

P2X₇ Reseptörü Aracılı Hücre Membran Geçirgenlik Artışı

P2X₇ Receptor Mediated Increase In Cell Membrane Permeability

Şerife Cankurtaran-Sayar¹, Kemal Sayar²

¹ Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı

² Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Pürinerjik reseptörler P2X ve P2Y olmak üzere iki ana aileden oluşmaktadır. P2Y reseptörleri G-proteini kenetli reseptörler (GPCR), P2X reseptörleri seçici olmayan katyon kanallarıdır. P2X reseptörlerinin 7 üyesinden biri olan P2X₇ reseptörü immün hücreler başta olmak üzere birçok tip hücrede bulunmaktadır. IL-1 β salınımı, kaspaz aktivasyonu gibi hücre içinde birçok sinyal yolağını aktive etmekle beraber, diğer üyelerden farklı olarak membranda büyük bir geçirgenlik aktive etmektedir. Membran geçirgenliğini incelemek için spektroskopik ve elektrofizyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Büyük geçirgenliğin mekanizmasını açıklamak için çeşitli hipotezler öne sürülmektedir. Bunlardan biri P2X₇ kanalının genişleyerek büyük moleküllere geçirgen hale geldiği, diğeri ise geçirgenliğin başka bir protein aracılığıyla olduğudur. P2X₇ reseptörü inflamasyon, ağrı, kanser ve Alzheimer gibi birçok hastalıkta rolü olduğu gösterilen bir reseptör olduğu için antagonistleri ve modülatörleri iyi birer ilaç hedefi olarak görülmektedir. Aktivasyon mekanizmasının aydınlatılması da birçok hastalığın tedavisi için önem taşımaktadır.

Anahtar Sözcükler: P2X₇ Reseptörü, Membran Geçirgenliği, YoPro-1, Lusifer Yellow

Purinergic receptors consist of two main families; P2X and P2Y. P2Y receptors are G protein coupled receptors (GPCR), whereas P2X receptors are non-selective cation channels. P2X₇ receptors which is a member of P2X receptors, have been found myriad types of cells including immune cells. The activation of this receptor leads to IL-1 β release and caspase activation as well as an increase in membrane permeability to big molecules. Spectroscopic and electrophysiologic methods have been used to investigate membrane permeability. Different hypotheses have been proposed as an explanation for big permeability. One of them proposes that P2X₇ channel itself dilates and becomes permeable to big molecules, whereas the other proposes participation of another channels to big permeability. Since it has been demonstrated that P2X₇ receptor has a role in many disease processes including inflammation, pain, cancer and Alzheimer's disease, its antagonists and modulators have been regarded as a good drug target. The uncovering of its activation mechanism is important for treatment of many diseases.

Key Words: P2X₇ Receptor, Membrane Permeability, YoPro-1, Lucifer Yellow

Hücre içinde serbest enerji kaynağı olarak kullanılan ATP'nin hücre dışına çıktığında hücre membranındaki reseptörlere bağlanarak hücrel yanıtı oluşturduğu ilk olarak Burnstock ve arkadaşları(1) tarafından 1970 yılında gösterilmiştir. ATP hücre dışına hücre hasarıyla, veziküler taşınmayla veya veziküler olmayan taşınmayla çıkabilmektedir (2). Hücre dışı ATP ve metabolitlerini tanıyan pürinerjik reseptörlerin P1, P2X ve P2Y olmak üzere üç alt sınıfı vardır. P1 reseptörleri adenosin reseptörleridir ve adenosinle aktive olurlar. A₁, A_{2a}, A_{2b}, A₃ olarak 4 alt tipi bulunmaktadır. P2 reseptörleri ise P2X ve P2Y olmak üzere iki alt aileye ayrılırlar. P2Y reseptörleri G-proteini

kenetlidirler ve metabotropik reseptörlerdir. P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14} olarak 8 alt tipi bulunmaktadır. P2X reseptörleri seçici olmayan ligand kapılı katyon kanallarıdır ve iyonotropik reseptörlerdir. P2X_{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7} olarak 7 alt tipi bulunmaktadır (3,4,5). P2X reseptörleri hücre membranını iki kez geçen alt ünitelerin üçünün bir araya gelmesiyle oluştuğu gösterilmiştir. Herbir alt ünitenin amino ucu ve karboksi ucu hücre içine bakmaktadır P2X₇ hariç diğer P2X reseptörlerinin uzunluğu 379-472 aminoasit arasındadır. (6,7).

P2X ailesinin son üyesi olan P2X₇ reseptör cDNA' sı 1996' da Surprenant ve arkadaşları (8) tarafından fare beyininden klonlanmıştır. Ailenin diğer üyelerine

Geliş Tarihi: 23.10.2016 • Kabul Tarihi: 22.02.2018

İletişim

Doç. Dr. Kemal Sayar

E-posta: kemalsayar@yahoo.com

Tel: 0 535 690 10 95

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Morfoloji Binası 1. Kat Sıhhiye / Ankara

benzer şekilde hücre içi amino ve karboksil uçları, kanalı oluşturduğu düşünülen iki transmembran bölgesi ve hücre dışında yer alan büyük bir nükleotid bağlanma bölgesi bulunur. Bununla beraber diğer üyelerden en önemli yapısal farklılığı, sistein aminoasidi bakımından zengin karboksil ucunun diğerlerinden çok daha uzun olmasıdır. P2X₇ reseptörü 595 aminoasit uzunluğundadır (8).

P2X₇ reseptörleri vücutta yaygın bir dağılım göstermektedir. Bağışıklık sisteminde ait hücreler (makrofajlar, dentritik hücreler, lenfositler, osteoklastlar, mast hücreleri, eozinofiller) ve sinir sisteminin destek hücrelerinde (mikroglia, astrositler, oligodentositler, Schwann hücreleri) çok miktarda bulunur. Bu hücre türlerinin yanı sıra osteoblastlar, fibroblastlar, endotel ve epitel hücreleri ve bazı nöron türlerinde de bulundukları gösterilmiştir (9).

Bu yaygın dağılımdan öngörülebileceği gibi, P2X₇'nin bir çok inflamatuvar, immün, nörolojik ve kas-iskelet hastalığı ile ilişkili olabileceğini düşündüren insan doku ve hayvan model çalışmaları mevcuttur. Bu hastalıklar arasında şunlar sayılabilir: multiple skleroz, amiotrofik lateral skleroz, Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı, kanser, iskemi, nöropatik ve inflamatuvar ağrı, romatoid artrit, glomerulonefrit, pulmoner fibrozis ve graft-versus-host hastalığı (9).

P2X₇ reseptörlerinin aktivasyonu hücre membranının depolarizasyonu ve hücre içi Ca²⁺ un artmasının yanı sıra çok sayıda hücre içi sinyal yolağının aktivasyonuna yol açmaktadır. Bu sinyal yolları; kaspaz-1 içeren inflamazom NLRP3'ün aktivasyonu ve bunu takiben proinflamatuvar bir sitokin olan interleukin-1 (IL-1 β) ve benzer sitokinlerin işlenmesi ve saliverilmesi, reaktif oksijen (ROS) ve nitrojen (NOS) bileşiklerinin oluşumu, proteaz aktivasyonu ve saliverilmesi, prostaglandin oluşumu ve saliverilmesi, nükleer faktör-kappaB (NF κ B) gibi bazı transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, fagositoz, hücre proliferasyonu ve apoptoz olarak sıralanabilir (10).

Agonistleri

P2X₇ reseptörünü tam bir seçicilikle aktive edebilen bir agonist bulunmakla birlikte dört özellik P2X₇ reseptörlerinden kaynaklanan akımların diğer P2X reseptörlerinden kaynaklanan akımlardan ayrılmasını sağlar (11):

- 1) ATP'nin en düşük potense sahip olduğu P2X reseptörü P2X₇ reseptörüdür. P2X₇ reseptörünü aktive edebilmek için 100 μ M ve üstünde ATP konsantrasyonu gerekir.
- 2) 2',3'-(benzoyl-4-benzoyl)-ATP (BzATP), P2X₇ reseptörü için seçici olmamakla birlikte, ATP'den yaklaşık 10-30 kat daha potettir.
- 3) ATP ve BzATP'nin etkisi hücre dışı iki değerli iyonların (Ca²⁺ ve Mg²⁺) azaltılmasıyla artar.
- 4) Aynı agonistin tekrarlayan uygulamaları ile akımların zaman seyirleri ve büyüklükleri değişir.

ATP analogu olan agonistler 2MeSATP, ATP γ S ve ADP ise ATP'den çok daha az etkin bulunurken α meATP ve β meATP hemen hemen etkisizdir (12).

Antagonistleri

P2X₇ reseptörü yaygın olarak kullanılan P2X reseptör antagonisti olan suramine duyarsızdır. Diğer P2X antagonistleri olan NF279, PPDAS, Brilliant G ve oxATP ile inhibe edilebilmektedir. Ancak bu antagonistler seçici olmadıklarından, gerek deneysel gerekse klinik çalışmalarda kullanılmak üzere farklı firmalar tarafından seçici ve etkili antagonistler sentezlenmiştir. Bunlardan, temel bilim çalışmalarında yaygın olarak kullanılanları, parantez içinde sentezleyen firmanın adıyla beraber A438079 (Abbot), A740003 (Abbot), A804598 (Abbot), A839977 (Abbot), AZ1060612 (AstraZeneca), AZ11645373 (AstraZeneca) ve GW791343 (GlaxoSmithKline)'tür. Bu antagonistler nanomolar konsantrasyon aralığında potense sahiptir ve P2X₇ için diğer P2X alt tipleriyle karşılaştırıldığında yüksek seçicilik göstermektedirler (10,12-19).

P2X₇ reseptör aktivasyonu ve hücre membran geçirgenliği

Seçici olmayan bir katyon kanalı olan P2X₇'nin aktivasyonu, bu özellikteki bir iyon kanalından beklendiği gibi, hücre membranını hızla Na⁺, K⁺ ve Ca²⁺ iyonlarına geçirgen hale getirir. Bu klasik geçirgenlik artışına ek olarak, P2X₇'nin tekrarlayan veya uzun süreli agonist uyarıları hücre membranının yaklaşık 900 Da' a kadar büyük moleküllere geçirgen hale gelmesine yol açar (11).

Büyük moleküllere geçirgenlik artışını ölçmek için elektrofizyolojik yöntemler ve spektroskopik yöntemler kullanılmaktadır. Elektrofizyolojik yöntemlerde, hücre dışı ortamda genellikle Na⁺ iyonu büyük bir katyon olan NMDG⁺ ile yer değiştirilmektedir. Agonist uygulamasını takiben oluşan NMDG⁺ geçirgenliğinin artışı P2X₇ reseptörünün aktive ettiği büyük geçirgenliğin bir ölçüsü olarak kabul edilmektedir. Spektroskopik yöntemlerde ise, YO-PRO-1 gibi membranı geçemeyen floresan moleküller kullanılmaktadır. YO-PRO-1 DNA'ya bağlandığında floresans veren bir moleküldür. Agonist uygulamasından sonra hücre içindeki floresans artışı P2X₇ reseptör aktivasyonunun bir ölçüsü olarak kabul edilmektedir.

P2X₇ reseptör aktivasyonu ile oluşan büyük geçirgenliğin basitçe kanalın genişlemesiyle mi yoksa başka kanalların ikincil aktivasyonu ile mi olduğu; tek bir yola mı yoksa farklı hücre ve koşullarda ayrıştırılabilen birden fazla yola mı olduğu araştırılmakta olan bir konudur (11). Membranı geçemeyen büyük bir katyon olan NMDG⁺ geçirgenliği ile ikinci faz geçirgenliğin oluşma kinetiğinin, her ikisinin de iyon akımlarına göre bir kaç saniyelik gecikmeyle başlaması; ATP ve BzATP'nin etkili konsantrasyonlarının benzerliği, hücre dışı Mg²⁺ iyon konsantrasyonu artışının her ikisini de baskılaması; büyük geçirgenliğin, P2X₇ reseptörünün küçük katyonlara geçirgen porunun genişlemesiyle oluştuğu fikrini ön plana çıkarmaktadır

(18, 20). Diğer yandan, calmidazolium adlı kimyasalın ilk faz hızlı katyon akımını etkilemezsen YO-PRO-1 girişini inhibe etmesi; büyük geçirgenliğin başka kanalların aktivasyonu ile oluştuğunu düşündürmektedir (19). Ancak farklı iki yöntemle elde edilen bilgilerin kıyaslanmasında unutulmaması gereken nokta ölçüm sürelerinin genellikle farklı olduğudur. Elektrofizyolojik yöntemlerde agonist uygulamasını izleyerek 10-15 saniyelik gözlemler yapılırken, spektroskopik yöntemlerde dakikalar boyunca gözlem yapılmaktadır. Farklı sürelerde yapılan bu gözlemler araştırmacıların isabetli yorum yapmasını zorlaştırmaktadır.

P2X₇ reseptörünün aktivasyonu ile hücre membranının büyük moleküllere geçirgen hale gelmesi, P2X₇ reseptörünün zamanla genişleyerek anyon ve katyonlar arasında seçicilik göstermeyen bir kanala dönüştüğü, anyon ve katyonlar arasında seçicilik göstermeyen başka bir kanalı aktive ettiği veya basitçe hücre membranındaki bir hasar şeklinde yorumlanabilir. Ancak anyonik floresan moleküllerin kullanıldığı bir çalışmada J774 fare makrofaj hücre serisinin ATP ile uyarılmasıyla, hücre membranının 831 Da veya daha küçük olan Lucifer Yellow, 6-karboksifloresin ve pentakarboksilat fura-2' ye geçirgen hale gelirken, daha büyük moleküller olan Ewans blue, floresin-falloidin konjugatı ve 4100 Da ağırlığındaki floresin-dextran konjugatını geçirmediği gözlenmiştir (21). Son yıllardaki bazı çalışmalar da anyonik ve katyonik büyük molekül geçirgenliklerinin farklı yollardan olabileceğini düşündürmektedir (22, 23). Cankurtaran-Sayar ve arkadaşlarının (23) çalışmasında, P2X₇ reseptörlerini endojen olarak ifade eden fare makrofajı kökenli RAW 264. 7 hücreleri ve sıçan P2X₇ sini egzogen olarak ifade eden insan böbrek epitel hücre serisi olan HEK-293 hücrelerinde (HEK-rP2X₇), ATP uyarısı sonucu pozitif yüklü (YO-PRO-1) ve negatif yüklü (Lucifer Yellow) floresan moleküllerin hücre içine girişi incelenmiştir. HEK-rP2X₇ hücrelerinde, Ca²⁺ varlığında ATP ile uyarıldığında hem YO-PRO-1'in hem de Lucifer Yellow' un hücre

içine girdiği gözlenmiştir. Bu durum seçici olmayan bir geçirgenliği destekliyor gibi görünmekle birlikte, hücre dışı ortamdan Ca²⁺ uzaklaştırıldığında YO-PRO-1 girişinde belirgin bir değişiklik olmaksızın Lucifer Yellow girişinin ortadan kalkması, bu iki geçirgenliğin farklı mekanizmalarla olduğunu ortaya koymuştur. HEK-rP2X₇ hücrelerinde hücre içi Ca²⁺ bir iyonofor ile artırıldığında Lucifer Yellow girişinin olması fakat YO-PRO-1 girişinin olmaması, bu hücrelerde Lucifer Yellow girişinin P2X₇ reseptör aktivasyonunun doğrudan bir sonucu olmayıp hücre içi Ca²⁺ artışına ikincil olduğunu göstermiştir. RAW 264. 7 hücrelerinde ise hücre dışı ortama Ca²⁺ eklenmediği koşullarda P2X₇ reseptörlerinin aktivasyonu ile hem YO-PRO-1'in hem de Lucifer Yellow' un hücre içine girdiği gözlenmiştir. Bu hücrelerde hücre dışı ortama Ca²⁺ eklenmesi HEK-rP2X₇ hücrelerinden farklı olarak Lucifer Yellow girişinin azalmasına yol açmıştır. Bu gözlemler P2X₇ reseptör aktivasyonu ile ortaya çıkan boya girişinin anyonik ve katyonik moleküller için farklı mekanizmalarla olduğunu göstermiştir. Yine aynı çalışmada ATP uyarısının ardından bazı RAW 264. 7 hücrelerinin pozitif yüklü boyayı alırken Lucifer Yellow' u almaması aynı hücre tipinde bile negatif yüklü boya girişine kenet bakımından farklılıklar olabileceğini göstermektedir (23). Schachter ve arkadaşlarının çalışmasında da (22), ATP uyarısıyla makrofajlara hem katyonik hem de anyonik floresan moleküllerin girdiği, P2X₇ ifade edilmiş HEK-293 hücrelerine ise sadece katyonik moleküllerin girdiği gözlenmiştir. Bütün bu bulgular, P2X₇ reseptörünün aktivasyonu ile görülen membran geçirgenliğinin anyonlar ve katyonlar için net bir seçicilik gösterdiğini ortaya koymakta ve aktivasyon mekanizmasının araştırılmasını önemli kılmaktadır.

P2X₇ reseptör aktivasyonu ile ortaya çıkan membran geçirgenliklerine aracılık etmesi muhtemel kanallar

Hücre membranında bulunan ve aktivasyonu ile büyük bir geçirgenliğe yol

açan kanalların P2X₇ reseptörü aracılı geçirgenlikle ilişkili olma olasılıkları bulunmaktadır. Bunlar; konneksin hemikanalları, panneksin-1, plazma membran voltaj bağımlı anyon kanalı (p1-VDAC), maksı anyon kanalı, transient reseptör potansiyel vaniloid-1 (TRPV1), transient reseptör potansiyel anquirin-1 (TRPA1), maitotoksinle indüklenen por ve hücre içi Ca²⁺ artışının indüklediği porlardır (24). Bu kanallar veya porlar arasında P2X₇ ile ilişkisi çok daha fazla incelenmiş olan konneksin 43 ve panneksin-1 ile ilgili bilgiler aşağıda kısaca sunulmuştur.

Konneksin hemikanalları: Konneksinler gap junction'larda yer alan ve karşı karşıya gelerek komşu iki hücrenin sitoplazmaları arasında köprü oluşturarak küçük metabolitler ve ikinci habercilerin paylaşımına olanak veren yüksek geçirgenlikli kanallardır (25). Komşu hücredeki karşılığı ile kompleks oluşturamamış Cx43 konneksin hemikanallarının P2X₇ aracılı membran geçirgenlik artışından sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (26). Ancak Cx43'ü silinmiş farelerde P2X₇ aracılı büyük geçirgenliğin ortadan kalkmaması (27) ve konneksin hemikanal bloklarının etkisiz bulunması (28) bu olasılığı zayıflatmıştır.

Panneksin 1: Yapısal olarak konneksinlere benzeyen ancak hemikanal olarak membranda bulunan, karşılıklı gelmeleri gerekmeyen panneksin 1, seçici olmayan büyük bir geçirgenliğe yol açmaktadır. ATP ve karboksifloresin gibi negatif yüklü moleküller ve YO-PRO-1 gibi pozitif yüklü moleküller kanaldan geçebilmektedir. Panneksin 1 kanalları mekanik stres, hücre içi Ca²⁺ artışı ve purinerjik reseptörlerin aktivasyonu ile açılabilir (29). Panneksin 1'in RNAi, inhibitör peptidler ve panneksin bloklarları ile inhibe edilmesiyle P2X₇ aracılı büyük geçirgenliğin azalması gözlemlerine dayanarak, bu kanalın P2X₇ aracılı büyük geçirgenliğe aracılık ettiği ve hatta büyük geçirgenliğin bu protein üzerinden olduğu ileri sürülmüştür (30). Ancak aynı inhibitörlerin kullanılmasına

rağmen P2X₇ aracılı büyük geçirgenlikte değişiklik gözlenmeyen çalışmalar da mevcuttur (20,22,28). Bu gözlemler panneksin 1'in P2X₇ aracılı büyük geçirgenlikte muhtemel bir rolü olduğunu göstermekte ancak gözlenen tüm fenomenleri tek başına açıklayamamaktadır.

Sonuç

P2X₇ reseptör aracılı büyük geçirgenliğe yukarıda adı geçen kanallar veya henüz tanımlanmamış geçirgenlikler aracılık ediyor olabilir. Farklı türlerde ve farklı hücrelerde farklı geçirgenliklere kenet ve bunları ayırt etmek için kullanılan yöntemlerin çok seçici olmaması literatürde

mevcut olan çelişkili sonuçlara yol açabilir. Daha seçici farmakolojik araçların bulunması hem temel bilim düzeyinde ilerleme sağlayacak hem de P2X₇ reseptör aktivasyonunun farklı yönlerinin seçici olarak modülasyonu klinikte daha seçici uygulamalara olanak verecektir.

KAYNAKLAR

1. Burnstock G, Campbell G, Satchell D, et al. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol.* 1970; 40:668–688.
2. Schwiebert EM, Zsembery A, Geibely JP. Cellular Mechanisms and Physiology of Nucleotide and Nucleoside Release from Cells: Current Knowledge, Novel Assays to Detect Purinergic Agonists, and Future Directions. *Current Topics in Membranes.* 2003; Volume 54:31-58
3. Burnstock G. Introduction and perspective, historical note. *Front Cell Neurosci.* 2013;7:1-13
4. Ivar von Kügelgen. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Biotrend Reviews.* 2008; 9:1-12
5. North RA ve Barnard EA. Nucleotide receptors. *Curr Opin Neurobiol.* 1997; Jun 110(3):415-32
6. Surprenant A ve North RA. Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu Rev Physiol.* 2009; 71:333-59
7. Burnstock G. Purinergic signalling: from discovery to current developments. *Exp Physiol.* 2014; 99(1):16-34
8. Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E et al. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X₇). *Science.* 1996; 272: 735–738.
9. Bartlett R, Stokes L, Sluyter R. The P2X₇ receptor channel: recent developments and the use of P2X₇ antagonists in models of disease. *Pharmacol Rev.* 2014; 66(3):638-75.
10. Jacobson KA, Müller CE. Medicinal chemistry of adenosine, P2Y and P2X receptors. *Neuropharmacology.* 2016; May 104:31-49.
11. North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev.* 2002; 82: 1013–1067.
12. North RA, Surprenant A. pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000; 40:563-80. Review.
13. Coddou C, Yan Z, Obsil T, et al. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol Rev.* 2011; 63(3):641-83.
14. Jarvis MF, Khakh BS. ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology.* 2009; 56(1):208-15
15. Donnelly-Roberts D L, Namovic MT, Surber B, et al. [3H]A-804598 ([3H]2-cyano-1-[(1S)-1 phenylethyl]-3-quinolin-5-ylguanidine) is a novel, potent, and selective antagonist radioligand for P2X₇ receptors. *Neuropharmacology.* 2009; 56(1):223-9.
16. Saul A, Hausmann R, Kless A, et al. Heteromeric assembly of P2X subunits. *Front Cell Neurosci.* 2013; 18:7:250
17. Jiang, LH. Inhibition of P2X(7) receptors by divalent cations: old action and new insight. *Eur Biophys J.* 2009; 38(3):339-46
18. Yan Z, Li S, Liang Z, et al. The P2X₇ receptor channel pore dilates under physiological ion conditions. *J Gen Physiol.* 2008; 132(5):563-73.
19. Virginio C, Church D, North RA, Surprenant A. Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X₇ receptor. *Neuropharmacology.* 1997; 36(9):1285-94.
20. Virginio C, Mackenzie A, North RA, Surprenant A. Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X₇ receptor. *J Physiol* 1999; 519: 335–346.
21. Thomas H. Steinberg, Alan S. Newman, Joel A. Swanson, Samuel C. Silverstein. ATP₄- Permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes. *The Journal of Biological Chemistry.* 1987; 262(18):8884-8888.
22. Schachter J, Motta AP, de Souza Zamorano A, et al. ATP-induced P2X₇-associated uptake of large molecules involves distinct mechanisms for cations and anions in macrophages. *J Cell Sci.* 2008; 121: 3261-3270.
23. Cankurtaran-Sayar S, Sayar K, Ugur M. P2X₇ receptor activates multiple selective dye permeation pathways in RAW 264.7 and human embryonic kidney 293 cells. *Mol Pharmacol.* 2009; 76:1323-1332.
24. Ferreira LGB, Reis RAM, Alves LA, et al. Intracellular Signaling Pathways Integrating the Pore Associated with P2X₇ Receptor with Other Large Pores. *Patch Clamp Technique.* Intech; Chapter 2:37-54
25. Nielsen MS, Axelsen LN, Sorgen PL, et al. Holstein-Rathlou NH Gap junctions. *Compr Physiol.* 2012; Jul2(3):1981-2035.
26. Beyer EC, Steinberg TH. Evidence that the gap junction protein connexin-43 is the ATP-induced pore of mouse macrophages. *J Biol Chem.* 1991; 266:7971-7974.
27. Alves LA, Coutinho-Silva R, Persechini PM, et al. Are there functional gap junctions or junctional hemichannels in macrophages? *Blood.* 1996; 88: 328-334.
28. Faria RX, Defarias FP, Alves LA. Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X₇ receptor? *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005; 288: C260-71.
29. Dahl G, Keane RW. Pannexin: From discovery to bedside in 11±4 years? *BrainResearch.* 2012; 1487:150-9
30. Pelegrin P, Surprenant A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1b release by the ATP-gated P2X₇ receptor. *EMBO J.* 2006; 25:5071–5082.