

Transport oligonukleotydów przez błonę komórkową

Janusz Łaski

Centrum Badań Molekularnych
i Makromolekularnych PAN
Łódź

1. Wstęp

Ogromne nadzieje terapeutyczne związane ze strategią antysensu (1) podtrzymane są przez pozytywne wyniki eksperymentów *in vitro*, których celem było, np. zablokowanie aktywności niektórych wirusów, jak HIV (2,3), grypy (4) i opryszczki (5) czy specyficznych onkogenów, jak c-myc (6,7) i c-myb (8). Głównymi problemami, które wiążą się z tą koncepcją są transport antysensowych oligonukleotydów przez naturalną barierę, jaką jest błona plazmatyczna oraz stabilność konstruktów antysensowych w środowisku wewnątrz- i zewnątrzkomórkowym. Syntetyczne oligonukleotydy mogą być modyfikowane zarówno w kierunku zwiększenia ich stabilności jak i efektywności transportu, jakkolwiek obecny stan wiedzy nie dostarcza jednoznacznych odpowiedzi na pytanie o mechanizm ich migracji przez błonę komórkową.

2. Mechanizmy transportu przez błonę komórkową

Jednym z podstawowych warunków powstania życia jest wyodrębnienie układów biologicznych z nieożywionego otoczenia. Na poziomie komórkowym rolę bariery uniemożliwiającej swobodny przepływ materii i energii pełni błona komórkowa. Zapobiega ona wypływowi rozpuszczalnych w wodnym środowisku składników komórki. Jednakże w toku ewolucji zostały wytworzone, często wysoce wyrafinowane mechanizmy umożliwiające pobieranie substancji odżywczych z otoczenia i wydalanie zbędnych produktów przemiany materii. Komórki muszą ponadto regulować wewnątrzkomórkowe stężenie elektrolitów, co oznacza transport specyficznych jonów do wewnątrz i na zewnątrz komórki. Znanie są również wytworzone przez komórki mechanizmy umożliwiające wnikanie niektórych makromolekuł, jak białka czy polisacharydy do ich wnętrza. Stosując substancje farmakologiczne, których miejsce działania jest zlokaliz-

zowane wewnątrz komórki należy więc pamiętać, że skuteczność ich działania jest limitowana możliwością ich transportu przez błonę komórkową. Główne, dobrze poznane mechanizmy wnikania substancji do komórek przedstawiono poniżej.

2.1. Dyfuzja prosta

Niektóre substancje mogą swobodnie dyfundować przez dwuwarstwę lipidową. Do tej grupy należą: molekuly hydrofobowe (O_2 , N_2 , benzen, itp.) oraz małe (m.c.z. < 100 Da), niejonowe, polarne cząsteczki (H_2O , mocznik, glicerol, CO_2 , itp.). Przepuszczalność dwuwarstwy maleje wraz ze wzrostem hydrofilowości i wielkości transportowanych molekuł.

2.2. Dyfuzja ułatwiona

2.2.1. Białka transportowe (ang. *carrier proteins*)

Jakkolwiek dwuwarstwa lipidowa jest nieprzepuszczalna dla wielu klas substancji, błony biologiczne zawierają wyspecjalizowane białka ułatwiające transport niektórych molekuł do komórki. Każde z tych białek jest przystosowane do transportu tylko jednego rodzaju cząsteczek, takich jak: niektóre jony, węglowodany czy aminokwasy. Są to integralne białka błonowe, których łańcuch aminokwasowy wielokrotnie przechodzi przez dwuwarstwę lipidową, posiadające miejsce wiązania substratu, po czym następuje zmiana ich konformacji umożliwiająca przeniknięcie transportowanej molekuly przez dwuwarstwę bez kontaktu z jej hydrofobowym środowiskiem.

2.2.2. Kanały jonowe (ang. *channel proteins*)

Efektywniejszy sposób transportu jonów przez błonę komórkową umożliwiają inne integralne białka błonowe tworzące tzw. kanały jonowe, których światło w obrębie dwuwarstwy jest otwarte, niezależnie od interakcji z substratem. Może tą drogą przenikać przez błonę ponad 10^6 jonów na sekundę, czyli ponad 100 razy więcej niż w przypadku transportu nośnikowego. Kanały jonowe występujące w błonach komórkowych roślin i zwierząt są małe i wysoce selektywne, podczas gdy w błonie mitochondriów, chloroplastów i komórek bakteryjnych są względnie duże i mniej selektywne. Przepływ jonów przez kanały jonowe może być regulowany przez „furtki”, które zamykają lub otwierają kanały pod wpływem różnorodnych czynników, takich jak: potencjał błonowy (najpowszechniejszy), stymulacja mechaniczna czy wiązanie specyficznego ligandu (neurotransmitery, jony, nukleotydy itd.). Do tej pory opisano ok. 50 typów kanałów jonowych występujących w wielu typach komórek, a następne nadal są odkrywane.

2.3. Transport aktywny

Transport substancji zgodnie z opisanymi mechanizmami może odbywać się jedynie w kierunku zgodnym z ich gradientem elektrochemicznym, tzn. z ośrodka o wyższym stężeniu określonej substancji lub koncentracji jonów obdarzonych zgodnym ładunkiem do ośrodka o odpowiednio niższym stężeniu. Jednakże dla prawidłowego funkcjonowania komórek niezbędne jest utrzymywanie gradientu stężeń po przeciwnych stronach błony. Przykładowo, stężenie jonów K^+ w cytoplazmie podstawowej jest w stanie fizjologicznym 10 do 20 razy wyższe niż w płynach tkankowych. Jest to możliwe dzięki systemowi aktywnego transportu, który zużywając energię transportuje substancje wbrew ich gradientowi elektrochemicznemu. Rolę transporterów pełnią białka błonowe posiadające z reguły aktywność ATP-azową. Zmiana konformacyjna takiego białka transportowego wymaga poza związaniem substratu również hydrolizy ATP i ufosforylowania tego białka. Niektóre białka transportują pojedyncze cząsteczki z jednej strony błony na drugą. Taki system nosi nazwę uniportu. Inne natomiast jednocześnie transportują drugą cząsteczkę innego rodzaju w kierunku zgodnym (symport), jak w przypadku transpotru glukozy wspólnie z jonami Na^+ do komórek jelita lub nerek lub przeciwnym (antyport) jak w przypadku białka pasma III erytrocytów, transportującego aniony Cl^- do wewnątrz, a HCO_3^- na zewnątrz komórki.

2.4. Endocytoza

Makromolekuły (polisacharydy, białka, kwasy nukleinowe) aby dostać się do wnętrza komórki wymagają bardziej wyrafinowanych mechanizmów transportu. Mogą one wnikać do komórek razem z fragmentami błony komórkowej na drodze endocytozy. Ze względu na rodzaj interakcji substratu z powierzchnią komórki można wyróżnić dwa rodzaje endocytozy: 1) niespecyficzną, adsorpcyjną (zwana także endocytozą z fazy ciekłej lub pinocytozą) oraz 2) zależną od wiązania substratu z receptorem. W pierwszym przypadku substrat o dużym powinowactwie do błony komórkowej spowodowanym najczęściej jego hydrofobowością lub dodatnim ładunkiem (powierzchnia komórki zawsze naładowana jest ujemnie) wchodzi wraz z przyległym fragmentem błony komórkowej w cykl endocytotyczny podobny jak w przypadku endocytozy zależnej od wiązania z receptorem. Zjawisko endocytozy zależnej od wiązania substratu z receptorem zachodzi w cyklu następujących po sobie faz:

I — wiązanie substratu ze specyficznym receptorem obecnym na powierzchni błony komórkowej;

II — koncentracja kompleksów ligand-receptor w wyspecjalizowanych regionach błony komórkowej w postaci zagłębień opłaszczonych od wewnętrznej strony białkiem błonowym — klatryną, wiążącym się z cytoplazmatyczną domeną receptorów (ang. *coated pits*). Regiony takie zajmują ok. 2% powierzchni komórki, a każdy z nich skupia ok. 1000 receptorów. Średni czas trwania tych struktur wynosi ok. 1 min;

III — zamykanie zagłębień i powstanie opłaszczonych klatryną pęcherzyków (ang. *coated vesicles*), które następnie odrywają się od błony komórkowej i migrują do cytoplazmy (ok. 2500 pęcherzyków na minutę odrywa się od błony komórkowej fibroblastów);

IV — w ciągu kilku sekund pęcherzyki tracą płaszcz klatrynowy i podlegają fuzji z endosomami, gdzie pod wpływem obniżonego pH (5 – 6) substrat może dysocjować od receptorów, zmieniając ponadto swoje właściwości fizykochemiczne. Niskie pH wewnątrz endosomów, podobnie jak pH lizosomów, jest utrzymywane dzięki ATP-zależnemu systemowi aktywnego transportu jonów H^+ z cytozolu (9);

V — zawartość endosomów z fragmentami ich błony, nadal zawierającymi receptory drogą transportu wezykularnego, migruje do lizosomów, gdzie ulega enzymatycznej degradacji lub poprzez pęcherzyki powracające (ang. *recycling vesicles*) dostaje się ponownie na powierzchnię błony komórkowej. Endosomy mogą również przekształcać się w lizosomy na drodze dojrzewania poprzez przyjmowanie pęcherzyków formowanych w aparacie Golgiego, zawierających odpowiednie enzymy. Ostateczna lokalizacja receptorów i ligandów jest zróżnicowana i nie zawsze dokładnie określona. Dobrze poznane przykłady to: receptory insuliny i EGF (czynnik wzrostu nabłonka), które wspólnie z ligandem wędrują do lizosomów; receptory mannozy, mannozo-6-fosforanu, LDL (lipoproteiny), α_2 -makroglobuliny, które wracają na powierzchnię, podczas gdy ich ligandy trafiają do lizosomów oraz receptor transferryny, który powraca na powierzchnię komórki wspólnie ze zasocjowanym ligandem (transferryną) uwalniającym jednakże w kwaśnym środowisku endosomalnym atomy żelaza.

2.5. Fagocytoza

Drogą endocytozy mogą wnikać do komórek cząstki o rozmiarach nie przekraczających z reguły 150 nm. Większe obiekty (>250 nm) takie jak mikroorganizmy czy zręby komórkowe mogą być wchłaniane tylko przez wyspecjalizowane komórki ssaków (neutrofile, makrofagi) zgodnie z procesem zwanym fagocytozą. W proces ten jest zaangażowany zespół receptorów błonowych. Obiekty wchłaniane są wraz z fragmentem błony komórkowej, tworząc pęcherzyki (fagosomy), które ulegają fuzji z lizosomami tworząc tzw. fagolizosomy, gdzie ich zawartość jest degradowana.

3. Transport niemodyfikowanych oligonukleotydów

Oligonukleotydy, jako względnie duże, obdarzone ujemnym ładunkiem molekuly nie są w stanie przenikać przez dwuwarstwę lipidową w sposób bierny. Połówkowy czas wypływu znakowanych izotopowo oligonukleotydów z lizosomów jest dłuższy niż 4 dni (10). Jednakże w żywych komórkach obserwowano wnikanie oligonukleotydów znakowanych izotopowo lub fluorescencyjnie do ich wnętrza i lokalizację w pęcherzykach cytoplazmatycznych i w obrębie

jądra (11,12). Podczas gdy oligonukleotydy wprowadzono do wnętrza komórki przez mikroiniekcję, obserwowano szybką ich migrację z cytoplazmy i skupienie wokół jądra komórkowego (13,14).

Szybkość transportu maleje wraz ze zwiększeniem liczby nukleotydów w cząsteczce (11,12). Badanie kinetyki tego transportu wykazało jego zależność od temperatury, konsumpcji energii i stężenia substratu oraz brak zależności od sekwencji nukleotydów. Efektywność wnikania oligonukleotydów jest wyższa przy niższym ich zewnątrzkomórkowym stężeniu ($< 0,5M$), co sugeruje, że błona komórkowa (w szczególności receptory błonowe) może absorbować jedynie ograniczoną ilość cząsteczek substratu (12). Pozwala to sądzić, że aktywny transport na drodze endocytozy zależnej od specyficznych receptorów, zgodnie z którą, po związaniu substratu wnikają one do cytoplazmy w postaci opłaszczonych klatryną pęcherzyków endocytarnych, które przechodzą przez system endosomalny i podlegają fuzji z lizosomami, gdzie ich zawartość może być degradowana lub powracają na powierzchnię komórki (15). Zgodnie z założeniami strategii antysensu, oligonukleotydy powinny być odporne wobec enzymów lizosomalnych i podlegać biernej dyfuzji z kwaśnego środowiska endo- lub lizosomów do cytoplazmy lub też na drodze transportu wezykularnego migrować do innych wewnątrzkomórkowych struktur błonowych.

W 1989 r. Loke i współ. (11) zidentyfikowali białko błonowe komórek HL60 o masie cząsteczkowej ok. 80 kDa (p80), wskazując je jako receptor oligonukleotydów biorący udział w ich aktywnym transporcie. Wykazano obecność p80 w wielu typach komórek, jak: mielomonocyty, fibroblasty, komórki nerwiaka niedojrzałego (neuroblastoma) czy komórki nabłonkowe. Analiza Scatcharda wykazała średnio od 20 000 do 100 000 miejsc wiążących oligonukleotydy na powierzchni komórki (16). Podobne białka powierzchniowe, wiążące oligonukleotydy o masach 79 i 90 kDa zidentyfikowali Yakubow i współ. (12) w komórkach L929 i puchliny brzusznej Krebsa (ang. *Krebs ascite cells*). Hipotezę dotyczącą aktywnego transportu oligonukleotydów na drodze endocytozy zależnej od wiązania ze specyficznym receptorem potwierdza jego inhibicja azydkiem sodu, deoksyglukozą czy cytochalasyną (inhibitory endocytozy) (11,12), punktowy obraz znakowanych oligonukleotydów wewnątrz komórki (skoncentrowany w strukturach błonowych) oraz kompetycyjna inhibicja transportu znakowanych oligo(dN) przez nieznakowane deoksyrybo- i rybonukleotydy, oligo(dN), plazmidowe DNA oraz tRNA z komórek drożdży w stopniu proporcjonalnym do ich stężenia. Nie obserwowano kompetycji transportu przez niefosforylowane nukleozydy, jakkolwiek pojedyncze nukleotydy są efektywnymi inhibitorami niezależnie od stopnia ich ufosforylowania (badano wpływ mono-, di- i trójfosforanów). Ponadto nukleotydy posiadające grupę fosforanową na końcu 5' lepiej współzawodniczą o miejsce wiążące niż ufosforylowane na końcu 2' lub 3'. Brak inhibicji przez fosforany węglowodanów (deoksyrybozy, fruktozy, mannozy, glukozy) świadczy o tym, że obecność pojedynczego 5'monofosforanu nukleozydu jest warunkiem zarówno wystarczającym, jak i koniecznym do efektywnej inhibicji kompetycyjnej, a zatem zapewne również do transportu oligonukleotydów przez błonę komórkową (11).

Wykazano również możliwość wiązania kwasów nukleinowych przez inne białka błonowe. Bennet i współ. (17) wykryli białko o masie 30 kDa, obecne w wielu typach komórek, zdolne do wiązania i internalizowania dwuniciowych, wysokopolimeryzowanych DNA (m.in. plazmidów). W tym jednakże przypadku nie obserwowano kompetycyjnej inhibicji wiązania DNA przez obecność tRNA, plazmidowego DNA ani krótszych oligonukleotydów nawet przy ich 1000-krotnie większym stężeniu. Ponadto wiązanie DNA do białka 30 kDa blokuje się heparyną i siarczanem chondroityny — związkami o charakterze polianionów. Wskazuje to na niespecyficzne jonowe wiązanie DNA i ewentualną możliwość endocytozy z fazy ciekłej. Stein i współ. (18) opisali wiązanie oligonukleotydów i ich pochodnych z receptorem CD4 limfocytów T (wiążącym białko wirusowe gp120), wskazując na możliwość wykorzystania tej właściwości w zwalczaniu wirusa HIV.

Poglądy na temat mechanizmu transportu oligonukleotydów przez błonę komórkową nie są jednak zgodne. Zamecnik (18) na podstawie mikroskopii elektronowej sugeruje wnikanie na drodze potocytozy. Różnica między potocytozą a endocytozą polega na tym, że po związaniu substratu z receptorem nie tworzą się endosomy — pęcherzyki opłaszczone klatryną, a tzw. Caveolae — pęcherzyki, w błonie których zakotwiczone są białka inne niż klatryna poprzez grupę glikozylofosfatydyloinozytolową. Pęcherzyki takie pozostają zasocjowane z błoną plazmatyczną, a pod wpływem obniżonego pH substrat jest uwalniany od receptorów, aby prawdopodobnie poprzez tworzące się przerwy w ciągłości błony na skutek zmian konformacyjnych białek błonowych pod wpływem obniżonego pH oraz przy współdziałaniu białek cytoszkieletu (filamentów aktyny i miozyny) migrować do cytoplazmy (20, 21).

4. Modyfikacje oligonukleotydów ułatwiające transport

Oligonukleotydy z racji posiadania ujemnego ładunku w niewielkim stopniu oddziałują z również ujemnie naładowaną powierzchnią komórki, co nie sprzyja ich transportowi przez błonę. Ładunek oligonukleotydów można modyfikować poprzez sprzężenie z dodatnio naładowanymi makromolekułami. Jednym z często stosowanych przENOŚNIKÓW stosowanych do wprowadzania leków do komórek jest polikationowy polipeptyd — poli L-lizyna (PLL), transportowana na drodze niespecyficznej endocytozy adsorpcyjnej (22). Leonetti i współ. (23), stosując metodę cytometrii przepływowej wykazali, że wiązanie znakowanych fluorescencyjnie oligonukleotydów z PLL zarówno przyspiesza ich transport przez błonę, jak i zwiększa ich końcowe stężenie wewnątrz komórki. Ponadto proces ten jest zależny od temperatury i konsumpcji energii, a fluorescencja znakowanych oligonukleotydów jest skoncentrowana w punktach odpowiadających endosomom, co wskazuje na transport na drodze endocytozy.

Innym stosowanym kationowym białkiem, również internalizowanym na drodze niespecyficznej endocytozy adsorpcyjnej jest awidyna. Obserwowano

czterokrotny wzrost efektywności transportu kompleksów oligonukleotydów związanych z biotyną (witamina H) zasocjowanych z awidyną (24).

Oligonukleotydy modyfikowano również w kierunku zwiększenia stopnia ich hydrofobowości w celu podwyższenia interakcji z błoną plazmatyczną. Dołączenie cząsteczki fosfolipidu do końca 5' oligonukleotydu zwiększa ilość internalizowanego substratu 8 – 10 razy (25). Przyłączenie pojedynczej cząsteczki cholesterolu prowadzi do 15-krotnego zwiększenia wewnątrzkomórkowej zawartości transportowanego oligonukleotydu (26), jednak nie znany jest sposób wnikania tak zmodyfikowanego substratu do komórki.

5. Modyfikacje zwiększające stabilność nukleotydów

Oligonukleotydy fosfodiesterowe transportowane do komórki są degradowane przez enzymy nukleolityczne obecne zarówno w komórkach jak i w płynach pozakomórkowych (27,28). Jest to proces niekorzystny z punktu widzenia strategii antysensowej. Modyfikacje syntetycznych oligonukleotydów polegające na podstawieniu atomu tlenu w wiązaniu fosfodiesterowym atomem siarki (tiofosforany) lub grupą metylową (metanofosfoniany) skutecznie chroni je przed enzymatyczną degradacją (29,30). Modyfikacje takie mogą wpływać jednak na sposób i efektywność ich transportu przez błonę komórkową.

Metanofosfoniany, ze względu na zwiększoną hydrofobowość i zmniejszony ładunek powinny być łatwiej transportowane na drodze biernej dyfuzji niż niemodyfikowane oligonukleotydy. Jednakże badania przeprowadzone w laboratorium Juliano (10,31) nie wykazały istotnych różnic w szybkości ich wpływu z liposomów. Ponadto nie stwierdzono kompetycyjnej inhibicji transportu niemodyfikowanych oligonukleotydów przez metanofosfoniany (11), a szybkość wnikania metanofosfonianów do komórki nie zależy od ich długości (32), mimo że szybkość ich transportu zależy od temperatury i czasu inkubacji, a obraz fluorescencyjnie znakowanego substratu wykazuje skupienia charakterystyczne dla endosomów (31). Fakty te sugerują transport metanofosfonianów na drodze niespecyficjnej (niezależnej od wiązania z receptorem) endocytozy z fazy ciekłej.

Tiofosforany pod względem chemicznym nie różnią się tak drastycznie od niemodyfikowanych oligonukleotydów, jak metanofosfoniany. Posiadają one ten sam ładunek i zbliżoną hydrofobowość. Obserwowano kompetycyjną inhibicję transportu fosfodiesterowych oligonukleotydów przez tiofosforany, co świadczy o wspólnym mechanizmie ich transportu, prawdopodobnie na drodze endocytozy zależnej od wiązania ze specyficznym receptorem (11,33). Kinytyka wnikania znakowanych fluorescencyjnie tiofosforanów jest zbliżona do transportu fosfodiestrów (34). Końcowe stężenie wewnątrz komórki tiofosforanów jest nieznacznie wyższe niż końcowe stężenie fosfodiestrów (35). Badano również transport oligonukleotydów modyfikowanych atomami siarki jedynie w dwóch skrajnych pozycjach; na 3' i 5' końcu (36). Takie produkty, wykazując odporność na enzymy nukleolityczne zbliżoną do „pełnych” tiofosforanów są transportowane wyraźnie od nich szybciej i efektywniej.

Obecnie brakuje danych na temat różnic w transporcie stereoregularnych tiofosforanów (wiązanie fosfotioestrowe może występować w dwóch przeciwnych konformacjach), z których zastosowaniem wiąże się duże nadzieje terapeutyczne (37,38).

6. Transport oligonukleotydów w liposomach

Względnie niska efektywność wnikania antysensowych oligonukleotydów do komórek na drodze opisanej (do 11% zewnątrzkomórkowego stężenia) skłania do poszukiwania alternatywnych metod transportu. Już w latach siedemdziesiątych rozwinęto technikę podawania leków w postaci liposomów. Są one tworzone jako pojedyncza lub wielokrotna dwuwarstwa lipidowa zamykająca wewnętrzne — wodne środowisko zawierające transportowane substancje i przenikają do komórek na drodze endocytozy. Skład lipidowy liposomów może być skomponowany tak, aby pod wpływem obniżonego pH wewnątrz endosomów lub lizosomów następowała dezintegracja dwuwarstwy, sprzyjając uwalnianiu ich zawartości (39). Zamknięcie oligonukleotydów w liposomach chroni je ponadto przed działaniem enzymów nukleolitycznych (40,41). Dodatkowe możliwości selektywnego transportu antysensowych oligonukleotydów do wybranych typów komórek stwarzają tzw. „adresowane” immunoliposomy, które na powierzchni zawierają przeciwciała skierowane przeciw specyficznym receptorom docelowych komórek (23,42).

Literatura

1. Zamecnik P.C., Stephenson M.L., (1978), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 280 – 284.
2. Agrawal S.A., Ikeuchi T., Sun D., Sarin P.S., Konopka A., Maizel J., Zamecnik P.C., (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 7790 – 7796.
3. Zamecnik P.C., Goodchild J., Taguchi Y., Sarin P.S., (1986), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 4143 – 4146.
4. Leiter J.M.E., Agrawal S., Palese P., Zamecnik P.C., (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3430 – 3434.
5. Gao W., Stein C.A., Cohen J.S., Dutschman G.E., Cheng C.Y., (1989), J. Biol. Chem., 246, 11521 – 11527.
6. McManaway M.E., Neckers L.M., Loke S.L., Al-Nasser A.A., Redner R.L., Shimizu B.T., Goldschmidts W.L., Huber B.E., Bhatia K.L., Magrath I.T., (1990), Lancet, 335, 808 – 811.
7. Wickstrom E.L., Bacon T.A., Gonzales A., Freeman D.L., Lyman G. H., Wickstrom E., (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 7790 – 7796.
8. Gewirtz A.M., Calabretta B., (1988), Science, 242, 1303 – 1306.
9. Mellman I., Fuchs R., Helenius A., (1986), Ann. Rev. Biochem., 55, 663 – 700.
10. Akhtar S., Basu S., Wickstrom E., Juliano R. L., (1991), Nucl. Acid Res., 19, 5551 – 5559.
11. Loke S.L., Stein C.A., Zhang X.H., Mori K., Nakanishi M., Subashinge C., Cohen J.S., Neckers L.M., (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3474 – 3478.
12. Yakubov L., Deeva E., Zarytova V., (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 6454 – 6458.

13. Chin D.J., Green G.A., Zon G., Szoka F.C., Staubinger R.M., (1990), *The New Biologist*, 2, 1091 - 1100.
14. Leonetti J.P., Mechti N., Degols G., Gagnor C., Lebleu B., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 2702 - 2706.
15. Krangel M.S., (1987), *J. Exp. Med.*, 165, 1141 - 1159.
16. Neckers L.M., Whitesell L., Rosolen A., Geselowitz D.A., (1992), *Crit. Rev. Oncogen.*, 3, 175 - 231.
17. Bennet R., Gabor G., Merrit M., (1985), *J. Clin. Invest.*, 76, 2182 - 2190.
18. Stein C.A., Neckers L.M., Nair B.C., Mumbauer S., Hoke G., Pal R., (1991), *J. AIDS*, 4, 686 - 693.
19. Zamecnik P.C., Aghajanian J., Zamecnik M., Goodchild J., Witman G., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 3156 - 3160.
20. Anderson R.G.W., Kamen B.A., Rothberg K.G., Lacey S.W., (1992), *Science*, 255, 410 - 411.
21. Anderson R.G.W., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 10909 - 10913.
22. Ryser H.J-P., Shen W-C., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 3867 - 3870.
23. Leonetti J.P., Machy P., Deglos G., Lebleu B., Leserman L., (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 2448 - 2451.
24. Partridge W.M., Boado R.J., (1991), *FEBS Letters*, 288, 30 - 32.
25. Shea R.G., Marsters J.C., Bischofberger N., (1990), *Nucl. Acid. Res.*, 18, 3777 - 3783.
26. Boutorin A.S., Guskova L.V., Ivanova E.M., Kobetz N.D., Zarytova V.F., Ryte A.S., Yurchenko L.V., Vlassov V.V., (1989), *FEBS Letters*, 254, 129 - 132.
27. Akhtar S., Kole R., Juliano R.L., (1991), *Life Sci.*, 49, 1793 - 1801.
28. Wickstrom E., (1986), *J. Biochem. Biophys. Methods*, 13, 97 - 102.
29. Shaw J. P., Kent K., Bird J., Fishback J., Froehler B., (1991), *Nucl. Acid Res.*, 19, 747 - 750.
30. Uhlmann E., Peyman A., (1990), *Chem. Rev.*, 90, 544 - 584.
31. Shoji Y., Akhtar S., Periasamy A., Herman B., Juliano R.L., (1991), *Nucl. Acid Res.*, 19, 5543 - 5550.
32. Miller P.S., McParland K.B., Jayaraman K., Ts'o P.O.P., (1981), *Biochemistry*, 20, 1874 - 1881.
33. Stein C.A., Tonkinson J.L., Zhang L-M., Yakubov L., Gervasoni J., Taub R., Rotenberg S.A., (1993), *Biochemistry*, 32, 4855 - 4861.
34. Marti G., Egan W., Noguchi P., Zon G., Matsukura M., Broder S., (1992), *Antisense Res. Dev.*, 2, 27 - 39.
35. Croke R., (1991), *Anti-cancer Drug Des.*, 6, 609 - 612.
36. Thierry A.R., Ditschilo A., (1992), *Nucl. Acid Res.*, 20, 5691 - 5698.
37. Cohen J.S., (1989), *Oligodeoxynucleotides Antisense Inhibitors of gene expression*, in: *Topics in molecular and structural Biology*, 12, Macmillan Press, London.
38. Stec W.J., (1993), *Stereocontrolled synthesis of P-chiral analogs of oligonucleotides*, in: *Antisense research and applications*, Eds. Croke S.T., Lebleu B., CRC Press Boca Raton, 251 - 271.
39. Chu C.J., Dijkstra J., Lai M.Z., Hong K., Szoka F.C., (1990), *Pharmaceutical Research*, 7, 824 - 834.
40. Leonetti J.P., Degols G., Lebeu B., (1990), *Bioconj. Chem.*, 1, 149 - 153.
41. Milhaud P.G., Machy P., Lebleu B., Leserman L., (1989), *Biochim. Biophys. Acta*, 987, 15 - 20.
42. Renneisen K., Leserman L., Matthes E., Schroder H.C., Muller W.E.G., (1990), *J. Biol. Chem.*, 265, 16337 - 16342.

Oligonucleotide transport across the plasma membrane

Summary

Transport of synthetic oligonucleotides across the plasma membrane of mammalian cells is the one of the major problems in the application of the antisense strategy. Modifications of oligonucleotides may improve their transport and stability in the cell's medium. The therapeutical agents targeted to intracellular structures and their mechanisms are reviewed.

Key words:

membrane transport, oligonucleotide uptake, endocytosis, antisense, phosphorothioates, methylphosphonates.

Adres dla korespondencji:

Janusz Łaski, Zakład Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź.