são os principais alvos. Os resultados deste trabalho sugerem que a miosina possa ser um alvo fisiológico de S-nitroação, e esta modificação pode regular as demandas de ATP intramuscular durante exercício.

## Abstract

Nogueira, Leonardo. Transnitrosation of myosin by S-nitrosoglutathione promotes a transient inhibition of the ATPase activity, affecting a population of accessible cysteines. Rio de Janeiro, 2008. Thesis (PhD in Biological Sciences) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Myosin is one of the main contractile proteins in skeletal muscle fibers, being responsible for the increased demand for ATP during muscle contraction. Skeletal muscle fibers synthesize nitric oxide (NO<sup>•</sup>) during rest and the production is increased during muscle contraction. One of the biological actions of the intracellular NO<sup>•</sup> production is protein S-nitrosation. Since myosin has a high content of free thiols, this work investigated the effects of S-nitrosation on myosin and actomyosin ATPase activity. The physiological S-nitrosating reagent, S-nitrosoglutathione (GSNO; 5 μM – 8 mM), inhibits myosin Mg<sup>2+</sup>ATPase and actomyosin activity in a concentration- and time-dependent manner, without affecting the myosin affinity for actin. The GSNO reaction with myosin promotes two groups of –SNO bonds related to their stabilities and the inhibitory effect is associated to the unstable group, which is located in the more accessible cysteines on myosin. The stable group of –SNO bonds, that does not promote inhibition, is located in more buried regions on myosin. To determine whether S-nitrosation is induced by NO<sup>•</sup>, myosin was treated with DEANO (10 μM – 1 mM). However, myosin is not S-nitrosated or inhibited by DEANO, suggesting that myosin S-nitrosation is dependent on transnitrosation. To investigate which contractile proteins are target to S-nitrosation, skinned skeletal muscle fibers were treated with GSNO (10 μM – 1 mM), and it was verified that actin and myosin are the main targets. The results of this work suggest that myosin is a physiological target of S-nitrosation, and this modification may regulate the intracellular ATP demand during exercise

## Abreviações

A	Actina
ADP	Adenosina Difosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
Biotina-HPDP	(N-(6-(Biotinamido)hexil)-3'-(2'-piridilditio)-propionamida
BSA	Albumina sérica bovina
Cys	Cisteína
DEANO	Dietilamina óxido nítrico
DTNB	5, 5'- ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico)
DTT	Ditiotreitol
$\epsilon$	Coefficiente de extinção molar ( $M^{-1}cm^{-1}$ )
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
EGTA	Ácido etileno glicol –bis (2-aminoetileter)-N-N-N'-N'-tetraacético
GndCl	Cloreto de guanidina
GSH	Glutathiona forma reduzida
GSSG	Glutathiona forma oxidada
GSNO	S-nitrosoglutathiona
HEPES	Ácido N-[2-Hidroxietilpiperazina- N'-[2-etanosulfônico]
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis-Menten
LC	Cadeia leve de miosina
M	Miosina
MHC	Cadeia pesada de miosina
MMTS	Metilmetanotiosulfonato
Mr	Massa molecular relativa
NEM	N-etilmaleimida
NO <sup>•</sup>	Óxido nítrico radical
NO <sup>+</sup>	Cátion nitrosônio
NO <sup>-</sup>	Ânion nitroxil
NOS	Óxido nítrico sintase
OH <sup>•</sup>	Radical hidroxila
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito

PCMB	p-Cloromercúribenzoato
Pi	Fosfato inorgânico
pK <sub>a</sub>	Logaritmo negativo da constante de equilíbrio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
RS•	Radical tiila
RSNO	S-nitrosotiol
S-1	Subfragmento 1 da miosina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNAP	S-nitroso-N-acetilpenicilamina
TNB <sup>-</sup>	Ânion 2-nitro-5-mercaptopbenzóico

## Índice

<b>I. Introdução</b>	<b>01</b>
<b>II. Revisão de literatura</b>	<b>04</b>
II.1 – Miosina : estrutura e função	04
II.2 – Miosina como alvo de modificações pós-transducionais em cisteínas	12
II.3 – Óxido nítrico: química e mecanismos de ação sobre cisteínas	20
II.4 – Síntese biológica de NO• no músculo esquelético e em outros tecidos	24
II.5 – S-nitrosação de tióis protéicos como modificação pós-transducional	29
II.6 – Efeitos da S-nitrosação de proteínas nas suas atividades biológicas	35
<b>III. Objetivos</b>	<b>40</b>
<b>IV. Materiais e métodos</b>	<b>41</b>
IV.1 – Purificação de miosina	41
IV.2 – Purificação e polimerização de actina	42
IV.3 – Preparo das fibras musculares "descascadas"	43
IV.4 – Síntese de S-nitrosoglutationa (GSNO)	43
IV.5 – Dosagem de proteína	44
IV.6 – Eletroforese unidimensional	44
IV.7 – Determinação de grupamentos tióis disponíveis na miosina	45
IV.8 – Alquilação da miosina	46
IV.9 – S-nitrosação da miosina e de fibras musculares descascadas	48
IV.10 – Método de troca dos resíduos S-nitrosados por biotina ( <i>Biotin-switch method</i> )	50
IV.11 – <i>Western blot</i>	52
IV.12 – Atividade ATPásica da miosina e da actomiosina	53
IV.13 – Análise estatística	55
<b>V. Resultados (Incluídos no manuscrito submetido ao <i>Biochemical Journal</i>)</b>	<b>56</b>
<b>VI. Discussão Complementar</b>	<b>92</b>
VI.1 – Inibição apenas da atividade Mg <sup>2+</sup> ATPásica por S-nitrosação	92
VI.2 – Quais são as cisteínas modificadas por S-nitrosação ?	94
VI.3 – A S-nitrosação por GSNO produz dois grupos de RSNO na miosina	102

VI.4 – Mecanismo de S-nitrosação da miosina	104
VI.5 – GSNO pode ser um agente S-nitrosante fisiológico	105
VI.6 – Correlação fisiológica da S-nitrosação da miosina com o desempenho muscular	106
<b>VII. Conclusões do trabalho</b>	<b>108</b>
<b>VIII. Referências bibliográficas</b>	<b>109</b>

## Índice de figuras não incluídas no manuscrito

Figura 1 – Esquema hierárquico da estrutura do músculo esquelético	03
Figura 2 – Imagem da miosina por microscopia de força atômica e esquema da molécula de miosina	05
Figura 3 – Estrutura do subfragmento-1 de miosina de músculo peitoral de galinha conseguida por cristalografia de raios-x e representada na forma de fita	07
Figura 4 – Hidrólise de ATP pela miosina na ausência e presença de actina	09
Figura 5 – Braço de alavanca da cabeça da miosina quando ligada à actina filamentosa	11
Figura 6 – Resumo dos estados oxidativos e nitrosativos de grupamentos sulfidríla em proteínas	14
Figura 7 – Localização das cisteínas presentes no subfragmento-1 da miosina	18
Figura 8 – Equações químicas da autooxidação do NO <sup>•</sup> em meio aquoso, da S-nitrosação por N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> e de transnitrosação	22
Figura 9 – Esquema de catálise da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e estrutura dos intermediários químicos na biossíntese do NO <sup>•</sup> pela NOS	25
Figura 10 – Localização da nNOS em fibras musculares esqueléticas	26
Figura 11 – Esquema do método de troca de resíduos S-nitrosados por resíduos biotinilados ( <i>biotin-switch method</i> )	31
Figura 12 – Esquema dos produtos de reação de transnitrosação entre GSNO e GSH	34
Figura 13 – Número de publicações a cada ano que utilizam no título ou no resumo a palavra-chave "S-nitrosylation" ou "S-nitrosation"	38
Figura 14 – Efeitos da reação de N-etilmaleimida com miosina sobre as atividades K <sup>+</sup> EDTA e Mg <sup>2+</sup> ATPásicas	47

## Índice de figuras incluídas no manuscrito (em inglês)

Figure 1 – GSNO, but not DEANO, inhibits $Mg^{2+}$ ATPase activity of myosin	85
Figure 2 – S-nitrosation of myosin detected by Western blotting	86
Figure 3 – Time-dependence for S-nitrosation of myosin after treatment with GSNO	87
Figure 4 – Myosin can be S-nitrosated on a large number of thiols, but during washing, only a few –SNO bonds remain stable and these do not affect $Mg^{2+}$ ATPase activity	88
Figure 5 – The most stable –SNO groups are located in the less available regions of myosin	89
Figure 6 – GSNO inhibits the actomyosin ATPase without affecting actin affinity	90
Figure 7 – Myosin and actin are the main targets of S-nitrosation in skinned skeletal muscle fibers	91

## Índice geral de tabelas

Table 1 – GSNO inhibits only $Mg^{2+}$ ATPase activity of myosin	81
Tabela 1 – Lista de aminoácidos vizinhos às cisteínas presentes na estrutura primária da cadeia pesada e cadeias leves da miosina, da actina, da transtiretina e da metionina adenosina transferase	100

## I - Introdução

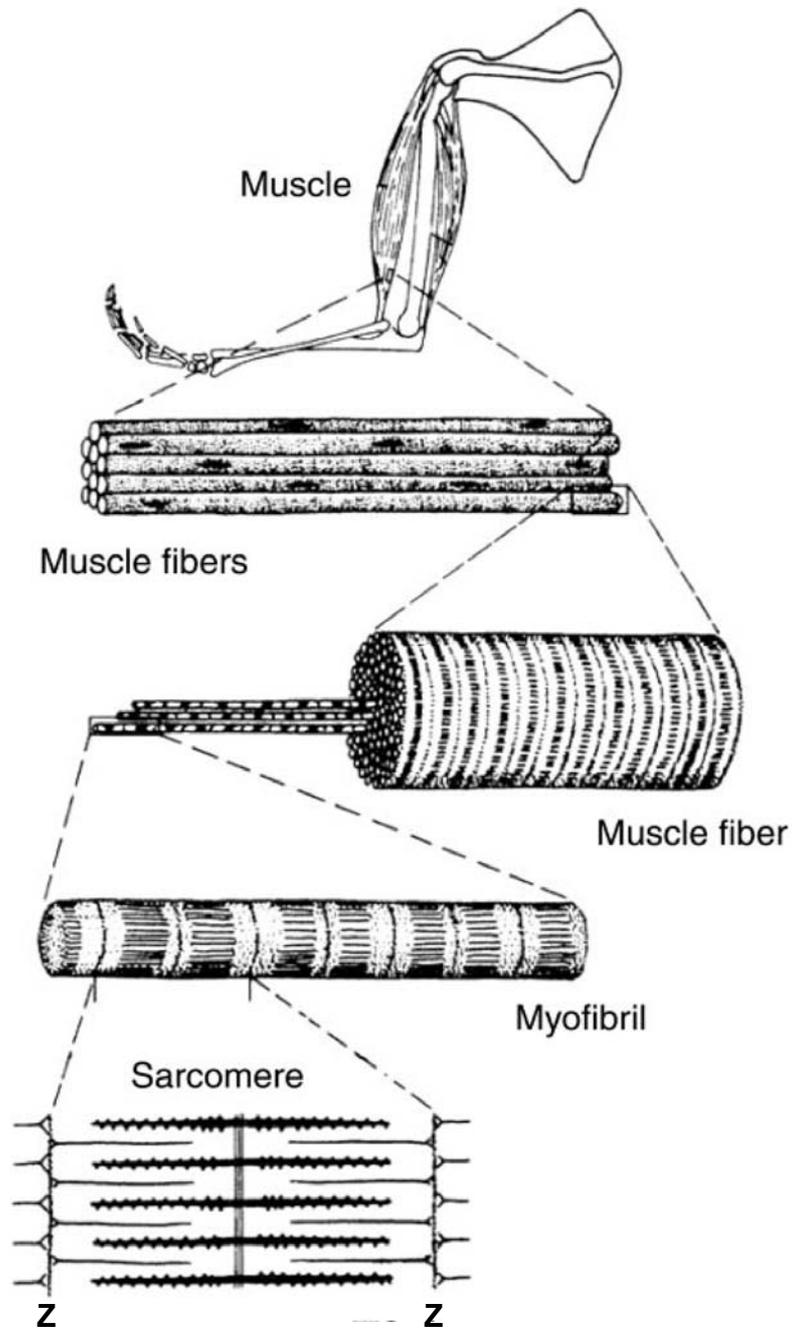
Os músculos esqueléticos são os responsáveis pelos movimentos corporais voluntários, como por exemplo o exercício físico. Cada músculo é composto de células alongadas e multinucleadas denominadas fibras musculares, que por sua vez possuem sarcômeros arranjados longitudinalmente e em série, formando as miofibrilas (Brooks, 2003) (Figura 1). As miofibrilas são constituídas por elementos contráteis denominados filamentos grossos e finos, que através das suas interações transformam energia química proveniente de ATP em trabalho mecânico durante a contração muscular (Brooks, 2003). Os filamentos grossos são compostos principalmente por moléculas de miosina, que possui a propriedade de interagir com filamentos de actina e hidrolisar moléculas de ATP, promovendo o encurtamento dos sarcômeros (Cooke, 1997).

Os músculos esqueléticos são capazes de produzir espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (Balon e Nadler, 1994; Davies et al., 1982), incluído o óxido nítrico ( $\text{NO}^*$ ), uma espécie reativa de nitrogênio produzida pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) a partir da arginina (Alderton et al., 2001). Durante a contração muscular há aumento da produção intracelular de  $\text{NO}^*$ , sendo este dependente da intensidade da contração (Silveira et al., 2003).

Uma das principais conseqüências da produção de  $\text{NO}^*$  é a S-nitrosação de cisteínas, formando S-nitrosotióis (Goldstein e Czapski, 1996). A S-nitrosação de proteínas tem sido associada como um dos principais mecanismos de ação do  $\text{NO}^*$  intracelular em sistemas biológicos, já que muitas proteínas têm suas atividades biológicas alteradas pela formação de S-nitrosotióis em cisteínas denominadas "críticas" (Lane et al., 2001). Como a miosina é uma proteína abundante em fibras

musculares esqueléticas e possui um grande número de cisteínas em sua estrutura, pode ser um alvo para a aumentada produção de NO<sup>•</sup> durante contração muscular.

Este trabalho aborda os efeitos da S-nitrosação de cisteínas na atividade biológica da miosina *in vitro*, bem como procura identificar o mecanismo de S-nitrosação (ação direta do NO<sup>•</sup> ou por transnitrosação) que promove as alterações enzimáticas na miosina. Os resultados podem servir para identificar a S-nitrosação da miosina como uma modificação pós-transducional que possa ocorrer principalmente durante ação contrátil ou em situações patológicas como na inflamação. Na revisão de literatura serão abordadas as principais características estruturais e funcionais da miosina no músculo esquelético e seu papel no processo contrátil que podem ser alterados com a S-nitrosação. Também serão discutidos os principais mecanismos de formação de S-nitrosotióis em proteínas.



**Figura 1.** Esquema hierárquico da estrutura do músculo esquelético mostrando que cada músculo é constituído por fibras musculares alongadas. Cada fibra muscular possui miofibrilas que fornecem a característica estriada da fibra muscular. A unidade funcional de cada miofibrila, o sarcômero, é delimitada por duas linhas Z. (Retirado de Brooks et al (2003)).

## II – Revisão da literatura

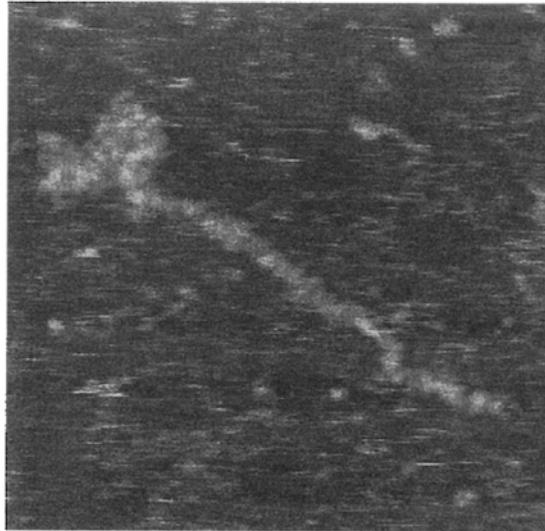
### II.1. – Miosina: estrutura e função

A miosina é a principal proteína constituinte das miofibrilas de músculo esquelético de mamíferos, representando em torno de 55% de todo seu conteúdo protéico (Vianna, 1981, p.284). Como uma das principais características, esta proteína possui a capacidade de fazer ligações com filamentos de actina e deslocá-las, promovendo o encurtamento dos sarcômeros nas miofibrilas e, por conseguinte, o encurtamento das fibras musculares (Perry, 1996, p.27).

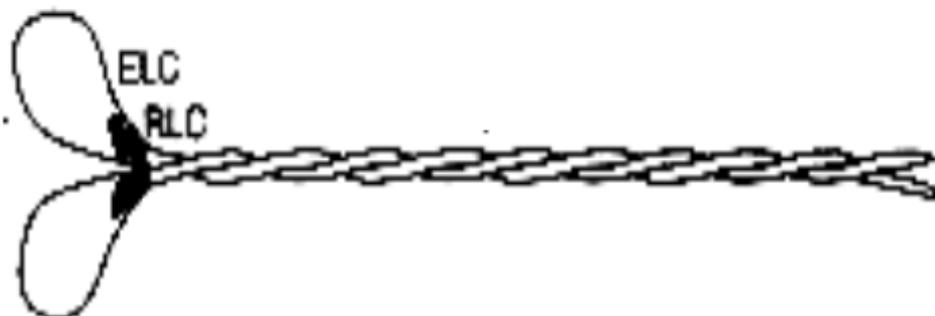
A miosina é uma proteína de massa molecular aproximada de 520 kDa e possui uma estrutura hexamérica e altamente assimétrica (Figura 2A), sendo constituída por duas cadeias pesadas (*myosin heavy chain*, MHC), que formam um dímero e somam 440 kDa, e duas cadeias leves (*light chain*, LC) associadas a cada cadeia pesada (Rayment et al., 1993b). A Figura 2A mostra a cadeia pesada, que apresenta dois domínios bem definidos: a região C-terminal, que tem característica filamentosa semelhante a uma cauda, e um domínio globular (a região N-terminal) onde se localiza o sítio de ligação de nucleotídeo e o sítio de ligação à actina. Este domínio é denominado como porção motora ou cabeça da miosina (Rayment et al., 1993b).

A parte filamentosa da miosina (cauda) é insolúvel em baixa força iônica e tende a se associar lateralmente com outras moléculas de miosina para formar o filamento grosso em condições iônicas fisiológicas, portanto sendo a responsável pela manutenção da estrutura do filamento grosso nas miofibrilas (Vianna, 1981, p.287).

**A**



**B**



**Figura 2.** A) Imagem da molécula de miosina por microscopia de força atômica (extraído de Hallett et al. (1995)). B) Esquema representativo da molécula de miosina que mostra cada cadeia pesada composta por uma grande cauda e por uma porção globular. Nesta última estão associadas as cadeias leves. Figura modificada de Sellers e Goodson (1995). ELC, cadeia leve essencial; RLC, cadeia leve regulatória.

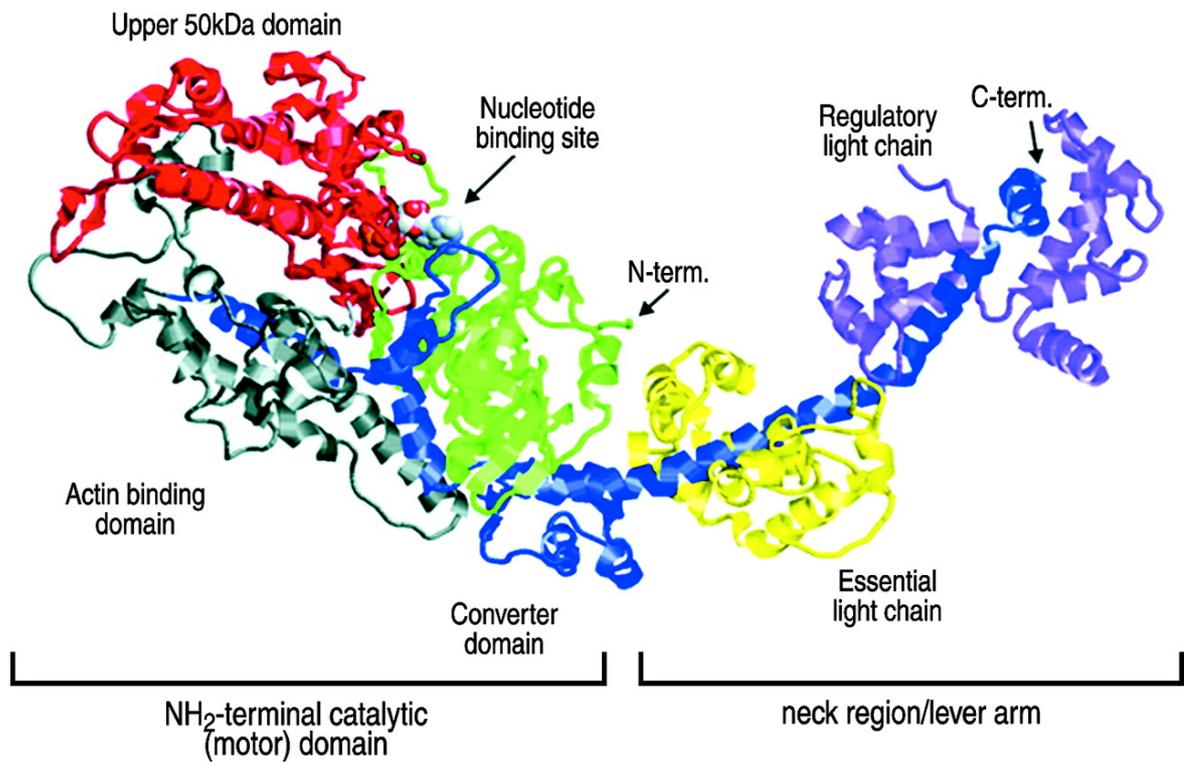
As cadeias leves da miosina são classificadas em essenciais (LC<sub>1</sub> e LC<sub>3</sub>), de peso molecular aproximado de 22 e 18 kDa, respectivamente, e uma cadeia leve regulatória, LC<sub>2</sub>, de peso molecular de 18 kDa. Esta última subunidade é também denominada cadeia leve-DTNB, pois pode ser removida sob tratamento com DTNB e EDTA (Szczesna et al., 1996). Cada cadeia pesada possui uma cadeia leve essencial (LC<sub>1</sub> ou LC<sub>3</sub>) e uma cadeia regulatória (LC<sub>2</sub>), que juntas, estabilizam a região de 8.5 nm do braço de alavanca, na cabeça da miosina (Hernandez et al., 2007).

Na cabeça da miosina, se localizam os sítios de ligação e hidrólise de ATP, além do sítio de ligação com a actina (Rayment et al., 1993b). Essa porção da miosina (subfragmento-1, S1) pode ser preparada através de proteólise limitada da miosina por quimiotripsina na presença de baixa força iônica e EDTA (Weeds e Taylor, 1975), sendo então muito utilizada para estudos dos passos enzimáticos de hidrólise de ATP e de ligação com actina (Figura 3).

A capacidade de hidrolizar ATP na miosina é dependente da presença do complexo entre cátions mono ou divalentes com o ATP, o que permite sua ligação no sítio ativo da cabeça da miosina. As atividades ATPásicas máximas variam significativamente entre os íons (Seidel, 1969c). Na ausência de cátions divalentes (presença de EDTA) e em altas concentrações de K<sup>+</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, a atividade ATPásica da miosina encontra seus valores maiores (Seidel, 1969a). A atividade é fortemente inibida na presença de cátions divalentes como o Mg<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> ou Mn<sup>2+</sup>, e têm um valor intermediário na presença de Ca<sup>2+</sup> (Seidel, 1969c).

A hidrólise de ATP pela miosina pode ser resumida em 4 passos (Lymn e Taylor, 1970): ligação de ATP, hidrólise do ATP em ADP e fosfato inorgânico (P<sub>i</sub>),

liberação de  $P_i$  do sítio ativo e liberação de ADP do sítio ativo, possibilitando uma nova ligação de ATP (Figura 4A).

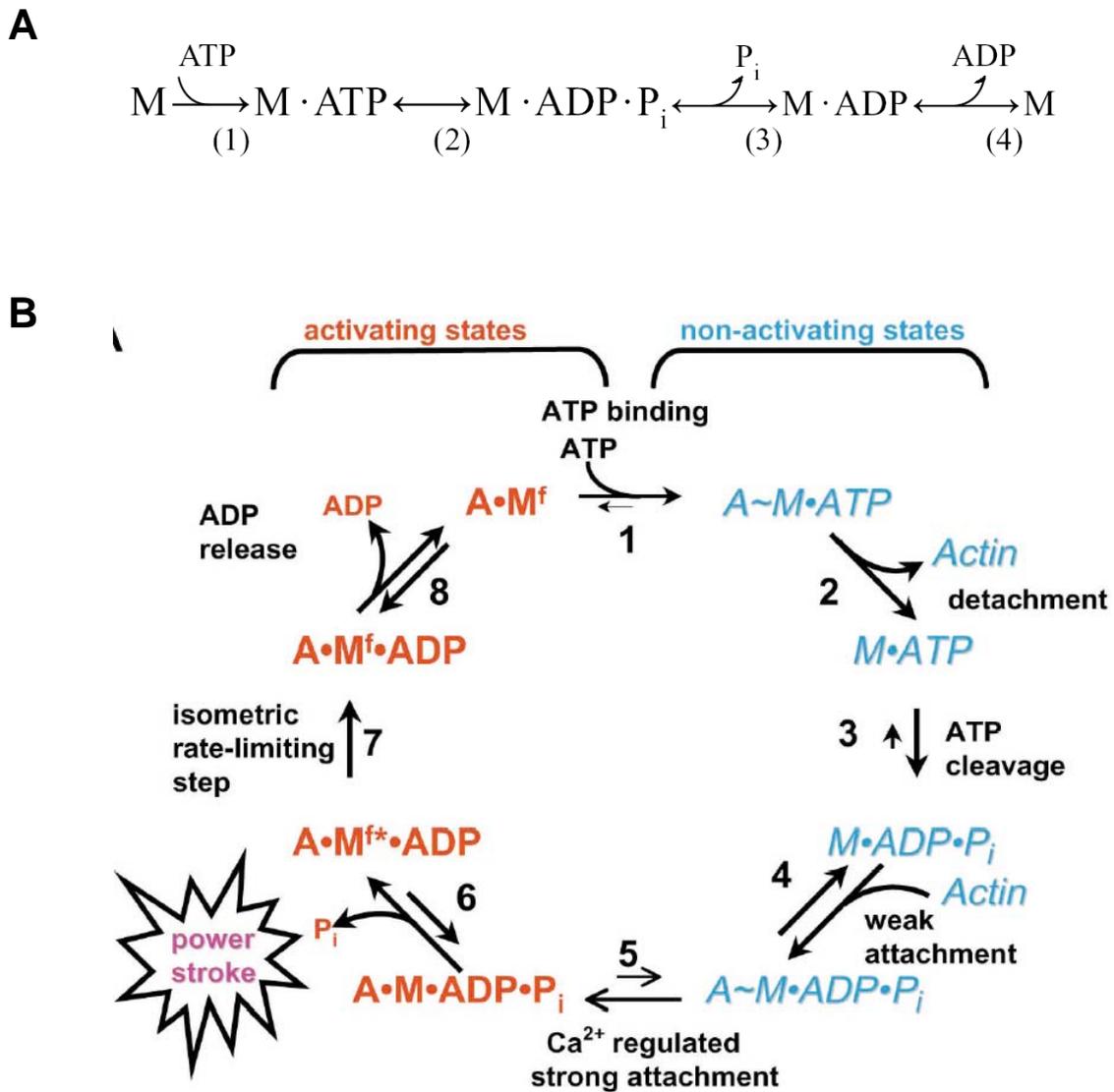


**Figura 3.** Estrutura do subfragmento-1 de miosina de músculo peitoral de galinha conseguida por cristalografia de raios-x e representada na forma de fita. Regiões coloridas em verde, vermelho, cinza e azul são pertencentes à cadeia pesada da miosina. A região em amarelo representa uma cadeia leve essencial (LC<sub>1</sub> ou LC<sub>3</sub>) e a região em violeta representa a cadeia leve regulatória (LC<sub>2</sub>). Cristalografia preparada por Rayment et al. (1993b) e modificada por Rayment (1996).

Na presença de  $K^+$ EDTA o passo limitante para a hidrólise de ATP é a clivagem do ATP em ADP e  $P_i$ . Já na presença de  $Mg^{2+}$  ou  $Ca^{2+}$ , o passo limitante é outro: a liberação de fosfato inorgânico ( $P_i$ ), mais lenta do que a clivagem do nucleotídeo (Lymn e Taylor, 1970). A atividade na presença de  $Mg^{2+}$  representa a condição fisiológica de repouso, sendo bem mais baixa ( $< 0.1 \text{ s}^{-1}$ ) que na presença de  $Ca^{2+}$  ou EDTA.

Já na presença de actina, a atividade  $Mg^{2+}$ ATPásica aumenta de 50 a 100x (Schliselfeld, 1976). Na ausência de ATP, a miosina ligar-se fortemente à actina ( $K_a = 10^7 \text{ M}^{-1}$ ), formando o complexo de "rigor". Na presença de ATP, esta afinidade é diminuída ( $K_a = 10^4 \text{ M}^{-1}$ ), de modo que, no músculo em repouso, a actina se dissocia da miosina e o ATP é imediatamente clivado a ADP e  $P_i$  (Figura 4B). A actina (A) volta a possuir afinidade alta pela miosina (M), mesmo com os produtos de hidrólise ainda ligados à miosina, e a formação do complexo A.M.ADP. $P_i$  acelera a saída de  $P_i$  do sítio catalítico, aumentando então a velocidade de hidrólise em comparação com a hidrólise pela miosina sozinha (Lymn e Taylor, 1971).

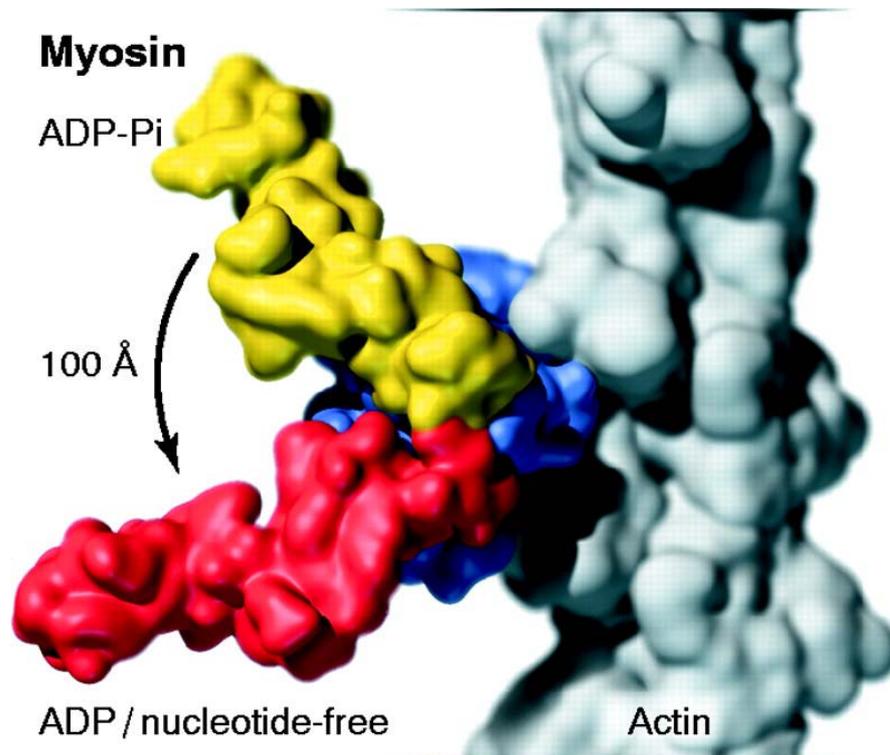
Tanto a miosina inteira quanto o subfragmento-1 da miosina apresentam afinidades diferentes pela actina, o que ainda não foi explicado pela literatura. A afinidade da miosina inteira pela actina é 40 a 100x maior do que para o subfragmento-1 ( $K_m$ ,  $0.12 \text{ } \mu\text{M}$  vs.  $4.3 - 11.7 \text{ } \mu\text{M}$  para miosina e subfragmento-1, respectivamente) (Offer et al., 1972; Ribeiro et al., 2005; Schliselfeld, 1976). A ativação da miosina pela actina é muito maior na forma filamentosa, já que a ativação máxima da ATPase da miosina por actina monomérica (globular) é apenas 4x o valor encontrado para miosina na ausência de actina (Offer et al., 1972). Isso mostra que o sítio de ligação para actina na cabeça da miosina depende da ligação de dois monômeros de actina no seu estado filamentoso (Rayment et al., 1993a).



**Figura 4.** Hidrólise de ATP pela miosina na ausência (A) e presença de actina (B). A) Resumo dos passos cinéticos de hidrólise de ATP pela miosina. Retirado de Lymn e Taylor (1970). B) Ciclo de pontes cruzadas quando miosina e actina filamentososa estão presentes. Nos passos 1-4 as moléculas de miosina não estão tracionando os filamentos de actina. Nos passos 5-8 ocorrem os estados de pontes fortes que são responsáveis por tracionar filamentos de actina até o estado de "rigor" ( $\text{A} \cdot \text{M}$ ). Retirado de Gordon et al. (2001).

No ciclo de pontes cruzadas ilustrado na Figura 4B, durante a fase de tensão isométrica dos filamentos de actina, as modificações conformacionais induzidas pela hidrólise do ATP e pela saída do Pi e do ADP do sítio ativo promovem movimento de aproximadamente 100 Å na região do pescoço do S1 da miosina, denominado "braço de alavanca" (*lever arm*), que é a etapa responsável pelo deslocamento dos filamentos de actina e encurtamento do sarcômero. Esta região possui uma grande  $\alpha$ -hélice, como ilustrado na Figura 5 (Vale e Milligan, 2000), onde se ancoram as cadeias leves. Essa região pode ser separada da cabeça da miosina por proteólise do S1 por tripsina (Mornet et al., 1985), que produz um fragmento de 20 kDa. Apesar da sua importância na produção de tensão no músculo, esse fragmento não é essencial para a ligação da actina ou do ATP no S-1 (Okamoto e Sekine, 1987).

Como os passos de hidrólise de ATP acompanham mudanças conformacionais principalmente na região da cabeça da miosina, essas mudanças são o resultado de pequenos movimentos de vários domínios pertencentes a regiões da cabeça da miosina. Qualquer impedimento aos movimentos locais pode afetar de forma significativa tanto a atividade enzimática da miosina quanto a capacidade de se ligar à actina (Ue, 1987). Um exemplo é a modificação química de algumas cisteínas presentes na cabeça da miosina (Walser et al., 1981) por DTNB ou *N*-etilmaleimida, que podem modular a capacidade de hidrolisar ATP (Kielley e Bradley, 1956). Estes resíduos são localizados em algumas regiões importantes para o ciclo catalítico e para a ligação com actina (Bertrand et al., 2000; Reisler, 1982; Tiago et al., 2006; Ue, 1987). Essas cisteínas têm sido alvo de muitos estudos para entender os mecanismos de mudanças conformacionais da miosina durante a hidrólise do ATP.



**Figura 5.** Braço de alavanca da cabeça da miosina quando ligada à actina filamentosa mostra um movimento de 100 Å durante a fase de tração do filamento de actina no ciclo de pontes cruzadas, na transição entre a presença de ADP e Pi na cabeça da miosina (amarelo) e a ausência de produtos de hidrólise de ATP (vermelho) (Vale e Milligan, 2000).

## II.2. – Miosina como alvo de modificações pós-transducionais em cisteínas

Após o processo de síntese de uma proteína pela tradução do mRNA pelos ribossomos no citosol, a proteína pode sofrer alterações na sua estrutura que geram modificações na sua função chamadas de modificações pós-transducionais (Nelson e Cox, 2000, p.1062). Muitas podem ser essas modificações, desde a clivagem da proteína por enzimas proteolíticas até modificações químicas em aminoácidos específicos. Existe um grande número de modificações pós-transducionais por alterações químicas em cadeias laterais de aminoácidos, como por exemplo glicação, ubiquitinação, fosforilação, oxidação, acetilação, tiolação e nitrosação (Thomas et al., 2006).

A miosina é uma proteína de meia-vida longa (em média 30 dias; Kay (1978)), e possui um grande número de cisteínas que podem ser modificadas quimicamente por agentes oxidantes fisiológicos, como  $H_2O_2$  e peroxinitrito (Ooizumi e Xiong, 2004; Tiago et al., 2006). Essas características sugerem que a miosina seja alvo de modificações pós-transducionais no músculo esquelético (Ramamurthy et al., 2001).

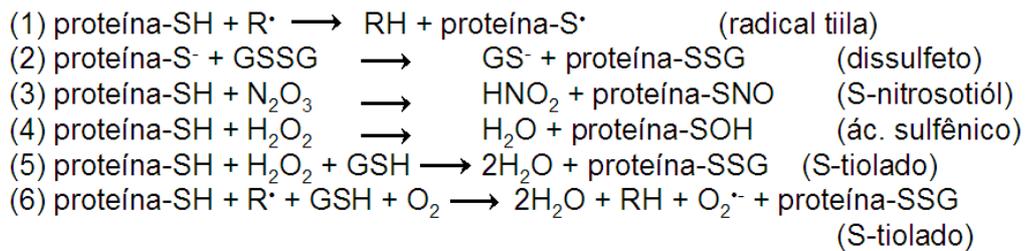
Proteínas que contém cisteínas na sua cadeia de aminoácidos são particularmente suscetíveis a modificações por radicais livres e moléculas eletrofílicas, incluindo espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (Thomas e Mallis, 2001). A cisteína é um aminoácido polar, sendo o único a apresentar em sua cadeia lateral um grupamento sulfidril ou tiol (R-SH) (Nelson e Cox, 2000, p.118) e possui a propriedade de formar dímeros covalentes através de pontes dissulfeto (R-S-S-R). Em muitas proteínas as pontes dissulfeto são fundamentais para estabilizar a estrutura tri-dimensional (Netto et al., 2007). A reatividade do grupamento tiol é um

fator limitante para sua participação nas reações redox, e essa reatividade é extremamente dependente da desprotonação do grupamento tiol (R-SH), ou seja a formação de seu ânion tiolato ( $-S^-$ ), uma vez que a forma protonada possui baixa reatividade (Netto et al., 2007). O  $pK_a$  do grupamento tiol na cisteína isolada é em torno de 8.5 (Benesch e Benesch, 1955), mas o  $pK_a$  pode variar muito dependendo da carga dos aminoácidos vizinhos, que podem aumentar ou diminuir a reatividade da cisteína em pH fisiológico (Netto et al., 2007; Perez-Mato et al., 1999; Zhang et al., 2005).

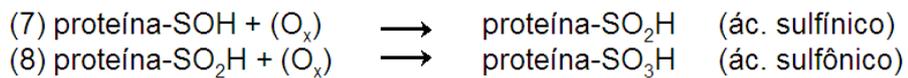
Os grupamentos tióis podem ser oxidados por compostos reativos radicalares e não radicalares para a formação de diversos estados oxidativos, dependendo do número de elétrons oxidados, como mostrado na Figura 6 (Thomas e Mallis, 2001). Os ataques nucleofílicos no grupamento tiol de cisteínas protéicas por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, resultam tanto na formação de radicais tiila ( $Ptn-S^\bullet$ ), de pontes dissulfeto intermoleculares ou intramoleculares ( $Ptn-S-S-Ptn$ ), de dissulfetos mistos ( $Ptn-S-S-R$ ) ou de ácido sulfênico ( $Ptn-SOH$ ), quanto de nitrosotióis ( $Ptn-SNO$ ). Tanto pontes dissulfeto e S-nitrosotióis quanto ácido sulfênico representam estados oxidativos e nitrosativos reversíveis por ação de agentes redutores como DTT e arsenito (Ishii et al., 1999). Alguns trabalhos sugerem que a formação de ácido sulfênico em cisteínas é um passo intermediário da formação de pontes dissulfeto em proteínas (Carballal et al., 2003; DeMaster et al., 1995).

A reação de espécies reativas de oxigênio com grupamentos tióis, além de gerar dissulfetos e ácido sulfênico, pode gerar estados oxidativos que são irreversíveis à ação de agentes redutores, como no caso da formação de ácido sulfínico ( $-SO_2H$ ) e sulfônico ( $-SO_3H$ ) (Ishii et al., 1999; Thomas e Mallis, 2001).

### Estados oxidativos reversíveis de sulfidrilas protéicas



### Estados oxidativos irreversíveis de sulfidrilas protéicas



**Figura 6.** Resumo dos estados oxidativos e nitrosativos de grupamentos sulfidrilas em proteínas. R $\cdot$  representa qualquer molécula radicalar. Figura modificada de Thomas e Mallis (2001).

Além do ataque de espécies reativas de oxigênio sobre grupamentos tióis, há também o ataque nitrosativo, que ocorre quando há aumento da produção de óxido nítrico intracelular, o principal representante das espécies reativas de nitrogênio (Miersch e Mutus, 2005). Um dos principais produtos finais do aumento do estresse nitrosativo intracelular é a formação de S-nitrosotióis (RSNO) (Bryan et al., 2004). Os mecanismos de formação de RSNO intracelular e seus efeitos biológicos serão abordados mais adiante.

A molécula de miosina apresenta ao todo em torno de 4300 aminoácidos, dos quais 42 são cisteínas (Lowey et al., 1969). Dependendo do método de determinação dos grupamentos tióis livres, do grau de desenovelamento protéico e dos cuidados tomados para eliminar metais do meio de reação, pode-se encontrar desde 3 pontes dissulfeto (no caso de soluções com pequena contaminação de metais), até os 42 grupamentos sulfidrílica reduzidos (em soluções livre de metais e na presença de altas concentrações de agentes desnaturantes) (Buttkus, 1971).

Históricamente, o período dos estudos das funções da miosina no processo de contração muscular coincide com a identificação e compreensão do papel das cisteínas na função enzimática da miosina. Um dos primeiros estudos em que se propôs verificar a “disponibilidade” de tióis na miosina foi o trabalho de Greenstein e Edsall (1940), onde determinou, através de titulação, que existe um grupo de tióis que se apresentam disponíveis a porfirinas, e que esse grupo é aumentado na presença de agentes desnaturantes como uréia e guanidina, como também verificado por Anfinsen e Haber (1961).

Pouco tempo depois, Singer e Barron (1944) titularam os grupamentos tióis da miosina com *p*-cloromercuribenzoato (PCMB) e nitroprussiato na ausência e presença de guanidina, verificando os efeitos sobre a atividade ATPásica, que era

bastante inibida. Esse trabalho teve grande importância para o estudo da atividade enzimática da miosina, pois foi uma forte evidência de que a ATPase e a miosina eram a mesma proteína; pois até então acreditava-se que a miosina e a ATPase fossem proteínas distintas (Kalckar, 1969, p.417).

Contudo, os reagentes utilizados para titular grupamentos tióis possuem efeitos bifásicos na atividade  $\text{Ca}^{2+}$ ATPásica da miosina: até 4  $\mu\text{M}$ , o PCMB aumenta a velocidade de hidrólise, enquanto que concentrações maiores a inibem totalmente (Chappell e Perry, 1955; Greville e Needham, 1955). Kielley e Bradley (1956) resolveram determinar qual a relação entre a modificação da atividade e a titulação de grupamentos tióis por PCMB e *N*-etilmaleimida (NEM), este último um conhecido agente alquilante de tióis. Este estudo demonstrou que a miosina possui mais do que um grupamento tiol "por centro ativo", e que apenas alguns tióis estavam relacionadas com a atividade enzimática. Após este trabalho, procurou-se identificar quais seriam esses grupamentos "essenciais" e como eles modulam a atividade ATPásica.

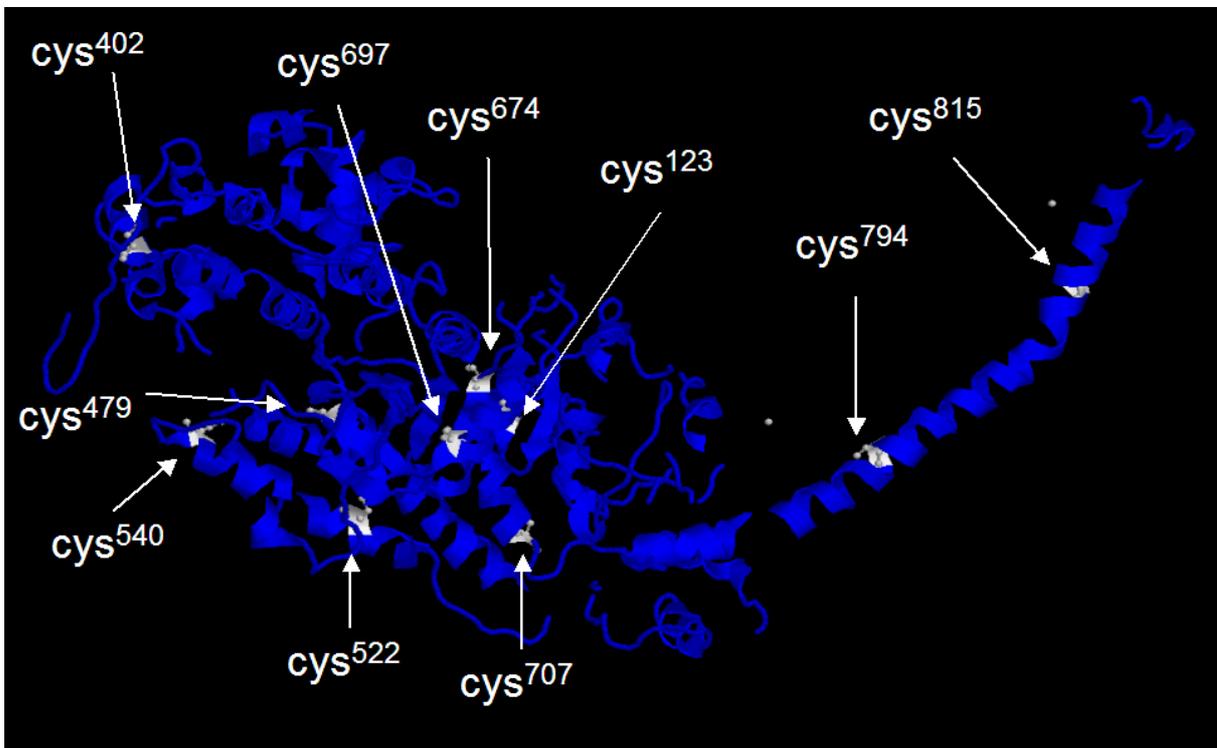
Trabalhos subseqüentes mostraram que existem duas classes de grupamentos tiol: o grupo  $\text{S}_1$ , mais reativo a agentes S-tiolantes e alquilantes; e o grupo  $\text{S}_2$ , menos reativo (Kielley, 1964). Seidel (1969b) demonstrou que modificação em apenas um dos grupos de tióis ( $\text{S}_1$  ou  $\text{S}_2$ ) inibe a atividade  $\text{K}^+$ EDTA ATPásica e ativa a atividade  $\text{Ca}^{2+}$ ATPásica, mas somente a modificação conjunta dos tióis inibe a atividade  $\text{Ca}^{2+}$ ATPásica. Esse estudo foi importante para determinar que a modificação dos tióis pode regular a atividade ATPásica da miosina.

Este mesmo autor demonstrou que tais grupos se localizam muito próximos uns dos outros e estão relacionados com mudanças conformacionais durante os passos de hidrólise, estando próximos ao sítio de ligação de ATP (Seidel et al.,

1970; Seidel, 1972). Esta conclusão foi ratificada por diversos outros trabalhos, inclusive por identificação dos resíduos na estrutura da cabeça da miosina por cristalografia de raios-x do S1 como Cys<sup>707</sup> (SH1) e Cys<sup>697</sup> (SH2) presentes no fragmento de 20 kDa (Duke et al., 1976; Elzinga e Collins, 1977; Rayment et al., 1993b; Reisler et al., 1974a; Reisler et al., 1974b). Estas cisteínas localizam-se entre o sítio de ligação do ATP e a fenda próxima ao sítio de ligação com actina (Rayment et al., 1993b) e ajudaram na compreensão dos movimentos da grande  $\alpha$ -hélice a que pertencem, uma vez que as cadeias laterais dessas duas cisteínas se aproximam e se afastam durante o ciclo de hidrólise de ATP (Nitao e Reisler, 1998).

No S1, são encontradas 11 cisteínas, sendo 10 pertencentes à cadeia pesada (Figura 7) e uma proveniente da cadeia leve essencial (LC<sub>1</sub> ou LC<sub>3</sub>) (Mornet et al., 1985). Caso o S1 seja proteolísado brevemente por tripsina, três grandes domínios são produzidos: um de 27 kDa, que possui apenas 1 tiol (Cys<sup>123</sup>); outro de 50 kDa, que possuiu quatro tióis (Cys<sup>402</sup>, Cys<sup>479</sup>, Cys<sup>522</sup> e Cys<sup>540</sup>); e um de 20 kDa, que possui cinco tióis (Cys<sup>674</sup>, Cys<sup>697</sup>, Cys<sup>707</sup>, Cys<sup>794</sup> e Cys<sup>815</sup>) (Mornet et al., 1985).

Apesar da importância das Cys<sup>707</sup> e Cys<sup>697</sup> como candidatos a reguladores da hidrólise de ATP pela miosina por modificações pós-transducionais, a cabeça da miosina possui outras cisteínas que, quando modificadas, podem promover alterações nas propriedades enzimáticas da miosina (Figura 7). A Cys<sup>540</sup>, presente na região de interface entre a miosina e actina, quando modificada especificamente por alquilação, apresenta efeitos diferentes dos percebidos quando as Cys<sup>707</sup> e Cys<sup>697</sup> são modificadas. A modificação desta cisteína produz redução apenas das atividades Mg<sup>2+</sup>ATPásica e actina-ativada, sem alteração das ATPases ativadas por Ca<sup>2+</sup> e K<sup>+</sup>EDTA, e sem alterar a afinidade da miosina por actina (Bertrand et al., 1999; Bertrand et al., 2000).



**Figura 7.** Localização das cisteínas presentes no subfragmento-1 da miosina. As cisteínas estão coloridas e identificadas em branco e o resto da cadeia pesada está colorido em azul. Figura extraída do PDB 2MYS proveniente da cristalografia de raios-x determinada por Rayment et al. (1993b) e tratada com o programa RASMOL. Os dois pontos brancos fora da cadeia pesada são referentes a cisteínas provenientes das cadeias leves que não estão mostradas na figura.

Outra cisteína que pode ser alvo de modificação é a Cys<sup>522</sup>, uma vez que esta cisteína parece se movimentar se aproximando e se afastando do domínio de 20 kDa durante a hidrólise de ATP pela miosina (Mornet et al., 1985; Ue, 1987). Entretanto, em alguns casos, o resíduo modificado não é identificado, como no caso do tratamento da miosina por xestoquinona (Sakamoto et al., 1995). Este reagente foi capaz de modificar duas cisteínas em cada molécula de miosina, e promove alterações enzimáticas tanto na miosina quanto em actomiosina, que são diferentes das produzidas quando as Cys<sup>707</sup> e Cys<sup>697</sup> são modificadas por NEM (Sakamoto et al., 1995).

Os grupamentos tióis presentes na cabeça e na cauda da miosina possuem reatividades diferentes. Enquanto na cauda a reatividade de alguns tióis é levemente reduzida com a diminuição da força iônica (Pliszka e Lu, 1985), os tióis denominados "essenciais" sofrem grandes redução na reatividade com aumento na força iônica (Watterson et al., 1975). Quando actina se apresenta ligada à cabeça de miosina, a reatividade dos tióis SH1 e SH2 é diminuída. A reatividade também é reduzida quando o sítio catalítico é ocupado por Mg<sup>2+</sup>ADP.P<sub>i</sub> (Burke et al., 1976). Contudo, existem poucos estudos acerca da reatividade dos tióis "não-essenciais" na cabeça da miosina na presença de actina ou nucleotídeo.

Como evidenciado pelos trabalhos citados acima, a modificação de cisteínas específicas, principalmente com reagentes que promovem alquilação ou S-tiolação, foi importante para a compreensão da estrutura tridimensional da miosina durante vários passos do ciclo catalítico e da sua ligação com actina. Outra função importante dos trabalhos citados foi a identificação do papel de algumas cisteínas na função biológica da miosina.

Dentre as espécies reativas de oxigênio que podem modificar a função enzimática da miosina, foi mostrado que o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) promove oxidação de algumas cisteínas, incluindo a Cys<sup>707</sup> e algum resíduo que promove formação de dissulfetos entre a miosina e actina (Ooizumi e Xiong, 2004)

Outra espécie reativa que é produzida biologicamente, principalmente durante resposta inflamatória, é o peroxinitrito. No trabalho de Tiago et al. (2006), a atividade Mg<sup>2+</sup>ATPásica actina-ativada do S1 é inibida por peroxinitrito. Tal inibição é provocada pela modificação de 7 cisteínas, sendo 2 cisteínas das mais reativas. Entretanto, não ficou claro neste trabalho quais foram os tipos de modificação nestas cisteínas (S-nitrosação ou oxidação).

Nestes dois trabalhos (Ooizumi e Xiong, 2004; Tiago et al., 2006), foi mostrado que a miosina é capaz de sofrer ataques nucleofílicos nas suas cisteínas por espécies biologicamente ativas. Pouco se sabe sobre a função da modificação por outras moléculas fisiologicamente ativas, como o óxido nítrico e seus intermediários químicos. Sendo assim, e considerando a produção de NO<sup>•</sup> durante a contração muscular, torna-se importante investigar quais os efeitos de modificações induzidas por estes compostos sobre a atividade da miosina.

### II.3. – Óxido nítrico: química e mecanismos de ação sobre cisteínas

O óxido nítrico (NO<sup>•</sup>), também chamado de monóxido de nitrogênio, é um radical livre, pois possui um elétron não pareado no orbital antiligante 2p- $\pi$ . Ele pode apresentar três formas redox, a forma neutra radicalar óxido nítrico radical (NO<sup>•</sup>); a forma oxidada cátion nitrosônio (NO<sup>+</sup>), quando há perda do elétron não pareado; e

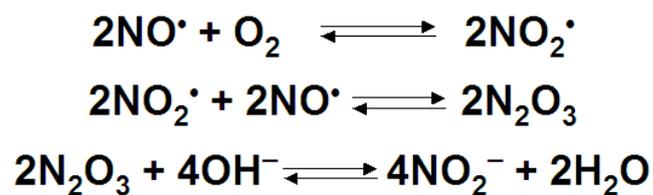
uma forma reduzida aniônica nitroxil ( $\text{NO}^-$ ), quando há adição de um elétron nesse orbital (Stamler et al., 1992c).

Biologicamente o  $\text{NO}^\bullet$  reage preferencialmente com a molécula de oxigênio ( $\text{O}_2$ ) e suas várias formas redox, além de metais iônicos de transição livres ou ligados a grupamentos prostéticos em proteínas, como no grupamento heme (Goldstein e Czapski, 1996; Stamler et al., 1992c). Na presença de soluções oxigenadas, o  $\text{NO}^\bullet$  reage rapidamente com o  $\text{O}_2$  para formar o dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2^\bullet$ ), seguido da condensação com outra molécula de  $\text{NO}^\bullet$  para formar trióxido de dinitrogênio ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), como evidenciado na Figura 8A (Fernandes et al., 2005). Este reage com  $\text{OH}^-$  para formar o ânion nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) (Goldstein e Czapski, 1996). A reação do  $\text{NO}^\bullet$  com o  $\text{O}_2$  é de segunda ordem para  $\text{NO}^\bullet$  e de primeira ordem para o  $\text{O}_2$ ; sendo assim, a meia-vida do  $\text{NO}^\bullet$  depende muito da quantidade de  $\text{NO}^\bullet$  produzido, podendo ser de até alguns minutos, no caso de concentrações micromolares de  $\text{NO}^\bullet$  (Kharitonov et al., 1994).

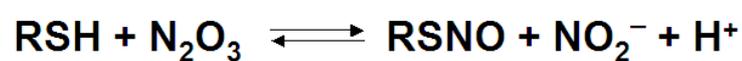
Muitas das funções biológicas do  $\text{NO}^\bullet$  estão associadas à reação direta do  $\text{NO}^\bullet$  com o grupamento heme da enzima guanilato ciclase solúvel, o que aumenta a produção de GMPcíclico (Cary et al., 2006). Este mecanismo promove entre outras funções, relaxamento do músculo liso vascular, aumentando o fluxo sangüíneo local, como mostrado nos estudos clássicos de Ignarro et al sobre a função do  $\text{NO}^\bullet$  na estimulação peniana (Ignarro et al., 1987; Ignarro et al., 1990).

Outra ação biológica importante do  $\text{NO}^\bullet$  é a formação de S-nitrosotióis em cisteínas proteicas e em tíois de baixo peso molecular, como a glutathiona. Apesar da reatividade do  $\text{NO}^\bullet$  por grupamentos tíois ser muito baixa em ambientes aeróbicos (Kharitonov et al., 1995), são encontradas quantidades significativas de S-nitrosotióis no sangue e em diversos tecidos (Bryan et al., 2004; Stamler et al., 1992a).

**A**



**B**



**C**



**Figura 8.** A) Mecanismo de autooxidação do óxido nítrico radical em soluções oxigenadas, mostrando que o principal produto final é o íon nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), caso nenhum intermediário da autooxidação reaja com outras moléculas. B) S-nitrosação induzida por reação de trióxido de dinitrogênio com o grupamento tiol. C) Equação básica da transnitrosação.

Uma das formas do  $\text{NO}^\bullet$  produzir um S-nitrosotiol é a sua reação direta (radical-radical) com um grupamento tiol ( $\text{RS}^\bullet$ ). Isso ocorre principalmente quando há oxidação de um elétron do grupamento tiol por  $\text{NO}_2^\bullet$ , um dos produtos da autooxidação do  $\text{NO}^\bullet$  em meio aquoso (Jourd'heuil et al., 2003; Fernandes et al., 2005). Esta reação não parece ser o principal mecanismo de formação de S-nitrosotióis (Kettenhofen et al., 2007).

O  $\text{NO}^\bullet$  também é capaz de produzir S-nitrosotióis quando sofre autooxidação em solução. Um dos principais intermediários da autooxidação do  $\text{NO}^\bullet$  é o  $\text{N}_2\text{O}_3$ , sendo a sua síntese o passo-limitante para a S-nitrosação à partir do  $\text{NO}^\bullet$  (Goldstein e Czapski, 1996). O  $\text{N}_2\text{O}_3$  é um conhecido agente S-nitrosante; entretanto, esta propriedade é mais evidente quando há um grande excesso molar de grupamentos tióis no meio em relação à concentração de  $\text{N}_2\text{O}_3$  (Jourd'heuil et al., 2003; Kharitonov et al., 1995) (Figura 8B).

Uma vez que a produção de  $\text{NO}^\bullet$  no meio intracelular é significativamente menor que a concentração de proteínas que contém cisteínas, a S-nitrosação de proteínas é quimicamente possível em células, como no caso de fibras musculares esqueléticas. Sendo assim, a miosina, que contém muitas cisteínas e é a proteína mais abundante em fibras musculares, pode ser um alvo importante para S-nitrosação, apesar desta possibilidade, nunca foi identificada a ocorrência de S-nitrosação em miosina.

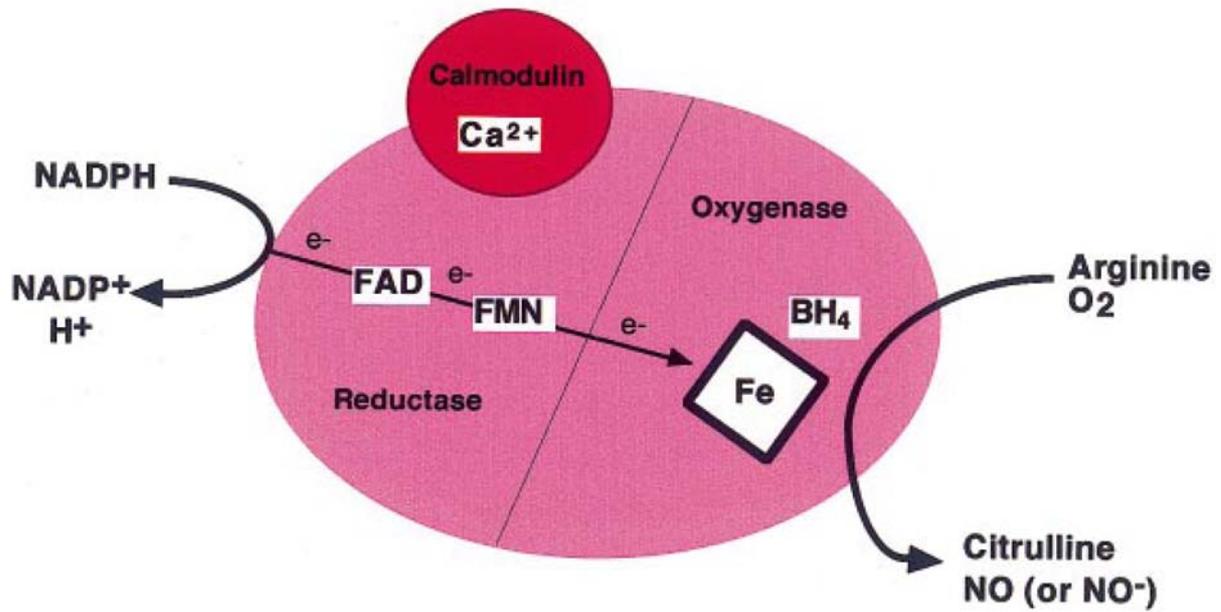
#### II.4. - Síntese biológica de NO<sup>•</sup> no músculo esquelético e em outros tecidos

Em sistemas biológicos, o NO<sup>•</sup> é sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) em um conjunto de reações complexas que em resumo possuem como substratos L-arginina, NADPH e O<sub>2</sub> e que possuem como produtos finais citrulina, NADP<sup>+</sup> e NO<sup>•</sup> (Knowles e Moncada, 1994), como mostrado na Figura 9A.

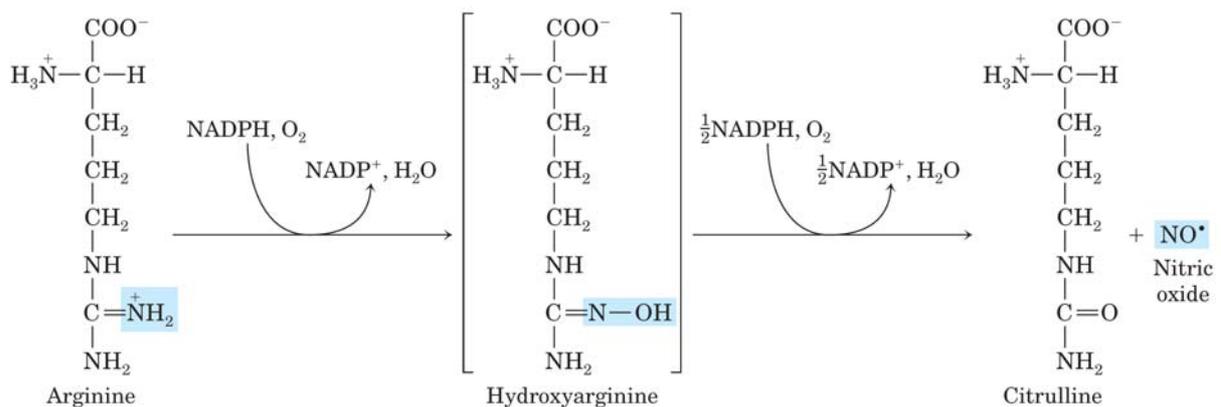
A NOS é usualmente referida como um tetrâmero, pois possui duas subunidades associadas entre si e cada subunidade de NOS é associada a uma calmodulina (Alderton et al. (2001), Figura 9B). Existem três isoformas de NOS: neuronal, endotelial e induzível. A isoforma neuronal (nNOS) foi primeiramente identificada em tecido neuronal e se apresenta ancorada à região interna do sarcolema de fibras musculares esqueléticas de contração rápida (Alderton et al., 2001; Kobzik et al., 1994; Nakane et al., 1993) como mostrado na Figura 10. A isoforma endotelial (eNOS) é expressa em tecido vascular e também na membrana externa mitocondrial em fibras musculares esqueléticas, tanto em fibras de contração rápida quanto em fibras de contração lenta (Kobzik et al., 1995). Tanto a nNOS quanto a eNOS são expressas de forma constitutiva pelas fibras musculares esqueléticas (Kobzik et al., 1994).

A última isoforma de NOS é denominada induzível (iNOS). Sua expressão é induzida por situações de inflamação em diversos tecidos, inclusive em fibras musculares (Thompson et al., 1996). A aumentada síntese de iNOS em músculo promove grande produção de NO<sup>•</sup> de forma contínua, uma vez que sua atividade independe de Ca<sup>2+</sup> (Stamler e Meissner, 2001). Em músculo esquelético, as NOS mais estudadas são as isoformas nNOS e eNOS, ambas dependentes de Ca<sup>2+</sup> para sua ativação.

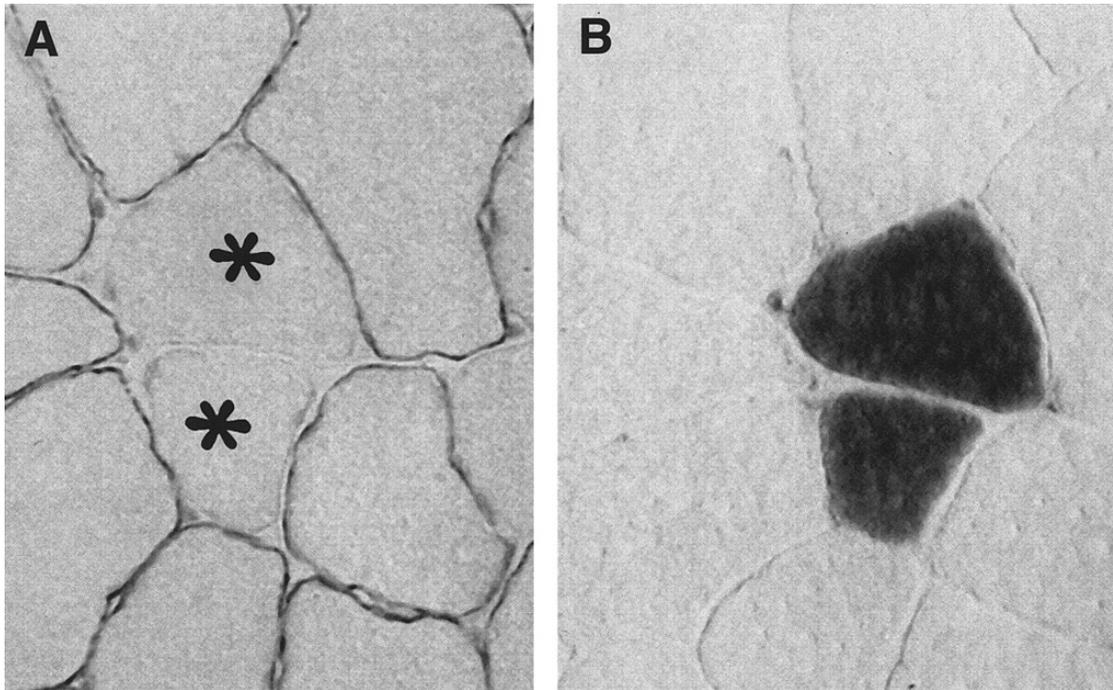
**A**



**B**



**Figura 9.** A) Esquema de catálise da enzima óxido nítrico sintase (NOS). O esquema mostra a dependência de  $\text{Ca}^{2+}$  para a ativação da enzima, sendo portanto relacionado a atividade das isoformas nNOS e eNOS. A figura mostra que NOS possui dois domínios, um domínio oxigenase e um domínio redutase. Figura extraída de Alderton et al. (2001). B) Estrutura dos intermediários químicos na biossíntese do  $\text{NO}^\bullet$  pela NOS. Extraído de Nelson e Cox (2000).



**Figura 10.** Localização da nNOS em corte transversal de feixe de músculo esquelético adjacente ao esôfago. A) Imunomarcção com anticorpo policlonal para nNOS, que mostra marcação na superfície de algumas fibras musculares. O asterisco representa as fibras que não possuem marcação para nNOS. B) Histoquímica das mesmas fibras mostradas em A e coloridas para identificação de fibras do tipo I (contração lenta). As fibras do tipo I não colocalizaram com nNOS. Ambas as figuras foram retiradas de Kobzik et al. (1994).

A síntese de NO<sup>•</sup> em fibras musculares esqueléticas foi descrita pela primeira vez no trabalho de (Kobzik et al., 1994), que mostraram que sua capacidade de sintetizar NO<sup>•</sup> independe do aparato vascular. No mesmo ano, Balon & Nadler (1994) realizaram experimentos com músculo intacto, verificando um aumento de síntese do NO<sup>•</sup> concomitante com aumento na atividade contrátil, dados que foram corroborados por estudos subseqüentes (Fujii et al., 1998; Reiser et al., 1997; Silveira et al., 2003).

Em fibras musculares, a produção do NO<sup>•</sup> parece contribuir para a regulação da função contrátil, uma vez que em alguns trabalhos a inibição da produção de NO<sup>•</sup> aumenta a função contrátil e a utilização de fármacos que funcionam como doadores de NO<sup>•</sup> ou doadores de grupamento nitroso inibe a função contrátil (Andrade et al., 1998; Galler et al., 1997; Heunks et al., 2001b; Heunks et al., 2001a Kobzik et al., 1994; Perkins et al., 1997;).

No trabalho de Andrade et al. (1998), foi sugerido que um dos efeitos do NO<sup>•</sup> poderia ser a inibição da captação de Ca<sup>2+</sup> pelo retículo sarcoplasmático ou a redução da sensibilidade miofibrilar ao Ca<sup>2+</sup>. Os autores não conseguiram verificar redução da força de contração. Entretanto, Galler et al. (1997), Perkins et al. (1997) e Heunks et al. (2001a), verificaram o contrário: A força isométrica foi reduzida por doadores de NO<sup>•</sup>, mas tal tratamento não promoveu alterações na sensibilidade das fibras musculares ao Ca<sup>2+</sup>.

Outros efeitos sobre o desempenho contrátil que podem ser atribuídos à aumentada síntese de NO<sup>•</sup> muscular são a atuação nas vias de produção de ATP. A utilização de glicose sangüínea é aumentada durante exercício, pois promove a transferência de transportadores de glicose (GLUT4) para a membrana celular (Lund et al., 1995). O NO<sup>•</sup> participa da regulação do conteúdo de GLUT4 na membrana

celular em fibras musculares, aumentando a captação de glicose, bem como a inibição da síntese de NO<sup>•</sup> produz efeito inverso (Balon, 1998; Roberts et al., 1997).

No catabolismo de carboidratos, a produção de NO<sup>•</sup> afeta a atividade da enzima fosfofructocinase (PFK) em células nervosas (Almeida et al., 2004), como também em homogenato de músculo esquelético (Costa et al., 2005). Outro alvo para o NO<sup>•</sup> no metabolismo de carboidratos é a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, que é inibida *in vitro* (Jenkins e Tanner, 2006). Sendo assim, o NO<sup>•</sup> tem sido relacionado como um modulador do fluxo glicolítico celular (Moncada e Bolanos, 2006).

No metabolismo lipídico, os efeitos do NO<sup>•</sup> não são bem claros, já que existe controvérsia quanto aos efeitos positivos ou negativos na degradação de triglicerídeos em adipócitos (Gaudiot et al., 2000; Penfornis e Marette, 2005).

Os efeitos do NO<sup>•</sup> no metabolismo energético têm sido correlacionados a modificações nitrosativas em proteínas que regulam vias metabólicas. Na regulação do processo contrátil, é possível que proteínas contráteis como actina e miosina sejam S-nitrosadas, mas existem poucas evidências dos efeitos gerados por S-nitrosação nestas proteínas *in vitro* (Dalle-Donne et al., 2000; Perkins et al., 1997).

Como muitos dos efeitos discutidos parecem ser relacionados a S-nitrosação de proteínas, é importante discutir os mecanismos de modificação nitrosativa em cisteínas protéicas que podem influenciar na contração do músculo esquelético (Marechal e Gailly, 1999).

## II.5. - S-nitrosação de tióis protéicos como modificação pós-transducional

Como discutido anteriormente, uma das alterações que o NO<sup>•</sup> pode fazer em proteínas, é a modificação química reversível de grupamentos tióis em cisteínas que gera S-nitrosotióis (RSNO), conhecida como S-nitrosação ou S-nitrosilação. Ambos os termos utilizados na literatura se referem à adição de um grupamento nitroso em um grupamento tiol (Weichsel et al., 2007). Os RSNO, que também são chamados de tionitritos na literatura mais antiga, são compostos de estrutura genérica R-SNO (ou RSNO), no qual o R se refere a qualquer estrutura química, desde proteínas e peptídeos até compostos não-protéicos ou açúcares onde um grupamento nitroso está ligado covalentemente a um enxofre (Hogg, 2000).

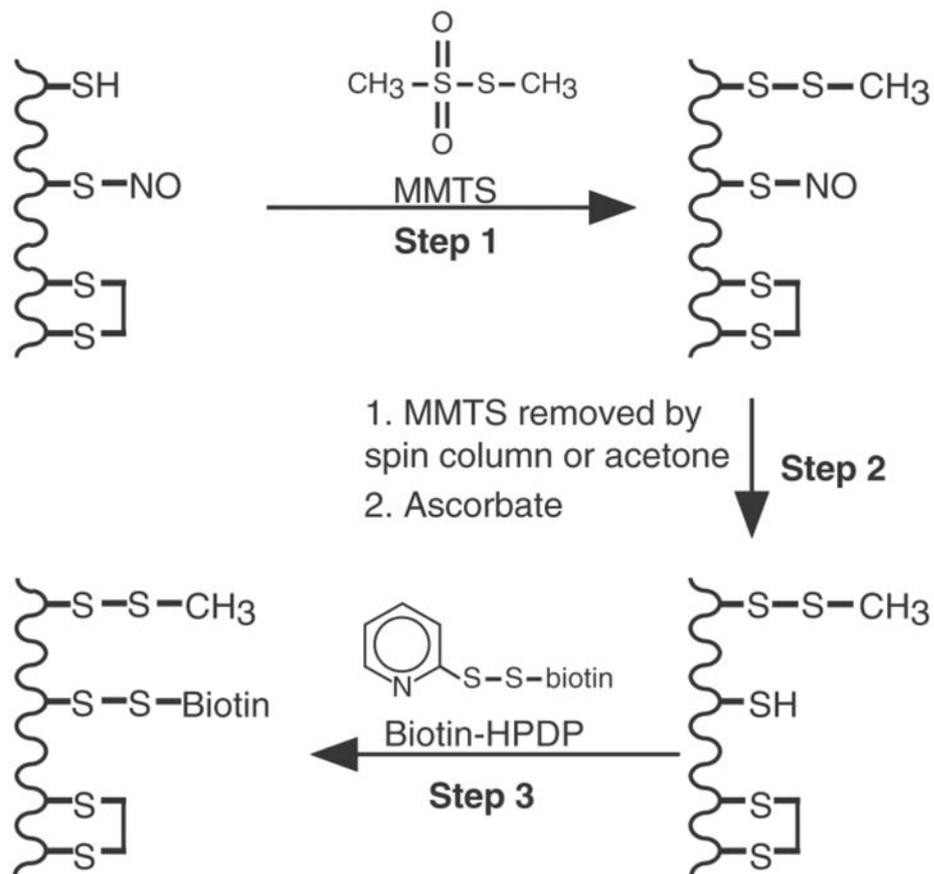
Existem dois grandes grupos de RSNO em células, os nitrosotióis de baixo peso molecular (RSNO não protéico) e os nitrosotióis protéicos (S-nitrosoproteínas). O principal RSNO não protéico é a S-nitrosoglutationa (GSNO) (Gaston et al., 1993), encontrada em concentrações que variam entre 5 e 100 μM dependendo do tipo de célula estudado (Kluge et al., 1997; Ng et al., 2007; Steffen et al., 2001). A presença de quantidades significativas de GSNO em células está relacionada com o alto conteúdo de glutathiona (GSH), uma vez que este é o principal tiol de baixo peso molecular, com concentrações que variam entre 1 e 10 mM (Leeuwenburgh et al., 1994).

Em proteínas, a primeira vez que foi detectada fisiologicamente a presença de resíduos S-nitrosados foi em 1992 (Stamler et al., 1992a). Este estudo mostrou que a albumina sérica é a principal S-nitrosoproteína no sangue, alcançando concentrações micromolares de S-nitrosoalbumina. Depois deste primeiro trabalho, muitas outras S-nitrosoproteínas foram identificadas, principalmente pelo advento de

novas técnicas que aumentam a sensibilidade e a fidelidade de detecção dos resíduos S-nitrosados (Lane et al., 2001).

Uma das técnicas mais utilizadas atualmente para detecção de resíduos S-nitrosados em proteínas é a técnica de troca de resíduos –SNO por resíduos biotinilados (*biotin-switch method*) (Jaffrey e Snyder, 2001). Como mostrado na Figura 11, esse método se caracteriza por bloquear os grupamentos tióis não modificados na proteína em estado desenovelado, seguido de redução específica dos resíduos S-nitrosados por ascorbato (Singh et al., 1996a). Os novos tióis livres são então biotinilados, formando grupamentos estáveis que podem ser detectados por técnicas de imuno-marcação para biotina ou por espectrometria de massa. Uma vez que anticorpos anti-nitrosocisteína são pouco específicos (Lane et al., 2001) e durante o procedimento de ionização dos peptídeos para detecção por espectrometria de massa, há perda das ligações –SNO (Kaneko e Wada, 2003), essa técnica é muito vantajosa.

Após o advento de novas técnicas de detecção de resíduos S-nitrosados, nota-se que esta modificação pós-transducional ocorre em um grupo muito grande de proteínas em uma mesma célula, o que não significa que todas as proteínas modificadas terão suas atividades biológicas moduladas por S-nitrosação. Entretanto, a S-nitrosação tem sido implicada no controle de um grande número de funções protéicas e atividades celulares, incluindo controle da apoptose celular (Mitchell et al., 2007), controle do metabolismo energético (Moncada e Bolanos, 2006), transporte de cálcio intracelular (Sun et al., 2003) e tráfego de proteínas (Arai et al., 2006). Devido à importância biológica crescente, esta modificação tem sido comparada à fosforilação (Lane et al., 2001).



**Figura 11.** Esquema do método de troca de resíduos S-nitrosados por resíduos biotinilados (*biotin-switch method*), que mostra no passo 1, o bloqueio dos tióis livres por MMTS seguido do passo 2, que representa a remoção do MMTS não reagido e redução de resíduos -SNO por ascorbato. No passo 3, os novos grupamentos tióis são marcados com reagente que promove biotinylação (biotina-HPDP). Figura extraída de Jaffrey e Snyder (2001).

Como muitas proteínas possuem várias cisteínas, mas apenas algumas formam ligações –SNO (Hess et al., 2005; Lane et al., 2001), tem sido mostrado que a S-nitrosação obedece a uma especificidade na proteína alvo. Esta é determinada principalmente por três fatores. São eles: interações eletrostáticas que controlam o  $pK_a$  do tiol; compartimentalização hidrofóbica que controla a acessibilidade ou reatividade do tiol; e interação entre fornecedores de grupamentos nitroso ou de  $NO^\bullet$  ao tiol alvo (Hess et al., 2005; Mitchell e Marletta, 2005).

Uma das características da S-nitrosação em proteínas é a carga iônica dos aminoácidos que estão próximos ao grupamento tiol. Aminoácidos básicos (principalmente arginina, histidina e lisina) aumentam a desprotonação e reatividade do tiol enquanto aminoácidos ácidos diminuem as mesmas (Hess et al., 2005).

Outro fator determinante na capacidade das cisteínas protéicas serem S-nitrosadas é a hidrofobicidade do meio em que se encontra a cisteína. Utilizando a Cys<sup>34</sup> da albumina como modelo de resíduo localizado em região hidrofóbica, Nedospasov et al (2000) mostraram que cisteínas que pertencem a regiões hidrofóbicas de proteínas são mais rapidamente S-nitrosadas. Quando comparada a tióis de baixo peso molecular (no caso cisteína livre e glutathione), a Cys<sup>34</sup> da albumina tratada com concentrações fisiológicas de  $NO^\bullet$  em ambiente aeróbico, é muito mais suscetível à S-nitrosação (Nedospasov et al., 2000). A explicação para tal fato se baseia na grande hidrofobicidade do  $NO^\bullet$  e do  $O_2$  que tendem a se acumular em regiões hidrofóbicas, aumentando a velocidade de produção de  $N_2O_3$  próximo a cisteínas localizadas em regiões hidrofóbicas. A proposta que a S-nitrosação ocorre em regiões mais hidrofóbicas de proteínas, parece explicar como algumas cisteínas localizadas em regiões menos acessíveis ao solvente, quando S-nitrosadas, são significativamente mais estáveis à desnitrosação que outras,

localizadas em regiões mais acessíveis ao solvente (Mannick et al., 1999; Tellez-Sanz et al., 2006; Weichsel et al., 2007).

Uma das principais rotas de formação de RSNO, a transnitrosação, envolve a transferência do grupamento nitroso ( $\text{NO}^+$ ) de um S-nitrosotiol para um grupamento tiol livre, principalmente quando na sua forma reativa, ou seja, tiolato ( $-\text{S}^-$ ), para a produção de um novo S-nitrosotiol, como mostrado na Figura 8C (Arnelle e Stamler, 1995). Esta reação pode ocorrer entre proteínas, entre tióis de baixo peso molecular e entre tióis de baixo peso e proteínas (Rossi et al., 1997).

A transnitrosação entre S-nitrosotióis e tióis, ambos de baixo peso molecular, têm como principal produto a formação de um novo S-nitrosotiol, mas pode gerar em torno de 4-6% de  $\text{NH}_3$ , sulfinamida, hidroxilamida,  $\text{NO}^-$ ,  $\text{NO}^\bullet$  e dissulfetos, além de outros compostos intermediários, como N-hidroxisulfenamida (Singh et al., 1996b; Wong et al., 1998). O rendimento destes outros produtos finais depende de vários fatores como tipo de tampão, pH, relação RSNO:RSH e presença ou ausência de  $\text{O}_2$  no meio (Singh et al., 1996b). Um esquema proposto por Wong et al (1998) demonstra bem a complexidade desta reação (Figura 12).

A velocidade de transnitrosação entre S-nitrosotióis e tióis livres, ambos provenientes de cisteína, glutathiona, acetilcisteína, acetilpenicamina ou albumina, é extremamente variável e inversamente relacionada com o  $\text{pK}_a$  dos grupamentos sulfidríla dos compostos doadores de  $\text{NO}^+$  ou dos receptores do mesmo grupamento (Arnelle e Stamler, 1995; Singh et al., 1996a).



As reações de transnitrosação estão implicadas na atividade biológica dos S-nitrosotióis (Stamler et al., 1992b), justamente pela maior estabilidade do NO<sup>•</sup> quando S-nitrosado. Tal estabilidade possibilita que o NO<sup>•</sup> seja sintetizado em uma região que esteja longe do seu sítio de ação, mas próxima de tióis de baixo peso molecular. As ações biológicas da S-nitrosação podem ocorrer então pelo transporte desses S-nitrosotióis, seguido de transnitrosação da proteína que será regulada. A importância da S-nitrosação de tióis de baixo peso molecular como L-cisteína e glutathiona se deve ao fato de eles possuírem mais mobilidade entre compartimentos celulares, ou seja, funcionam como um sistema carreador de grupamentos nitroso para tióis menos móveis, ligados a proteínas (Broniowska et al., 2006; Hogg et al., 1996; Zhang e Hogg, 2004).

Como a produção de NO<sup>•</sup> nos músculos ocorre por NOS localizada em regiões específicas das fibras musculares, a ação do NO<sup>•</sup> pode ser mediada por transnitrosações específicas. Este mecanismo pode ocorrer nas fibras musculares esqueléticas, uma vez que a ação contrátil é modulada pelo aumento da produção de NO<sup>•</sup> durante contração muscular e vias metabólicas podem ser moduladas por NO<sup>•</sup> ou por S-nitrosotióis *in vitro*.

## II.6. - Efeitos da S-nitrosação de proteínas nas suas atividades biológicas

Muitas proteínas possuem grupamentos tióis que são críticos para as suas funções biológicas. A modificação nitrosativa nestes grupamentos começou a ser vista como moduladora da atividade biológica de proteínas, após a caracterização da inibição da atividade da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) por nitrosação dos grupamentos tióis (Vedia et al., 1992).

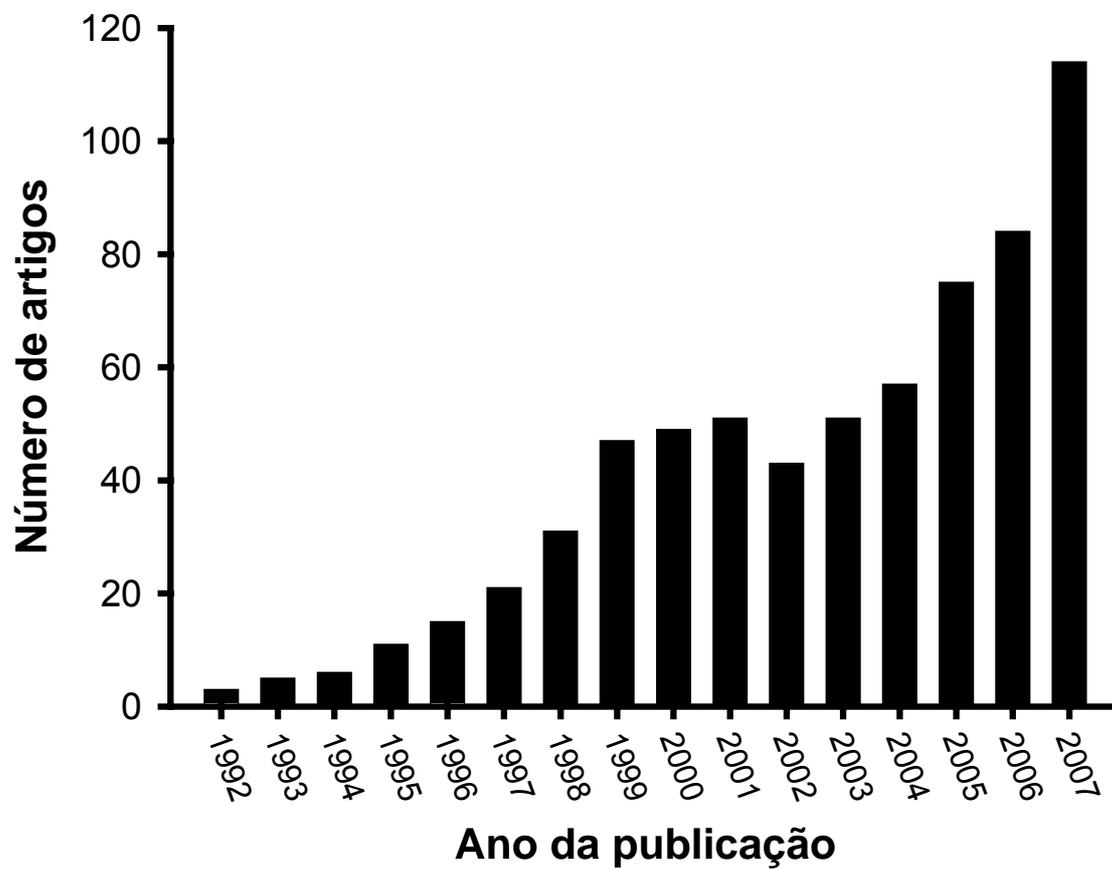
Desde então, houve um crescente aumento no número de publicações que relacionam S-nitrosação com a modulação de proteínas e enzimas ou com modulação de diversas funções celulares. O crescimento desta área de conhecimento foi tão significativo, que uma rápida busca no PubMed utilizando as palavras-chave "S-nitrosation" ou "S-nitrosylation" (Figura 13) mostra um perfil crescente no número de publicações a cada ano, e principalmente no ano de 2007, que obteve exatamente o dobro do número de publicações de 2004, principalmente pelo advento de novas técnicas de detecção de proteínas S-nitrosadas, já discutidas anteriormente. Vale ressaltar que muitos dos artigos incluídos na Figura 13 mostram que a S-nitrosação modula funções biológicas de proteínas.

Durante a contração muscular esquelética, há uma estreita regulação entre as vias metabólicas responsáveis pelo fornecimento de ATP e o aparato contrátil, que utiliza o ATP para gerar energia mecânica (Astrand et al., 2003). Como discutido na seção II.4, a aumentada síntese de NO<sup>•</sup> pelas NOS musculares promove alterações significativas no desempenho contrátil muscular e alguns efeitos podem ser explicados por S-nitrosação de proteínas que estimulam ou inibem o processo de contração muscular (Stamler e Meissner, 2001).

Das proteínas musculares que são conhecidamente alteradas por S-nitrosação, destacam-se as proteínas que regulam o metabolismo energético glicolítico, principalmente a GAPDH, além das proteínas que regulam a liberação e captação de cálcio do retículo sarcoplasmático.

A S-nitrosação da GAPDH tem sido mostrada como uma modificação pós-transducional reguladora do metabolismo glicolítico muscular (Jenkins e Tanner, 2006). Apesar do trabalho de Vedia et al. (1992) mostrar que a GAPDH é capaz de sofrer S-nitrosação de duas a três cisteínas por monômero, utilizando NO<sup>•</sup> gasoso. Quando um S-nitrosotiol de baixo peso molecular (SNAP) é utilizado, o efeito inibitório ocorre em apenas uma cisteína de cada monômero das quatro cisteínas existentes (Ishii et al., 1999). Esse efeito ocorre por S-nitrosação da Cys<sup>149</sup>, localizada no sítio ativo da enzima (Mohr et al., 1996), uma região conhecidamente hidrofóbica (Jenkins e Tanner, 2006).

Das proteínas que regulam a concentração de cálcio no meio intracelular em fibras musculares esqueléticas, o canal de liberação de cálcio, também chamado de canal de rianodina, é a proteína que mais sofre modificações por NO<sup>•</sup> que modulam a probabilidade de abertura do canal (Stamler e Meissner, 2001). Essa proteína é um homotetrâmero em que cada monômero possui 50 cisteínas e diversas classes de tióis (Sun et al., 2003). A reatividade dessas cisteínas à S-nitrosação depende da tensão de O<sub>2</sub> no meio (Eu et al., 2000) e da espécie nitrosativa que reage com a proteína (Sun et al., 2003). A S-nitrosação da Cys<sup>3635</sup>, localizada em uma região hidrofóbica da proteína, aumenta a probabilidade de abertura do canal de Ca<sup>2+</sup>, aumentando a saída do íon do retículo sarcoplasmático (Eu et al., 2000). A S-nitrosação desta cisteína pode explicar o aumento do Ca<sup>2+</sup> citosólico em fibras musculares intactas expostas à S-nitrosoacetilcisteína (Andrade et al., 1998).



**Figura 13.** Número de publicações a cada ano que utilizam no título ou no resumo a palavra-chave "S-nitrosylation" ou "S-nitrosation". Base de dados PubMed, em 22 de janeiro de 2008.

Dentre as proteínas miofibrilares, os efeitos da S-nitrosação foram estudados apenas na actina (Dalle-Donne et al., 2000). Neste trabalho, a actina foi S-nitrosada em uma única cisteína (Cys<sup>374</sup>), a qual é crítica para ligação com miosina. Curiosamente, as consequências para sua interação com miosina não foram examinadas. Outros trabalhos detectaram actina S-nitrosada em células não musculares, sugerindo que essa proteína é um sítio ubíquo para modificação S-nitrosativa (Hao et al., 2006; Jaffrey et al., 2001).

Apesar de muitas proteínas miofibrilares possuírem cisteínas que podem ser alvos para S-nitrosação, apenas a actina foi alvo de estudo, talvez pelo papel desta proteína como citoesqueleto de muitas células, inclusive a muscular (Sheterline et al., 1995). Isso não significa que outras proteínas miofibrilares não possam ser S-nitrosadas *in vivo* e *in vitro*, produzindo alterações conformacionais, enzimáticas e contráteis, como já foi proposta anteriormente (Perkins et al., 1997). No caso da miosina, uma proteína abundante em fibras e com alto conteúdo de cisteínas, pode ser outro alvo para S-nitrosação, o que pode afetar sua função enzimática ou sua afinidade por actina.

### III – Objetivos

Para esta tese tivemos como objetivos:

- 1) Investigar os efeitos da S-nitrosação da miosina *in vitro* na atividade  $Mg^{2+}$ ATPásica e na atividade actina-ativada;
- 2) Verificar se eventuais efeitos na ATPase são promovidos por ligações –SNO;
- 3) Verificar a estabilidade das ligações –SNO e relacioná-la com a acessibilidade dos grupamentos tióis na miosina;
- 4) Determinar se a S-nitrosação de cisteínas que afetam a atividade  $Mg^{2+}$ ATPásica da miosina é induzida por transnitrosação ou por  $NO^{\bullet}$ ;
- 5) Identificar quais as proteínas que podem ser S-nitrosadas em fibras musculares esqueléticas "descascadas".

Como todos os resultados experimentais que foram obtidos durante o doutorado foram submetidos para publicação em periódico internacional (*Biochemical Journal*), a introdução, os objetivos, os materiais e métodos e a discussão complementar estão escritas em português e os resultados estão apresentados no manuscrito submetido ao periódico, no formato exigido pelo mesmo, em inglês. A tese conta ainda com as referências bibliográficas utilizadas nas seções escritas em português.

## IV – Materiais e Métodos

### IV.1. Purificação de miosina

A miosina utilizada neste trabalho foi purificada de músculo de dorso de coelho segundo o trabalho de Bremel e Weber (1975) com algumas modificações. O método consiste na solubilização e precipitação da actina e miosina em diferentes forças iônicas. O coelho é sacrificado por deslocamento cervical seguido de hipovolemia sangüínea. O músculo *longissimus dorsi* é esfriado em gelo durante 30 min, o tecido conectivo é manualmente removido e o músculo é moído por duas vezes em um moedor de carne previamente gelado. Todas as etapas seguintes são realizadas a 4°C com utilização de água gelada, desionizada através do sistema Milli-Q. Inicialmente para cada 100 g de músculo são adicionados 300 ml de tampão (300 mM KCl, 150 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6.5) sob agitação leve por 10 min. Após este passo inicial a força iônica é diminuída pela adição de 3 vol de H<sub>2</sub>O e a suspensão é levemente agitada por 15 min. A suspensão é então filtrada em gaze. Após o descarte dos sólidos que ficam retidos, são adicionados 300 ml de H<sub>2</sub>O para cada 100 g de músculo, com conseqüente redução da força iônica para melhor precipitação da miosina. A suspensão é centrifugada durante 30 min a 30000 xg. O sobrenadante, contendo principalmente actina, é desprezado e o precipitado é ressuspenso em alta força iônica (600 mM KCl) e novamente centrifugado à mesma velocidade. O precipitado desta vez é descartado e o sobrenadante é filtrado em gaze; ao filtrado são adicionados 1400 ml de H<sub>2</sub>O para cada 100 g de músculo, seguido de centrifugação por 30 min a 30000 xg e ressusensão do precipitado em alta força iônica. O processo é repetido novamente para eliminar contaminantes,

principalmente actina. Após esse processo de purificação, a miosina é mantida em tampão de alta força iônica (0.6 M KCl e 50 mM imidazol pH 7.0 preparado em 50 % de glicerol (v/v)) e estocada a -20°C. Sua atividade permanece estável durante meses. Para a utilização da miosina, o glicerol é retirado por diluição da amostra com H<sub>2</sub>O a 4°C na relação de 15:1 (v/v) para que a miosina se torne insolúvel e conseqüentemente precipite. Após a diluição, a amostra é centrifugada a 2000 xg por 20 min a 4°C. O precipitado (miosina) é ressuspensão com 0.6 M KCl, 50 mM imidazol, pH 7.0 e dosado por biureto para determinar a concentração de proteína.

#### IV.2. Purificação e polimerização de actina

A actina foi purificada de músculo peitoral de galinha de acordo com Pardee e Spudich (1982) gerando actina monomérica (G-actina) em baixa força iônica (100 mM KCl) seguido de desidratação com acetona e estocada em pó a 4°C. No dia antes do experimento, o pó é re-hidratado na presença de 0.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2 mM ATP e 2.5 mM Tris-HCl (pH 8) e o precipitado é separado por centrifugação a 4°C (25000 xg), sendo este processo repetido 3 três vezes. A polimerização da actina ocorre na presença de 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP e 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) por 2 horas sob agitação leve e temperatura ambiente, seguido de adição de KCl para concentração de 600 mM, com o objetivo de dissociar tropomiosina contaminante e seguido por mais 30 min sob a mesma agitação.(Mariano et al., 2001). A polimerização foi realizada na ausência de DTT para não interferir na S-nitrosação da miosina.

### IV.3. Preparo de fibras musculares "descascadas"

Foram utilizadas fibras musculares de músculo *psoas* de coelho, permeabilizadas por EGTA como descrito por (Eastwood et al., 1979) e estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  em 50% glicerol (v/v) contendo solução 152 mM propionato de potássio, 20 mM propionato de imidazol pH 7.0, 2.5 mM acetato de magnésio, 5 mM EGTA, 2.5 mM ATP contendo um cocktail de inibidores de protease (Sousa et al., 2006). O glicerol foi removido antes do uso.

### IV.4. Síntese de S-nitrosoglutationa (GSNO)

O GSNO (5 – 20 mM) foi preparado imediatamente antes de cada experimento combinando concentrações equimolares de glutathiona reduzida (GSH) e nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) em meio ácido (0.1 M HCl). A reação foi mantida a  $30^{\circ}\text{C}$  por 1 min, para promover a nitrosação do grupamento tiol do GSH por ácido nitroso ( $\text{H}_2\text{ONO}^+$ ) (Kettenhofen et al., 2007). A solução foi então tamponada com 50 mM imidazol e levada a pH 7 com KOH, resfriada em gelo e protegida da luz. Durante a reação ocorre a formação de uma cor rosada-avermelhada, que é uma característica típica de formação de S-nitrosotióis primários em altas concentrações (Williams, 1999). A concentração de GSNO em solução é medida por absorção da luz a 335 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon_{335 \text{ nm}} : 900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Cook et al., 1996).

#### IV.5. Dosagem de proteína

A concentração de miosina foi medida por dois métodos distintos, contra uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA) ausente de ácidos graxos livres. Para determinar a concentração de miosina ou actina quando encontram-se em concentrações entre 10 e 20 mg/ml, foi utilizado o método de biureto (Gornall et al., 1949). A curva padrão de BSA para estas leituras foi de 50 a 200  $\mu$ l de BSA (20 mg/ml de estoque) em 3 ml de volume final.

Após a S-nitrosação da miosina e separação do excesso de GSNO livre não reagido, o método utilizado para a dosagem de proteína foi o de (Lowry et al., 1951), pois a miosina encontra-se em concentrações em torno de 0.5 a 2 mg/ml. A curva padrão de BSA para estas leituras foi de 10 a 40  $\mu$ l de BSA (0.75 mg/ml de estoque) em 1.5 ml de volume final, apresentando-se linear nesta faixa. Este método também foi utilizado para dosagem de proteína extraída das fibras musculares esqueléticas.

#### IV.6. Eletroforese unidimensional

Para a determinação da pureza das preparações de miosina e para identificar a S-nitrosação de proteínas após a troca dos resíduos –SNO por resíduos –SSBiotina, foi utilizado eletroforese na presença de SDS, géis de poliacrilamida (10 e 12%) segundo o método de Laemmli (1970), mas na ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol (gel não-redutor), utilizando padrões conhecidos de miosina, actina, subfragmento-1, troponina T, tropomiosina, troponina I, troponina C e padrão de peso molecular SigmaMarker™ Wide Range ( $M_r$  = 6500 – 205000).

#### IV.7. Determinação de grupamentos tióis disponíveis na miosina

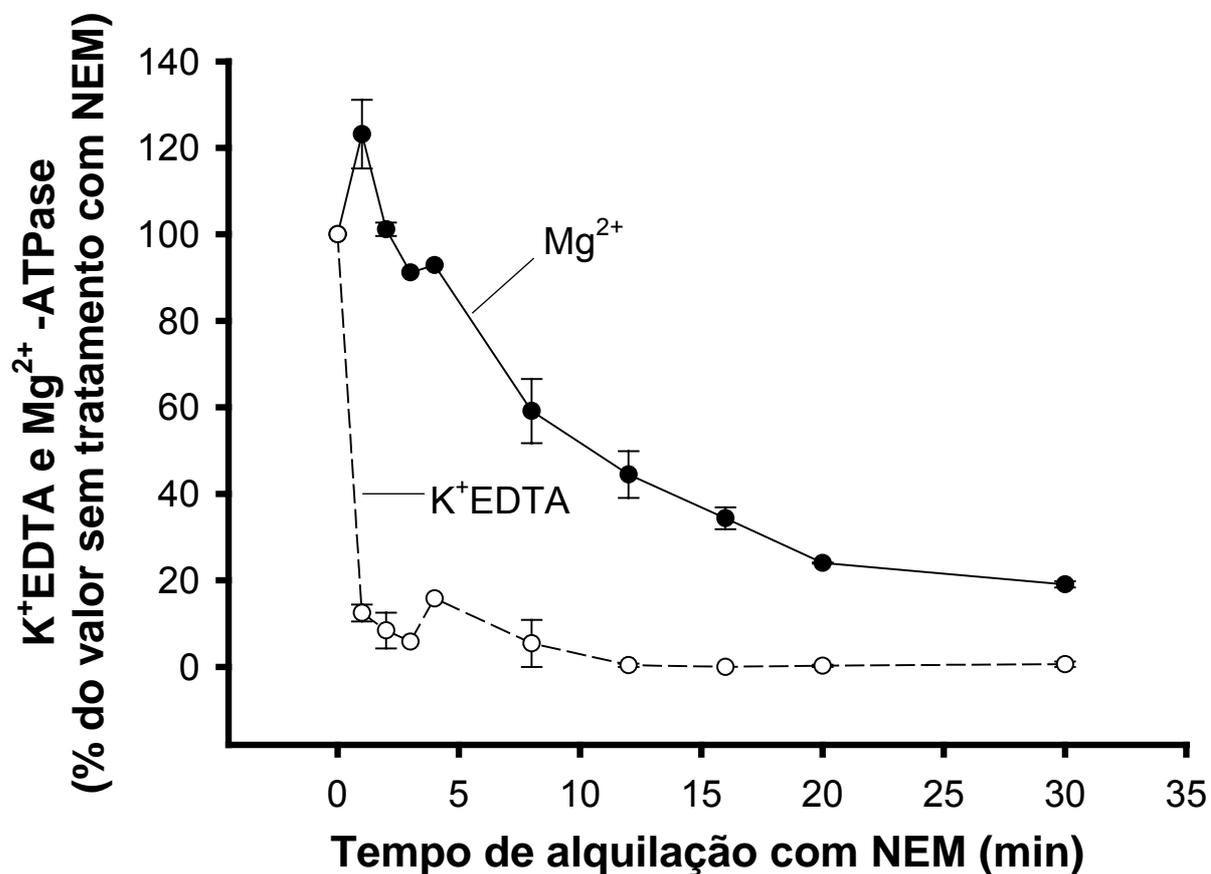
O número de tióis livres na miosina no estado enovelado e desenovelado, foi medido nos mesmos tampões que foram usados para a S-nitrosação (ver adiante) mas na ausência de GSNO. Miosina (0.25 mg/ml) foi incubada com 500  $\mu$ M DTNB por 2 h a pH 7 e 25-30°C, e curva de progresso de liberação de TNB<sup>-</sup> foi analisada à 412 nm ( $\epsilon_{412 \text{ nm}} = 13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Ellman, 1959). Os tióis livres da miosina S-nitrosada não puderam ser analisados com DTNB, uma vez que TNB<sup>-</sup> decompõe S-nitrosotióis, o que superestima o número real de tióis livres (Gergel' e Cederbaum, 1997).

Apesar do método tradicional de leitura de tióis disponíveis por DTNB ser a pH 8.0 (Ellman, 1959), utilizamos pH 7.0 para aproximar as condições de protonação das sulfidrilas às condições de S-nitrosação. Esta mudança no pH parece não promover mudanças na leitura de tióis disponíveis (Brocklehurst, 1979). Todos os experimentos foram feitos em duplicata e os brancos foram realizados com miosina (0.25 mg/ml) nas mesmas condições iônicas, sem a adição de DTNB; e com 500  $\mu$ M DTNB sem a adição da miosina. Os valores de cada branco são somados e então são subtraídos dos valores encontrados após a reação da miosina com DTNB.

#### IV.8. Alquilação da miosina

O bloqueio de grupamentos tióis tem sido usado por muitos pesquisadores como forma de estudar os efeitos das cisteínas na função biológica de proteínas. Uma das formas mais eficientes de bloquear cisteínas é a alquilação dos grupamentos sulfidríla por reagentes que possuem maleimida como grupo funcional. A *N*-etilmaleimida (NEM) é um reagente que bloqueia grupamentos tióis em alta velocidade e de forma bastante específica (Gregory, 1955).

A reação da *N*-etilmaleimida não é capaz de bloquear todos os grupamentos tióis da miosina, agindo apenas sobre os mais reativos (Watterson et al., 1975). Para bloquear os tióis mais reativos, miosina (5 mg/ml) foi tratada com NEM (1 mM) por 30 min a 25°C em tampão  $Mg^{2+}$  (50 mM imidazol, pH 7, 50 mM KCl, 0.2 mM EDTA e 5 mM  $MgCl_2$ ) e a reação foi interrompida com 10 mM DTT, seguida de extensiva diálise para remover o excesso de NEM e DTT (Reisler et al., 1974a). O número de tióis remanescentes foi determinado por ensaio de DTNB na presença e ausência de cloreto de guanidina (GndCl). A atividade ATPásica da miosina foi avaliada na presença de tampão  $K^+$ EDTA ou  $Mg^{2+}$  e mostrou o padrão de ativação e inibição esperado, respectivamente, que são características de alquilação nos tióis mais reativos, incluindo Cys<sup>707</sup> e Cys<sup>697</sup> (Reisler et al., 1974a), como mostrado na Figura 14.



**Figura 14.** Efeitos da reação de *N*-etilmaleimida (1 mM) com miosina (5 mg/ml) a 25°C sobre as atividades K<sup>+</sup>EDTA (○) e Mg<sup>2+</sup> (●) ATPásicas. Para cada tempo de alquilação referido na figura, a reação com NEM foi interrompida com 10 mM DTT seguida de diluição da miosina no tampão com referida condição iônica para as atividades ATPásicas. A atividade ATPásica foi medida pela liberação de Pi por curvas de progresso de hidrólise na fase linear.  $x \pm s.e.$ , n=2.

#### IV.9. S-nitrosação de miosina e de fibras musculares "descascadas"

Miosina (2 mg/ml) foi S-nitrosada utilizando GSNO preparado imediatamente antes de cada experimento a 30°C, nas condições iônicas similares àquelas usadas para medir as atividades ATPásicas clássicas da miosina (Lymn e Taylor, 1970), mas na ausência de ATP ou qualquer outro nucleotídeo.

São elas:

- 1) K<sup>+</sup>EDTA: 0.6 M KCl, 5 mM K<sub>2</sub>EDTA, 50 mM imidazol pH 7.0;
- 2) Ca<sup>2+</sup>: 50 mM KCl, 0.2 mM K<sub>2</sub>EDTA, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM imidazol pH 7.0;
- 3) Mg<sup>2+</sup>: 50 mM KCl, 0.2 mM K<sub>2</sub>EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM imidazol pH 7.0.

Em cada condição iônica para iniciar a reação, GSNO (1 mM – 8 mM) foi adicionado ao meio contendo miosina em volume final de 2 ml. Após 15 – 120 min de reação, o GSNO não reagido foi removido pela adição de 5 ml de H<sub>2</sub>O gelada seguida de centrifugação (15 min; 2700 xg). Em alguns experimentos, esse procedimento foi repetido por até 5 vezes. Após 1 – 5 lavagens, o precipitado (0.1 ml) foi solubilizado em 1 ml de tampão de alta força iônica (0.6 M KCl, 50 mM imidazol pH 7) e coberto com papel alumínio para diminuir a decomposição das ligações –SNO pela luz (Forrester et al., 2007). A formação de S-nitrosomiosina foi verificada colorimetricamente segundo Saville (1958), em 40 µl (~ 40 µg) de miosina em volume final de 0.5 ml. O produto de decomposição das ligações –SNO em solução (íons nitrito; NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) foi medido após decomposição com 3 mM HgCl<sub>2</sub> e reagindo o meio com reagente de Griess em meio ácido (125 µl de 1 % sulfanilamida (p/v) em 10 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (v/v) + 125 µl de 0.1% naftiletlenodiamino em H<sub>2</sub>O (p/v),

misturados imediatamente antes da adição da miosina modificada) que serve como corante do  $\text{NO}_2^-$  liberado. A coloração do nitrito liberado atinge o platô em torno de 10 min e permanece estável por mais de 2 horas. A leitura de  $\text{NO}_2^-$  por reagente de Griess é analisada por absorção da luz a 540 nm contra uma curva padrão de  $\text{NaNO}_2$  de 1 a 8  $\mu\text{M}$ . Os brancos são realizados sem a adição de  $\text{HgCl}_2$  e os valores encontrados nos brancos são subtraídos dos valores encontrados das alíquotas de miosina nitrosada tratada com  $\text{HgCl}_2$ .

A leitura de  $\text{NO}_2^-$  através do método de Saville é considerada específica para ligações  $-\text{SNO}$ , já que a Cys é o único aminoácido a apresentar grupamento sulfidril e a afinidade do  $\text{Hg}^{2+}$  por grupamentos tióis é muito alta (Boyer, 1954).

A S-nitrosação de proteínas miofibrilares foi induzida por tratamento de pequenos feixes de fibras musculares "descascadas" (50 mg peso úmido) com 0.5 ml GSNO (0.01 – 1 mM) por 30 min a 30°C em solução de relaxamento (152 mM propionato de potássio, 20 mM propionato de imidazol pH 7.0, 6.4 mM acetato de magnésio, 5 mM EGTA, 4.4 mM ATP). O GSNO não reagido foi removido por lavagem do feixe com 0.5 ml de solução de relaxamento por 3 vezes e as proteínas foram solubilizadas por 30 min em 1 ml de tampão A (25 mM HEPES pH 7.7, 4 mM EGTA, 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM ATP, 0.1 mM neocuproína) contendo 0.3 M KCl, na ausência de luz. A concentração de proteína e o conteúdo de  $-\text{SNO}$  foram determinados como mostrado acima.

#### IV.10. Método de troca dos resíduos S-nitrosados por biotina (*Biotin switch method*)

Como descrito na introdução e na Figura 11, a técnica de troca de resíduos S-nitrosados por resíduos S-biotinilados, possui diversas várias vantagens para detecção da modificação nitrosativa em relação aos métodos colorimétricos e fluorimétricos, como por exemplo, permite que a S-nitrosação na proteína seja identificada por método de imunodeteção após Western blot (ver próximo tópico) na banda de peso molecular específico da proteína de interesse.

A detecção da miosina S-nitrosada foi realizada de acordo com Hao et al (2006) com algumas modificações. Miosina (2 mg/ml) foi pre-tratada com GSNO (1 – 1000  $\mu$ M) por 15 – 120 min, ou com DEANO (10 – 1000  $\mu$ M) por 30 min em tampão  $Mg^{2+}$  a 30°C (0.2 ml volume final) na ausência de ATP. GSNO ou DEANO não reagido foi removido por precipitação da miosina usando 1.8 ml de tampão de precipitação (20 mM TrisHCl pH 7.7; 1 mM EDTA; 0.1 mM neocuproína). Os precipitados foram ressuspensos em 0.2 ml de tampão de bloqueio (tampão de precipitação + 8 M uréia e 40 mM MMTS) e mantido a 50°C por 1 h na ausência de luz com frequente agitação, com o objetivo de bloquear os grupamentos tióis não S-nitrosados ou oxidados. Um controle positivo para determinar o número máximo de tióis disponíveis para biotinilação foi realizado omitindo GSNO e trocando MMTS por DTT (10 mM) no passo de bloqueio. Excesso de MMTS ou DTT foi removido com coluna PD-10 (Amersham Biosciences) contendo Sephadex G-25 e pré-equilibrada com tampão de precipitação contendo 8 M uréia. Resíduos contendo grupamentos –SNO foram trocados por *tags* de biotina após incubação da amostra com 1 mM ascorbato (estoque de 50 mM ácido ascórbico que quando adicionado no meio era

tamponado para ascorbato) e 2 mM biotina-HPDP (estoque de 8 mM solubilizado em DMF 100%) por 2 h a 37°C também na ausência de luz. Após este passo, as amostras não necessitam mais ser protegidas da luz. Para retirar excesso de biotina-HPDP não reagido, as amostras foram dializadas contra tampão de precipitação contendo 0.5% Triton X-100 (v/v) ou precipitadas por adição de 2 vol de acetona gelada (-20°C) seguido de centrifugação (5 min; 5000 xg) e solubilizadas em tampão de precipitação contendo 0.5% Triton X-100 (v/v).

O *biotin-switch method* também foi utilizado para detecção de proteínas miofibrilares S-nitrosadas e o método original (Hao et al., 2006) também foi modificado. Feixes de fibras "descascadas" (50 mg) foram tratadas com GSNO como descrito para miosina, na presença de solução de relaxamento por 30 min a 30°C. A solução contendo GSNO foi então descartada e as fibras foram então lavadas com 0.5 ml de solução de relaxamento por 3x para eliminar o GSNO não reagido. As cisteínas reduzidas foram bloqueadas e solubilizadas com 0.2 ml tampão A (25 mM HEPES pH 7.7, 4 mM EGTA, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM ATP, 0.1 mM neocuproína) contendo 2.5% SDS (p/v) e 0.1 M MMTS por 1 h a 50°C com agitação frequente, na ausência de luz. Um controle positivo foi preparado omitindo GSNO e trocando MMTS por DTT (10 mM) no passo de bloqueio e um controle negativo (para determinar S-nitrosação endógena persistente) foi preparado trocando GSNO por DTT (10 mM) no passo de S-nitrosação e realizando normalmente o passo de bloqueio dos tióis. Proteínas foram precipitadas pela adição de 5 vol de acetona gelada (-20°) seguida de centrifugação (5 min; 5000 xg). O precipitado foi lavado 3x com acetona gelada e ressuspendido em 0.2 ml de tampão A contendo 1% SDS, 1 mM ascorbato e 2 mM biotina-HPDP por 1 h a 37°C na ausência de luz. Excesso de ascorbato e biotina-HPDP foram removidos por precipitação por acetona. As

proteínas (o precipitado) foram ressuspendidas em 0.2 ml de tampão A contendo 0.5% Triton X-100 (p/v).

#### IV.11. Western Blot

Para a identificação das proteínas S-nitrosadas após o *biotin-switch method*, as amostras foram isoladas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE sem agentes redutores ( $\beta$ -mercaptoetanol) para evitar a perda dos resíduos biotinilados por biotina-HPDP, uma vez que a biotinilação ocorre por uma ponte dissulfeto entre o tiol da cisteína com o grupamento sulfidríla do reagente biotina-HPDP (Jaffrey e Snyder, 2001). Todos os géis foram realizados em duplicata, pois em um dos géis, logo após a eletroforese, as proteínas foram coradas com Coomassie blue R e no outro gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por *Western blot* por 2 h a 200 mA utilizando tampão de transferência gelado (14 mg/ml glicina, 25 mM Tris-HCl pH 8, 0.1% SDS (p/v) e 10% etanol (v/v)). A transferência do gel para membrana foi realizada na geladeira (4°C) sob agitação na presença de uma barra de gelo.

Após a transferência, a membrana foi exposta a uma solução de TBST (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20 (v/v)) contendo 1% BSA livre de gordura (p/v) *overnight* sob agitação leve, com o objetivo de bloquear os sítios de ligação de proteína que não foram preenchidos durante a transferência. Não foi utilizado leite desnatado para o bloqueio da membrana, pois este possui quantidades significativas de biotina, o que impossibilita a determinação dos resíduos biotinilados das proteínas de interesse.

Após o passo de bloqueio, a membrana foi lavada 2x por 5 min cada com TBST em quantidade suficiente para cobrir a membrana, como o objetivo de desfazer ligações não específicas do BSA na membrana. A membrana foi então tratada por 3 h com TBST contendo 1% BSA e anticorpo anti-biotina streptavidina-HRP (diluição de 1:8,000) seguido de lavagem por 6x por 5 min cada com TBST para retirar o excesso de anticorpo não reagido com as proteínas biotinizadas.

A biotinação foi detectada por quimioluminescência usando reagente ECL Plus como substrato da enzima peroxidase que acompanha o anticorpo ligado às proteínas biotinizadas, e filmes de raios-x (Kodak T-MAT G/RA Film 18x24 cm) foram expostos à membrana por variados tempos a temperatura ambiente, dependendo da intensidade de marcação, que foi variada entre os experimentos.

As intensidades de coloração das proteínas com Coomassie blue R e da quimioluminescência marcada nos filmes de raios-x, foram analisados usando o software Image Quant 5.2 (Molecular Dynamics).

#### IV.12. Atividade ATPásica da miosina e da actomiosina

Após a S-nitrosação da miosina seguido de 1 – 5 lavagens e solubilização do precipitado final em tampão de alta força iônica como descrito na sessão III.9, 0.1 ml (~0.1 mg proteína) foi usado para medir a atividade ATPásica da miosina em um volume final de 1 ml na presença de 3 mM ATP a 30°C. Esse procedimento produz uma diluição de 350 x da concentração de GSNO original, após 1 lavagem. As amostras foram pré-incubadas a 30°C por 2 min a uma concentração final de 0.05 – 0.2 mg/ml de miosina em tampão  $Mg^{2+}$  (para medida da atividade  $Mg^{2+}$ ATPásica) ou em 0.6 M KCl, 5 mM EDTA e 50 mM imidazol pH 7 (para medida da atividade

K<sup>+</sup>EDTA ATPásica), ou em 50 mM KCl, 50 mM imidazol pH 7, 0.2 mM EDTA e 5 mM CaCl<sub>2</sub> (para medida da atividade Ca<sup>2+</sup>ATPásica). Hidrólise de ATP foi iniciada por adição de 3 mM ATP e interrompida por transferência de 0.5 ml em 0.5 ml de carvão ativado (25 g/100 ml) suspenso em 0.1 N de ácido perclórico para adsorção do ATP não hidrolisado (Grubmeyer e Penefsky, 1981), seguido de centrifugação para remover o carvão (2700 xg; Beckman GS-6R 4°C; 30 min). Após a centrifugação foi retirado 0.5 ml do sobrenadante de cada amostra e adicionado 0.5 ml de reagente ferro-molibdato para leitura colorimétrica a 700 nm do Pi liberado pela hidrólise do ATP (Taussky e Shorr, 1953). A curva de progresso de hidrólise foi linear em todos os casos e foi comparada com as leituras das curvas-padrão de Pi. Os brancos foram preparados pela adição de ATP após a desnaturação da proteína pelo carvão ativo.

A atividade ATPásica actina-ativada foi medida após S-nitrosação da miosina seguida de 2 lavagens e ressuspensão do precipitado com tampão de alta força iônica. Neste caso, a hidrólise foi iniciada pela adição de 50 µl de miosina modificada (concentração final de 0.1 – 0.2 mg/ml) no meio de ATPase na presença de actina (60 mM KCl, 50 mM imidazol pH 7, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 3 mM ATP e 0-0.5 mg/ml actin). Após 10 min, a reação foi interrompida pela transferência de 0.5 ml em 0.5 ml de carvão ativado (25 g/100 ml) suspenso em 1 N de ácido perclórico seguido de centrifugação para remover o carvão. A concentração de Pi foi determinada como descrito acima. Ativação da miosina por actina foi calculada por subtração da atividade ATPásica na presença de actina pela atividade ATPásica na ausência de actina.

Os parâmetros cinéticos ( $K_m$  e  $V_{max}$ ) foram determinados pela regressão dos dados por uma hipérbole retangular (equação de Michaelis-Menten), uma vez que

eles determinam a afinidade aparente da miosina pela actina ( $K_m$ ) e a ativação máxima da miosina pela actina ( $V_{max}$ ).

#### IV.13. Análise estatística

Neste trabalho os resultados experimentais foram analisados por teste-t pareado, para a análise das diferenças entre as médias dos valores obtidos em pelo menos três preparações distintas de proteína, com um nível de significância superiores a 0.05 ( $P < 0.05$ ). As diferenças significativas estão indicadas nas legendas ou no texto.

## V – Resultados (Incluídos no manuscrito submetido à Biochemical Journal

### *S*-Nitrosation of skeletal muscle myosin produces stable and unstable –SNO bonds\*

Nogueira, L.<sup>†</sup>, Figueiredo-Freitas, C.<sup>†</sup>, Magdesian, M.H.<sup>†</sup>, Assreuy, J.<sup>‡</sup> and Sorenson, M.M.<sup>†1</sup>

<sup>†</sup>Instituto de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brasil;

<sup>‡</sup>Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88015-420, Brasil.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed: Instituto de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21951-590 Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Telephone: (55) (21) 2562-6783. Fax: (55) (21) 2270-8647. E-mail: [sorenson@bioqmed.ufrj.br](mailto:sorenson@bioqmed.ufrj.br)

\*This work was supported financially by the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa Carlos Chagas Filho do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC/SC), Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT) and Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX). L.N. was the recipient of a graduate fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). J.A. and M.M.S. hold fellowships from CNPq.

**Page heading :** *S*-nitrosation of myosin by GSNO.

## ABBREVIATIONS

RSNO, *S*-nitrosothiol;  $M_r$ , relative molecular mass;  $\text{NO}^\bullet$ , nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; GSNO, *S*-nitrosoglutathione; DEANO, diethylamine nitric oxide; NEM, *N*-ethylmaleimide; MMTS, methylmethanethiosulfonate; Biotin-HPDP, (*N*-(6-(biotinamido)hexyl)-3'-(2'-pyridyldithio)-propionamide; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; DTNB, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid); DTT, dithiothreitol; GSH, glutathione reduced form; ATP, adenosine 5'-triphosphate; GndCl, guanidine hydrochloride; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EGTA, ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid; BSA, bovine serum albumin.

## SYNOPSIS

Nitric oxide (NO<sup>•</sup>) is synthesized in skeletal muscle, and NO<sup>•</sup> release increases during contractile activity. Although myosin is the most abundant protein in skeletal muscle, it is not known whether myosin is a target of NO<sup>•</sup> or NO<sup>•</sup> derivatives. Here we show that *S*-nitrosation of isolated myosin with *S*-nitrosoglutathione (GSNO) produces two populations of *S*-nitrosothiols, one more stable than the other. Interestingly, the less stable population inhibits the physiological ATPase activity, while the more stable *S*-nitrosothiols have no effect. Blocking the most reactive thiols on myosin by *N*-ethylmaleimide does not alter the *S*-nitrosation of the more stable –SNO bonds, suggesting that the stable *S*-nitrosation occurs in more buried regions. Diethylamine nitric oxide (DEANO), which releases NO<sup>•</sup>, has no effect on myosin activity, indicating that myosin forms –SNO bonds by transnitrosation rather than by a direct reaction with NO<sup>•</sup> or products of its autooxidation. In skeletal muscle, myosin ATPase is activated by actin. We found that *S*-nitrosation of myosin inhibits maximal actin-activated ATPase activity, without affecting its affinity for actin. In skinned skeletal muscle fibers *in vitro*, myosin and actin are the main targets of *S*-nitrosation by GSNO. This study reveals a new link between *S*-nitrosation and contractile muscle proteins which may modulate ATP demand during muscle contraction.

Keywords: Myosin ATPase, thiols, biotin-switch assay, skinned fibers, transnitrosation.

## INTRODUCTION

Myosin is the most abundant protein in skeletal muscle, where it accounts for nearly 60% of the total myofibrillar proteins. It has a high impact on the demand for ATP during muscle contraction because of its ability to convert chemical energy derived from ATP hydrolysis into mechanical work. Myosin ( $M_r \cong 500000$ ) has two heavy chains, four light chains and a large number of cysteines. In adult skeletal muscle, its slow turnover rate (half-life  $\sim 30$  days; [1]), makes myosin a potential target for functionally significant post-translational modifications, including *S*-nitrosation, the formation of nitroso groups on thiols.

Skeletal muscle produces  $\text{NO}^\bullet$  constitutively, and the rate of  $\text{NO}^\bullet$  synthesis increases with contractile activity (for review, see [2]). Several authors have suggested that  $\text{NO}^\bullet$  or its derivatives may lead to *S*-nitrosation of actomyosin in fibers. In fact, a number of proteins involved in cell signalling, energy metabolism and calcium fluxes are modulated by *S*-nitrosation *in vitro* [3], but among sarcomeric contractile and regulatory proteins, only actin has been studied [4].

Although all or most of the 42 cysteines in myosin appear to be reduced in the native protein [5], oxidizing or alkylating agents such as *N*-ethylmaleimide and peroxyxynitrite can alter myosin ATPase activity and its affinity for actin *in vitro* [6;7]. Nothing is known, however, about cysteine modifications in myosin by biologically active compounds such as  $\text{NO}^\bullet$ , *S*-nitrosoglutathione (GSNO) and other products of  $\text{NO}^\bullet$  metabolism.

The formation of *S*-nitrosothiols (RSNO) in biological systems occurs by a number of different mechanisms, including direct reaction of  $\text{NO}^\bullet$  with thiols [8], transnitrosation from low-molecular-weight *S*-nitrosothiols to protein thiols [9] and transnitrosation between proteins [10]. *S*-Nitrosation by  $\text{NO}^\bullet$  is thought to occur rarely, because of the low reactivity of  $\text{NO}^\bullet$  to thiols [8]. An important route for the production of RSNO in proteins is transnitrosation, the transfer of the nitroso group between a nitrosothiol donor and a free thiol group of the target protein. This reaction occurs easily and quickly in cells [11]. Among low-molecular-weight *S*-nitrosothiols used to study the effects of transnitrosation in proteins is GSNO, the naturally occurring *S*-nitrosated form of glutathione (GSH). The concentration of GSNO in skeletal muscle cells is not known, but the concentration of GSH ranges between 1 and 3 mM [12], and most reports on *S*-nitrosation of proteins in cell culture use 5 – 100  $\mu\text{M}$  of the *S*-nitrosothiol [13-15].

In this report we use GSNO to show for the first time that thiol groups in skeletal muscle myosin can be extensively *S*-nitrosated *in vitro*; in myofibrils, both myosin and actin are targets. *S*-nitrosation of myosin increases with incubation time and GSNO concentration, and after 60 min the formation of –SNO bonds from 100  $\mu$ M GSNO is 7 times the value for untreated myosin. A significant reduction in the  $Mg^{2+}$  ATPase activity of myosin and actomyosin accompanies *S*-nitrosation of a subpopulation of ~10 cysteines in myosin that form unstable –SNO bonds, suggesting the possibility that a transient *S*-nitrosation by GSNO or other *S*-nitrosothiol *in vivo* might contribute to the regulation of actomyosin during muscle contraction and exercise.

## **EXPERIMENTAL**

### **Materials**

GSH, NEM, Sephadex G-25, HgCl<sub>2</sub>, DTNB, ATP (Grade I), EDTA, EGTA, imidazole, HEPES, Tris, DTT, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). GndCl was from Acros Organics (Morris Plains, NJ), urea was from Merck (Darmstadt, Germany), MMTS was from Calbiochem (La Jolla, CA), biotin-HPDP was from Pierce (Rockford, IL), diethylamine nitric oxide, sodium salt (DEANO) was from Molecular Probes (Eugene, OR) and streptavidin-HRP was from MP Biomedicals (Irvine, CA). Other salts were from Brazilian suppliers.

### **Purification of myosin**

Skeletal muscle myosin was obtained from rabbit back muscles according to Bremel & Weber [16] and stored at -20°C in 50% glycerol (v/v) at high ionic strength. Before use, the glycerol was removed by dilution and centrifugation followed by resuspending the protein in buffer (0.6 M KCl, 50 mM imidazole pH 7) and determining the concentration by the biuret method, using BSA as a standard.

### **Purification and polymerization of actin**

Chicken skeletal muscle actin was purified according to Pardee and Spudich [17] and stored as an acetone powder. Polymerization of actin was carried out as in Mariano et al. [18] but in the absence of DTT. There was no difference in actin-activated myosin ATPase activity in the presence or absence of DTT (data not shown).

### **Skinned muscle fibers**

Skinned skeletal muscle fibers were prepared from rabbit psoas muscle and stored at -20°C in 50% glycerol (v/v) containing relaxing solution (152 mM K propionate, 20 mM imidazole propionate pH 7.0, 6.4 mM Mg acetate, 5 mM EGTA, 4.4 mM ATP) and a cocktail of protease inhibitors [19]. Glycerol was removed before use.

### **Synthesis of S-nitrosoglutathione**

S-nitrosoglutathione (GSNO) was prepared before each experiment by combining equimolar concentrations of GSH (acidified in 0.1 N HCl) and NaNO<sub>2</sub> [4]. After 1-2 min, the

reaction was stopped by titration with KOH to pH 7.0 and 50 mM imidazol was added. The concentration was determined by measuring absorbance at 335 nm ( $\epsilon_{335 \text{ nm}} = 900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

### **Detection of sulfhydryl groups of myosin**

The number of free thiol groups in native and unfolded myosin was measured in the same buffers as those used for *S*-nitrosation (see below) but without GSNO. Myosin (0.25 mg/ml) was incubated with 500  $\mu\text{M}$  DTNB for 2 h at pH 7 and 25-30°C, and the time course of TNB<sup>-</sup> release was analyzed at 412 nm ( $\epsilon_{412 \text{ nm}} = 13,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) [20]. The free thiol groups of *S*-nitrosated myosin could not be analyzed with DTNB, since TNB<sup>-</sup> decomposes *S*-nitrosothiols, over-estimating the real number of free thiols [21].

### **Alkylation of myosin**

In the experiments of Figure 5, to block the most reactive thiol groups, myosin (5 mg/ml) was treated with NEM (1 mM) for 30 min at 25°C in  $\text{Mg}^{2+}$  buffer and the reaction was stopped with 10 mM DTT, followed by extensive dialysis to remove excess NEM and DTT [6]. The remaining number of accessible thiols was determined using DTNB in the presence and absence of GndCl. Measurements of ATPase activity in the presence of  $\text{K}^+$ EDTA or  $\text{Mg}^{2+}$  buffer showed the expected activation and inhibition, respectively, that are characteristic of alkylation of the most reactive thiols, including Cys<sup>707</sup> and Cys<sup>697</sup> [6].

### ***S*-Nitrosation of myosin and of skeletal muscle skinned fibers**

*S*-nitrosation of myosin (2 mg/ml) was carried out using fresh GSNO at 30°C in the ionic condition that promotes the classical  $\text{Mg}^{2+}$ ATPase activity of myosin [22], but without ATP. This  $\text{Mg}^{2+}$  buffer contained 50 mM imidazol, pH 7, 50 mM KCl, 0.2 mM EDTA and 5 mM  $\text{MgCl}_2$  in a final volume of 2 ml. To start the reaction, GSNO (1  $\mu\text{M}$ -8 mM) was added to the medium containing myosin. After 15-120 min, unreacted GSNO was removed by adding 5 ml cold  $\text{H}_2\text{O}$ , followed by centrifugation (15 min; 2700 g). In some experiments, this procedure was repeated up to 5 times. After 1 to 5 washes, the pellet (0.1 ml) was solubilized in 1 ml high-ionic-strength buffer (0.6 M KCl, 50 mM imidazol pH 7) and covered with foil to diminish -SNO decomposition by light [23]. *S*-nitrosomyosin formation was verified colorimetrically on 40  $\mu\text{l}$  (~ 40  $\mu\text{g}$ ) myosin in a final volume of 0.5 ml.  $\text{NO}_2^-$  was measured after decomposing -SNO bonds with 3 mM  $\text{HgCl}_2$  and reacting the medium with Griess

reagent [24]. Standard curves were constructed using  $\text{NaNO}_2$  and protein concentration was determined according to Lowry et al. [25].

Small bundles of skinned muscle fibers (50 mg wet weight) were treated with 0.5 ml GSNO (0.01-1 mM) for 30 min at 30°C in relaxing solution. Unreacted GSNO was removed by washing 3x with 0.5 ml relaxing solution and proteins were solubilized for 30 min in 1 ml buffer B (25 mM HEPES pH 7.7, 4 mM EGTA, 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM ATP, 0.1 mM neocuproine) containing 0.3 M KCl, in the absence of light. Protein concentration and –SNO content were determined as above.

### **Biotin-switch assay of myosin**

Detection of *S*-nitrosated myosin was carried out according to Hao et al. [26] with some modifications. Myosin (2 mg/ml) was pre-treated with GSNO (1-1000  $\mu\text{M}$ ) for 15 - 120 min, or DEANO (10-1000  $\mu\text{M}$ ) for 30 min, in  $\text{Mg}^{2+}$  buffer at 30°C (0.2 ml final volume). Unreacted reagent was removed by precipitation of myosin using 1.8 ml buffer A (20 mM TrisHCl pH 7.7; 1 mM EDTA; 0.1 mM neocuproine). Protein pellets were resuspended in 0.2 ml blocking buffer (Buffer A plus 8 M urea and 40 mM MMTS) at 50°C for 1 h in the dark with frequent vortexing. Positive controls for maximum number of thiols available to biotinylation were carried out by omitting GSNO and replacing MMTS with DTT (10 mM). Excess MMTS or DTT was removed on a PD-10 column (Sephadex G-25) pre-equilibrated in buffer A containing 8 M urea. –SNO groups were switched to biotin tag by incubating with 1 mM ascorbate and 2 mM biotin-HPDP for 2 h at 37°C in the dark. The samples were dialyzed against buffer A containing 0.5% Triton X-100 (v/v) followed by SDS-PAGE (without reducing agent), in duplicate. One gel was used for transfer to a nitrocellulose membrane and blocked in 1% BSA (w/v) overnight. The blot was exposed for 3 h to streptavidin-HRP (1:8,000 dilution) and biotinylation was detected with chemiluminescence using ECL Plus (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). The other gel was stained with Coomassie blue R and intensities of Coomassie blue staining and chemiluminescence were analyzed using Image Quant 5.2 (Molecular Dynamics).

### **Biotin-switch assay of skinned fibers**

Skinned fibers (50 mg) treated with GSNO as described above were washed 3x with 0.5 ml relaxing buffer and reduced cysteines were blocked and solubilized with 0.2 ml buffer B (25 mM HEPES pH 7.7, 4 mM EGTA, 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM ATP, 0.1 mM neocuproine)

containing 2.5% SDS (w/v) and 0.1 M MMTS for 1 h at 50°C with frequent vortexing, in the absence of light. Controls were prepared in which GSNO or MMTS was replaced with DTT. Proteins were precipitated by adding 5 vol cold acetone, the mixture was centrifuged and the pellet was washed 3x with cold acetone followed by resuspension in 0.2 ml buffer B containing 1% SDS, 1 mM ascorbate and 2 mM biotin-HPDP for 1 h at 37°C in the absence of light. Excess ascorbate and biotin-HPDP were removed by acetone precipitation. Proteins were resuspended by adding 0.2 ml buffer B containing 0.5% Triton X-100 (w/v) (neutralization buffer) and immunoblotting was carried out as described for myosin.

### **Myosin and actomyosin ATPase activity**

After the *S*-nitrosation protocol followed by 1-5 washes and resuspending the final pellet in KCl-imidazol as described above, 0.1 ml (~0.1 mg protein) was used to measure myosin ATPase activity in a final volume of 1 ml in the presence of 3 mM ATP at 30°C. This procedure ensured a dilution of the original GSNO by a factor of 350, after 1 wash. The samples were pre-incubated at 30°C for 2 min at a final concentration of 0.05 – 0.2 mg/ml myosin either in Mg<sup>2+</sup> buffer (for Mg<sup>2+</sup>ATPase) or in 0.6 M KCl, 5 mM EDTA and 50 mM imidazol pH 7 for K<sup>+</sup>EDTA ATPase, or in 50 mM KCl, 50 mM imidazol pH 7, 0.2 mM EDTA and 5 mM CaCl<sub>2</sub> for Ca<sup>2+</sup>ATPase activity. Hydrolysis was started by adding 3 mM ATP and interrupted by transferring 0.5 ml into 0.5 ml of activated charcoal suspended in 0.1 N perchloric acid, followed by centrifugation to remove the charcoal. The supernatants were analyzed colorimetrically to determine Pi release. The time course of hydrolysis was linear in all cases.

Actin-activated myosin ATPase activity was measured after myosin *S*-nitrosation followed by 2 washes and resuspending the pellet in KCl-imidazol. Hydrolysis was started by adding 50 µl modified myosin (final concentration 0.1 – 0.2 mg/ml) to ATPase medium in the presence of actin (60 mM KCl, 50 mM imidazol pH 7, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 3 mM ATP, 0-0.5 mg/ml actin). After 10 min, the reaction was interrupted by transferring 0.5 ml into 0.5 ml of activated charcoal suspended in 1 N perchloric acid followed by centrifugation to remove the charcoal. The Pi determination was the same as described above. Actin-activation of myosin was calculated by subtracting the specific activity of myosin from the total ATPase activity in the presence of actin. Kinetic parameters ( $K_m$  and  $V_{max}$ ) were determined by fitting the data with a rectangular hyperbola.

**Statistical analysis**

The experimental results were analyzed for significance using Student's paired  $t$  test at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### **S-Nitrosation of myosin affects only Mg<sup>2+</sup> ATPase activity**

Myosin exhibits pronounced differences in activity under different ionic conditions, presumably reflecting conformational changes associated with the binding of K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> or Ca<sup>2+</sup> to the motor domain [27] as well as the stability of the cation-ATP complex in the catalytic site. Using these three classical ionic conditions, we explored the effects of myosin S-nitrosation on the ATPase activity, and the results are summarized in Table 1. In these experiments, myosin was pre-incubated with GSNO for 15 min under the different conditions, then separated from the reaction medium as described in Methods and solubilized in KCl-imidazol solution. Separate aliquots were removed for measurements of S-nitrosation, protein and ATPase activity.

It is evident that Ca<sup>2+</sup>ATPase and K<sup>+</sup>EDTA ATPase activities were not affected by the pre-treatment with GSNO (Table 1). In the presence of Mg<sup>2+</sup>, however, an inhibition of  $\approx$  25% was observed after treatment with 3 mM GSNO (Table 1). This decrease in Mg<sup>2+</sup>ATPase activity was obtained after 1 wash, which dilutes the unreacted GSNO present in the medium by a factor of 350 (see Methods). The effect was very similar when ATPase was measured after a simple dilution (1:10) of GSNO present in the assay medium, i.e. without washing (filled circles in Fig. 1A). This observation suggests an effect mediated by a nitrosative modification promoted by GSNO, since a 10-fold dilution and a 350-fold dilution of unreacted GSNO had the same inhibitory effect.

Although the concentration of GSNO used in these first experiments produced a measurable effect in a short time, it greatly exceeds the values that have been reported in cells [13;15]. In the next experiments, myosin was incubated for 60 min in the presence of lower concentrations of GSNO. In this case, the maximum inhibition was greater (40%) and nearly identical values were attained with 5, 10 and 100  $\mu$ M GSNO (filled squares in Fig. 1A). Thus inhibition of the Mg<sup>2+</sup>ATPase activity following pre-incubation with GSNO is both time- and concentration-dependent and does not require the continued presence of S-nitrosothiol.

### **DEANO, a NO<sup>•</sup> donor, has no effect**

To investigate whether the decrease in activity of myosin was mediated by the nitric oxide radical, we compared the effects of GSNO with those of the NONOate DEANO, which releases 1.5 mM NO<sup>•</sup>/ mM DEANO over a period of many minutes [28]. Over a wide range

of DEANO concentrations, the ATPase activity was not modified (filled triangles in Fig. 1A). These results indicate that treatment with GSNO affects myosin ATPase activity primarily by transnitrosation and not by a direct reaction with NO<sup>•</sup>. A similar result was reported for creatine kinase, which is inhibited by *S*-nitrosothiols but not by NONOates [29].

### **Inhibition of myosin is correlated with *S*-nitrosation**

To verify whether the decrease in myosin activity was related to *S*-nitrosation of some of the 42 cysteines present in myosin, we determined the number of *S*-nitrosothiols following the pre-incubation of myosin with 0 – 3 mM GSNO. In these experiments higher concentrations of GSNO were used in order to attain significant levels of *S*-nitrosation in a short period. –SNO groups were quantified and identified spectrophotometrically using the Griess reagent and immunodetection by the biotin-switch assay, respectively. To avoid contamination with unreacted GSNO, we purified myosin after the reaction with GSNO by repeated washes (see Methods) based on the precipitation of myosin at low ionic strength.

Figure 1B shows the relationship between the –SNO groups detected spectrophotometrically and their inhibitory effect on Mg<sup>2+</sup> ATPase after 15 min of reaction with GSNO. Inhibition reached its maximum (~25% under these conditions) in conjunction with *S*-nitrosation of 9 – 13 thiol groups per myosin molecule. A comparison with Figure 1A (open circles) shows that this level of inhibition requires 1.5 mM GSNO. At a higher GSNO concentration (3 mM), up to 28 *S*-nitrosothiols were formed without further effect, suggesting a specificity of some thiols that, when modified by nitroso groups, modulate the activity of myosin.

Contaminant GSNO can interfere with the colorimetric quantification of –SNO bonds using Griess reagent. In the next experiments we isolated the protein and determined the *S*-nitrosation specific to myosin, using the biotin-switch assay [26]. This assay replaces –SNO groups with biotin-HPDP, a more stable modification that makes it possible to detect protein *S*-nitrosothiols by immunoblotting. Myosin was first pre-treated with GSNO for 15 min, then precipitated, resuspended and processed for the biotin-switch as described in Materials and Methods. The immunoblot reveals a concentration-dependent increase in –SNO content (WB, Fig. 2A) demonstrating that GSNO promotes transnitrosation of the myosin heavy chain. On average, quantitation of the GSNO-dependent biotinylation shows an increase of six fold as the concentration of GSNO is raised to 1 mM (Fig. 2A). In this experiment, GSH was used as a negative control (WB, Fig. 2B). With GSH, a low level of biotinylation was observed regardless of the GSH concentration, showing the same degree of biotinylation, within

experimental error, as in the absence of GSNO or GSH (cf. 0  $\mu$ M GSNO with 0-1000  $\mu$ M GSH in Western blots in Fig. 2A and 2B). This observation is consistent with a previous report showing that the blocking step can be less than totally efficient [23]. In the positive control (PC), the reaction of reduced myosin with biotin-HPDP without blocking with MMTS was used to show the maximal capacity for biotinylation of myosin thiols, and indicates sites of biotinylation that, even after 1 mM GSNO, were not *S*-nitrosated.

The time dependence of the *S*-nitrosation of myosin heavy chain detected by the biotin-switch assay is shown in Figure 3, using 100  $\mu$ M GSNO. The GSNO-dependent biotinylation increased progressively as the pre-incubation time was extended from 15 to 120 min. It is noteworthy that there was an increase of 4 fold between 15 and 60 min (lower panel), which can be compared with inhibition of the ATPase activity at this concentration in Figure 1A (0 – 5% after 15 min (filled circles) vs. 38% after 60 min (filled squares)).

To demonstrate that *S*-nitrosation occurs only by transnitrosation, myosin was incubated with DEANO followed by the biotin-switch assay. DEANO did not promote a significant increase in –SNO content when compared with the positive control for biotinylation of cysteine residues (Fig. 2C). These data indicate that  $\text{NO}^\bullet$  cannot form –SNO bonds in myosin under conditions where GSNO is effective in this regard.

### **Stability of myosin *S*-nitrosothiols and inhibition of the ATPase**

A number of different proteins that can be *S*-nitrosated *in vitro* have been shown to lose the –SNO groups subsequently, at different rates and by different mechanisms, including release of  $\text{NO}^\bullet$  to the medium and transfer of the nitroso group to other proteins. Although it was not our objective to explore possible routes of myosin-SNO decomposition, we did compare the stability of the *S*-nitrosated cysteines with the inhibition of ATPase activity, using for convenience a relatively short incubation time (15 min) and a wide range of GSNO concentrations. As described below, these same experiments were useful for eliminating the possibility of overestimating –SNO bonds because of contaminant GSNO. Figure 4 shows that the extent of *S*-nitrosation with different GSNO concentrations is almost linear and does not reach a plateau, when excess GSNO is removed by one wash. It is interesting that the total number of nitrosated thiols at 3 mM GSNO ( $25 \pm 3$  mol –SNO/mol myosin, Fig. 4A) exceeds the number that reacts with DTNB in 2 h ( $12 \pm 1$  mol –SH/mol myosin, Fig. 5B) suggesting a very different reactivity of cysteines in response to *S*-nitrosation compared with DTNB.

The upper curve in Figure 4 could, in principle, arise from contamination with unreacted GSNO. After one wash, the final GSNO concentration available to react with the Griess reagent is reduced about 440 fold, so the maximal GSNO concentration used was limited to 3 mM (maximum estimated contaminant at 3 mM GSNO is 6.8  $\mu$ M). To measure the *S*-nitrosation in myosin using higher GSNO concentrations without increasing the contaminant GSNO, two to five washes were used after the *S*-nitrosation step (Fig. 4). In these cases, the *S*-nitrosation of myosin approached a plateau with 4 – 5 mM GSNO. Thus there is clear evidence of saturation, and the occurrence of a plateau as GSNO increases is not consistent with an artefact arising from –SNO measured as a contaminant derived from residual GSNO. To ascertain whether contaminant GSNO could promote the inhibitory effect on myosin activity seen in Figure 2, we determined the  $Mg^{2+}$ ATPase activity after 0 – 5 washes. Despite the fact that 2 washes decreased the residual GSNO concentration by at least two orders of magnitude, inhibition was essentially the same in 0, 1 and 2 washes (Fig. 4B). Thus it is unlikely that contaminant GSNO is responsible for inhibition of the ATPase; instead, we infer that GSNO promotes *S*-nitrosation of a group of cysteines that affect the activity.

The question of stability was considered on the basis of these same experiments. It is striking that there was a marked decrease in –SNO groups in myosin after each wash (Fig. 4A;  $25 \pm 3$  to  $11 \pm 1$  to  $2 \pm 0.2$  mol –SNO/mol myosin, for 1, 2 and 5 washes, respectively, at 3 mM GSNO). This observation suggests that the loss of –SNO groups after washing is related primarily to the lability of some of these groups, and not merely to the removal of contaminant GSNO. When the *S*-nitrosation is normalized to the value attained at the highest GSNO concentration, the profile of –SNO bonds after 2 and 5 washes is the same (Figure 4A inset). Thus the stable and unstable groups appear to have the same affinity for *S*-nitrosation by GSNO.

The stability of *S*-nitrosothiols in proteins is associated with the environment of the –SNO group in the molecule. The nature and proximity of neighboring amino-acid residues can increase or decrease its rate of decomposition [30]. As described above (Fig. 4), when myosin is washed 1 or 2 times after *S*-nitrosation, the –SNO content is reduced, but the ATPase effect is unchanged. However, after 5 washes, the number of –SNO groups decreases and reaches a steady value, with a maximum of  $3.5 \pm 0.6$  mol/mol (Fig. 4A). At the same time, the inhibitory effect on  $Mg^{2+}$ ATPase activity is lost (squares in Fig. 4B). We infer that *S*-nitrosation of myosin produces two populations of –SNO bonds: a large one which is more labile and includes some bonds that inhibit the ATPase, and a small one which does not affect

the activity, but is more stable. It is also evident from Figure 4 that not all of the –SNO bonds in the more labile population are involved in inhibiting the ATPase activity, since a comparison of the upper two curves in Figure 4A shows that the number of –SNO bonds can be reduced from 25 to 11 at 3 mM GSNO, for example, with no effect on the activity (cf. triangles in Fig. 4B). These results reinforce and extend the conclusion drawn from Figure 1: inhibition arises from *S*-nitrosation of no more than 10 labile cysteines, and possibly fewer.

### **The more stable –SNO groups are located in more buried regions**

To further characterize the more stable *S*-nitrosothiols formed in myosin after reaction with GSNO, NEM was used to block the more reactive thiols and *S*-nitrosation was measured after reaction with GSNO followed by 5 washes, which eliminates the unstable –SNO bonds.

As can be seen in Figure 5A, the treatment with 1 mM NEM significantly reduced the *S*-nitrosation of myosin only at high GSNO concentrations ( $4.8 \pm 0.1$  to  $2.5 \pm 0.5$  mol/mol in 8 mM GSNO for native- and NEM-myosin, respectively;  $P < 0.05$ ), but not in low GSNO concentration ( $1.1 \pm 0.4$  to  $1.5 \pm 0.3$  mol/mol in 0.25 mM GSNO for native- and NEM-myosin, respectively). These data show that between 2 and 3 cysteines (triangles in Fig. 5A) that belong to the more stable group of *S*-nitrosothiols were not alkylated, suggesting that these cysteines are reactive to GSNO, but not to NEM. The 2 cysteines alkylated by NEM (circles at 8 mM GSNO in Fig. 5A) do not affect the ATPase activity. Since *S*-nitrosation with GSNO followed by two washes produces 10 – 15 –SNO bonds / myosin (filled triangles in Fig. 4A), and 3 – 5 of them belong to the stable group, some of the other 10 labile –SNO bonds must promote the inhibitory effect of *S*-nitrosation.

To relate the stable –SNO bonds with the reactivity and availability of thiols in myosin, DTNB was used after the alkylation step to measure the number of free –SH groups. The protein was alkylated in the folded state with NEM and thiols were determined in the folded (without GndCl) and unfolded (with GndCl) protein (Fig. 5B). In both conditions, NEM-myosin had a reduced number of free –SH groups in relation to non-alkylated myosin (Fig. 5B). The difference in free thiol content of native myosin and NEM-myosin is  $10 \pm 2$  mol –SH/mol myosin when measured in the folded state and  $11 \pm 2$  mol –SH/mol myosin when measured in the unfolded state (Fig. 5B;  $P > 0.05$ ). This result shows that alkylation reaches the more available thiols, since the alkylation step in both cases was carried out in the folded state. Thus it seems likely that in these 10 – 11 alkylated cysteines, located in regions more exposed to the solution, one or two can form stable –SNO bonds and the 8 – 10

remaining thiols can form unstable –SNO bonds. We infer that some of these latter, more exposed residues are responsible for the inhibition of ATPase activity after *S*-nitrosation.

### ***S*-nitrosation does not affect the actin-myosin affinity**

Myosin's ability to bind to actin during the cross-bridge cycle, increasing its ATPase activity, is fundamental to its chemomechanical role in muscle. To determine whether *S*-nitrosation alters the maximal ATPase activation or actin-myosin affinity, myosin was reacted with 0.1 – 8 mM GSNO in Mg<sup>2+</sup> buffer for 15 min at 30°C and the reaction was interrupted by 2 washes to avoid reaction of contaminant GSNO with actin in the ATPase assay. The actin-activation of modified myosin was induced by adding it to a Mg<sup>2+</sup> buffer containing ATP and various concentrations of actin.

Figure 6A shows an example of the actin-activation of native and *S*-nitrosomyosin prepared as described in Figure 4B (2 washes). On average, the maximal activity decreased in a concentration-dependent manner, approaching a plateau value ( $\approx$  20% inhibition) after treatment with 2 mM GSNO (Fig. 6B). There was no effect on myosin affinity for actin (see legend to Fig. 6A), and thus the effect of *S*-nitrosation on the actomyosin ATPase can probably be attributed to its effect on the catalytic cycle of myosin alone.

### ***S*-nitrosation of skinned fibers targets myosin and actin**

Among the contractile and regulatory proteins of skeletal muscle, there are many free thiols that could be targets for *S*-nitrosation. To explore this possibility, skinned fibers were exposed to GSNO in relaxing solution and then solubilized to detect and quantify the –SNO groups in muscle proteins by the biotin-switch assay and Saville's method, respectively.

Figure 7A shows that treatment with 0.1 and 1 mM GSNO increased –SNO bonds from  $0.8 \pm 0.05$  (control) to  $1.5 \pm 0.1$  and  $4.2 \pm 0.9$  nmol –SNO/ $\mu$ g total protein, respectively. To determine which proteins were *S*-nitrosated by this treatment, a biotin-switch assay was performed. Biotinylated proteins detected by Western blot were primarily myosin and actin (Fig. 7B). In positive controls, labeled PC, DTT replaced MMTS and subsequent biotinylation revealed available cysteines in many other proteins that were not susceptible to GSNO treatment (Fig. 7B). These data suggest that in skinned skeletal muscle fibers, actin and myosin are the main targets of transnitrosation from GSNO.

In Figure 7B, the biotin switch of skinned fibers in the absence of GSNO revealed a trace *S*-nitrosation in the myosin heavy chain. Since there was no labelling in the negative

control (NC, where GSNO was replaced by DTT), this observation indicates that myosin may be *S*-nitrosated in resting muscle.

## DISCUSSION

The principal findings of the present study are that myosin can be extensively *S*-nitrosated *in vitro* and the physiological ATPase activity can be affected by unstable –SNO sites located in more exposed cysteines, which do not affect the affinity of myosin for actin. Evidence is presented to show that the mechanism is one of transnitrosation rather than a direct effect of NO<sup>•</sup>.

The demonstration of a constitutive expression of NOS in skeletal muscle fibers [31] was followed by a number of studies showing that many muscle proteins can be *S*-nitrosated, including actin [4]. Myosin *S*-nitrosation has not previously been reported, in spite of the important role of myosin in muscle contraction and the presence of cysteines that are critical for its activity.

First we show that the activity of myosin is significantly reduced after reaction with GSNO, and that only the physiologically relevant Mg<sup>2+</sup> ATPase activity is affected (Table 1) suggesting that in the presence of Mg<sup>2+</sup> the availability of (a) specific thiol(s) necessary for *S*-nitrosation in myosin is increased, but not in other ionic conditions [6].

The effects on ATPase activity found with GSNO were not found with DEANO, a NONOate compound that releases nitric oxide radical (NO<sup>•</sup>). This result makes it unlikely that myosin is regulated directly by NO<sup>•</sup> or other products of its autooxidation in oxygenated solutions (e.g. NO<sub>2</sub><sup>•</sup> or N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) [8]. This may reflect the fact that the rate of *S*-nitrosation by NO<sup>•</sup> in oxygenated solutions is relatively slow [8]. We suggest that DEANO does not affect the activity of myosin because it is not capable of *S*-nitrosating the same thiols on myosin as GSNO does. This suggestion is reinforced by the data in Figure 2C, where immunodetection after the biotin-switch assay shows a negligible *S*-nitrosation compared with GSNO.

Myosin contains 42 cysteines, and different populations of sulfhydryl groups have been described [5]. In our experiments, maximal inhibition of the Mg<sup>2+</sup> ATPase in 15 min was attained after *S*-nitrosation of 9 – 13 thiol groups (Fig. 1B), apparently with no contribution from the other 15 –SNO groups formed by transnitrosation at higher GSNO concentrations. When the same number of *S*-nitrosothiols was formed in Ca<sup>2+</sup> or K<sup>+</sup>EDTA buffers, there was no effect whatever (data not shown). Either the more reactive thiols, including SH1 (Cys<sup>707</sup>) and SH2 (Cys<sup>697</sup>) [6], can be *S*-nitrosated without functional impairment, or they are not susceptible to attack by GSNO. It is also possible that they are *S*-nitrosated but only for a very short time – i.e., that the stability of the *S*-nitrosation of SH1 and SH2 is so low that the

nitroso group is lost before it can be detected by our methodology. It is of interest that Sakamoto et al. [32] have recently described an –SH reagent that reacts with a single residue in each myosin head, without modifying either SH1 or SH2, and inhibits the  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^+$ EDTA ATPase activities, without affecting the  $\text{Mg}^{2+}$  ATPase activity.

Our experiments showing that myosin *S*-nitrosation causes inhibition of actin-activated ATPase with no effect on the actomyosin affinity provide additional evidence that *S*-nitrosation is not affecting SH1 or SH2. Alkylation of myosin with NEM enhances the affinity between actin and myosin, even in the presence of  $\text{Mg}^{2+}$  ATP, and reduces the maximal actin-activation [33], since this modification affects SH1 and SH2. After *S*-nitrosation, the maintenance of actomyosin affinity suggests the absence of –SNO bonds on SH1 and SH2, consistent with our observation of the lack of the characteristic changes in myosin ATPase activity that accompany alkylation of these two thiols [6]. An inhibition of actomyosin activity by *S*-nitrosation was proposed by Tiago et al. [7], who used peroxyntirite to promote nitrosative damage in the purified proteins but did not demonstrate *S*-nitrosation.

The Saville-Griess method used in this study to quantify the *S*-nitrosothiols is indirect, but the biotin-switch assay provides an independent check on the occurrence of *S*-nitrosation, especially at low RSNO concentrations. This method is based on complete blocking of free thiols with MMTS, followed by specific reduction of –SNO groups by ascorbate and labelling with biotin-HPDP, which can be identified by Western blotting. The blocking step was relatively efficient, although complete blocking was not obtained (cf. Fig. 2B and 2C), and it may be that native myosin has endogenous –SNO bonds that survive the myosin purification procedure. As also observed for the ATPase activity, the time of reaction between myosin and GSNO was important. Assessment of the physiological significance of this reaction will ultimately require a better understanding of factors that govern the rate of transnitrosation between GSNO and myosin thiols.

The sulfhydryl groups of protein cysteines have different reactivities depending on the three-dimensional structure, which can increase or decrease the tendency for *S*-nitrosation [30]. One of our goals was to determine whether *S*-nitrosation reveals different classes of thiols in myosin. The reduction in –SNO content with washing appears to be related to decomposition of the less stable *S*-nitrosothiols in myosin, since we used deionized water without chelating agents, which are reported to stabilize these bonds [23]. The reduction in –SNO content to 10 – 15 mol/mol myosin after two washes did not change the inhibitory effect on the  $\text{Mg}^{2+}$  ATPase activity. However, after 5 washes, the inhibitory effect was completely abolished, and the –SNO content drastically reduced to 3 – 5 mol/mol. This suggests that

there are two groups of *S*-nitrosothiols in myosin, one more unstable that affects ATPase and the other more stable, with no effect. Thus myosin has thiols that can be transiently *S*-nitrosated, and these thiols have the potential to modulate the demand for ATP in situations where the nitrosative stress is increased by the production of nitric oxide during muscle contraction.

To investigate the relationship between different thiol populations and the stable –SNO groups we have found in myosin, we blocked the most reactive thiol groups with NEM. In this condition, according to Watterson et al. [34], 10 cysteines are alkylated in the native state. After this procedure, the protein was exposed to GSNO for 15 min, followed by 5 washes, to study the more stable –SNO groups. The –SNO content of myosin alkylated and then *S*-nitrosated in this way was reduced only in high GSNO concentrations (from 4-5 to 3 mol –SNO/mol for native and alkylated myosin, respectively). This means that only 20% (2/10) of the total number of thiols accessible to alkylation can form stable –SNO bonds and the other alkylated cysteines can form unstable –SNO bonds. This may mean that the former are located on residues more exposed to the solvent, increasing the rate of RSNO decomposition [30]. In the case of the –SNO bonds that do not affect the activity, their stability could be related to the accessibility of the solvent to the interior of the protein [9]. These data suggest that the –SNO sites belong to two classes of thiols: those in more exposed regions, which bind transiently to nitroso groups and affect  $Mg^{2+}$  ATPase activity, and those in more buried regions on myosin, which form stable –SNO bonds but do not inhibit ATPase activity.

Formation of 3-nitrotyrosine and protein disulfide bonds can also occur with GSNO, and would not be detected by the Saville assay, where specificity is conferred by the reaction of Hg(II) with sulfur in the –SNO bonds [35]. If these other bonds are formed, it seems unlikely that they could be responsible for inhibition of the ATPase, since they are inherently more stable than –SNO bonds and are not easily lost simply by washing the protein [7].

Even though many muscle proteins have their function changed by *S*-nitrosation *in vitro*, it has never been demonstrated that *S*-nitrosation occurs in fibers. Here we show that in skinned fibers, in which the sarcolemma is disrupted by EGTA and there is extensive loss of cytosolic proteins [36], many myofibrillar proteins are susceptible to cysteine biotinylation (Fig. 7B), but *S*-nitrosation is induced pharmacologically mainly in myosin and actin.

The evident *S*-nitrosation of actin in skinned muscle fibers is consistent with a report that showed *S*-nitrosated actin in non-muscle cells [23], suggesting that this protein may be an ubiquitous site for *S*-nitrosation of the cytoskeleton. In the case of myosin, it was not

unexpected that myosin could be *S*-nitrosated in skinned fibers, since it has a large content of thiols. However, myosin and actin appear to be preferential targets for –SNO bonds, since other proteins such as tropomyosin and troponin (C+T+I), which have cysteines, are not visibly affected up to 0.5 mM GSNO (Fig. 7B).

Inhibition of contraction by *S*-nitrosothiols in intact fibers appears to involve calcium release from the sarcoplasmic reticulum [37]. In skinned fibers, however, this component can easily be eliminated, leaving only cross-bridges and Ca<sup>2+</sup> regulation of the thin filament as potential targets. Inhibition of the Mg<sup>2+</sup> ATPase activity of myosin and actomyosin by GSNO provides a plausible explanation for the significant decreases in maximal force and rigor stiffness that have been obtained using nitroso donors in skinned fibers [38-40]. A somewhat larger effect on Ca<sup>2+</sup> sensitivity suggests additional sites of action on the thin filament [39]. In one of these studies, controls were performed to eliminate contributions from reaction products other than *S*-nitrosothiols [40]. Similarly, in our experiments, excess GSNO and the products of the reaction were removed by extensive washing, or by passage through a PD-10 column.

Low-molecular-weight *S*-nitrosothiols are produced in response to the increased NOS activity in different tissues [41]. In skeletal muscle, myosin is present in such large amounts that it could act as a nitroso buffer reacting with *S*-nitrosothiols in muscle fibers during contractile activity. It is interesting that only the Mg<sup>2+</sup> ATPase activity is inhibited by GSNO. Further study will be required to establish whether *S*-nitrosation of a specific residue is responsible for this effect. We conclude that myosin is a new target for *S*-nitrosation in skeletal muscle, but we note that the modulatory effect on ATPase activity may be transient, due to *S*-nitrosation of unstable –SNO groups.

**Acknowledgments:** We thank Ms. D.M. Araujo for the skillful preparation of actin and myosin, and Dr. H.M. Scofano and Dr. P.L. de Oliveira (Inst. Bioquímica Médica, UFRJ) for critical reading of the manuscript.

## REFERENCES

- 1 Kay, J. (1978) Intracellular protein degradation. *Biochem.Soc.Trans*, **6**, 789-797.
- 2 Stamler, J.S. and Meissner, G. (2001) Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol. Rev.*, **81**, 209-237.
- 3 Marechal, G. and Gailly, P. (1999) Effects of nitric oxide on the contraction of skeletal muscle. *Cell Mol.Life Sci.*, **55**, 1088-1102.
- 4 Dalle-Donne, I., Milzani, A., Giustarini, D., Di Simplicio, P., Colombo, R. and Rossi, R. (2000) S-NO-actin: S-nitrosylation kinetics and the effect on isolated vascular smooth muscle. *J.Muscle Res.Cell Motil.*, **21**, 171-181.
- 5 Buttke, H. (1971) The sulfhydryl content of rabbit and trout myosins in relation to protein stability. *Can.J.Biochem.*, **49**, 97-107.
- 6 Reisler, E., Burke, M. and Harrington, W.F. (1974) Cooperative role of two sulfhydryl groups in myosin adenosine triphosphatase. *Biochemistry*, **13**, 2014-2022.
- 7 Tiago, T., Simao, S., Aureliano, M., Martin-Romero, F.J. and Gutierrez-Merino, C. (2006) Inhibition of skeletal muscle S1-myosin ATPase by peroxynitrite. *Biochemistry*, **45**, 3794-3804.
- 8 Goldstein, S. and Czapski, G. (1996) Mechanism of the nitrosation of thiols and amines by oxygenated NO<sup>•</sup> solutions: the nature of the nitrosating intermediates. *J.Am.Chem.Soc.*, **118**, 3419-3425.
- 9 Weichsel, A., Brailey, J.L. and Montfort, W.R. (2007) Buried S-nitrosocysteine revealed in crystal structures of human thioredoxin. *Biochemistry*, **46**, 1219-1227.
- 10 Mitchell, D.A. and Marletta, M.A. (2005) Thioredoxin catalyzes the S-nitrosation of the caspase-3 active site cysteine. *Nat.Chem.Biol.*, **1**, 154-158.
- 11 Martinez-Ruiz, A. and Lamas, S. (2007) Signalling by NO-induced protein S-nitrosylation and S-glutathionylation: Convergences and divergences. *Cardiovasc.Res.*, **75**, 220-228.

- 12 Leeuwenburgh,C., Fiebig,R., Chandwaney,R. and Ji,L.L. (1994) Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. *Am.J.Physiol.*, **267**, R439-R445.
- 13 Ng,E.S., Cheng,Z.J., Ellis,A., Ding,H., Jiang,Y., Li,Y., Hollenberg,M.D. and Triggle,C.R. (2007) Nitrosothiol stores in vascular tissue: modulation by ultraviolet light, acetylcholine and ionomycin. *Eur.J.Pharmacol.*, **560**, 183-192.
- 14 Steffen,M., Sarkela,T.M., Gybina,A.A., Steele,T.W., Trassetth,N.J., Kuehl,D. and Giulivi,C. (2001) Metabolism of *S*-nitrosoglutathione in intact mitochondria. *Biochem.J.*, **356**, 395-402.
- 15 Kluge,I., Gutteck-Amsler,U., Zollinger,M. and Do,K.Q. (1997) *S*-nitrosoglutathione in rat cerebellum: identification and quantification by liquid chromatography-mass spectrometry. *J.Neurochem.*, **69**, 2599-2607.
- 16 Bremel,R.D. and Weber,A. (1975) Calcium binding to rabbit skeletal myosin under physiological conditions. *Biochim.Biophys.Acta*, **376**, 366-374.
- 17 Pardee,J.D. and Spudich,J.A. (1982) Purification of muscle actin. *Methods Enzymol.*, **85**, 164-181.
- 18 Mariano,A.C., Alexandre,G.M., Silva,L.C., Romeiro,A., Cameron,L.C., Chen,Y., Chase,P.B. and Sorenson,M.M. (2001) Dimethyl sulphoxide enhances the effects of P(i) in myofibrils and inhibits the activity of rabbit skeletal muscle contractile proteins. *Biochem.J.*, **358**, 627-636.
- 19 Sousa,V.P., Pinto,J.R. and Sorenson,M.M. (2006) Ionic interventions that alter the association of troponin C C-domain with the thin filaments of vertebrate striated muscle. *Biochim.Biophys.Acta*, **1760**, 272-282.
- 20 Ellman,G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch.Biochem.Biophys.*, **82**, 70-77.
- 21 Gergel',D. and Cederbaum,A.I. (1997) Interaction of nitric oxide with 2-thio-5-nitrobenzoic acid: implications for the determination of free sulfhydryl groups by Ellman's reagent. *Arch.Biochem.Biophys.*, **347**, 282-288.

- 22 Lymn,R.W. and Taylor,E.W. (1970) Transient state phosphate production in the hydrolysis of nucleoside triphosphates by myosin. *Biochemistry*, **9**, 2975-2983.
- 23 Jaffrey,S.R., Erdjument-Bromage,H., Ferris,C.D., Tempst,P. and Snyder,S.H. (2001) Protein *S*-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat.Cell Biol.*, **3**, 193-197.
- 24 Saville,B. (1958) A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analyst*, **83**, 670-672.
- 25 Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farra,A.L. and Randall,R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.*, **193**, 265-275.
- 26 Hao,G., Derakhshan,B., Shi,L., Campagne,F. and Gross,S.S. (2006) SNOSID, a proteomic method for identification of cysteine *S*-nitrosylation sites in complex protein mixtures. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **103**, 1012-1017.
- 27 Schaub,M.C., Watterson,J.G. and Waser,P.G. (1975) Conformational differences in myosin, IV.[1-3] Radioactive labeling of specific thiol groups as influenced by ligand binding. *Hoppe Seylers Z.Physiol. Chem.*, **356**, 325-339.
- 28 Keefer,L.K., Nims,R.W., Davies,K.M. and Wink,D.A. (1996) "NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms. *Methods Enzymol.*, **268**, 281-293.
- 29 Konorev,E.A., Kalyanaraman,B. and Hogg,N. (2000) Modification of creatine kinase by *S*-nitrosothiols: *S*-nitrosation vs. *S*-thiolation. *Free Radic.Biol.Med.*, **28**, 1671-1678.
- 30 Hess,D.T., Matsumoto,A., Kim,S.O., Marshall,H.E. and Stamler,J.S. (2005) Protein *S*-nitrosylation: purview and parameters. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, **6**, 150-166.
- 31 Kobzik,L., Reid,M.B., Bredt,D.S. and Stamler,J.S. (1994) Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature*, **372**, 546-548.
- 32 Sakamoto,H., Furukawa,K., Matsunaga,K., Nakamura,H. and Ohizumi,Y. (1995) Xestokinone activates skeletal muscle actomyosin ATPase by modification of the specific sulfhydryl group in the myosin head probably distinct from sulfhydryl groups SH1 and SH2. *Biochemistry*, **34**, 12570-12575.

- 33 Meeusen,R.L. and Cande,W.Z. (1979) *N*-ethylmaleimide-modified heavy meromyosin. A probe for actomyosin interactions. *J.Cell Biol.*, **82**, 57-65.
- 34 Watterson,J.G., Schaub,M.C., Locher,R., Di Pierri,S. and Kutzer,M. (1975) Temperature-induced transitions in the conformation of intermediates in the hydrolytic cycle of myosin. *Eur.J.Biochem.*, **56**, 79-90.
- 35 Swift,H.R. and Williams,D.L.H. (1997) Decomposition of *S*-nitrosothiols by mercury(II) and silver salts. *J.Chem.Soc.Perkin Trans.2.*, 1933-1935.
- 36 Eastwood,A.B., Wood,D.S., Bock,K.L. and Sorenson,M.M. (1979) Chemically skinned mammalian skeletal muscle. I. The structure of skinned rabbit psoas. *Tissue Cell*, **11**, 553-566.
- 37 Andrade,F.H., Reid,M.B., Allen,D.G. and Westerblad,H. (1998) Effect of nitric oxide on single skeletal muscle fibres from the mouse. *J.Physiol.*, **509**, 577-586.
- 38 Galler,S., Hilber,K. and Gobesberger,A. (1997) Effects of nitric oxide on force-generating proteins of skeletal muscle. *Pflugers Arch.*, **434**, 242-245.
- 39 Perkins,W.J., Han,Y.S. and Sieck,G.C. (1997) Skeletal muscle force and actomyosin ATPase activity reduced by nitric oxide donor. *J.Appl.Physiol.*, **83**, 1326-1332.
- 40 Heunks,L.M., Machiels,H.A., Dekhuijzen,P.N., Prakash,Y.S. and Sieck,G.C. (2001) Nitric oxide affects sarcoplasmic calcium release in skeletal myotubes. *J.Appl.Physiol.*, **91**, 2117-2124.
- 41 Bryan,N.S., Rassaf,T., Maloney,R.E., Rodriguez,C.M., Saijo,F., Rodriguez,J.R. and Feelisch,M. (2004) Cellular targets and mechanisms of nitros(yl)ation: an insight into their nature and kinetics in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **101**, 4308-4313.
- 42 Porzio,M.A. and Pearson,A.M. (1977) Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochim.Biophys.Acta*, **490**, 27-34.

Condition	ATPase activities (nmol Pi.mg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )		% Native myosin activity (3 mM GSNO)
	0 GSNO	3 mM GSNO	
K <sup>+</sup> EDTA (3)	1054 ± 80	1089 ± 31	103.7 ± 4.9
Ca <sup>2+</sup> (3)	860 ± 91	860 ± 93	100.1 ± 3.0
Mg <sup>2+</sup> (6)	40 ± 6	29 ± 3.5 *	75.5 ± 9.3 *

**Table 1. GSNO inhibits only Mg<sup>2+</sup> ATPase activity of myosin.** Myosin was incubated with or without GSNO in specific ion buffer for 15 min followed by removing reaction products and excess GSNO by 1 wash (see Methods). Pellets were solubilized in high ionic strength solution (0.6 M KCl; 50 mM imidazol, pH 7). ATPase activity was measured by adding modified myosin to Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> or K<sup>+</sup>EDTA buffer (see Materials and Methods), followed by 3 mM ATP. \* P<0.05 vs. unmodified myosin. x ± s.e. of the number of preparations shown in parentheses in the first column.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. GSNO, but not DEANO, inhibits  $Mg^{2+}$  ATPase activity of myosin.** *A)* Myosin was incubated with GSNO for 15 min (●, ○; n = 6) or 60 min (■; n = 5) or with DEANO for 30 min (▲; n = 3) in  $Mg^{2+}$  buffer at 30°C.  $Mg^{2+}$  ATPase activity was then measured by diluting myosin (1:10) in  $Mg^{2+}$  buffer containing 3 mM ATP (●, ▲, ■), or after removing unreacted GSNO by dilution, centrifugation and solubilization of the pellet (○, see Methods). *B)* Stoichiometry of myosin *S*-nitrosation by GSNO after dilution, centrifugation and solubilization is correlated with the ATPase effect. \* $P < 0.05$  vs activity of the control (100%). The concentrations of GSNO and conditions of the reaction (15 min, removal of the unreacted GSNO) were the same as in (*A*; ○).  $x \pm s.e.$ , n = 6.

**Figure 2. *S*-nitrosation of myosin detected by Western blotting.** Myosin was exposed to GSNO (A), GSH (B) or DEANO (C) followed by electrophoresis for the biotin-switch assay described in Materials and Methods. *A) Top:* Non-reducing SDS-PAGE (10% acrylamide) shows the myosin heavy chain (220 kDa;  $4 \pm 1 \mu g$ ) *S*-nitrosated with GSNO followed by the biotin-switch assay. The protein was stained with Coomassie Blue (CB) and Western blotted (WB) for biotinylation using streptavidin-HRP. In the positive control for biotinylation (PC); MMTS was replaced with DTT, followed by the biotin-switch protocol. *Bottom:* Densitometry was used to quantify the relationship between biotinylated myosin heavy chain determined by Western blotting and protein content quantified by Coomassie blue staining (n = 4),  $x = \pm s.e.$  *B)* Same as in A, but GSH was used as a control for GSNO. *C) Top:* Non-reducing SDS-PAGE (10% acrylamide) shows the myosin heavy chain ( $2 \pm 1 \mu g$ ) exposed to DEANO but otherwise processed as in A. *Bottom:* Densitometry was used to quantify the relationship between biotinylated myosin heavy chain and protein content as in A (n = 2),  $x = \pm s.e.$

**Figure 3. Time-dependence for *S*-nitrosation of myosin after treatment with GSNO.** *Top:* Non-reducing SDS-PAGE (10% acrylamide) shows the myosin heavy chain (220 kDa;  $4 \pm 1 \mu g$ ) *S*-nitrosated with 100  $\mu M$  GSNO up to 120 min, followed by the biotin-switch assay. The protein was stained with Coomassie Blue (CB) and Western blotted (WB) for biotinylation using streptavidin-HRP. In the positive control for biotinylation (PC), MMTS was replaced with DTT, followed by the biotin-switch protocol. In the negative control for *S*-nitrosation

(NC), GSNO was replaced with DTT, followed by the biotin-switch protocol. *Bottom:* Densitometry was used to quantify the relationship between biotinylated myosin heavy chain and protein content as in Fig. 2. \*P<0.05 vs. 0, 15 and 30 min reaction with 100  $\mu$ M GSNO ( $x = \pm$  s.e.,  $n = 3$ ).

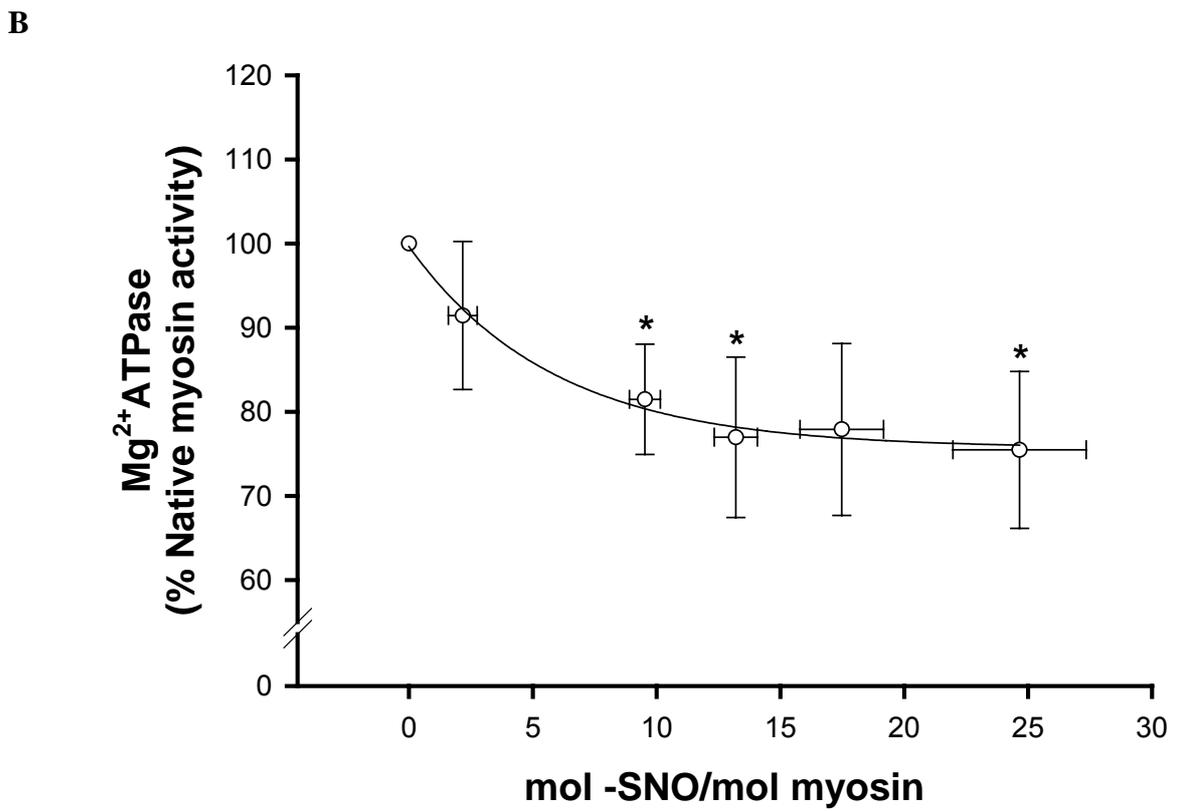
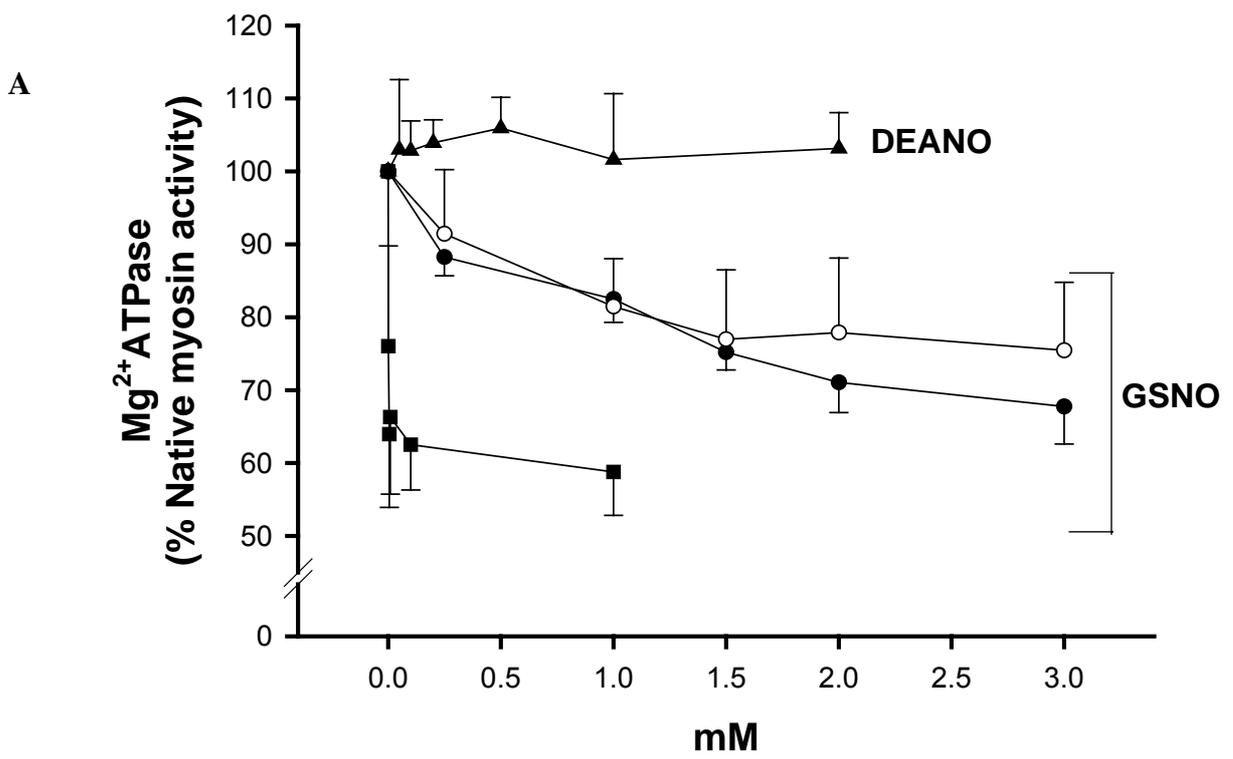
**Figure 4. Myosin can be S-nitrosated on a large number of thiols, but during washing, only a few –SNO bonds remain stable and these do not affect  $Mg^{2+}$ ATPase activity.** *A)* Myosin was reacted with GSNO in  $Mg^{2+}$  buffer for 15 min at 30°C and unreacted GSNO was removed by dilution, centrifugation and solubilization of the pellet (1 – 5 washes, see Figure 1 for details). S-nitrosomyosin content was determined by Saville’s method. *Inset:* Myosin –SNO content after two and five washes normalized to –SNO value in 8 mM GSNO. *B)* Loss of inhibitory effect on  $Mg^{2+}$ ATPase activity by extensive washing. GSNO treatment was followed by 1:10 dilution without washing ( $\bullet$ ,  $n = 3$ ) and either 1 ( $\Delta$ ,  $n = 6$ ), 2 ( $\blacktriangle$ ,  $n = 3$ ) or 5 ( $\square$ ,  $n = 3$ ) washes.  $x = \pm$  s.e.

**Figure 5. The most stable –SNO groups are located in the less available regions of myosin.** Myosin (5 mg/ml) reacted with 1 mM NEM for 30 min at 25°C in  $Mg^{2+}$  buffer to block the most available thiols. The reaction was stopped by adding 10 mM DTT for 5 min. Alkylated ( $\Delta$ ) and non-alkylated ( $\bullet$ ) myosin were purified by extensive dialysis and: *A)* treated with GSNO (0.25 – 8 mM) for 15 min at 30°C followed by 5 washes and measurement of –SNO content by Saville’s method, where \*P<0.05 vs. control at same GSNO concentration ( $n = 3$ ), or *B)* treated with DTNB (0.5 mM) for 2 h in the presence or absence of 2 M GndCl, accompanied by measurement of free –SH content by absorption at 412 nm. In B, \*P<0.05 vs. control or control + GndCl,  $x = \pm$  s.e. ( $n = 3$ ).

**Figure 6. GSNO inhibits the actomyosin ATPase without affecting actin affinity.** *A)* Typical experiment showing actin activation by myosin (2 mg/ml) reacted with 0-8 mM GSNO for 15 min at 30°C followed by two washes. Activation of ATP hydrolysis was measured by adding modified or non-modified myosin (0.1 mg/ml) to a  $Mg^{2+}$  buffer (see Methods) containing 3 mM ATP and actin (0-0.5 mg/ml). The activity of myosin alone was subtracted from each point. The apparent affinity for actin ( $K_m$ , see Methods) was not modified by GSNO ( $21.7 \pm 5.4$  to  $20.9 \pm 7.0$  to  $17.8 \pm 4.0$   $\mu$ g actin/ml for 0, 4 and 8 mM GSNO, respectively,  $P > 0.05$ ). *B)* Effect of GSNO treatment on maximal actin-activation

( $V_{\max}$ ) is significantly reduced from the control value ( $423 \pm 83 \text{ nmol Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) (\* $P < 0.05$ ).  $x = \pm \text{ s.e.}$  ( $n = 3$ ).

**Figure 7. Myosin and actin are the main targets of S-nitrosation in skinned skeletal muscle fibers.** *A)* Quantification of –SNO bonds using Saville/Griess method after treatment of myofibrils with GSNO for 30 min. \* $P < 0.05$  vs. 0 mM GSNO,  $x = \pm \text{ s.e.}$  ( $n = 3$ ). *B)* Non-reducing SDS-PAGE (10% acrylamide) of skinned muscle fiber proteins after biotin-switch assay as described in Methods, stained with Coomassie blue (CB) and Western blot of biotinylated proteins after exposure for 5 min (PC) or 15 min (SF, NC and 0-1 mM GSNO), showing that myosin heavy chain, myosin light chain 2 and actin are preferentially S-nitrosated after reaction with GSNO. Protein identification was based on molecular weight of SigmaMarker™ Wide Range ( $M_r = 6,500 - 205,000$ ) correlated with muscle proteins in skinned fibers [42] and with the mobility of purified myosin, S1, TnI and TnC. *Legend:* MHC, Myosin heavy chain; TnT, Troponin T; TM, Tropomyosin; TnC, Troponin C; MLC 2, Myosin light chain 2; MLC 3, Myosin light chain 3; SF, Proteins extracted from skinned fibers after GSNO treatment without biotin-switch assay; PC, Positive control for biotinylation when GSNO was replaced with DTT followed by the biotin-switch protocol.



**Fig. 1, Nogueira et al.**

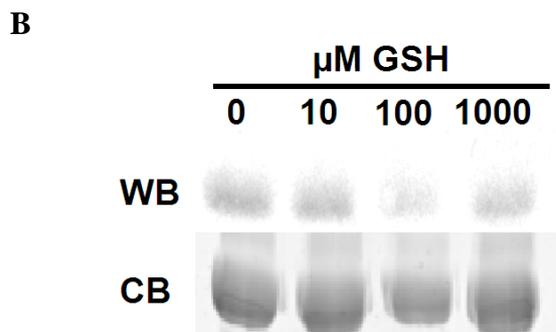
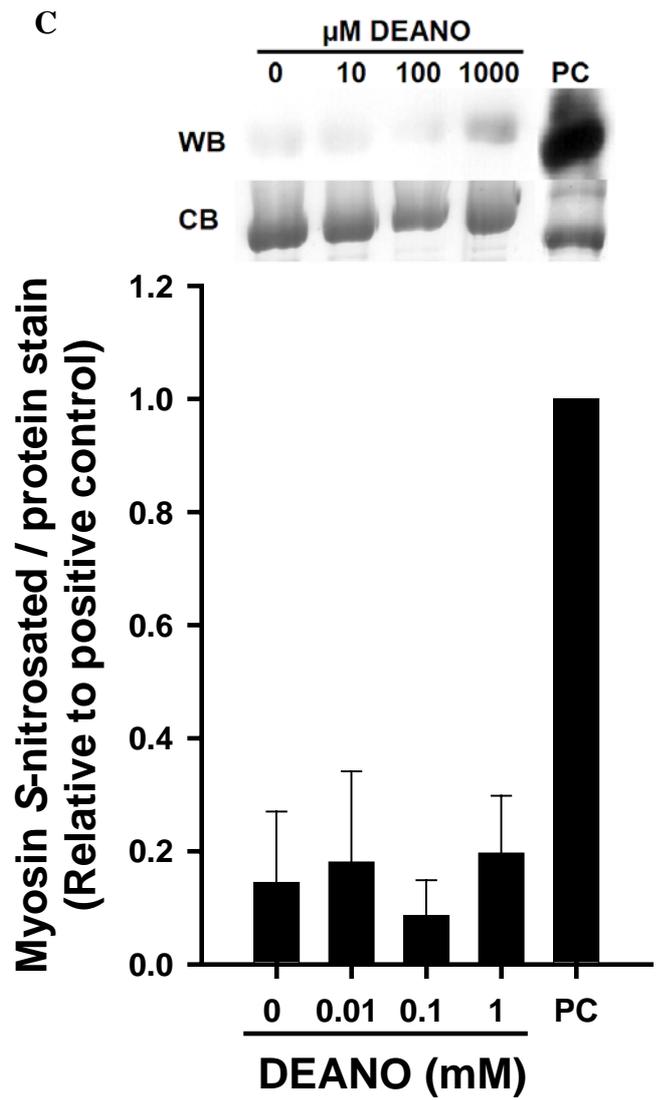
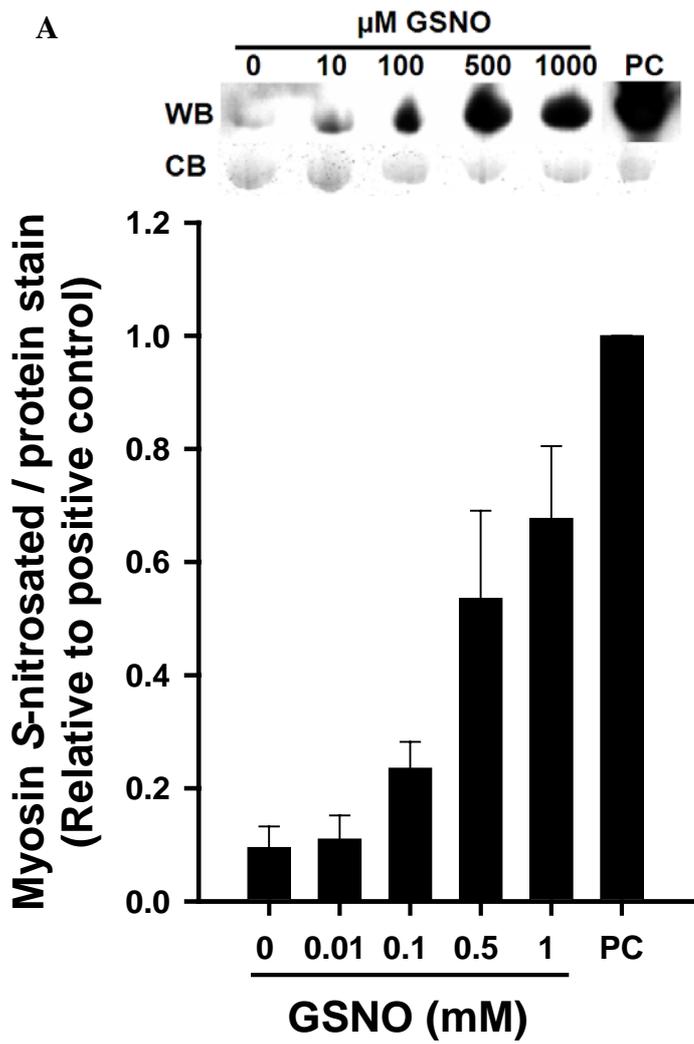


Fig. 2, Nogueira et al.

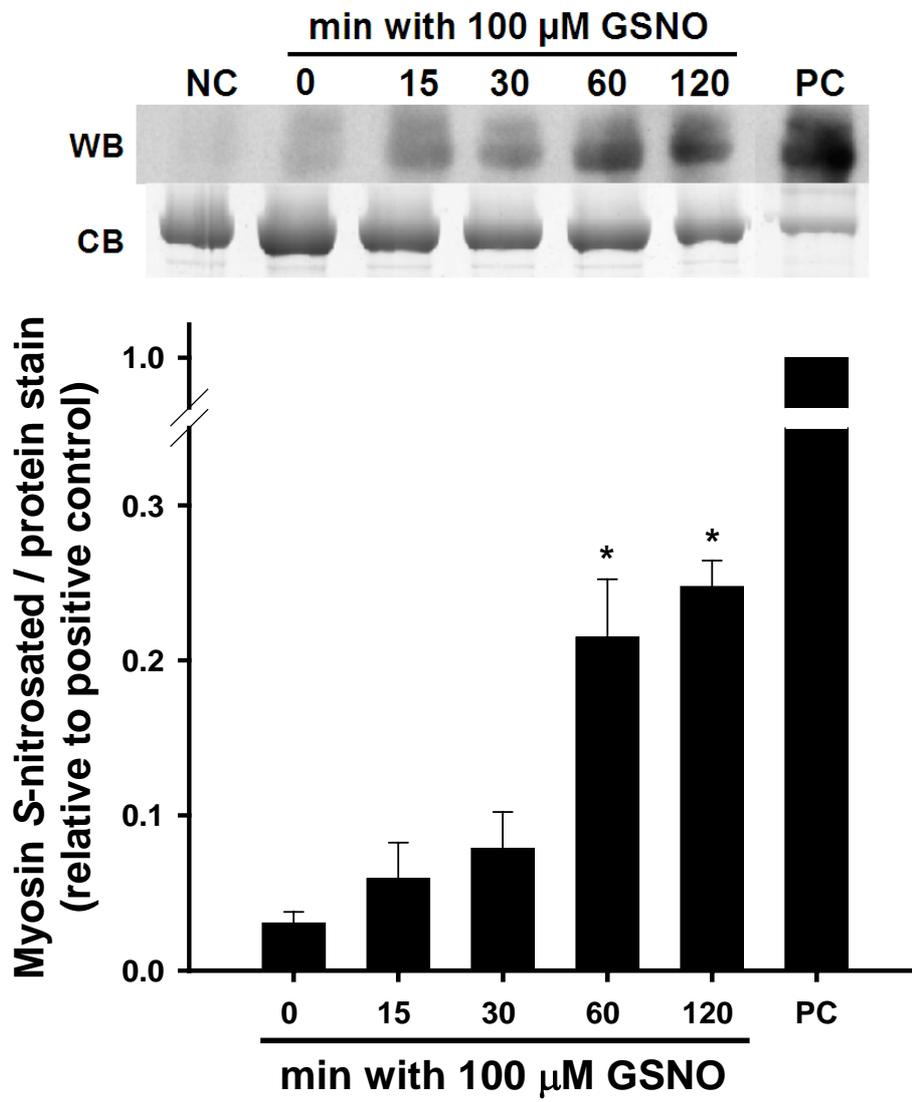
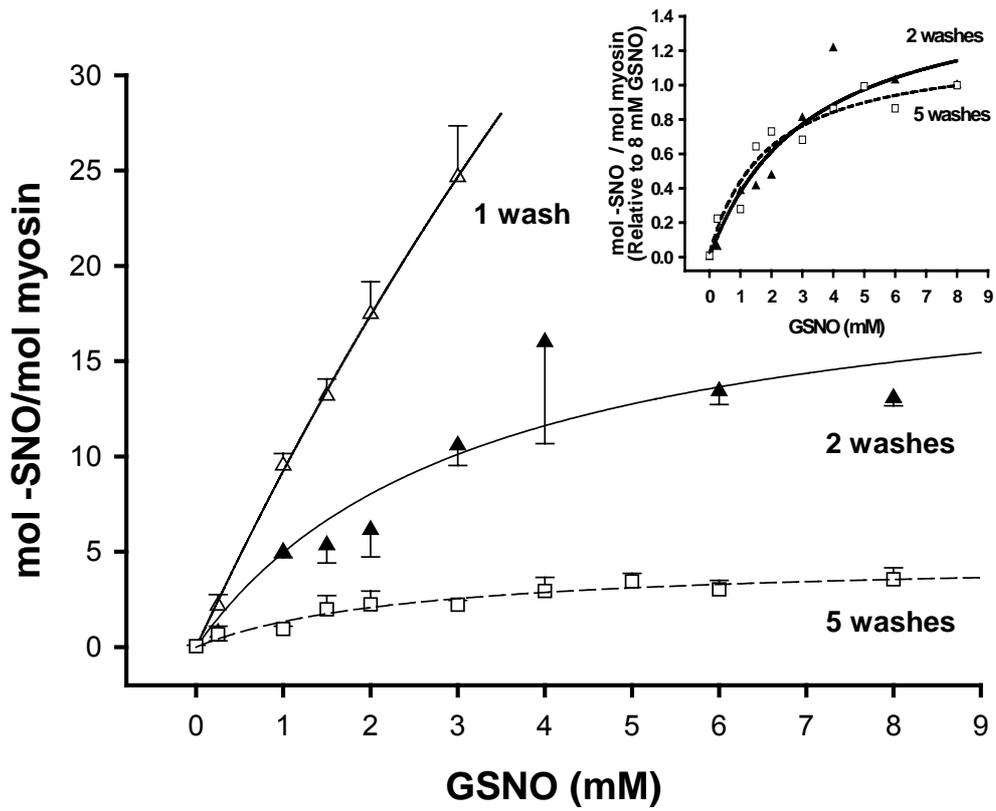


Fig. 3, Nogueira et al.

A



B

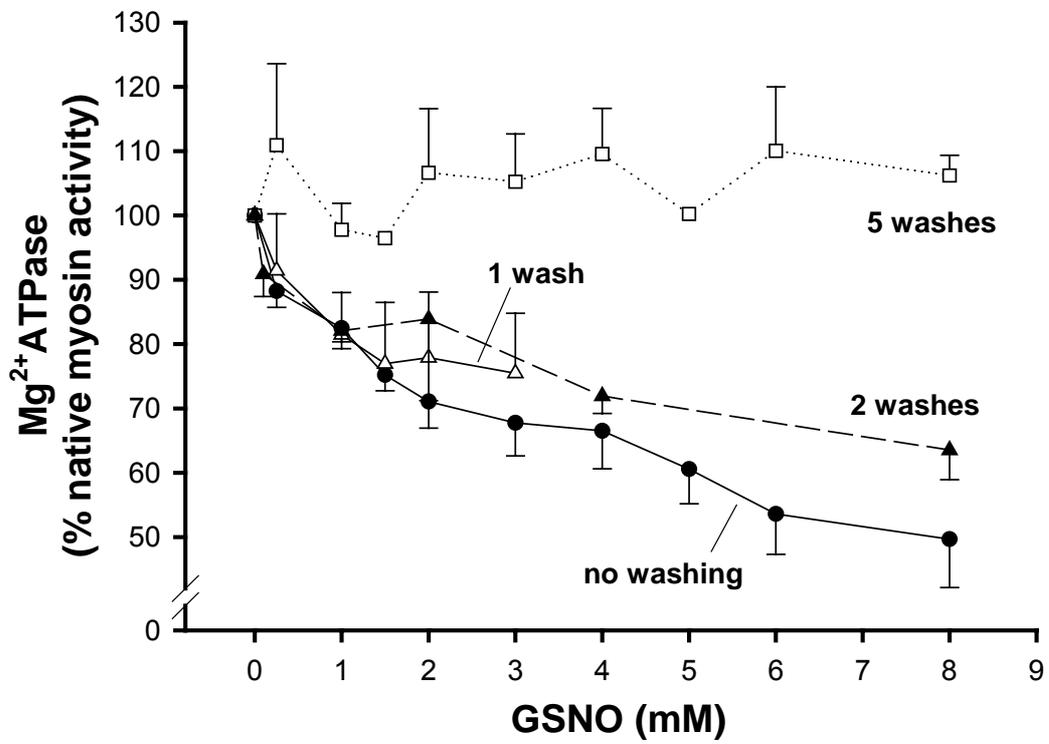
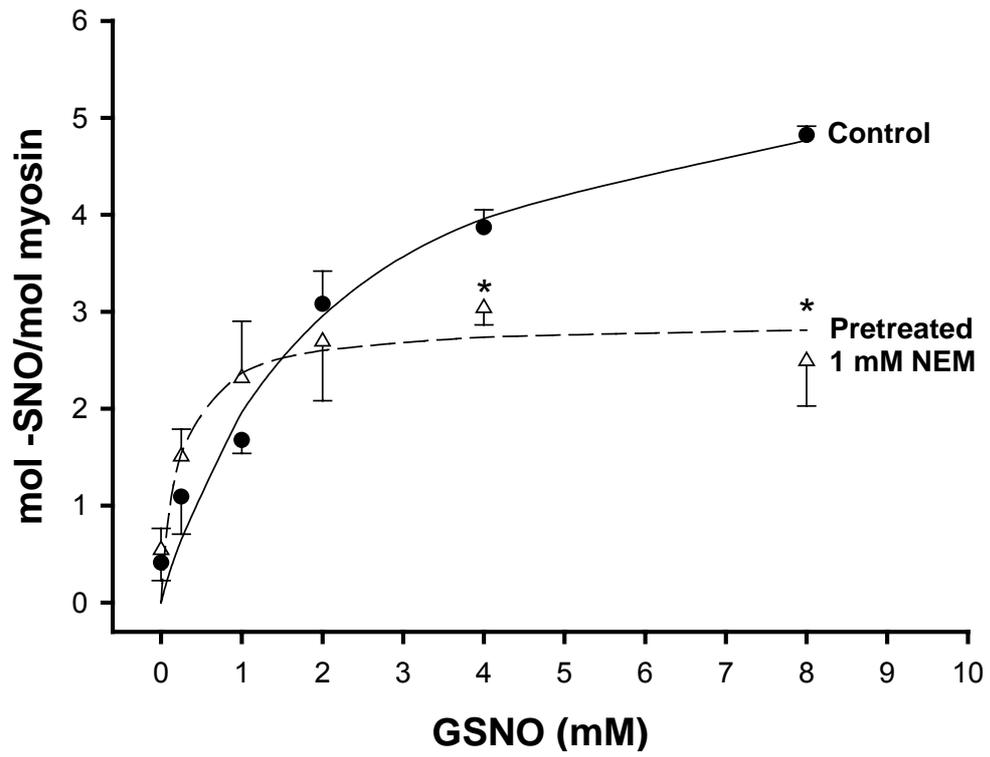


Fig. 4, Nogueira et al.

A



B

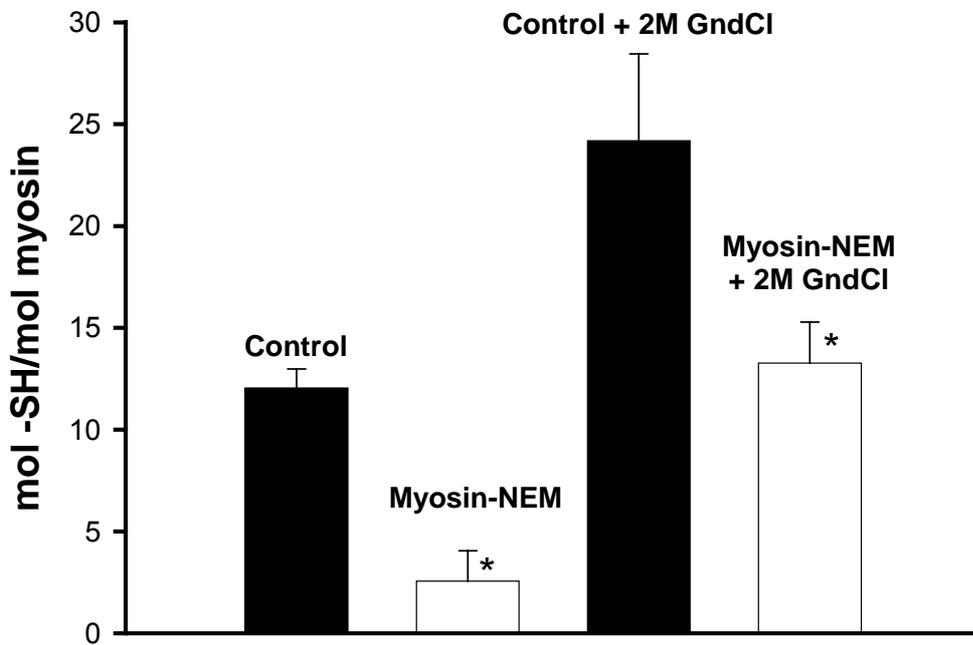
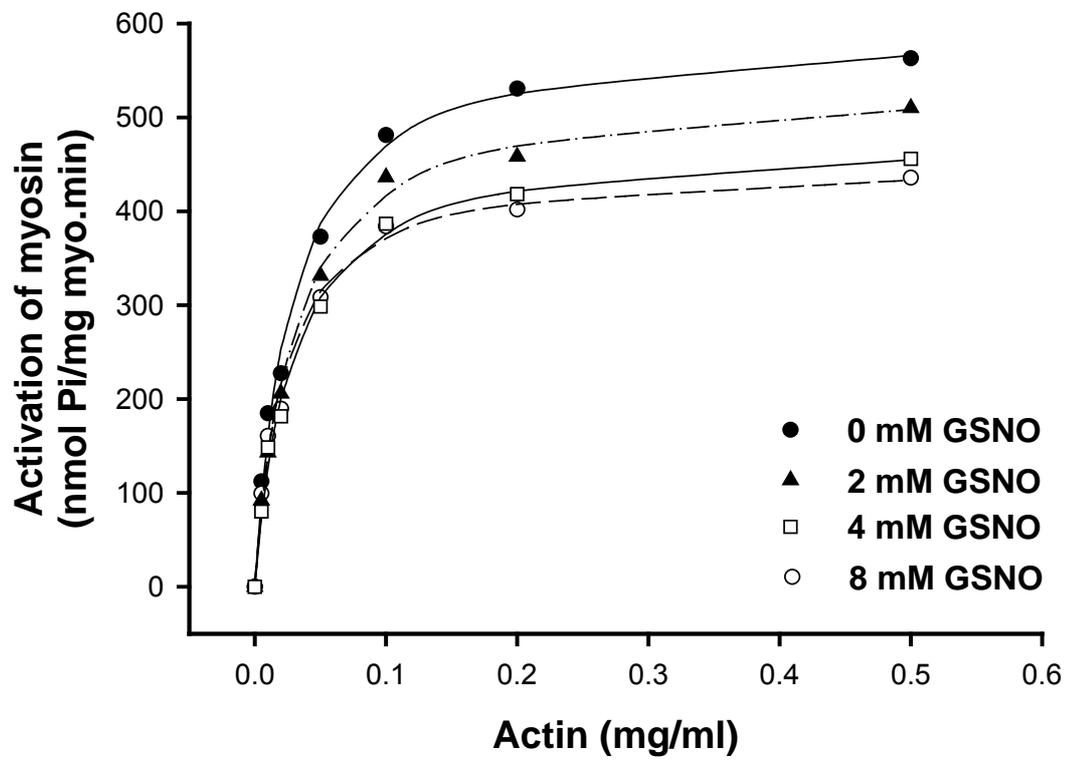


Fig. 5, Nogueira et al.

A



B

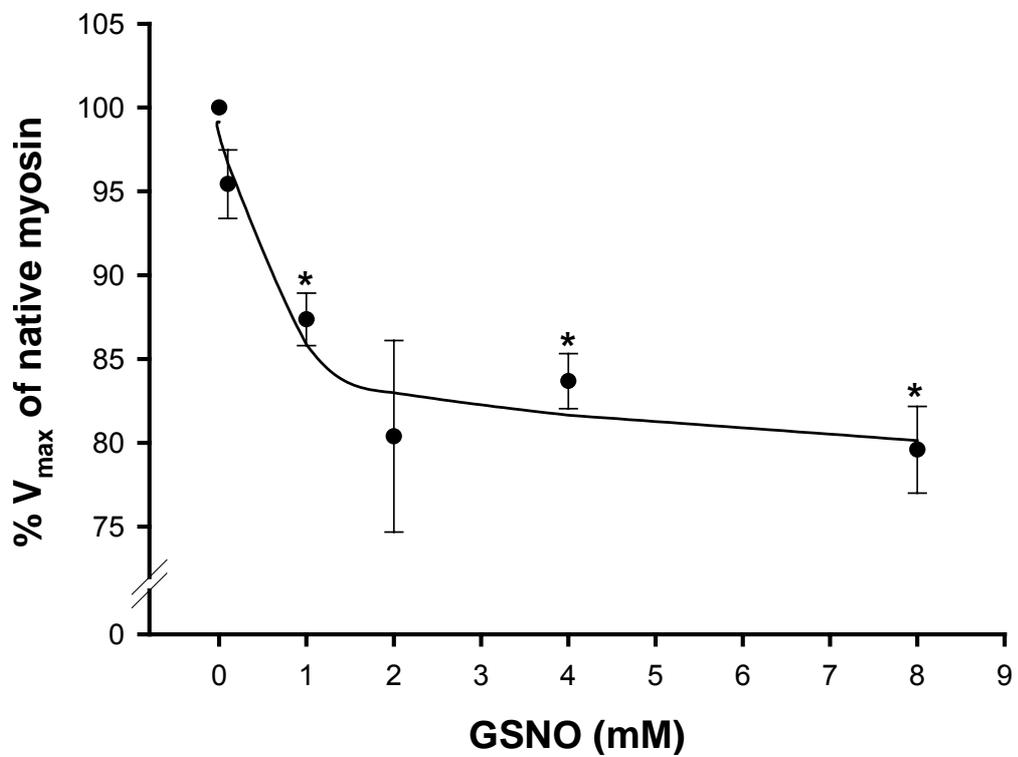
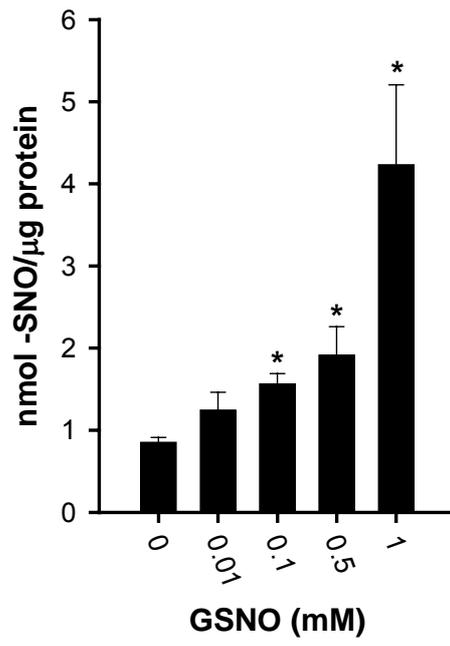


Fig. 6, Nogueira et al.

A



B

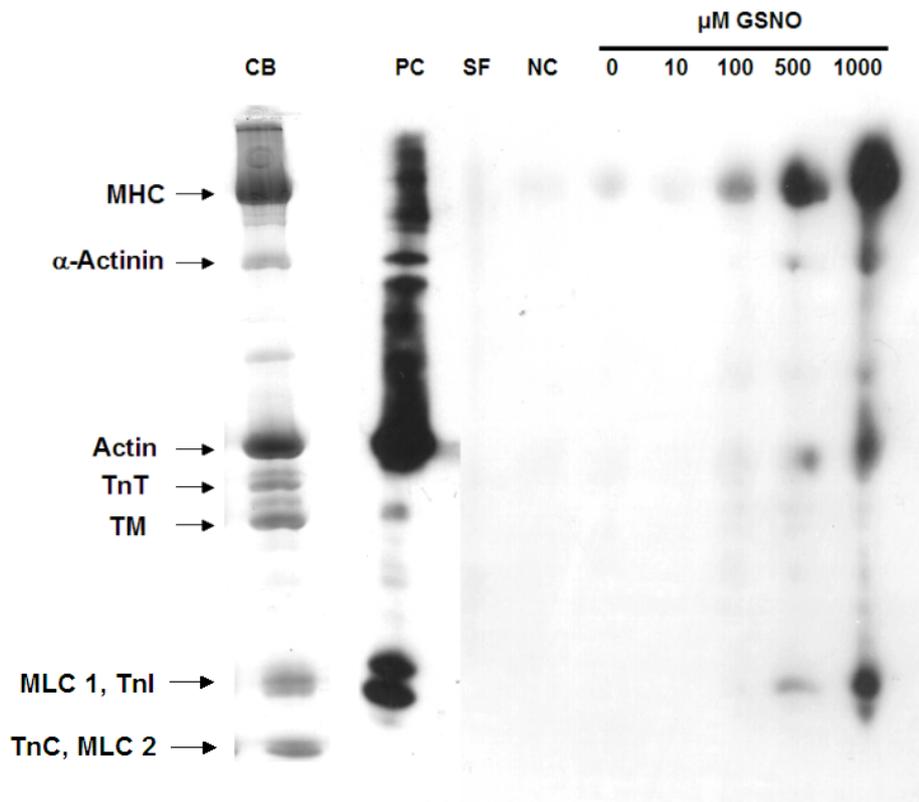


Fig. 7, Nogueira et al.

## VI – Discussão complementar

O trabalho experimental apresentado no artigo em anexo mostra que a S-nitrosação da miosina afeta apenas a atividade  $Mg^{2+}$ ATPásica sem alterar a afinidade por actina. Os efeitos são gerados por modificações em cisteínas que são menos estáveis à S-nitrosação, sendo a instabilidade correlacionada à exposição das cisteínas ao solvente. O mecanismo da S-nitrosação das cisteínas mais expostas ocorre por transnitrosação, ao invés da ação direta do  $NO^{\bullet}$  em solução.

Esta discussão complementar tem como objetivo se aprofundar nas correlações bioquímicas e fisiológicas dos resultados conseguidos nesta tese, além de especular sobre os possíveis mecanismos de S-nitrosação das cisteínas na miosina, que não foram abordados no manuscrito submetido ao periódico, devido às limitações de espaço.

### VI.1. Inibição apenas da atividade $Mg^{2+}$ ATPásica por S-nitrosação

O tratamento com GSNO foi responsável pela inibição na atividade  $Mg^{2+}$ ATPásica da miosina, mas não promoveu inibição das atividades  $K^+$ EDTA e  $Ca^{2+}$ ATPásicas. Importante destacar que o tratamento com GSNO realizado nas três condições iônicas, S-nitrosação foi muito semelhante para cada concentração de GSNO reagido com a miosina, o que não significa que as mesmas cisteínas foram modificadas para cada condição.

Em cada condição iônica ( $Mg^{2+}$  ou  $K^+$ EDTA ou  $Ca^{2+}$ ), a ligação dos íons na miosina promove modificações conformacionais diferentes. A ligação de  $K^+$  na miosina promove aumento da velocidade de hidrólise de ATP, mesmo após o sítio

catalítico estar saturado por  $K^+ATP$  (Seidel, 1969c). Este mecanismo não depende apenas da força iônica promovida pelo aumento da concentração de  $K^+$  no meio, pois quando é trocado  $K^+$  por  $Na^+$  no meio de reação, a atividade ATPásica da miosina é fortemente inibida (Seidel, 1969c). Outra evidência de modificação conformacional promovida por íons, é a produção de diferentes fragmentos durante a proteólise por quimiotripsina na presença de cátions divalentes e monovalentes (Weeds e Taylor, 1975).

A presença de diferentes íons pode então promover alterações conformacionais que modificam a reatividade dos tióis de algumas cisteínas (Watterson et al., 1975). No trabalho de Watterson et al. (1975), NEM foi utilizado como agente alquilante de tióis na presença de cátions divalentes ( $Ca^{2+}$  ou  $Mg^{2+}$ ) ou  $K^+$  sob alta força iônica. Este trabalho mostrou que a presença de cátions divalentes aumenta a reatividade das cisteínas denominadas SH1 e SH2 (que depois foram identificadas como  $Cys^{707}$  e  $Cys^{697}$ , respectivamente) ao NEM, quando comparada à reatividade na presença de  $K^+$  (Watterson et al., 1975). Já para as outras cisteínas que não são denominadas como "essenciais", a reatividade destas ao NEM é aumentada na presença de  $K^+$  (Watterson et al., 1975).

Uma vez que a S-nitrosação da miosina inibe apenas a atividade ATPásica quando a reação ocorre na presença de  $Mg^{2+}$ , possivelmente a disponibilidade dos tióis que promovem esta inibição, pode ser aumentada nesta condição iônica. Entretanto, o conteúdo de S-nitrosotióis após tratamento com 1 mM GSNO, foi o mesmo entre as condições iônicas ( $9.8 \pm 1.6$ ,  $9.4 \pm 1.4$  e  $9.2 \pm 0.6$  mol  $-SNO/mol$  miosina para  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$ , respectivamente). Apesar do número de resíduos S-nitrosados ser o mesmo entre as condições iônicas, a metodologia empregada para determinação de resíduos S-nitrosados (colorimétrica, pelo método de Saville

(1958)) pode não ser sensível o suficiente para detectar uma variação de 1 a 2 mol – SNO/mol miosina (erro experimental). Estes resultados sugerem que o efeito inibitório na atividade possa ter sido promovido por alguns resíduos específicos que são mais reativos à S-nitrosação na presença de  $Mg^{2+}$ , mas indistinguíveis colorimetricamente.

Na presença de  $Mg^{2+}$ , o efeito inibitório é correlacionado com ~ 10 cisteínas S-nitrosadas. Entretanto, após extensiva purificação da miosina para eliminar GSNO contaminante, o número de cisteínas S-nitrosadas é reduzido, enquanto que o efeito inibitório é mantido (Figura 4 do manuscrito), sugerindo que poucos resíduos são responsáveis pelo efeito inibitório quando modificados por S-nitrosação. Estes resultados estão de acordo com a hipótese de Lane et al. (2001), que propõem que muitas proteínas podem ser poli-nitrosadas, mas os efeitos nas funções são associadas a um pequeno número de cisteínas em cada proteína.

## VI.2. Quais são as cisteínas modificadas por S-nitrosação ?

Os efeitos da S-nitrosação da miosina por GSNO são intrigantes, pois os resultados sugerem que as cisteínas 707 e 697 não foram modificadas pelo tratamento com o S-nitrosotiol, ou que a S-nitrosação destas cisteínas não promove alteração funcional. Essa afirmação se deve ao fato que modificações nestas cisteínas por alquilação ou S-tiolação, afetam dramaticamente a atividade ATPásica da miosina (Reisler et al., 1974a). Quando a Cys<sup>707</sup> é modificada, as atividades  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  ATPásicas são significativamente aumentadas e na presença de alto  $K^+$  e EDTA, a atividade é reduzida. Já quando a Cys<sup>697</sup> é modificada, a atividade

ATPásica na presença de ambos os cátions divalentes é inibida (Reisler et al., 1974a).

Os resultados mostram também que o efeito inibitório verificado na atividade actina-ativada, foi muito semelhante ao efeito na miosina na ausência de actina ( $\approx$  25%). Apesar dessa inibição, a miosina não sofre alteração da sua afinidade por actina. Este resultado reforça a hipótese que as Cys<sup>707</sup> e Cys<sup>697</sup> não são alvos de S-nitrosação por GSNO, pois a alquilação destas, aumenta significativamente a afinidade da miosina por actina (Meeusen e Cande, 1979).

As Cys<sup>707</sup> e Cys<sup>697</sup> são reconhecidamente muito reativas, sendo as mais facilmente detectadas no subfragmento 1 por DTNB (Tiago et al., 2006) e por PCMB (Kielley e Bradley, 1956) no estado nativo. A alta reatividade, principalmente da Cys<sup>707</sup>, pode estar relacionada com a presença de resíduos básicos muito próximos (sulfidril da Cys<sup>707</sup> e guanidina da Arg<sup>714</sup>, 6 Å; sulfidril da Cys<sup>697</sup> e imidazol da His<sup>693</sup>, 5.5 Å; estrutura PDB, código 2MYS; Rayment et al. (1993b)). Tais resíduos podem propiciar à desprotonação do tiol e formação de tiolato. Entretanto, estas cisteínas possuem ácidos glutâmicos muito próximos também (sulfidril da Cys<sup>707</sup> e ácido carboxílico da Glu<sup>499</sup>, 6.2 Å; sulfidril da Cys<sup>697</sup> e ácido carboxílico da Glu<sup>180</sup>, 5.5 Å; PDB: 2MYS) que podem promover efeito inverso.

Existem outros aminoácidos reativos, além dos citados acima, como a Cys<sup>522</sup>. Esta cisteína possui um resíduo histidina (His<sup>583</sup>) bastante próximo (4.3 Å), não possui resíduos ácidos próximos e está situada em uma região exposta ao solvente (Rayment et al., 1993b). Apesar da alta reatividade da Cys<sup>522</sup> (Ue, 1987), não existem relatos sobre os efeitos de modificação específica desta cisteína sobre a ATPase da miosina.

Uma possível explicação para os efeitos da S-nitrosação da miosina seria a modificação da Cys<sup>540</sup>. O trabalho de Bertrand et al. (1999) mostrou que a S-tioação específica deste resíduo é capaz de inibir a atividade actina-ativada em 60%, sem alterar a afinidade da miosina pela actina; entretanto, a modificação não afeta as atividades K<sup>+</sup>EDTA e Ca<sup>2+</sup>ATPásicas (Bertrand et al., 1999). A análise da estrutura do S1 em 3D (PDB: 2MYS; Figura 7), mostra que esta cisteína é bastante exposta ao solvente e fica próxima a um resíduo de lisina (Lys<sup>544</sup>) que está situado em uma região pouco estruturada. A exposição desta cisteína poderia conferir propriedade lábil se for S-nitrosada (Hess et al., 2005). Apesar desta cisteína localizar-se próxima à fenda do sítio de ligação com actina, a ausência de efeito sobre a afinidade da miosina por actina, não exclui a possibilidade deste resíduo ser alvo da S-nitrosação induzida por GSNO.

Segundo Stamler et al. (1997), a capacidade das cisteínas sofrerem S-nitrosação parece obedecer a *motifs* específicos, que dependem da presença de aminoácidos vizinhos básicos e ácidos. A disposição destes aminoácidos vizinhos pode permitir a desprotonação do tiol, quando o resíduo for S-nitrosado, ou a protonação do tiol, quando o resíduo for desnitrosado (Stamler et al., 1997).

A enzima metionina adenosiltransferase (MAT) foi utilizada como modelo para estudar a influência de interações iônicas sobre a S-nitrosação de cisteínas (Perez-Mato et al., 1999). Esta enzima possui uma cisteína (Cys<sup>121</sup>) cuja modificação nitrosativa inibe a atividade enzimática. Ao trocar aminoácidos vizinhos de carga positiva ou negativa por aminoácidos sem carga, Pérez-Mato et al (1999) constataram que a S-nitrosação da Cys<sup>121</sup> é altamente inibida. Os autores propuseram que a carga iônica dos aminoácidos ao redor da Cys<sup>121</sup> possa ajudar tanto na desprotonação do tiol, o que aumenta a reatividade da cisteína, quanto na

protonação do S-nitrosotiol, aumentando a sua capacidade de sofrer desnitrosação. Sendo assim, a carga dos aminoácidos vizinhos e sua distância da cisteína (< 6 Å), podem influenciar diretamente na capacidade da cisteína sofrer ataque nitrosativo (Hess et al., 2005).

A modificação de estrutura tridimensional promovida por ligantes também pode influenciar na reatividade das cisteínas, quando estas estão presentes em *motifs* para grupamento nitroso. As diferenças conformacionais na hemoglobina entre os estados de alta (R) e baixa (T) afinidade por O<sub>2</sub> influenciam positivamente e negativamente, respectivamente, na capacidade da Cys<sup>β93</sup> de sofrer S-nitrosação (Stamler et al., 1997). Isso ocorre, pois no estado R, a sulfidrila desta cisteína está próxima do resíduo histidina adjacente, aumentando a S-nitrosação; em contrapartida, no estado T, a sulfidrila se afasta da cadeia lateral da histidina e se aproxima da cadeia lateral do aspartato adjacente a cisteína, aumentando a desnitrosação da cisteína (Stamler et al., 1997).

Os *motifs* para S-nitrosação que podem ser encontrados em diversas proteínas, como explorado por *screening* de muitas proteínas, utilizando para isto base de dados na internet (*Swiss Protein* e *Protein Identification Resource*) (Stamler et al., 1997), obedecem a um consenso de aminoácidos adjacentes à cisteína e compartilham uma estrutura geral xyCz (Broillet, 1999). Nesta estrutura, x pode ser G, S, T, C, Y ou N, y pode ser K, R, H, D ou E e z pode ser D ou E (Broillet, 1999). Segundo este, os elementos mais importantes desta seqüência são os resíduos D e E na posição z.

Comparando essa hipótese com duas proteínas que são S-nitrosadas por GSNO *in vitro* cujos os resíduos modificados já foram identificados (transtiretina, Cys<sup>10</sup>; MAT, Cys<sup>121</sup>; e actina, Cys<sup>374</sup> (Dalle-Donne et al., 2000; Saito et al., 2005)),

verificamos que as cisteínas S-nitrosadas possuem resíduos básicos adjacentes à cisteína e não possuem resíduos ácidos muito próximos, o que poderia aumentar a reatividade deste para S-nitrosação (Tabela 1). Para estas proteínas é importante destacar que as cisteínas referidas estão localizadas em regiões mais expostas na estrutura.

A análise na seqüência primária da cadeia pesada da miosina (Pubmed protein: AAA74199) mostra que das 16 cisteínas presentes em cada cadeia pesada, apenas quatro cisteínas apresentam aminoácidos ácidos adjacentes (Cys<sup>540</sup>, Cys<sup>907</sup>, Cys<sup>949</sup> e Cys<sup>1342</sup>) e seis cisteínas apresentam aminoácidos básicos adjacentes (Cys<sup>697</sup>, Cys<sup>707</sup>, Cys<sup>794</sup>, Cys<sup>907</sup>, Cys<sup>1251</sup> e Cys<sup>1413</sup>), como mostrado na tabela 1. Uma vez que das cisteínas descritas acima na miosina, apenas as cisteínas 540, 697 e 707 estão presentes no domínio motor, este dado sugere que a Cys<sup>540</sup> pode ser um alvo de S-nitrosação, já que os outros dois resíduos não parecem ter sido modificados (como já discutido). Outras características importantes da Cys<sup>540</sup> são: a proximidade com a Lys<sup>544</sup> e a grande exposição desta cisteína na estrutura tridimensional (Figura 7).

Importante destacar que a localização das cisteínas na estrutura tridimensional é dependente da presença de nucleotídeo e da presença dos produtos de hidrólise do ATP no sítio ativo (Rayment et al., 1996). A estrutura cristalográfica do S1 (2MYS), representa um estado semelhante ao estado de "rigor", ou seja, ausência de nucleotídeo (Rayment et al., 1993b). Entretanto, para conseguir formar o cristal, os aminoácidos lisina, histidina, metionina e arginina, foram extensivamente metilados. Sendo assim, essas modificações podem promover pequenas alterações da estrutura nativa da proteína. Estas alterações conformacionais da cabeça da miosina podem modificar a capacidade de formação

de ligações –SNO em cisteínas. Para compreender melhor a capacidade de S-nitrosação e seus efeitos biológicos, é necessário que a S-nitrosação seja estudada no subfragmento 1 da miosina na presença de nucleotídeo no sítio ativo.

O método mais apropriado para identificar as cisteínas que são S-nitrosadas e que influenciam diretamente no efeito inibitório, é a espectrometria de massa. Nesse método é possível determinar com grande precisão a massa de peptídeos que são ionizados e as variações de massa induzidas por modificações químicas, incluindo S-nitrosação (Mirza et al., 1995). Entretanto, existem limitações na utilização dessa técnica para identificar S-nitrosação em proteínas, uma vez que resíduos S-nitrosados podem não ser detectados devido à clivagem redutiva durante o processo de ionização dos peptídeos (Kaneko e Wada, 2003) Outro fator limitante é a identificação da S-nitrosação em proteínas de alto peso molecular, pois a massa adicionada pela S-nitrosação é de 29 Da (Lane et al., 2001).

Como discutido na revisão de literatura, uma das formas de identificar os resíduos S-nitrosados em proteínas é trocar os resíduos –SNO por resíduos –SSbiotina, utilizando o método do *biotin switch* ((Jaffrey e Snyder, 2001), Figura 11). Como os resíduos biotinizados possuem uma estabilidade muito superior aos resíduos S-nitrosados, a proteína pode ser proteolisada e duas metodologias empregadas: identificar os peptídeos biotinizados ou purificar os peptídeos biotinizados por resina estreptavidina-agarose seguido de recuperação dos peptídeos reduzidos por DTT (Hao et al., 2006).

Proteína	Seqüência de aminoácidos adjacentes às cisteínas na estrutura primária
Cadeia pesada da miosina	SGLFC <sup>123</sup> VTVN LKALC <sup>402</sup> YPRV LEQLC <sup>479</sup> INFT DLAAC <sup>522</sup> IELI EEEC <sup>540</sup> MFPK HQLRC <sup>697</sup> NGVL GIRIC <sup>707</sup> RKGF TQAMC <sup>794</sup> RGFL ESIFC <sup>815</sup> IQYN AEERC <sup>907</sup> DQLI LEDEC <sup>949</sup> SELK LEKMC <sup>1251</sup> RTLE ARHDC <sup>1342</sup> DLLR VNAKC <sup>1413</sup> ASLE TNAAC <sup>1441</sup> AALD AEEQC <sup>1891</sup> NINL
Cadeia leve essencial da miosina (LC1)	DSNGC <sup>179</sup> INYE
Cadeia leve essencial da miosina (LC3)	DSNGC <sup>137</sup> INYE
Cadeia leve regulatória da miosina (LC2)	LITQC <sup>129</sup> DRFS YKNIC <sup>158</sup> YVIT
Actina	TALYC <sup>10</sup> DDGS KEKLC <sup>217</sup> YVAL ERFRC <sup>256</sup> PETL SIMKC <sup>284</sup> DIDI VHRKC <sup>374</sup> F
Transtiretina	GDSKC <sup>10</sup> PLMV
Metionina adenosina transferase	VDGLC <sup>9</sup> DHSL PDKIC <sup>35</sup> DQIS AKVAC <sup>57</sup> ETVC <sup>61</sup> KTGM MVLLC <sup>69</sup> GEIT DFKTC <sup>105</sup> NVLV DIAQC <sup>121</sup> VHLD ETEEC <sup>150</sup> MPLT KAGLC <sup>312</sup> RRVL QKTAC <sup>378</sup> YGHF

**Tabela 1.** Lista de aminoácidos vizinhos às cisteínas presentes na estrutura primária de cada proteína. A seqüência de aminoácidos foi extraída do Pubmed protein para cadeia pesada de miosina (AAA74199), cadeias leves da miosina (LC1, P02602; LC2, P24732; LC3, P02603), transtiretina (P07489) e da metionina adenosina transferase (P13444). Para actina, a seqüência primária foi extraída do trabalho de Collins e Elzinga (1975):

Neste trabalho, algumas tentativas foram feitas para identificar os resíduos S-nitrosados na miosina após troca de –SNO por biotina seguido de proteólise extensiva por tripsina. Para isto utilizamos espectrometria de massa MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry*). Essa técnica que tem como princípio básico a interação da proteína ou dos peptídeos com uma matriz que absorve luz visível-UV, seguido de ionização da matriz e dos peptídeos por pulsos a laser de nanosegundos. Os peptídeos ionizados são acelerados em um campo elétrico em um tubo de vôo para determinação da massa da proteína ou peptídeo (Hortin, 2006).

Nas tentativas de identificar resíduos S-nitrosados, vários foram os problemas experimentais que dificultaram o estudo proteômico na miosina. Uma das principais limitações encontradas foi a baixa cobertura da seqüência de peptídeos, principalmente da cadeia pesada da miosina. A cobertura máxima que foi conseguida foi de 24%, que é uma cobertura muito baixa para identificar modificações pós-transducionais em proteínas (Schoneich e Sharov, 2006). Isto pode ser correlacionado ao fato da miosina ser uma proteína de alto peso molecular. Outra limitação encontrada foi a baixa capacidade de identificar peptídeos que contém cisteína tanto na proteína nativa, quando na proteína modificada por biotina nos resíduos cisteína. Para resolver tal questão, é necessário que os peptídeos biotinilados sejam purificados para reduzir o conteúdo total de peptídeos expostos à ionização.

### VI.3. A S-nitrosação por GSNO produz dois grupos de RSNO na miosina

Para correlacionar os efeitos na atividade ATPásica com a S-nitrosação da miosina, quantificamos por método de Saville o número de ligações –SNO na miosina após os procedimentos de lavagem, estes responsáveis por remover o GSNO contaminante. Verificamos que o processo de purificação da miosina é acompanhado da perda do conteúdo de grupamentos –SNO, mas o efeito inibitório so é perdido, quando permanecem ligados apenas 3 a 5 grupamentos –SNO. Estes dados sugerem que a miosina possui dois grupos de RSNO, um grupo mais estável, que não promove efeito inibitório e um grupo de S-nitrosotióis menos estável, estes responsáveis por inibir a atividade da miosina.

Para correlacionar a estabilidade dos S-nitrosotióis da miosina com a acessibilidade das cisteínas na estrutura, decidimos bloquear apenas as cisteínas que são mais reativas no estado nativo da miosina, utilizando para isto NEM. Após o bloqueio, foi verificado que apenas 20% das cisteínas alquiladas são capazes de fazer ligações –SNO estáveis, ou seja, estas cisteínas são pouco acessíveis ao NEM. Uma vez que a alquilação por NEM em muitas proteínas é dependente do desenovelamento protéico (Hubbard e Miller, 1970; Kriauciunas et al., 1991), acreditamos que o NEM foi pouco capaz de bloquear cisteínas presentes em regiões mais hidrofóbicas da miosina. Como em outras proteínas a estabilidade de S-nitrosotióis é maior em regiões hidrofóbicas (Tellez-Sanz et al., 2006; Weichsel et al., 2007), é possível que as cisteínas que possuam ligações –SNO mais estáveis, estejam localizadas em regiões mais hidrofóbicas na miosina. Os resultados também sugerem que os grupamentos –SNO que inibem a ATPase estão mais expostos ao solvente. Da mesma forma que em outras proteínas, cisteínas que são localizadas

em regiões mais expostas ao solvente, tendem a possuir S-nitrosação mais instável (Hess et al., 2005; Weichsel et al., 2007), o que explica a perda do efeito inibitório após perda de grupamentos –SNO pelo procedimento de purificação da miosina.

A perda de grupamentos –SNO durante o processo de purificação, pode estar relacionada com a presença de metais contaminantes que catalizam a decomposição de S-nitrosotióis (Stamler e Toone, 2002). É sugerido que a decomposição redutiva por  $\text{Cu}^+$ , pode produzir como um dos produtos finais, dissulfetos (Stamler e Toone, 2002). Como a miosina não apresenta pontes dissulfeto no seu estado nativo (Buttkus, 1971), somado ao fato que a perda de –SNO recupera a atividade ATPásica da miosina, é pouco provável que sejam formadas pontes dissulfeto intramoleculares ou intermoleculares ou dissulfetos mistos (miosinaS-Sglutaciona).

A instabilidade de muitas ligações –SNO na miosina permite propor que estas modificações possam ser transferidas para outras proteínas, dependendo da proximidade entre as cisteínas. Já foi mostrado que GSNO é capaz de nitrosar a  $\text{Cys}^{374}$  da actina, o que altera sua capacidade de polimerização (Dalle-Donne et al., 2000). Esta cisteína localiza-se no subdomínio 1 da actina, a qual sofre modificações conformacionais após ligação da cabeça da miosina com actina (Eli-Berchoer et al., 2000). Isso significa que as cisteínas presentes na miosina que fazem ligações –SNO instáveis, e que estejam próximas de cisteínas presentes no subdomínio 1 da actina (que contém as  $\text{Cys}^{10}$  e  $\text{Cys}^{374}$ ), podem ser capazes de promover transnitrosação da miosina para a actina.

#### VI.4. Mecanismo de S-nitrosação da miosina

Neste trabalho foram utilizados como agentes S-nitrosantes, dois compostos com características diferentes: GSNO e DEANO. Enquanto GSNO, um S-nitrosotiol fisiológico, é conhecido por promover transferência do grupamento nitroso para outro tiol sem a liberação de NO<sup>•</sup> (Wong et al., 1998), DEANO, um NONOato não fisiológico, é um conhecido doador de NO<sup>•</sup> a pH 7 (Keefer et al., 1996).

Os efeitos inibitórios do GSNO sobre a atividade ATPásica e sua capacidade de promover S-nitrosação na miosina já foram descritos e comentados acima. Entretanto, o tratamento da miosina com DEANO, tanto não promoveu efeito inibitório, quanto foi incapaz de gerar S-nitrosação significativa da miosina. Sabe-se que a reação de NO<sup>•</sup> ou de seus produtos de autooxidação (NO<sub>2</sub><sup>•</sup> e N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) com tióis é lenta (Goldstein e Czapski, 1996). Outros trabalhos mostraram que NONOatos possuem uma fraca capacidade S-nitrosativa em proteínas quando comparados a S-nitrosotióis (Konorev et al., 2000; Yang e Loscalzo, 2005).

De fato, a aumentada produção de NO<sup>•</sup> no meio intracelular aumenta o conteúdo de S-nitrosotióis de baixo peso molecular, como o GSNO (Inoue et al., 1999). A formação do GSNO está associada à livre circulação do GSH no meio intracelular, o que facilita a reação deste com o NO<sup>•</sup> produzido pelas NOS. Isto pode ocorrer pois a velocidade de reação do NO<sup>•</sup> e dos seus produtos de autooxidação com tióis aumenta quando há concentrações milimolares de GSH (Kharitonov et al., 1995). Em fibras musculares esqueléticas, a concentração de GSH varia de 1 a 3 mM (Leeuwenburgh et al., 1994).

A incapacidade do DEANO em inibir a atividade ATPásica da miosina pode ser explicada pela maior afinidade do NO<sup>•</sup> e do O<sub>2</sub> por regiões hidrofóbicas de

proteínas, facilitando a formação de  $N_2O_3$  na vizinhança das cisteínas localizadas nestas regiões (Nedospasov et al., 2000). Como os efeitos da atividade ATPásica estão associados à S-nitrosação de cisteínas localizadas em regiões mais acessíveis ao solvente, é possível que o  $NO^*$  não seja capaz de promover S-nitrosação das mesmas cisteínas que são S-nitrosadas por GSNO.

Os resultados deste trabalho sugerem que a miosina seja um alvo fisiológico de transnitrosação. Sendo assim, para que a miosina seja S-nitrosada em meio fisiológico, é necessário que o  $NO^*$  sintetizado seja capaz de produzir GSNO intracelular.

#### VI.5. GSNO pode ser um agente S-nitrosante fisiológico

Os resultados principais desta tese mostram que o efeito inibitório e a produção de S-nitrosotióis na miosina ocorrem em concentrações superiores às concentrações fisiológicas de GSNO em outros tecidos (Kluge et al., 1997; Ng et al., 2007). Entretanto, o efeito verificado com altas concentrações de GSNO é conseguido com baixo tempo de reação entre miosina e GSNO (15 min). As reações de transnitrosação são dependentes da estabilidade do grupo –SNO doador, da interação do RSNO doador com as cisteínas-alvo e das propriedades químicas que modulam a S-nitrosação das cisteínas protéicas (Mitchell e Marletta, 2005). Quando investigamos os efeitos na atividade da miosina promovidos por concentrações fisiológicas (5  $\mu M$  – 100  $\mu M$ ) de GSNO, podemos verificar que estas inibem a atividade ATPásica quando a miosina é exposta ao GSNO por longos tempos (acima de 60 min). Os efeitos inibitórios enzimáticos foram correlacionados com aumentada S-nitrosação da miosina por 100  $\mu M$  GSNO. Sendo assim, podemos postular que a

exposição prolongada da miosina a concentrações fisiológicas de GSNO seja capaz de promover S-nitrosação nos tióis que afetam a atividade da miosina. Uma vez que não é sabido o conteúdo de GSNO intramuscular, imagina-se que a concentração de GSNO possa aumentar em consequência da alta síntese de NO<sup>\*</sup> durante a contração muscular. Sendo assim, durante a contração muscular, o GSNO poderia agir como um agente S-nitrosante da miosina, promovendo S-nitrosação e consequente inibição da atividade ATPásica.

#### VI.6. Correlação fisiológica da S-nitrosação da miosina com o desempenho muscular

A síntese de NO<sup>\*</sup> muscular é aumentada proporcionalmente à atividade contrátil (Silveira et al., 2003) e este aumento em fibras musculares tem sido relacionado como um dos mecanismos de regulação do desempenho contrátil, seja por regulação do acoplamento excitação-contração, como também por regulação dos sistemas metabólicos de fornecimento de ATP (Marechal e Gailly, 1999). Entretanto, os efeitos da aumentada produção intramuscular de NO<sup>\*</sup> sobre a função das proteínas contráteis foi pouco estudada até o presente momento.

Este trabalho mostra pela primeira vez, os efeitos da S-nitrosação da miosina sobre sua função enzimática. Poucos trabalhos mostram moduladores da atividade da miosina produzidos fisiologicamente; destes destacam-se a inibição por produtos da hidrólise de ATP (Mariano et al., 2001), por glicação (Ramamurthy et al., 2001) e por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Ooizumi e Xiong, 2004; Tiago et al., 2006). Como para outros mecanismos de modulação, a S-nitrosação da miosina pode apresentar característica transitória, dependendo do conteúdo de GSNO

intramuscular. Este efeito pode potencialmente modular a demanda de ATP intramuscular, quando o estresse nitrosativo é aumentado pela contração muscular prolongada. A modulação da demanda de ATP intramuscular pela miosina, faz parte do mecanismo de ativação de vias metabólicas (Astrand et al., 2003).

Além de modular a demanda de ATP intracelular, a S-nitrosação da miosina pode servir como mecanismo de proteção contra a S-nitrosação de outras proteínas musculares, como no caso da creatina cinase, que está presente ligada ao filamento grosso (Bahler et al., 1985) e é inibida por S-nitrosação (Konorev et al., 2000). Este efeito é possível pois a miosina existe em grande abundância em fibras musculares e possui um grande número de cisteínas que podem ser alvo de S-nitrosação durante estresse nitrosativo. Como essa poli-nitrosação não necessariamente interfere na sua função, a miosina pode servir como um "tampão" nitrosativo muscular se o conteúdo de GSNO foi aumentado durante exercício prolongado ou de alta intensidade. O mecanismo de tamponamento de  $\text{NO}^{\bullet}$  pela formação de S-nitrosotióis já foi proposto por (Ribeiro et al., 1993) que mostram a nitroforina sendo capaz de liberar  $\text{NO}^{\bullet}$  no meio, proveniente, em parte, de S-nitrosotióis.

## VII – Conclusões do trabalho

- 1) A atividade  $Mg^{2+}$ ATPásica da miosina é inibida por S-nitrosação promovida por GSNO, mas não é mediada pela ação direta de  $NO^*$  nos grupamentos tióis da miosina;
- 2) O efeito inibitório é provocado pelas ligações –SNO instáveis, pertencentes a cisteínas que são mais acessíveis ao solvente;
- 3) A S-nitrosação da miosina reduz a ativação máxima pela actina, mas não interfere na afinidade da miosina pela actina;
- 4) Em concentrações fisiológicas de GSNO, a miosina é inibida por S-nitrosação, após longo tempo de reação entre miosina e GSNO;
- 5) Em fibras musculares permeabilizadas, tanto a miosina quanto a actina são alvos preferenciais para a S-nitrosação por GSNO.

## VIII – Referências bibliográficas

Alderton, W.K., Cooper, C.E. e Knowles, R.G. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357:593-615.

Almeida, A., Moncada, S. e Bolanos, J.P. 2004. Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nat. Cell Biol.* 6:45-51.

Andrade, F.H., Reid, M.B., Allen, D.G. e Westerblad, H. 1998. Effect of nitric oxide on single skeletal muscle fibres from the mouse. *J. Physiol.* 509:577-586.

Anfinsen, C.B. e Haber, E. 1961. Studies on the reduction and re-formation of protein disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* 236:1361-1363.

Arai, R.J., Masutani, H., Yodoi, J., Debbas, V., Laurindo, F.R., Stern, A. e Monteiro, H.P. 2006. Nitric oxide induces thioredoxin-1 nuclear translocation: possible association with the p21Ras survival pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348:1254-1260.

Arnelle, D.R. e Stamler, J.S. 1995.  $\text{NO}^+$ , NO, and  $\text{NO}^-$  donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Arch. Biochem. Biophys.* 318:279-285.

Astrand, P.O., Rodahl, K., Dahl, H.A. e Stromme, S.B. 2003. *Textbook of Work Physiology: Physiological Bases of Exercise*. 3<sup>a</sup> Ed. Human Kinetics, Champaign, 648 p.

Bahler, M., Wallimann, T. e Eppenberger, H.M. 1985. Myofibrillar M-band proteins represent constituents of native thick filaments, frayed filaments and bare zone assemblages. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 6:783-800.

Balon, T.W. 1998. Role of nitric oxide in contraction induced glucose transport. *Adv. Exp. Med. Biol.* 441:87-95.

Balon, T.W. e Nadler, J.L. 1994. Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations. *J. Appl. Physiol.* 77:2519-2521.

Benesch, R.E. e Benesch, R. 1955. The acid strength of the -SH group in cysteine and related compounds. *J. Am. Chem. Soc.* 77:5877-5881.

Bertrand, R., Capony, J.P., Derancourt, J. e Kassab, R. 1999. Detection of nucleotide- and F-actin-induced movements in the switch II helix of the skeletal myosin using its differential oxidative cleavage mediated by an iron-EDTA complex disulfide-linked to the strong actin binding site. *Biochemistry* 38:11914-11925.

Bertrand, R., Derancourt, J. e Kassab, R. 2000. Fluorescence characterization of structural transitions at the strong actin binding motif in skeletal myosin affinity labeled at cysteine 540 with novel spectroscopic cysteaminylyl mixed disulfides. *Biochemistry* 39:14626-14637.

- Boyer, P.D. 1954. Spectrophotometric study of the reaction of protein sulfhydryl groups with organic mercurials. *J. Am. Chem. Soc.* 76:4331-4337.
- Bremel, R.D. e Weber, A. 1975. Calcium binding to rabbit skeletal myosin under physiological conditions. *Biochim. Biophys. Acta* 376:366-374.
- Brocklehurst, K. 1979. Specific covalent modification of thiols: applications in the study of enzymes and other biomolecules. *Int. J. Biochem.* 10:259-274.
- Broillet, M.C. 1999. S-nitrosylation of proteins. *Cell Mol. Life Sci.* 55:1036-1042.
- Broniowska, K.A., Zhang, Y. e Hogg, N. 2006. Requirement of transmembrane transport for S-nitrosocysteine-dependent modification of intracellular thiols. *J. Biol. Chem.* 281:33835-33841.
- Brooks, S.V. 2003. Current topics for teaching skeletal muscle physiology. *Adv. Physiol. Educ.* 27:171-182.
- Bryan, N.S., Rassaf, T., Maloney, R.E., Rodriguez, C.M., Saijo, F., Rodriguez, J.R. e Feelisch, M. 2004. Cellular targets and mechanisms of nitros(yl)ation: an insight into their nature and kinetics in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:4308-4313.
- Burke, M., Reisler, E. e Harrington, W.F. 1976. Effect of bridging the two essential thiols of myosin on its spectral and actin-binding properties. *Biochemistry* 15:1923-1927.
- Buttkus, H. 1971. The sulfhydryl content of rabbit and trout myosins in relation to protein stability. *Can. J. Biochem.* 49:97-107.
- Carballal, S., Radi, R., Kirk, M.C., Barnes, S., Freeman, B.A. e Alvarez, B. 2003. Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Biochemistry* 42:9906-9914.
- Cary, S.P., Winger, J.A., Derbyshire, E.R. e Marletta, M.A. 2006. Nitric oxide signaling: no longer simply on or off. *Trends Biochem. Sci.* 31:231-239.
- Chappell, J.B. e Perry, S.V. 1955. The stimulation of the adenosinetriphosphatase activities of myofibrils and L-myosin by 2:4-dinitrophenol. *Biochim. Biophys. Acta* 16:285-287.
- Collins, J.H. e Elzinga, M. 1975. The primary structure of actin from rabbit skeletal muscle. Completion and analysis of the amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* 250:5915-5920.
- Cook, J.A., Kim, S.Y., Teague, D., Krishna, M.C., Pacelli, R., Mitchell, J.B., Vodovotz, Y., Nims, R.W., Christodoulou, D., Miles, A.M., Grisham, M.B. e Wink, D.A. 1996. Convenient colorimetric and fluorometric assays for S-nitrosothiols. *Anal. Biochem.* 238:150-158.
- Cooke, R. 1997. Actomyosin interaction in striated muscle. *Physiol. Rev.* 77:671-697.

- Costa,L.S., Silva,A.P.P., Nogueira,L., Sorenson,M.M. e Sola-Penna,M. 2005. Putative effects of nitric oxide on skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase regulation. *XXXIV Reunião Anual da SBBq* 66.
- Dalle-Donne,I., Milzani,A., Giustarini,D., Di Simplicio,P., Colombo,R. e Rossi,R. 2000. S-NO-actin: S-nitrosylation kinetics and the effect on isolated vascular smooth muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 21:171-181.
- Davies,K.J., Quintanilha,A.T., Brooks,G.A. e Packer,L. 1982. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107:1198-1205.
- DeMaster,E.G., Quast,B.J., Redfern,B. e Nagasawa,H.T. 1995. Reaction of nitric oxide with the free sulfhydryl group of human serum albumin yields a sulfenic acid and nitrous oxide. *Biochemistry* 34:11494-11499.
- Duke,J., Takashi,R., Ue,K. e Morales,M.F. 1976. Reciprocal reactivities of specific thiols when actin binds to myosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73:302-306.
- Eastwood,A.B., Wood,D.S., Bock,K.L. e Sorenson,M.M. 1979. Chemically skinned mammalian skeletal muscle. I. The structure of skinned rabbit psoas. *Tissue Cell* 11:553-566.
- Eli-Berchoer,L., Reisler,E. e Muhlrad,A. 2000. Structural implications of the chemical modification of Cys<sup>10</sup> on actin. *Biophys. J.* 78:1482-1489.
- Ellman,G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82:70-77.
- Elzinga,M. e Collins,J.H. 1977. Amino acid sequence of a myosin fragment that contains SH-1, SH-2, and Ntau-methylhistidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74:4281-4284.
- Eu,J.P., Sun,J., Xu,L., Stamler,J.S. e Meissner,G. 2000. The skeletal muscle calcium release channel: coupled O<sub>2</sub> sensor and NO signaling functions. *Cell* 102:499-509.
- Fernandes,D.C., Medinas,D.B., Alves,M.J. e Augusto,O. 2005. Tempol diverts peroxyxynitrite/carbon dioxide reactivity toward albumin and cells from protein-tyrosine nitration to protein-cysteine nitrosation. *Free Radic. Biol. Med.* 38:189-200.
- Forrester,M.T., Foster,M.W. e Stamler,J.S. 2007. Assessment and application of the biotin switch technique for examining protein S-nitrosylation under conditions of pharmacologically induced oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 282:13977-13983.
- Fujii,Y., Guo,Y. e Hussain,S.N. 1998. Regulation of nitric oxide production in response to skeletal muscle activation. *J. Appl. Physiol.* 85:2330-2336.
- Galler,S., Hilber,K. e Gobesberger,A. 1997. Effects of nitric oxide on force-generating proteins of skeletal muscle. *Pflugers Arch.* 434:242-245.
- Gaston,B., Reilly,J., Drazen,J.M., Fackler,J., Ramdev,P., Arnelle,D., Mullins,M.E., Sugarbaker,D.J., Chee,C., Singel,D.J., Loscalzo,J. e Stamler,J.S. 1993. Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:10957-10961.

- Gaudiot,N., C.Ribiere, A.M.Jaubert, e Y.Giudicelli. 2000. Endogenous nitric oxide is implicated in the regulation of lipolysis through antioxidant-related effect. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279:C1603-C1610.
- Gergel',D. e Cederbaum,A.I. 1997. Interaction of nitric oxide with 2-thio-5-nitrobenzoic acid: implications for the determination of free sulfhydryl groups by Ellman's reagent. *Arch. Biochem. Biophys.* 347:282-288.
- Goldstein,S. e Czapski,G. 1996. Mechanism of the nitrosation of thiols and amines by oxygenated NO solutions: the nature of the nitrosating intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* 118:3419-3425.
- Gordon,A.M., Regnier,M. e Homsher,E. 2001. Skeletal and cardiac muscle contractile activation: tropomyosin "rocks and rolls". *News Physiol. Sci.* 16:49-55.
- Gornall,A.G., Bardawill,C.J. e David,M.M. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177:751-766.
- Greenstein,J.P. e Edsall,J.T. 1940. The effect of denaturing agents on myosin. I. Sulfhydryl groups as estimated by porphyrin titration. *J. Biol. Chem.* 133:397-408.
- Gregory,J.D. 1955. The stability of *N*-ethylmaleimide and its reaction with sulfhydryl groups. *J. Am. Chem. Soc.* 77:3922-3923.
- Greville,G.D. e Needham,D.M. 1955. Effect of 2,4-dinitrophenol and phenylmercuric acetate on enzymic activity of myosin. *Biochim. Biophys. Acta* 16:284-285.
- Grubmeyer,C. e Penefsky,H.S. 1981. Cooperatively between catalytic sites in the mechanism of action of beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 256:3728-3734.
- Hallett,P., Offer,G. e Miles,M.J. 1995. Atomic force microscopy of the myosin molecule. *Biophys. J.* 68:1604-1606.
- Hao,G., Derakhshan,B., Shi,L., Campagne,F. e Gross,S.S. 2006. SNOSID, a proteomic method for identification of cysteine S-nitrosylation sites in complex protein mixtures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:1012-1017.
- Hernandez,O.M., Jones,M., Guzman,G. e Szczesna-Cordary,D. 2007. Myosin essential light chain in health and disease. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292:H1643-H1654.
- Hess,D.T., Matsumoto,A., Kim,S.O., Marshall,H.E. e Stamler,J.S. 2005. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:150-166.
- Heunks,L.M., Cody,M.J., Geiger,P.C., Dekhuijzen,P.N. e Sieck,G.C. 2001a. Nitric oxide impairs  $Ca^{2+}$  activation and slows cross-bridge cycling kinetics in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 91:2233-2239.
- Heunks,L.M., Machiels,H.A., Dekhuijzen,P.N., Prakash,Y.S. e Sieck,G.C. 2001b. Nitric oxide affects sarcoplasmic calcium release in skeletal myotubes. *J. Appl. Physiol.* 91:2117-2124.

- Hogg,N. 2000. Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols. *Free Radic. Biol. Med.* 28:1478-1486.
- Hogg,N., Singh,R.J. e Kalyanaraman,B. 1996. The role of glutathione in the transport and catabolism of nitric oxide. *FEBS Lett.* 382:223-228.
- Hortin,G.L. 2006. The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome. *Clin. Chem.* 52:1223-1237.
- Hubbard,J.S. e Miller,A.B. 1970. Nature of the inactivation of the isocitrate dehydrogenase from an obligate halophile. *J. Bacteriol.* 102:677-681.
- Ignarro,L.J., Buga,G.M., Wood,K.S., Byrns,R.E. e Chaudhuri,G. 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:9265-9269.
- Ignarro,L.J., Bush,P.A., Buga,G.M., Wood,K.S., Fukuto,J.M. e Rajfer,J. 1990. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170:843-850.
- Inoue,K., Akaike,T., Miyamoto,Y., Okamoto,T., Sawa,T., Otagiri,M., Suzuki,S., Yoshimura,T. e Maeda,H. 1999. Nitrosothiol formation catalyzed by ceruloplasmin. Implication for cytoprotective mechanism in vivo. *J. Biol. Chem.* 274:27069-27075.
- Ishii,T., Sunami,O., Nakajima,H., Nishio,H., Takeuchi,T. e Hata,F. 1999. Critical role of sulfenic acid formation of thiols in the inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by nitric oxide. *Biochem. Pharmacol.* 58:133-143.
- Jaffrey,S.R., Erdjument-Bromage,H., Ferris,C.D., Tempst,P. e Snyder,S.H. 2001. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat. Cell Biol.* 3:193-197.
- Jaffrey,S.R. e Snyder,S.H. 2001. The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Sci. STKE.* L1:1-9.
- Jenkins,J.L. e Tanner,J.J. 2006. High-resolution structure of human D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 62:290-301.
- Jourd'heuil,D., Jourd'heuil,F.L. e Feelisch,M. 2003. Oxidation and nitrosation of thiols at low micromolar exposure to nitric oxide. Evidence for a free radical mechanism. *J. Biol. Chem.* 278:15720-15726.
- Kalckar,H.M. 1969. *Biological phosphorylations: development of concepts.* Prentice-Hall, New Jersey, 735 p.
- Kaneko,R. e Wada,Y. 2003. Decomposition of protein nitrosothiols in matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 38:526-530.
- Kay,J. 1978. Intracellular protein degradation. *Biochem. Soc. Trans* 6:789-797.

- Keefer, L.K., Nims, R.W., Davies, K.M. e Wink, D.A. 1996. "NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms. *Methods Enzymol.* 268:281-293.
- Kettenhofen, N.J., Broniowska, K.A., Keszler, A., Zhang, Y. e Hogg, N. 2007. Proteomic methods for analysis of S-nitrosation. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 851:152-159.
- Kharitonov, V.G., Sundquist, A.R. e Sharma, V.S. 1994. Kinetics of nitric oxide autoxidation in aqueous solution. *J. Biol. Chem.* 269:5881-5883.
- Kharitonov, V.G., Sundquist, A.R. e Sharma, V.S. 1995. Kinetics of nitrosation of thiols by nitric oxide in the presence of oxygen. *J. Biol. Chem.* 270:28158-28164.
- Kielley, W.W. 1964. The biochemistry of muscle. *Annu. Rev. Biochem.* 33:403-430.
- Kielley, W.W. e Bradley, L.B. 1956. The relationship between sulfhydryl groups and the activation of myosin adenosinetriphosphatase. *J. Biol. Chem.* 218:653-659.
- Kluge, I., Gutteck-Amsler, U., Zollinger, M. e Do, K.Q. 1997. S-nitrosoglutathione in rat cerebellum: identification and quantification by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Neurochem.* 69:2599-2607.
- Knowles, R.G. e Moncada, S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* 298:249-258.
- Kobzik, L., Reid, M.B., Bredt, D.S. e Stamler, J.S. 1994. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 372:546-548.
- Kobzik, L., Stringer, B., Balligand, J.L., Reid, M.B. e Stamler, J.S. 1995. Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211:375-381.
- Konorev, E.A., Kalyanaraman, B. e Hogg, N. 2000. Modification of creatine kinase by S-nitrosothiols: S-nitrosation vs. S-thiolation. *Free Radic. Biol. Med.* 28:1671-1678.
- Kriauciunas, A., Frolik, C.A., Hassell, T.C., Skatrud, P.L., Johnson, M.G., Holbrook, N.L. e Chen, V.J. 1991. The functional role of cysteines in isopenicillin N synthase. Correlation of cysteine reactivities toward sulfhydryl reagents with kinetic properties of cysteine mutants. *J. Biol. Chem.* 266:11779-11788.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lane, P., Hao, G. e Gross, S.S. 2001. S-nitrosylation is emerging as a specific and fundamental posttranslational protein modification: head-to-head comparison with O-phosphorylation. *Sci. STKE.* RE1:1-9.
- Leeuwenburgh, C., Fiebig, R., Chandwaney, R. e Ji, L.L. 1994. Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. *Am. J. Physiol.* 267:R439-R445.

- Lowey,S., Slayter,H.S., Weeds,A.G. e Baker,H. 1969. Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J. Mol. Biol.* 42:1-29.
- Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L. e Randall,R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Lund,S., Holman,G.D., Schmitz,O. e Pedersen,O. 1995. Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:5817-5821.
- Lymn,R.W. e Taylor,E.W. 1970. Transient state phosphate production in the hydrolysis of nucleoside triphosphates by myosin. *Biochemistry* 9:2975-2983.
- Lymn,R.W. e Taylor,E.W. 1971. Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry* 10:4617-4624.
- Mannick,J.B., Hausladen,A., Liu,L., Hess,D.T., Zeng,M., Miao,Q.X., Kane,L.S., Gow,A.J. e Stamler,J.S. 1999. Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* 284:651-654.
- Marechal,G. e Gailly,P. 1999. Effects of nitric oxide on the contraction of skeletal muscle. *Cell Mol. Life Sci.* 55:1088-1102.
- Mariano,A.C., Alexandre,G.M., Silva,L.C., Romeiro,A., Cameron,L.C., Chen,Y., Chase,P.B. e Sorenson,M.M. 2001. Dimethyl sulphoxide enhances the effects of P(i) in myofibrils and inhibits the activity of rabbit skeletal muscle contractile proteins. *Biochem. J.* 358:627-636.
- Meeusen,R.L. e Cande,W.Z. 1979. N-ethylmaleimide-modified heavy meromyosin. A probe for actomyosin interactions. *J. Cell Biol.* 82:57-65.
- Miersch,S. e Mutus,B. 2005. Protein S-nitrosation: biochemistry and characterization of protein thiol-NO interactions as cellular signals. *Clin. Biochem.* 38:777-791.
- Mirza,U.A., Chait,B.T. e Lander,H.M. 1995. Monitoring reactions of nitric oxide with peptides and proteins by electrospray ionization-mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 270:17185-17188.
- Mitchell,D.A. e Marletta,M.A. 2005. Thioredoxin catalyzes the S-nitrosation of the caspase-3 active site cysteine. *Nat. Chem. Biol.* 1:154-158.
- Mitchell,D.A., Morton,S.U., Fernhoff,N.B. e Marletta,M.A. 2007. Thioredoxin is required for S-nitrosation of procaspase-3 and the inhibition of apoptosis in Jurkat cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:11609-11614.
- Mohr,S., Stamler,J.S. e Brune,B. 1996. Posttranslational modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by S-nitrosylation and subsequent NADH attachment. *J. Biol. Chem.* 271:4209-4214.
- Moncada,S. e Bolanos,J.P. 2006. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. *J. Neurochem.* 97:1676-1689.

- Mornet,D., Ue,K. e Morales,M.F. 1985. Stabilization of a primary loop in myosin subfragment 1 with a fluorescent crosslinker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:1658-1662.
- Nakane,M., Schmidt,H.H., Pollock,J.S., Forstermann,U. e Murad,F. 1993. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett.* 316:175-180.
- Nedospasov,A., Rafikov,R., Beda,N. e Nudler,E. 2000. An autocatalytic mechanism of protein nitrosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:13543-13548.
- Nelson,D.L. e Cox,M.M. 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4<sup>a</sup> Ed. Worth Publishers, New York, 1119 p.
- Netto,L.E., de Oliveira,M.A., Monteiro,G., Demasi,A.P., Cussiol,J.R., Discola,K.F., Demasi,M., Silva,G.M., Alves,S.V., Faria,V.G. e Horta,B.B. 2007. Reactive cysteine in proteins: protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more. *Comp Biochem. Physiol C. Toxicol. Pharmacol.* 146:180-193.
- Ng,E.S., Cheng,Z.J., Ellis,A., Ding,H., Jiang,Y., Li,Y., Hollenberg,M.D. e Triggle,C.R. 2007. Nitrosothiol stores in vascular tissue: modulation by ultraviolet light, acetylcholine and ionomycin. *Eur. J. Pharmacol.* 560:183-192.
- Nitao,L.K. e Reisler,E. 1998. Probing the conformational states of the SH1-SH2 helix in myosin: a cross-linking approach. *Biochemistry* 37:16704-16710.
- Offer,G., Baker,H. e Baker,L. 1972. Interaction of monomeric and polymeric actin with myosin subfragment 1. *J. Mol. Biol.* 66:435-444.
- Okamoto,Y. e Sekine,T. 1987. A new, smaller actin-activatable myosin subfragment 1 which lacks the 20-kDa, SH1 and SH2 peptide. *J. Biol. Chem.* 262:7951-7954.
- Ooizumi,T. e Xiong,Y.L. 2004. Biochemical susceptibility of myosin in chicken myofibrils subjected to hydroxyl radical oxidizing systems. *J. Agric. Food Chem.* 52:4303-4307.
- Pardee,J.D. e Spudich,J.A. 1982. Purification of muscle actin. *Methods Enzymol.* 85:164-181.
- Penforis,P. e Marette,A. 2005. Inducible nitric oxide synthase modulates lipolysis in adipocytes. *J. Lipid Res.* 46:135-142.
- Perez-Mato,I., Castro,C., Ruiz,F.A., Corrales,F.J. e Mato,J.M. 1999. Methionine adenosyltransferase S-nitrosylation is regulated by the basic and acidic amino acids surrounding the target thiol. *J. Biol. Chem.* 274:17075-17079.
- Perkins,W.J., Han,Y.S. e Sieck,G.C. 1997. Skeletal muscle force and actomyosin ATPase activity reduced by nitric oxide donor. *J. Appl. Physiol.* 83:1326-1332.
- Perry,S.V. 1996. *Molecular Mechanisms in Striated Muscle*. Cambridge University Press, Cambridge, 168 p.

- Pliszka,B. e Lu,R.C. 1985. Reactivities of thiols in myosin rod: effect of magnesium and ionic strength. *Biochim. Biophys. Acta* 830:304-312.
- Ramamurthy,B., Hook,P., Jones,A.D. e Larsson,L. 2001. Changes in myosin structure and function in response to glycation. *FASEB J.* 15:2415-2422.
- Rayment,I. 1996. The structural basis of the myosin ATPase activity. *J. Biol. Chem.* 271:15850-15853.
- Rayment,I., Holden,H.M., Whittaker,M., Yohn,C.B., Lorenz,M., Holmes,K.C. e Milligan,R.A. 1993a. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* 261:58-65.
- Rayment,I., Rypniewski,W.R., Schmidt-Base,K., Smith,R., Tomchick,D.R., Benning,M.M., Winkelmann,D.A., Wesenberg,G. e Holden,H.M. 1993b. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* 261:50-58.
- Rayment,I., Smith,C. e Yount,R.G. 1996. The active site of myosin. *Annu. Rev. Physiol.* 58:671-702.
- Reiser,P.J., Kline,W.O. e Vaghy,P.L. 1997. Induction of neuronal type nitric oxide synthase in skeletal muscle by chronic electrical stimulation in vivo. *J. Appl. Physiol.* 82:1250-1255.
- Reisler,E. 1982. Sulfhydryl modification and labeling of myosin. *Methods Enzymol.* 85 Pt B:84-93.
- Reisler,E., Burke,M. e Harrington,W.F. 1974a. Cooperative role of two sulfhydryl groups in myosin adenosine triphosphatase. *Biochemistry* 13:2014-2022.
- Reisler,E., Burke,M., Himmelfarb,S. e Harrington,W.F. 1974b. Spatial proximity of the two essential sulfhydryl groups of myosin. *Biochemistry* 13:3837-3840.
- Ribeiro,A.S., Salerno,V.P. e Sorenson,M.M. 2005. Probing actomyosin interactions with 2,4-dinitrophenol. *Biochim. Biophys. Acta* 1748:165-173.
- Ribeiro,J.M., Hazzard,J.M., Nussenzveig,R.H., Champagne,D.E. e Walker,F.A. 1993. Reversible binding of nitric oxide by a salivary heme protein from a bloodsucking insect. *Science* 260:539-541.
- Roberts,C.K., Barnard,R.J., Scheck,S.H. e Balon,T.W. 1997. Exercise-stimulated glucose transport in skeletal muscle is nitric oxide dependent. *Am. J. Physiol.* 273:E220-E225.
- Rossi,R., Lusini,L., Giannerini,F., Giustarini,D., Lungarella,G. e Di Simplicio,P. 1997. A method to study kinetics of transnitrosation with nitrosoglutathione: reactions with hemoglobin and other thiols. *Anal. Biochem.* 254:215-220.
- Saito,S., Ando,Y., Nakamura,M., Ueda,M., Kim,J., Ishima,Y., Akaike,T. e Otagiri,M. 2005. Effect of nitric oxide in amyloid fibril formation on transthyretin-related amyloidosis. *Biochemistry* 44:11122-11129.

Sakamoto,H., Furukawa,K., Matsunaga,K., Nakamura,H. e Ohizumi,Y. 1995. Xestoquinone activates skeletal muscle actomyosin ATPase by modification of the specific sulfhydryl group in the myosin head probably distinct from sulfhydryl groups SH1 and SH2. *Biochemistry* 34:12570-12575.

Saville,B. 1958. A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analyst* 83:670-672.

Schliselfeld,L.H. 1976. Steady-state studies of the actin-activated adenosine triphosphatase activity of myosin. *Biochim. Biophys. Acta* 445:234-245.

Schoneich,C. e Sharov,V.S. 2006. Mass spectrometry of protein modifications by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic. Biol. Med.* 41:1507-1520.

Seidel,J.C. 1969a. Effects of salts of monovalent ions on the adenosine triphosphatase activities of myosin. *J. Biol. Chem.* 244:1142-1148.

Seidel,J.C. 1969b. Similar effects on enzymic activity due to chemical modification of either of two sulfhydryl groups of myosin. *Biochim. Biophys. Acta* 180:216-219.

Seidel,J.C. 1969c. The effects of monovalent and divalent cations on the ATPase activity of myosin. *Biochim. Biophys. Acta* 189:162-170.

Seidel,J.C. 1972. The effects of nucleotides and  $Mg^{2+}$  on the electron spin resonance spectra of myosin spin labeled at the S2 thiol groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 152:839-848.

Seidel,J.C., Chopek,M. e Gergely,J. 1970. Effect of nucleotides and pyrophosphate on spin labels bound to S1 thiol groups of myosin. *Biochemistry* 9:3265-3272.

Sellers,J.R. e Goodson,H.V. 1995. Motor proteins 2: myosin. *Protein Profile* 2:1323-1423.

Sheterline,P., Clayton,J. e Sparrow,J. 1995. Actin. *Protein Profile* 2:1-103.

Silveira,L.R., Pereira-da-Silva,L., Juel,C. e Hellsten,Y. 2003. Formation of hydrogen peroxide and nitric oxide in rat skeletal muscle cells during contractions. *Free Radic. Biol. Med.* 35:455-464.

Singer,T.P. e Barron,E.S.G. 1944. Effect of sulfhydryl reagents on adenosinetriphosphatase activity of myosin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 56:120-124.

Singh,R.J., Hogg,N., Joseph,J. e Kalyanaraman,B. 1996a. Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *J. Biol. Chem.* 271:18596-18603.

Singh,S.P., Wishnok,J.S., Keshive,M., Deen,W.M. e Tannenbaum,S.R. 1996b. The chemistry of the S-nitrosoglutathione/glutathione system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:14428-14433.

Sousa,V.P., Pinto,J.R. e Sorenson,M.M. 2006. Ionic interventions that alter the association of troponin C C-domain with the thin filaments of vertebrate striated muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1760:272-282.

Stamler, J.S., Jaraki, O., Osborne, J., Simon, D.I., Keane, J., Vita, J., Singel, D., Valeri, C.R. e Loscalzo, J. 1992a. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:7674-7677.

Stamler, J.S. e Meissner, G. 2001. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol. Rev.* 81:209-237.

Stamler, J.S., Simon, D.I., Jaraki, O., Osborne, J., Francis, S., Mullins, M., Singel, D. e Loscalzo, J. 1992b. S-nitrosylation of tissue-type plasminogen activator confers vasodilatory and antiplatelet properties on the enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:8087-8091.

Stamler, J.S., Singel, D.J. e Loscalzo, J. 1992c. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258:1898-1902.

Stamler, J.S. e Toone, E.J. 2002. The decomposition of thionitrites. *Curr. Opinion Chem. Biol.* 6:779-785.

Stamler, J.S., Toone, E.J., Lipton, S.A. e Sucher, N.J. 1997. (S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif. *Neuron* 18:691-696.

Steffen, M., Sarkela, T.M., Gybina, A.A., Steele, T.W., Trasseth, N.J., Kuehl, D. e Giulivi, C. 2001. Metabolism of S-nitrosoglutathione in intact mitochondria. *Biochem. J.* 356:395-402.

Sun, J., Xu, L., Eu, J.P., Stamler, J.S. e Meissner, G. 2003. Nitric oxide, NOC-12, and S-nitrosoglutathione modulate the skeletal muscle calcium release channel/ryanodine receptor by different mechanisms. An allosteric function for O<sub>2</sub> in S-nitrosylation of the channel. *J. Biol. Chem.* 278:8184-8189.

Szczesna, D., Zhao, J. e Potter, J.D. 1996. The regulatory light chains of myosin modulate cross-bridge cycling in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 271:5246-5250.

Taussky, H.H. e Shorr, E. 1953. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.* 202:675-685.

Tellez-Sanz, R., Cesareo, E., Nuccetelli, M., Aguilera, A.M., Baron, C., Parker, L.J., Adams, J.J., Morton, C.J., Lo, B.M., Parker, M.W. e Garcia-Fuentes, L. 2006. Calorimetric and structural studies of the nitric oxide carrier S-nitrosoglutathione bound to human glutathione transferase P1-1. *Protein Sci.* 15:1093-1105.

Thomas, J.A. e Mallis, R.J. 2001. Aging and oxidation of reactive protein sulfhydryls. *Exp. Gerontol.* 36:1519-1526.

Thomas, S.N., Lu, B.W., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y. e Yang, A.J. 2006. MUDPIT (Multidimensional protein identification technology) for identification of post-translational protein modifications in complex biological mixtures. *In Redox Proteomics From Protein Modifications to Cellular Dysfunctions and Diseases.* I. Dalle-Donne, A. Scaloni, e D.A. Butterfield, Editores. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey. 233-52.

Thompson,M., Becker,L., Bryant,D., Williams,G., Levin,D., Margraf,L. e Giroir,B.P. 1996. Expression of the inducible nitric oxide synthase gene in diaphragm and skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 81:2415-2420.

Tiago,T., Simao,S., Aureliano,M., Martin-Romero,F.J. e Gutierrez-Merino,C. 2006. Inhibition of skeletal muscle S1-myosin ATPase by peroxynitrite. *Biochemistry* 45:3794-3804.

Ue,K. 1987. Intramolecular cross-linking of myosin subfragment 1 with bimeane. *Biochemistry* 26:1889-1894.

Vale,R.D. e Milligan,R.A. 2000. The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* 288:88-95.

Vedia,L., McDonald,B., Reep,B., Brune,B., Di Silvio,M., Billiar,T.R. e Lapetina,E.G. 1992. Nitric oxide-induced S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibits enzymatic activity and increases endogenous ADP-ribosylation. *J. Biol. Chem.* 267:24929-24932.

Vianna,A.L. 1981. Contração muscular. In *Biofísica*. F.R.Lacaz-Vieira e G.Malnic, editors. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 278-313.

Walser,J.T., Watterson,J.G. e Schaub,M.C. 1981. Cyanylation and cleavage of myosin heavy chains at reactive thiol groups: direct localization of thiol-1 and thiol-2 groups. *Biochemistry* 20:1169-1175.

Watterson,J.G., Schaub,M.C., Locher,R., Di Pierri,S. e Kutzer,M. 1975. Temperature-induced transitions in the conformation of intermediates in the hydrolytic cycle of myosin. *Eur. J. Biochem.* 56:79-90.

Weeds,A.G. e Taylor,R.S. 1975. Separation of subfragment-1 isoenzymes from rabbit skeletal muscle myosin. *Nature* 257:54-56.

Weichsel,A., Brailey,J.L. e Montfort,W.R. 2007. Buried S-nitrosocysteine revealed in crystal structures of human thioredoxin. *Biochemistry* 46:1219-1227.

Williams,D.L.H. 1999. The chemistry of S-nitrosothiols. *Acc. Chem. Res.* 32:869-876.

Wong,P.S.Y., Hyun,J., Fukuto,J.M., Shirota,F.N., DeMaster,E.G., Shoeman,D.W. e Nagasawa,H.T. 1998. Reaction between S-nitrosothiols and thiols: Generation of nitroxyl (HNO) and subsequent chemistry. *Biochemistry* 37:5362-5371.

Yang,Y. e Loscalzo,J. 2005. S-nitrosoprotein formation and localization in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:117-122.

Zhang,H., Xu,Y., Joseph,J. e Kalyanaraman,B. 2005. Intramolecular electron transfer between tyrosyl radical and cysteine residue inhibits tyrosine nitration and induces thiyl radical formation in model peptides treated with myeloperoxidase, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: EPR SPIN trapping studies. *J. Biol. Chem.* 280:40684-40698.

Zhang,Y. e Hogg,N. 2004. The mechanism of transmembrane S-nitrosothiol transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:7891-7896.

# Curriculum Vitae

Nome: Leonardo Nogueira

Nascimento: 25/07/1977

Naturalidade: Rio de Janeiro

## Formação Acadêmica

- Licenciatura plena em educação física pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1996 – 2001.
- Mestrado em Ciências (Química Biológica) no Departamento de Bioquímica Médica – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001 – 2003.
- Doutorado em Ciências (Química Biológica) no Instituto de Bioquímica Médica – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003 – 2008.

## Orientação de Estudante

1. Cícero Figueiredo Freitas – iniciação científica de julho de 2006 até julho de 2007

## Comunicação em congresso

- 7 comunicações em congressos nacionais
- 2 comunicações em congressos internacionais

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)