

Aus dem
Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Institut der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Thomas Gudermann

**Untersuchung der zelltypspezifischen Lokalisation und
Funktion des P2X7-Rezeptors im enterischen
Nervensystem in einem BAC transgenen P2X7R-EGFP
Reportermausmodell**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Tina Natalie Jooß

aus
Sulz am Neckar

Jahr
2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichtersteller:

Prof. Dr. Annette Nicke

Mitberichtersteller:

Prof. Dr. Patrick N. Harter

Prof. Dr. Benjamin Misselwitz

PD Dr. Torsten Olszak

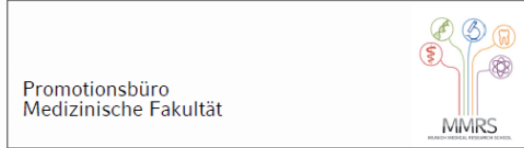
Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan:

Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.06.2025

Affidavit

			
Eidesstattliche Versicherung			

Jooß, Tina Natalie
Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

***Untersuchung der zelltypspezifischen Lokalisation
und Funktion des P2X7-Rezeptors im enterischen
Nervensystem in einem BAC transgenen P2X7R-EGFP
Reportermausmodell***

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 09.07.2025
Ort, Datum

Tina Natalie Jooß
Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Erklärung der Übereinstimmung der gebundenen und der elektronischen Fassung



Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung

Jooß, Tina Natalie

Name, Vorname

Straße, Hausnummer

PLZ, Ort

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel
Untersuchung der zelltypspezifischen Lokalisation und Funktion des P2X7-Rezeptors im enterischen Nervensystem in einem BAC transgenen P2X7R-EGFP Reportermausmodell

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

München, 09.07.2025

Ort, Datum

Tina Natalie Jooß

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Inhaltsverzeichnis

Affidavit.....	III
Erklärung der Übereinstimmung der gebundenen und der elektronischen Fassung.....	IV
Inhaltsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
Publikationsliste.....	X
1. Beitrag zu den Veröffentlichungen	1
1.1 Beitrag zu Paper I	1
1.2 Beitrag zu Paper II	2
1.3 Beitrag zu Paper III (Anhang)	2
2. Einleitung.....	3
2.1 Der P2X7-Rezeptor.....	3
2.2 Die Zelltyp-spezifische P2X7R Biosynthese und Lokalisation	5
2.3 Funktionen des P2X7R	5
2.4 Das P2X7R-EGFP Mausmodell.....	8
2.5 Der P2X7R im Gastrointestinaltrakt und seine Rolle bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen	10
2.5.1 Anatomie des Gastrointestinaltrakts	10
2.5.2 Das enterische Nervensystem	11
2.5.3 Der Aufbau des enterischen Nervensystems.....	11
2.5.4 Der Plexus myentericus	12
2.5.5 Der Plexus submucosus	12
2.5.6 Weitere Plexūs des enterischen Nervensystems.....	13
2.5.7 Der Aufbau enterischer Ganglien.....	13
2.5.8 Epidemiologie und Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.....	15
2.5.9 Die Rolle des P2X7R bei der Entstehung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen	15
2.6 Ziele der Arbeit.....	18
3. Zusammenfassung	19
4. Summary.....	21
5. Paper I.....	23
6. Paper II.....	24
7. Literatur	25
8. Anhang.....	37

8.1	Paper III	37
-----	-----------------	----

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur des P2X7-Monomers und einige Funktionen des P2X7R	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung der IL-1 β Prozessierung nach der Aktivierung des P2X7R	7
Abbildung 3: Schematische Abbildung des P2X7R-EGFP Mausmodells und des verwendeten BAC-Klons RP24-114E20	9
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Colonaufbaus	11

Abkürzungsverzeichnis

APCs	Antigen-presenting cells
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein-containing caspase-recruiting domain
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Bacterial artificial chromosome
Ca ²⁺	Calciumionen
CD	Cluster of Differentiation
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
Da	Dalton
DNBS	2,4-Dinitrobenzolsulfonsäure
DSS	Natriumdextransulfat
ECM	Extracellular matrix
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
ENS	Enterisches Nervensystem
GIT	Gastrointestinaltrakt
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
ICC	Interstitielle Zellen von Cajal
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-2	Interleukin-2
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
K ⁺	Kaliumionen
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
Kryo-EM	Kryoelektronenmikroskopie
LMMP	Longitudinal muscle myenteric plexus
Na ⁺	Natriumionen
NF- κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NLRP3	LRR- and pyrin domain-containing protein 3
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase

P2X7R	P2X purinoceptor 7
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
ROS	Reactive oxygen species
SNP	Single nucleotide polymorphism
Tfh-Zellen	Follikuläre T-Helferzellen
TGF- β	Transforming growth factor β
TM	Transmembranbereich
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
Treg	Regulatorische T-Zellen
wt	Wildtyp

Publikationsliste

Publikationen der kumulativen Dissertation:

1. **Jooss T**, Zhang J, Zimmer B, Rezzonico-Jost T, Rissiek B, Felipe Pelczar P, Seehusen F, Koch-Nolte F, Magnus T, Zierler S, Huber S, Schemann M, Grassi F, Nicke A. Macrophages and glia are the dominant P2X7-expressing cell types in the gut nervous system - no evidence for a role of neuronal P2X7 receptors in colitis. *Mucosal Immunol.* 2023.
2. Kaczmarek-Hajek K, Zhang J, Kopp R, Grosche A, Rissiek B, Saul A, Bruzzone S, Engel T, **Jooss T**, Krautloher A, Schuster S, Magnus T, Stadelmann C, Sirko S, Koch-Nolte F, Eulenburg V, Nicke A. Re-evaluation of neuronal P2X7 expression using novel mouse models and a P2X7-specific nanobody. *Elife.* 2018;7.

Weitere Publikationen (Anhang):

3. **Jooss T**, Kuch B, Zhang J, Schemann M, Nicke A. Immunofluorescence Staining of P2X7 Receptors in Whole-Mount Myenteric Plexus Preparations. *Methods Mol Biol.* 2022;2510:145-156.

Poster:

1. Zhang J, Kaczmarek-Hájek K, Saul A, **Jooss T**, Stocklauser R, Nicke A. Novel mouse models to study the localization and function of the P2X7 receptor in vivo. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2016;389 (Suppl 1). 1–104. DOI 10.1007/s00210-016-1213-y.

82nd Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT) and the 18th Annual Meeting of the Network Clinical Pharmacology Germany (VKliPha) in cooperation with the Arbeitsgemeinschaft für angewandte Humanpharmakologie e.V. (AGAH), 29.02.-03.03.2016, Berlin

2. **Jooss T**, Zhang J, Schwinghammer L, Kaczmarek-Hájek K, Zierler S, Schemann M, Nicke A. Involvement of the P2X7R in enteric neuron death during inflammatory bowel disease. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2017;390 (Suppl 1). 1–101. DOI 10.1007/s00210-017-1354-7.

83rd Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT) and the 19th Annual Meeting of the Association of the Clinical Pharmacology Germany (VKliPha), 06.03.-09.03.2017, Heidelberg

3. **Jooss T**, Freisberg S, Zierler S, Schemann M, Zhang J, Nicke A. Investigation of the P2X7R localization and function in colonic myenteric plexus preparations using a BAC transgenic P2X7-EGFP mouse model. *Purinergic Signalling.* 2017;13. 629. DOI 10.1007/s11302-017-9581-4.

The 7th Joint Italian-German Purine Club Meeting, 20.07.-22.07.2017, Rom

1. Beitrag zu den Veröffentlichungen

1.1 Beitrag zu Paper I

Jooss T, Zhang J, Zimmer B, Rezzonico-Jost T, Rissiek B, Felipe Pelczar P, Seehusen F, Koch-Nolte F, Magnus T, Zierler S, Huber S, Schemann M, Grassi F, Nicke A. Macrophages and glia are the dominant P2X7-expressing cell types in the gut nervous system - no evidence for a role of neuronal P2X7 receptors in colitis. *Mucosal Immunol.* 2023.

Als Erstautor mit geteilter Erstautorenschaft war mein Beitrag zu der o.g. Veröffentlichung wie folgt:

- Planung der Experimente (zusammen mit Dr. Jiong Zhang)
- Durchführung der Experimente (Präparationen, Kryoschnitte, Färbungen, *ex vivo* ATP- und BzATP-Experimente, Mikroskopie, Quantifizierungen, statistische Auswertung) und Anfertigung der Abbildungen:
 - Abbildungen 1: 1B, 1C, 1D
 - Gesamte Abbildung 2
 - Gesamte Abbildung 3
 - Gesamte Abbildung 4
 - Abbildungen 5: 5A, 5B Bild 1
 - Abbildungen 6: 6A, 6D
 - Supplement Abbildung 1: Gesamte Abbildung
 - Supplement Abbildung 2: Gesamte Abbildung
 - Supplement Abbildung 3: 3A, 3B Bild 2
 - Supplement Abbildung 4: Gesamte Abbildung
 - Supplement Abbildung 5: Gesamte Abbildung
 - Supplement Abbildung 6: Gesamte Abbildung
- Verfassen eines Manuskriptentwurfs und Editieren des Manuskripts

1.2 Beitrag zu Paper II

Kaczmarek-Hajek K, Zhang J, Kopp R, Grosche A, Rissiek B, Saul A, Bruzzone S, Engel T, **Jooss T**, Krautloher A, Schuster S, Magnus T, Stadelmann C, Sirko S, Koch-Nolte F, Eulenburg V, Nicke A. Re-evaluation of neuronal P2X7 expression using novel mouse models and a P2X7-specific nanobody. *Elife*. 2018;7.

Als Koautor war mein Beitrag zu der o.g. Veröffentlichung wie folgt:

- Durchführung aller Experimente für die Abbildung 4, figure supplement 1B und Anfertigung der Abbildung
- Editieren des Manuskripts

1.3 Beitrag zu Paper III (Anhang)

Jooss T, Kuch B, Zhang J, Schemann M, Nicke A. Immunofluorescence Staining of P2X7 Receptors in Whole-Mount Myenteric Plexus Preparations. *Methods Mol Biol*. 2022;2510:145-156.

Als Erstautor war mein Beitrag zu der o.g. Veröffentlichung wie folgt:

- Durchführung aller Experimente und Anfertigung der Abbildungen 1, 2 B bis E, 3 A, B
- Verfassen und Editieren des Manuskripts

2. Einleitung

2.1 Der P2X7-Rezeptor

Der P2X7-Rezeptor (P2X7R) ist ein ATP-gesteuerter Kationenkanal, dessen Aktivierung zum Influx von Na^+ und Ca^{2+} sowie dem Efflux von K^+ führt [1, 2]. Im Gegensatz zu den sechs anderen P2X-Rezeptorsubtypen ist der P2X7R durch eine niedrige ATP-Affinität charakterisiert und wird deshalb auch als „Gefahrenrezeptor“ bezeichnet [3, 4]. Eine weitere Besonderheit des P2X7R ist die sogenannte Porenbildung. Die repetitive oder anhaltende Stimulation des P2X7R führt zur Ausbildung einer unselektiven Plasmamembranpore, die für Moleküle bis zu einer Größe von 900 Dalton (Da) permeabel ist [4, 5], [6, 7].

Das humane P2X7-Gen besteht aus 13 Exons und liegt auf dem humanen Chromosom 12. Das murine P2X7-Gen ist auf dem Chromosom 5 lokalisiert [8, 9]. Bisher wurden 9 verschiedene humane Splicevarianten (P2X7B-J) und über 650 Einzelnukleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphism, SNP) identifiziert [9-13]. Einige dieser SNPs zeichnen sich dabei durch eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Pathogenen wie beispielsweise *Mycobacterium tuberculosis* aus oder werden mit Erkrankungen wie der chronisch lymphatischen Leukämie assoziiert [9, 14-17].

Bei Nagern wurden bisher vier unterschiedliche Splicevarianten (P2X7a, P2X7k, P2X713b, P2X713c) identifiziert [18]. Die P2X7k-Variante verfügt über einen alternativen N-Terminus und eine alternative Transmembrandomäne 1 (TM1). Sie ist voll funktionsfähig. Die Isoform der Ratte weist jedoch eine höhere Sensitivität gegenüber Agonisten, eine verstärkte Porenbildung und eine langsamere Deaktivierung auf [9, 19, 20].

Das P2X7-Monomer besteht aus 595 Aminosäuren und bildet den homotrimeren P2X7R [1, 21]. Der transmembrane Bereich (TM) des P2X7-Monomers besteht aus zwei Helices, die jeweils 24 Aminosäuren lang sind (Abbildung 1). Extrazellulär besitzt das P2X7-Monomer einen aus 282 Aminosäuren bestehenden Teil. Wie alle P2X-Rezeptorsubtypen, verfügt das P2X7-Monomer über einen kurzen intrazellulären N-Terminus, der 26 Aminosäuren lang ist [18, 22]. Das intrazelluläre C-terminale Ende ist im Gegensatz zu allen anderen P2X-Rezeptorsubtypen sehr lang und besteht aus 239 Aminosäuren. Es besitzt mehrere Lipid- und Proteinbindemotive [23, 24] und reguliert unter anderem Protein-Protein-Interaktionen sowie posttranslationale Modifikationen [25, 26]. Für die Porenbildung ist der C-Terminus unverzichtbar [18, 21]. Die Kryo-EM-Struktur des P2X7R wurde kürzlich publiziert [27] und zeigt eine globuläre Struktur des C-Terminus sowie eine unerwartete Zink-Bindungsstelle und ein neuartiges GTP/GDP-Bindemotiv.

Freisetzung von extrazellulärem ATP durch:

- Entzündung
- Zelluntergang
- Mikroflora

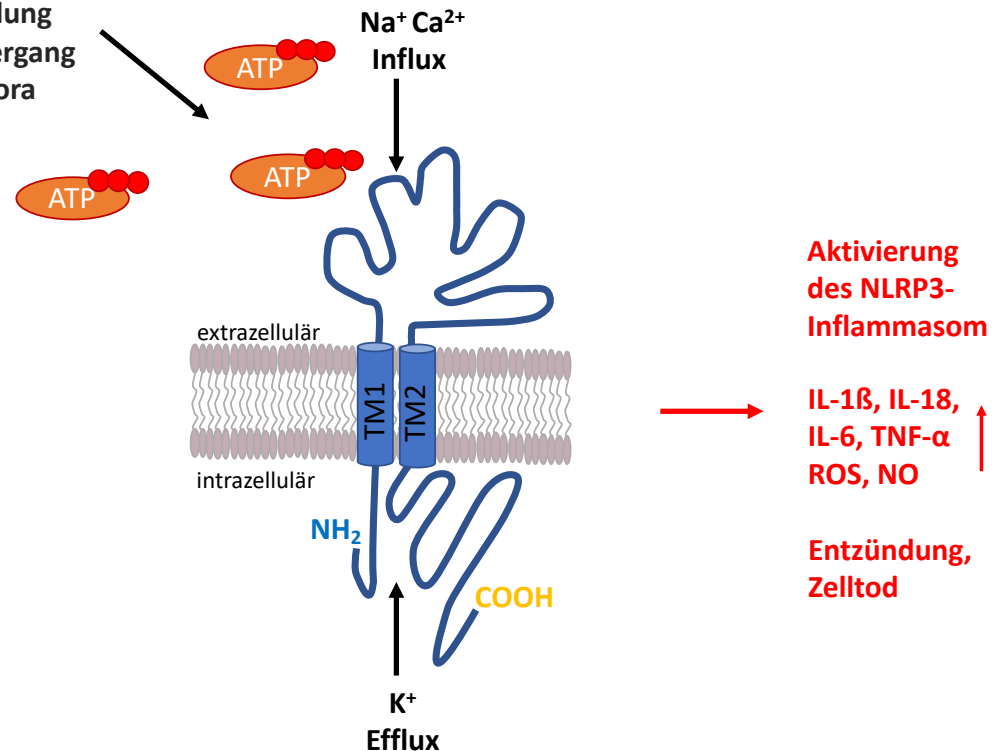


Abbildung 1: Struktur des P2X7-Monomers und einige Funktionen des P2X7R

Abbildung modifiziert nach Bartlett et. al., 2014 und Mortaz et al., 2012 [28, 29]. Die Abbildung zeigt die vereinfachte, schematische Darstellung des 595 Aminosäuren großen P2X7-Monomers. Dieses verfügt über zwei transmembrane Helices (TM1 und TM2), einen extrazellulären Teil sowie einen kurzen intrazellulären N-Terminus und den 239 Aminosäuren umfassenden intrazellulären C-Terminus. Das P2X7-Monomer bildet den homotrimeren P2X7-Rezeptor [1, 21].

Durch Entzündung und Zelltod kommt es zur extrazellulären Akkumulation von Nukleotiden wie ATP. Auch kommensale Bakterien der Mikroflora setzen ATP frei [30, 31]. Die Aktivierung des P2X7R durch ATP führt zum Influx von Na^+ und Ca^{2+} sowie dem Efflux von K^+ [1, 2], zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasom, zur Freisetzung von Zytokinen, Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffmonoxid (NO) [18, 25, 32-41] sowie zur Entzündung und der Induktion des Zelltodes [18, 42-48].

2.2 Die Zelltyp-spezifische P2X7R Biosynthese und Lokalisation

Der P2X7R wird nachweislich vor allem von Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems wie Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen, Mastzellen und Lymphozyten sowie von Epithel- und Endothelzellen exprimiert und biosynthetisiert und nimmt dadurch u.a. eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunantwort sowie entzündlicher Prozesse ein [9, 37, 49-63].

Immunhistochemische und elektrophysiologische Untersuchungen des zentralen Nervensystems (ZNS) wiesen die P2X7R Synthese durch Gliazellen wie Astrozyten, Oligodendrozyten und Ependymzellen [64-68] sowie die Expression und Synthese des P2X7 auf mRNA- und Proteinebene aktivierter Mikroglia nach [34, 53, 68-71].

Einige Studien berichten zudem von der Expression und Synthese des P2X7R durch Neuronen des ZNS [68, 72-75]. Der neuronale P2X7R wird hierbei u.a. mit der Induktion des neuronalen Zelltods assoziiert [68, 72, 73]. Trotz zahlreicher Studien in den letzten Jahren, wird die neuronale P2X7R Lokalisation und Funktion kontrovers diskutiert [76, 77].

Außerhalb des ZNS wird der P2X7R u.a. von Schwann- und Satellitenzellen des peripheren Nervensystems (PNS) sowie von Gliazellen des enterischen Nervensystems (ENS) exprimiert und synthetisiert [9, 78].

2.3 Funktionen des P2X7R

Untersuchungen mit *P2rx7^{-/-}* Mausmodellen und P2X7R Antagonisten deuten auf die Involvierung des P2X7R in den Knochenstoffwechsel [79-81], den Glukose- und Lipidstoffwechsel [82, 83], in die Pathogenese von chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis [84] sowie auf die Assoziation mit Tumorerkrankungen [85, 86] und der Tumormetastasierung hin [87, 88]. Der P2X7R scheint an der Pathogenese von Epilepsie [89, 90] und neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer-Erkrankung, Chorea Huntington sowie dem Parkinson-Syndrom [34, 91-96] beteiligt zu sein und wird hierbei mit dem Zelltod von Neuronen und Gliazellen in Verbindung gebracht [3, 4, 97-99].

Bei der Abwehr von Pathogenen wie *Chlamydiaceae*, *Leishmanien*, *Toxoplasma gondii*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis* und Protozoen nimmt der P2X7R eine wichtige Rolle ein [100-104]. Bei mit Mykobakterien infizierten Makrophagen führt die Aktivierung des P2X7R beispielsweise zum Zelltod [104] und einzelne P2X7-SNPs werden mit einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber *Mycobacterium tuberculosis* in Verbindung gebracht [9, 14, 15].

Auf zellulärer Ebene wird der P2X7R von Immunzellen exprimiert und synthetisiert [37, 56, 105-111] und ist in die Regulation der angeborenen und der adaptiven Immunantwort

involviert. Die P2X7R Aktivierung führt abhängig von der ATP-Konzentration zur Proliferation, Differenzierung oder zum Zelltod von T-Lymphozyten [54, 112-116]. Daneben supprimiert die P2X7R Aktivierung die Aktivität und Viabilität von antiinflammatorischen Regulatorischen T-Zellen (Treg) [117, 118]. Außerdem scheint der P2X7R auch Einfluss auf die Regulation der intestinalen $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen zu haben [18, 119] und begünstigt die Differenzierung von nativen T-Zellen zu Th17-Zellen [117, 118].

Die Aktivierung des P2X7R stimuliert daneben auch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-6 (IL-6) aus humanen Fibroblasten, murinen Mikroglia und Mastzellen sowie von Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) aus humanen Dendritischen Zellen und murinen Mikroglia [18, 37-41]. Insbesondere für die NLRP3 Aktivierung und die nachfolgende IL-1 β Reifung und Freisetzung ist der P2X7R von besonderer Bedeutung (Abbildung 2). Die Aktivierung des P2X7R führt zur Zusammenlagerung des NLRP3-Inflammasoms und der Maturation und Freisetzung des proinflammatorischen IL-1 β [41]. Untersuchungen mit dem P2rx7^{-/-}Mausmodell zeigten, dass LPS aktivierte Makrophagen bei P2X7-Depletion kein Pro-IL-1 β prozessieren können und die ATP-Stimulation nicht zur Freisetzung des reifen IL-1 β führt [120]. Dies konnte auch bei Leukozyten, welche aus dem peripheren Blut des P2rx7^{-/-}Mausmodell gewonnen wurden, beobachtet werden [121]. Durch die Freisetzung von Zytokinen und die konsekutive Veränderung des inflammatorischen Mikromilieus, kann die P2X7R Aktivierung zudem auch indirekt Einfluss auf die Differenzierung von Treg-, Th17- sowie die M1/M2-Differenzierung von Makrophagen nehmen [18, 122, 123].

Neben den immunologischen Funktionen wird die P2X7R Aktivierung auch mit dem Zelltod assoziiert [18]. Die ATP vermittelte Aktivierung kann hierbei zur Nekrose [42-44], Pyroptose [18, 44, 124] oder Apoptose [45-48, 104] führen. Der zum Zelluntergang führende Mechanismus ist dabei von dem Zelltyp, dem jeweiligen Agonisten und dessen Konzentration abhängig [18, 43, 47, 115, 125]. Bei Dendritischen Zellen, Makrophagen und Lymphozyten wurde der P2X7R vermittelte Zelltod in Untersuchungen durch Apoptose initiiert [45-48, 104].

Der P2X7R ist neben den bereits beschriebenen Funktionen, auch an der Aktivierung verschiedener Signalwege wie der *nuclear factor of activated T cells 1* (NFATc1), *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B), *hypoxia-inducible factor 1-alpha* (HIF-1 α) [18, 126, 127] beteiligt und in die Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) [33-35] und Stickstoffmonoxid (NO) [36] sowie in die Freisetzung von Prostaglandin-E2 [128, 129] involviert.

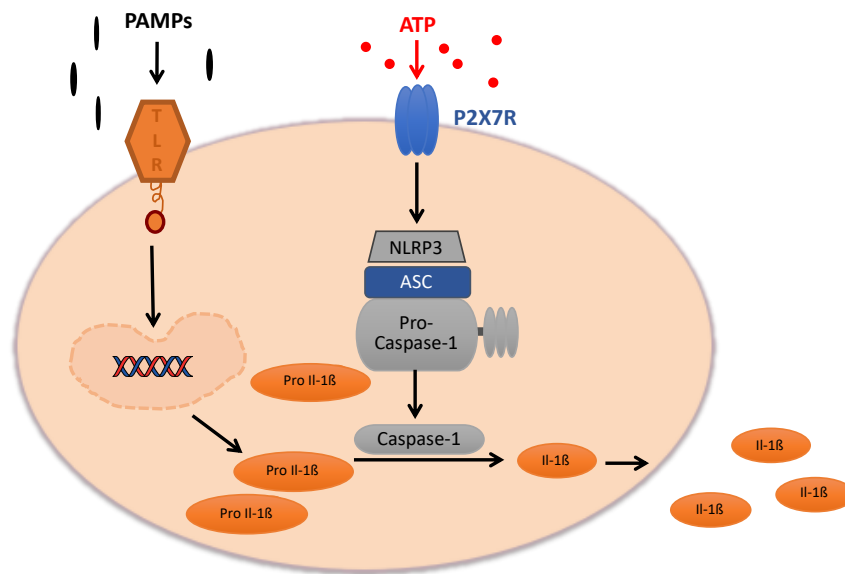


Abbildung 2: Schematische Darstellung der IL-1 β Prozessierung nach der Aktivierung des P2X7R

Abbildung modifiziert nach Cheng et al., 2020 [130]. Die Reifung und Freisetzung des IL-1 β ist ein zweistufiger Prozess. Die Stimulation von Toll-like Rezeptoren in Anwesenheit von PAMPs führt zur Transkription des IL-1 β -Gens und zur Akkumulation von Pro-IL-1 β im Zytoplasma. Durch die Aktivierung des P2X7R erfolgt der Efflux von K⁺. Über die Oligomerisierung der NLRP3-Inflammasom-Bestandteile NLRP3 und ASC kommt es zur proteolytischen Spaltung der Pro-Caspase-1 in die aktive Caspase-1 und der nachfolgenden Konvertierung von Pro-IL-1 β zu IL-1 β . [41, 131].

2.4 Das P2X7R-EGFP Mausmodell

Für die vorliegende Arbeit wurde ein von Kaczmarek et al., generiertes bacterial artificial chromosome (BAC)-transgenes Mausmodell verwendet [132, 133]. In diesem BAC-transgenen P2X7R-EGFP Mausmodell wird ein transgener P2X7R, der C-Terminal an ein EGFP fusioniert ist, unter der Kontrolle des endogenen murinen P2X7-Gen-Promotors moderat überexprimiert. Die C-terminale Strep-tagII-Gly-7xHis-Gly-Linkersequenz, an welche eine EGFP-Sequenz fusioniert wurde, erleichtert die *in vivo* Visualisierung des P2X7R und ermöglicht dessen Aufreinigung für biochemische Analysen. Das Transgen wurde sowohl mit der P2X7451P- als auch der 451L-Varianten generiert, wobei der zu 451L führende SNP im C57BL/6 Mausstamm vorliegt. Der SNP der in der zytoplasmatischen P2X7-Domäne lokalisiert ist, scheint die Funktion des Kanals signifikant zu beeinträchtigen [132, 134, 135].

Die Expression, Synthese und Funktionalität des transgenen P2X7R-EGFP wurde von Kaczmarek-Hajek et al., durch sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, (SDS-PAGE), Patch-Clamp-Analysen und durch ATP-induzierte Ethidium-Aufnahme in humanen embryonalen Nierenzellen (human embryonic kidney, HEK-Zellen) bestätigt [132]. In diesen Untersuchungen wurden keine Beeinträchtigungen der Rezeptorfunktion durch die Fusion an das EGFP festgestellt. Southern Blot Untersuchungen zeigten die Integration von 4-15 BAC-Kopien in verschiedenen, generierten Transgen-Linien. Die endogene P2X7 Proteinsynthese wird durch die P2X7-EGFP-Überexpression nicht beeinflusst. Zudem zeigte die Aufreinigung von P2X7-EGFP mit Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-NTA) die Zusammenlagerung von endogenen und transgenen P2X7-Untereinheiten [132].

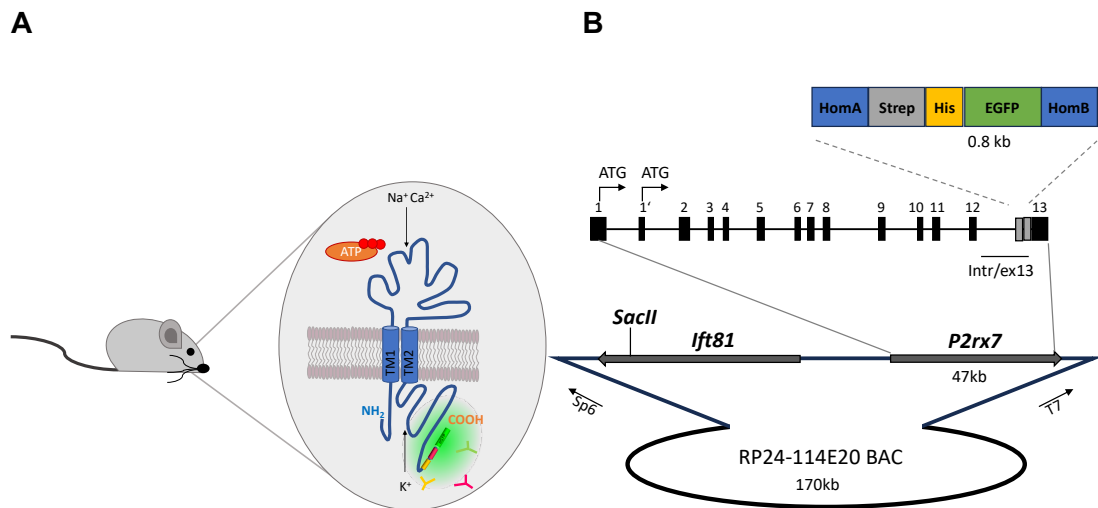


Abbildung 3: Schematische Abbildung des P2X7R-EGFP Mausmodells und des verwendeten BAC-Klons RP24-114E20

Abbildung modifiziert nach [28, 29, 132]. Schematische Darstellung des P2X7R-EGFP Mausmodells (A) und des BAC-Klons RP24-114E20 (B), der das *P2rx7*-Gen plus 103 kb (5') und 10 kb (3') flankierenden Sequenzen enthält. Eine Strep-His-EGFR-Kassette (0,8 kb), wurde mittels zweier Homologiearme (HomA, HomB; blaue Kästchen), direkt vor dem Stopcodon in Exon 13 des *P2rx7*-Gens insertiert [28, 29, 132].

2.5 Der P2X7R im Gastrointestinaltrakt und seine Rolle bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

2.5.1 Anatomie des Gastrointestinaltrakts

Der Gastrointestinaltrakt weist vom Ösophagus bis zum Enddarm einen gleichartigen Wandaufbau auf und gliedert sich von *luminal* nach *basolateral* in die folgenden vier Schichten (Abbildung 4):

***Tunica mucosa* (Schleimhaut)**

Die Mukosa umfasst die *Lamina epithelialis mucosae*, die *Lamina propria mucosae* und die *Lamina muscularis mucosae*. Sie grenzt mit dem Epithel an das Lumen des Gastrointestinaltrakts. Die *Lamina propria mucosae* besteht aus Bindegewebe, durch das Blutgefäße und Nerven ziehen. Die *Lamina muscularis mucosae* ermöglicht die Motilität der Mukosa und besteht aus glatter Muskulatur [136, 137]. Die Enterozyten des Epithels verfügen über Mikrovilli und sind apikal durch Schlussleisten verbunden. Zudem kommen vereinzelt M-Zellen im Epithel vor, die über Lymphfollikeln lokalisiert sind und Antigene transportieren können [138].

***Tela submucosa* (Submukosa)**

Basal der Mukosa liegt die *Tela submucosa* die aus lockerem Bindegewebe besteht. In der Submukosa verlaufen größere Blutgefäße. Zudem beinhaltet die Submukosa einen Teil des enterischen Nervensystems, den *Plexus submucosus* sowie eine Ansammlung von Lymphfollikeln [136, 137].

***Tunica muscularis* (Muskularis)**

Die *Tunica muscularis* ist basal der *Tela submucosa* lokalisiert. Sie setzt sich aus dem *Stratum circulare* und dem *Stratum longitudinale* zusammen, welche aus glatter Muskulatur bestehen. Ein dünner Bindegewebestreifen liegt zwischen der Längs- und Quermuskelschicht. In diesem befinden sich die Ganglien des *Plexus myentericus*. Die Kontraktion der Muscularis führt zu den Pendel- und Segmentationsbewegungen der Peristaltik [136, 137].

Tunica adventitia* oder *Tunica serosa* mit *Tela subserosa

Intraperitoneal folgt der Muskelschicht die *Tunica serosa* mit der *Tela subserosa*. Extraperitoneal die *Tunica adventitia*, welche aus lockerem Bindegewebe besteht [136, 137].

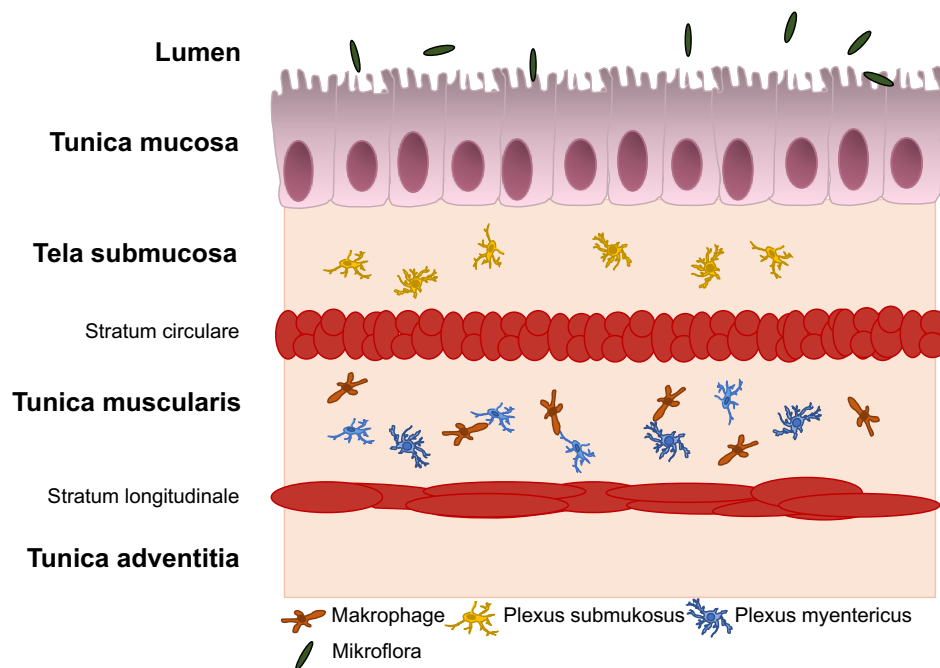


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Colonaufbaus

Abbildung modifiziert nach Gabanyi et al., 2016 [139]. Die Abbildung zeigt den vereinfachten, schematischen Aufbau der Colonwand. Der schichtartige Wandaufbau gliedert sich vom Lumen aus in die Schleimhaut (*Tunica mucosa*), die Submukosa (*Tela Submucosa*), die Muscularis mit dem *Stratum circulare* und dem *Stratum longitudinale* und extraperitoneal der Adventitia (*Tunica adventitia*) [137]. Zwischen der Längs- und Quermuskelschicht befinden sich die Ganglien des *Plexus myentericus*, in der Submukosa die Ganglien des *Plexus submucosus*. [136, 137].

2.5.2 Das enterische Nervensystem

Das enterische Nervensystem (ENS) steuert und koordiniert den Verdauungsprozess, den enteralen Elektrolyttransport, den gastrointestinalen Blutfluss sowie die gastrointestinale Motilität [140] und trägt zur Aufrechterhaltung der Integrität der epithelialen Barriere bei [140-143].

Es umfasst circa 400-600 Millionen Neuronen [140, 144] und verfügt neben der extrinsischen parasympathischen und sympathischen Innervation, über intrinsische neuronale Schaltkreise, welche unabhängig vom ZNS, reflexartige Kontraktionen erzeugen können [140, 144, 145]. Zudem interagiert das ENS mit dem Immunsystem und dem endokrinen System des GITs [140, 143] und scheint daneben auch in entzündliche Prozesse und in die Pathogenabwehr involviert zu sein [146-148].

2.5.3 Der Aufbau des enterischen Nervensystems

Das enterische Nervensystem ist ein komplexes Netzwerk. Es erstreckt sich intramural über den gesamten Gastrointestinaltrakt [149] und besteht aus Ganglien und den interganglionären Verbindungsfasern sowie aus neuronalen Fasern, die aus den Plexus hervorgehen und die Muskeln, Blutgefäße und die Schleimhaut des Gastrointestinaltrakts innervieren [150].

Die Ganglien des enterischen Nervensystems bestehen aus einer Ansammlung von neuronalen Zellkörpern und den umgebenden enterischen Gliazellen [140]. Die einzelnen Ganglien der Plexūs sind durch primäre interganglionäre Nervenfasern miteinander verbunden [140]. Sie sind in neuronalen Plexūs, hauptsächlich in dem *Plexus myentericus* (*Auerbachscher Plexus*, nach Leopold Auerbach, 1864 [151]) und dem *Plexus submucosus* (*Meissnerscher Plexus*, nach Georg Meissner, 1857 [152]) organisiert [140, 153-156].

2.5.4 Der Plexus myentericus

Den größten Teil des enterischen Nervensystem bilden der *Plexus submucosus* und der *Plexus myentericus*. Die Ganglien des *Plexus myentericus* sind in einer bindegewebigen Schicht zwischen der *Muscularis longitudinalis* und der *Muscularis circularis* lokalisiert [140, 157, 158]. Der *Plexus myentericus* kann in 3 Hauptkomponenten differenziert werden. Die Primär- und Sekundärkomponenten wurden von Auerbach, 1864 [151] identifiziert, die Tertiärkomponente wurde später unter anderem von Stöhr [159] und Richardson [160] beschrieben [161].

Der primäre Plexus besteht aus den Ganglien und den interganglionären Verbindungsfasern. Aus dem primären Plexus treten dünne Nervenfasern aus, die parallel zur *Muscularis circularis* verlaufen und den sekundären Plexus ausbilden [140, 151, 157, 161]. Der tertiäre Plexus besteht aus feinen Faserbündeln von noch geringerer Größe als die des sekundären Plexus, welche ein Netzwerk zwischen den Maschen des primären Plexus bilden [140, 151, 157, 159, 160]. Die Fasern des tertiären Plexus sind nicht vollständig von Gliazellen umhüllt und enthalten disseminierte Nervenzellkörper. Sie verlaufen an der Innenfläche der *Muscularis longitudinalis* und durchdringen diese teilweise [140, 159-162]. Die *Muscularis longitudinalis* wird abhängig von der Muskeldicke und Spezies, neben dem tertiären Plexus auch durch den longitudinalen Muskelplexus innerviert. Dieser besteht aus Bündeln feiner Nervenfasern, die parallel zur Muskulatur verlaufen [140, 160].

Die *Muscularis circularis* wird von dem primären und sekundären Plexus des *Plexus myentericus* innerviert. Feine Nervenfaserbündel ziehen zu der zirkulären Muskulatur und bilden ein kontinuierliches Geflecht. Zum Teil treten zudem Fasern des *Plexus submucosus* hinzu, welche sich mit den primären und sekundären Bestandteilen des *Plexus myentericus* verbinden [140, 160, 161, 163].

2.5.5 Der Plexus submucosus

Im Bindegewebe der *Tela submucosa* ist der *Plexus submucosus* lokalisiert. Er kann in einen *Plexus submucosus internus* und einen *Plexus submucosus externus* unterteilt werden. Allgemein sind die Verbindungsstränge des *Plexus submucosus* feiner und die Ganglien kleiner als die des *Plexus myentericus* [140, 164]. Zudem sind im Ösophagus und im Magen nur einzelne, verstreute submuköse Ganglien lokalisiert, die im Gegensatz zum Intestinum jedoch keine Plexūs ausbilden [140].

Der *Plexus submucosus internus* ist ein mehrschichtiges Netzwerk aus Ganglien. Die Ganglien bestehen üblicherweise aus fünf oder weniger Neuronen. Jedoch kann der *Plexus submucosus internus* auch größere, über 30 Neuronen umfassende Ganglien beinhalten. Diese sind in zwei oder drei Ebenen im apikalen Teil der *Tela submucosa* lokalisiert. Stellenweise kann sich der *Plexus submucosus internus* auch über mehrere Ebenen erstrecken. Die unterschiedlichen Ebenen des *Plexus submucosus internus* werden durch interganglionäre Nervenstränge verbunden, die sich in den verschiedenen Ebenen kreuzen [149].

Der *Plexus submucosus externus* ist dagegen ein einschichtiges Netzwerk, welches im basalen Teil der *Tela submucosa* lokalisiert ist [140, 149]. Gewundene, korkenzieherartige Nervenstränge verbinden den einschichtigen basalen *Plexus submucosus externus* mit dem mehrschichtigen apikalen *Plexus submucosus internus*. Diese Nervenstränge gehen von allen Ebenen des *Plexus submucosus internus* aus und enthalten teilweise Ganglien von unterschiedlicher Größe [149].

Der *Plexus submucosus internus* innerviert die Mukosa und steuert die Resorption und Sekretion [165]. Das *Stratum circulare* der *Tunica muscularis* wird zum Teil vom *Plexus submucosus externus* innerviert [140, 161].

Neben dem *Plexus submucosus internus* und dem *Plexus submucosus externus* wird von manchen Autoren ein dritter, intermediärer Plexus im humanen Colon und bei großen Säugetieren beschrieben [149, 162, 166].

2.5.6 Weitere Plexūs des enterischen Nervensystems

Neben den ganglionären Plexūs, wie dem *Plexus myentericus* und dem *Plexus submucosus*, existieren im GIT noch weitere kleine Plexūs, wie der *Plexus mucosus* in der *Tunica mucosa*, der *Plexus muscularis mucosae* sowie aganglionäre Plexūs wie der *Plexus muscularis circularis* und der *Plexus muscularis longitudinalis* in der *Muscularis externa* [157, 162, 167]. In den aganglionären Plexūs stellen die enterischen Gliazellen neben den neuronalen Fasern die vorherrschende Zellpopulation dar [157, 168].

2.5.7 Der Aufbau enterischer Ganglien

Die Ganglien des enterischen Nervensystems beinhalten sensorische Neuronen, Interneuronen sowie exzitatorische und inhibitorische Motoneuronen [150]. Diese werden von enterischen Gliazellen, Bindegewebszellen und von Cajal-Zellen (ICC) begleitet [143, 169]. Im Interstitium sind die neuronalen Ganglien von der Extrazellulärmatrix (extracellular matrix, ECM), Fibroblasten, Blutgefäßen, ICC und glatten Muskelzellen umgeben [170].

Die ECM, welche den extrazellulären Raum der Ganglien ausfüllt, ist von komplexer Struktur. Sie besteht aus verschiedenen Makromolekülen, welche von Bedeutung für die Entwicklung und die Regeneration des ENS sind [169, 171, 172]. Diese bilden einen wichtigen Rahmen für die enterische Mikroumgebung und beeinflussen die Homöostase myenterischer neuronaler Schaltkreise [173].

In den Ganglien und den Verbindungssträngen der Plexūs sind eine Vielzahl von Gliazellen vorhanden. Enterische Gliazellen wurden analog zu den enterischen Neuronen erstmals 1899 von Alexander Dogiel beschrieben [174, 175]. Sie weisen eine sternförmige Morphologie auf [175, 176] und teilen sich einige Eigenschaften mit Astrogliazellen des ZNS, weshalb sie auch als periphere Astrogliazellen bezeichnet werden [158, 177, 178]. Enterische Gliazellen und Gliazellen des ZNS enthalten beispielsweise beide prominente Gliofilamente, besitzen keine eigene Basalmembran [158, 177, 178] und exprimieren und synthetisieren teilweise die gleichen zellulären Antigene [179]. Gliazellen wurden in der Vergangenheit vor allem als mechanisches Stützgewebe für Neuronen betrachtet. In den letzten Jahren wurde jedoch zunehmend die Wichtigkeit der enterischen Gliazellen für die intestinale Homöostase erkannt [175, 180-182]. Enterische Gliazellen setzen eine Vielzahl von Faktoren frei, die für die Entwicklung, Differenzierung, Neuroprotektion und Neuroplastizität enterischer Neuronen sowie für die Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase und der Barrierefunktion des intestinalen Epithels verantwortlich sind [142, 175, 183-187]. Neben der gut untersuchten, protektiven Funktion, können enterische Gliazellen bei entzündlichen Prozessen aktiviert werden und zur inflammatorischen Reaktion beitragen [175]. Sie fungieren dabei als APCs (Antigen-presenting cells, antigenpräsentierende Zellen) [175, 188-193] und exprimieren und synthetisieren Zytokinrezeptoren sowie iNOS. Zudem können sie auch Zytokine wie IL-6, IL-1 β sowie NO freisetzen [175, 189, 194-197].

Die Somata von Gliazellen sind länglich und schmal sowie im Allgemeinen kleiner als die der enterischen Neuronen [193, 198-202]. Die enterischen Gliazellen umgeben die Axone und Somata der Neuronen. Die Fortsätze der Gliazellen weisen morphologisch eine unregelmäßige Form und Größe auf, sind stark verzweigt und breiten sich zwischen den neuronalen Fortsätzen und Perikarya aus. Eine große Anzahl der glialen Fortsätze umgeben die enterischen Neuronen und Axone zum Teil komplett [170]. Einige der neuronalen Axone sind zudem in Einfaltungen der enterischen Gliazellen eingebettet [193, 198-202].

Neben den Gliazellen werden die Nervenfaserbündel von den langen zytoplasmatischen Prozessen der ICC und von Fibrozyten umhüllt, welche sie vom umgebenden Bindegewebe und den glatten Muskelzellen abgrenzen [169, 178, 203]. Die ICC sind fibroblastenähnliche Zellen, die über Gap junctions mit den glatten Muskelzellen verbunden sind. Sie bilden ein dichtes Netzwerk in der Tunica muscularis und dienen als Vermittler zwischen dem ENS und der Muskulatur. Als Schrittmacherzellen können sie langsame Depolarisationswellen generieren und leiten exzitatorische und inhibitorische Impulse an die glatte Muskulatur der Tunica muscularis [136].

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Ultrastruktur des *Plexus myentericus* durch Cook und Burnstock zeigten wenige Mastzellen, die in der Nähe kleiner, in der glatten Muskulatur verlaufender Nervenbündel, lokalisiert sind. Plasmazellen sowie eosinophile oder neutrophile Granulozyten wurden in elektronenmikroskopischen Untersuchungen nur vereinzelt festgestellt [169, 178, 203]. Hingegen sind zahlreiche Makrophagen in der Muscularis externa verteilt und interagieren mit enterischen Neuronen, wovon sie Einfluss auf die peristaltische Aktivität des Colons nehmen können [204].

2.5.8 Epidemiologie und Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) sind multifaktorielle, chronisch verlaufende oder rezidivierende Entzündungen des GITs [205-208].

Klinisch manifestieren sich CED unter anderem durch gastrointestinale Blutungen, Diarrhoen, Tenesmen, Fieber und Gewichtsverlust [209].

Histologisch gehen die Entzündungen mit Ulzerationen, Erosionen und Ödemen der Mukosa einher und führen zur Infiltration einer großen Anzahl von Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten [209].

In den letzten Jahrzehnten wurde vor allem in den Industrienationen eine zunehmende Prävalenz von CED festgestellt [105, 210-212]. Die Inzidenz von CED weist ein starkes Nord-Südgefälle auf, mit den höchsten Inzidenzraten in Nordamerika und Europa und den niedrigsten in Asien, Afrika und Asien [213, 214].

Ätiologisch geht man von einem Zusammenspiel einer genetischen Prädisposition, immunologischen Ursachen und Umweltfaktoren aus, welche zur Entwicklung der Erkrankungen führen [215]. Es wurden verschiedene Genloci wie *NOD2*, *IBD5*, *IL23R* und *ATG16L1* identifiziert, die mit CED assoziiert sind und auf die Bedeutung des angeborenen Immunsystems, der Autophagie und der Phagozytose bei der Pathogenese von CED hindeuten [216-225]. Auch Umwelt- und Lebensstilfaktoren scheinen eine Rolle bei der Entstehung von CED zu spielen. So weisen Raucher ein 2-fach erhöhtes Risiko für Morbus Crohn auf. [226].

Neuere Studien zeigen, dass CED mit einer Dysregulation des intestinalen Immunsystems einhergehen [107, 110]. Die Stimulation von Immunzellen durch luminale Antigene führt zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-1 β sowie zur Freisetzung von ROS und ATP [107, 111, 227]. Dies führt konsekutiv zur weiteren Aktivierung der Entzündungskaskade und zu Gewebeschädigungen [107, 216, 228]. Unter entzündlichen Bedingungen sezernieren Immunzellen ATP über Pannexin-1 [107, 229, 230]. Durch Zelluntergang werden zusätzlich große Mengen an ATP in den extrazellulären Raum freigesetzt [107, 229], wodurch hohe extrazelluläre ATP-Konzentrationen auftreten können [107, 229].

Langfristig verursachen intestinale Entzündungen Veränderungen des enterischen Nervensystems. Colitismodelle mit 2,4-Dinitrobenzolsulfonsäure (DNBS), 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) und Natriumdextransulfat (DSS) zeigten, dass Makrophagen und Mastzellen in die neuromuskuläre Schicht des Colons infiltrieren [231, 232] und intestinale Entzündungen zum Verlust enterischer Neuronen sowie einer dadurch induzierten motorischen Dysfunktion führen [99, 231].

2.5.9 Die Rolle des P2X7R bei der Entstehung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Die Beteiligung des P2X7R an der Pathogenese von CED wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass durch die Blockade

oder Deletion des P2X7R Gewebeschädigung und Krankheitssymptome vermindert werden können [105, 106, 233-236]. P2X7R-Antagonisten reduzierten die Symptome einer TNBS- und DSS-induzierten Colitis, führten zu einer verminderten Produktion proinflammatorischer Zytokine, zu einer Verringerung der NF- κ B-Aktivierung und der Myeloperoxidaseaktivität sowie zu einer Reduktion von Kollagenablagerungen und zu einer verringerten Anzahl von T-Zellen und Makrophagen in der Lamina propria [105, 107, 235]. Im Mausmodell führte die P2X7R-Depletion zum Versagen einer TNBS oder DSS induzierten Colitis [56, 105, 106]. Die klinische Erprobung des P2X7R Antagonisten *AZD9056* in einer placebokontrollierten, multizentrischen, doppelblinden Phase-IIa-Studie mit einer kleinen Gruppe an Morbus Crohn erkrankter Patienten, verbesserte signifikant die klinischen Symptome der teilnehmenden Probanden [237].

Trotz intensiver Forschung ist die Involvierung des P2X7R in die Pathogenese von CED bisher nur unzureichend aufgeklärt. Untersuchungen deuten hierbei vor allem auf die Beeinflussung der T-Zell- und Makrophagenfunktion, auf eine Dysfunktion des ENS sowie auf die gestörte Integrität der epithelialen Barriere hin.

2.5.9.1 Der Einfluss des P2X7R auf die T-Zell und Makrophagen Funktion

Vor allem Makrophagen und T-Helferzellen bestimmen den Verlauf von CED und sind mit der Krankheitsaktivität und dem Rezidivrisiko assoziiert [107, 110, 111, 238]. Die Mukosa von an CED erkrankten Patienten weist eine erhöhte Anzahl an aktivierten T-Zellen auf, welche proinflammatorische Mediatoren freisetzen und die inflammatorische Reaktion aufrechterhalten und verstärken [105, 239-241].

Der P2X7R wird u.a. von Immunzellen wie Makrophagen und T-Lymphozyten exprimiert und synthetisiert [37, 56, 105-111]. Die P2X7R Aktivierung führt dabei, abhängig von der ATP-Konzentration, entweder zur Proliferation und Differenzierung oder auch zum Zelltod von T-Lymphozyten [54, 112-116]. Daneben wird die Aktivität und Viabilität von antiinflammatorischen Regulatorischen T-Zellen supprimiert [117, 242]. Treg produzieren antiinflammatorische Zytokine wie TGF- β und IL-10 und tragen damit zur Aufrechterhaltung der Immunhomöostase und der intestinalen Integrität bei. Die Treg Funktionsstörung ist mutmaßlich eine wichtige Ursache für CED [105, 243-245]. Untersuchungen zeigten, dass die Aktivierung des P2X7R zum Zelltod von mukosalen Tregs führt [106] und P2X7R-Antagonisten die Anzahl von Treg in inflammatorischen Regionen des Darmes erhöhen können [105, 246]. Der P2X7R scheint durch die Induktion des Zelltods von Treg Einfluss auf die Immuntoleranz sowie antiinflammatorische Mechanismen auszuüben und nimmt dadurch wahrscheinlich eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese entzündlicher Darmerkrankungen ein [105, 106].

Daneben führt die Induktion einer Colitis im Mausmodell auch zu einer erhöhten Anzahl P2X7R-exprimierender Makrophagen und einer erhöhten IL-1 β Konzentration in der Mukosa und der Lamina propria [105, 235]. Es wird daher vermutet, dass die P2X7R-induzierte NLRP3-Inflammasom-Aktivierung in Makrophagen mit nachfolgender Reifung und Freisetzung von IL-1 β zur inflammatorischen Reaktion bei CED entscheidend beitragen kann [105].

2.5.9.2 Der Einfluss des P2X7R auf die epitheliale Barriere

Für die physiologische Homöostase ist die epitheliale Barriere der Darmschleimhaut essentiell. Sie stellt die erste Abwehr gegen pathogene Mikroorganismen und exogene Antigene dar [208, 247, 248]. Die Integrität der Epithelbarriere hängt von der Aufrechterhaltung des dynamischen Gleichgewichts in Bezug auf Zellzahl, Zelltyp und Differenzierungsgrad ab [249]. Eine gestörte Funktion oder erhöhte Permeabilität der epithelialen Barriere führt durch die Stimulation der Mikrobiota zur verstärkten Sezernierung von Entzündungsmediatoren durch die Darmepithelzellen. Dies führt nachfolgend vermutlich zu einer abnormen Interaktion zwischen den Immun- und den Epithelzellen und trägt wahrscheinlich entscheidend zur Pathogenese von CED bei [105, 250-252]. Neben Immunzellen, wird der P2X7R auch von intestinalen Epithelzellen exprimiert [249, 253-255]. Die epitheliale Expression und Synthese des P2X7R wurde dabei mit dem Zelltod der intestinalen Epithelzellen assoziiert [254]. Bei anhaltender Aktivierung des P2X7R werden Apoptose und Autophagie der Darmepithelzellen initiiert [105, 256]. Darüber hinaus zeigten Studien, dass die Hemmung des P2X7R die Expression und Synthese des antiinflammatorischen TGF- β erhöht und die Proliferationsrate von intestinalen Epithelzellen beschleunigt [105, 246].

2.5.9.3 Der Einfluss des P2X7R auf das enterische Nervensystem

CED gehen mit einem Untergang enterischer Neuronen und einer konsekutiven motorischen Dysfunktion einher [99, 231].

Neben den intestinalen Immunzellen [37, 106, 118, 257], wurde die P2X7R Expression und Synthese auch durch Neuronen des ENS mehrfach beschrieben [99, 231, 258, 259]. Hierbei demonstrierten Studien mit Ischämie-Reperfusions- und Colitismodellen die neuronale Expression und Synthese des P2X7R durch enterischen Neuronen des *Plexus submucosus* und des *Plexus myentericus* [99, 231, 258-261]. Die Colitisinduktion führte dabei bei Ratten zu einer Verstärkung der P2X7R Expression und Synthese in myenterischen Neuronen und in der neuromuskulären Schicht [231].

Darüber hinaus legen Daten aus Colitismodellen nahe, dass der P2X7R mit dem Zelltod enterischer Neuronen und den daraus resultierenden Motilitätsstörungen während einer Colitis assoziiert ist [99, 106, 231]. Funktionelle Untersuchungen mit murinen Colitismodellen zeigten, dass die Aktivierung eines neuronalen P2X7R, Pannexin-1, Asc und Caspasen-Signalkomplexes zum Untergang enterischer Neuronen führt. Die Inhibierung des neuronalen P2X7R, des Pannexin-1-Rezeptors, Asc oder der Caspasenaktivität hatten hierbei eine neuroprotektive Wirkung und verhinderten den während der Entzündung auftretenden Untergang der Neuronen des *Plexus myentericus* [99].

2.6 Ziele der Arbeit

P2X7R werden vor allem durch Immunzellen exprimiert und vermitteln pro-inflammatorische Effekte. Studien mit verschiedenen CED-Tiermodellen zeigen mildere Verläufe und eine protektive Wirkung auf CED-assoziierte Schädigungen von Neuronen, wenn der P2X7R antagonisiert oder depletiert wurde. In einer klinischen Studie mit an Morbus Crohn erkrankten Patienten wurde eine Besserung der klinischen Symptomatik bei Therapie mit einem P2X7R Antagonisten gefunden [105, 106, 235-237].

Trotz seiner Bedeutung als potentielltes Arzneistofftarget sind die Lokalisation, Regulation und Funktionen des P2X7R, auch aufgrund fehlender, selektiver Antikörper, unvollständig geklärt und insbesondere die Lokalisation und Funktion in Neuronen wird kontrovers diskutiert. In mehreren, zu Beginn dieser Arbeit publizierten Studien, wurde die Aktivierung neuronaler P2X7R als Ursache funktioneller ENS-Schädigungen gefunden. Da die Klärung der Lokalisation des P2X7R wichtig für potenzielle P2X7R-basierte medikamentöse Therapien [262] ist, wurden in der vorliegenden Arbeit ein neuartiges BAC-transgenes P2X7R-EGFP-Reportermausmodell und neue P2X7R-spezifische Nanobodies sowie P2X7R-knockout-Kontrollmäuse verwendet, um die zelltypspezifische Lokalisation des P2X7R im ENS des distalen Colons aufzuklären. Darüber hinaus wurde in *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten untersucht, ob eine P2X7R-Überexpression im transgenen P2X7R-EGFP-Mausmodell mit einer höheren Suszeptibilität verbunden ist.

3. Zusammenfassung

Der P2X7-Rezeptor (P2X7R) ist ein durch ATP aktivierter Kationenkanal [1]. Er wird durch Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems exprimiert [37, 106, 118, 257, 263] und spielt eine wichtige Rolle bei entzündlichen Prozessen [50]. Die Aktivierung des P2X7R führt u. a. zur Zusammenlagerung des NLRP3-Inflammasom, zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 β [18, 37-41] und kann zum Zelltod durch Apoptose führen [18, 54, 57, 264].

Die Beteiligung des P2X7R an der Pathogenese von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) konnte in verschiedenen CED-Modellen gezeigt werden [105, 235, 236]. Der P2X7R Antagonist AZD9056 verbesserte in einer Phase IIa Studie mit einer kleinen Gruppe von an Morbus Crohn erkrankter Patienten die klinische Symptomatik [237]. Während die P2X7R Lokalisation und Funktion in Neuronen des ZNS umstritten ist [76], wurde die Lokalisation in Neuronen des Plexus myentericus und des Plexus submucosus mehrfach beschrieben [99, 231, 258, 259]. Diesbezüglich wird angenommen, dass der Untergang enterischer Neuronen während einer Colitis und die damit verbundenen enteralen Motilitätsstörungen durch die Aktivierung neuronaler P2X7R vermittelt wird [99, 231, 265].

Um die zelltypspezifische Lokalisation und Funktion des P2X7R im enterischen Nervensystem (ENS) näher zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst verschiedene Colonpräparationen eines BAC-transgenen P2X7R-EGFP-Mausmodells mittels EGFP- und P2X7R-spezifischen Antikörpern sowie eines P2X7R-spezifischen Nanobodies analysiert und mit dem Wildtyp (wt) verglichen. Die Immunfluoreszenzuntersuchungen von Colonquerschnitten, LMMP (longitudinal muscle myenteric plexus)-Präparationen, Präparationen des Plexus submucosus sowie planarer Mukosapräparationen zeigten die P2X7R- und EGFP-Expression in Enterozyten, Zellen der Lamina propria und in der Muscularis externa. Mittels Durchflusszytometrie konnte die Vergleichbarkeit der P2X7R-Expression in Immunzellen von wt und transgenen Mäusen gezeigt werden. Weiterhin wurden übereinstimmende Expressionsmuster in LMMP-Präparationen von wt und transgenen Mäusen demonstriert und die Spezifität der Antikörper und des Nanobodies durch knockout-Kontrollen belegt.

In weiteren Untersuchungen wurden Co-Färbungen mit Antikörpern für verschiedene Markerproteine (Neuronen, ICC, Gliazellen, Mastzellen und Makrophagen) durchgeführt. Im Gegensatz zu früheren Studien [99, 231, 258, 259] zeigten diese Untersuchungen keine P2X7R Lokalisation in Neuronen des Plexus myentericus und des Plexus submucosus, sondern eine dominante P2X7R Expression und Synthese durch S-100 β positive Gliazellen sowie durch F4/80 und CD68 positive Makrophagen. Ferner konnten hierbei zwei unterschiedliche Makrophagentypen differenziert werden, die sich hinsichtlich ihrer Lokalisation, Morphologie und der IBA-1 Expression und Synthese unterscheiden. Die Quantifizierung der F4/80 positiven Makrophagen ergab eine um 40% erhöhte Makrophagenanzahl im transgenen P2X7R-EGFP-Mausmodell im Vergleich zum wt und in diesen Zellen konnte interessanterweise auch der Proliferationsmarker Ki-67 nachgewiesen werden.

Schließlich wurde untersucht, ob eine neuronale P2X7R-Expression und Synthese unter pathophysiologischen Bedingungen induziert werden kann und ob die P2X7R-Überexpression im P2X7R-EGFP-Mausmodell mit einer höheren Suszeptibilität bei Induktion einer Colitis einhergeht.

In einem *ex vivo* Modell führte die Applikation des physiologischen Agonisten ATP zu keiner nachweisbaren neuronalen P2X7R Expression und Synthese des Plexus myentericus, jedoch zu einer verminderten Neuronenanzahl in Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen [99]. Die Quantifizierung der Neuronenanzahl im *ex vivo* Modell nach Applikation des selektiveren P2X7R Agonisten BzATP, zeigte eine geringere Anzahl an Neuronen im P2X7R-EGFP-Mausmodell und wt im Vergleich zum P2rx7^{-/-}-Mausmodell, die jedoch nicht signifikant war.

Nach *in vivo* Colitis-Induktion mittels DSS sowie im T-Zell-Transfer-Colitismodell, konnte ebenfalls keine P2X7R-Hochregulation nachgewiesen werden. Die Überexpression des P2X7R im P2X7R-EGFP-Mausmodell führte im DSS-Colitismodell zudem zu keinen signifikanten Unterschieden im Vergleich zum wt.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass der P2X7R im ENS vor allem durch Makrophagen und S-100β-positiven Gliazellen exprimiert wird. Die ATP-induzierte neuronale Schädigung des ENS ist somit wahrscheinlich ein indirekter Effekt der P2X7R Aktivierung in Makrophagen und/oder Gliazellen. Dies ähnelt der Situation im ZNS, wo P2X7R in hohem Maße von Mikroglia und S-100β-positiven Astrozyten exprimiert werden. Interessanterweise ähneln Mikroglia im ZNS in vielerlei Hinsicht den Makrophagen im ENS [266].

Zusammenfassend liefern die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine wichtige Grundlage zum Verständnis der physiologischen und pathophysiologischen P2X7R-Funktionen und seine Validierung als Zielstruktur für die Entwicklung neuartiger Arzneistoffe zur Behandlung entzündlicher Erkrankungen.

4. Summary

The P2X7 receptor (P2X7R) is an ATP-activated cation channel [1]. It is expressed by cells of the innate and adaptive immune system [37, 106, 118, 257, 263] and plays an important role in inflammation [50]. Activation of the P2X7R leads to NLRP3-Inflammasome assembly and the release of proinflammatory cytokines such as IL-1 β [18, 37-41]. Furthermore, it leads to cell death through apoptosis in various cell types [18, 54, 57, 264].

The involvement of P2X7R in the pathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD) has been demonstrated in various IBD models [105, 235, 236]. The P2X7R antagonist AZD9056 improved disease symptoms in a phase IIa study with a small group of patients suffering from Crohn's disease [237]. While the P2X7R localization and function in neurons of the CNS is controversial [76], its localization in neurons of the myenteric plexus and submucosal plexus has been described several times [99, 231, 258, 259] and it is assumed that the death of enteric neurons during colitis and the associated enteral motility disorders are mediated by the activation of neuronal P2X7R [99, 231, 265].

In order to investigate the cell type-specific localization and function of the P2X7R in the ENS, various colon preparations of a BAC-transgenic P2X7R-EGFP mouse model were analyzed using EGFP and P2X7R-specific antibodies as well as a P2X7R-specific nanobody and compared to wt tissues. Immunofluorescence studies of colon cross-sections, LMMP (longitudinal muscle myenteric plexus) preparations, submucosal plexus preparations and planar mucosal preparations showed P2X7R and EGFP expression in enterocytes, cells of the lamina propria and in the muscularis externa. Flow cytometry demonstrated the comparability of P2X7R expression levels in immune cells from wt and transgenic mice. Furthermore, consistent expression patterns were shown in wt and transgenic mice in LMMP preparations and the specificity of the antibodies and the nanobody was demonstrated by knockout controls. In further studies, co-staining was carried out with antibodies for various marker proteins (neurons, ICC, glial cells, mast cells and macrophages).

In contrast to previous studies [99, 231, 258, 259] this study did not show P2X7R localization in neurons of the myenteric plexus and submucosal plexus but rather a dominant P2X7R expression by S-100 β positive glial cells and F4/80 and CD68 positive macrophages. Two different types of macrophages could be differentiated, which differ in their localization, morphology and IBA-1 expression. The quantification of the F4/80 positive macrophages revealed a 40% increase in the number of macrophages in the transgenic P2X7R-EGFP mouse model compared to the wild type and, interestingly, the expression of the proliferation marker Ki-67 could be found in these cells.

Finally, we investigated whether neuronal P2X7R expression can be induced under pathophysiological conditions and whether P2X7R overexpression in the P2X7R-EGFP mouse model is associated with higher susceptibility when inducing colitis.

In an *ex vivo* model, application of the physiological agonist ATP resulted in no detectable neuronal P2X7R expression of the myenteric plexus but in a reduced number of neu-

rons in agreement with previous observations [99]. Quantification of the number of neurons after application of the more selective P2X7R agonist BzATP showed a lower number of neurons in the P2X7R-EGFP mouse model and wild type compared to the P2rx7^{-/-} mouse model, but this was not significant.

After colitis induction *in vivo* using DSS or a T-cell transfer model, P2X7R upregulation could also not be detected. Overexpression of the P2X7R in the P2X7R-EGFP mouse model did not result in any significant differences in the DSS colitis model compared to the wt.

The present work shows that the P2X7R in the enteric nervous system is mainly expressed by macrophages and S-100 β -positive glial cells. The ATP-induced neuronal damage to the ENS is therefore probably an indirect effect of P2X7R activation in macrophages and/or glial cells. This is similar to the situation in the CNS, where P2X7R are highly expressed by microglia and S-100 β -positive astrocytes. Interestingly, microglia in the CNS also resemble macrophages in the ENS in many aspects [266].

In summary, the results of the presented work provide an important basis for understanding the physiological and pathophysiological P2X7R functions and its validation as a target structure for the development of novel drugs for the treatment of inflammatory diseases.

5. Paper I

Jooss T, Zhang J, Zimmer B, Rezzonico-Jost T, Rissiek B, Felipe Pelczar P, Seehusen F, Koch-Nolte F, Magnus T, Zierler S, Huber S, Schemann M, Grassi F, Nicke A. Macrophages and glia are the dominant P2X7-expressing cell types in the gut nervous system-No evidence for the role of neuronal P2X7 receptors in colitis. *Mucosal Immunol.* 2023 Apr;16(2):180-193. doi: 10.1016/j.mucimm.2022.11.003. Epub 2023 Jan 10. PMID: 36634819.

6. Paper II

Kaczmarek-Hajek K, Zhang J, Kopp R, Grosche A, Rissiek B, Saul A, Bruzzone S, Engel T, Jooss T, Krautloher A, Schuster S, Magnus T, Stadelmann C, Sirko S, Koch-Nolte F, Eulenburg V, Nicke A. Re-evaluation of neuronal P2X7 expression using novel mouse models and a P2X7-specific nanobody. *Elife*. 2018 Aug 3;7:e36217. doi: 10.7554/eLife.36217. PMID: 30074479; PMCID: PMC6140716.

7. Literatur

1. North, R.A., *Molecular physiology of P2X receptors*. Physiol Rev, 2002. **82**(4): p. 1013-67.
2. Illes, P. and J. Alexandre Ribeiro, *Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system*. Eur J Pharmacol, 2004. **483**(1): p. 5-17.
3. Franke, H., U. Krugel, and P. Illes, *P2 receptors and neuronal injury*. Pflugers Arch, 2006. **452**(5): p. 622-44.
4. Sperlagh, B. and P. Illes, *P2X7 receptor: an emerging target in central nervous system diseases*. Trends Pharmacol Sci, 2014. **35**(10): p. 537-47.
5. Sperlagh, B., et al., *P2X7 receptors in the nervous system*. Prog Neurobiol, 2006. **78**(6): p. 327-46.
6. Khakh, B.S., et al., *Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds*. Nat Neurosci, 1999. **2**(4): p. 322-30.
7. Virginio, C., et al., *Pore dilation of neuronal P2X receptor channels*. Nat Neurosci, 1999. **2**(4): p. 315-21.
8. Buell, G.N., et al., *Gene structure and chromosomal localization of the human P2X7 receptor*. Receptors Channels, 1998. **5**(6): p. 347-54.
9. Kaczmarek-Hajek, K., et al., *Molecular and functional properties of P2X receptors--recent progress and persisting challenges*. Purinergic Signal, 2012. **8**(3): p. 375-417.
10. Adinolfi, E., et al., *Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor*. FASEB J, 2010. **24**(9): p. 3393-404.
11. Cheewatrakoolpong, B., et al., *Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP channel*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **332**(1): p. 17-27.
12. Feng, Y.H., et al., *A truncated P2X7 receptor variant (P2X7-j) endogenously expressed in cervical cancer cells antagonizes the full-length P2X7 receptor through hetero-oligomerization*. J Biol Chem, 2006. **281**(25): p. 17228-37.
13. Bradley, H.J., et al., *Residues 155 and 348 contribute to the determination of P2X7 receptor function via distinct mechanisms revealed by single-nucleotide polymorphisms*. J Biol Chem, 2011. **286**(10): p. 8176-87.
14. Ben-Selma, W., et al., *Contribution of the P2X7 1513A/C loss-of-function polymorphism to extrapulmonary tuberculosis susceptibility in Tunisian populations*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2011. **63**(1): p. 65-72.
15. Fernando, S.L., et al., *A polymorphism in the P2X7 gene increases susceptibility to extrapulmonary tuberculosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **175**(4): p. 360-6.
16. Dao-Ung, L.P., et al., *Association of the 1513C polymorphism in the P2X7 gene with familial forms of chronic lymphocytic leukaemia*. Br J Haematol, 2004. **125**(6): p. 815-7.
17. Roger, S., et al., *Single nucleotide polymorphisms that were identified in affective mood disorders affect ATP-activated P2X7 receptor functions*. J Psychiatr Res, 2010. **44**(6): p. 347-55.
18. Di Virgilio, F., et al., *The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation*. Immunity, 2017. **47**(1): p. 15-31.
19. Nicke, A., et al., *A functional P2X7 splice variant with an alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X7 knock-out mice*. J Biol Chem, 2009. **284**(38): p. 25813-22.
20. Masin, M., et al., *Expression, assembly and function of novel C-terminal truncated variants of the mouse P2X7 receptor: re-evaluation of P2X7 knockouts*. Br J Pharmacol, 2012. **165**(4): p. 978-93.
21. Surprenant, A., et al., *The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7)*. Science, 1996. **272**(5262): p. 735-8.
22. Boue-Grabot, E., V. Archambault, and P. Seguela, *A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X(2) ATP-gated channels*. J Biol Chem, 2000. **275**(14): p. 10190-5.

23. Denlinger, L.C., et al., *Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide*. J Immunol, 2001. **167**(4): p. 1871-6.
24. Kopp, R., et al., *P2X7 Interactions and Signaling - Making Head or Tail of It*. Front Mol Neurosci, 2019. **12**: p. 183.
25. Illes, P., et al., *The P2X7 receptor: a new therapeutic target in Alzheimer's disease*. Expert Opin Ther Targets, 2019. **23**(3): p. 165-176.
26. Costa-Junior, H.M., F. Sarmiento Vieira, and R. Coutinho-Silva, *C terminus of the P2X7 receptor: treasure hunting*. Purinergic Signal, 2011. **7**(1): p. 7-19.
27. McCarthy, A.E., C. Yoshioka, and S.E. Mansoor, *Full-Length P2X(7) Structures Reveal How Palmitoylation Prevents Channel Desensitization*. Cell, 2019. **179**(3): p. 659-670 e13.
28. Bartlett, R., L. Stokes, and R. Sluyter, *The P2X7 receptor channel: recent developments and the use of P2X7 antagonists in models of disease*. Pharmacol Rev, 2014. **66**(3): p. 638-75.
29. Mortaz, E., et al., *Role of P2X7 Receptors in Release of IL-1beta: A Possible Mediator of Pulmonary Inflammation*. Tanaffos, 2012. **11**(2): p. 6-11.
30. Kunzli, B.M., et al., *Variable impact of CD39 in experimental murine colitis*. Dig Dis Sci, 2011. **56**(5): p. 1393-403.
31. Atarashi, K., et al., *ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation*. Nature, 2008. **455**(7214): p. 808-12.
32. Munoz, F.M., et al., *Neuronal P2X7 receptor-induced reactive oxygen species production contributes to nociceptive behavior in mice*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 3539.
33. Skaper, S.D., et al., *P2X(7) receptors on microglial cells mediate injury to cortical neurons in vitro*. Glia, 2006. **54**(3): p. 234-42.
34. Parvathenani, L.K., et al., *P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease*. J Biol Chem, 2003. **278**(15): p. 13309-17.
35. Pfeiffer, Z.A., et al., *Nucleotide receptor signaling in murine macrophages is linked to reactive oxygen species generation*. Free Radic Biol Med, 2007. **42**(10): p. 1506-16.
36. Sperlagh, B., et al., *ATP released by LPS increases nitric oxide production in raw 264.7 macrophage cell line via P2Z/P2X7 receptors*. Neurochem Int, 1998. **33**(3): p. 209-15.
37. Kurashima, Y., et al., *Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 1034.
38. Shieh, C.H., et al., *P2X7-dependent, but differentially regulated release of IL-6, CCL2, and TNF-alpha in cultured mouse microglia*. Glia, 2014. **62**(4): p. 592-607.
39. Solini, A., et al., *Human primary fibroblasts in vitro express a purinergic P2X7 receptor coupled to ion fluxes, microvesicle formation and IL-6 release*. J Cell Sci, 1999. **112** (Pt 3): p. 297-305.
40. Ferrari, D., et al., *The P2 purinergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release*. FASEB J, 2000. **14**(15): p. 2466-76.
41. Ferrari, D., et al., *The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release*. J Immunol, 2006. **176**(7): p. 3877-83.
42. Di Virgilio, F., et al., *Responses of mouse lymphocytes to extracellular adenosine 5'-triphosphate (ATP). Lymphocytes with cytotoxic activity are resistant to the permeabilizing effects of ATP*. J Immunol, 1989. **143**(6): p. 1955-60.
43. Di Virgilio, F., et al., *Cytolytic P2X purinoceptors*. Cell Death Differ, 1998. **5**(3): p. 191-9.
44. Dubyak, G.R., *P2X7 receptor regulation of non-classical secretion from immune effector cells*. Cell Microbiol, 2012. **14**(11): p. 1697-706.
45. Coutinho-Silva, R., et al., *P2Z/P2X7 receptor-dependent apoptosis of dendritic cells*. Am J Physiol, 1999. **276**(5): p. C1139-47.

46. Slater, N.M., J.A. Barden, and C.R. Murphy, *Distributional changes of purinergic receptor subtypes (P2X 1-7) in uterine epithelial cells during early pregnancy*. Histochem J, 2000. **32**(6): p. 365-72.
47. Zanollo, P., et al., *Responses of mouse lymphocytes to extracellular ATP. II. Extracellular ATP causes cell type-dependent lysis and DNA fragmentation*. J Immunol, 1990. **145**(5): p. 1545-50.
48. Humphreys, B.D., et al., *Stress-activated protein kinase/JNK activation and apoptotic induction by the macrophage P2X7 nucleotide receptor*. J Biol Chem, 2000. **275**(35): p. 26792-8.
49. Liu, J.P., et al., *ATP ion channel P2X purinergic receptors in inflammation response*. Biomed Pharmacother, 2023. **158**: p. 114205.
50. Adinolfi, E., et al., *The P2X7 receptor: A main player in inflammation*. Biochem Pharmacol, 2018. **151**: p. 234-244.
51. Chen, L. and C.F. Brosnan, *Regulation of immune response by P2X7 receptor*. Crit Rev Immunol, 2006. **26**(6): p. 499-513.
52. Burnstock, G. and G.E. Knight, *Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems*. Int Rev Cytol, 2004. **240**: p. 31-304.
53. Collo, G., et al., *Tissue distribution of the P2X7 receptor*. Neuropharmacology, 1997. **36**(9): p. 1277-83.
54. Rissiek, B., et al., *P2X7 on Mouse T Cells: One Channel, Many Functions*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 204.
55. Ferrari, D., et al., *Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages*. J Immunol, 1997. **159**(3): p. 1451-8.
56. Neves, A.R., et al., *Overexpression of ATP-activated P2X7 receptors in the intestinal mucosa is implicated in the pathogenesis of Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 2014. **20**(3): p. 444-57.
57. Proietti, M., et al., *ATP-gated ionotropic P2X7 receptor controls follicular T helper cell numbers in Peyer's patches to promote host-microbiota mutualism*. Immunity, 2014. **41**(5): p. 789-801.
58. Martinez-Garcia, J.J., et al., *P2X7 receptor induces mitochondrial failure in monocytes and compromises NLRP3 inflammasome activation during sepsis*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 2711.
59. Glass, R., A. Townsend-Nicholson, and G. Burnstock, *P2 receptors in the thymus: expression of P2X and P2Y receptors in adult rats, an immunohistochemical and in situ hybridisation study*. Cell Tissue Res, 2000. **300**(2): p. 295-306.
60. Garcia-Marcos, M., et al., *P2X7 and phospholipid signalling: the search of the "missing link" in epithelial cells*. Cell Signal, 2006. **18**(12): p. 2098-104.
61. Ramirez, A.N. and D.L. Kunze, *P2X purinergic receptor channel expression and function in bovine aortic endothelium*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(6): p. H2106-16.
62. Ray, F.R., et al., *Purinergic receptor distribution in endothelial cells in blood vessels: a basis for selection of coronary artery grafts*. Atherosclerosis, 2002. **162**(1): p. 55-61.
63. Schwiebert, L.M., et al., *Extracellular ATP signaling and P2X nucleotide receptors in monolayers of primary human vascular endothelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **282**(2): p. C289-301.
64. Ballerini, P., et al., *Rat astroglial P2Z (P2X7) receptors regulate intracellular calcium and purine release*. Neuroreport, 1996. **7**(15-17): p. 2533-7.
65. Duan, S., et al., *P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes*. J Neurosci, 2003. **23**(4): p. 1320-8.
66. James, G. and A.M. Butt, *P2Y and P2X purinoceptor mediated Ca²⁺ signalling in glial cell pathology in the central nervous system*. Eur J Pharmacol, 2002. **447**(2-3): p. 247-60.
67. Genzen, J.R., et al., *Ependymal cells along the lateral ventricle express functional P2X(7) receptors*. Purinergic Signal, 2009. **5**(3): p. 299-307.

68. Yu, Y., et al., *Cellular localization of P2X7 receptor mRNA in the rat brain*. Brain Res, 2008. **1194**: p. 45-55.
69. Melani, A., et al., *P2X7 receptor modulation on microglial cells and reduction of brain infarct caused by middle cerebral artery occlusion in rat*. J Cereb Blood Flow Metab, 2006. **26**(7): p. 974-82.
70. Franke, H., et al., *P2X7 receptor expression after ischemia in the cerebral cortex of rats*. J Neuropathol Exp Neurol, 2004. **63**(7): p. 686-99.
71. Cavaliere, F., K. Dinkel, and K. Reymann, *Microglia response and P2 receptor participation in oxygen/glucose deprivation-induced cortical damage*. Neuroscience, 2005. **136**(3): p. 615-23.
72. Gandelman, M., et al., *P2X7 receptor-induced death of motor neurons by a peroxynitrite/FAS-dependent pathway*. J Neurochem, 2013. **126**(3): p. 382-8.
73. Ohishi, A., et al., *Expression level of P2X7 receptor is a determinant of ATP-induced death of mouse cultured neurons*. Neuroscience, 2016. **319**: p. 35-45.
74. Ishii, K., et al., *Neuron-specific distribution of P2X7 purinergic receptors in the monkey retina*. J Comp Neurol, 2003. **459**(3): p. 267-77.
75. Sperlagh, B., et al., *Involvement of P2X7 receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus*. J Neurochem, 2002. **81**(6): p. 1196-211.
76. Illes, P., T.M. Khan, and P. Rubini, *Neuronal P2X7 Receptors Revisited: Do They Really Exist?* J Neurosci, 2017. **37**(30): p. 7049-7062.
77. Miras-Portugal, M.T., et al., *Neuronal P2X7 Receptor: Involvement in Neuronal Physiology and Pathology*. J Neurosci, 2017. **37**(30): p. 7063-7072.
78. Mendes, C.E., et al., *Effects of probenecid and brilliant blue G on rat enteric glial cells following intestinal ischemia and reperfusion*. Acta Histochem, 2023. **125**(1): p. 151985.
79. Ke, H.Z., et al., *Deletion of the P2X7 nucleotide receptor reveals its regulatory roles in bone formation and resorption*. Mol Endocrinol, 2003. **17**(7): p. 1356-67.
80. Li, J., et al., *The P2X7 nucleotide receptor mediates skeletal mechanotransduction*. J Biol Chem, 2005. **280**(52): p. 42952-9.
81. Gartland, A., et al., *Multinucleated osteoclast formation in vivo and in vitro by P2X7 receptor-deficient mice*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2003. **13**(2-4): p. 243-53.
82. Arguin, G., et al., *The loss of P2X7 receptor expression leads to increase intestinal glucose transit and hepatic steatosis*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 12917.
83. Beaucage, K.L., et al., *Loss of P2X7 nucleotide receptor function leads to abnormal fat distribution in mice*. Purinergic Signal, 2014. **10**(2): p. 291-304.
84. McInnes, I.B., et al., *Targeting the P2X7 receptor in rheumatoid arthritis: biological rationale for P2X7 antagonism*. Clin Exp Rheumatol, 2014. **32**(6): p. 878-82.
85. Adinolfi, E., et al., *The P2X7 Receptor in Oncogenesis and Metastatic Dissemination: New Insights on Vesicular Release and Adenosinergic Crosstalk*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(18).
86. Raffaghello, L., et al., *The P2X7 receptor sustains the growth of human neuroblastoma cells through a substance P-dependent mechanism*. Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 907-14.
87. Jelassi, B., et al., *P2X(7) receptor activation enhances SK3 channels- and cystein cathepsin-dependent cancer cells invasiveness*. Oncogene, 2011. **30**(18): p. 2108-22.
88. Ren, S., et al., *Targeting P2X(7) receptor inhibits the metastasis of murine P388D1 lymphoid neoplasm cells to lymph nodes*. Cell Biol Int, 2010. **34**(12): p. 1205-11.
89. Wei, C., et al., *How is the P2X7 receptor signaling pathway involved in epileptogenesis?* Neurochem Int, 2024. **173**: p. 105675.
90. Engel, T., et al., *P2X7 receptor in epilepsy; role in pathophysiology and potential targeting for seizure control*. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol, 2012. **4**(4): p. 174-87.
91. Ronning, K.E., et al., *The P2X7 Receptor, a Multifaceted Receptor in Alzheimer's Disease*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(14).

92. Ahn, Y.H., Y. Tang, and P. Illes, *The neuroinflammatory astrocytic P2X7 receptor: Alzheimer's disease, ischemic brain injury, and epileptic state*. Expert Opin Ther Targets, 2023. **27**(9): p. 763-778.
93. Hracsko, Z., et al., *Lack of neuroprotection in the absence of P2X7 receptors in toxin-induced animal models of Parkinson's disease*. Mol Neurodegener, 2011. **6**: p. 28.
94. McLarnon, J.G., et al., *Upregulated expression of purinergic P2X(7) receptor in Alzheimer disease and amyloid-beta peptide-treated microglia and in peptide-injected rat hippocampus*. J Neuropathol Exp Neurol, 2006. **65**(11): p. 1090-7.
95. Lee, H.G., et al., *Microglial P2X(7) receptor expression is accompanied by neuronal damage in the cerebral cortex of the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease*. Exp Mol Med, 2011. **43**(1): p. 7-14.
96. Diaz-Hernandez, M., et al., *Altered P2X7-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration*. FASEB J, 2009. **23**(6): p. 1893-906.
97. Burnstock, G., *An introduction to the roles of purinergic signalling in neurodegeneration, neuroprotection and neuroregeneration*. Neuropharmacology, 2016. **104**: p. 4-17.
98. Franke, H. and P. Illes, *Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS*. Pharmacol Ther, 2006. **109**(3): p. 297-324.
99. Gulbransen, B.D., et al., *Activation of neuronal P2X7 receptor-pannexin-1 mediates death of enteric neurons during colitis*. Nat Med, 2012. **18**(4): p. 600-4.
100. Naranjo-Galvis, C.A., et al., *Genetic Variations in the Purinergic P2X7 Receptor Are Associated with the Immune Response to Ocular Toxoplasmosis in Colombia*. Microorganisms, 2023. **11**(10).
101. Karmakar, M., et al., *Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion in response to ATP*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 10555.
102. Coutinho-Silva, R., et al., *Inhibition of chlamydial infectious activity due to P2X7R-dependent phospholipase D activation*. Immunity, 2003. **19**(3): p. 403-12.
103. Coutinho-Silva, R. and D.M. Ojcius, *Role of extracellular nucleotides in the immune response against intracellular bacteria and protozoan parasites*. Microbes Infect, 2012. **14**(14): p. 1271-7.
104. Lammas, D.A., et al., *ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z(P2X7) receptors*. Immunity, 1997. **7**(3): p. 433-44.
105. Liu, Y. and X. Liu, *Research progress of P2X7 receptor in inflammatory bowel disease*. Scand J Gastroenterol, 2019. **54**(5): p. 521-527.
106. Figliuolo, V.R., et al., *P2X7 receptor promotes intestinal inflammation in chemically induced colitis and triggers death of mucosal regulatory T cells*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017. **1863**(6): p. 1183-1194.
107. Wan, P., et al., *Extracellular ATP mediates inflammatory responses in colitis via P2 x 7 receptor signaling*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 19108.
108. Wiley, J.S., et al., *The human P2X7 receptor and its role in innate immunity*. Tissue Antigens, 2011. **78**(5): p. 321-32.
109. Costa-Junior, H.M., et al., *Lipid metabolism modulation by the P2X7 receptor in the immune system and during the course of infection: new insights into the old view*. Purinergic Signal, 2011. **7**(4): p. 381-92.
110. Arseneau, K.O., et al., *Innate and adaptive immune responses related to IBD pathogenesis*. Curr Gastroenterol Rep, 2007. **9**(6): p. 508-12.
111. Brown, S.J. and L. Mayer, *The immune response in inflammatory bowel disease*. Am J Gastroenterol, 2007. **102**(9): p. 2058-69.
112. Shenker, B.J., et al., *Aggregatibacter actinomycetemcomitans cytolethal distending toxin activates the NLRP3 inflammasome in human macrophages, leading to the release of proinflammatory cytokines*. Infect Immun, 2015. **83**(4): p. 1487-96.
113. Baricordi, O.R., et al., *An ATP-activated channel is involved in mitogenic stimulation of human T lymphocytes*. Blood, 1996. **87**(2): p. 682-90.

114. Trabanelli, S., et al., *Extracellular ATP exerts opposite effects on activated and regulatory CD4⁺ T cells via purinergic P2 receptor activation*. J Immunol, 2012. **189**(3): p. 1303-10.
115. Adinolfi, E., et al., *P2X(7) receptor: Death or life?* Purinergic Signal, 2005. **1**(3): p. 219-27.
116. Woehrle, T., et al., *Pannexin-1 hemichannel-mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse*. Blood, 2010. **116**(18): p. 3475-84.
117. Savio, L.E.B., et al., *The P2X7 Receptor in Inflammatory Diseases: Angel or Demon?* Front Pharmacol, 2018. **9**: p. 52.
118. Schenk, U., et al., *ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors*. Sci Signal, 2011. **4**(162): p. ra12.
119. Hashimoto-Hill, S., et al., *Contraction of intestinal effector T cells by retinoic acid-induced purinergic receptor P2X7*. Mucosal Immunol, 2017. **10**(4): p. 912-923.
120. Solle, M., et al., *Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors*. J Biol Chem, 2001. **276**(1): p. 125-32.
121. Labasi, J.M., et al., *Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response*. J Immunol, 2002. **168**(12): p. 6436-45.
122. Killeen, M.E., et al., *Signaling through purinergic receptors for ATP induces human cutaneous innate and adaptive Th17 responses: implications in the pathogenesis of psoriasis*. J Immunol, 2013. **190**(8): p. 4324-36.
123. Pandolfi, J.B., et al., *ATP-Induced Inflammation Drives Tissue-Resident Th17 Cells in Metabolically Unhealthy Obesity*. J Immunol, 2016. **196**(8): p. 3287-96.
124. Yang, D., et al., *Caspase-11 Requires the Pannexin-1 Channel and the Purinergic P2X7 Pore to Mediate Pyroptosis and Endotoxic Shock*. Immunity, 2015. **43**(5): p. 923-32.
125. Taylor, S.R., et al., *Sequential shrinkage and swelling underlie P2X7-stimulated lymphocyte phosphatidylserine exposure and death*. J Immunol, 2008. **180**(1): p. 300-8.
126. Di Virgilio, F. and E. Adinolfi, *Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth*. Oncogene, 2017. **36**(3): p. 293-303.
127. Ferrari, D., et al., *Extracellular ATP activates transcription factor NF-kappaB through the P2Z purinoreceptor by selectively targeting NF-kappaB p65*. J Cell Biol, 1997. **139**(7): p. 1635-43.
128. Panupinthu, N., et al., *P2X7 receptors on osteoblasts couple to production of lysophosphatidic acid: a signaling axis promoting osteogenesis*. J Cell Biol, 2008. **181**(5): p. 859-71.
129. Barbera-Cremades, M., et al., *P2X7 receptor-stimulation causes fever via PGE2 and IL-1beta release*. FASEB J, 2012. **26**(7): p. 2951-62.
130. Cheng, R., et al., *Interleukin-1beta is a potential therapeutic target for periodontitis: a narrative review*. Int J Oral Sci, 2020. **12**(1): p. 2.
131. Murphy, K.M., Weaver, Casey *Janeway Immunologie*. Vol. 9. 2018: Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.
132. Kaczmarek-Hajek, K., et al., *Re-evaluation of neuronal P2X7 expression using novel mouse models and a P2X7-specific nanobody*. Elife, 2018. **7**.
133. Sluyter, R., et al., *Animal Models for the Investigation of P2X7 Receptors*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(9).
134. Adriouch, S., et al., *Cutting edge: a natural P451L mutation in the cytoplasmic domain impairs the function of the mouse P2X7 receptor*. J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4108-12.
135. Sorge, R.E., et al., *Genetically determined P2X7 receptor pore formation regulates variability in chronic pain sensitivity*. Nat Med, 2012. **18**(4): p. 595-9.
136. Lüllmann-Rauch R, A.E., . , *Taschenlehrbuch Histologie*. Vol. Hrsg. 6., vollständig überarbeitete Auflage. 2019, Stuttgart: Thieme.
137. Ulfing, N., *Der gemeinsame Wandaufbau des Verdauungskanal, in Kurzlehrbuch Histologie*, N. Ulfing, Editor. 2019, Georg Thieme Verlag.

138. Ulfig, N., *Der Dünndarm*, in *Kurzlehrbuch Histologie*, N. Ulfig, Editor. 2019, Georg Thieme Verlag.
139. Gabanyi, I., et al., *Neuro-immune Interactions Drive Tissue Programming in Intestinal Macrophages*. *Cell*, 2016. **164**(3): p. 378-91.
140. Furness, J.B., *The Enteric Nervous System*. 2006, Oxford: Blackwell.
141. Toumi, F., et al., *Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model*. *Neurogastroenterol Motil*, 2003. **15**(3): p. 239-42.
142. Savidge, T.C., et al., *Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione*. *Gastroenterology*, 2007. **132**(4): p. 1344-58.
143. Furness, J.B., *The enteric nervous system and neurogastroenterology*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012. **9**(5): p. 286-94.
144. Sasselli, V., V. Pachnis, and A.J. Burns, *The enteric nervous system*. *Dev Biol*, 2012. **366**(1): p. 64-73.
145. Wood, J.D., D.H. Alpers, and P.L. Andrews, *Fundamentals of neurogastroenterology*. *Gut*, 1999. **45 Suppl 2**: p. II6-II16.
146. Sharkey, K.A. and T.C. Savidge, *Role of enteric neurotransmission in host defense and protection of the gastrointestinal tract*. *Auton Neurosci*, 2014. **181**: p. 94-106.
147. Coquenlorge, S., et al., *Modulation of lipopolysaccharide-induced neuronal response by activation of the enteric nervous system*. *J Neuroinflammation*, 2014. **11**: p. 202.
148. Margolis, K.G., et al., *Enteric neuronal density contributes to the severity of intestinal inflammation*. *Gastroenterology*, 2011. **141**(2): p. 588-98, 598 e1-2.
149. Brehmer, A., H. Rupprecht, and W. Neuhuber, *Two submucosal nerve plexus in human intestines*. *Histochem Cell Biol*, 2010. **133**(2): p. 149-61.
150. Furness, J.B. and M. Costa, *Types of nerves in the enteric nervous system*. *Neuroscience*, 1980. **5**(1): p. 1-20.
151. Auerbach, L., *Fernere vorläufige Mitteilung über den Nerven Apparat des Darmes*. *Virchows Arch. path. Anat.*, 1864. **30**: p. 457-460.
152. Meissner, G., *Über die Nerven der Darmwand*. *Z Ration Med N F* 8:364–366, 1857.
153. Hansen, M.B., *The enteric nervous system I: organisation and classification*. *Pharmacol Toxicol*, 2003. **92**(3): p. 105-13.
154. Costa, M., S.J. Brookes, and G.W. Hennig, *Anatomy and physiology of the enteric nervous system*. *Gut*, 2000. **47 Suppl 4**: p. iv15-9; discussion iv26.
155. Balemba, O.B., et al., *An immunohistochemical study of the organization of ganglia and nerve fibres in the mucosa of the porcine intestine*. *Anat Histol Embryol*, 2002. **31**(4): p. 237-46.
156. Timmermans, J.P., et al., *Functional morphology of the enteric nervous system with special reference to large mammals*. *Eur J Morphol*, 1992. **30**(2): p. 113-22.
157. J.B. Furness, M.C., *The enteric nervous system*. 1987, New York: Churchill Livingstone.
158. Gabella, G., *Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glial cells*. *Neuroscience*, 1981. **6**(3): p. 425-36.
159. Stöhr, P., *Mikroskopische Studien zur Innervation des Magen-Darmkanals*. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 12:66–154, 1930.
160. Richardson, K.C., *Electronmicroscopic observations on Auerbach's plexus in the rabbit, with special reference to the problem of smooth muscle innervation*. *Am J Anat*, 1958. **103**(1): p. 99-135.
161. Llewellyn-Smith, I.J., et al., *Structure of the tertiary component of the myenteric plexus in the guinea-pig small intestine*. *Cell Tissue Res*, 1993. **272**(3): p. 509-16.
162. Wedel, T., et al., *Organization of the enteric nervous system in the human colon demonstrated by wholemount immunohistochemistry with special reference to the submucous plexus*. *Ann Anat*, 1999. **181**(4): p. 327-37.
163. Wilson, A.J., et al., *The source of the nerve fibres forming the deep muscular and circular muscle plexuses in the small intestine of the guinea-pig*. *Cell Tissue Res*, 1987. **247**(3): p. 497-504.

164. HENLE, J., *Handbuch der Nervenlehre des Menschen*. 1871, Braunschweig: Friedrich Vieweg und Sohn.
165. Bornstein, J.C. and J.B. Furness, *Correlated electrophysiological and histochemical studies of submucous neurons and their contribution to understanding enteric neural circuits*. J Auton Nerv Syst, 1988. **25**(1): p. 1-13.
166. Hoyle, C.H. and G. Burnstock, *Neuronal populations in the submucous plexus of the human colon*. J Anat, 1989. **166**: p. 7-22.
167. Brehmer, A., *Structure of enteric neurons*. Adv Anat Embryol Cell Biol, 2006. **186**: p. 1-91.
168. Bjorklund, H., D. Dahl, and A. Seiger, *Neurofilament and glial fibrillary acid protein-related immunoreactivity in rodent enteric nervous system*. Neuroscience, 1984. **12**(1): p. 277-87.
169. Zauszkiewicz-Pawlak, A., et al., *Ultrastructural characteristics of myenteric plexus in patients with colorectal cancer*. Folia Histochem Cytobiol, 2017. **55**(1): p. 6-10.
170. Gabella, G., *Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum*. J Anat, 1972. **111**(Pt 1): p. 69-97.
171. Bannerman, P.G., et al., *Light microscopic immunolocalization of laminin, type IV collagen, nidogen, heparan sulphate proteoglycan and fibronectin in the enteric nervous system of rat and guinea pig*. J Neurocytol, 1986. **15**(6): p. 733-43.
172. Rauch, U. and K.H. Schafer, *The extracellular matrix and its role in cell migration and development of the enteric nervous system*. Eur J Pediatr Surg, 2003. **13**(3): p. 158-62.
173. Bistoletti, M., P. Moretto, and C. Giaroni, *Method for Detecting Hyaluronan in Isolated Myenteric Plexus Ganglia of Adult Rat Small Intestine*. Methods Mol Biol, 2019. **1952**: p. 117-125.
174. Dogiel, A.S., *Über den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugethiere*. Z Naturforsch B 1899; 5: 130-158 1899.
175. Cirillo, C., et al., *S100B protein in the gut: the evidence for enteroglial-sustained intestinal inflammation*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(10): p. 1261-6.
176. Hoff, S., et al., *Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody*. J Comp Neurol, 2008. **509**(4): p. 356-71.
177. Gabella, G., *Glial cells in the myenteric plexus*. Z Naturforsch B, 1971. **26**(3): p. 244-5.
178. Cook, R.D. and G. Burnstock, *The ultrastructure of Auerbach's plexus in the guinea-pig. II. Non-neuronal elements*. J Neurocytol, 1976. **5**(2): p. 195-206.
179. Jessen, K.R. and R. Mirsky, *Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system: an immunohistochemical study of enteric glia*. J Neurosci, 1983. **3**(11): p. 2206-18.
180. Bassotti, G., et al., *Enteric glial cells: new players in gastrointestinal motility?* Lab Invest, 2007. **87**(7): p. 628-32.
181. Van Landeghem, L., et al., *Regulation of intestinal epithelial cells transcriptome by enteric glial cells: impact on intestinal epithelial barrier functions*. BMC Genomics, 2009. **10**: p. 507.
182. Bassotti, G., et al., *Enteric glial cells and their role in gastrointestinal motor abnormalities: introducing the neuro-gliopathies*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(30): p. 4035-41.
183. Bubeck, M., C. Becker, and J.V. Patankar, *Guardians of the gut: influence of the enteric nervous system on the intestinal epithelial barrier*. Front Med (Lausanne), 2023. **10**: p. 1228938.
184. Laranjeira, C. and V. Pachnis, *Enteric nervous system development: Recent progress and future challenges*. Auton Neurosci, 2009. **151**(1): p. 61-9.
185. Aube, A.C., et al., *Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption*. Gut, 2006. **55**(5): p. 630-7.
186. Bush, T.G., et al., *Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice*. Cell, 1998. **93**(2): p. 189-201.

187. Cornet, A., et al., *Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease?* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(23): p. 13306-11.
188. Esposito, G., et al., *Enteric glial-derived S100B protein stimulates nitric oxide production in celiac disease.* Gastroenterology, 2007. **133**(3): p. 918-25.
189. Cirillo, C., et al., *EFFECT OF PROINFLAMMATORY STIMULI ON CELLULAR ACTIVATION AND NITRIC OXIDE PRODUCTION IN HUMAN PRIMARY ENTEROGLIAL CELLS.* Digestive and Liver Disease, 2009. **41**: p. S23.
190. Cirillo, C., et al., *Increased mucosal nitric oxide production in ulcerative colitis is mediated in part by the enteroglia-derived S100B protein.* Neurogastroenterol Motil, 2009. **21**(11): p. 1209-e112.
191. Neunlist, M., et al., *Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease.* J Intern Med, 2008. **263**(6): p. 577-83.
192. Savidge, T.C., M.V. Sofroniew, and M. Neunlist, *Starring roles for astroglia in barrier pathologies of gut and brain.* Lab Invest, 2007. **87**(8): p. 731-6.
193. Cabarrocas, J., T.C. Savidge, and R.S. Liblau, *Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease.* Glia, 2003. **41**(1): p. 81-93.
194. Murakami, M., T. Ohta, and S. Ito, *Lipopolysaccharides enhance the action of bradykinin in enteric neurons via secretion of interleukin-1beta from enteric glial cells.* J Neurosci Res, 2009. **87**(9): p. 2095-104.
195. Ruhl, A., et al., *Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **280**(6): p. G1163-71.
196. Aoki, E., R. Semba, and S. Kashiwamata, *Evidence for the presence of L-arginine in the glial components of the peripheral nervous system.* Brain Res, 1991. **559**(1): p. 159-62.
197. Nagahama, M., et al., *L-arginine immunoreactive enteric glial cells in the enteric nervous system of rat ileum.* Biol Signals Recept, 2001. **10**(5): p. 336-40.
198. Gershon, M.D. and T.P. Rothman, *Enteric glia.* Glia, 1991. **4**(2): p. 195-204.
199. Gulbransen, B.D. and K.A. Sharkey, *Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract.* Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2012. **9**(11): p. 625-32.
200. Hagstrom, C. and C. Olsson, *Glial cells revealed by GFAP immunoreactivity in fish gut.* Cell Tissue Res, 2010. **341**(1): p. 73-81.
201. Liu, Y.A., et al., *3-D imaging, illustration, and quantitation of enteric glial network in transparent human colon mucosa.* Neurogastroenterol Motil, 2013. **25**(5): p. e324-38.
202. Mendes, C.E., et al., *Enteric glial cells immunoreactive for P2X7 receptor are affected in the ileum following ischemia and reperfusion.* Acta Histochem, 2019. **121**(6): p. 665-679.
203. Rumessen, J.J., J.M. Vanderwinden, and T. Horn, *Ulcerative colitis: ultrastructure of interstitial cells in myenteric plexus.* Ultrastruct Pathol, 2010. **34**(5): p. 279-87.
204. Muller, P.A., et al., *Crosstalk between muscularis macrophages and enteric neurons regulates gastrointestinal motility.* Cell, 2014. **158**(2): p. 300-313.
205. Heller, F., et al., *Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells.* Immunity, 2002. **17**(5): p. 629-38.
206. Bauer, C., et al., *Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome.* Gut, 2010. **59**(9): p. 1192-9.
207. Podolsky, D.K., *Inflammatory bowel disease.* N Engl J Med, 2002. **347**(6): p. 417-29.
208. Baumgart, D.C. and S.R. Carding, *Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology.* Lancet, 2007. **369**(9573): p. 1627-40.
209. Pavlick, K.P., et al., *Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease.* Free Radic Biol Med, 2002. **33**(3): p. 311-22.
210. Ng, S.C., et al., *Incidence and phenotype of inflammatory bowel disease based on results from the Asia-Pacific Crohn's and colitis epidemiology study.* Gastroenterology, 2013. **145**(1): p. 158-165 e2.

211. Park, S.J., W.H. Kim, and J.H. Cheon, *Clinical characteristics and treatment of inflammatory bowel disease: a comparison of Eastern and Western perspectives*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(33): p. 11525-37.
212. Kaplan, G.G., *The global burden of IBD: from 2015 to 2025*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2015. **12**(12): p. 720-7.
213. Loftus, E.V., Jr., *Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences*. Gastroenterology, 2004. **126**(6): p. 1504-17.
214. M'Koma, A.E., *Inflammatory bowel disease: an expanding global health problem*. Clin Med Insights Gastroenterol, 2013. **6**: p. 33-47.
215. Livingstone Solomon, S.M., Peter Mallon, Eilish Donnelly, Margaret Hoper, Morris Loughrey, Stephen Kirk, Keith Gardiner *The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: an overview* Comparative Clinical Pathology, 2010. **3/2010**
216. Xavier, R.J. and D.K. Podolsky, *Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 427-34.
217. Goyette, P., et al., *Molecular pathogenesis of inflammatory bowel disease: genotypes, phenotypes and personalized medicine*. Ann Med, 2007. **39**(3): p. 177-99.
218. Hampe, J., et al., *A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1*. Nat Genet, 2007. **39**(2): p. 207-11.
219. Libioulle, C., et al., *Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4*. PLoS Genet, 2007. **3**(4): p. e58.
220. Peltekova, V.D., et al., *Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease*. Nat Genet, 2004. **36**(5): p. 471-5.
221. Rioux, J.D., et al., *Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease*. Nat Genet, 2001. **29**(2): p. 223-8.
222. Rioux, J.D., et al., *Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis*. Nat Genet, 2007. **39**(5): p. 596-604.
223. Silverberg, M.S., et al., *Refined genomic localization and ethnic differences observed for the IBD5 association with Crohn's disease*. Eur J Hum Genet, 2007. **15**(3): p. 328-35.
224. Yamazaki, K., et al., *Single nucleotide polymorphisms in TNFSF15 confer susceptibility to Crohn's disease*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(22): p. 3499-506.
225. Duerr, R.H., et al., *A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene*. Science, 2006. **314**(5804): p. 1461-3.
226. Mahid, S.S., et al., *Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis*. Mayo Clin Proc, 2006. **81**(11): p. 1462-71.
227. Graham, D.B., et al., *Functional genomics identifies negative regulatory nodes controlling phagocyte oxidative burst*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 7838.
228. Yamamoto-Furusho, J.K. and D.K. Podolsky, *Innate immunity in inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(42): p. 5577-80.
229. Eltzschig, H.K., M.V. Sitkovsky, and S.C. Robson, *Purinergic signaling during inflammation*. N Engl J Med, 2012. **367**(24): p. 2322-33.
230. Deaglio, S. and S.C. Robson, *Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity*. Adv Pharmacol, 2011. **61**: p. 301-32.
231. Antonioli, L., et al., *Involvement of the P2X7 purinergic receptor in colonic motor dysfunction associated with bowel inflammation in rats*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e116253.
232. Shi, X.Z., J.H. Winston, and S.K. Sarna, *Differential immune and genetic responses in rat models of Crohn's colitis and ulcerative colitis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011. **300**(1): p. G41-51.

233. Machado, F.A., et al., *Effects of experimental ulcerative colitis on myenteric neurons in P2X7-knockout mice*. Histochem Cell Biol, 2023. **160**(4): p. 321-339.
234. Abad, C., et al., *Administration of an AAV vector coding for a P2X7-blocking nanobody-based biologic ameliorates colitis in mice*. J Nanobiotechnology, 2024. **22**(1): p. 27.
235. Marques, C.C., et al., *Prophylactic systemic P2X7 receptor blockade prevents experimental colitis*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(1): p. 65-78.
236. Vuerich, M., et al., *Control of Gut Inflammation by Modulation of Purinergic Signaling*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 1882.
237. Eser, A., et al., *Safety and Efficacy of an Oral Inhibitor of the Purinergic Receptor P2X7 in Adult Patients with Moderately to Severely Active Crohn's Disease: A Randomized Placebo-controlled, Double-blind, Phase IIa Study*. Inflamm Bowel Dis, 2015. **21**(10): p. 2247-53.
238. Dave, M., K.A. Papadakis, and W.A. Faubion, Jr., *Immunology of inflammatory bowel disease and molecular targets for biologics*. Gastroenterol Clin North Am, 2014. **43**(3): p. 405-24.
239. Marsal, J. and W.W. Agace, *Targeting T-cell migration in inflammatory bowel disease*. J Intern Med, 2012. **272**(5): p. 411-29.
240. Sturm, A., H.S. de Souza, and C. Fiocchi, *Mucosal T cell proliferation and apoptosis in inflammatory bowel disease*. Curr Drug Targets, 2008. **9**(5): p. 381-7.
241. Himmel, M.E., et al., *The role of T-regulatory cells and Toll-like receptors in the pathogenesis of human inflammatory bowel disease*. Immunology, 2008. **125**(2): p. 145-53.
242. Grassi, F. and R. Marino, *The P2X7 receptor in mucosal adaptive immunity*. Purinergic Signal, 2023.
243. Ishikawa, D., et al., *Tregs are dysfunctional in vivo in a spontaneous murine model of Crohn's disease*. Mucosal Immunol, 2013. **6**(2): p. 267-75.
244. Pedros, C., et al., *Disrupted regulatory T cell homeostasis in inflammatory bowel diseases*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(3): p. 974-95.
245. Mayne, C.G. and C.B. Williams, *Induced and natural regulatory T cells in the development of inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2013. **19**(8): p. 1772-88.
246. Hofman, P., et al., *Genetic and pharmacological inactivation of the purinergic P2RX7 receptor dampens inflammation but increases tumor incidence in a mouse model of colitis-associated cancer*. Cancer Res, 2015. **75**(5): p. 835-45.
247. Baumgart, D.C. and A.U. Dignass, *Intestinal barrier function*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2002. **5**(6): p. 685-94.
248. Swidsinski, A., et al., *Mucosal flora in inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 2002. **122**(1): p. 44-54.
249. de Campos, N.E., et al., *Characterizing the presence and sensitivity of the P2X7 receptor in different compartments of the gut*. J Innate Immun, 2012. **4**(5-6): p. 529-41.
250. Coskun, M., *Intestinal epithelium in inflammatory bowel disease*. Front Med (Lausanne), 2014. **1**: p. 24.
251. Martin, C.A., et al., *Adhesion and cytosolic dye transfer between macrophages and intestinal epithelial cells*. Cell Adhes Commun, 1998. **5**(2): p. 83-95.
252. Homaidan, F.R., et al., *IL-1 activates two phospholipid signaling pathways in intestinal epithelial cells*. Inflamm Res, 2001. **50**(7): p. 375-81.
253. Bourzac, J.F., et al., *Glucose transporter 2 expression is down regulated following P2X7 activation in enterocytes*. J Cell Physiol, 2013. **228**(1): p. 120-9.
254. Groschel-Stewart, U., et al., *P2X receptors in the rat duodenal villus*. Cell Tissue Res, 1999. **297**(1): p. 111-7.
255. Souza, C.O., et al., *Extracellular ATP induces cell death in human intestinal epithelial cells*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1820**(12): p. 1867-78.

256. Coutinho-Silva, R., et al., *P2X and P2Y purinergic receptors on human intestinal epithelial carcinoma cells: effects of extracellular nucleotides on apoptosis and cell proliferation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. **288**(5): p. G1024-35.
257. Ohbori, K., et al., *Prophylactic Oral Administration of Magnesium Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice through a Decrease of Colonic Accumulation of P2X7 Receptor-Expressing Mast Cells*. Biol Pharm Bull, 2017. **40**(7): p. 1071-1077.
258. da Silva, M.V., et al., *Submucosal neurons and enteric glial cells expressing the P2X7 receptor in rat experimental colitis*. Acta Histochem, 2017. **119**(5): p. 481-494.
259. Palombit, K., et al., *Blockage of the P2X7 Receptor Attenuates Harmful Changes Produced by Ischemia and Reperfusion in the Myenteric Plexus*. Dig Dis Sci, 2019. **64**(7): p. 1815-1829.
260. da Silva, M.V., et al., *Differential effects of experimental ulcerative colitis on P2X7 receptor expression in enteric neurons*. Histochem Cell Biol, 2015. **143**(2): p. 171-84.
261. Palombit, K., et al., *Effects of ischemia and reperfusion on subpopulations of rat enteric neurons expressing the P2X7 receptor*. Dig Dis Sci, 2013. **58**(12): p. 3429-39.
262. Jooss, T., et al., *Macrophages and glia are the dominant P2X7-expressing cell types in the gut nervous system - no evidence for a role of neuronal P2X7 receptors in colitis*. Mucosal Immunol, 2023.
263. Di Virgilio, F., *P2X receptors and inflammation*. Curr Med Chem, 2015. **22**(7): p. 866-77.
264. Di Virgilio, F., A.C. Sarti, and F. Grassi, *Modulation of innate and adaptive immunity by P2X ion channels*. Curr Opin Immunol, 2018. **52**: p. 51-59.
265. Magalhaes, H.I.R. and P. Castellucci, *Enteric nervous system and inflammatory bowel diseases: Correlated impacts and therapeutic approaches through the P2X7 receptor*. World J Gastroenterol, 2021. **27**(46): p. 7909-7924.
266. Verheijden, S., S. De Schepper, and G.E. Boeckxstaens, *Neuron-macrophage crosstalk in the intestine: a "microglia" perspective*. Front Cell Neurosci, 2015. **9**: p. 403.

8. Anhang

8.1 Paper III

Jooss T, Kuch B, Zhang J, Schemann M, Nicke A. Immunofluorescence Staining of P2X7 Receptors in Whole-Mount Myenteric Plexus Preparations. *Methods Mol Biol.* 2022;2510:145-156. doi: 10.1007/978-1-0716-2384-8_8. PMID: 35776324.