

Trabajo Fin de Grado

El uso de proteínas en investigación: el caso de
las cadherinas

The use of proteins in research: a cadherine
case study

Autor/es

Pablo Ruiz Bozal

Director/es

Raluca Maria Fratila
Eduardo Moreno Antolín

Facultad de Ciencias

2020

1 INDICE

2	Abreviaturas y acrónimos.....	2
3	Resumen.....	2
4	Summary	2
5	Introducción	3
5.1	Proteínas e investigación	3
5.2	Proteínas de adhesión.....	4
5.3	La superfamilia de las cadherinas	4
5.3.1	Cadherinas clásicas.....	4
5.3.2	Cadherinas desmosomales.....	5
5.3.3	Cadherinas atípicas	6
5.3.4	Protocadherinas	6
5.3.5	Proteínas señalizadoras relacionadas	6
6	Objetivos	6
7	Metodología	6
8	Cadherina E	7
8.1	La proteína	7
8.1.1	Gen	7
8.1.2	Traducción e isoformas	8
8.1.3	Regulación	8
8.1.4	Estructura y anclaje	10
8.1.5	Funciones moleculares.....	12
8.2	Implicaciones actuales	17
8.2.1	Implicaciones en el desarrollo.....	17
8.2.2	Implicaciones con el cáncer.....	18
8.3	Nuevas aplicaciones	19
8.3.1	Detección y profilaxis en HDGC.....	19
8.3.2	Superficies funcionalizadas	19
8.3.3	Partículas funcionalizadas	20
9	Discusión	21
10	Discussion	22
11	Bibliografía	23

2 ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- Cadherina E o E-cad: Cadherina Epitelial, cadherina 1 u ovomorulina.
- CCC: Cadherin-Catenin complex, complejo cadherina-catenina.
- EC: Repetición extracelular.
- EGF: Epidermal Growth Factor.
- EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor.
- EMT: Transición epitelio-mesenquimal.
- HDGC: Cáncer gástrico hereditario difuso.
- kb: Kilobases, mil pares de bases.
- KO: Knock out.
- mRNA: RNA mensajero.
- RMN: Resonancia magnética nuclear.

3 RESUMEN

En este trabajo se ha realizado una recopilación de información acerca de la cadherina E. Esta glicoproteína ha sido estudiada dada su función como componente central en la formación de las uniones adherentes entre células. Se ha recogido y sintetizado información de la proteína acerca de su gen, su estructura, sus modificaciones post-traduccionales, su regulación y sus funciones moleculares en la primera parte de este trabajo. Gracias a esta información se ha contextualizado la proteína para poder discutir aplicaciones que se le están otorgando o postular nuevas funciones posibles en un futuro cercano. Aquí se han recogido avances acerca de la presencia de la cadherina E en el desarrollo embrionario y su implicación en cánceres, en concreto el HDGC. En cuanto a aplicaciones futuras, se han descrito métodos de profilaxis para el HDGC y nuevos avances en materiales funcionalizados. Estos comprenden aplicaciones en superficies modificadas con cadherina E, como la generación de implantes percutáneos que se adhieren a la epidermis, y los nuevos avances en nanomateriales, como la transferencia de genes foráneos o el tratamiento selectivo y dirigido a un tipo celular.

4 SUMMARY

In this work, a compilation of information about cadherin E has been carried out. This glycoprotein has been studied given its role as a central component in the formation of adherent junctions between cells. Information about the gene, its structure, its post-translational modifications, its regulation and its molecular functions has been collected and synthesized in the first part of this work. Thanks to this information, the protein has been contextualized to be

able to discuss present applications that are being granted or postulate possible new functions in the near future. Here, advances in the role of E-cadherin in embryonic development and its involvement in cancers, specifically the HDGC, have been collected. As for the future applications, prophylaxis methods for HDGC and new advances in functionalized materials have been described. These include applications on E-cadherin modified surfaces, such as the generation of percutaneous implants that binds to the epidermis, and new advances in nanomaterials, such as foreign genes transference or selective and targeted treatment to a certain cell type.

5 INTRODUCCIÓN

5.1 PROTEÍNAS E INVESTIGACIÓN

Gracias a todos los avances de la ciencia moderna, se han abierto nuevos campos de conocimiento en la biología. Uno de los más importantes actualmente es el referente al estudio de las proteínas. Las proteínas son las unidades funcionales de los seres vivos, y se ha descubierto que el estudio de sus secuencias en el genoma no era suficiente por sí solo. Existen una multitud de cambios post-transcripcionales y post-traduccionales que afectan a estas moléculas y que aportan nuevas pistas sobre las funciones y estructuras de nuevas proteínas descubiertas o de algunas ya conocidas.(1) (2)

Con la tendencia por la cada vez más exhaustiva anotación de genomas, se empezaron a descubrir nuevas proteínas codificadas por éstos, lo que llevó a acuñar el nombre de *proteoma* por parte de Marc Wilkins en 1994.(3) De acuerdo con la definición propuesta para proteoma, su nombre proviene de la fusión de las palabras “proteína” y “genoma”. Consiste en la identificación de todas las proteínas que se expresan a partir del genoma estudiado.(1) Desde ahí se definió la proteómica como la ciencia que estudia esos proteomas, del mismo modo que la genómica lo hace con los genomas.

Con todos los descubrimientos realizados dentro de este campo, y en otras áreas como la caracterización estructural de proteínas, se disponía de una vasta librería de estas macromoléculas descubiertas. Dentro de este gran número de proteínas, también se encontraba una infinidad de funciones realizadas por enzimas y otros polipéptidos. A medida que se iban conociendo estas funciones, comenzaron a proponerse distintas aplicaciones con las que poder obtener un beneficio. Esto propició la aparición de nuevos avances y descubrimientos en materias como la nanotecnología y la medicina. La creación de nuevos

materiales funcionalizados con proteínas para otorgar una nueva propiedad o el uso de nuevas enzimas para diagnóstico y tratamiento de enfermedades son algunos de los muchos ejemplos que han nacido del estudio de la función y estructura de nuevas proteínas. (4)

5.2 PROTEÍNAS DE ADHESIÓN

Una de las funciones más estudiadas ha sido la adhesión de proteínas con otras proteínas. Esta particularidad permitiría la unión selectiva de módulos como si de piezas de un puzle se tratase. En el contexto fisiológico, las proteínas que presentan esta función se encargan de las uniones célula-célula. Además, pueden jugar un papel determinante en los procesos de embriogénesis y morfogénesis, siendo así responsables de la diferenciación de los tejidos.(5) En el contexto patológico, algunas de estas proteínas pueden estar involucradas en procesos de desdiferenciación de células normales a cancerígenas en algunos tejidos.(6) (7) Este trabajo se va a centrar en una familia de proteínas de adhesión, las cadherinas.(8)

5.3 LA SUPERFAMILIA DE LAS CADHERINAS

Las cadherinas representan una superfamilia de proteínas de adhesión entre células. Como ya se ha mencionado en el párrafo anterior, estas proteínas son un ejemplo de moléculas de unión implicadas en procesos como la morfogénesis o procesos del desarrollo cancerígeno.(9) Su nombre proviene de “Calcium-dependent adhesion proteins”(10), siendo la función y la dependencia de iones calcio las propiedades que tienen en común la mayoría de proteínas dentro de esta superfamilia.

La superfamilia está dividida en cinco grupos con características definidas: cadherinas clásicas, desmosomales, atípicas, protocadherinas y proteínas reguladoras con dominios cadherina. La cadherina E, miembro particular en el que se enfocará este trabajo, se encuentra dentro del primer grupo, clasificada a su vez en el subgrupo de las cadherinas tipo I, pero para contextualizarla, se van a explicar brevemente los demás grupos de cadherinas.(11,12)

La clasificación de las proteínas en uno u otro grupo se realizó atendiendo al número de repeticiones y en homologías de secuencia analizadas en el dominio citoplasmático, ya que este es el más conservado dentro de todos los individuos de la familia.(11)

5.3.1 Cadherinas clásicas

Las proteínas que pertenecen a este grupo son glicoproteínas transmembrana integrales que atraviesan la membrana celular una única vez. La función principal de anclar unas células a otras la realizan en dependencia de iones calcio, aunque también pueden desarrollar funciones de

reconocimiento y asimilación de información por medio de interacciones de estas moléculas con el citoesqueleto o mediante moléculas señalizadoras.(13)

Como ya se ha mencionado, tienen una dependencia establecida de iones calcio en la formación de uniones adherentes homofílicas, es decir, interaccionan con proteínas idénticas generando uniones entre ellas. Además de esto, en algunas se ha descubierto que también pueden realizar alguna unión heterofílica más débil.(14) Unido a esto, comparten una estrecha interacción con el esqueleto de actina por medio de unas proteínas que se explicaran más adelante, β -catenina, α -catenina y p120. Los miembros de esta familia están divididos en dos subgrupos. Algunos estudios van más allá en la diferenciación y consideran estos dos subgrupos como familias diferentes.(11) Los dos tipos de subfamilias se diferencian por las colas citoplasmáticas de las proteínas.(15) A parte de estas diferencias en las colas citoplasmáticas, las cadherinas clásicas de tipo II presentan dos triptófanos conservados que participan en la formación de las uniones adherentes. A diferencia de estas, las del primer grupo solo presentan un residuo triptófano conservado.(16)

Los dos grupos de cadherinas clásicas:

1. Cadherinas clásicas de tipo I: Sus nombres provienen de los tejidos donde se encontraron. La cadherina E está localizada en multitud de epitelios. Esta comparte muchas similitudes con la cadherina N, que fue descubierta en nervios y músculos. También se encuentra en este grupo la cadherina P, localizada en la placenta.(17) La cadherina R es muy similar a la cadherina N en cuanto a secuencia y localización, sin embargo, fue aislada en la retina.(18) Otro ejemplo de este grupo es la cadherina C, utilizada como modelo estructural de este grupo.(19)
2. Cadherinas clásicas de tipo II: Dentro de este se encuentran las cadherinas de la 6 a la 12. Otro ejemplo de esta subfamilia es la cadherina VE, que participa en los procesos de vasculogénesis y remodelado vascular.

5.3.2 Cadherinas desmosomales

Dentro de esta familia se encuentran las proteínas transmembranas que mantienen las uniones de los desmosomas localizados en tejidos sometidos a esfuerzos mecánicos (epitelios y miocardio). Esta familia se divide a su vez en 2 subfamilias, desmocolinas y desmogleínas. Son similares en cuanto a estructura a las cadherinas clásicas, pero tienen algunas diferencias que las separan de éstas. Los dominios citoplasmáticos interactúan con la plakoglobina (γ -catenina) y la desmoplaquina, y estas proteínas están ancladas al citoesqueleto por medio de los filamentos intermedios, en lugar de la actina.(8) Al igual que en las cadherinas clásicas, las

diferencias entre desmocollinas y desmogleínas con las otras cadherinas se encuentran en el dominio citoplasmático, lo que hace que interactúen con diferentes proteínas.(15)

5.3.3 Cadherinas atípicas

Dentro de esta subfamilia se encuentran por ejemplo las cadherinas T y Ll. También participan en uniones homofílicas, pero no interactúan con las cateninas ni con el citoesqueleto con sus dominios intracelulares.(8) De hecho, la cadherina T se diferencia de las demás al estar truncada, careciendo de sus regiones transmembrana y citoplasmática. Se une a las membranas de las células anclándose al glicosilfosfatidilinositol.(13)

5.3.4 Protocadherinas

Representan una familia de cadherinas menos conocidas, sus dominios extracelulares son variables y los citoplasmáticos no interactúan con los filamentos de actina sino con otras proteínas. Los genes de algunas de estas moléculas se encuentran organizados en *clusters*. (6)

5.3.5 Proteínas señalizadoras relacionadas

Estas proteínas presentan dominios de cadherina en su estructura y participan en procesos de supresión de tumores y embriogénesis. No se conoce si estas proteínas pueden interactuar uniéndose con moléculas idénticas. Un ejemplo de estas es la FAT que se descubrió en *Drosophila*.(13)

6 OBJETIVOS

Este trabajo va a tratar de exponer los posibles avances que podrían derivar de las funciones desempeñadas por la cadherina E. Antes de ello se procederá a contextualizar la proteína para comprender sus funciones. Se estudiará el gen CDH1, así como su expresión y la estructura peptídica de la glicoproteína.

Se va a realizar un estudio de las funciones que se le han atribuido a esta proteína y que ya han sido probadas. Además de estas, se va a proponer y revisar nuevas funcionalidades que están siendo aplicadas en el presente o en un futuro cercano. Con este trabajo se pretende orientar las posibles utilidades que se le atribuyen y que podrían atribuírsele a la cadherina epitelial.

7 METODOLOGÍA

Para la realización de este Trabajo de Fin de Grado, se ha recopilado información acerca de cada apartado expuesto en bibliotecas y revistas de trabajos ya publicados con la ayuda de un

buscador bibliográfico. Se recopilaron los documentos utilizando el buscador de bibliografía Google Scholar. De entre estos artículos, se han seleccionado aquellos que pueden aportar la mayor información adecuada de la manera más sintetizada y con ellos se ha realizado esta revisión bibliográfica acerca de las funciones de la cadherina E.

Además de artículos de revistas científicas, también se han visitado bases de datos de proteómica y estructuras de proteínas. Todas las referencias se han apuntado y se reflejarán en el apartado correspondiente mediante el uso de la herramienta Zotero. Zotero es un gestor de referencias bibliográficas, libre, abierto y gratuito desarrollado por el Center for History and New Media de la Universidad George Mason.(20)

8 CADHERINA E

8.1 LA PROTEÍNA

En primer lugar, se dará información sobre la proteína en cuestión. Esto servirá para comprender su estructura y los procesos funcionales en los que la cadherina E participa. Se va a comenzar exponiendo aspectos básicos como cuál es el gen que la codifica para ir profundizando poco a poco hacia la regulación y las funciones biológicas que esta proteína presenta. Estos dos últimos apartados son los más interesantes, ya que ellos derivan las posibles aplicaciones biotecnológicas que se le han atribuido a esta cadherina.

8.1.1 Gen

El gen de la cadherina E humana se denomina CDH1. En UniprotKB se encuentra etiquetado como P12830.(21) La localización del gen dentro del genoma humano fue estudiada mediante la técnica FISH (hibridación fluorescente *in situ*) y se dictaminó que se encontraba en la región 16q22.1, es decir, se encuentra situado en el brazo largo del cromosoma 16.(22)

La longitud del transcrito primario consta de unas 100 kb que se procesan para dar lugar a un mRNA de aproximadamente 4,5 kb.(23) También se realizó un mapa de restricción de la zona donde se encontraba el gen, y mediante el análisis de la secuencia, se descubrió que éste se encontraba organizado en 16 exones y 15 intrones. Estos límites intrón-exón se encuentran altamente conservados dentro de las cadherinas clásicas. Se ha destacado la existencia del intrón 2 debido a su gran amplitud, de unas 65 kb de longitud. También es remarcable la presencia de una isla CpG de alta densidad en el intrón 1, que puede estar implicada en la regulación de la transcripción durante la embriogénesis y en el cáncer.(22) (24) (25)

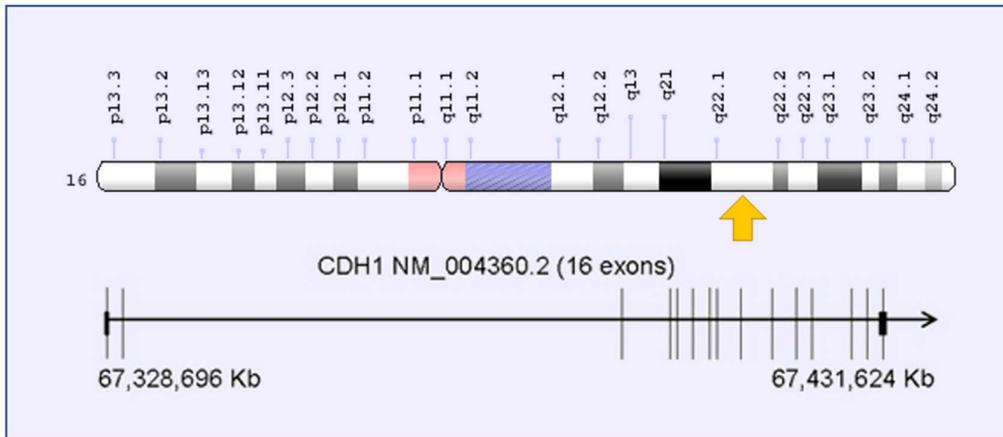


Figura 1: Arriba. Representación gráfica de la localización cromosomal de CDH1 en el cromosoma 16 humano. **Abajo.** Ampliación de la secuencia génica con los exones representados. Imagen obtenida de Genome Decoration Page.

8.1.2 Traducción e isoformas

El transcrito de CDH1 sin los intrones, al traducirse a cadena peptídica, origina un polipéptido de 882 aminoácidos recogido en Uniprot.(21) Esta cadena polipeptídica será sometida a cambios post-traduccionales, como se explicará más adelante, para originar una glicoproteína de membrana de 120 kDa.(26) Se ha observado la presencia de una segunda isoforma, denominada cadherina E mutante en varios artículos, la cual carece de una porción de la secuencia de aminoácidos. En concreto, le faltan 60 aminoácidos localizados entre las posiciones 380-440. Estas dos isoformas figuran en la base de datos Uniprot bajo los localizadores P12830-1 y P12830-2 respectivamente. Se ha propuesto que esta variación entre las dos isoformas sea consecuencia de un splicing alternativo. Aparte de esta isoforma, se han mapeado computacionalmente otras 6 potenciales secuencias de isoformas.(21)

8.1.3 Regulación

8.1.3.1 Modificaciones post-traduccionales

La cadena peptídica resultante de los ribosomas tiene que sufrir una serie de transformaciones para llegar a convertirse en una cadherina funcional. La primera modificación de la proteína consiste en la escisión de dos péptidos a lo largo de su maduración post-traduccionales. El primero de ellos es el péptido señal, que recluta a la proteína y mediante un sistema de membranas la lleva a la membrana plasmática. Este péptido señal corresponde a los primeros 22 aminoácidos de la secuencia según Uniprot.(21) El segundo de ellos es un propéptido, ya que, si no se produce la escisión de este, la proteína no puede pasar a su estado funcional. Este péptido es de mayor tamaño y comprende los residuos del 23 al 154.(21) Cuando se produce la escisión de este

péptido, se genera un nuevo extremo amino terminal que será imprescindible para la actividad de la proteína.(15)

La cadherina E, como la mayoría de las cadherinas, presenta residuos glucídicos, lo que la hace ser una glicoproteína. Estos residuos se introducen durante el procesado post-traduccional sufrido por la proteína en el retículo endoplasmático y aparato de Golgi. Al comparar la cadherina E con sus homólogos en otras especies, se han identificado sitios de glicosilación potenciales. Se tiene la constancia de uno en concreto, la Asn637. Está demostrado que la N-glicosilación de este residuo por parte de la N-acetilglucosaminotransferasa III es imprescindible para el correcto plegamiento y reclutamiento la cadherina en la membrana. Se vio incluso, que la cadherina E podría llegar a estar involucrada en la regulación de la expresión de esta enzima.(27)

Otra de las transformaciones que sufre la proteína durante su maduración es la fosforilación de algunos de sus residuos. Al igual que con las glicosilaciones, se han postulados potenciales residuos para su fosforilación, así como algunos cuya transformación ha sido documentada. Este es el caso de la tirosina 754, cuya fosforilación es necesaria para la ubiquitinación de la proteína.(28)

8.1.3.2 Ubiquitinación y apoptosis

Durante los procesos de proliferación cancerígena, se produce en la mayor parte de los que afectan a células epiteliales la pérdida de uniones intercelulares, que conllevará a una transición epitelio-mesenquimal. Para que esto se lleve, se tiene que producir la degradación de la cadherina E. Esta es reclutada y degradada en el lisosoma por medio de la ubiquitina. Existen varias redes funcionales para esta ubiquitinación siendo una de estas la mediada por la ligasa de ubiquitina E3 HAKAI. Esta proteína contiene un dominio que reconoce la fosfotirosina 754 y se une a la cadherina. Esta proteína será la responsable de la unión de ubiquitina y la degradación de las uniones adherentes.(28)

La destrucción de las uniones adherentes también es un proceso clave durante la apoptosis de las células. Para llevar a cabo esta regulación, se han identificado 3 proteínas que llevan a cabo la degradación de la cadherina E. La primera de ellas es una metaloproteasa llamada ADAM10 que escinde un fragmento del ectodominio en presencia de iones calcio. Se postuló que el punto de escisión probable se encuentra entre Leu81-Ser 582 y / o Ser582-Asp583. Por lo tanto, se espera que el producto de escisión que queda unido a la membrana contiene 297 (o 296) residuos.(29) La otra proteína que participa en el desmantelamiento de la cadherina E es la caspasa 3. Esta caspasa cataliza la escisión de otro fragmento, esta vez intracelularmente, lo que

libera la cola citoplasmática. Este corte deja como extremo C-terminal al Asp752.(30) Por último, también se ha evidenciado la participación de una γ -secretasa que produce una escisión parecida a la de la caspasa 3, liberando la cola citoplasmática de la cadherina E. Gracias a esto la cadherina se disocia de las cateninas, las cuales pueden solubilizarse, desmantelando la unión adherente.(31)

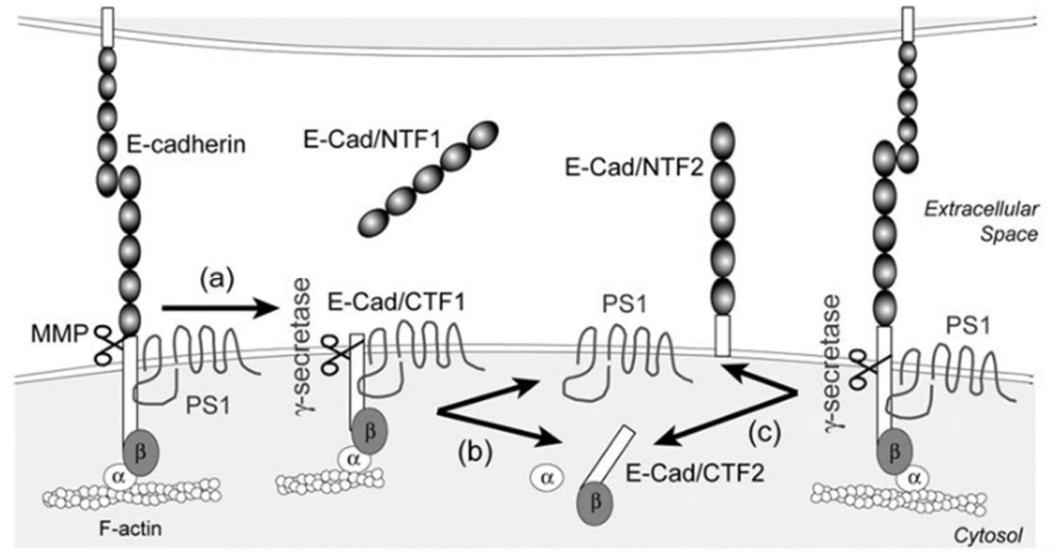


Figura 2. Representación de las posibles rutas en la degradación de la cadherina E en uniones adherentes.(31)

8.1.4 Estructura y anclaje

La glicoproteína final está estructurada en 3 regiones o dominios diferenciados. Contiene una región citoplasmática donde se encuentra su extremo carboxilo, una transmembrana, y la extracelular de mayor tamaño que contiene el extremo N-terminal. Cada dominio tiene una función definida y motivos estructurales propios.(32)

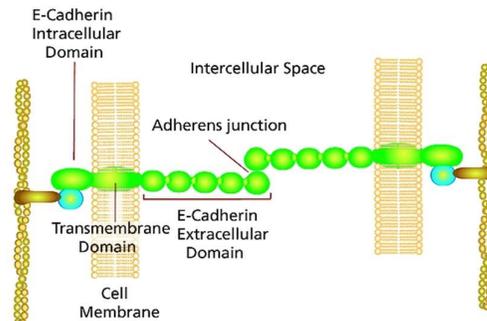


Figura 3: Representación esquemática de los 3 dominios de la cadherina E. Imagen obtenida de Sigma Aldrich.

Empezando por el dominio extracelular, este dominio contiene 5 repeticiones estructurales que se denotan como EC. Los 4 dominios más extracelulares se denominan EC1 desde el exterior hasta EC4, el segundo más próximo a la membrana. El dominio EC5, el más próximo a la membrana, a veces se denomina también “membrane proximal extracellular domain (MPED)” y contiene 4 cisteínas conservadas.(6) Se ha comprobado que estos residuos establecen puentes disulfuro necesarios para que se produzcan las adhesiones célula-célula.(33) Una curiosidad de

este dominio, formado por repeticiones en tándem, es que la estructura del gen CDH1 no refleja estas repeticiones. Sin embargo, cada repetición está codificada entre dos y tres exones independientes y los límites del exón no coinciden con los límites del dominio EC.(6)

La estructura de estas repeticiones extracelulares recuerda a la estructura de los dominios inmunoglobulina, lo que sugiere que estas dos proteínas podrían tener un antepasado común, con una posterior evolución independiente.(34) Se trata de un dominio de aproximadamente 45 Å x 25 Å x 25 Å formado por 7 hebras beta antiparalelas.(35) Estos dominios se estabilizan cuando se producen las uniones de los iones calcio necesarios para poder realizar la función de la proteína. La unión de estos iones se produce entre dos repeticiones mediante los residuos de la base de una repetición y de la parte superior del siguiente. Estos residuos se encuentran bastante conservados y se coordinan con los iones generando la forma curva del ectodominio de la cadherina, por eso en la imagen se ha utilizado la cadherina C como ejemplo.(32) La estructura de las cadherinas clásicas es muy similar entre ellas y la única estructura tridimensional del dominio extracelular que se ha resuelto en su totalidad actualmente es la de la cadherina C de *Xenopus laevis*.(19)

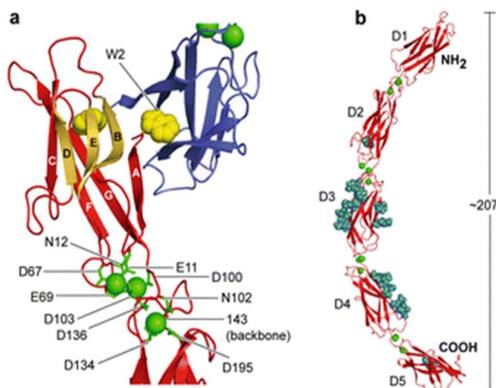


Figura 4: (a) Estructura del dominio, coordinación de los iones calcio, y unión homofilica de cadherina C. Las láminas beta se han etiquetado de A-D y se han coloreado de distinto color según la lámina a la que pertenecen. Tres iones Ca^{2+} entre cada repetición, representados en verde. La interacción entre dos cadherinas se ha representado, cada una de un color (Rojo y azul) y los triptófanos que intervienen (Amarillo). (b) Estructura tridimensional completa del ectodominio de la cadherina C. Los residuos glucídicos se han representado en azul. Imágenes obtenidas de artículo. (32)

Con respecto al dominio transmembrana, es, junto con el dominio citoplasmático, el dominio más conservado de la proteína, incluso entre las diferentes cadherinas de la superfamilia. Este dominio de pequeño tamaño sigue siendo una incógnita, y se ha postulado que su estructura y secuencia favorezca las interacciones diméricas laterales de las cadherinas.(36)

Por último, se encuentra la cola citoplasmática de la proteína. Este dominio, de unos 150 residuos, contiene las zonas más conservadas entre cada familia de cadherinas.(37) Es la región encargada de interactuar y anclar la cadherina con componentes intracelulares, como los del citoesqueleto.(8) Un ejemplo de esto es su interacción la con β -catenina, se ha demostrado que la cola citoplasmática de la cadherina no se pliega en su estructura funcional en ausencia de esta proteína, lo que podría indicar que se trata de un mecanismo de regulación.(38) La β -catenina

se une a la α -catenina, proteína de unión a actina, que propicia el anclado de la cadherina al citoesqueleto. Se ha visto que esta unión es necesaria para desempeñar la función adhesiva de las cadherinas. Se han identificado varios residuos en esta región que son los necesarios para agregar las proteínas en su forma funcional y dimérica.(39)

8.1.5 Funciones moleculares

La función molecular de la proteína, como ya se ha mencionado anteriormente, es la adhesión homofílica. De esta función molecular derivan todas las funciones biológicas que desempeña esta proteína. En primer lugar, se va a explicar la naturaleza de estas uniones para comprender los procesos en los que ésta se encuentra involucrada.

Se han descubierto 2 tipos de interacciones de dimerización en las cadherinas, estas son las interacciones *cis* y las *trans*.(19) Las uniones *cis*, establecen interacciones entre cadherinas de una misma superficie celular, mientras que las *trans*, son interacciones entre cadherinas de diferentes superficies las cuales originan las uniones adherentes tal y como se conocen. Estas interacciones se descubrieron al estudiar las estructuras de las cadherinas E, N y C. Al encontrarse constancia de ellas en la estructura de las tres proteínas se postuló que no se trataba de una asociación espontánea, sino que tiene lugar *in vivo*, realizando una función biológica.(19)

Uniones *cis*

Las uniones *cis* se producen entre la repetición EC1 de un protómero de cadherina con la EC2, y en menor medida la EC3, de otra molécula adyacente. Esto permite que solapen unas con otras y logren estabilizar una alineación de varias cadherinas en la membrana.(19)

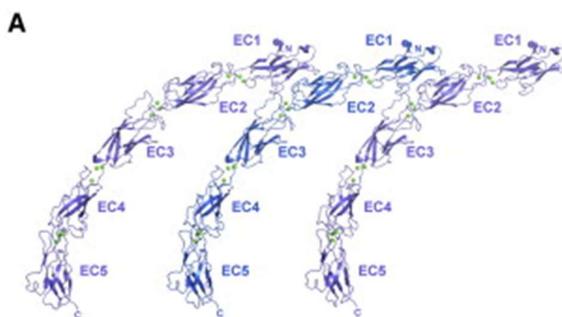


Figura 5: Matriz lineal formada por interacciones *cis* entre ectodominios paralelos de N-cadherina. El mismo modelo se puede extrapolar a interacciones idénticas en las redes cristalinas de E y C-cadherina (1L3W).

Imagen tomada de Harrison OJ, Jin X, Hong S, Bahna F, Ahlsen G, Brasch J, et al. *The Extracellular Architecture of Adherens Junctions Revealed by Crystal Structures of Type I Cadherins.*

Estas matrices lineales, junto con las uniones *trans* que se detallarán a continuación, explicarían el motivo de cómo es posible que, aunque la unión entre dos cadherinas es débil, la adhesión

celular presenta una resistencia a la separación considerable. El enterramiento de residuos hidrofóbicos que se produce al dimerizar las proteínas contribuye positivamente al mantenimiento de estas uniones *cis*.(15)

Uniones *trans*

Estas uniones son las que participan fundamentalmente en la unión entre células. Se ha comprobado que las cadherinas no se encuentran perpendiculares a la membrana, sino que cada tipo de cadherina presenta un ángulo definido que será imprescindible para el reconocimiento y unión homofílica.(32)

El modelo de "dímero de cadena" ha sido ampliamente aceptado para el mecanismo de adhesión homofílica de las cadherinas tipo I. Este modelo es una interacción *trans* que involucra residuos N-terminales altamente conservados de EC1 conocidos como "brazo de adhesión" y el "bolsillo receptor" conservado en el cuerpo de EC1, en el que el brazo de adhesión de una cadherina se inserta en el bolsillo receptor de la cadherina oponente.(6) La clave de esta interacción se encuentra en el residuo conservado Trp2 del brazo de adhesión, que se inserta en el bolsillo aceptor de otra cadherina. Este acoplamiento está favorecido por interacciones catión pi entre el grupo indol del residuo de triptófano con residuos conservados del bolsillo aceptor, así como la formación de un puente de hidrogeno de Trp2 con Asp90.(15) Se comprobó que en concentraciones pequeñas de proteína, el Trp2 se entierra en el bolsillo aceptor de la propia proteína. Sin embargo, al aumentar la concentración de proteínas, facilitando el encuentro entre dos cadherinas, estas dimerizan. La presencia de Trp2 en su bolsillo aceptor o en el de otra proteína genera dos estados posibles para el monómero, una forma cerrada y una adhesiva. Estudiando las estructuras de las dos posibilidades se descubrió que las energías libres de estas son casi idénticas, lo que no explicaría como se produce la dimerización.(15) Para explicar la dimerización se descubrió que en los dímeros se produce la formación de dos puentes salinos que estabilizarían la forma dimérica. En estos puentes intervienen el grupo amino terminal en Asp1 de una cadherina con el Glu89 de otra y viceversa.(15)

Esto origina que las cadherinas monoméricas se encuentren en un equilibrio entre las dos formas, cerrada y adhesiva. Las interacciones de cadherina dependen de la presencia de Ca^{2+} . La eliminación de estos iones en los dominios EC1-EC2 ocasiona la pérdida de las uniones adherentes. El análisis de RMN reveló conformaciones distintas para el monómero libre de Ca^{2+} , el monómero unido a Ca^{2+} y el dímero unido a Ca^{2+} de E-cadherina. La unión de Ca^{2+} desplaza el equilibrio hacia el estado dimérico.(32)

El modelo de unión se muestra en la figura 6B. Comenzando por la izquierda, la cadherina es sintetizada como un propéptido inactivo, en la que el acoplamiento del brazo de adhesión no es favorable debido a la ausencia de un N-terminal libre que pueda formar un puente salino con Glu89 (se muestra en azul). A su vez, también se produce impedimento estérico por el propio dominio. Después de la escisión irreversible que elimina la pro-secuencia, el brazo de adhesión puede acoplarse intramolecularmente al cuerpo de EC1. La intercalación de Trp2 (en verde) se estabiliza mediante una interacción de apilamiento con Glu89 y Met92, y la formación de un puente de sal entre Glu89 y la amina N-terminal libre (mostrada como línea roja discontinua), entre otras interacciones. Sin embargo, esta configuración "cerrada" está en equilibrio con una forma "abierta" en la que el brazo de adhesión se disocia del cuerpo de EC1. La posición de este equilibrio puede determinarse en parte por la tensión en la conformación cerrada debido al motivo Pro5-Pro6 que se muestra en marrón. La formación de dímeros "adhesivos" implica el intercambio de cadenas con el acoplamiento intermolecular de Trp2 y la formación de puentes de sal que es casi idéntica a la observada en la forma "cerrada", y la formación de interacciones intermoleculares adicionales que también involucran el brazo de adhesión.(15)

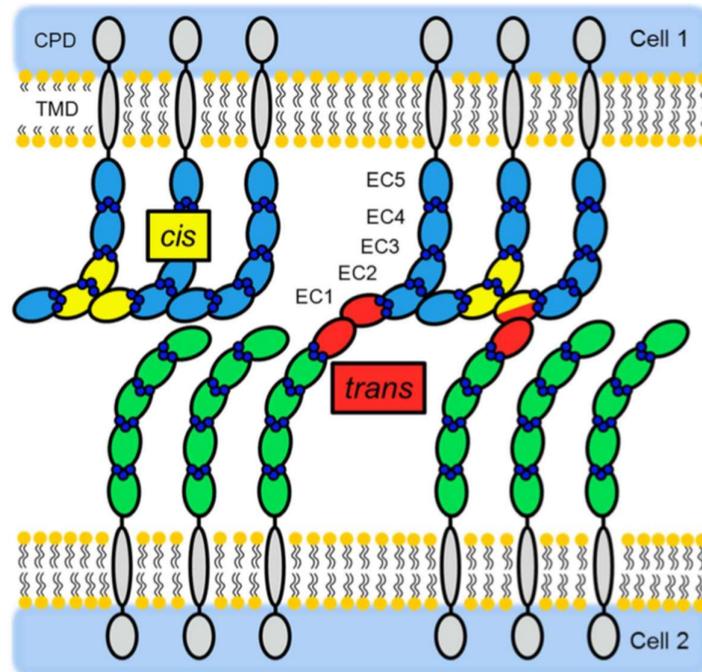


Figura 6: Esquema visual de las interacciones cis y trans que se producen en las superficies celulares. Se muestra la estructura típica de cremallera gracias a la combinación de uniones cis (amarillo), entre cadherinas de la misma superficie, y las trans (rojo), entre cadherinas de 2 superficies.(40)

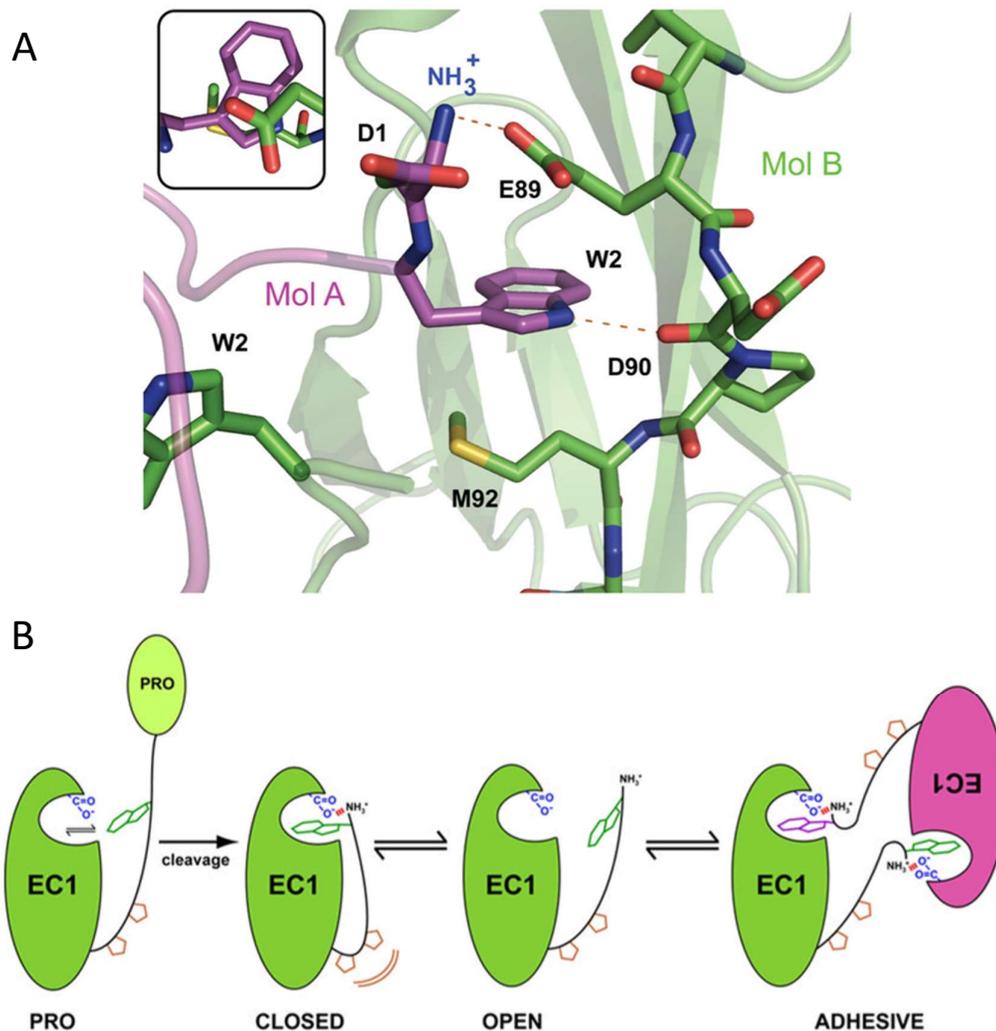


Figura 7. A. Interacciones detalladas entre la porción N-terminal de la molécula A (magenta) y el bolsillo aceptor hidrófobo de la molécula B (verde) dentro de un dímero de cadena. Las líneas discontinuas muestran el puente de sal entre el A Asp1-NH₃⁺ + N-terminal y B Glu89, así como el enlace de hidrógeno entre NεH de A Trp2 y el grupo carbonilo de B Asp90. También se observa el apilamiento de los residuos B Glu89, A Trp2 y B Met92. **B.** Modelo para el mecanismo de unión de las cadherinas tipo I. (15)

Anclaje al citoesqueleto y transducción de señales

La cadherina E se ancla al citoesqueleto mediante la unión a unas proteínas denominadas cateninas. Se demostró que estas proteínas eran tres; α , β y γ o plakoglobina; y se unían secuencialmente al dominio citoplasmático de la cadherina formando el complejo cadherina-catenina (CCC). Existen dos tipos de CCC en las células. En los dos se encuentran la cadherina y la α -catenina, pero difieren en que en uno la cadherina se une primero a la β -catenina y esta se une a la α , y el otro no presenta la β -catenina, sino que la plakoglobina la sustituye siendo estas dos cateninas las moléculas centrales en la formación de los CCCs.(11) La región citoplasmática

de la cadherina E que une a las cateninas ha sido mapeada y se observa que se trata de una zona rica en serinas (Aa 832-862) completamente codificada en el último exón del gen CDH1.(11)

Existen diversas evidencias de que el mantenimiento de las uniones adherentes está regulado por fosforilaciones de tirosinas en proteínas de estos CCCs.(11) Esta regulación es la base de rutas de señalización como la desencadenada por EGF. Este factor de crecimiento se une a su receptor, EGFR, el cual interactúa directamente con la β -catenina o plakoglobina, produciéndose la fosforilación de estas. Un resultado de esta fosforilación es que los CCCs se dispersan a lo largo de la membrana. Esto se estima que se produce porque la fosforilación de las cateninas produce que el CCC se suelte de los filamentos de actina, generándose así el desensamblado de las uniones adherentes.(11)

Otra proteína que participa en la regulación de estas uniones adherentes es p120^{cas}. Su nombre proviene de "cadherin-associated src-substrate". Se ha visto que esta proteína también es fosforilada en respuesta a factores de crecimiento como el EGF. La unión de distintas isoformas de esta proteína directamente a la cadherina E provoca el desensamblado de las uniones adherentes. Esta nueva proteína ha sido calificada como una nueva catenina y se ha observado que su unión a las cadherinas se realiza en una región distinta a la de las cateninas del CCC.(11)

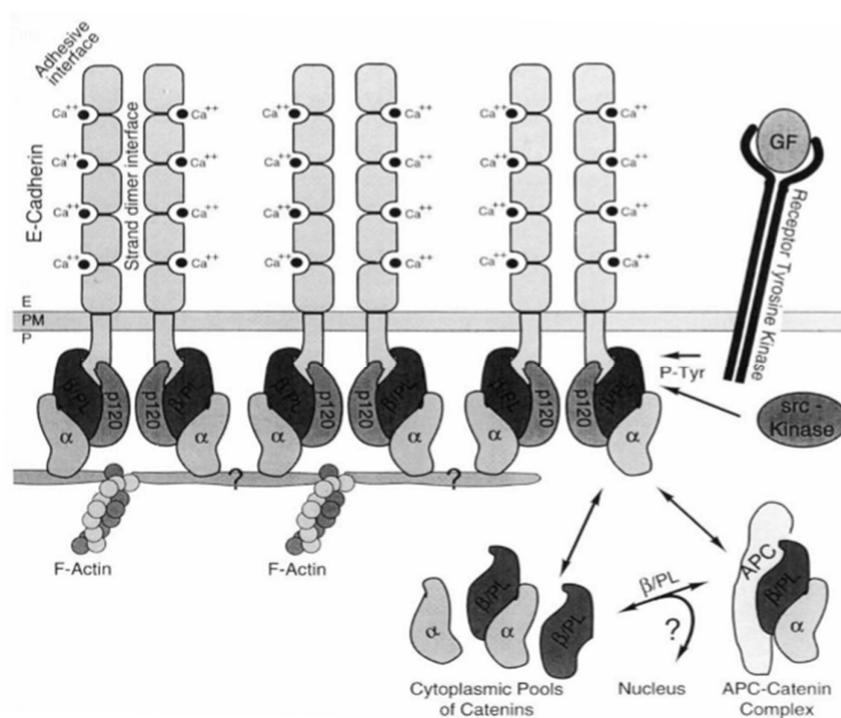


Figura 8: Modelo esquemático de CCC. Se presenta una cremallera de cadherinas asociadas entre ellas y a los filamentos de actina del citoesqueleto. A la derecha se muestran las posibles interacciones de regulación mediada por fosforilaciones.(11)

8.2 IMPLICACIONES ACTUALES

Después de haber contextualizado a la proteína, desarrollando su estructura y funciones moleculares, se puede extraer que la cadherina E es una molécula de gran importancia en la formación de uniones adherentes. Estas uniones participan en procesos relevantes de diferenciación y morfogénesis celular como el desarrollo embriológico o la metástasis de células cancerosas. Aquí es donde recae la importancia del estudio de esta proteína, para poder identificar problemas derivados del malfuncionamiento de las cadherinas E.

8.2.1 Implicaciones en el desarrollo

La unión de células en el desarrollo embrionario supone uno de los pasos claves para la correcta generación de nuevos embriones en mamíferos. El cigoto se desarrolla a blastómeros durante los primeros instantes de este desarrollo. Durante un tiempo las células, denominadas blastómeros, son independientes unos de otros y se comportan como organismos unicelulares. Esto se mantiene hasta que el embrión llega a un estado denominado mórula, en el cual sufre una compactación debida a la generación de uniones adherentes. Después de esta compactación, las células del blastocito se mantienen unidas y se comportan como un individuo pluricelular. Se ha demostrado que ratones knock out (KO) para el gen que codifica para la cadherina E no consiguen sobrevivir y fallecen durante el desarrollo embrionario.(11) Se estipuló que podría ser debido a que, sin estas proteínas, no se podía realizar la compactación de la mórula y, por tanto, la generación del blastocito. Si bien se ha demostrado que la cadherina E es una molécula clave para la inducción de uniones célula-célula, parece no ser necesaria para su mantenimiento, ya que los blastocitos de embriones KO para CDH1 son capaces de formar uniones estrechas y desmosomas. Curiosamente, a pesar de la presencia de uniones estrechas y desmosomas, los embriones KO no presentan un epitelio bien formado. El fenotipo de los embriones con deficiencia de cadherina E proporciona evidencia adicional de que la cadherina E es de elevada importancia durante los eventos morfogénicos tempranos de mamíferos y juega un papel protagonista en la biogénesis del epitelio.(11) Más adelante durante el desarrollo en la etapa adulta, la expresión de cadherina E se limita principalmente a los epitelios. Aquí desempeña papeles centrales en la integridad de los tejidos, la homeostasis y la función de los órganos. Por ejemplo, la falta de cadherina E en la glándula mamaria induce apoptosis precoz.(41) La expresión de cadherina E y cadherina N son exclusivas mutuamente y cambios en las proporciones de estas dos proteínas originan varios cambios morfológicos en las células. Durante la gastrulación, las células del epiblasto se delaminan y experimentan una transición epitelio-mesenquimal (EMT) para formar el nuevo mesodermo emergente. Este cambio está regulado reprimiendo la expresión de cadherina E e iniciando la expresión de cadherina N.(41)

8.2.2 Implicaciones con el cáncer

Una de las aplicaciones más relevantes por las que se investiga el gen de la cadherina E es su implicación confirmada en varios tipos de desarrollo de cáncer. Normalmente en cánceres de tejidos epiteliales como el endometrio o los lóbulos de la glándula mamaria, se han encontrado mutaciones de este gen que estarían relacionadas con el desarrollo de esta enfermedad. También se ha identificado la participación del gen CDH1 en el síndrome blefaro-queilo-odóntico, el cual se caracteriza por ectropión de los párpados inferiores, distiquiasis de los párpados superiores, euriblefarón, fisura labiopalatina bilateral y dientes cónicos. Otros rasgos adicionales son hipertelorismo, lagofthalmos, ano imperforado y sindactilia.(42)

Uno de los cánceres relacionados con mutaciones en el gen CDH1 más estudiado es el cáncer hereditario gástrico difuso (HDGC). El cáncer gástrico es la tercera causa de muerte más común entre los cánceres en el mundo. Existen dos tipos de cáncer gástrico, el intestinal, que normalmente es esporádico, y el difuso, del cual se han observado algunos esporádicos y otros hereditario.(43) El HDGC normalmente puede desencadenar otros cánceres como el cáncer de mama o el colorrectal y se caracteriza por ser multigeneracional debido a que se trata de un síndrome autosomal dominante, que se presenta en mutaciones heterocigotas.(43) El riesgo acumulado de sufrir cáncer gástrico para pacientes que contienen mutaciones en el gen CDH1 a los 80 años es de 70% para hombres y 56% para mujeres. Las mujeres, además, también tienen a esta edad un riesgo del 42% de desarrollar cáncer de mama debido a estas mismas mutaciones.(43) Por ahora el único gen al que se le atribuye el desarrollo de este cáncer es el de la cadherina E, pero se ha observado que también podrían estar relacionadas mutaciones en genes de proteínas relacionadas con esta, como las cateninas.(43) Se ha demostrado mediante tinción inmunohistoquímica de tumores HDGC que se produce una inactivación somática del segundo alelo de CDH1, a pesar de que en algunos tumores se observa la presencia residual de cadherina E. La pérdida de heterocigosidad no parece ser frecuente en HDGC, en cambio, es probable que la causa de esta inactivación del gen sea la hipermetilación del promotor de CDH1. La hipermetilación del promotor también se ha encontrado en aproximadamente el 80% de los cánceres gástricos difusos esporádicos y en un tercio de otros tipos de cáncer gástrico esporádico.(44) También se ha demostrado que el defecto puede ser originado por mutaciones puntuales o desplazamientos del marco de lectura de CDH1 en la línea germinal.(45)

Estas afirmaciones han llevado a la noción de que la EMT y la pérdida de la cadherina E es un requisito previo para la metástasis y la progresión del cáncer. Esto identificó a la cadherina E como un nuevo supresor de tumores.(46)

8.3 NUEVAS APLICACIONES

8.3.1 Detección y profilaxis en HDGC

Se ha estipulado en relación con el rol que desempeña la cadherina E en el desarrollo de cánceres que la proteína soluble podría tener un papel pro-oncogénico. Ya se ha nombrado el papel en la EMT y metástasis que el gen CDH1 se cree que desarrolla. Además de este, también se han dilucidado roles alternativos que dicha proteína podría desempeñar en la progresión tumoral, como podría ser, la estabilización de contactos celulares para la migración de células en conjunto o señalizaciones aberrantes en citoplasma y núcleo.(46) La detección de un número elevado de fragmentos solubles de cadherina E en el suero de pacientes con cáncer podría ser una señal de metástasis o invasión del cáncer. La explicación de estos niveles altos es que en células normales la degradación de la cadherina se produce mediante la endocitosis de la molécula. Sin embargo, en casos de apoptosis y células tumorales se produce la degradación por ADAM10 expuesta en su correspondiente apartado. Esto todavía está en duda debido a que hay estudios que no recomiendan este diagnóstico ya que se han encontrado relaciones entre estos niveles y la edad del paciente.(46)

La detección de mutaciones en el genoma de pacientes asintomáticos es suficiente para ofertarles una gastrectomía que evite el desarrollo futuro del HDGC. Como se ha nombrado, las mutaciones solo afectan a un alelo, es decir, son heterocigóticas, pero se produce la inactivación del alelo sano mediante la metilación del promotor. Uno de los nuevos tratamientos que se están investigando es la utilización de agentes demetilantes y otros fármacos epigenéticos para evitar esta inactivación. Se ha descubierto que la utilización de inhibidores de EGFR y Notch pueden suprimir la metástasis de células cancerosas.(46)

8.3.2 Superficies funcionalizadas

Uno de los campos que se están desarrollando en la actualidad es la creación de nuevos materiales funcionalizados que presenten, por ejemplo, proteínas funcionales en su matriz. Se han realizado avances y descubrimientos mediante la inmovilización de cadherina E en diversas superficies. Estos trabajos se han centrado en optimizar la unión de cadherina E, y a su vez al estudio de las nuevas funciones que la proteína inmovilizada puede aportar. Por ejemplo, se ha comprobado que ectodominios EC1-EC5 anclados en arrays espaciados con 5-11 nm promueven la extensión de células que presenten cadherina E en su superficie.(40) Para demostrar esta propiedad se utilizaron células L, fibroblastos de ratón que no presentan ninguna cadherina, y se transfectaron con cadherina E humana. Al ponerlos en contacto con la superficie

funcionalizada, se observa como las células se extienden y adoptan una formación determinada en función al patrón de los fragmentos fijados, que se pierde al retirar el Ca^{2+} del medio.(40)

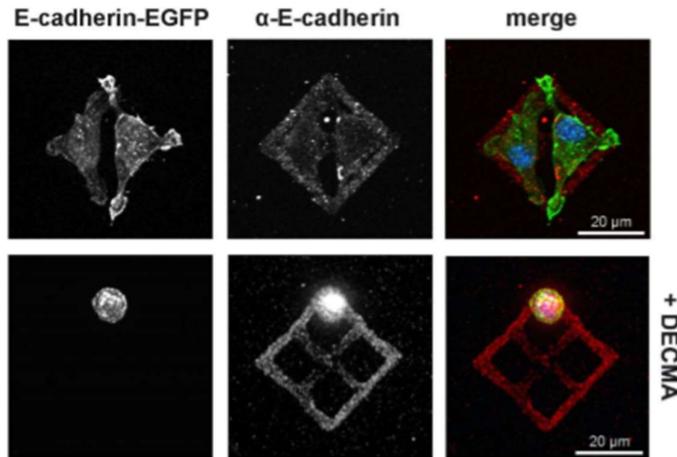


Figura 9: Fila superior: imagen de fluorescencia de células L con EcadEGFP (Cadherina E unida a proteína fluorescente en superficies impresas con microcontacto funcionalizadas con E1-5; fila inferior en presencia de anticuerpo de bloqueo (DECMA). Verde: fluorescencia EcadEGFP, rojo: inmunotinción contra E-cadherina, fusión: superposición con tinción de núcleos (DAPI).(40)

Otra aplicación que se ha observado revela el potencial de superficies de titanio funcionalizadas con cadherina E para promover adhesión epidérmica y generar implantes percutáneos estables. Estas superficies son prometedoras, ya que inhiben la adhesión de los fibroblastos dérmicos al tiempo que promueven la fuerte adhesión de los queratinocitos humanos.(47) A su vez evitan la migración de estos queratinocitos a regresión epidérmica, proceso que se produce en rechazos de implantes.(47)

8.3.3 Partículas funcionalizadas

Otro ejemplo de estructuras que se pueden funcionalizar con la cadherina E son las micropartículas y las nanopartículas. En el campo de las micropartículas hay más estudios realizados, pero las nanopartículas presentan alguna ventaja frente a estas y se trata de un campo más inexplorado con posibles futuros prometedores. Se trata de micro y nanoestructuras metálicas (por ejemplo, nanopartículas magnéticas de óxido de hierro -magnetita y/o maghemita, nanopartículas de oro), poliméricas, de carbono, etc. Estos materiales poseen propiedades únicas debido a su tamaño, como el magnetismo en el caso de las nanopartículas magnéticas que podrán ser utilizadas para aplicaciones más avanzadas. Lo que se busca en estos desarrollos de funcionalización es que dichas esferas presenten en su superficie los elementos que se deseen, en este caso la cadherina E. En el caso de la cadherina E, se ha demostrado que al funcionalizar la superficie con solo los EC1 y EC2 de la proteína esta puede formar dímeros con otras cadherinas, pero no son capaces de mantener una interacción estable.(40) Para que esta interacción pueda llevarse a cabo es necesario que la unión del fragmento EC12 se produzca en una orientación adecuada. Los protocolos de funcionalización siguen en desarrollo, pero una de las estrategias para conseguir una funcionalización orientada de la cadherina es la utilización

de etiquetas de histidina fusionadas al fragmento EC12 que serán queladas por un ion divalente unido a la nanopartícula mediante $N\alpha, N\alpha$ Bis(carboximetil)-L-lisina hidrato (NTA).(48)

Estas nanopartículas abrirían nuevas posibilidades en la investigación de las cadherinas, ya que podrían funcionar como marcadores específicos de esta proteína debido a su interacción homofílica. Otro de los posibles desarrollos derivados del magnetismo de las partículas de óxido de hierro podría ser el tratamiento focalizado a determinadas células. Por ejemplo, en el desarrollo de tumores, se produce una desregulación ya descrita, que consiste en un descenso de la presencia de cadherina E en la superficie celular y un aumento de cadherina N. Este patrón distintivo podría utilizarse para unir a dichas células tumorales nanopartículas magnéticas funcionalizadas con la cadherina N. Tras la aplicación de un campo magnético, el calor generado por las nanopartículas (hipertermia magnética) podría ocasionar un aumento de la permeabilidad de su membrana selectivamente, lo que podría utilizarse para introducir en estas células algún compuesto o fármaco. Este mismo principio podría ser utilizado a su vez para ocasionar la muerte dirigida de las células marcadas selectivamente aumentando la temperatura generada. En un futuro ideal, este sería un posible tratamiento para la metástasis de tumores. También se ha observado que nanoestructuras funcionalizadas con cadherina E y fibronectina aumentan la eficiencia de transfección con DNA foráneo en células madre embrionarias.(49)

9 DISCUSIÓN

La investigación acerca de la cadherina E sigue siendo un tema bastante abierto en cuanto a avances. Existen numerosos trabajos que arrojan luz sobre temas como su estructura y funciones, pero siguen existiendo multitud de enigmas sobre otros aspectos de la proteína. Por ejemplo, la estructura de la proteína está caracterizada casi en su totalidad, sin embargo, no se tienen modelos estructurales completos. Tampoco se tiene constancia en detalle de cuáles son los mecanismos moleculares que regulan la formación de uniones adherentes. Se desconocen multitud de factores que poco a poco van descubriéndose y que afectan a la síntesis, procesado y destrucción de la cadherina E. En cuanto a las funciones de la proteína, se ha comprobado que principalmente regula la adhesión de células, pero todavía hay mucho terreno que descubrir en las posibles implicaciones que esta función conlleva en procesos biológicos.

Dos de los temas en los que más se está investigando acerca de esta proteína son su papel en mecanismos de desarrollo en procesos cancerígenos y embrionarios. En última instancia se desea poder conocer al completo qué regula la cadherina E para comprender estos procesos aún desconocidos en su mayor parte. Esto se está consiguiendo con grandes avances en campos

como la genómica y la proteómica en áreas acerca de los estudios de HDGC o en la creación de nuevos tratamientos basados en nuevos materiales funcionalizados. La caracterización de las mutaciones que predisponen a HDGC posibilitaría la detección precoz de esta enfermedad y podría abrir paso a la detección de otros tipos de cáncer. Todo esto junto con a los nuevos avances en el terreno de la nanotecnología podrían aportar indicios de una posible terapia dirigida a ciertos tipos de cánceres.

En cuanto a los nuevos materiales funcionalizados, está siendo posible gracias a ellos el poder comprender en su totalidad los mecanismos de adhesión de las cadherinas. A su vez, se están descubriendo nuevas aplicaciones de estas proteínas. Estos avances podrían mejorar por ejemplo protocolos de transfección o la generación de nuevos implantes biocompatibles. El futuro de sus aplicaciones podría residir en los nanomateriales, pero aun es necesario adquirir más conocimiento en esta área.

10 DISCUSSION

Research on E-cadherin remains a wide-open topic in terms of progress. There are numerous works that shed light on topics such as its structure and functions. However, there are still many other unknown aspects of this protein. For example, the structure of the protein is almost fully characterized, although there are no complete structural models. There is also no record of the detailed molecular mechanisms that regulate the formation of adherent bonds. A multitude of factors that are gradually being discovered and that affect the synthesis, processing and destruction of E-cadherin are unknown to us. Regarding the functions of the protein, it has been found that it mainly regulates cell adhesion, but there is still much ground to discover the possible implications that this subject entails in biological processes.

Two of the topics in which more are being carried out about this protein are its role in mechanisms of development of carcinogenic and embryonic processes. Ultimately, it is desired to be able to know the processes that are regulated by E-cadherin and which are still largely unknown. This is being achieved with great advances in different fields, such as genomics and proteomics in areas about HDGC studies or the development of new treatments based on new functionalized materials. The characterization of the mutations that predispose someone to suffer HDGC would make possible the early detection of this disease and could lead the way to the detection of other types of cancer. All this together with the new advances in the field of nanotechnology could provide indications of a possible directed therapy at some types of known cancers.

As for the new functionalized materials, thanks to them, it is being possible to fully understand the adhesion mechanisms of cadherins. In turn, new applications of these proteins are being discovered. These advances could improve, for example, transfection protocols or the generation of new biocompatible implants. The future of this protein could reside in the new nanostructures, although we need more knowledge in this area.

11 BIBLIOGRAFÍA

1. Wilkins MR, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF. Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2013. Disponible en: <https://books.google.es/books?id=luptCQAAQBAJ>
2. Phizicky E, Bastiaens PIH, Zhu H, Snyder M, Fields S. Protein analysis on a proteomic scale. *Nature*. marzo de 2003;422(6928):208-15.
3. Wilkins MR, Sanchez J-C, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, et al. Progress with Proteome Projects: Why all Proteins Expressed by a Genome Should be Identified and How To Do It. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 1 de diciembre de 1996;13(1):19-50.
4. Meredith GD, Wu HY, Allbritton NL. Targeted Protein Functionalization Using His-Tags. *Bioconjug Chem*. septiembre de 2004;15(5):969-82.
5. Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*. 9 de febrero de 1996;84(3):345-57.
6. van Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci*. diciembre de 2008;65(23):3756-88.
7. Hinck L, Nelson WJ. Wnt-1 Modulates Cell-Cell Adhesion in Mammalian Cells by Stabilizing β -Catenin Binding to the Cell Adhesion Protein Cadherin. *J Cell Biol*. 1994;124:13.
8. Gumbiner BM. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. agosto de 2005;6(8):622-34.
9. Shiozaki H, Oka H, Inoue M, Tamura S, Monden M. E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. *Am Cancer Soc*. 1996;77:1605-13.
10. Kemler R, Ozawa M, Ringwald M. Calcium-dependent cell adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol*. 1 de octubre de 1989;1(5):892-7.
11. Aberle H, Schwartz H, Kemler R. Cadherin-catenin complex: Protein interactions and their implications for cadherin function. *J Cell Biochem*. 1996;61:514-23.
12. Nollet F, Kools P, van Roy F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members 1 Edited by M. Yaniv. *J Mol Biol*. junio de 2000;299(3):551-72.

13. Angst BD, Marcozzi C, Magee AI. The cadherin superfamily. *J Cell Sci.* 2001;114:629-41.
14. Prakasam AK, Maruthamuthu V, Leckband DE. Similarities between heterophilic and homophilic cadherin adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17 de octubre de 2006;103(42):15434-9.
15. Parisini E, Higgins JMG, Liu J, Brenner MB, Wang. J. The crystal structure of human E-cadherin domains 1 and 2, and comparison with other cadherins in the context of adhesion mechanism. *J Mol Biol.* 19 de octubre de 2007;373(2):401-11.
16. Patel SD, Ciatto C, Chen CP, Bahna F, Rajebhosale M, Arkus N, et al. Type II Cadherin Ectodomain Structures: Implications for Classical Cadherin Specificity. *Cell.* 24 de marzo de 2006;124(6):1255-68.
17. Piedra Bueno J, Duñach Masjuan M, García de Herreros Madueño A. Regulación de la estructura y funcionalidad de la β -catenina por fosforilación de residuos de tirosina. [Barcelona]: Universitat Autònoma de Barcelona; 2003.
18. Inuzuka H, Miyatani S, Takeichi M. R-cadherin: a novel Ca(2+)-dependent cell-cell adhesion molecule expressed in the retina. *Neuron.* julio de 1991;7(1):69-79.
19. Harrison OJ, Jin X, Hong S, Bahna F, Ahlsen G, Brasch J, et al. The Extracellular Architecture of Adherens Junctions Revealed by Crystal Structures of Type I Cadherins. *Structure.* 9 de febrero de 2011;19(2):244-56.
20. Zotero | Your personal research assistant [Internet]. [citado 14 de noviembre de 2019]. Disponible en: <https://www.zotero.org/>
21. CDH1 - Cadherin-1 precursor - Homo sapiens (Human) - CDH1 gene & protein [Internet]. [citado 8 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.uniprot.org/uniprot/P12830#sequences>
22. Berx G, Staes K, van Hengel J, Molemans F, Bussemakers MJG, van Bokhoven A, et al. Cloning and characterization of the human invasion suppressor gene E-cadherin (CDH1). *Genomics.* marzo de 1995;26(2):281-9.
23. Oliveira C, Suriano G, Ferreira P, Canedo P, Kaurah P, Mateus R, et al. Genetic Screening for Familial Gastric Cancer. *Hered Cancer Clin Pract.* 15 de mayo de 2004;2(2):51-64.
24. CDH1 (cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)) [Internet]. [citado 21 de mayo de 2020]. Disponible en: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/CDH1ID166ch16q22.html>
25. Genome Decoration Page [Internet]. [citado 21 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/gdp>
26. Graziano F. The E-Cadherin Gene, Structure and Function. En: Corso G, Roviello F, editores. *Spotlight on Familial and Hereditary Gastric Cancer* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2013. p. 27-33. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-94-007-6570-2_4
27. Pinho SS, Reis CA, Paredes J, Magalhaes AM, Ferreira AC, Figueiredo J, et al. The role of N-acetylglucosaminyltransferase III and V in the post-transcriptional modifications of E-cadherin. *Hum Mol Genet.* 15 de julio de 2009;18(14):2599-608.

28. Mukherjee M, Chow SY, Yusoff P, Seetharaman J, Ng C, Sinniah S, et al. Structure of a novel phosphotyrosine-binding domain in Hakai that targets E-cadherin: Structure of a novel phosphotyrosine-binding domain in Hakai. *EMBO J.* 7 de marzo de 2012;31(5):1308-19.
29. Ito K, Okamoto I, Araki N, Kawano Y, Nakao M, Fujiyama S, et al. Calcium influx triggers the sequential proteolysis of extracellular and cytoplasmic domains of E-cadherin, leading to loss of β -catenin from cell – cell contacts. *Oncogene.* noviembre de 1999;18(50):7080-90.
30. Steinhilber U, Weiske J, Badock V, Tauber R, Bommert K, Huber O. Cleavage and Shedding of E-cadherin after Induction of Apoptosis. *J Biol Chem.* 16 de febrero de 2001;276(7):4972-80.
31. Marambaud P, Shioi J, Serban G, Georgakopoulos A, Sarnier S, Nagy V, et al. A presenilin-1/ γ -secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J.* 15 de abril de 2002;21(8):1948-56.
32. Pokutta S, Weis WI. Structure and Mechanism of Cadherins and Catenins in Cell-Cell Contacts. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 18 de octubre de 2007;23(1):237-61.
33. Ozawa M, Hoschützky H, Herrenknecht K, Kemler R. A possible new adhesive site in the cell-adhesion molecule uvomorulin. *Mech Dev.* diciembre de 1990;33(1):49-56.
34. Wagner G. E-cadherin: a distant member of the immunoglobulin superfamily. *Science.* 20 de enero de 1995;267(5196):342.
35. Weis WI. Cadherin structure: a revealing zipper. *Structure.* 1 de mayo de 1995;3(5):425-7.
36. Huber O, Kemler R, Langosch D. Transmembrane domain of E-cadherin. *J Cell Sci.* 1999;112:4415-23.
37. Nagafuchi A, Takeichi M. Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *EMBO J.* diciembre de 1988;7(12):3679-84.
38. Huber AH, Stewart DB, Laurents DV, Nelson WJ, Weis WI. The Cadherin Cytoplasmic Domain Is Unstructured in the Absence of β -Catenin: A POSSIBLE MECHANISM FOR REGULATING CADHERIN TURNOVER. *J Biol Chem.* 13 de abril de 2001;276(15):12301-9.
39. Ozawa M, Kemler R. The Membrane-proximal Region of the E-Cadherin Cytoplasmic Domain Prevents Dimerization and Negatively Regulates Adhesion Activity. *J Cell Biol.* 21 de septiembre de 1998;142(6):1605-13.
40. Fichtner D, Lorenz B, Engin S, Deichmann C, Oelkers M, Janshoff A, et al. Covalent and Density-Controlled Surface Immobilization of E-Cadherin for Adhesion Force Spectroscopy. *PLOS ONE.* 27 de marzo de 2014;9(3):e93123.
41. Stemmler MP, Bedzhov I. A Cdh1HA knock-in allele rescues the Cdh1^{-/-} phenotype but shows essential Cdh1 function during placentation. *Dev Dyn.* 2010;239(9):2330-44.
42. Orphanet: Síndrome blefaro queilo odóntico [Internet]. [citado 17 de junio de 2020]. Disponible en: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=ES&Expert=1997

43. Hansford S, Kaurah P, Li-Chang H, Woo M, Senz J, Pinheiro H, et al. Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: *CDH1* Mutations and Beyond. *JAMA Oncol.* 1 de abril de 2015;1(1):23.
44. Pharoah PDP, Guilford P, Caldas C. Incidence of gastric cancer and breast cancer in *CDH1* (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology.* diciembre de 2001;121(6):1348-53.
45. Oliveira C, Senz J, Kaurah P, Pinheiro H, Sanges R, Haegert A, et al. Germline *CDH1* deletions in hereditary diffuse gastric cancer families. *Hum Mol Genet.* 1 de mayo de 2009;18(9):1545-55.
46. Carneiro P, Fernandes MS, Figueiredo J, Caldeira J, Carvalho J, Pinheiro H, et al. E-cadherin dysfunction in gastric cancer - Cellular consequences, clinical applications and open questions. *FEBS Lett.* 31 de agosto de 2012;586(18):2981-9.
47. Dehli J, Karlsson C, Bizelli-Silveira C, Jiang X, Kraft D, Foss M. E-cadherin mediated cell-biomaterial interaction reduces migration of keratinocytes in-vitro. *Colloids Surf B Biointerfaces.* agosto de 2019;180:326-33.
48. Moreno Antolín E. Oriented functionalization of magnetic nanoparticles with E-cadherin. [Zaragoza]: Universidad de Zaragoza; 2017.
49. Kutsuzawa K, Chowdhury EH, Nagaoka M, Maruyama K, Akiyama Y, Akaike T. Surface functionalization of inorganic nano-crystals with fibronectin and E-cadherin chimera synergistically accelerates trans-gene delivery into embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* noviembre de 2006;350(3):514-20.