

# Primjena globalnih metoda analize u identificiranju uloge proteina TFF2 u organizmu

## Global methods approach in deciphering the role of TFF2 proteins in organism

Mirela Baus Lončar

Institut "Ruđer Bošković",  
Zavod za molekularnu medicinu,  
Laboratorij za sistemske biomedicinu

Primljeno: 5. 10. 2008.  
Prihvaćeno: 10. 12. 2008.

Adresa za dopisivanje:  
\* **Doc. dr. sc. Mirela Baus Lončar**,  
Institut "Ruđer Bošković",  
Zavod za molekularnu medicinu,  
Laboratorij za sistemske biomedicinu,  
Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

**SAŽETAK.** Tijekom posljednjih petnaestak godina za istraživanje uloge različitih proteina i mehanizama nastanka bolesti primjenjuju se sistemski pristupi i analize kojima se istovremeno prate globalne promjene razine ekspresije velikog broja gena i/ili proteina. Imajući na umu složene interakcije na razini stanica i činjenicu kako je većina bolesti multifaktorijalnog podrijetla, takav sistemski pristup najbolji je način stjecanja uvida u funkciju nekog proteina i/ili mehanizme nastanka bolesti. Proteini "Trefoil Factor Family" ili proteini TFF (TFF1, TFF2, TFF3) otkriveni su prije više od 25 godina, te je ubrzo postalo jasno kako je njihova uloga u organizmu iznimno kompleksna. Tek je sistemski pristup istraživanju analize uloge proteina TFF2 razjasnio njegovu ulogu u organizmu pokazujući vezu s imunološkim sustavom.

**Ključne riječi:** gastrointestinalna obrana, imunološki sustav, proteini TFF, TFF2

**ABSTRACT.** In the last fifteen years a systemic approach has been widely implemented in the investigation of different proteins' function as well as to elucidate the mechanisms underlying disease development. Simultaneous monitoring of global changes through gene expression studies combined with protein pattern analyses represents the best way to unveil the function of some proteins and/or pathogenesis mechanisms for various disease especially when knowing that multiple interaction patterns are present inside the cells and that causes of diseases are often multifactorial. Trefoil factor family proteins (TFFs) have been discovered more than 25 years ago. It has soon become clear that their role in biological systems is multifactorial and quite complex. A systemic approach to their analyses brought out the role of TFF2 involvement in the processes relevant for the immune system.

**Key words:** gastrointestinal defence, immune system, TFF proteins, TFF2

## UVOD

“Trefoil Factor Family” proteini (TFF) kod čovjeka predstavljaju male proteine veličine 7 – 14 kDa koji imaju tri disulfidne veze odgovorne za stvaranje strukture slične listu djeteline (engl. *trefoil*)<sup>1</sup> (slika 1), po čemu su proteini ove skupine i dobili svoje ime. Ovakva im strukturna domena osigurava otpornost na razgradnju zbog povećanja topline ili pak kod djelovanja kiseline, odnosno raznih enzima. Ovi su proteini funkcionalno djelotvorni u obliku monomera (TFF2) i dimera (TFF1 i TFF3). Mjesto njihove najveće ekspresije kod čovjeka je probavni trakt koji je ujedno i najveća površina ljudskog tijela kojom smo u neposrednom dodiru s vanjskim svijetom. Protein TFF1 je ekspimiran u stanicama površine želučane mukoze<sup>2</sup>, dok je protein TFF2 prisutan u antralnim i piloričkim žlijezdama želuca te u Brunnerovim žlijezdama tankoga crijeva<sup>3</sup>. Protein TFF3 sintetizira se u vrčastim stanicama crijeva<sup>4</sup>, a u nešto manjoj količini i u želucu<sup>5</sup>.

Epitel probavnog trakta stalno je izložen djelovanju različitih mikroorganizama i njihovih produkata te, kako bi održavao homeostazu, proizvodi spojeve koji ograničavaju upalni proces i pomažu održavanju cjelovitosti epitelne barijere. Mehanizmi djelovanja proteina TFF su raznoliki i uključuju ulogu jednostavne sekrecije pri čemu se vežu na mucine, kao i ulogu kompleksnih proteina uključenih u različite aspekte karcinogeneze (TFF1 je, primjerice, potencijalni tumor-supresorski protein) i upalnih reakcija. Nedavno je otkriveno kako proteini TFF2 i TFF3 sudjeluju u modulaciji imunološkog odgovora, stoga se postavlja i logično pitanje njihove uloge u cijelom organizmu, a ne samo u probavnom traktu.

Mukozni epitel probavnog sustava izložen je učestalim ozljedama koje uzrokuju upalne reakcije u ozlijeđenom tkivu. Nekontrolirani upalni procesi mogu postati kronični procesi koji su prepoznati kao rizični čimbenik pri nastanku tumora u različitim organima<sup>6</sup>. Ta povezanost osobito je izražena u slučaju inflamatorne bolesti crijeva (IBD: ulcerozni kolitis i Chronova bolest). Učestale ozljede tkiva i njegova regeneracija uz prisustvo visoko reaktivnih molekula kisika i dušika proizvedenih od strane leukocita i ostalih fagocita povećavaju učestalost mutacija u molekulama DNA epitela tijekom proliferacije, što povećava mogućnost na-

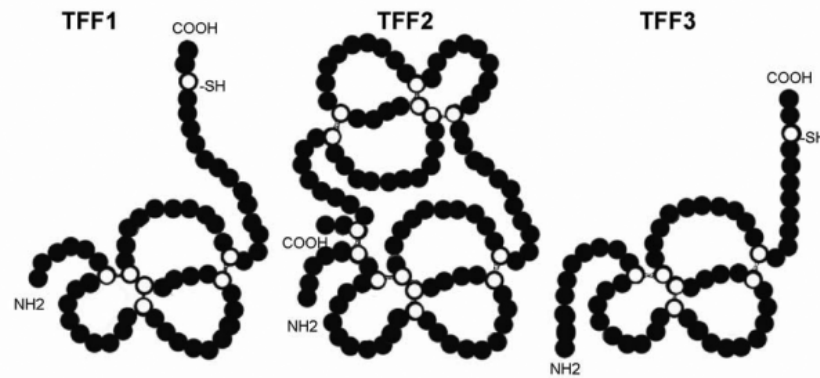
stanka tumora<sup>7</sup>. Proteini TFF kao glavni sekretorni produkti epitela probavila imaju važnu ulogu u njegovoj homeostazi gdje sudjeluju u zaštiti epitela i mehanizmima njegova popravka.

## OBRAMBENI SUSTAV PROBAVNOG TRAKTA

Sa svojom površinom od oko tristo metara kvadratnih mukoza probavnog trakta najveća je površina ljudskoga tijela u dodiru (preko lumena probavne cijevi) s okolinom. Jednoslojni epitel ojačan čvrstim spojevima i debelim slojem muku-

“Trefoil Factor Family” proteini (TFF) kod čovjeka imaju više funkcija koje uključuju ulogu jednostavne sekrecije, pri čemu se vežu na mucine, ulogu kompleksnih proteina uključenih u različite aspekte karcinogeneze te ulogu u modulaciji imunološkog odgovora. Najvrjedniji podaci o funkciji proteina TFF2 dobiveni su uz pomoć tzv. *knock-out* mišjeg modela u kojem je gen za protein TFF2 inaktiviran.

sa i glikokaliksom<sup>8</sup> ima ulogu fizičke prepreke prema vanjskom svijetu i istovremeno je mjesto selektivne apsorpcije hranjivih tvari. Urođeni imunološki odgovor s brojnim nespecifičnim mehanizmima obrane (primjerice želučana kiselina, probavni enzimi, peristaltika, fagociti, cjelovitost epitelnog sloja, antimikrobni protein i proteini TFF) predstavljaju prvu liniju zaštite probavila<sup>9</sup>. Imunološki sustav mukoze crijeva je specifičan u odnosu na ostale dijelove probavila. Primarna mjesta indukcije imunološkog odgovora su brojne limfoidne nakupine prisutne u mukozu crijeva (tzv. Payerove ploče i limfoidni folikuli) u koje putuju sve limfoidne stanice. Epitelne stanice crijeva sprječavaju prodor stranih antigena i olakšavaju prezentaciju antigena imunološkim stanicama preko receptora MHC II. Specijalizirane stanice M, razasute među epitelnim stanicama koje pokrivaju folikule Payerovih ploča, ingestijom prenose unijete antigene i mikroorganizme iz lumena crijeva. Dendritičke pak stanice subepitelne regije predstavljaju glavne antigen-prezentirajuće stanice koje vežu bakterijske produkte uz pomoć svojih receptora TL (engl. *toll like*) i prezentiraju ih T-limfocitima koji pak pomažu pokretanje proizvodnje IgA preko B-limfocita<sup>10</sup>. IgA je glavni imunoglobulin mukoze koji potpomaže odlaganje antigena bez



**Slika 1.** Predložena sekundarna struktura humanih proteina TFF s disulfidnim vezama; cisteinski ostaci (otvoreni krugovi) formiraju veze na položaju 1-5, 2-4 i 3-6. Prema prijedlogu Thim L<sup>1</sup>.

**Figure 1.** Proposed secondary structure of human TFF proteins with formed disulfide bonds between cysteins (open circles) on positions 1-5, 2-4 i 3-6. Suggested by Thim L<sup>1</sup>.



**Slika 2.** Statistički značajno modulirani geni u TFF2<sup>-/-</sup> miševa. Omjer signala 9 u usporedbi između divljeg tipa i TFF2<sup>-/-</sup> miševa<sup>31</sup>. Prikazani su geni čiji intenzitet signal je >100 i čija promjena ekspresije je značajna i imaju promjenu ekspresije ≥1.6. Ekspresijski uzorak gena predstavljen je kao nijanse crvene boje (povećana ekspresija) i zelene boje (smanjena ekspresija).

**Figure 2.** Statistically relevant modulated gene expression in TFF2<sup>-/-</sup> mice. Ratio of signals in nine comparisons between wild type and TFF2<sup>-/-</sup> mice<sup>31</sup>. Represented are genes with intensity signals >100 with fold change ≥1.6. Expression pattern is shown by appropriate intensity of red (up regulated expression) and green (down regulated expression) colour.

pokretanja kaskade sustava komplementa. Ovako aktivirani B-limfociti migriraju iz Payerovih naku-pina u mezenteričke limfne čvorove i laminu propriju gdje diferenciraju u plazma-stanice. Glavno mjesto intestinalnog imunološkog odgovora je lamina proprija u kojoj se nalaze brojne heterogene nakupine limfoidnih i mijeloidnih stanica koje kroz integrativni mehanizam proizvode specifične kostimulatorne, adhezijske i efektorske molekule kao što su to citokini<sup>11</sup>. Površina probavnog sustava je stalno izložena potencijalno opasnim antigenima i tvarima koje su jaki inicijatori imunološkog odgovora. Fiziološko stanje mukoze probavila suzdržana je upala gdje brojni imunološki mehanizmi balansiraju stanje između sprječavanja mikrobne invazije i sprječavanja prekomjernog odgovora koji dovodi do kroničnih upala. Za uspješno održavanje ravnoteže između ovih dvaju zahtjeva nužna je cjelovitost mukoze površine koju, uz ostalo, osiguravaju i proteini TFF. Ekspresija proteina TFF povećava se zbog ozljeda epitela<sup>12</sup> i pospješuje kratkotrajne (restitucija) i dugotrajne (reepitelizacija žlijezda) procese zacjeljenja epitela. Proteini TFF potječu migraciju stanica<sup>13,14</sup>, inhibiraju apoptozu migrirajućih stanica<sup>15</sup>, te povećanjem viskoznosti mukusa umanjuju doticaj obnavljajućeg epitela sa štetnim agensima<sup>16,17</sup>. Istovremeno, njihova ekspresija regulirana je uz pomoć upalnih<sup>18</sup> i protuupalnih citokina<sup>19-21</sup>. Proteini TFF prisutni su u probavnom sustavu, ali i u ostalim dijelovima organizma, pa tako i u imunološkom sustavu (slezina, makrofazi i timus)<sup>22</sup>.

### FUNKCIJA TFF2 U IMUNOREGULACIJI

Istraživanja kojima je praćena lokalizacija radioaktivno obilježenih proteina TFF pokazala su kako TFF2-producirajuće stanice internaliziraju proteine TFF i kao takve ih prezentiraju bazolateralno-receptoru. Ovo ukazuje na moguću unakrsnu regulaciju i autoregulaciju sekrecije TFF i funkcionalnu kompleksnost<sup>23,24</sup>. Do danas je otkriveno nekoliko interakcijskih partnera za TFF2. To su, prije svega, protein beta podjedinica fibronektinskog receptora 140 kDa, muclin 224 kDa ili CRP-duktin<sup>25</sup> te gastrokin-2<sup>26</sup>.

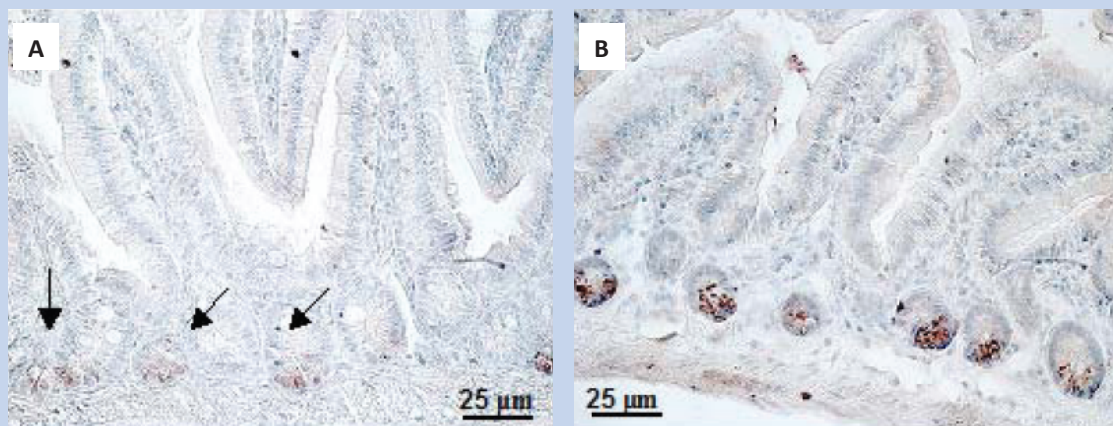
No, ni za jednog od njih nije pokazano da uistinu posreduje djelovanju TFF2. Nedavno je otkriveno kako TFF2 u tumorskim stanicama aktivira signalne putove preko kemokinskog receptora CXCR4<sup>27</sup>. Uz to, TFF2 ima antiapoptotičku aktivnost<sup>28</sup>, djeluje kao signalna molekula preko Erk1/2 te fosforilacije c-Jun N-terminalne kinaze, dok mitogeni učinak TFF2 ovisi o aktivaciji EFK1/2 i protein kinaze C (PKC)<sup>29</sup>.

Najvrjedniji podaci o funkciji proteina TFF2 dobiveni su pomoću tzv. *knock-out* mišjeg modela u kojem je gen za protein TFF2 inaktiviran<sup>30</sup>. Prvi rezultati pokazali su blagi fenotip kod TFF2 *-/-* miševa. Primijećena je dvostruko veća proizvodnja želučane kiseline i smanjena proliferacija želučane mukoze. Usporedbe genske ekspresije u epitelnom tkivu probavila (slika 2) pokazale su kako nedostatak TFF2 modulira ekspresiju brojnih gena uključenih u prirodenu i stečenu imunost<sup>31</sup>.

Ekspresija gena koji kodiraju proteosomalne podjedinice (LMP2, LMP7 i PSMB59), a uključeni su u prezentacijski put MHC I, modulirana je tako da povećava sadržaj imunoproteasoma koji imaju poboljšanu prezentaciju antigena. Modulirana je i ekspresija podjedinice transportera TAP1, važnog kod unosa razgrađenih antigena u endoplazmatski retikulum (ER), kao i ekspresija gena BAG2 koji modulira aktivnost šaperonskih proteina u ER te pomaže pravilno vezanje uz MHC I molekule. Nadalje, nedostatak TFF2 značajno je povišio razinu defenzina, urođenog antimikrobnog proteina koji je dio urođenog imunskog odgovora (slika 3). Istovremeno je bila povišena razina intestinalnog proteina bogatog cisteinom (CRIP) koji je važan regulator populacije bijelih krvnih stanica<sup>32</sup> i regulira citokinsku sintezu i imunološki odgovor<sup>33</sup>.

Važan regulator upalnih procesa u probavnom sustavu je dušikov oksid NO, koji pri akutnoj ozljedi sintetizira konstitutivno aktivna NO sintetaza (cNOS). NO pozitivno utječe na mukoza jer potječe protok krvi i oslobađa razne lokalne reparativne molekule<sup>34</sup>. U kroničnoj upali NO sintetizira inducibilna NO sintetaza (iNOS) u infiltrirajućim makrofazima i neutrofilima<sup>35</sup>, dajući slobodne radikale koji teško oštećuju tkivo i indiciraju daljnju upalu i daljnje oštećenje tkiva<sup>36</sup>.

Razina NO u enterocitima je normalno niska, a njen je porast zbog iNOS aktivacije ključan posrednik zacjeljivanja epitela prije nastupanja upalne reakcije<sup>37</sup> jer stimulirajući restituciju, proi-



**Slika 3.** Imunoreaktivnost anti-cryptdin1 prosegmenta (preteča defenzina) u tankom crijevu (A) divljeg tipa miševa i TFF2 *-/-* miševima (B)<sup>31</sup>. Defenzinski preteča sintetizira se u Panetovim stanicama tankoga crijeva, a njegova sinteza je povećana u crijevu TFF2 deficitarnih miševa.

**Figure 3.** Immunoreactivity of anti-cryptdin1 pro-segment (defensin precursor) in small intestine (A) of wild type mice and TFF2 *-/-* mice (B)<sup>31</sup>. Defensine precursor is synthesized in Paneth cells of small intestine and its synthesis is up regulated in intestine of TFF2 deficient mice.

zvodnju mukusa i zaštitu stanica, posreduje u ranoj reepitelizaciji<sup>38</sup>. Egzogeni TFF2 dan štakorima u modelu kolitisa inhibira aktivnost mijeloperoksidaze i smanjuje upalnu infiltraciju<sup>39</sup>. TFF2 snažno smanjuje regrutaciju leukocita u eksperimentalnom modelu crijevne upale jer smanjuje adheziju leukocita za intestinalne venule<sup>40</sup>. Ove činjenice ukazuju na protuupalnu ulogu egzogenog TFF2 kroz inhibiciju lokalne mobilizacije imunoloških stanica u modelu kolitisa. TFF2  $-/-$  miševi pokazali su upalnim modelima gastritisa (Helico-

Globalne metode analize kojima se istovremeno prate promjene u razini ekspresije velikog broja gena i/ili proteina sve se više koriste za razumijevanje funkcije nekog proteina i/ili mehanizama nastanka bolesti. Upravo je sistemski pristup u istraživanju uloge jednog proteina iz obitelji TFF, točnije proteina TFF2, razjasnio njegovu biološku funkciju i pokazao vezu s imunološkim sustavom.

bacter felis infekcija) i kolitisa (dekstran natrij sulfat inducirani miševi) povećani upalni odgovor u odnosu na normalne miševe<sup>41</sup>.

Detaljna analiza ekspresije otkrila je kako je TFF2 prisutan u stanicama slezene, peritonealnim makrofazima i u limfocitima. Neaktivirani makrofazi TFF2  $-/-$  miševa pokazali su hiperinflamatorni uzorak genske ekspresije sličan onom kod makrofaga divljeg tipa miševa kad ih se pobudi s IL1 $\beta$ , ukazujući na ulogu TFF2 u negativnoj regulaciji signalnog puta preko receptora IL1 (IL-1R). Signalizacija preko IL-1R važna je kod kroničnih upalnih procesa probavnog trakta<sup>42,43</sup> jer utječe na regulaciju raznih upalnih citokina i kemokina kao što su to, primjerice, TNF $\alpha$ , IL6, monocit kemoatraktant protein 1, kao što može i poticati autosekreciju IL1 $\beta$ . Progresija upalnih procesa želuca kroz atrofiju i tumorske promjene u vezi je s ravnotežom između proupalnih i protuupalnih citokina, gdje posebnu ulogu ima IL1 $\beta$ <sup>44</sup>.

S obzirom na negativni učinak TFF2 na signalizaciju IL-1R možemo reći da je TFF2 vjerojatno jedan od ključnih regulatora signalnog sistema epitel-imunološki sustav. Kao takav TFF2 je negativni regulator gastrointestinalnih upalnih procesa i citokinskog odgovora imunoloških stanica. TFF2 kontrolira popravak mukoze probavila, a istovremeno i imunološki odgovor limfocita i makrofaga.

## ZAKLJUČAK

Tek upotreba sistemskog pristupa analizi promjena na razini mukoze pokazala je što se događa na molekularnoj razini u slučaju nedostatka proteina TFF2 i na taj način ukazala na njegovu ulogu u imunološki relevantnim procesima. Iako je prisutnost TFF2 u limfoidnim organima pokazana još prije desetak godina<sup>45</sup>, razumijevanje njegove točne uloge omogućeno je tek sistemskim pristupom analize uz pomoć mišjeg modela TFF2  $-/-$ , što ukazuje na nužnost korištenja sistemskog pristupa za analizu konkretnog biološkog problema.

## ZAHVALA

Ovaj rad nastao je uz financijsku potporu projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa 098-0982464-2393 i 219-0982914-2179, te projekta Fonda za zapošljavanje i razvoj RH 14V09809.

## LITERATURA

1. Thim L. A new family of growth factor-like peptides. 'Trefoil' disulphide loop structures as a common feature in breast cancer associated peptide (pS2), pancreatic spasmodic polypeptide (PSP), and frog skin peptides (spasmolysins). *FEBS Lett* 1989;250:85-90.
2. Tomasetto C, Lathe R, Chenard MP, Batzenschlager A, Chambon P. Breast cancer-associated pS2 protein: synthesis and secretion by normal stomach mucosa. *Science* 1988;241:705-8.
3. Tomasetto C, Rio MC, Gautier C, Wolf C, Hareuveni M, Chambon P et al. HSP, the domain-duplicated homolog of pS2 protein, is co-expressed with pS2 in stomach but not in breast carcinoma. *EMBO J* 1990;9:407-14.
4. Suemori S, Lynch Devaney K, Podolsky DK. Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:11017-21.
5. Kouznetsova I, Peitz U, Vieth M, Meyer F, Vestergaard EM, Malfertheiner P et al. A gradient of TFF3 (trefoil factor family 3) peptide synthesis within the normal human gastric mucosa. *Cell Tissue Res* 2004;316:155-65.
6. Ohshima H, Tazawa H, Sylla BS, Sawa T. Prevention of human cancer by modulation of chronic inflammatory processes. *Mutat Res* 2005;591:110-22.
7. Coussens LM, Werb Z. Inflammatory cells and cancer: think different! *J Exp Med* 2001;193:F23-6.
8. Maury J, Bernadac A, Rigal A, Maroux S. Expression and glycosylation of the filamentous brush border glycolyx (FBBG) during rabbit enterocyte differentiation along the crypt-villus axis. *J Cell Sci* 1995;108:2705-13.
9. Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000;343:338-44.
10. Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 2002;168:554-61.

11. Wittig BM, Zeitz M. The gut as an organ of immunology. *Int J Colorectal Dis* 2003;18:181-7.
12. Cook GA, Yeomans ND, Giraud AS. Temporal expression of trefoil peptides in the TGF- $\beta$  knock-out mouse after gastric ulceration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1997;272:G1540-9.
13. Dignass A, Lynch Devaney K, Kindon H, Thim L, Podolsky DK. Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta-independent pathway. *J Clin Invest* 1994;94:376-83.
14. Oertel M, Graness A, Thim L, Buhling F, Kalbacher H, Hoffmann W. Trefoil factor family-peptides promote migration of human bronchial epithelial cells: synergistic effect with epidermal growth factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25:418-24.
15. Taupin DR, Kinoshita K, Podolsky DK. Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:799-804.
16. Sands BE, Podolsky DK. The trefoil peptide family. *Annu Rev Physiol* 1996;58:253-73.
17. Taupin D, Podolsky DK. Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:721-32.
18. Tebbutt NC, Giraud AS, Inglese M, Jenkins B, Waring P, Clay FJ et al. Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice. *Nat Med* 2002;8:1089-97.
19. Blanchard C, Durual S, Estienne M, Bouzakri K, Heim MH, Blin N et al. IL-4 and IL-13 up-regulate intestinal trefoil factor expression: requirement for STAT6 and de novo protein synthesis. *J Immunol* 2004;172:3775-83.
20. Dossinger V, Kayademir T, Blin N, Gott P. Down-regulation of TFF expression in gastrointestinal cell lines by cytokines and nuclear factors. *Cell Physiol Biochem* 2002;12:197-206.
21. Baus-Loncar M, Al azeh ED, Romanska H, Lalani E, Stamp GW, Blin N et al. Transcriptional control of TFF3 (intestinal trefoil factor) via promoter binding sites for the nuclear factor kappaB and C/EBPbeta. *Peptides* 2004;25:849-54.
22. Hoffmann W, Jagla W, Wiede A. Molecular medicine of TFF-peptides: from gut to brain. *Histol Histopathol* 2001;16:319-34.
23. Poulsen SS, Thulesen J, Nexø E, Thim L. Distribution and metabolism of intravenously administered trefoil factor 2/porcine spasmolytic polypeptide in the rat. *Gut* 1998;43:240-7.
24. Poulsen SS, Thulesen J, Hartmann B, Kissow HL, Nexø E, Thim L. Injected TFF1 and TFF3 bind to TFF2-immunoreactive cells in the gastrointestinal tract in rats. *Regul Pept* 2003;115:91-9.
25. Thim L, Mortz E. Isolation and characterization of putative trefoil peptide receptors. *Regul Pept* 2000;90:61-8.
26. Otto WR, Patel K, McKinnell I, Evans MD, Lee CY, Frith D et al. Identification of blottin: a novel gastric trefoil factor family-2 binding protein. *Proteomics* 2006;6:4235-45.
27. Dubeykovskaya Z, Dubeykovskiy A, Solal-Cohen J, Wang TC. Secreted Trefoil factor 2 activates the chemokine CXCR4 receptor in epithelial and lymphocytic cancer cell lines. *J Biol Chem* 2009;284:3650-62.
28. Lalani EN, Williams R, Jayaram Y, Gilbert C, Chaudhary KS, Siu LS et al. Trefoil factor-2, human spasmolytic polypeptide, promotes branching morphogenesis in MCF-7 cells. *Lab Invest* 1999;79:537-46.
29. Chwieralski CE, Schnurra I, Thim L, Hoffmann W. Epidermal growth factor and trefoil factor family 2 synergistically trigger chemotaxis on BEAS-2B cells via different signaling cascades. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;31:528-37.
30. Farrell JJ, Taupin D, Koh TJ, Chen D, Zhao CM, Podolsky DK et al. TFF2/SP-deficient mice show decreased gastric proliferation, increased acid secretion, and increased susceptibility to NSAID injury. *J Clin Invest* 2002;109:193-204.
31. Baus-Loncar M, Schmid J, Lalani EN, Rosewell I, Goodlad RA, Stamp GWH et al. Trefoil. Factor 2 deficiency in murine digestive tract influences the immune system. *Cell Physiol Biochem* 2005;16:31-42.
32. Davis BA, Blanchard RK, Lanningham-Foster L, Cousins RJ. Structural characterization of the rat cysteine-rich intestinal protein gene and overexpression of this LIM-only protein in transgenic mice. *DNA Cell Biol* 1998;17:1057-64.
33. Lanningham-Foster L, Green CL, Langkamp-Henken B, Davis BA, Nguyen KT, Bender BS et al. Overexpression of CRIP in transgenic mice alters cytokine patterns and the immune response. *Am J Physiol. Endocrin Metabol* 2002;282:E1197-203.
34. Alican I, Kubes PA. Critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction. *Am J Physiol* 1996;270:G225-37.
35. Wallace JL, Miller MJ. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterol* 2000;119:512-20.
36. Miampamba M, Sharkey KA. Temporal distribution of neuronal and inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine during colitis in rats. *Neurogastroenterol Motil* 1999;11:193-206.
37. Stallmeyer B, Kampfer H, Kolb N, Pfeilschifter J, Frank S. The function of nitric oxide in wound repair: inhibition of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelialization. *J Invest Dermatol* 1999;113:1090-8.
38. Gookin JL, Rhoads JM, Argenzio RA. Inducible nitric oxide synthase mediates early epithelial repair of porcine ileum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G157-68.
39. Tran CP, Cook GA, Yeomans ND, Thim L, Giraud AS. Trefoil peptide TFF2 (spasmolytic polypeptide) potently accelerates healing and reduces inflammation in a rat model of colitis. *Gut* 1999;44:636-42.
40. Soriano-Izquierdo A, Gironella M, Massaguer A, May FE, Salas A, Sans M et al. Trefoil peptide TFF2 treatment reduces VCAM-1 expression and leukocyte recruitment in experimental intestinal inflammation. *J Leukoc Biol* 2004;75:214-23.
41. Kurt-Jones EA, Cao L, Sandor F, Rogers AB, Whary MT, Nambiar PR et al. Trefoil family factor 2 is expressed in murine gastric and immune cells and controls both gastrointestinal inflammation and systemic immune responses. *Infect Immun* 2007;75:471-80.
42. Mahida YR, Wu K, Jewell DP. Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease. *Gut* 1989;30:835-8.
43. Tountas NA, Casini-Raggi V, Yang H, Di Giovine FS, Vecchi M, Kam L et al. Functional and ethnic association of allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene in ulcerative colitis. *Gastroenterol* 1999;117:806-13.
44. Hwang IR, Kodama T, Kikuchi S, Sakai K, Peterson LE, Graham DY et al. Effect of interleukin 1 polymorphisms on gastric mucosal interleukin 1beta production in Helicobacter pylori infection. *Gastroenterol* 2002;123:1793-803.
45. Cook GA, Familiari M, Thim L, Giraud AS. The trefoil peptides TFF2 and TFF3 are expressed in rat lymphoid tissues and participate in the immune response. *FEBS Lett* 1999;30:456:155-9.