



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**DISEÑO DE UN REPORTERO BASADO EN FRET PARA  
ANALIZAR LA ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA CINASA PAK1  
EN CÉLULAS VIVAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**Biólogo**

**P R E S E N T A :**

**Xochitl Araceli Rodriguez Bautista**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. Luis Enrique Arias Romero**

**Los Reyes Iztacala, Edo. De México, 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Este proyecto fue elaborado en el Laboratorio de Señalización Celular del Cáncer de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM bajo la dirección del Dr. Luis Enrique Arias Romero, con financiamiento del proyecto FESI-DIP-PAPCA-2016-18.**

## **COMITÉ DE ASESORES**

### **Dra. Miriam Rodríguez Sosa**

Laboratorio de Inmunología. UBIMED, Facultad de Estudios superiores Iztacala, UNAM.

### **Dr. José Bustos Arriaga**

Laboratorio de Biología molecular e inmunología de arbovirus. UBIMED, Facultad de Estudios superiores Iztacala, UNAM.

### **Dr. Carlos Pérez Plascencia**

Laboratorio de Genómica funcional del cáncer. UBIMED, Facultad de Estudios superiores Iztacala, UNAM.

### **M. en C. Olga Villamar Cruz**

Laboratorio de Señalización celular del cáncer. UBIMED, Facultad de Estudios superiores Iztacala, UNAM.

## **Agradecimientos y Dedicatorias**

A mi bella madre, por todo el sacrificio que ha realizado conmigo, sin ti nada de esto habría sido posible. Gracias por apoyarme en cada una de mis decisiones, aunque no siempre hayan sido las mejores y sobre todo por entenderme en cada una de mis facetas de enojo, alegría, estrés y tristeza, MAMI, TE AMO.

A mi papá, por apoyarme a tu manera, por creer en cada uno de mis sueños y por tu inmenso cariño. Gracias por ser y estar.

A mis hermanos (Diego y fer ), a mi cuñada Eli y mi sobrina Adelita por su apoyo y amor incondicional, por soportarme siempre en mis arranques de enojo. Les agradezco, y hago presente mi gran amor hacia ustedes, mi hermosa familia.

A mis primas y amigas del alma Adris (chata) y Hilary (bichita), quienes sin esperar nada a cambio compartieron sus alegrías y tristezas, por estos dos años de grandes aventuras, gracias por estar a mi lado apoyándome, sin ustedes no lo hubiese logrado, las amo.

A Haydee, Lez, Areli y Niza, por permanecer todos estos años conmigo, me han hecho una mejor persona.

A mis mejores amigos de todos los semestres Misael y Rosa, por todos los buenos y malos momentos que pasamos a lo largo de la carrera, por todas esas tardes en las clandes, y sobre todo gracias por todo el apoyo que he recibido de ambos, los quiero.

A Luis, Tania, Elenita y Oscar, gracias por compartir su conocimiento, sus triunfos y tristezas, por todas esas tardes de series y platicas, ¡GRACIAS POR SU AMISTAD!

Y sin dejar atrás a mi otra familia, David “güerito”, Luis, Joss, Sam, Mica, gracias por todas esas tardes de papas, galletas y chelas, sobre todo chelas, por adoptarme en su laboratorio, por hacer mi estadía en esta unidad completamente grata y disfrutable, y por último gracias por su sincera AMISTAD.

A Iván, por brindarme su ayuda y enseñanza, sin tu apoyo este trabajo hubiese sido más largo y complicado, por tu amistad, por esos desayunos y comidas llenas de entretenimiento.

A cada uno de los miembros del Laboratorio 14, especialmente al Dr Luis y la Dra Olga , por la oportunidad de estar en su laboratorio, por el apoyo en la elaboración de este proyecto, ¡GRACIAS!.

A cada uno de mis asesores, gracias por su tiempo y dedicación en la corrección de este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de estudios superiores Iztacala por brindarme todas las herramientas necesarias para formarme académicamente y humanamente en todos estos años.

## **Tabla de contenido**

- I. Lista de figuras
  - II. Abreviaturas
- 
- 1. Resumen
  - 2. Introducción
    - 2.1 Fosforilación
  - 3. Proteínas cinasas
    - 3.1. Clasificación de las proteínas cinasa
    - 3.2. Estructura de las proteínas cinasas
    - 3.3 Mecanismo de fosforilación
    - 3.4 Proteínas fosfatasas
  - 4. Proteínas de la familia PAK
    - 4.1 Mecanismo de activación
    - 4.2 PAK y cáncer
  - 5. Métodos para medir actividad cinasa
    - 5.1 Ventajas y desventajas
    - 5.2 Biosensores basados en FRET
      - 5.2.1 Reporteros de actividad cinasa
  - 6. Justificación
  - 7. Objetivos
    - 7.1 General
    - 7.2 Objetivos particulares
  - 8. Materiales y métodos

- 8.1. Cultivo celular
- 8.2. Mutagénesis sitio dirigida
- 8.3. Transformación en bacterias competentes *E. coli* DH5 $\alpha$
- 8.4. Purificación del DNA plasmídico por lisis alcalina (Mini prep)
- 8.5. Determinación de la concentración de DNA plasmídico
- 8.6. Digestión del biosensor PKAR-Kras
- 8.7. Secuenciación del biosensor PKAR-Kras
- 8.8. Análisis bioinformático de la fosforilación del biosensor PKAR-Kras
- 8.9. Transfección del vector PKAR-Kras
- 8.10. Fraccionamiento celular por ultracentrifugación
- 8.11. Cuantificación de proteínas
- 8.12. Western blot
- 8.13. Eficiencia de FRET en células vivas
9. Resultados
10. Discusión
11. Conclusiones
12. Perspectivas
13. Referencias



## Abreviaturas

Aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucléico
ADP	Adenosín difosfato
AID	Dominio auto inhibitorio
ATP	Adenosín trifosfato
Asp	Ácido aspártico
CFP	Proteína cian fluorescente
EGF	Factor de crecimiento
FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
GBD	Dominio de unión a GTPasas
Gly	Glicina
GFP	Proteína verde fluorescente
GTP	Guanosín trifosfato
KAR	Reportero de actividad cinasa
Phe	Fenilalanina
pb	Pares de bases
ROI	Región de interés
YFP	Proteína amarilla fluorescente
μl	Microlitros

## Lista de figuras

Figura 1. Fosforilación de proteínas

Figura 2. Kinoma humano

Figura 3. Estructura de proteínas cinasas

Figura 4. Estructura del sitio catalítico de la proteína cinasa.

Figura 5. Estructura y clasificación de la Familia PAK

Figura 6. Modelos de activación de PAK

Figura 7. PAK y cáncer

Figura 8. Diseño general y mecanismo de los reporteros de actividad cinasa

Figura 9. Digestión del vector PKAR-Kras con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI

Figura 10. Electroferograma del plásmido PKAR-Kras

Figura 11. Análisis *in silico* de fosforilación del reportero PKAR-Kras mediada por PAK1

Figura 12. Microscopia confocal células HEK293T transfectadas con el vector PKAR-Kras.

Figura 13. Detección de la localización del biosensor PKAR-Kras

Figura 14. Eficiencia de FRET de los biosensor PKAR-Kras y PKAR localización citoplasmática en células HEK293T.

## 1.- Resumen

Las proteínas de la familia PAK son cinasas de Serina y Treonina, que son activadas por las GTPasas pequeñas CDC42 y Rac1, las cuales están involucradas en la regulación de distintos procesos celulares, en particular PAK1 desempeña un papel importante en la regulación de diversas rutas de señalización y procesos celulares tales como la motilidad celular, la división celular, la reorganización del citoesqueleto, la transcripción de genes y la apoptosis, mediante la fosforilación de distintos sustratos. Sin embargo no se ha descrito la dinámica de activación de PAK1 en los distintos compartimentos sub-celulares, por lo que se desconoce si esta cinasa se activa primero en la membrana plasmática o en el citoplasma. Los reporteros de actividad cinasa se han convertido en herramientas indispensables para visualizar las actividades subcelulares de las proteínas cinasas. En este trabajo, se diseñó y caracterizó un reportero de actividad cinasa basado en FRET para investigar la dinámica de activación de PAK1 en células vivas. En primer lugar, comprobamos que nuestro biosensor es fosforilado únicamente por PAK1 realizando un análisis *in silico*, los resultados obtenidos en este ensayo demostraron que PKAR-Kras es altamente específico para la fosforilación de PAK1. Posteriormente se realizaron ensayos de microscopia confocal y Western blot para confirmar que nuestro biosensor se localice específicamente en la membrana plasmática, las imágenes mostraron la ubicación correcta de este biosensor en las células HEK293. Finalmente confirmamos el biosensor PKAR-kras permite estudiar la actividad de PAK1 en la membrana plasmática y el citoplasma a través de los cambios en FRET, realizando la medición de la eficiencia de FRET del biosensor PKAR dirigido a la membrana plasmática y del biosensor PKAR dirigido al citoplasma. Los datos revelaron que el biosensor de membrana plasmática tuvo una respuesta y una eficiencia del 30 % después de la estimulación con EGF, mientras que el biosensor de citoplasma mostro una respuesta lenta y una eficiencia de 28.88% tras la estimulación con EGF, estos datos sugieren que PAK1 se activa inicialmente en membrana plasmática y después en citoplasma.

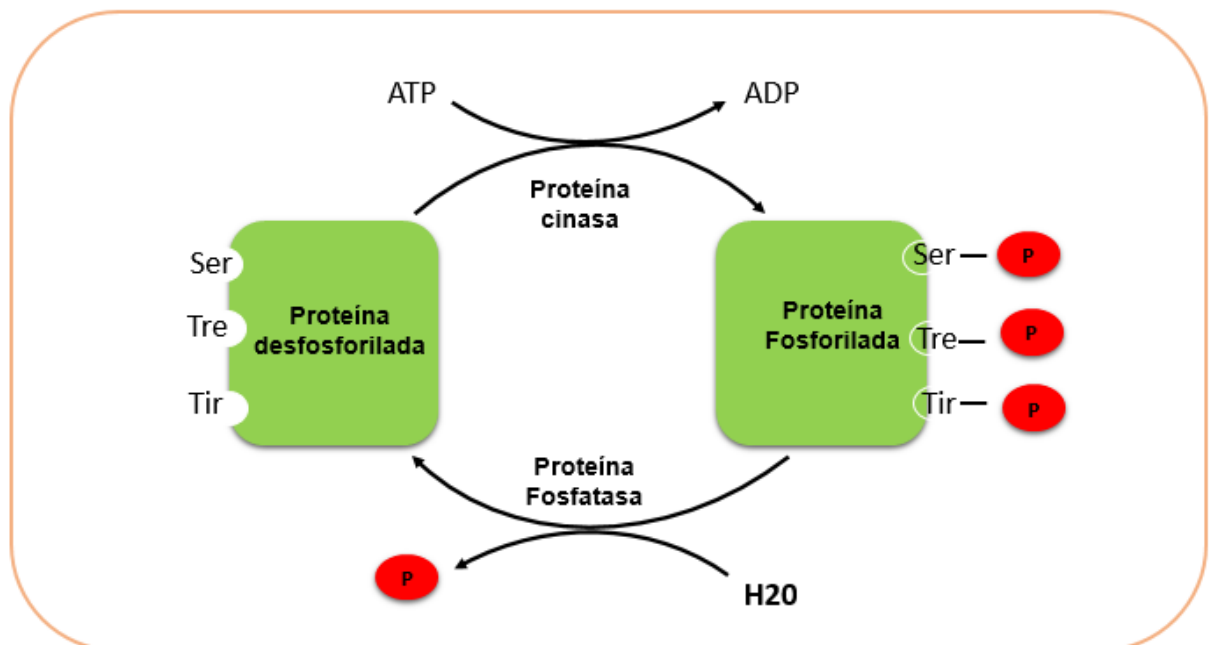
## 2. Introducción.

### 2.1 Fosforilación

La fosforilación de proteínas es una de las modificaciones post-traduccionales más comunes e importantes que ocurre en células eucariotas. Este mecanismo, es un proceso dinámico y reversible, el cual esta mediado por proteínas cinasas y fosfatasas que fosforilan y desfosforilan distintos sustratos respectivamente (Figura 1) (Sefton, 1996; Ubersax, y Ferrell, 2007; Zavialova, *et al.*, 2017).

La fosforilación tiene múltiples efectos sobre las proteínas fosforiladas, alterando su actividad enzimática, la interacción con otras proteínas y su localización subcelular.

La fosforilación tiene un rol importante en las funciones normales de la célula, ya que desempeña un papel fundamental en la regulación y control de múltiples rutas de señalización, y distintos procesos celulares, por lo tanto, no es sorprendente que la alteración de este mecanismo se relacione con el desarrollo distintas patologías (Hodgson, y Schroder, 2010; Wang y Ma., 2015; Ardito *et al.*, 2017).



**Figura 1. Fosforilación de proteínas:** Se muestran las reacciones enzimáticas de fosforilación y desfosforilación mediado por proteínas cinasas y fosfatasas respectivamente (Modificado de Zavialova, *et al.*, 2017).

### **3. PROTEINAS CINASAS**

Las proteínas cinasas son las enzimas responsables del mecanismo de fosforilación, catalizando la transferencia de un grupo fosfato ( $\text{PO}_4$ ) de alta energía a partir de ATP o GTP a los grupos hidroxilo (OH) de los residuos de Serina, Treonina o Tirosina de las proteínas. Más de un tercio de los eventos de fosforilación ocurren en residuos de Serina (86.4%), Treonina (11.8%) y Tirosina (1.8%).

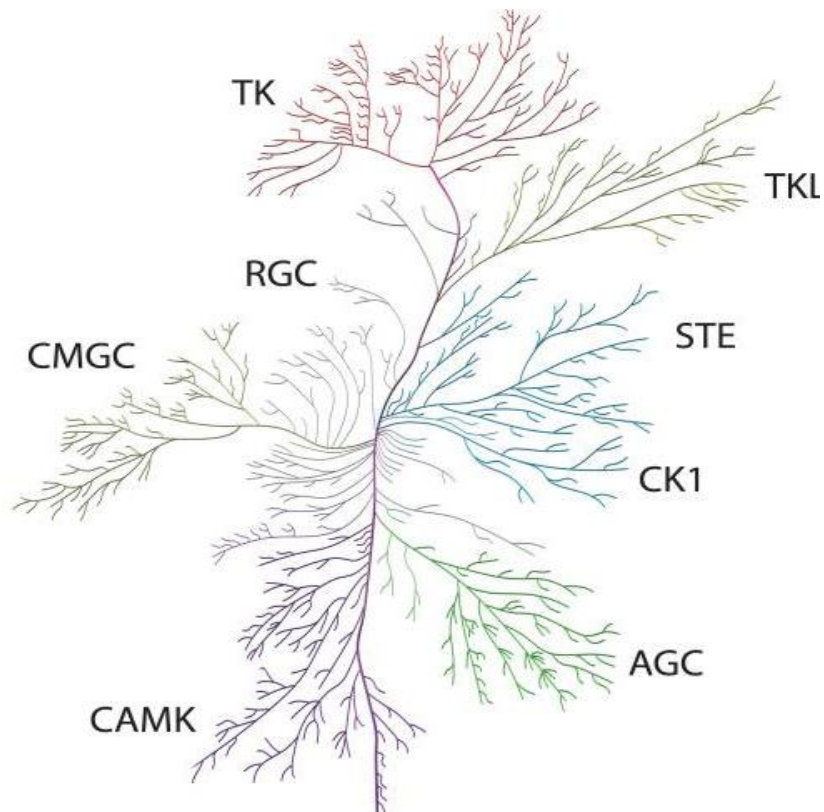
Las cinasas juegan un papel crítico y complejo en la transducción de señales y distintos procesos biológicos, tales como el metabolismo, la transcripción de genes, la progresión del ciclo celular, la diferenciación celular, la reorganización del citoesqueleto, la migración celular, la proliferación, y la apoptosis entre otros. Por esta razón, no resulta extraño que la sobreexpresión y / o desregulación de algunas proteínas cinasas estén implicadas en el desarrollo de distintas condiciones patológicas como el cáncer, diabetes y trastornos neurodegenerativos o inflamatorios. Por esta razón, los mecanismos de activación y regulación de las proteínas cinasas son importantes tanto para la investigación básica como para el desarrollo de fármacos (Hunter, 2000; Schwartz y Murray, 2011; Wang y cole, 2014).

#### **3.1 CLASIFICACION DE LAS PROTEINAS CINASAS**

Las cinasas constituyen una gran familia de proteínas, que constan de 518 miembros los cuales están codificados por aproximadamente el 1.7 % de todos los genes humanos (Manning, *et al.*, 2002; Aranda *et al.*, 2017).

Las proteínas cinasas humanas se clasifican en 3 grupos principales con base a los residuos de aminoácidos que estas enzimas fosforilan: las cinasas que actúan sobre Serinas y Treonina (Serina/ Treonina cinasas, STK), las que actúan sobre tirosina (Tirosina cinasas, TK), y las cinasas que actúan sobre las tres (cinasas de doble especificidad, DSK) (Hunter, 1991; Ardito *et al.*, 2017).

Las proteínas cinasas también pueden clasificarse de acuerdo a la homología de la secuencia de aminoácidos de su dominio catalítico. El kinoma humano se divide en siete familias principales: 1) AGC, que comprenden a las proteínas cinasas A, G y C; 2) CAMK, proteínas cinasas dependientes de calcio/calmodulina ( $\text{Ca}^{2+}$  / CAM); 3) CK1, caseína cinasa 1; 4) CMGC, comprende a las proteínas CDK (cinasas dependientes de ciclinas), MAPK (proteína cinasas activadas por mitógeno); GSKs (cinasa de la glucógeno sintasa); CLK, cinasas de tipo cdc2, y RGC, receptores con actividad de guanilato ciclasa, 5) TK, tirosina cinasas; 6) TKL, proteínas similares a tirosina cinasas y 7) STE familia de cinasas estériles. Dentro de la familia Ste20, los miembros mejor caracterizados son las proteínas cinasas activadas por p21 (PAKs), que son reguladores críticos de diversas vías de señalización (Figura 2). Esta clasificación también incluye muchas cinasas atípicas, cuyo dominio catalítico no presenta similitud en secuencia a los dominios de cinasa de otras proteínas (Manning, *et al.*, 2002; Duong y Peterson, 2013).



**Figura 2. Kinoma humano:** Las proteínas cinasas se clasifican en las siguientes familias con base a la homología del dominio catalítico: TK, TKL, STE, CK1, AGC, CMGC, RGC (Tomado de Cell Signaling Technology, Inc (www.cellsignal.com)).

### 3.2 ESTRUCTURA DE LAS PROTEINAS CINASAS

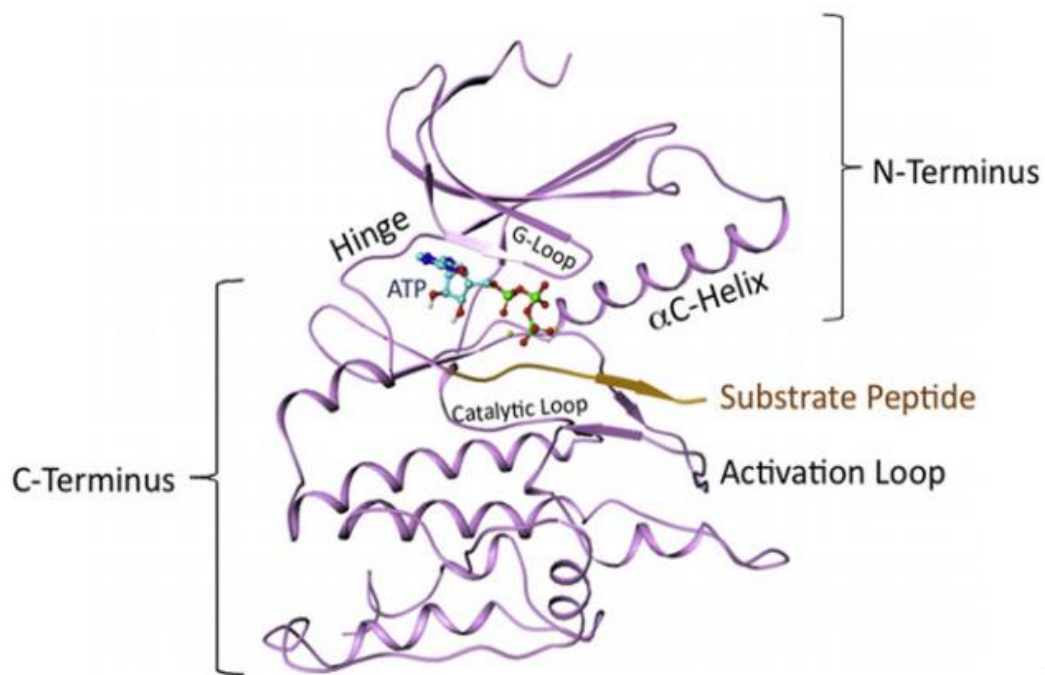
La actividad catalítica de las proteínas cinasas está estrictamente regulada en condiciones celulares normales. Los estudios estructurales han contribuido a la comprensión actual de los mecanismos de regulación.

Las proteínas cinasas comparten un dominio catalítico muy conservado, el cual tiene aproximadamente 250 aa y consta de dos subdominios, un lóbulo N-terminal (lóbulo N) compuesto de cinco cadenas  $\beta$  que es crítica para que la enzima cumpla con su función catalítica, y que recibe el nombre de hélice  $\alpha$ -C y un lóbulo C-terminal (lóbulo-C) que es principalmente  $\alpha$ -helicoidal. Los dos subdominios están unidos por un filamento peptídico (la bisagra), que constituyen el sitio activo, el cual tiene un “pocket frontal” y un “pocket trasero”. En el “pocket” frontal se encuentran los residuos directamente implicados en la catálisis o en la unión a ATP, mientras que el “pocket” hidrófobo (“pocket posterior) tiene funciones reguladoras (Figura 3).

En el “pocket” frontal, el anillo de adenina del ATP se une a la cadena principal de la amida de la región bisagra. Una asa flexible situado en lóbulo N-terminal (asa G), contiene tres residuos de glicina conservados (G-X-G-X-X-G), los cuales se unen a los grupos fosfato intransferibles del ATP ( $\alpha$  y  $\beta$ ) a través de interacciones iónicas. La conformación de la asa G es dinámica y depende del estado de activación del dominio catalítico y la presencia de ligandos (Knighton, *et al.*, 1991; Schwartz y Murray, 2011; Wang, *et al.*, 2014; Rennefahrt *et al.*, 2007).

La activación enzimática está regulada, en parte, por la orientación de la hélice  $\alpha$ -C y frecuentemente interactúa con la asa de activación del lóbulo C-terminal para alterar la alineación de residuos catalíticos. La asa de activación tiene una secuencia DFG (Asp-Phe-Gly) conservada (asa de orientación de  $Mg^{2+}$ ) crítica para la catálisis, debido a que el residuo de aspartato se une directamente al ion de

magnesio que actúa como cofactor y orienta el fosfato y del ATP para su transferencia al sustrato. El asa de activación tiene típicamente sitios de fosforilación críticos para la regulación de la actividad catalítica. La incorporación de un grupo fosfato en un residuo de la asa de activación crea una red de puentes de hidrógeno fuertes que facilitan la organización de los residuos del sitio catalítico activo y el sitio de unión del fosfoaceptor (Knighton, *et al.*, 1991; Schwartz y Murray, 2011; Wang, *et al.*, 2014).

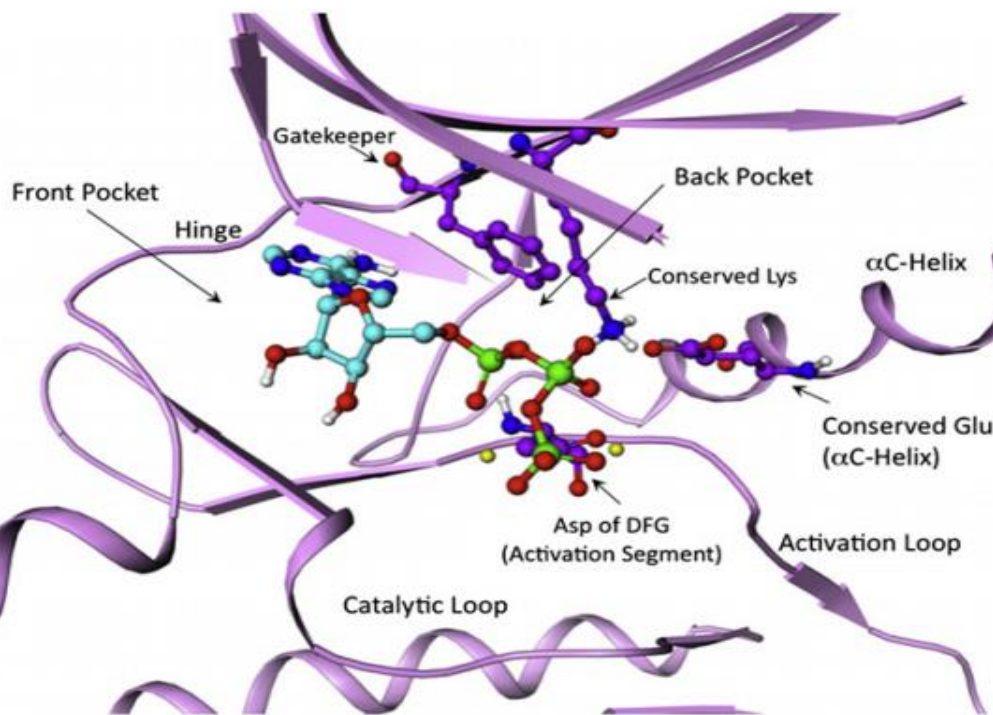


**Figura 3. Estructura de proteína cinasa.** Se muestran las características estructurales, dos dominios N-terminal y C-terminal que se encuentran unidos a un filamento peptídico, los cuales constituyen el sitio activo (Tomado de Schwartz y Murray, 2011).

El acceso al “pocket” trasero está controlado por dos residuos: un residuo conservado de lisina y un residuo que bloquea el acceso del ATP al “pocket” catalítico. Recientemente, se ha descrito un mecanismo regulador que facilita las



interacciones entre subdominios: las espinas hidrofóbicas. Las espinas hidrofóbicas proporcionan una conexión para la comunicación entre subdominios, contienen porciones del segmento de activación, la hélice  $\alpha C$  y el residuo "gatekeeper", se ensamblan durante la activación del dominio catalítico. Como tal, las espinas hidrofóbicas pueden controlar la dinámica conformacional del dominio catalítico (Figura 4) (Knighton, *et al.*, 1991; Schwartz y Murray, 2011; Wang, *et al.*, 2014).



**Figura 4. Estructura del sitio catalítico de la proteína cinasa.** El sitio activo, el cual está conformado por un "pocket frontal" y un "pocket trasero". En el "pocket" frontal se encuentran los residuos directamente implicados en la catálisis o en la unión a ATP, mientras que el "pocket" hidrófobo ("pocket "posterior) tiene funciones reguladoras (Tomado de Schwartz y Murray, 2011).

### 3.3 MECANISMO DE FOSFORILACIÓN

El mecanismo de fosforilación, involucra la unión de dos sustratos, ATP y una proteína, carbohidrato, lípido, etc y la transferencia del fosfato y desde el ATP a la

proteína o sustrato lipídico. El producto fosforilado y el ADP se liberan del sitio catalítico. El dominio cinasa contiene residuos que facilitan la unión de sustratos y magnesio, un cofactor requerido, así como residuos que mejoran la formación y liberación de los productos. Para lograr esto, el dominio catalítico sufre cambios conformacionales entre estados activos (catalíticamente competentes) e inactivos (Schwartz y Murray, 2011; Duong y Peterson, 2013).

### **3.4 PROTEINAS FOSFATASAS**

Por el contrario a las cinasas, las proteínas fosfatasas son las enzimas encargadas del mecanismo de desfosforilación, al eliminar el grupo fosfato de sus sustratos fosforilados al hidrolizar monoésteres de ácido fosfórico en un grupo fosfato y la aparición de un grupo hidroxilo libre (Barford, *et al.*, 1998; Ardito *et al.*, 2017).

En el genoma humano se han identificado más de 200 fosfatasas, que tienen como sustratos principales a proteínas o lípidos fosforilados. Las proteínas fosfatasas se clasifican en 3 principales familias: familia de fosfoproteína fosfatasa (PPP), familia de proteína fosfatasa metalodependiente (PPM) y familia de proteína-tirosina fosfatasa (PTP) (Ardito *et al.*, 2017).

La familia de PP incluye a PP1, PP2A, PP2B y PP4-7, mientras que la familia PPM su miembro más importante es PP2C. Los grupos PPP y PMP son responsables de la mayoría de las reacciones de defosforilación de los residuos de fosfoserina y fosfotreonina, también pueden desfosforilar residuos de fosfotirosina (Barford, *et al.*, 1998; Jin y Pawson, 2012).

Por el contrario, las fosfatasas que pertenecen a la familia PTP comparten el mismo dominio catalítico, pero tienen diferente selectividad para las proteínas fosforiladas. De todas las fosfatasas de este grupo al menos 100 desfosforilan los residuos de tirosina. Aunque los miembros de la familia PTP son muy diversos en sus preferencias de sustrato, se sabe que algunas fosfatasas defosforilan sustratos no proteicos, incluidos los carbohidratos, mARN y fosfoinosítidos (Barford, *et al.*, 1998; Jin y Pawson, 2012).

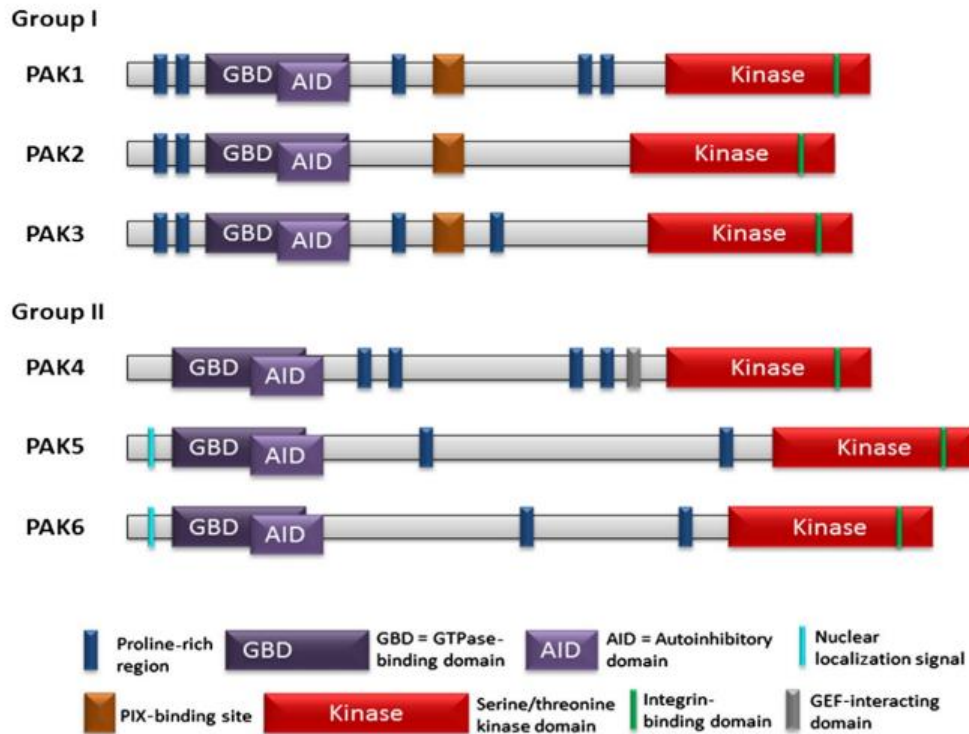
En las últimas décadas, gran parte del interés de la comunidad científica se ha centrado en las proteínas cinasas, sin embargo, hallazgos recientes han llevado al reconocimiento emergente de que las proteínas fosfatasas juegan un papel clave en el establecimiento de los niveles de fosforilación de Tirosina, Serina y Treonina en las células, participando en la regulación de muchos procesos fisiológicos, incluido el crecimiento celular, la diferenciación tisular y el comunicación celular, entre otros (Ardito *et al.*, 2017).

#### **4. PROTEINAS CINASAS DE LA FAMILIA PAK**

Las proteínas de la familia PAK, son cinasas de Serina y Treonina que se expresan en diversos tejidos, y son activadas por señales extracelulares mediante mecanismos que pueden ser dependientes o independientes de las GTPasas pequeñas (Rac y Cdc42). Las proteínas PAK regulan distintos procesos celulares, incluyendo la motilidad celular, la sobrevivencia, la apoptosis, la transcripción de genes, organización del citoesqueleto de actina, etc. Por lo que la desregulación de estas enzimas se ha relacionado con diversas enfermedades, incluido el cáncer (Bokoch, *et al.*, 2003; Radu, *et al.*, 2014).

En mamíferos se han identificado 6 miembros de esta familia, los cuales se han clasificado en dos distintos grupos de acuerdo con la homología en sus secuencias, así como a sus funciones bioquímicas, PAK1, PAK2 y PAK3 se encuentran en el grupo I, mientras que PAK4, PAK5 y PAK6 pertenecen al grupo II (Zhao y Manser, 2012 ) (Figura 5).

Todas las cinasas de la familia PAK poseen un dominio con actividad de cinasa de Serina y Treonina en el carboxilo terminal, y un dominio de regulación en el amino terminal (Jaffer y Chernoff, 2002; Arias-Romero y Chernoff, 2008). Aunque en general ambos grupos de la familia PAK son similares en secuencia y estructura, la evidencia experimental sugiere que cada grupo de estas cinasas es regulado de manera distinta y que cada uno posee funciones celulares únicas (Arias-Romero y Chernoff, 2008; Radu, *et al.*, 2014).



**Figura 5. Estructura y clasificación de la familia PAK.** Las cinasas PAK constan de seis miembros, divididos en dos grupos según su homología en su secuencia. Ambos grupos presentan un dominio de unión a GTPasas en el extremo N-terminal que sobrelapa con un dominio de autoinhibición, seguido de regiones ricas en prolina, y el dominio de cinasa en el extremo C-terminal (Tomado de King *et al.*, 2014).

#### 4.1 MECANISMO DE ACTIVACION

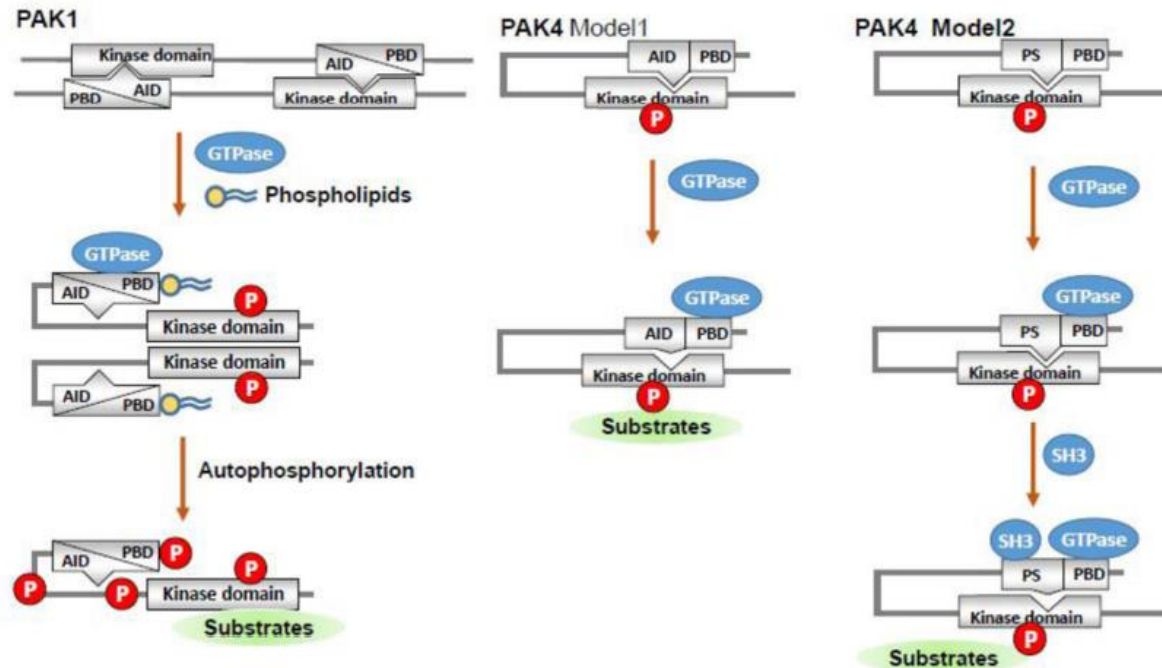
Las PAK del Grupo I se caracterizan por poseer un dominio conservado de unión a GTPasa (GBD) que se sobrelapa con un dominio de autoinhibición (AID) en la región N-terminal y un dominio catalítico de cinasa en el C-terminal. Otras características adicionales presentes en la región N-terminal de las PAK del Grupo I, incluyen la presencia de motivos ricos en poli-prolina (PXXP), dos motivos canónicos de unión a dominios SH3 (homología Src 3) y un sitio no canónico de unión a dominios SH3, que permite su unión a los Factores de Intercambio de Nucleótidos de Guanina (GEFs)  $\alpha$ -PIX y  $\beta$ -PIX. El primer sitio de unión a dominios SH3 se une a la proteína adaptadora Nck, mientras que el segundo sitio es capaz de unirse a Grb2, lo que

sugiere que las PAK del grupo I se pueden reclutar en la membrana (Arias-Romero y Chernoff, 2008; Parrini, 2012; Semenova y Chernoff, 2017).

La proteína PAK1, así como los otros miembros del grupo I, son regulados por un mecanismo autoinhibitorio en *trans*. Cuando PAK1 se encuentra inactiva, se pliega en un homodímero antiparalelo, en el que el dominio AID se une al dominio cinasa del otro monómero. Estudios estructurales y bioquímicos, han demostrado que la unión de Cdc42 o Rac al dominio GBD conducen a la disociación del AID del dominio de cinasa, dando lugar a cambios conformacionales del dímero, permitiendo así la autofosforilación que se requiere para la actividad completa de la cinasa. La actividad de PAK 1 también se puede regular de una manera independiente de GTPasas, dichos mecanismos de activación de PAK1 incluyen la unión de fosfolípidos y proteínas con dominios SH3, así como la fosforilación cruzada por otras cinasas (Figura 6) (Parrini, et al, 2002; Radu, et al., 2014 ; King et al., 2014).

Aunque las PAK del Grupo I y del Grupo II comparten características estructurales, los dos grupos tienen mecanismos de activación diferentes. A diferencia de las PAK del Grupo I, las PAK del Grupo II se encuentran en monómeros inactivos. Recientemente, se pensó que estas enzimas carecían de un AID y estaban constitutivamente activas. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que PAK4 posee un dominio AID en el N-terminal que inactiva su dominio catalítico en *cis*, hasta que Cdc42 se une al dominio GBD y permita la activación de la cinasa (Radu, et al., 2014).

Un modelo de activación alternativo propone que PAK4 se inhibe por la interacción de su dominio catalítico con una secuencia de pseudosustrato (PS) ubicada en el extremo N-terminal. En este modelo, la unión de las proteínas que contienen el dominio SH3 al PS desestabiliza dicha interacción y promueve la liberación del dominio catalítico activando así a la cinasa. Se cree que PAK5 y PAK6 también siguen este modelo de activación (Figura 6) (Buchwald, et al., 2001; Ha, et al., 2012; Radu, et al., 2014).



**Figura 6. Modelos de activación de PAK.** Las PAK del grupo I se encuentran en homodimeros inactivos, en el que el dominio AID se une al dominio cinasa del otro monómero, hasta que la unión de Cdc42 o Rac al dominio GBD conducen a la disociación del AID del dominio de cinasa, dando lugar a cambios conformacionales del dímero, permitiendo así la autofosforilación para activar a la cinasa. Las PAK del Grupo II se encuentran en monómeros inactivos. Hay dos modelos sugeridos para la activación de PAK4, en el que un AID en el N-terminal inactiva su dominio catalítico en *cis*, hasta que Cdc42 se una al dominio GBD y permita la activación de la cinasa. (Tomado de Kumar, 2017).

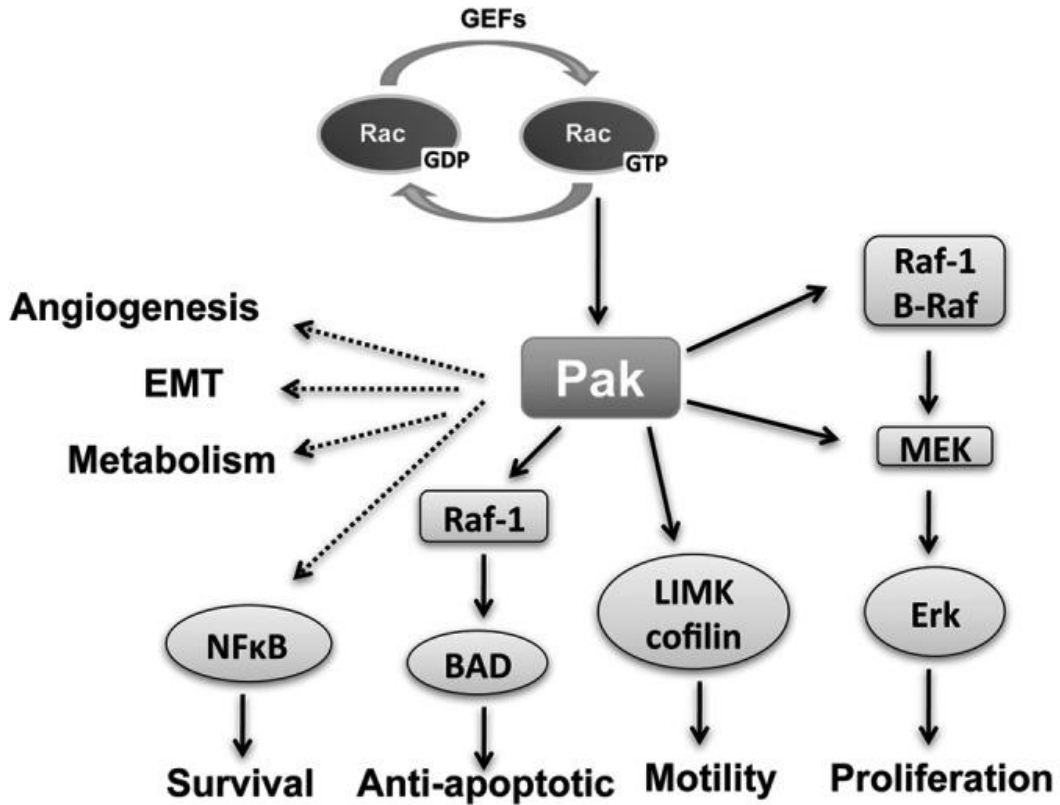
## 4.2 PAK Y CANCER

Varios estudios indican que PAK se activa de forma aberrante en distintos tipos de cáncer. Recientemente, distintos grupos de investigación han reportado que al menos dos miembros de la familia PAK se encuentran comúnmente sobre expresados e hiperactivos en distintos tipos de tumores y que generalmente existe una correlación con un grado avanzado del tumor y una menor tasa de sobrevivencia (Radu, *et al.*, 2014).

Esta sobre expresión e hiperactividad de PAK, se debe frecuentemente a la amplificación del gen *PAK1* en el cromosoma 11q13 o de *PAK4* en el cromosoma

19q13, aunque en algunos casos puede haber una mayor cantidad del mRNA y/o proteína de PAK en ausencia de la amplificación del gen (Dummler, *et al*, 2009; Radu, *et al.*, 2014). Además, se ha observado que esta hiperactividad puede deberse a mutaciones en proteínas reguladoras que se encuentran río arriba de PAK, como por ejemplo en Rac, sus GEFs o incluso receptores a distintos factores de crecimiento (Radu, *et al.*, 2014; Whale, *et al*, 2011).

Finalmente, diversos estudios biológicos sugieren que los miembros de la familia PAK desempeñan un papel importante en los “Hallmarks” del cáncer, interviniendo en la señalización proliferativa, la resistencia a la muerte celular, promoviendo la invasión, la metástasis y la inducción de la angiogénesis mediante diferentes vías de señalización, las cuales incluyen a Ras/RAF/MEK/ErK, NFkB, PI3K/Akt/mTOR,  $\beta$ -catenina, Bad y p53 (Figura 6) (Whale, *et al.*, 2011; Ye y Field, 2012).



**Figura 7. PAK y el cáncer.** Los miembros de la familia PAK son efectores de las GTPasas Rac/CDC42 y desempeñan un papel fundamental en algunas de las características distintivas del cáncer tales como la señalización proliferativa, resistencia a la muerte celular, inducción de la angiogénesis, la activación de la invasión y la metástasis (Ye y Field, 2012).



## 5. METODOS PARA MEDIR ACTIVIDAD CINASA

Las proteínas cinasas han sido blanco de números estudios debido a la importancia que tienen en la regulación de diversos procesos biológicos, por lo que se ha puesto un gran énfasis en la comprensión del papel biológico de la fosforilación de proteínas en el contexto de la enfermedad humana. La evaluación de la actividad catalítica de una proteína cinasa específica, puede ser un paso importante para dilucidar las vías de transducción de señales que afectan el comportamiento celular (Wang y Ma., 2015).

La actividad catalítica de las proteínas cinasas, ha sido evaluada de forma clásica mediante métodos bioquímicos, tales como el western blot, ensayos de cinasa *in vitro*, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, ensayos de microarreglos con fosfoanticuerpos, espectrometría de masas y citometría de flujo, entre otros. Estos ensayos dependen esencialmente de la incorporación de fósforo radiactivo ( $P^{32}$ ) en sustratos, o de anticuerpos altamente específicos que permiten identificar sustratos que contienen epítopos fosforilados en aminoácidos específicos (p-Serina, p-Treonina, p-Tirosina) (Lin, *et al.*, 2010; Yan, *et al.*, 1998;).

Para los ensayos de cinasa *in vitro*, las células se lisan y la fosforilación de un sustrato exógeno es monitoreada por radiactividad o anticuerpos fosfoespecíficos. Los anticuerpos fosfoespecíficos también pueden utilizarse para evaluar el grado de fosforilación de una proteína endógena dentro de los lisados celulares mediante western blot, ELISA y microarreglos, o en células fijadas mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, lo que permite determinar la localización celular de las fosfoproteínas. Alternativamente se puede utilizar citometría de flujo para examinar el estado de fosforilación en células individuales.

Finalmente, el gran avance de la espectrometría de masas (MS) ha permitido identificar y cuantificar miles de residuos fosforilados en un solo experimento. (Olive, 2004; Schmelzle, y White, 2006; Wang y Ma., 2015; González, y Morris, 2015).

## 5.1 Ventajas y desventajas

Estos métodos bioquímicos nos permiten caracterizar y cuantificar el grado de actividad o hiperactividad de las proteínas cinasas, nos permiten la identificación de sitios de fosforilación específicos, además de conocer la asociación que tienen con otras proteínas, así como su localización celular. Sin embargo los métodos basados en ensayos radioactivos o antigénicos tienen la desventaja de requerir altos niveles de radiación y en ocasiones la disponibilidad de anticuerpos específicos es limitada.

Además, al ser ensayos irreversibles no proporcionan suficiente información sobre la dinámica espacial y temporal de la actividad cinasa, y carecen del entorno celular fisiológico, por lo que no permiten el análisis en tiempo real de la actividad de cinasa en células vivas (Lin, *et al* ,2010; González, y Morris, 2015).

A pesar del papel central de las proteínas cinasas en procesos fisiológicos, la investigación de las actividades dinámicas de estas enzimas de manera continua en el espacio y en el tiempo, constituye un desafío importante que requiere de herramientas específicas y sensibles diseñadas para satisfacer estas demandas particulares.

Los avances tecnológicos en imágenes de microscopía óptica, combinados con la disponibilidad de proteínas fluorescentes codificadas genéticamente, han permitido el desarrollo de nuevas metodologías y herramientas, tales como el nuevo grupo de reporteros para medir la actividad de cinasa o KARs por sus siglas en inglés (Kinase Activity Reporters) que permiten determinar la dinámica de activación de una cinasa de interés en tiempo real en diversos fenómenos biológicos y bajo distintos estímulos (Mehta y Zhang, 2011; Vera y Morris, 2015).

## 5.2 Biosensores basados en FRET

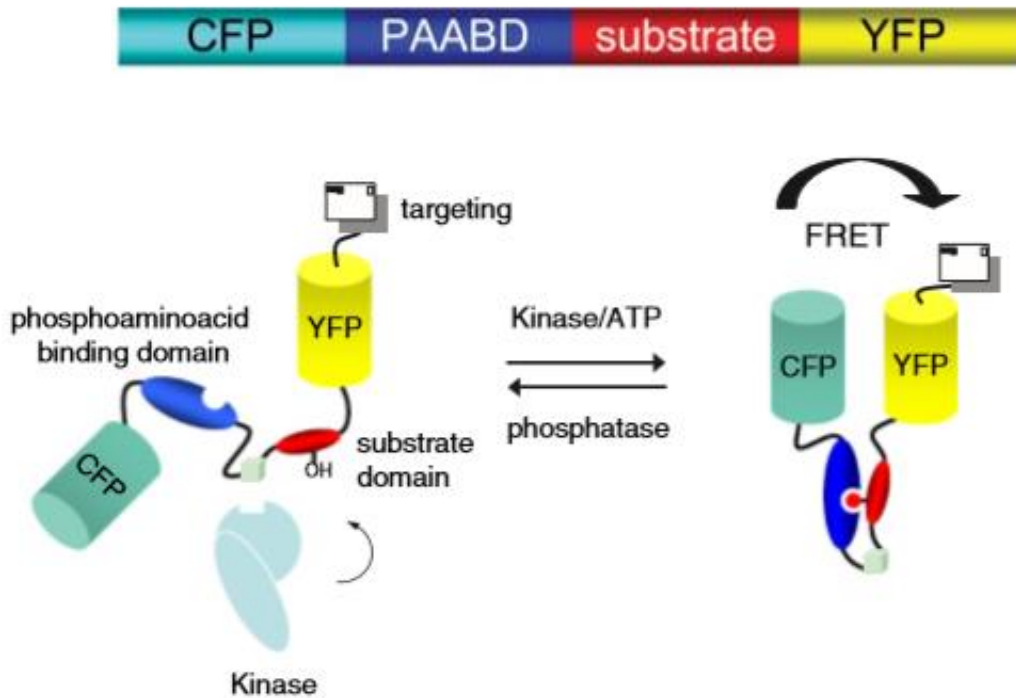
La transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), es un proceso físico mediante el cual un fluoróforo donador en un estado excitado transfiere su energía en forma de fotón a un fluoróforo aceptor vecino, lo que hace que el aceptor emita fluorescencia en su longitud de onda característica. La eficacia de FRET depende en gran medida de la distancia y orientación del donante y del aceptor (<10nm), y de la superposición espectral de los fluoróforos, (Ni, *et al*, 2006; Zhang y Allen, 2007; Oldach y Zhang, 2014).

Los Kars, son reporteros fluorescentes que están diseñados con alta especificidad, lo que permite determinar los niveles de activación de la cinasa de interés con alta sensibilidad y de manera cuantitativa, proporcionando así medios para probar la función bioquímica y la dinámica de determinadas cinasas en células vivas, a través de cambios detectables de la emisión de fluorescencia de la molécula aceptora de fotones (Zhou, *et al*, 2012; Vera y Morris, 2015).

### 5.2.1 Biosensores de actividad cinasa

El desarrollo de reporteros de actividad cinasa ha iniciado una nueva era de investigación de transducción de señales. Dichos reporteros proporcionan un medio para estudiar la función de las proteínas cinasas en tiempo real y para obtener imágenes del comportamiento de estas enzimas en células vivas con alta resolución espacial y temporal.

Los reporteros de actividad cinasa, consisten de cuatro módulos básicos, una proteína fluorescente donadora (por ejemplo, CFP), seguido de un dominio de unión a fosfoaminoácidos (PAABD) y después la secuencia consenso de fosforilación para la cinasa de interés que se une al sustrato fosforilado y una proteína fluorescente aceptora (por ejemplo, YFP). Tras la fosforilación del sustrato, el PAABD se une al fosfopéptido, alterando la distancia y / o la orientación entre los fluoróforos donantes y aceptores, dando como resultado un cambio detectable en FRET. (Figura). (Ni, *et al*, 2006; Zhang y Allen, 2007; Zhang y Depry, 2010; Oldach y Zhang, 2014).



**Figura 8. Diseño general y mecanismo de reporteros de actividad cinasa.** Consisten en una secuencia de sustrato específica de cinasa, unido a un dominio de unión a fosfoaminoácidos (PAABD), intercalado entre dos proteínas fluorescentes (FP) (Tomada de Ni, *et al*, 2006).

La respuesta de FRET generada por los biosensores de actividad cinasa depende de las proteínas fluorescentes utilizadas y puede detectarse mediante mediciones radiométricas entre la señal de intensidad del donante y el aceptor (Ni, *et al*, 2006; Day y Davidson, 2012).

Para investigar la actividad de cinasa espacialmente localizada, estos biosensores pueden dirigirse específicamente a diversos compartimentos celulares, como el citoplasma, núcleo, retículo endoplásmico, mitocondria o membrana plasmática. Este anclaje a compartimentos intracelulares definidos se logra mediante la adición de secuencias de localización al organelo de interés en el extremo N-terminal o C-terminal del reportero (Allen, y Zhang, 2006; Kunkel, 2009; Zhang y Depry, 2010).

En los últimos años, se han creado diferentes biosensores basados en FRET para estudiar la actividad de cinasas de Serina/Treonina y Tirosina. El primer biosensor en desarrollarse fue diseñado para la proteína PKA, a partir de este, se han creado muchos reporteros nuevos mediante la sustitución de la secuencia fosfoaceptora, por la secuencia consenso de fosforilación de la cinasa de interés, la cual servirá como un sustrato y la secuencia PAABD. Algunos ejemplos de los KARs que se han diseñado son para las proteínas cinasas Akt, Src, PKC, PKD, receptor de insulina, receptor de crecimiento epidérmico, entre otros (Zhang y Allen, 2007; Depry, *et al.*, 2015).

## **6. Justificación**

PAK1 desempeña un papel importante en la regulación de diversas rutas de señalización y procesos celulares tales como la motilidad celular, la división celular, la reorganización del citoesqueleto, la transcripción de genes y la apoptosis, mediante la fosforilación de distintos sustratos.

La función versátil de PAK1 se basa, al menos en parte, a sus múltiples localizaciones celulares, sin embargo, comprender los mecanismos moleculares precisos de la translocación y activación de PAK1 sigue siendo un desafío y hasta la fecha, no se ha descrito la dinámica de activación de esta cinasa en los distintos compartimentos sub-celulares, por lo que se desconoce si PAK1 se activa primero en la membrana plasmática o en el citoplasma, esto se debe en parte a las limitaciones en las técnicas bioquímicas convencionales, por lo que el desarrollo de nuevas tecnologías, como el grupo de reporteros de la actividad de cinasa basados en FRET nos permitirá estudiar la dinámica de activación de esta cinasa en células vivas.

## **7. Objetivo General**

1) Diseñar un reportero de la actividad de cinasa basado en FRET que sea específico para monitorear la actividad de PAK1 en la membrana plasmática.

### **7.1 Objetivos Particulares**

1. Sustituir la secuencia consenso de fosforilación de PKA en el reportero AKAR4 por la secuencia óptima de fosforilación para las PAKs del grupo I mediante Mutagénesis sitio dirigida
2. Determinar la expresión del reportero de PAK1 en la membrana plasmática mediante microscopia confocal.
3. Determinar la localización del reportero de PAK1 en la membrana plasmática mediante fraccionamiento celular.

4. Validar la eficiencia del reportero basado en FRET para monitorear la actividad de PAK1 en células vivas

## 8. MATERIALES Y METODOS

### 8.1 Cultivo celular

La línea celular de riñón embrionario humano HEK293T se cultivó en medio DMEM-F12 (BIOWEST). Este medio se complementó con suero bovino fetal al 10% (GIBCO) y 2mM de L-glutamina (GIBCO), y 1X de penicilina-estreptomicina 100X (10,000U / mL, BIOWEST). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37 ° C en una incubadora humidificada en una atmósfera de 5% de CO<sup>2</sup> / 95% de aire.

### 8.2 Mutagénesis sitio dirigida

Para generar un biosensor basado en FRET específico para PAK1 , se realizaron mutaciones puntuales en el vector pCDNA3 – AKAR-4-Kras (biosensor para PKA), utilizando el kit de Mutagénesis sitio dirigida QuikChange II, con el propósito de sustituir la secuencia consenso de fosforilación de PKA **GLRRATLVD** por la secuencia óptima de fosforilación de las PAK del grupo I **LRRASWYFS** , se realizó bajo el siguiente protocolo, brevemente, se mezclaron 10 ng de molde de DNA, 10 mM de oligonucleótidos que contienen las mutaciones relevantes, 1U de polimerasa PFU, 10 mM dNTPs y agua, en un volumen final de 50 µL, la mezcla se sometió a reacción de PCR con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 95°C por 2 min, desnaturalización 95 °C por 45 seg, alineamiento 55°C por 45 seg, extensión 68°C por 16 min y un paso de extensión final a 68° C a 10 min. La mezcla se incubó con 1 µL de la endonucleasa DpnI a 37 ° C durante 1 h con la finalidad de digerir el DNA molde metilado.

### 8.3 Transformación en bacterias competentes *E.coli* DH5α.

La transformación se llevó acabo mezclando 10 µl de la reacción de ligación con 50 µl de células competentes, la mezcla se dejó incubar por 60 minutos a 4°C. Posteriormente se aplicó un choque térmico a 42°C durante 2 min, para luego añadir 1 ml de medio LB estéril sin antibióticos y se incubó durante 1 hora a 37°C en agitación. Posteriormente las bacterias se centrifugaron a 5000 rpm durante 2 minutos, se retiró el sobrenadante y se añadió 0.1 ml de LB suplementado con



ampicilina (100 µg / ml) y se incubo a 37° C toda la noche, para el crecimiento bacteriano.

#### **8.4 Purificación del DNA plasmídico por lisis alcalina (Mini prep)**

Para la purificación del vector, las colonias se inocularon en 5 ml de medio LB-Amp (100 µg / mL), y se dejaron crecer durante 13 horas a 37°C en agitación continua. La purificación de los plásmidos se realizó utilizando el kit de miniprep de plásmidos GenJet (Thermo), bajo el siguiente protocolo: después del crecimiento bacteriano, se centrifugaron 3 mL en un tubo eppendorf a 5,000 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 250 µL de buffer de resuspensión (suplementado con RNasa A). Posteriormente se añadieron 250 µL de buffer de lisis (que contenía NaOH y SDS), para después agregar 350 µL de tampón de neutralización, se mezcló por inversión y se centrifugó a 13.500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, el sobrenadante (que contenía el plásmido) se recuperó y se transfirió a la columna, se centrifugo a 13,500 rpm durante 1 min. Posteriormente, se añadieron 500µL de solución de lavado a la columna y se centrifugó a 13,500 rpm durante 1 min, el sobrenadante se desechó, se repitió este último paso. La columna se centrifugó durante un min adicional, para eliminar exceso de solución de lavado. Finalmente, se añadieron 50 µL de buffer de elución a la columna y se incubo durante 2 minutos a temperatura ambiente. La columna se centrifugó a 13,500 rpm durante 2 minutos. La integridad de los plásmidos se confirmó en un gel de agarosa al 0.8%.

#### **8.5 Determinación de la concentración de DNA plasmídico.**

La concentración del DNA del plásmido fue medida por espectrofotometría en el equipo EPOCH BIOTEK. Se usó 1 µL de buffer de elución como blanco y un 1µL de la muestra para la medición.

## **8.6 Digestión del vector de membrana**

El vector se digirió con BamHI y EcoRI, brevemente: 2 µg de la construcción se digirió con 1U EcoRI, 2U BamHI, 4µL Buffer Tango 10X (Thermo Scientific) en un volumen final de 20 µL, esta mezcla se incubó a 37°C durante 2 horas, el fragmento liberado se determinó migrando la digestión en un gel de agarosa al 0.8%.

## **8.7 Secuenciación de PKAR-Kras.**

Las muestras se secuenciaron utilizando un oligonucleotido (5´CAAGTGCTTAAGGAA 3´) específico para verificar la sustitución de secuencias de fosforilación, las muestras fueron llevadas a la Unidad de bioprototipos en la FES Iztacala UNAM, donde fueron analizadas mediante secuenciación de Sanger.

## **8.8 Análisis bioinformático de la fosforilación del biosensor PKAR-Kras mediado por PAK1**

Usando el software Group- Based Prediction System (GPS) 3.0, se analizaron las cinasas que pudiesen fosforilar al biosensor PKAR. Se tomaron como candidatos los sitios con un score mayor a 10 (el score es el valor calculado por el algoritmo GPS para evaluar el potencial de fosforilación, cuanto mayor sea el valor será el potencial de fosforilación del residuo).

## **8.9 Transfección del vector PKAR-Kras**

La línea celular HEK293T se sembró en cubreobjetos estériles colocados en una placa de 6 pozos y se dejaron establecer durante 24 horas. Posteriormente fueron transfectadas con 2 µL de reactivo Lipofectamine 2000® (Invitrogen) que se diluyó en 50 µL de Opti-MEM® (GIBCO) y combinado con 1.5 µg del plásmido PKAR-Kras diluido en 50 µL de Opti-MEM®. Posteriormente se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Brevemente se lavaron las células con 1ml de PBS 1x estéril (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, pH 7,4) y se les añadió 1 ml de DMEM-F12 y la mezcla de DNA Lipofectamine se añadió a cada pozo por goteo. Se dejó que las células expresaran la proteína durante 48 h después de la transfección, se lavaron con PBS 1x (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM,

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM, pH 7,4) y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, los cubreobjetos se montaron en un portaobjetos con 25 µl de medio de montaje sin DAPI y se sellaron con barniz. Las células se visualizaron utilizando el microscopio confocal Leica TCS SP5 X. Las imágenes se adquirieron con el software LAS X 2017.

### **8.10 Fraccionamiento celular**

Se sembraron 2 placas Petri de la línea celular HEK283T, se dejaron establecer 24 hrs hasta alcanzar una confluencia de 70%. Posteriormente una de las placas fue transfectada con 30 µL de reactivo Lipofectamine 2000® (Invitrogen) y 10 µg del vector PKAR-Kras durante 48 horas. Una vez concluida las 48 hrs, las cajas Petri se colocaron en hielo. A continuación se decantó el medio de cultivo y se lavaron con 2mL de buffer fosfatos frio (PBS, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, pH 7,4) frio y se agregó 1mL de Buffer A (20mM Tris-HCl, 0.25M sacarosa, 2mM EDTA, 2mM EGTA, pH = 7.5, cóctel de inhibidores de proteasas) por placa y se desprenden las células con gendarme. La suspensión celular se colocó en microtubos Eppendorf, previamente etiquetados, y se colocó en hielo seco hasta la congelación de la suspensión. Posteriormente se descongeló la suspensión celular y se centrifugó a 2,800 g por 10min a 4°C. La suspensión (citoplasma y membrana) se colocó en tubos de policarbonato con tapa. Los pellets (núcleos) se re-suspendieron en 400µL de Buffer A. Los tubos de policarbonato se pesaron y se parearon de acuerdo con el peso. Los tubos se centrifugaron a 200,000 g por 1:45h a 4°C en ultracentrífuga. La suspensión (citoplasma) se recuperó en microtubos Eppendorf y se guardó a -20 °C. El pellet (membrana) se re-suspendió en 2mL de Buffer B (20mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 150mM de NaCl, 1% Tritón X-100, pH=7.5, con cóctel de inhibidores de proteasas) y se incubaron durante 20min en hielo. Transcurrido el tiempo de incubación, los tubos se agitaron en vortex para desprender el pellet. Posteriormente, los pellets se pasaron por una jeringa de insulina para que estén bien disueltos. Nuevamente los tubos se pesaron y parearon y se centrifugaron a 16,000 g por 15 min a 4°C en ultracentrífuga. La suspensión (membrana) se recupera en microtubos Eppendorf y se guarda a – 20°C.

### **8.11 Cuantificación de proteínas**

La cuantificación para determinar la concentración de proteínas se realizó por el método de Lowry (el cual se basa en una reacción producida por el  $\text{Cu}^{2+}$ , que es producida por la oxidación de los enlaces peptídicos), usando el kit DC Protein Assay (Biorad), siguiendo el protocolo del fabricante y utilizando una curva patrón con albúmina de suero bovino con concentraciones de 0 a 1 mg/mL (Lowry, *et al.*, 1951). Las lecturas de absorbancia se midieron a 750 nm en el equipo EPOCH (BIOTEK).

### **8.12 Western Blot.**

Para analizar verificar la localización del reportero PKAR-Kras, se emplearon los extractos de proteínas de núcleo, membrana y citoplasma, obtenidos de la línea celular HEK293T, se empleó el siguiente protocolo. Brevemente, 30  $\mu\text{g}$  de proteínas fueron separados en geles de poliacrilamida al 8, 10% y 15% por electroforesis a 120 V durante 1hr 30 min, posteriormente se transfirieron a una membrana Immun-Blot PVDF® (BIO RAD) durante 2 hrs a 350 mA. Para verificar la transferencia de las proteínas a la membrana de PVDF, se tiñó la membrana con una solución de rojo de Ponceau 0.5% en ácido acético al 2% durante 5 minutos en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con leche al 5% en TBS-Tween 20 al 0.1% durante 1 hr a temperatura ambiente en agitación. A continuación las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios dirigidos contra las proteínas GFP (1:1500), vinculina para la fracción citoplasmática (1:1000), histona 3-acetilada para la fracción de núcleo (1:1000) y N-cadherina (1:2500) para la fracción de membrana, durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente las membranas se lavaron 3 veces con TBS-Tween 20 al 0.1% durante 15 minutos en agitación a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron en presencia de los anticuerpos secundarios respectivos, los cuales estaban acoplados a HRP. El anticuerpo anti-conejo se utilizó a una dilución 1:10,000, y el anti-ratón a una dilución 1:10,000 todos ellos de Cell Signaling Technology, en TBS-Tween 20 al 0.1% con leche al 5% durante 1 hr a temperatura ambiente, las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS-Tween 20 al 0.1% durante 15 min. La inmunodetección

de las proteínas se realizó mediante quimioluminiscencia, empleando el kit Clarity ECL Western Substrate (Bio Rad).

### **8.13 Eficiencia de FRET en células vivas.**

La línea celular HEK293T se sembró en cubreobjetos de vidrio estériles colocados en una placa de 35 mm (Thermofisher), y se cultivaron hasta una confluencia del 70% en DMEM con suero fetal bovino al 10% a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células fueron transfectadas con las construcciones PKAR-Kras y PKAR localización citoplasmática bajo el protocolo ya establecido con Lipofectamine 2000® (Invitrogen), después de 24 hrs las células se lavaron con PBS. Brevemente las células se pusieron en ayuno con 2 ml de Opti-MEM® (GIBCO) durante 2 hrs, transcurrido el tiempo las células se estimularon con EGF y se visualizaron en un microscopio confocal. Para la obtención de la eficiencia de FRET, se obtuvieron los valores estadísticos de las relaciones de emisión de CFP e YFP de las muestras capturadas antes y después del fotoblanqueo del aceptor, la eficiencia de FRET se obtuvo de acuerdo con la siguiente fórmula:

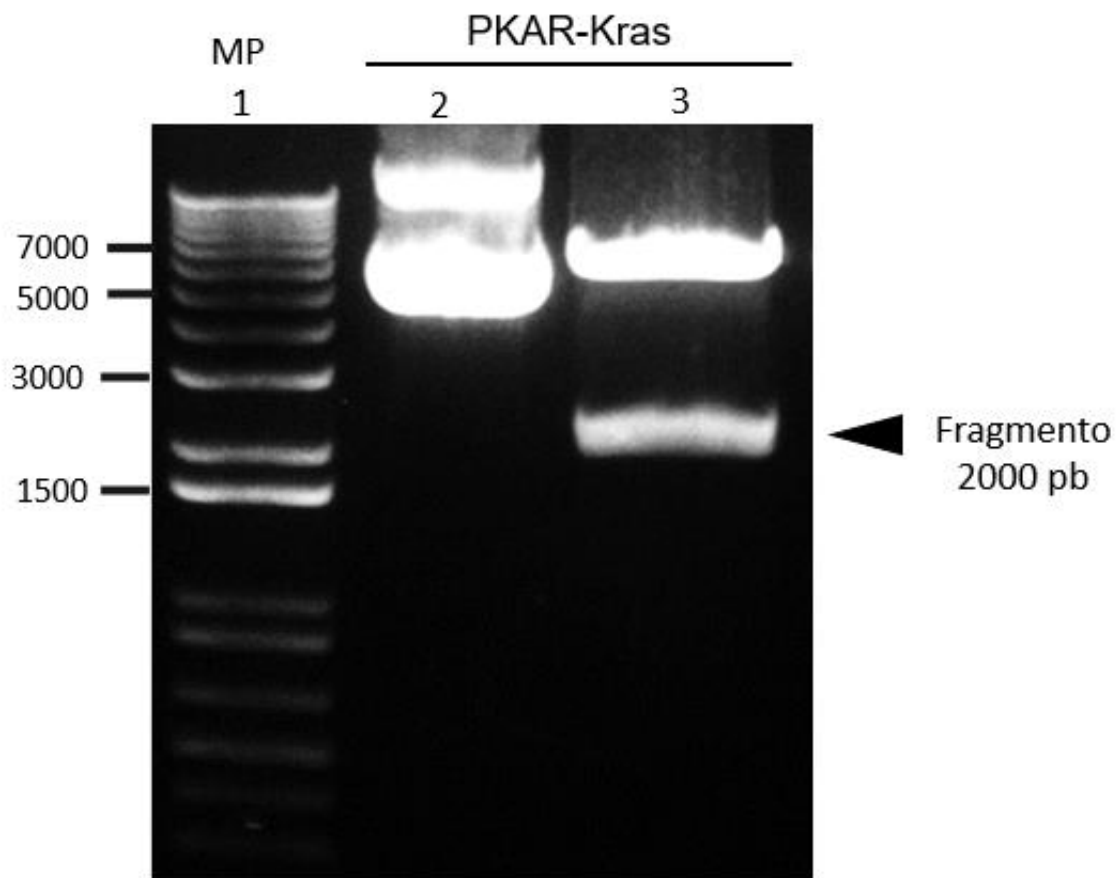
$$\text{Eficiencia FRET} = \frac{D_{\text{post}} - D_{\text{pre}}}{D_{\text{post}}}$$

Donde  $D_{\text{post}}$  es la intensidad de fluorescencia del donador después del fotoblanqueo y  $D_{\text{pre}}$  es la intensidad de fluorescencia del donador antes del fotoblanqueo.

## 9. Resultados

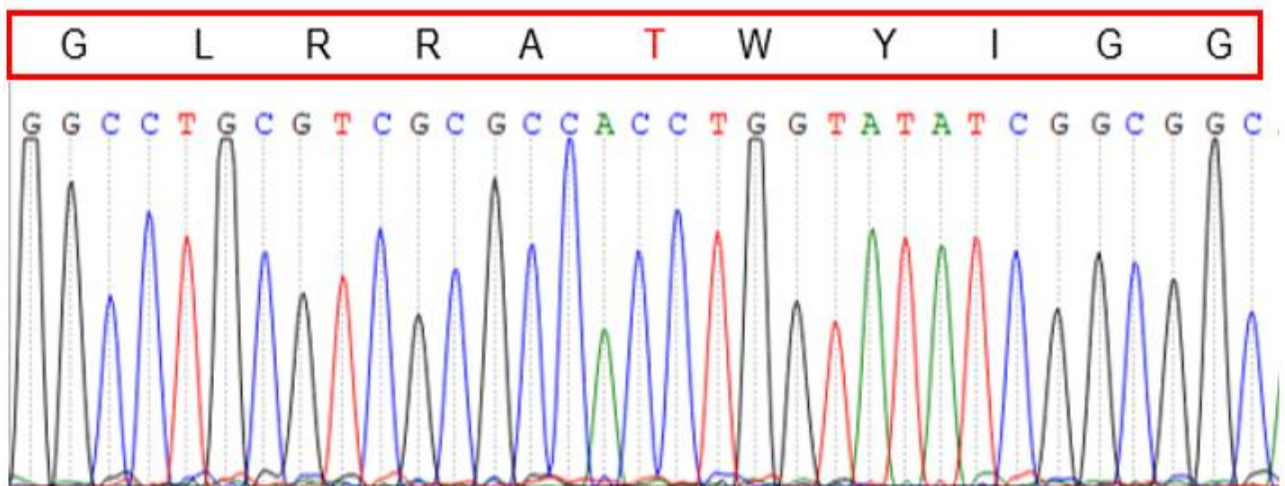
### Generación del biosensor para monitorear la actividad de PAK1 en la membrana plasmática.

Para la obtención del reportero PKAR, se realizó la sustitución de la secuencia consenso de fosforilación de PKA GLRRAILVD por la secuencia consenso de fosforilación para las PAK de grupo I LRRRASWYFS, para este propósito el plásmido PKAR-Kras se usó como DNA molde en una reacción de mutagénesis sitio dirigida por PCR empleando oligonucleótidos que contienen las mutaciones deseadas. La reacción se digirió con la enzima DpnI y se transformó en células competentes de *E. coli*. El plásmido se purificó y se utilizó en un ensayo de restricción enzimática con el propósito de verificar la identidad del vector, el resultado de esta reacción se migró en un gel de agarosa al 0.8%, en la figura 9 se observa en el segundo carril el vector sin digerir en un peso de 7000 pb, y el tercer carril el vector digerido con un peso aproximado de 2000 pb.



**Fig 9. Digestión del vector PKAR-Kras con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI.** El primer carril corresponde al marcador de peso molecular, el segundo carril se observa el vector sin digerir y en el último carril se observa el vector digerido en un peso aproximado de 2000 pb.

Posteriormente, el plásmido fue analizado mediante secuenciación con la finalidad de verificar la sustitución de las secuencias, en la figura 10 se muestra el electroferograma, el cual revela que la secuencia de fosforilación del vector PKAR-Kras es GLRRATWYIGG.



**Figura 10. Electroferograma del plásmido PKAR-Kras.** Se observa en el cuadro rojo la secuencia obtenida del vector PKAR-kras.

Posteriormente, se realizó un análisis *in silico* con el objetivo de determinar si PAK1 u otras cinasas podrían fosforilar al biosensor PKAR-Kras, empleando el software bioinformático Group-Based Prediction System (GPS 3.0), en el cual se comparó la secuencia de fosforilación de PKAR con otras cinasas diferentes a PAK1. Los resultados del análisis arrojaron que PAK1 tenía alta probabilidad de fosforilar a nuestro reportero con un score de 11.68 (figura 11).

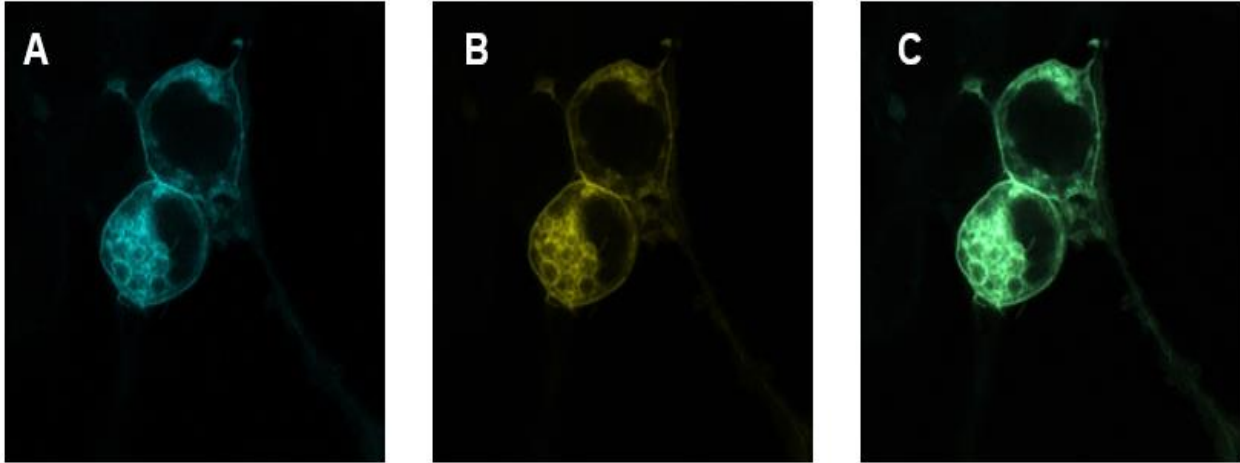
Código	Cinasa	Péptido	Score	Cutoff
T	PAK1	GLRRATWYIGG	11.684	9.701
T	PAK2	GLRRATWYIGG	3.875	2.05
T	PAK3	GLRRATWYIGG	8.067	5.9

**Figura 11. Análisis *in silico* de fosforilación del reportero PKAR mediada por PAK1.**

### **Expresión del biosensor de PKAR-Kras en la membrana plasmática mediante microscopia confocal.**

El biosensor PKAR posee la secuencia de miristilación de K-Ras en su extremo C-terminal, lo que permite su anclaje a la membrana plasmática, con la finalidad de evaluar la correcta localización sub-celular del reportero en la membrana plasmática, las células HEK293T fueron transfectadas con nuestra construcción, y la localización del reportero se analizó empleando microscopía confocal. Los resultados obtenidos indican que la proteína fluorescente cian y la proteína fluorescente amarilla se expresan uniformemente a lo largo de la membrana plasmática (figura 12).



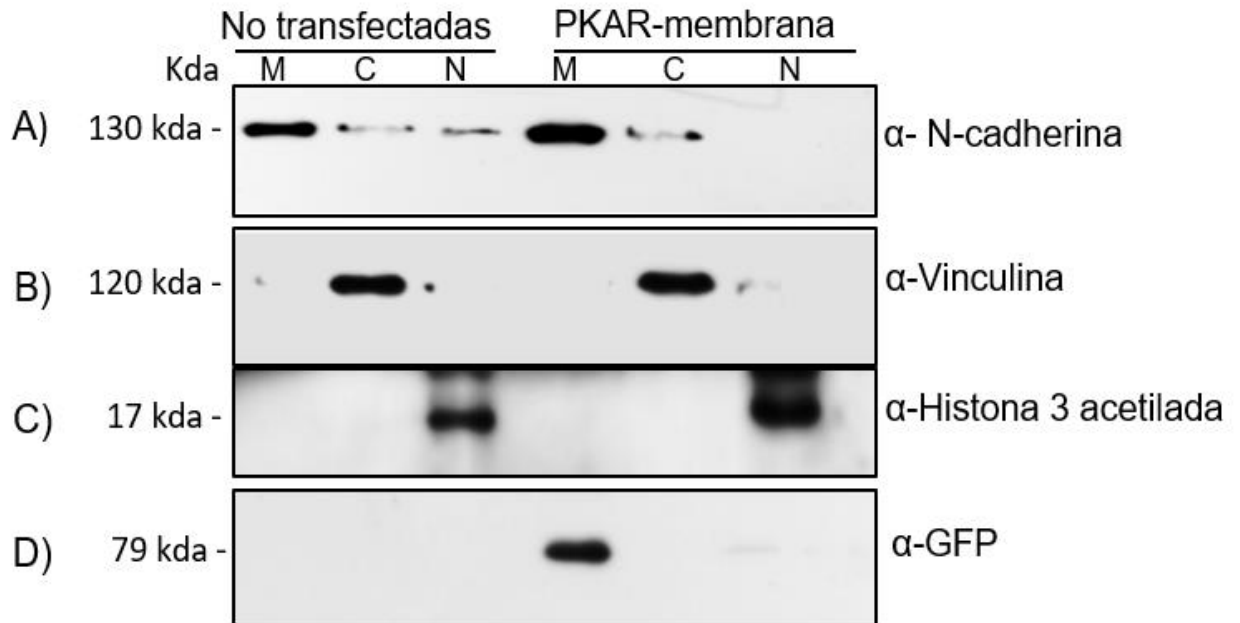


**Figura 12. Microscopia confocal células HEK293T transfectadas con el vector PKAR-Kras.** Los paneles A y B muestran la expresión de la proteína fluorescente cian y amarilla en la membrana plasmática, así como en el retículo endoplasmático, en el panel C se muestra la superposición de ambas señales de fluorescencia.

#### **Localización específica del biosensor PKAR-Kras en membrana plasmática mediante fraccionamiento celular.**

Con la finalidad de corroborar la localización del biosensor PKAR-Kras en la membrana plasmática, el vector de expresión que lo codifica se transfectó en la línea celular HEK293T, los lisados celulares totales se sometieron a fraccionamiento celular por ultracentrifugación para obtener extractos proteicos de membrana, citoplasma y núcleo. Posteriormente los extractos proteicos de cada fracción celular se analizaron mediante Western blot empleando anticuerpos específicos. Los resultados obtenidos muestran que al emplear el anticuerpo anti-cadherina únicamente se muestra una señal enriquecida en la fracción de membrana plasmática en las células no transfectadas y transfectadas con el biosensor, al realizar la inmunodetección con anti-vinculina se observa únicamente una señal en la fracción de citoplasma, cuando se emplea anti-histona3 acetilada se observa una señal únicamente en la fracción nuclear. Finalmente al realizar la inmunodetección con el anticuerpo anti-GFP se observa una señal únicamente en la fracción de membrana plasmática en las células que fueron transfectadas con el biosensor, lo

que comprueba que el biosensor PKAR se localiza únicamente en la membrana plasmática (figura 13).



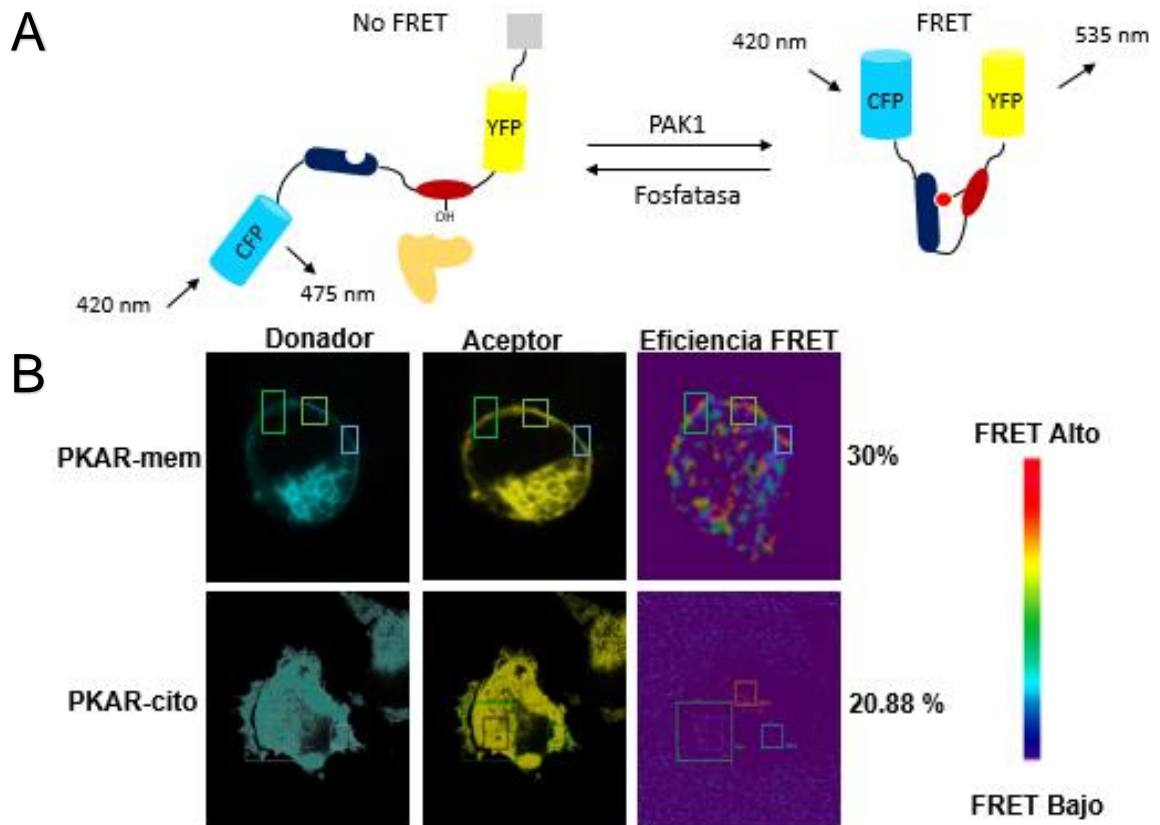
**Figura 13. Detección de la localización del biosensor PKAR-Kras.** Western blot del biosensor PKAR-Kras en células HEK293T, demostró que se expresa en membrana plasmática empleando anticuerpo N-Cadherina (A), en citoplasma: anti-vinculina (B), y en Núcleo: anti-histona3 acetilada (C). Se comprobó su localización en la membrana plasmática detectando con el anticuerpo GFP al reportero (D). Para todos los casos se utilizó como control las células no transfectadas.

### **Eficiencia del biosensor PKAR-Kras en células vivas.**

Finalmente, con la finalidad de conocer la dinámica de activación de PAK1 en la membrana plasmática y citoplasma, se realizó una transfección en las células HEK293T con las construcciones PKAR-kras y PKAR localización citoplasmática. Las células se colocaron en medio libres de suero durante 1 hora y se estimularon con EGF, posteriormente se visualizaron en un microscópico confocal. En la figura 14-A se muestra la estructura de los biosensores y su mecanismo de activación, cuando el residuo de Treonina (se indica con un OH) es fosforilado por PAK1 es reconocido por el dominio FHA1 que tiene la capacidad de unirse a treoninas fosforiladas, generando un cambio conformacional del biosensor que permite la proximidad entre CFP y YFP para que el FRET se lleve a cabo.

En la figura 14B se muestran las imágenes representativas de las células capturas en los canales CFP y YFP antes del fotoblanqueo. Se usó el software confocal Leica para obtener los valores estadísticos y calcular la densidad óptica de cada punto en la imagen, obteniendo así el gráfico de distribución de eficiencia de FRET para ambos biosensores, como se muestra en la figura 14 B los ROIs fueron seleccionados para calcular la eficiencia de FRET para los dos biosensores en diferentes posiciones, la transición de púrpura a rojo indica el aumento en la eficiencia de FRET, es decir, indica la emisión de fluorescencia de la proteína fluorescente aceptora de fotones (YFP), después de la excitación de la proteína donadora de fotones (CFP). La eficiencia de FRET en el caso del biosensor de membrana plasmática fue de 30% y se observó una respuesta inmediata tras la estimulación con EGF. Para el biosensor de citoplasma la eficiencia de FRET fue de 20.88 % y se observó una respuesta lenta después de la estimulación con EGF.

La eficiencia de FRET así como la respuesta del biosensor PKAR-kras fue mayor en comparación con el biosensor PKAR de localización citoplasmática después de la estimulación con EGF, lo que sugiere que PAK1 se activa primero en la membrana plasmática y después en el citoplasma.



**Figura 14. Eficiencia de FRET de los biosensor PKAR-Kras y PKAR localización citoplasmática en células HEK293T.** A) Descripción del mecanismo de activación del biosensor. Cuando PAK1 se encuentra inactiva, la molécula donadora de fotón (CFP) se encuentra espacialmente lejos de la molécula aceptora del fotón (YFP), y cuando el residuo de Treonina (se indica el grupo OH en donde se lleva a cabo la transferencia del fosfato) es fosforilado, es reconocido por el dominio FHA1, generando un cambio conformacional del reportero que permite la proximidad entre CFP y YFP para que el FRET se lleve a cabo. B) Se muestran las proteínas CFP y YFP de los biosensores de membrana plasmática y citoplasma antes del fotoblaqueo. Las imágenes de pseudocolor muestran las respuestas de los biosensores, se seleccionaron los ROI para calcular la eficiencia de FRET. El biosensor PKAR-Kras mostro una eficiencia de 30%, mientras PKAR de localización citoplasmática de 28.88%.

## 10. Discusión

En condiciones fisiológicas normales, los miembros de la familia PAK desempeñan funciones esenciales en una amplia gama de procesos celulares, en particular PAK1 es un regulador clave de una gran variedad de procesos celulares tales como la motilidad celular, la división celular, la reorganización del citoesqueleto, la transcripción de genes y la apoptosis, y su actividad aberrante ha sido relacionada con el desarrollo de diversas enfermedades, entre ellas el cáncer. Diversos estudios han demostrado que la función versátil de PAK1 se basa, al menos en parte, a su capacidad de translocarse a la membrana plasmática, al citoplasma y al núcleo, esta localización dinámica contribuye a su activación o inactivación, a la fosforilación eficiente de sus sustratos, a la interacción con otras proteínas, y en consecuencia a la especificidad de su función biológica, sin embargo no se ha descrito la dinámica de activación de PAK1 en los distintos compartimentos sub-celulares, por lo que se desconoce si esta cinasa se activa primero en la membrana plasmática o en el citoplasma (Bokoch, et al., 1998; Buschwald, et al., 2001; Zhao y Manser, 2012; Parrini, 2012).

Teniendo en cuenta el papel clave que desempeña PAK1 en los procesos fisiológicos, además de su reciente implicación en la carcinogénesis, es necesario conocer la relación entre la localización y activación de esta cinasa. Los estudios estructurales y bioquímicos *in vitro* han demostrado que PAK1 se encuentra normalmente autoinhibida y que su activación se produce por eventos de autofosforilación a través de mecanismos dependientes o independientes de GTPasas como Rac1 y Cdc42 (Lei, et al, 2000; Chong y Manser, 2001). Sin embargo la comprensión de los mecanismos moleculares precisos de translocación y activación de esta cinasa se ha visto obstaculizada principalmente a las limitaciones de las técnicas bioquímicas y genéticas tradicionales, ya que estos métodos pueden no alcanzar una resolución espacial y temporal precisa de los eventos de señalización, debido a que se requiere del fraccionamiento o la tinción de las células que se han lisado o fijado en puntos de tiempo definidos (Parrini y Gunzburg, 2005; Zhang y Allen, 2007; Parrini, 2012).

Recientemente, gracias a los avances tecnológicos en microscopia de células vivas, combinados con el diseño de proteínas fluorescentes codificadas genéticamente se han desarrollado nuevas herramientas como los reporteros de actividad cinasa basados en FRET. Estos biosensores se desarrollaron mediante la clonación de proteínas fluorescentes derivadas de la proteína verde fluorescentes (GFP) junto con una secuencia de fosforilación específica de la cinasa de interés y un dominio de unión a aminoácidos fosforilados (PAABD). Las construcciones que codifican estos biosensores pueden transfectarse fácilmente y medir la actividad cinasa a través de los cambios en FRET. Estos biosensores se han implementado amplia y exitosamente para estudiar la actividad catalítica de distintas cinasas como PKA, PKC, PKD, Akt entre otras, en diversos fenómenos en un entorno celular nativo con alta resolución espacial y temporal en células vivas (Zhang y Allen, 2007; Gallegos y Newton, 2011; Miura, *et al.*, 2014).

Estas nuevas herramientas nos permitirán comprender mejor la biología PAK1, por lo que en este trabajo diseñamos y caracterizamos un reportero basado en FRET específico para monitorear la actividad de PAK1 en la membrana plasmática al que llamamos PKAR-Kras. El reportero de actividad cinasa PKAR es similar estructuralmente al biosensor para PKA (AKAR4), en el cual, la molécula donadora de fotón es la Proteína Cian Fluorescente, la cual se encuentra fusionada a un dominio Forkhead, la secuencia consenso de fosforilación de PAK1 y como molécula donadora la Proteína Amarilla Fluorescente. En primer lugar, para comprobar que nuestro biosensor es fosforilado únicamente por PAK1 se realizó un análisis *in silico*, los resultados obtenidos de este ensayo demostraron que PKAR es altamente específico para la fosforilación de PAK1. Posteriormente se realizaron ensayos de microscopia confocal y Western blot para confirmar que nuestro biosensor se exprese y se localice específicamente en la membrana plasmática, las imágenes mostraron la ubicación correcta de este biosensor en las células HEK293T.

Posterior a esto, para confirmar que el biosensor nos permita estudiar la actividad de PAK1 en la membrana plasmática y el citoplasma a través de los cambios en FRET, realizamos la medición de la eficiencia de FRET del biosensor PKAR dirigido a la membrana plasmática y del biosensor PKAR dirigido al citoplasma. Los datos revelaron que el biosensor de membrana plasmática tuvo una respuesta y una eficiencia del 30 % después de la estimulación con EGF, mientras que el biosensor de citoplasma mostro una respuesta lenta y una eficiencia de 28.88% tras la estimulación con EGF, estos datos sugieren que PAK1 se activa inicialmente en membrana plasmática y después en citoplasma.

En conclusión, describimos un nuevo biosensor basado en FRET que es altamente específico para monitorear la actividad de PAK1 en la membrana plasmática. Los datos obtenidos en este trabajo validan la viabilidad y el poder de esta herramienta, sin embargo se requieren de más estudios para comprender mejor la regulación compleja y precisa de la actividad de la cinasa PAK1 en un contexto de células vivas durante la realización de distintos procesos celulares regulados por PAK1.

## **11. Conclusiones.**

- Se diseñó un biosensor específico para monitorear la actividad catalítica de PAK1 en la membrana plasmática.
- Se demostró que el biosensor PKAR se localiza en membrana plasmática.
- Se demostró que el biosensor PKAR-Kras tiene una eficiencia de FRET de 30%, mientras la eficiencia del biosensor de PKAR de citoplasma fue de 20.8% por lo que nos permite estudiar la actividad de PAK1 en estos compartimentos celulares.

## **12. Perspectivas**

- Determinar la dinámica de activación de PAK1 en membrana plasmática y citoplasma mediante imágenes de Time-lapse FRET.
- Diseñar un biosensor dirigido que sea específico para monitorear la actividad de PAK1 en núcleo.
- Determinar la dinámica de activación de esta cinasa en membrana plasmática, citoplasma y núcleo en células con amplificación y/o sobre expresión de PAK1.



### 13. Referencias.

1. Allen, M.D., and Zhang, J. (2006). Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348, 716–721.
2. Ardito, F., Giuliani, M., Perrone, D., Troiano, G., and Muzio, L.L. (2017). The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int J Mol Med* 40, 271–280.
3. Arias-Romero, L.E., and Chernoff, J. (2008) A tale of two Paks. *Biology of the Cell* 100, 97–108.
4. Barford, D., Das, A.K., and Egloff, M.P. (1998). The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27, 133–164.
5. Bokoch, G.M. (2003). Biology of the p21-Activated Kinases. *Annual Review of Biochemistry* 72, 743–78.
6. Bokoch, G.M., Reilly, A.M., Daniels, R.H., King, C.C., Olivera, A., Spiegel, S., and Knaus, U.G. (1998). A GTPase-independent Mechanism of p21-activated Kinase Activation REGULATION BY SPHINGOSINE AND OTHER BIOLOGICALLY ACTIVE LIPIDS. *J. Biol. Chem.* 273, 8137–8144.
7. Buchwald, G., Hostinova, E., Rudolph, M.G., Kraemer, A., Sickmann, A., Meyer, H.E., Scheffzek, K., and Wittinghofer, A. (2001). Conformational Switch and Role of Phosphorylation in PAK Activation. *Mol Cell Biol* 21, 5179–5189.
8. Chong, C., Tan, L., Lim, L., and Manser, E. (2001). The Mechanism of PAK Activation AUTOPHOSPHORYLATION EVENTS IN BOTH REGULATORY AND KINASE DOMAINS CONTROL ACTIVITY. *J. Biol. Chem.* 276, 17347–17353.
9. Depry, C., and Zhang, J. (2010). Visualization of Kinase Activity with FRET-Based Activity Biosensors. *Current Protocols in Molecular Biology* 91, 18.15.1-18.15.9.
10. Depry, C., Mehta, S., Li, R., and Zhang, J. (2015). Visualization of Compartmentalized Kinase Activity Dynamics Using Adaptable BimKARs. *Chemistry & Biology* 22, 1470–1479.
11. Dummler, B., Ohshiro, K., Kumar, R., and Field, J. (2009). Pak protein kinases and their role in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 28, 51–63.
12. Duong-Ly, K.C., and Peterson, J.R. (2013). The Human Kinome and Kinase Inhibition as a therapeutic strategy. *Curr Protoc Pharmacol* 02, Unit2.9.

13. Gallegos, L.L., and Newton, A.C. (2011). Genetically encoded fluorescent reporters to visualize protein kinase C activation in live cells. *Methods Mol Biol* 756, 295–310.
14. González-Vera, J.A., and Morris, M.C. (2015). Fluorescent Reporters and Biosensors for Probing the Dynamic Behavior of Protein Kinases. *Proteomes* 3, 369–410.
15. Ha, B.H., Davis, M.J., Chen, C., Lou, H.J., Gao, J., Zhang, R., Krauthammer, M., Halaban, R., Schlessinger, J., Turk, B.E. (2012). Type II p21-activated kinases (PAKs) are regulated by an autoinhibitory pseudosubstrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 16107–16112.
16. Hodgson, D.R.W., and Schröder, M. (2011). Chemical approaches towards unravelling kinase-mediated signalling pathways. *Chem Soc Rev* 40, 1211–1223.
17. Hunter, T. (1991). Protein kinase classification. In *Methods in Enzymology*, (Academic Press), pp. 3–37.
18. Hunter, T. (2000). Signaling—2000 and Beyond. *Cell* 100, 113–127.
19. Jaffer, Z.M., and Chernoff, J. (2002). p21-Activated kinases: three more join the Pak. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34, 713–717
20. Jin, J., and Pawson, T. (2012). Modular evolution of phosphorylation-based signalling systems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367, 2540–2555.
21. King, H., Nicholas, N.S., and Wells, C.M. (2014). Role of p-21-activated kinases in cancer progression. *Int Rev Cell Mol Biol* 309, 347–387.
22. Knighton, D.R., Zheng, J.H., Ten Eyck, L.F., Ashford, V.A., Xuong, N.H., Taylor, S.S., and Sowadski, J.M. (1991). Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* 253, 407–414
23. Kunkel, M.T., and Newton, A.C. (2009). Spatiotemporal Dynamics of Kinase Signaling Visualized by Targeted Reporters. *Current Protocols in Chemical Biology* 1, 17.
24. Lei, M., Lu, W., Meng, W., Parrini, M.-C., Eck, M.J., Mayer, B.J., and Harrison, S.C. (2000). Structure of PAK1 in an Autoinhibited Conformation Reveals a Multistage Activation Switch. *Cell* 102, 387–397.
25. Lin, J., Xie, Z., Zhu, H., and Qian, J. (2010). Understanding protein phosphorylation on a systems level. *Brief Funct Genomics* 9, 32–42.
26. Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912–1934.
27. Mehta, S., and Zhang, J. (2011). Reporting from the Field: Genetically Encoded Fluorescent Reporters Uncover Signaling Dynamics in Living Biological Systems. *Annu Rev Biochem* 80, 375–401.

28. Miura, H., Matsuda, M., and Aoki, K. (2014). Development of a FRET Biosensor with High Specificity for Akt. *Cell Struct. Funct.* 39, 9–20.
29. Ni, Q., Titov, D.V., and Zhang, J. (2006). Analyzing protein kinase dynamics in living cells with FRET reporters. *Methods* 40, 279–286.
30. Oldach, L., and Zhang, J. (2014). Genetically Encoded Fluorescent Biosensors for Live-Cell Visualization of Protein Phosphorylation. *Chemistry & Biology* 21, 186–197.
31. Olive, D.M. (2004). Quantitative methods for the analysis of protein phosphorylation in drug development. *Expert Rev Proteomics* 1, 327–341.
32. Parrini, M.C. (2012). Untangling the complexity of PAK1 dynamics. *Cell Logist* 2, 78–83.
33. Parrini, M.C., Matsuda, M., and de Gunzburg, J. (2005). Spatiotemporal regulation of the Pak1 kinase. *Biochemical Society Transactions* 33, 646–648.
34. Radu, M., Semenova, G., Kosoff, R., and Chernoff, J. (2014). Pak Signaling in the Development and Progression of Cancer. *Nat Rev Cancer* 14, 13–25.

### **35. Referencias**

36. Rennefahrt, U.E.E., Deacon, S.W., Parker, S.A., Devarajan, K., Beeser, A., Chernoff, J., Knapp, S., Turk, B.E., and Peterson, J.R. (2007). Specificity profiling of Pak kinases allows identification of novel phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* 282, 15667–15678.
37. Schmelzle, K., and White, F.M. (2006). Phosphoproteomic approaches to elucidate cellular signaling networks. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 406–414.
38. Schwartz, P.A., and Murray, B.W. (2011). Protein kinase biochemistry and drug discovery. *Bioorg. Chem.* 39, 192–210.
39. Sefton, B.M., and Shenolikar, S. (1996). Overview of Protein Phosphorylation. *Current Protocols in Molecular Biology* 33, 18.1.1-18.1.5.
40. Semenova, G., and Chernoff, J. (2017). Targeting PAK1. *Biochem Soc Trans* 45, 79–88.
41. Ubersax, J.A., and Ferrell, J.E. (2007). Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 530–541.
42. Wang, Y., and Ma, H. (2015). Protein kinase profiling assays: a technology review. *Drug Discovery Today: Technologies* 18, 1–8.
43. Wang, Y., and Ma, H. (2015). Protein kinase profiling assays: a technology review. *Drug Discovery Today: Technologies* 18, 1–8.
44. Wang, Z., and Cole, P.A. (2014). Catalytic Mechanisms and Regulation of Protein Kinases. *Methods Enzymol* 548, 1–21.
45. Whale, A., Hashim, F.N., Fram, S., Jones, G.E., and Wells, C.M. (2011). Signalling to cancer cell invasion through PAK family kinases. *Front Biosci (Landmark Ed)* 16, 849–864.

46. Yan, J.X., Packer, N.H., Gooley, A.A., and Williams, K.L. (1998). Protein phosphorylation: technologies for the identification of phosphoamino acids. *Journal of Chromatography A* 808, 23–41.
47. Ye, D.Z., and Field, J. (2012). PAK signaling in cancer. *Cell Logist* 2, 105–116.
48. Zavalova, M.G., Zgodina, V.G., and Nikolaev, E.N. (2017). Analysis of the role of protein phosphorylation in the development of diseases. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B* 11, 203–218.
49. Zhang, J., and Allen, M.D. (2007). FRET-based biosensors for protein kinases: illuminating the kinome. *Mol Biosyst* 3, 759–765.
50. Zhao, Z., and Manser, E. (2012). PAK family kinases. *Cell Logist* 2, 59–68.
51. Zhou, X., Herbst-Robinson, K.J., and Zhang, J. (2012). Visualizing Dynamic Activities of Signaling Enzymes Using Genetically Encodable FRET-Based Biosensors: From Designs to Applications. *Methods Enzymol* 504, 317–340.