

# Antysensowe oligonukleotydy jako narzędzie badania ekspresji genów w mózgu

Arkadiusz Szklarczyk

Leszek Kaczmarek

Pracownia Hodowli Komórek i Tkanek

Instytut Biologii Doświadczalnej

im. M. Nenckiego PAN

Warszawa

## 1. Wstęp

Antysensowe oligonukleotydy (asODN) są to chemicznie zsyntetyzowane naturalne lub zmodyfikowane analogi jednoniciowego DNA o długości 10 – 30 nukleotydów. Związki te umożliwiają wysoce selektywne zablokowanie aktywności określonego genu(ów) w wyniku reakcji z komplementarną (sensową) sekwencją mRNA. Umożliwiają one zatem precyzyjne wyłączenie z aparatu molekularnego komórki wybranego białka (produktu docelowego genu). Celem dla asODN może być dowolne mRNA nawet jeśli pełna jego sekwencja jest dotąd nie znana. Użyteczność strategii asODN rysuje się wyraźnie w sytuacji, gdy celem doświadczenia jest zahamowanie aktywności, np. produktów genów wczesnych, czynników wzrostowych, receptorów o nieznanym antagonistach, a zatem tych białek, których selektywne inhibitory nie są znane.

Jednym z głównych wyzwań współczesnej neurobiologii jest poznanie funkcjonowania komórek nerwowych na poziomie molekularnym, w szczególności ekspresji genów w różnych stanach fizjologicznych, a co za tym idzie, określenie substratu biochemicznego wyższych czynności nerwowych. Umożliwi to również opracowanie w przyszłości nowych strategii terapeutycznych chorób neurologicznych, psychicznych, infekcji wirusowych oraz nowotworów mózgu. Zadania te wymagają opracowania niezwykle pewnych i precyzyjnych narzędzi możliwych do zastosowania w różnych modelach neurobiologicznych, a w przyszłości także i w klinice. asODN, jak się wydaje, są jednym z takich narzędzi.

W ciągu ostatnich kilku lat z dużym powodzeniem stosowano asODN do blokowania ekspresji wybranych genów w komórkach hodowanych *in vitro*, a także w całym organizmie wielokomórkowym. Oba podejścia są dokładniej przedstawione w innych artykułach tego numeru „Bioteknologii”, a także w zeszycie 4/’94. Celem tego opracowania jest omówienie danych odnoszących się do zastosowania asODN do blokowania ekspresji genów w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN).

## 2. Geny zablokowane przez asODN w ośrodkowym układzie nerwowym

Listę genów, których ekspresję w OUN blokowano za pomocą asODN przedstawiono w tab. 1. Z oczywistych względów szczególnie licznie są w niej

TABELA 1  
GENY ZABLOKOWANE PRZEZ asODN W OŚRODKOWYM UKŁADZIE NERWOWYM

Receptory neurotransmiterów	Neurotransmitery	Czynniki transkrypcyjne	Czynniki wzrostowe
ATII-R1 (22)	ATII (11)	c-fos (6,7,10,14,24)	IGF-1 (34)
DOR-1 (15,25)	AVP (8)	PR (20,21)	
NPY-YIR (31)	VIP (23)	ER (17)	
D2R (33,35)	NPY (2)		
NMDA-R1 (30)			

R — receptor, At — angiotensyna, DO — delta opioid, NPY — neuropeptyd Y, D — dopamina, NMDA — N - methyl - D - aspartate, AVP — wazopresyna argininowa, VIP — *ang. vasoactive intestinal peptide*, P — progesteron, E — estrogen, IGF — insulinopodobny czynnik wzrostowy.

reprezentowane receptory dla neuroprzekaźników. Właśnie w tym przypadku asODN okazały się szczególnie użyteczne. Ostatnio bowiem techniki klonowania genów pozwoliły uzyskać liczne sekwencje, których znaczenie fizjologiczne było niemal zupełnie nieznanne. W takiej właśnie sytuacji asODN, jak się wydaje, są idealnym narzędziem badawczym. Na przykład zablokowanie ekspresji NMDAR1 — jednego z pięciu genów kodujących podjednostki receptora NMDA (*ang. N - methyl - D - aspartate*) pozwoliło wykazać dominującą rolę tego właśnie białka w neurodegeneracji wywołanej niedotlenieniem (30). Z kolei zastosowanie asODN w badaniach nad receptorami opioidowymi pozwoliły wykazać, że gen DOR - 1 w istocie koduje funkcjonalne białko receptorowe (15,25). W innych badaniach chodziło o wykazanie udziału wybranych receptorów, czy też neuropeptydów w określonych sytuacjach behawioralnych (zob. tab. 1 i zawarte w niej odnośniki).

## 3. Farmakokinetyka asODN w ośrodkowym układzie nerwowym

asODN podawane do jamy otrzewnowej lub dożylnie wykazują jedynie ograniczoną zdolność do wnikania do OUN (1,6). Konieczne jest zatem wprowadzenie asODN bezpośrednio do OUN. asODN można podawać albo bezpośrednio w okolicę badanej struktury mózgowej lub do układu komór mózgowych. Pierwsze podejście umożliwia ingerencję w procesy przebiegające w ściśle zdefiniowanej strukturze anatomicznej. Drugie zaś, pozwala wpływać na procesy zależne od wielu struktur lub w sytuacji, gdy substrat anatomiczny badanego procesu jest nieznan. Oba sposoby były skutecznie wykorzysty-

wane (tab. 2 – A,B,C). Warto zwrócić uwagę na ogromne, sięgające dwóch rzędów wielkości rozpiętości w użytych dawkach.

TABELA 2  
A. INFUZJE DO UKŁADU KOMOROWEGO MÓZGU

Analog	Gen	Zwierzę	Dawka [nmole]	Sposób podania	Literatura
O-ODN	NMDA-R1	szczur	60	4 iniekcje co 12 h	(30)
O-ODN	DOR-1	mysz	~ 15	6 iniekcji co 12 h	(15)
O-ODN	NPY-Y1-R	szczur	~ 40	4 iniekcje co 12 h	(31)
O-ODN		szczur	2520	ciągła infuzja 15 nmoli/h przez 1 tydzień nietoksyczna	(34)
S-ODN	D2R	szczur	120	ciągła infuzja 1,6 nmola/h przez 3 dni	(35)
S-ODN	D2R	mysz	7,5	3 iniekcje co 12 h	(3)
S-ODN	ATII-R1	szczur	~ 0,12	3 iniekcje co 24 h	(22)
S-ODN	D2R	szczur	255,5	infuzja 1,5 nmola/h przez 1 tydzień nietoksyczna	(34)
S-ODN		szczur	72 dawka śmiertelna	infuzja 3 nmole/h przez 24 h	(34)

B. INIEKCJA INTRATEKALNA

O-ODN	DOR-1	mysz	~ 0,6 i 3	3 iniekcje co 2 dni	(25)
-------	-------	------	-----------	---------------------	------

C. INIEKCJE DOSTRUKTURALNE

Analog	Gen	Struktura	Zwierzę	Dawka [nmole]	Iniekcje	Literatura
S-ODN	c-fos	prążkowie	szczur	~ 4	1 w 2 $\mu$ l	(7)
S-ODN	c-fos	prążkowie	szczur	2	1 w 2 $\mu$ l	(6)
S-ODN	c-fos	prążkowie	szczur	2	1 w 2 $\mu$ l	(24)
S-ODN	c-fos	jądro półleżące	szczur	5	1 w 1 $\mu$ l	(14)
EC-ODN	c-fos	rdzeń kręgowy	szczur	0,375	1 w 5 $\mu$ l aCSF	(10)
O-ODN	PR	podwzgórze	szczur	~ 0,1	1 w 1 $\mu$ l soli fizjologicznej	(21)
O-ODN	ER	podwzgórze	szczur-osesek	~ 0,2	1 w 1 $\mu$ l oleju	(17)
O-ODN	PR	podwzgórze	szczur	~0,1	1 w 0,5 $\mu$ l oleju	(20)
O-ODN	VIP	jądro nadskrzyżowaniowe	szczur	~ 0,08	1	(23)
O-ODN	AVP	jądro nadwzrokowe	szczur	~ 0,02	1 w 0,5 $\mu$ l	(8)
O-ODN	NPY	jądro półkieszycowate	szczur	~ 0,2	4 w 0,3 $\mu$ l soli fizjologicznej co 24 h	(2)

W naszych doświadczeniach zdecydowaliśmy się porównać przeżywalność i penetrację w tkance nerwowej znakowanych radioaktywnie analogów asODN: tiofosforanowego S – ODN oraz niemodyfikowanego O – ODN, wstrzykniętych do jądra podstawno-bocznego ciała migdałowatego (28). Stwierdziliśmy, że wnikają w głąb tkanki nerwowej na odległość ok. 1 – 2 mm (O – ODN nieco dalej niż S – ODN). Zastosowanie autoradiografii, z użyciem emulsji fotograficznej, uwiarygodniło radioaktywne asODN zgrupowane w okolicy jąder komórkowych. Niestety, na podstawie otrzymanych obrazów nie można było stwierdzić jakie typy komórek gromadziły asODN oraz w jakim stopniu. Wykazaliśmy również, że dwa testowane analogi S – ODN i O – ODN są metabolizowane w mózgu w różny sposób. O – ODN są szybko (w 1/2 godz.) degradowane do wolnych nukleotydów i produkty degradacji pozostają w tkance. S – ODN pozostawały zachowane w stanie nienaruszonym do 24 godz., choć w ilości zredukowanej do 4% ilości podanej. Wyjaśnienie tego zjawiska wymaga dalszych badań. Można sądzić, że w czasie iniekcji dochodzi do uszkodzenia naczyń krwionośnych mózgu i częściowej przynajmniej degradacji O – ODN przez nukleazy zawarte we krwi. Produkty rozpadu O – ODN, jako nukleotydy, stosunkowo łatwo powinny zostać wprowadzone w szlaki metaboliczne komórki. Z kolei S – ODN, choć niepodatne na nukleazy są zapewne usuwane na drodze krążenia płynu mózgowo-rdzeniowego. Wykazaliśmy również, że po ośmiu godzinach S – ODN zachowują zdolność do hybrydyzacji co jest warunkiem koniecznym do ich działania.

Badania przeprowadzone przez inną grupę pozwoliły na określenie farmakokinetyki asODN podawanych do układu komorowego mózgu (34). W doświadczeniach tych również wykazano zdolność asODN do wnikania do komórek w mózgu, większej podatności na degradację niemodyfikowanych oligonukleotydów oraz zwrócono uwagę na toksyczny efekt wysokich dawek asODN.

#### **4. Mechanizmy działania asODN w ośrodkowym układzie nerwowym**

Stosując asODN w hodowlach dzielących się komórek, niejednokrotnie wykazywano, że działaniu asODN towarzyszy spadek poziomu właściwego mRNA (mechanizmy działania asODN opisane są w 18,27). Uważa się, że w pewnych warunkach asODN mogą aktywować enzym komórkowy RNazę H mogący przeciąć RNA w miejscu utworzonego heterodupleksu asODN i mRNA (32). RNaza H występuje w dzielących się komórkach, gdzie uczestniczy w procesie replikacji DNA, podczas którego hydrolizuje oligorybonukleotydy służące jako startery. RNaza H hydrolizuje w kompleksie RNA-DNA jedynie RNA, zatem jedna cząsteczka ODN wyzwalać może degradację wielu cząsteczek RNA (37).

W OUN dorosłego ssaka komórki nerwowe zasadniczo nie ulegają podziałom, co jak się wydaje, wyklucza udział RNazy H w mechanizmie działania asODN. W istocie, Wahlestedt i współ. (30) donieśli, że podanie asODN do mRNA jednej z podjednostek receptora NMDA nie doprowadziło do obniżenia poziomu tego mRNA, a jedynie białka. Warto jednak podkreślić, że nadmierne

uogólnienia w tej kwestii mogą być zwodnicze, albowiem inni badacze zaobserwowali obniżenie poziomu mRNA dla receptora dopaminowego D<sub>2</sub> po podaniu asODN (33). Należy też zwrócić uwagę, że zastosowanie asODN do hamowania wzrostu guzów nowotworowych układu nerwowego nie napotykałoby na wspomniane ograniczenia.

TABELA 3  
WPLYW asODN NA POZIOMIE DOCELOWEGO mRNA I BIAŁKA

Gen	Sekwencja docelowego mRNA	Poziom mRNA	Obniżenie poziomu białka [%]	Literatura
ATII-R1	+1+15	NT	70; RB	(22)
NPY	-3+15+51+69	NT	50; RIA	(2)
DOR-1	+1+18	NT	25-30; RB	(25)
NPY-Y1-R	+4+21	NT	60; RB	(31)
DOR-1	+7+26	NT	NT	(15)
D2R	+4+22	NT	50-72; RB	(35)
D2R	-10+10	obniżenie o 30%; ISH	15-23; IHC	(33)
NMDA-R1	+4+21	bez zmiany	20; RB	(30)
PR	-6+9	NT	IHC	(20)
ER	-6+9	NT	NT	(17)
PR	-3+15	NT	NT	(21)
c-fos	-6+9	NT	IHC	(6,7,24)
c-fos	-6+9	NT	NT	(14)
c-fos	-8+12	NT	IHC	(10)

NT — nie badano; RB — wiązanie do receptora; RIA — radioimmunoassay; IHC — immunohistochemia; ISH — *in situ* hybrydyzacja; +1 pierwszy nukleotyd kodonu startowego.

Z danych zawartych w tab. 3 wynika, że skuteczne zablokowanie ekspresji wielu genów w OUN osiągnięto stosując asODN komplementarne do sekwencji zawierającej kodon startowy. W takich przypadkach asODN mogły blokować rozpoczęcie translacji (ang. *translational arrest*). Wymaga to jednak potwierdzenia doświadczalnego.

## 5. Efekty uboczne asODN stosowanych w ośrodkowym układzie nerwowym

Istotnym zagadnieniem jest swoistość działania asODN. Przykładem może być seria prac przeprowadzona nad blokowaniem genu *c-fos*, kodującego czynnik transkrypcyjny. Chiasson i współ. (6) stwierdzili początkowo, że 15-mer S-ODN o sekwencji komplementarnej do obszaru zawierającego w środku kodon startowy mRNA *c-fos* (dawki nanomolarne), podany do prądkowia może skutecznie zablokować możliwość indukcji immunoreaktywności białka *c-Fos* przez amfetaminę. Taki sam asODN został następnie iniektowany przez Heiliga

i współ. (14) do jądra pólężącego (obserwowano zmiany zachowań lokomotorycznych wywoływanych kokainą) oraz przez Sommera i współ. (24) w celu czynnościowego zablokowania prążkowie. Wydawało się, że prace te wnoszą bardzo istotne informacje na temat biologicznej roli białka c - Fos. W przeprowadzonych kolejnych badaniach okazało się jednak, że nie tylko ekspresja białka c - Fos ulegała zablokowaniu przez badany asODN. Podobny efekt obserwowano również w przypadku białka Jun B, a nie ma powodów aby sądzić, że ekspresja tego drugiego mogłaby być regulowana przez c - Fos w opisywanym układzie doświadczalnym. Wskazuje to zatem na nieswoisty wpływ badanego asODN na różne geny. Częściowe wytłumaczenie tego zjawiska mogą przynieść nasze ostatnie badania (38). Zauważyliśmy, że podanie S - ODN w nanomolarnych dawkach wywołuje zaburzenie aktywności elektrycznej komórek ziarnistych zakrętu zębatego hipokampa. Efekt ten jest niezależny od sekwencji nukleotydowej asODN. Na podstawie innych doświadczeń wynika, że infuzja z szybkością 1  $\mu\text{l/h}$  roztworu S - ODN o stężeniu  $> 3 \text{ mM}$  powoduje śmierć zwierząt po 24 godzinach (34).

Możliwe efekty uboczne asODN — zob. zestawienie. Wykazano, że asODN

ZESTAWIENIE  
EFEKTY UBOCZNE asODN

**1. Zahamowanie aktywności enzymów**

(badane w hodowlach komórkowych i systemach bezkomórkowych):

PKC  $\beta 1$  [kinaza białkowa C] (26)

IC<sub>50</sub> dla O - ODN (C28) wynosi 100  $\mu\text{M}$

IC<sub>50</sub> dla S - ODN (C28) wynosi 1  $\mu\text{M}$

PLA<sub>2</sub> [fosfolipaza A2] (3)

specyficzne zahamowanie przez S - ODN

Polimerazy DNA  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  (9)

RNazy H1 i H2 (9)

S - ODN są silniejszymi inhibitorami niż O - ODN czy EC - ODN

RT [odwrotna transkryptaza] (13)

zahamowanie jest niezależne od sekwencji

trombina (4)

zahamowanie jest zależne od sekwencji ODN.

**2. Zahamowanie syntezy innych białek:**

jun B (7).

**3. Przypadkowe zahamowanie ekspresji nieznanego genu.**

BB1 (19).

**4. Zahamowanie translacji z nici antysensowej przez sensowe ODN?**

**5. Zahamowanie transkrypcji genu docelowego przez asODN i sODN?**

są inhibitorami wielu enzymów i efekt ten może być zależny lub nie od sekwencji nukleotydowej. Istotną kwestią jest opracowanie właściwych procedur kontrolnych. Powszechnie stosowane są jako kontrolne ODN o sekwencji sensowej. Wiąże się to z możliwością zahamowania translacji z antysensowej nici. Wpływ oligonukleotydów na transkrypcję również nie jest wyjaśniony (hybrydyzacja z pojedynczą, rozplecioną nicią DNA). Opisano także w pełni swoiste zahamowanie ekspresji nie znanego dotąd genu przez kontrolne oligonukleotydy. Na uwagę zasługuje propozycja użycia jako kontroli ODN różniących się zaledwie kilkoma celowanymi mutacjami od właściwego asODN, a także potrzeba zastosowania kilku odmiennych asODN skierowanych przeciwko różnym obszarom mRNA docelowego w oczekiwaniu na zbliżony jakościowo efekt biologiczny (29,39).

## 6. Podsumowanie

Pierwsza publikacja o zastosowaniu asODN do blokowania ekspresji genów w mózgu pochodzi zaledwie sprzed 2 lat (grudzień 1992 r.) (6). Od tego czasu ukazało się ok. 20 prac na ten temat. Witane są one z ogromnym zainteresowaniem nie tylko przez neurobiologów, ale także przez klinicystów (12). Trzeba jednak stwierdzić, że nadal wiele pozostaje do wyjaśnienia, zanim asODN staną się wiarygodnym narzędziem badawczym czy terapeutycznym. Szczególnie istotne jest zrozumienie rozbieżności w stosowanych procedurach, zwłaszcza w zakresie dawek, poznanie mechanizmów działania, a także wyjaśnienie toksyczności antysensowych oligonukleotydów w ośrodkowym układzie nerwowym.

Praca wsparta była finansowo z grantu KBN nr 0421 P2 9304. Autorzy wyrażają podziękowania lek. med. Michałowi Hetmanowi i mgr Dorocie Nowickiej za krytyczne przeczytanie pracy.

## Literatura

1. Agrawal S., Tamsamani J., Tang J. Y., (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 7595 - 7599.
2. Akabayashii A., Wahlestedt C., Alexander J. T., Leibowitz S. F., (1994), Molec. Brain. Res., 21, 55 - 61.
3. Bennet C. F., (1993), *Antisense Research and Applications*, Eds. Crooke S. T., Lebleu B., CRC Press, Ann Arbor, 548 - 559.
4. Bock L., Griffin L. C., Latham J. A., Veramass E. H., Toole J. J., (1992), Nature, 355, 1992 - 1996.
5. Branda R. F., Moore A. L., Mathews L., McCormac J. J., Zon G., (1993), Biochem. Pharmacol., 45, 2037 - 2043.
6. Chiasson B. J., Hooper M. L., Murphy P. R., Robertson H. A., (1992), Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol. Sect., 227, 451 - 453.
7. Dragunow M., Lawlor P., Chiasson B., Robertson H., (1993), Neuroreport, 5, 305 - 306.
8. Flanagan L. M., McCarthy M. M., Brooks P. J., Pfaff D. W., McEwen B. S., (1992), Society for Neuroscience Abstracts, 18, 481.

9. Gao W. I., Han F. S., Storm C., Egan W., Cheng Y. C., (1992), *Molec. Pharmacol.*, 41, 223 - 229.
10. Gillardon F., Beck H., Uhlmann E., Herdegen T., Sandkuhler J., Peyman A., Zimmerman M., (1994), *Eur. J. Neurosci.*, 6, 880 - 884.
11. Gyurko R., Wielbo D., Philips M. I., (1993), *Regulatory Peptides*, 49, 167 - 174.
12. Harrison P., (1993), *Lancet*, 342, 254 - 255.
13. Hatta T., Kim S. G., Nakashima H., Yamamoto N., Sakamoto K., Yokoyama S., Takaku H., (1993), *FEBS Lett.*, 330, 161 - 164.
14. Heilig M., Engel J. A., Soderpalm B., (1993), *Eur. J. Pharmacol.*, 236, 339 - 340.
15. Lai J., Bilsky E. J., Rothman R. B., Porreca F., (1994), *NeuroReport*, 5, 1049 - 1052.
16. Iversen P., (1993), *Antisense Research and Applications*, Eds. Crooke S. T., Lebleu B., CRC Press, Ann Arbor, 461 - 469.
17. McCarthy M., Schlenker E. H., Pfaff D. W., (1993), *Endocrinology*, 133, 433 - 439.
18. Mirabelli C. H., Crooke S. T., (1993), *Antisense Research and Applications*, Eds. Crooke S. T., Lebleu B., CRC Press, Ann Arbor, 7-36.
19. Moats-Staats B. M., Jarvis W. H., D'Ercole J., Stiles A., (1994), *Molec. Cell. Biol.*, 14, 2936 - 2945.
20. Ogawa S., Olazabal U. E., Parhar I. S., Pfaff D. W., (1994), *J. Neurosci.*, 14, 1766 - 1774.
21. Pollio G., Xue P., Zanisi M., Nicolini A., Maggi A., (1993), *Mol. Brain Res.*, 19, 135 - 139.
22. Sakai R. R., He P. F., Yang L. Y., Guo Y. F., Reilly J. J., Moga C. N., Fluharty S. J., (1994), *J. Neurochem.*, 62, 2053 - 2056.
23. Scarbrough K., Wise P. M., (1992,) *Society for Neuroscience Abstracts*, 18, 2.
24. Sommer W., Bjelke B., Ganten D., Fuxe K., (1993), *Neuroreport*, 5, 277 - 280.
25. Standifer K. M., Chien C. C., Wahlestedt C., Brown G. P., Pasternak G. W., (1994), *Neuron*, 12, 805 - 810.
26. Stein C. A., Tonkinson J. L., Zhang L. M., Yakubow L., Gervasoni J., Aub R., Rotenberg S. A., (1993), *Biochemistry*, 32, 4855 - 4861.
27. Szklarczyk A., (1994), *Postępy Biochemii*, 40, 166 - 174.
28. Szklarczyk A., Kaczmarek L., (1994), *J. Neurosci. Methods* (wysłane do druku).
29. Wahlestedt C., (1994), *Trends Pharmacol. Sciences*, 15, 42 - 46.
30. Wahlestedt C., Golanov E., Yamamoto S., Yee F., Ericson H., Yoo H., Inturrist C. E., Reis D., (1993), *Nature*, 363, 260 - 263.
31. Wahlestedt C., Pich E. M., Koob G. F., Yee F., Heilig M., (1993), *Sciences*, 259, 528 - 531.
32. Walder R. Y., Walder J. A., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 5011 - 5015.
33. Weiss B., Zhou W., Zhang P., Qin Z. H., (1993), *Neuroscience*, 55, 607 - 612.
34. Whitesell L., Geselowitz D., Chavany C., Fahmy B., Walbridge S., Alger J. R., Neckers L. M., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 4665 - 4669.
35. Zhang M., Creese I., (1993), *Neurosci. Lett.*, 161, 223 - 226.
36. Castro-Alamancos M. A., Torres-Aleman I., (1993), 16 Annual Meeting of ENA, Madryt, 18 - 21 IX.
37. Shuttleworth J., Colman A., (1988), *EMBO J.*, 7, 427 - 434.
38. Szklarczyk A., Błaszczak J., Kaczmarek L., (1994), dane nie publikowane.
39. Saxena S. K., Ackerman E. J., (1990), *J. Biol. Chem.*, 265, 3263 - 3269.



**Antisense oligonucleotides as a tool to study gene expression in the brain****Summary**

Antisense oligonucleotides (asODN) have recently been used to block specific gene expression in the rodent brain. Their targets include subunits of receptors for neurotransmitters, neuro-peptides and transcription factors, i.e. those proteins, whose other blockers are not known. Successful applications of the asODN require good understanding of their pharmacokinetics, mechanisms of action and side effects in the brain. Unfortunately, very little is known in this regard. Both intraventricular and intrastructure route of administration of phosphodiester (O - ODN) and phosphorothioate (S - ODN) ODN to the brain were effectively employed. However, doses used, even in the case of the same analog, differ up to two orders of magnitude. Since translation arrest is believed to be an effective mechanism of ODN activity in the brain, most of the authors target the ODN to the mRNA region including the translation codon, but there are almost no studies of the target mRNA levels. The paper reviews the recent development in this field, offering critical evaluation of the data.

**Key words:**

antisense oligonucleotides, gene expression, brain.

*Adres dla korespondencji:*

Arkadiusz Szklarczyk, Leszek Kaczmarek, Pracownia Hodowli Komórek i Tkanki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. L. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; E-mail: Leszek@Nencki. Gov. Pl.