

Received: 2009.09.29
Accepted: 2010.08.11
Published: 2010.11.30

Białka MCM i ich rola w proliferacji komórek i procesie nowotworowym

The role of MCM proteins in cell proliferation and tumorigenesis

Katarzyna Nowińska¹, Piotr Dziegiel^{1,2}

¹ Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

² Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego Poznań

Streszczenie

Rodzina białek MCM (minichromosome maintenance proteins) została po raz pierwszy zidentyfikowana w komórkach drożdży, *Saccharomyces cerevisiae*. MCM to konserwatywne białka, które występują u wszystkich organizmów eukariotycznych. Grupa obejmuje białka MCM 2-9, które charakteryzują się obecnością domeny ATP-az (MCM box), a także dwa dodatkowe białka: MCM 1 i MCM 10, które uczestniczą w replikacji DNA, lecz nie mają tej domeny. MCM 2-9 natomiast mają charakterystyczną domenę MCM. Podstawową funkcją jaką białka MCM pełnią w komórce jest współdziałanie w molekularnym mechanizmie tworzenia widełek replikacyjnych i regulacji syntezy DNA. MCM tworzą kompleks o kształcie pierścienia. Nabywa on aktywność w obecności dodatkowych czynników. MCM 2-7 są jednym ze składników kompleksu prereplikacyjnego. Dołączenie się kompleksu MCM 2-7 do miejsca inicjacji replikacji zapoczątkowuje powstawanie widełek replikacyjnych. Białka MCM odgrywają także rolę w utrzymywaniu integralności genomu, zapobiegając ponownej duplikacji fragmentów DNA w tym samym cyklu komórki. W komórkach proliferujących MCM jest znaczna ilość, nie wykrywa się ich w komórkach w stanie spoczynku, różnicowania i starzenia się. Mogą więc służyć jako potencjalne markery proliferacji komórek. Ostatnie badania wskazują na przydatność białek MCM do oceny nasilenia stopnia proliferacji komórek nowotworowych, ze względu na obserwację ich wzmożonej ekspresji w komórkach różnych typów guzów. Praca jest próbą przedstawienia stanu aktualnej wiedzy na temat udziału białek MCM w syntezie DNA, a także potencjalnych możliwości wykorzystania ich jako markerów proliferacji komórek nowotworowych.

Słowa kluczowe:

białka MCM • replikacja DNA • komórki nowotworowe

Summary

The MCM (minichromosome maintenance protein) protein family was identified for the first time in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. The subgroup consists of MCM proteins 2-9, that possess the characteristic ATPase domain (MCM box). There are also MCM1 and MCM10, which are important in DNA replication, but they do not possess the specific MCM box. The main function of MCM proteins is cooperation with other factors in molecular mechanisms that form the replication fork and in regulation of DNA synthesis. MCM proteins form a ring-shaped complex, which is activated when other factors are bound. MCM 2-7 complex is one of the pre-replication factors. Association of MCM 2-7 complex is a crucial moment initiating the replication fork. MCM proteins play a role in maintaining genome integrity and prevent re-replication once per cell cycle. Proliferating cells have high levels of MCM, whereas they are not detected in quiescent, differentiated or senescent cells. They are also potential useful markers of

cell proliferation. Recent studies suggested that MCMs are good markers of proliferation activity degree, because they are highly expressed in a variety of tumors. The aim of this work is to summarize current knowledge about the role of MCM proteins in DNA replication and potential diagnostic markers of proliferating cancer cells.

Key words: MCM proteins • DNA replication • cancer cell

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=924430>

Word count: 3716

Tables: –

Figures: 2

References: 75

Adres autorki: mgr Katarzyna Nowińska, Zakład Histologii i Embriologii Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, ul. Chałubińskiego 6a, 50-368 Wrocław; kasiap@hist.am.wroc.pl

Wykaz skrótów: **AAA+** – rodzina ATP-az (ATPases associated with various cellular activities); **Cdc6** – białko 6 cyklu podziałowego komórki (cell division cycle 6); **CDK** – kinazy zależne od cyklin (cyclin dependent kinases); **Cdt1** – czynnik 1 licencjonujący replikację DNA (chromatin licensing and DNA replication factor 1); **CMG** – kompleks Cdc45-MCM-GINS; **DDK** – kompleks białka Dbf4 i Cdc7; **GINS** – kompleks białek Sld5-Psf1-Psf2-Psf3 (Go-Ichi-Nii-San); **HPV** – wirus brodawczaka ludzkiego (human papilloma virus); **HR-HPV** – wirus brodawczaka ludzkiego z grupy wysokiego ryzyka (high risk – human papilloma virus); **MCM** – białka licencjonujące replikację (minichromosome maintenance proteins); **MCM 2-7** – kompleks MCM 2-MCM 3-MCM 4-MCM 5-MCM 6-MCM 7; **NLS** – sygnał warunkujący import do jądra (nuclear localization signal); **NTP** – trifosforany nukleotydów (nucleotide triphosphate); **ORC** – kompleks naznaczający miejsca inicjacji replikacji (origin recognition complex of proteins); **PCNA** – jądrowy antygen komórek proliferujących (proliferation cell nuclear antygen); **pRB** – białko retinoblastoma (retinoblastoma protein); **Pre-IC** – kompleks preinicjujący (preinitiation complex); **Pre-RC** – kompleks przedreplikacyjny (prereplication complex).

WSTĘP

Ciągle poszerzana wiedza na temat molekularnych mechanizmów regulujących proliferację komórkową może być przydatna do wykrywania złośliwych zmian w różnych narządach ludzkich. Białka regulujące proliferację komórkową są użyteczne jako markery, uwidoczniające stopień aktywności wzrostu guza. Badania nad wykorzystaniem tych białek są prowadzone dlatego, że w komórkach nowotworowych wiele mechanizmów regulujących proliferację zostaje zaburzonych. Obserwowany jest wzrost ilości białek regulacyjnych oraz podwyższenie poziomu ekspresji kodujących je genów. Wzrost ekspresji genów odpowiedzialnych za regulację proliferacji komórkowej w guzach nowotworowych, jest związany z gorszym rokowaniem dla chorych. Najczęściej używanymi i klasycznymi markerami proliferacji komórkowej są białka Ki-67 i PCNA [26,73].

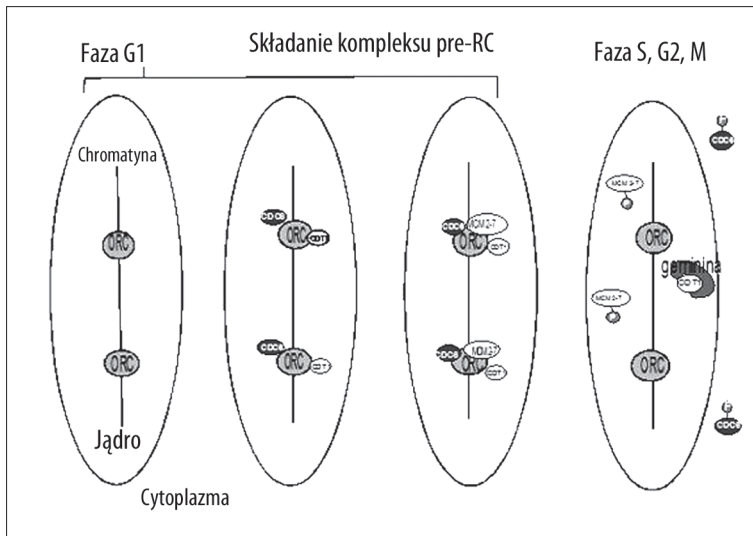
Przez ostatnie lata bardzo intensywnie badano i poznawano dokładny mechanizm regulacji syntezy DNA. Molekularne mechanizmy regulujące replikację DNA komórek ludzkich wymagają współdziałania wielu komponentów. Składnikami „niezbędnej maszynarii” są białka, mające za zadanie zainicjować proces duplikacji DNA. Mogą one być potencjalnymi markerami proliferujących komórek. Ponadto mogą także uwidoczniać te komórki, które mają potencjał do replikacji, natomiast ich materiał genetyczny nie

został jeszcze zduplikowany. Jednymi z takich czynników są białka z rodziny MCM (białka licencjonujące replikację, minichromosome maintenance proteins), których funkcja i przydatność jako nowych markerów proliferacji komórkowej była intensywnie badana przez ostatnie lata [6].

RODZINA BIAŁEK MCM 2-9

Do rodziny MCM zalicza się obecnie osiem białek: MCM 2-9. Najpóźniej odkryto MCM 8 i MCM 9. Znane są także MCM 1 i MCM 10, które uczestniczą w replikacji DNA, lecz nie mają swoistej dla grupy MCM domeny NTP-az [38]. Rodzinę białek MCM zidentyfikowano po raz pierwszy w komórkach drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*). Badania wykazały, że MCM 2-9 to bardzo konserwatywne białka, których ekspresja zachodzi u wszystkich organizmów eukariotycznych. Wyższe eukarionty zawierają homologiczne do drożdży białka MCM, które wchodziły w skład kompleksu MCM 2-7 [14,29].

Grupę tych białek wyodrębniono na podstawie funkcji, jaką pełnią w komórce, budowy łańcucha białkowego i obecności charakterystycznej dla nich domeny MCM. Każde z białek MCM należy do szerszej rodziny AAA+, czyli ATP-az, pełniących różne funkcje w komórce (NTP-azy/helikazy) [67]. Swoista domena MCM zawiera motywy charakterystyczne dla ATP-az: Walker A i Walker



Ryc. 1. Czynniki regulujące przyłączenie się kompleksu MCM 2-7 do chromatyny; (A) Faza G1- kompleks ORC jest związany z chromatyną w miejscach inicjacji replikacji. (B) Przyłączenie białek CDT1 i CDC6. (C) związanie się kompleksu MCM 2-7 z chromatyną. Przyłączenie się czynników powoduje utworzenie kompleksu pre-RC i przejście komórki do fazy replikacji DNA. (D) Faza S, G2 i M – po wejściu w fazę S kompleks pre-RC ulega rozkładowi. Duże stężenie cykliny A-CDK2 powoduje ufosforylowanie kompleksu MCM 2-7 i białka CDC6 i ich oddysocjonowanie od chromatyny. CDC6 jest transportowane z jądra do cytoplazmy. CDT1 jest degradowane przez proteolizę lub unieczynnione przez związanie gemininy - inhibitora replikacji DNA (wg [22] zmodyfikowano)

B (w rodzinie ATP-az stanowią one domenę AAA). Te dwa obszary umożliwiają wiązanie i hydrolizę cząsteczek ATP. W grupie białek MCM motywy Walker A i Walter B różnią się od klasycznych pojedynczymi aminokwasami. W domenie MCM występuje także motyw „palca argininowego” [19,69].

Białka MCM biorą udział w wielu procesach komórkowych. Uważa się, że są one niezbędne do rozpoczęcia syntezy DNA oraz zapobiegają zajściu ponownej replikacji podczas trwania tego samego cyklu komórki. Są to czynniki, które inicjują i limitują replikację DNA w komórkach eukariotycznych [5]. Obecność MCM umożliwia inicjację replikacji i wydłużanie nowo powstających cząsteczek DNA. Obecnie wiadomo, że biorą one udział w powstawaniu widełek replikacyjnych. Mechanizm działania białek MCM nie został dobrze poznany, mimo ich istotnej roli w komórce [42].

Poszczególne białka MCM mają dodatkowe funkcje. Uczestniczą w reorganizacji struktury chromatyny, utrzymaniu stabilności genomu, odpowiedzi komórkowej związanej z punktami kontrolnymi cyklu komórkowego oraz pomagają w regulacji transkrypcji. Przypuszcza się, że wybrane białka MCM mogą brać także udział w procesie kancerogenezy [29,43].

Białka MCM biorą udział w procesie syntezy DNA. Tworzą one kompleks zbudowany z sześciu podjednostek, w skład którego wchodzi MCM 2, 3, 4, 5, 6, 7 [29]. Heteroheksamer (MCM 2-7) o kształcie pierścienia jest nieaktywną helikazą DNA, która w obecności dodatkowych czynników nabywa zdolność przyłączania się do miejsca inicjacji replikacji i rozplatania podwójnej helisy DNA. Powstanie pojedynczych nici DNA z podwójnej helisy jest reakcją zależną od energii. Reakcja katalizowana jest przez enzymy – helikazy. Enzymy te są białkami motorycznymi, które czerpią energię z hydrolizy NTP (trifosforany nukleotydów), aby przemieścić jedną nić DNA w stosunku do komplementarnej nici [69]. Wiadomo, że kompleks MCM 2-7 *in vitro* nie wykazuje aktywności helikazowej. Natomiast rdzeń (MCM 4, 6, 7) w warunkach *in vitro* ma słabą aktywność helikazową, która jest hamowana przez podjednostki MCM 2, 3 i 5. W kompleksie prereplikacyjnym formuje się rdzeń

– katalityczne centrum, które jest zbudowane z podjednostek: MCM 4, MCM 6 i MCM 7. Centrum katalityczne odpowiada za aktywność helikazową kompleksu. Pozostałe MCM 2, MCM 3 i MCM 5 prawdopodobnie są podjednostkami regulacyjnymi helikazy MCM 2-7 [29,42,69].

ROLA BIAŁEK MCM W PROCESIE REPLIKACJI DNA KOMÓRKI

Replikacja chromosomalnego DNA w komórkach eukariotycznych to proces kontrolowany przez liczne czynniki [14]. Synteza DNA zależy od kompleksów składających się z wielu białek, które są dołączane do miejsc inicjacji replikacji w dwóch etapach [2].

Pierwszym etapem inicjacji replikacji jest formowanie się pre-RC (kompleksu pre-replikacyjnego). Komponenty pre-RC są przyłączane do chromatyny. W skład tego kompleksu wchodzi m.in. heteroheksamer MCM 2-7. Nieaktywny heteroheksamer MCM 2-7 jest dołączany do pre-RC na końcu mitozy i początku fazy G1 [32]. Jest on wyłapywany z macierzy jądrowej i przyłączany w miejscach inicjacji replikacji [19]. Czynniki, które wpływają na przyłączanie się go do chromatyny przedstawiono na ryc. 1. Obszary, w których zaczyna się synteza nowych cząsteczek DNA są oznaczone kompleksami białek ORC (origin recognition complex of proteins). Przyłączają się one jako pierwsze do miejsc inicjacji replikacji i stanowią „platformę”, na której umieszczane są kolejne komponenty [6]. Podczas przejścia komórki z fazy spoczynkowej G0 do fazy G1 (przygotowującej do replikacji DNA), do ORC dołączane są białka Cdc6 i Cdt1 [22,34,38]. Te dwa czynniki są odpowiedzialne za przyłączenie gotowego kompleksu MCM 2-7 [20]. Prawdopodobnie Cdc6 i Cdt1 powodują otwarcie się pierścienia heksameru MCM 2-7 i zaciskanie się go dookoła nici DNA [6].

Drugim etapem przygotowania do replikacji DNA jest uaktywnienie kompleksu MCM 2-7. Sposób, w jaki dochodzi do mobilizacji MCM 2-7 i przekształcenia go w aktywną helikazę, nie został jeszcze w pełni wyjaśniony [38]. Obecnie uważa się, że kompleks MCM 2-7 jest przekształcany w część składową aktywnej helikazy poprzez modyfikacje potranslacyjne, takie jak fosforylacja jego poszczególnych podjednostek [1,22]. Do zmiany konformacji oraz

aktywacji MCM 2-7 dochodzi pod wpływem połączonego działania kinazy DDK oraz kinazy CDK [20].

Ostatnie doniesienia wskazują na istnienie zespołu białek CMG, który ma aktywność helikazową. Odpowiada on za rozplatanie DNA i jest częścią widełek replikacyjnych [42,51]. CMG składa się z: MCM 2-7, Cdc45 i GINS (nazwa pochodzi od liczebników japońskich, Go, Ichi, Nii, San) [3]. Modyfikacje powstające pod wpływem działania kinaz umożliwiają połączenie się poszczególnych składników kompleksu CMG. Wiadomo, że kinaza DDK (Dbf4 - Cdc7) fosforyluje podjednostkę MCM 4 i MCM 2 ułatwiając przyłączenie się Cdc45 i kompleksu GINS [2,67]. Uważa się, że zdolność do rozplatania DNA przez MCM 2-7 przejawia się jedynie w obecności Cdc45 i kompleksu GINS. Są to niezbędne kofaktory MCM 2-7, które prawdopodobnie odpowiadają za stabilizację jego połączenia z chromatyną oraz przesuwanie się powstających widełek replikacyjnych [1,3,42]. Czynniki Cdc45 wpływa także na asocjacje polimerazy DNA α do miejsca inicjacji replikacji oraz zaznacza przejście kompleksu pre-RC w pre-IC, czyli zespół białek inicjujących [39].

ROLA BIAŁEK MCM W ZACHOWANIU STABILNOŚCI GENOMU

Istotą replikacji DNA jest precyzyjne powielenie genomu komórki. Genom komórki powinien być zduplikowany jedynie raz w ciągu cyklu komórkowego. Ludzki genom nie jest jedną ciągłą nicią DNA, lecz jest podzielony na 46 chromosomów (w diploidalnej komórce). Każdy z chromosomów zawiera tysiące miejsc inicjacji replikacji. W komórce niezbędny jest system kontroli replisomów, aby mogła ona zachować integralność genomu [64]. Zaburzenia w procesie syntezy DNA prowadzą do niestabilności genomu oraz transformacji nowotworowej komórek. Wielokrotne zduplikowanie DNA może być przyczyną amplifikacji genów. Niebezpieczne dla komórki może być również pominięcie podczas replikacji pewnej części DNA, np. wybranego genu supresorowego. Taki błąd może doprowadzić również do zapoczątkowania procesu transformacji nowotworowej komórek [44,64].

Konserwatywne mechanizmy zapobiegają ponownej replikacji DNA w czasie trwania jednego cyklu komórkowego. W komórce występuje mechanizm pozytywnej kontroli – licencjonowania replikacji. Regulacja pozytywna odbywa się poprzez naznaczenie miejsca inicjacji replikacji przez komponenty kompleksu pre-RC, m.in. MCM 2-7. Duplikacja DNA zachodzi jedynie wtedy, gdy w komórce zasocjują się składniki pre-RC i powstaną widełki replikacyjne.

W komórce istnieją także mechanizmy represjonujące – regulacja negatywna. Zabezpieczają one przed duplikacją fragmentów DNA, które zostały już wcześniej powielone. Są przynajmniej trzy takie mechanizmy, zapobiegające zjawisku ponownej replikacji w komórkach eukariotycznych [7]. Pierwszy to utrzymywanie dużego stężenia cykliny A-CDK2, która działa na białka MCM podczas fazy G1. CDK powodują inaktywację tych białek oraz ich przemieszczenie poza macierz jądrową [39,46]. Drugi mechanizm to destabilizacja połączenia białek regulatorowych i chromatyny [39].

Trzeci mechanizm represji jest charakterystyczny dla wyższych eukariotów. Jest to represja poprzez inhibitor

replikacji DNA – gemininę (geminin) [31,75]. Blokują ona aktywność czynnika Cdt1 i powoduje dysocjację MCM 2-7 od chromatyny (ryc. 1D) [39,41]. W komórkach drożdży dołączanie Cdc6 do ORC pobudza wiązanie MCM 2-7 z chromatyną. Wskazuje to, że aby MCM 2-7 utworzyły połączenie, niezbędne jest utworzenie ATP-azy poprzez związanie Cdc6 do ORC. Natomiast czynnik Cdt1 służy jako ogniwo łączące MCM 2-7 i ATP-azę ORC- Cdc6 [57]. Dysregulacja ekspresji Cdc6, Cdt1 i gemininy może prowadzić do amplifikacji genów. Cdc6 i Cdt1 są dlatego potencjalnie ważnymi onkogenami, które podobnie jak MCM 2-7 są pod kontrolą czynnika transkrypcyjnego E2F [6,22].

Kompleks MCM 2-7 stopniowo oddysocjowuje od chromatyny w miarę postępowania fazy S. Odłączenie się go wraz z czynnikiem Cdc6 zabezpiecza komórkę przed ponownym replikowaniem DNA w tym samym cyklu [26]. Natomiast czynnik Cdt1 jest unieczynniony przez gemininę [38,39].

KONTROLA EKSPRESJI GENÓW MCM

W komórkach ssaków mechanizm transkrypcji genów *MCM* odgrywa ważną rolę w regulacji aktywności białek MCM [50]. Ekspresja genów *MCM* jest regulowana przez czynniki transkrypcyjne E2F (E2F1, E2F2, E2F3) [35]. Analiza sekwencji DNA genu *MCM 5* wykazała istnienie motywu, który jest potencjalnym miejscem wiążącym czynnik transkrypcyjny z rodziny E2F. Czynniki te regulują transkrypcję genów *MCM* w fazie G1 i podczas przejścia do fazy S [26]. Po pobudzeniu komórki do wyjścia z fazy G0, obserwuje się gwałtowny wzrost stężenia mRNA i białka MCM na granicy faz G1-S [68]. Ekspresja genów *MCM* jest regulowana nie tylko przez czynniki transkrypcyjne, ale także przez stymulację wzrostu komórki egzogennymi czynnikami wzrostu [50]. Według Leone i wsp. [35] geny *MCM* można podzielić na dwie grupy. Pierwsza to geny kodujące *MCM 4*, *MCM 5*, *MCM 7*, które są regulowane jedynie przez stymulację wzrostu komórki. Natomiast ekspresja drugiej grupy genów, kodujących *MCM 2* i *MCM 6* (podobnie jak genów kodujących PCNA, Cdk2, Cdc6 i cyklinę E), jest kontrolowana przez czynniki cyklu komórkowego oraz dodatkowo poprzez stymulację wzrostu komórki [35]. Istnieją dowody na to, że niektóre geny *MCM* są intensywniej przepisywane podczas fazy G1 i S w dzielących się komórkach. Mimo to w wielu badaniach wykazano, że poziom ekspresji białek MCM nie zmienia się podczas cyklu komórkowego [45]. Białka te występują w komórce w dużej ilości. Podczas trwania fazy S tylko część z nich jest połączona z chromatyną [19].

Goodwin i wsp. [23] udowodnili, że onkoproteina E7 wirusa HPV łączy się z hiperfosforylowanym białkiem pRb i przez to destabilizuje kompleks pRb/E2F oraz powiązanych białek p107 i p130 [58]. Uwolnienie czynnika transkrypcyjnego E2F, od którego zależna jest transkrypcja m.in. genów *MCM*, powoduje zwiększenie ekspresji tych białek [35,36].

CHARAKTERYSTYKA BIAŁEK Z RODZINY MCM

Białka *MCM 1* i *MCM 10* nie są zaliczane do rodziny MCM, ponieważ nie mają wyżej opisanej domeny MCM. Są bardzo konserwatywne i występują u wyższych eukariotów [38]. Białko MCM 1 należy do rodziny czynników

transkrypcyjnych MADS. Regulują one ekspresję genów poprzez oddziaływania z kofaktorami, łączącymi się z różnymi sekwencjami DNA. Białko MCM 1 wpływa na replikację, bezpośrednio łącząc się z miejscami inicjacji replikacji oraz pośrednio poprzez regulację ekspresji czynników kompleksu pre-RC, takich jak Cdc6 i MCM 2-7 [18]. Natomiast MCM 10 wydaje się bezpośrednio związane z przyłączeniem polimerazy DNA α /prymazy do chromatyny i stabilizowaniem tego połączenia [54].

Białko **MCM 2** jest jedną z podjednostek regulujących aktywność kompleksu MCM 2-7 [42]. Ekspresja białka MCM 2 jest intensywnie badana w różnych nowotworach. Większość badań potwierdza podwyższenie stężenia tego białka w komórkach guzów nowotworowych. Ponadto badano również korelację MCM 2 i Ki-67. Stężenie białka MCM 2 w komórce koreluje z ekspresją cycliny A [10]. Podwyższone stężenie MCM 2 wykryto m.in. w raku kory nadnerczy [61], okrężnicy [21], żołądka [66].

Nie udowodniono związku MCM 2 z przeżywalnością chorych [10,53]. MCM 2 jest jednak uznawane za czynnik związany z niekorzystnym rokowaniem u chorych z inwazyjnym rakiem piersi [53].

MCM 3 – tylko MCM 2 i MCM 3 mają domenę NLS, która wskazuje na ich jądrowe umiejscowienie [19]. Ponadto białko MCM 3 może ulegać potranslacyjnej modyfikacji, ponieważ ma motyw homologiczny do miejsca wiążącego acetylotransferazę w acetylo-CoA [19,33]. Takei i wsp. [65] zaobserwowali istnienie acetylotransferazy MCM3AP, która działa na białko MCM 3. Wydaje się, że MCM 3 po modyfikacji hamuje przejście komórki do fazy S [33,65].

Wykryto także m.in. korelację między ekspresją białka MCM 3 i stopniem złośliwości gruczolakoraków sutka oraz włókniakomięsaków tkanek miękkich u psów [48].

MCM 4 to białko, jako jedyne z rodziny MCM, ma w łańcuchu peptydowym na N-końcu domenę wiążącą CDK [19]. Jest fosforylowane przez kinazę DDK, co powoduje zmianę jego właściwości. Po ufosforylowaniu wiąże ono czynnik Cdc45, który uaktywnia właściwości helikazowe kompleksu MCM 2-7 [2].

MCM 5 i Cdc6 wydają się swoistymi markerami proliferacji komórkowej. W komórkach w fazie spoczynku lub różnicowania kompleks MCM 5 – Cdc6 nie jest aktywny. Kompleks replikacyjny ulega rozkładowi w trakcie trwania syntezy DNA, aby zapobiec ponownej amplifikacji [72]. W dysplastycznych komórkach szyjki macicy MCM 5 – Cdc6 jest stale aktywny. Nadekspresję MCM 5 – Cdc6 stwierdza się w komórkach transformowanych wirusem HR-HPV, które znajdują się w fazie S (replikacja DNA) [74]. Ekspresja białka MCM 5, badana metodami immunohistochemicznymi, jest podwyższona w komórkach dysplastycznych i nowotworowych. Potwierdziły to także badania ekspresji mRNA *MCM 5* [44]. Prawdopodobnie w przyszłości dzięki badaniom immunohistochemicznym z wykorzystaniem swoistych przeciwciał anty MCM 5 można będzie odzwierciedlić nasilenie stopnia dysplazji komórek [36].

MCM 7, ze względu na budowę biochemiczną i interakcje z różnymi czynnikami, ma dodatkowe funkcje. MCM

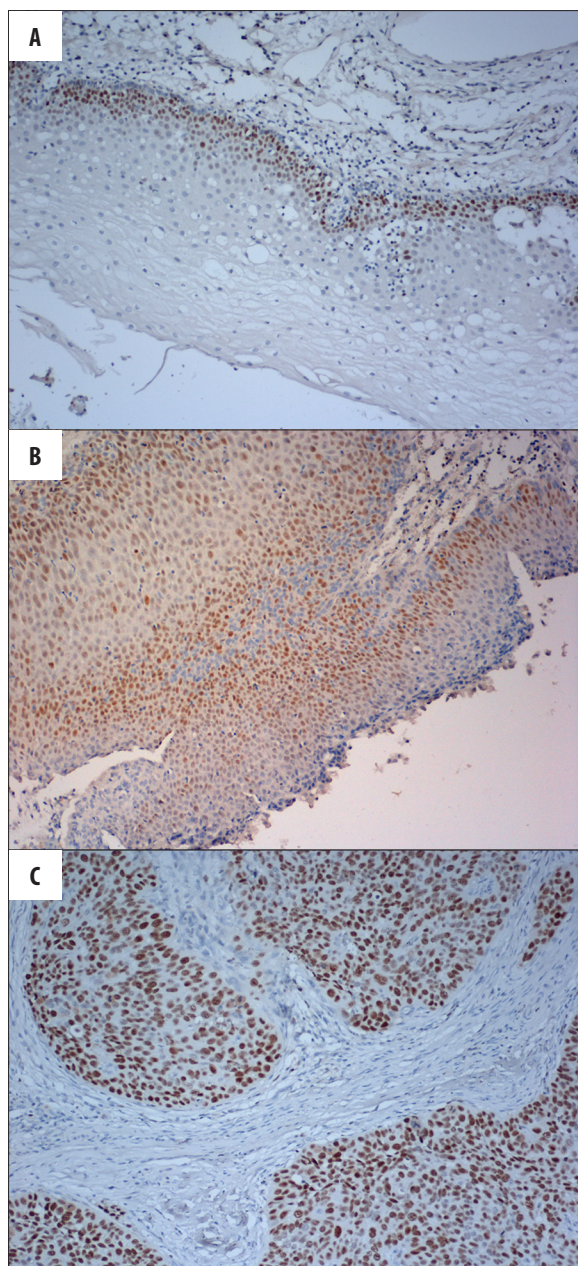
7 jest powiązane z wybranymi białkami uczestniczącymi w regulacji cyklu komórkowego i proliferacji komórek, takimi jak: pRb [58], Mat-1 [71], FLH [11] i wirusową onkoproteinę HPV-E6 [60]. Transkrypcja MCM 7 jest regulowana przez czynnik E2F oraz przez onkogeny *C-myc* i *N-MYC* [29]. Ludzkie białko MCM 7 jest umiejscowione w jądrze w komórkach interfazowych. Podczas mitozy proteina jest równomiernie rozprowadzana po całej komórce [68]. MCM 7 wydaje się swoistym markerem nowotworowym. Badania wykazały, że podwyższoną ekspresję MCM7 wykrywa się w rakach szyjki macicy [8,40], prostaty [52], trzustki [25], głowy i szyi [15], jelita grubego [47]. Wykazano również wysoką korelację między ekspresją białka MCM 7 i znanego markera proliferacji komórkowej Ki-67 [47,52].

K. Strati i wsp. [60] wykazali, podczas badań prowadzonych na modelu mysim, że białko MCM 7 jest obecne w większej ilości w guzach myszy transformowanych onkoproteiną E6 i E7 wirusa HPV 16, niż w tych pobranych z nietransformowanych myszy. To doświadczenie wykazało dodatkowo, że MCM 7 może być markerem odróżniającym nowotwory głowy i szyi o etiopatogenezie wirusowej od wywoływanych przez inne czynniki. Strati i wsp. [60] sugerują, że nadekspresja MCM 7 w zmienionych komórkach, w których wykryto wirusa HPV, jest dobrym wskaźnikiem aktywności onkoproteiny E7 [60]. Brake i wsp. [8] zaobserwowali, że MCM 7 jest markerem syntezy DNA indukowanej przez E7 w cyklu życiowym wirusa. E7 jest odpowiedzialna za przeprogramowywanie keratynocytów warstwy powierzchniowej nabłonka płaskiego oraz ich ponowne wejście w cykl komórkowy. Wznawiana jest wtedy synteza DNA, co umożliwia wegetatywną amplifikację genomu wirusa [8]. Przeprowadzono również badania immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał anty-MCM 7 i anty-p16 na materiale z nowotworów szyjki macicy. Oba markery wykazują podobne nasilenie ekspresji wyżej wymienionych białek. MCM 7 w tych badaniach jest uwidocznione jedynie w jądrach komórek w przeciwieństwie do białka p16, które zaobserwowano zarówno w jądrach komórek jak i w cytoplazmie [8].

MCM 8 to białko, które odkryto w komórkach ludzkich hepatocytów. Wykazano, że gen *MCM 8* jest powiązany z karcynogenezą nowotworów wątroby. Jest on miejscem docelowym, w które wbudowuje się wirus zapalenia wątroby typu B. *MCM 8* jest bardzo konserwatywny, ale nie występuje u drożdży. Tłumaczy to, dlaczego został odkryty później niż geny *MCM 2-7* [24].

Mimo to, że białko MCM 8 odkryto zupełnie niezależnie od MCM 2-7, ma ono podobne właściwości jak białka z rodziny MCM. W jego strukturze biochemicznej obecna jest domena MCM, a także motyw palca cynkowego. Jest umiejscowione w jądrach komórkowych, ale nie ma domeny NLS. Sugeruje to, że łączy się ono z innym białkiem jądrowym [24]. MCM 8 nie uczestniczy w tworzeniu kompleksu MCM 2-7. Przyłącza się do chromatyny po dołączeniu do niej kompleksu MCM 2-7 [38].

MCM 9 – Podczas przeszukiwania baz danych, w celu zbadania sekwencji genów *MCM 2-8*, zidentyfikowano nowy gen należący do tej grupy. Doniesiono o istnieniu genu MCM 9 i kodowanego przez niego białka. MCM 9



Ryc. 2. Ekspresja białka MCM 3 w komórkach proliferujących; reakcja immunohistochemiczna (jądra komórek wybarwione na kolor brązowy); (A) Prawidłowy nabłonek wielowarstwowy płaski – komórki proliferujące wykazujące ekspresję MCM 3 znajdują się w warstwie bazalnej. (B) Rak płaskonabłonkowy krtani – ekspresja MCM 3 w licznych proliferujących komórkach nowotworowych. (C) Rak płaskonabłonkowy krtani – widoczne naciekanie podścieliska (tkanka łączna) z obecnością proliferujących komórek nowotworowych

jest aktywny w różnych typach tkanek mysich i ludzkich. Rola, jaką pełni to białko w syntezie DNA nie została dotychczas wyjaśniona [37,38].

MCM JAKO MARKERY NOWOTWOROWE

W prawidłowym nabłonku wielowarstwowym płaskim ekspresja białek MCM jest widoczna w jądrach komórek warstwy podstawnej oraz w komórkach warstwy parabazalnej

[36]. Większość keratynocytów warstwy powierzchniowej nabłonka przeszła proces różnicowania. Te keratynocyty nie powinny wykazywać obecności MCM w jądrze. Wzór ekspresji białek MCM w nabłonku płaskim zmienia się pod wpływem procesu nowotworowego. W takim przypadku zauważalna jest ekspansja komórek proliferujących w warstwach nabłonka, w których w warunkach prawidłowych nie występują [64]. Zarówno wzrost liczby komórek proliferujących oraz ich nietypowe rozmieszczenie w warstwach nabłonka, a także spadek histologicznego stopnia różnicowania zmiany przednowotworowej, można skorelować z pojawieniem się MCM-pozytywnych komórek [4,36,64]. Taki wzór ekspresji MCM wykryto w dysplazjach i nowotworach złośliwych nabłonków szyjki macicy [43,44], krtani [12,13,56], jamy ustnej [63], okrężnicy [21,55], przełyku [30], gruczołów ślinowych [70], dróg moczowych [59], sromu [16]. Na zdjęciach zamieszczonych na ryc. 2 widoczna jest ekspresja białka MCM 3 w rakach krtani o różnych stopniach złośliwości (reakcja immunohistochemiczna).

Immunohistochemiczne badania ekspresji MCM 2, MCM 5 i MCM 7 wykazują, że obecność tych białek jest ograniczona do regionów proliferujących naskórka, błony śluzowej jelita i tkanki limfatycznej [28]. Wzrost ekspresji zauważa się w guzach litych i stanach przednowotworowych [74]. Występowanie białek MCM w komórkach nowotworowych i dysplastycznych sugeruje ich kliniczną użyteczność w diagnozowaniu raków przedinwazyjnych i inwazyjnych szyjki macicy, pęcherza moczowego i prostaty [52].

Wiele badań potwierdza także tezę, że dzięki białkom MCM możliwe jest rozróżnianie stadiów kancerogenezy z większą dokładnością (np. w raku prostaty czy szyjki macicy) w porównaniu do antygenu Ki-67 [8,52].

Większość komórek ludzkiego ciała znajduje się poza cyklem podziałowym, w stadium spoczynku (faza G0). Komórki, które aktywnie się dzielą są umiejscowione w szczególnych miejscach w tkankach o dużym potencjale proliferacyjnym: nabłonki np. szyjki macicy, skóry, błony śluzowej przewodu pokarmowego oraz komórki szpiku kostnego. Egzogenne czynniki wzrostu stymulują komórki do przejścia z fazy spoczynku (G0) do pierwszej fazy cyklu (G1). Podczas późnej fazy G1 komórki są przygotowywane do replikacji DNA, która zachodzi w fazie S, poprzedzającej fazę G2 i podział (M). Progresja cyklu komórki i jej podziału jest możliwa dzięki zmieniającemu się stosunkowi ekspresji cyklin i kinaz zależnych od cyklin (CDK). Fazę G1 regulują kompleksy cyklina D-CDK4, cyklina D-CDK6 i cyklina E-CDK2. Progresja fazy G2 oraz wejście komórki na drogę podziału mitotycznego jest inicjowane przez parę cyklina A-CDK2 i cyklina B-CDK1 [22].

MCM łączą się z chromatyną w początkowej fazie replikacji. W czasie trwania procesu syntezy DNA białka MCM zostają odłączone od chromatyny. Są jednak ciągle obecne w jądrze komórek proliferujących [33]. MCM stają się nieaktywne, gdy komórka opuszcza cykl podziału i przechodzi w fazę spoczynku, różnicowania lub starzeje się [22]. Utrata aktywności następuje w ciągu kilku dni od przejścia w fazę spoczynku lub różnicowania. Kompleks pre-RC, w którym uczestniczą białka MCM 2-7, jest rozkładany szybciej, gdy komórka zaczyna się różnicować, niż gdy

przechodzi w stan spoczynku [36]. Białka MCM w tej fazie nie są wykrywane przez przeciwciała skierowane przeciwko ich antygenom. Natomiast w komórce będącej w cyklu podziałowym antygeny białka MCM są bardzo stabilne i są aktywne podczas wszystkich faz G1, S, G2 i M [28,74]. Ta obserwacja zapoczątkowała prace badawcze nad wykorzystaniem przeciwciał przeciwko białkom MCM, jako markerów proliferacji komórkowej w diagnostyce histopatologicznej. Istotne jest zwłaszcza zweryfikowanie, czy z użyciem przeciwciał anti-MCM można odróżnić komórki nowotworów złośliwych oraz komórki stanów przednowotworowych w fazie spoczynku i różnicowania [22,33,36].

W wielu badaniach wykazano, że zmiana regulacji ekspresji kompleksu MCM 2-7 jest charakterystyczna dla wczesnych etapów karcynogenezy. Te ważne czynniki inicjujące replikację DNA mogą być użyte jako markery diagnostyczne różnych zmian przednowotworowych oraz nowotworowych. Ponadto przeciwciała przeciwko polipeptydom MCM nie wykrywają komórek, które przechodzą proces naprawy DNA [36]. Tradycyjne markery proliferacji komórkowej, takie jak Ki-67 czy PCNA, są dobrymi wykładnikami nasilenia proliferacji w różnych typach nowotworów [17,48,50,62,73], jednak ocena stadiów cyklu komórkowego przez te markery jest ograniczona. PCNA jest koenzymem potrzebnym polimerazie DNA δ nie tylko w procesie replikacji DNA, ale także podczas naprawy DNA [27]. Badania immunohistochemiczne z wykorzystaniem markera PCNA wykazują, że wykrywa on nie tylko komórki dzielące się, lecz także populacje komórek będących w stanie spoczynku. Natomiast antygen Ki-67 uczestniczy w rybosomalnej biosyntezie, ale okazuje się, że nie jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za proliferację komórek [9]. Odkrycie i użycie do diagnozy oraz oceny rokowniczej białek, które są głównymi czynnikami regulującymi replikację DNA może być skutecznym sposobem na wykazanie odsetka proliferujących komórek nowotworowych w guzie [36]. Postępem w diagnostyce niektórych nowotworów (rak szyjki macicy, rak sutka i in.) mogłoby być ulepszenie dotychczasowych testów bazujących na wymazach cytologicznych, tak aby wykrywały zmiany możliwie dokładniej, rozróżniając stadia rozwoju zmian, były mało inwazyjne i obiektywne. To znacznie ułatwiłoby monitorowanie zagrożonej populacji oraz zmniejszyło koszt badań diagnostycznych oraz leczenia [56].

Mukherjee i wsp. [43] zbadali przydatność białek MCM 2 i MCM 5 w wykrywaniu nieprawidłowych komórek powierzchniowej warstwy nabłonka szyjki macicy. Wykonane wymazy cytologiczne wykorzystano do przeprowadzenia badań immunocytochemicznych. Porównywano test Papanicolaou (Pap) z testem przeprowadzonym z wykorzystaniem przeciwciał anti-MCM. Barwienie Pap jest tradycyjną metodą używaną w diagnozowaniu zmienionych komórek nabłonka szyjki macicy. Diagnoza wykonywana za pomocą testu Pap jest bardzo subiektywna. Jeśli pobranie materiału zostało przeprowadzone niewłaściwie, to może dawać błędne wyniki. Mukherjee i wsp. [43] wykazali, że immunocytochemia z wykorzystaniem przeciwciał anti-MCM jest czułą i bardzo swoistą metodą, umożliwiającą wykrywanie nowotworów szyjki macicy. Wartość prognostyczna testu MCM wyniosła 100% w przypadku stadiów CIN1 i 79% dla CIN3. Immunocytochemiczna ocena z użyciem przeciwciał anti-MCM nie daje fałszywie pozytywnych wyników. Nie jest konieczne wykonywanie dalszych badań i biopsji, jeżeli wynik testu MCM jest negatywny. Konieczna jest tylko ocena wyniku reakcji immunocytochemicznej oraz morfologii komórek z pozytywną reakcją przez doświadczonego cytopatologa [43].

Stoeber i wsp. [59] przeprowadzili ilościowe badanie cytoimmunofluorymetryczne, którego celem było opracowanie metody wykrywania białka MCM 5 w komórkach występujących w osadzie moczu. Wykazano, że taka diagnostyka jest czuła, swoista i umożliwia wczesne, proste i nieinwazyjne wykrywanie pierwotnych i nawracających guzów nowotworowych pęcherza moczowego. Cytometria przepływowa oceniająca komórki MCM5 dodatkowo okazała się czulszą metodą w porównaniu do badań cytologicznych dróg moczowych w diagnostyce zmian nowotworowych [36,59].

PODSUMOWANIE

Białka z rodziny MCM są intensywnie badane ze względu na ich zastosowanie jako markery proliferacji komórek. Wykorzystanie tych białek może umożliwić sprecyzowanie diagnozy, prognozowanie i ocenę odpowiedzi na leczenie w wielu powszechnie występujących typach nowotworów. Białka MCM mogłyby być także użyteczne w projektowaniu nowych terapii antynowotworowych, ukierunkowanych na regulację replikacji DNA.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Akman G., MacNeill S.A.: MCM-GINS and MCM-MCM interactions *in vivo* visualised by bimolecular fluorescence complementation in fission yeast. *BMC Cell Biol.*, 2009; 10: 12
- [2] Aparicio T., Guillou E., Coloma J., Montoya G., Méndez J.: The human GINS complex associates with Cdc45 and MCM and is essential for DNA replication. *Nucl. Acids Res.*, 2009; 37: 2087–2095
- [3] Aparicio T., Ibarra A., Méndez J.: Cdc45-MCM-GINS, a new power player for DNA replication. *Cell Div.*, 2006; 1: 18
- [4] Baldwin P., Laskey R., Coleman N.: Translational approaches to improving cervical screening. *Nat. Rev. Cancer*, 2003; 3: 217–226
- [5] Będowska G.E., Ławicki S., Szmítowski M.: Molecular markers of carcinogenesis in the diagnostics of cervical cancer. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2009; 63: 99–105
- [6] Blow J.J., Gillespie P.J.: Replication licensing and cancer – a fatal entanglement? *Nat. Rev. Cancer*, 2008; 8: 799–806
- [7] Blow J.J., Hodgson B.: Replication licensing – defining the proliferative state? *Trends Cell Biol.*, 2002; 12: 72–78
- [8] Brake T., Connor J.P., Petereit D.G., Lambert P.F.: Comparative analysis of cervical cancer in women and in a human papillomavirus-transgenic mouse model: identification of minichromosome maintenance protein 7 as an informative biomarker for human cervical cancer. *Cancer Res.*, 2003; 63: 8173–8180
- [9] Brown D.C., Gatter K.C.: Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology*, 1990; 17: 489–503
- [10] Bukholm I.R., Bukholm G., Holm R., Nesland J.M.: Association between histology grade, expression of HsMCM2, and cyclin A in human invasive breast carcinomas. *J. Clin. Pathol.*, 2003; 56: 368–373
- [11] Chan K.K., Tsui S.K., Ngai S.M., Lee S.M., Kotaka M., Waye M.M., Lee C.Y., Fung K.P.: Protein-protein interaction of FHL2, a LIM domain protein preferentially expressed in human heart, with hCDC47. *J. Cell. Biochem.*, 2000; 76: 499–508
- [12] Chatrath P., Scott I.S., Morris L.S., Davies R.J., Bird K., Vowler S.L., Coleman N.: Immunohistochemical estimation of cell cycle phase in laryngeal neoplasia. *Br. J. Cancer*, 2006; 95: 314–321

- [13] Chatrath P., Scott I.S., Morris L.S., Davies R.J., Rushbrook S.M., Bird K., Vowler S.L., Grant J.W., Saeed I.T., Howard D., Laskey R.A., Coleman N.: Aberrant expression of minichromosome maintenance protein-2 and Ki67 in laryngeal squamous epithelial lesions. *Br. J. Cancer*, 2003; 89: 1048–1054
- [14] Costa A., Onesti S.: The MCM complex: (just) a replicative helicase? *Biochem. Soc. Trans.*, 2008; 36: 136–140
- [15] Cromer A., Carles A., Millon R., Ganguli G., Chalmel F., Lemaire F., Young J., Dembélé D., Thibault C., Muller D., Poch O., Abecassis J., Wasylyk B.: Identification of genes associated with tumorigenesis and metastatic potential of hypopharyngeal cancer by microarray analysis. *Oncogene*, 2004; 23: 2484–2498
- [16] Davidson E.J., Morris L.S., Scott I.S., Rushbrook S.M., Bird K., Laskey R.A., Wilson G.E., Kitchener H.C., Coleman N., Stern P.L.: Minichromosome maintenance (Mcm) proteins, cyclin B1 and D1, phosphohistone H3 and *in situ* DNA replication for functional analysis of vulva intraepithelial neoplasia. *Br. J. Cancer*, 2003; 88: 257–262
- [17] Dziegiel P., Salwa-Zurawska W., Zurawski J., Wojnar A., Zabel M.: Prognostic significance of augmented metallothionein (MT) expression correlated with Ki-67 antigen expression in selected soft tissue sarcomas. *Histol. Histopathol.*, 2005; 20: 83–89
- [18] Fitch M.J., Donato J.J., Tye B.K.: Mcm7, a subunit of the presumptive MCM helicase, modulates its own expression in conjunction with Mcm1. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 25408–25416
- [19] Forsburg S.L.: Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2004; 68: 109–131
- [20] Forsburg S.L.: The MCM helicase: linking checkpoints to the replication fork. *Biochem. Soc. Trans.*, 2008; 36: 114–119
- [21] Giaginis C., Georgiadou M., Dimakopoulou K., Tsourouffis G., Gatzidou E., Kouraklis G., Theocharis S.: Clinical significance of MCM-2 and MCM-5 expression in colon cancer: association with clinicopathological parameters and tumor proliferative capacity. *Dig. Dis. Sci.*, 2009; 54: 282–291
- [22] Gonzalez M.A., Tachibana K.E., Laskey R.A., Coleman N.: Control of DNA replication and its potential clinical exploitation. *Nat. Rev. Cancer*, 2005; 5: 135–141
- [23] Goodwin E.C., DiMaio D.: Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 12513–12518
- [24] Gozuacik D., Chami M., Lagorce D., Faivre J., Murakami Y., Poch O., Biermann E., Knippers R., Bréchet C., Paterlini-Bréchet P.: Identification and functional characterization of a new member of the human Mcm protein family: hMcm8. *Nucleic Acids Res.*, 2003; 31: 570–579
- [25] Grützmann R., Pilarsky C., Ammerpohl O., Lüttges J., Böhme A., Sipos B., Foerder M., Alldinger I., Jahnke B., Schackert H.K., Kalthoff H., Kremer B., Klöppel G., Saeger H.D.: Gene expression profiling of microdissected pancreatic ductal carcinomas using high-density DNA microarrays. *Neoplasia*, 2004; 6: 611–622
- [26] Ha S.A., Shin S.M., Namkoong H., Lee H., Cho G.W., Hur S.Y., Kim T.E., Kim J.W.: Cancer-associated expression of *minichromosome maintenance 3* gene in several human cancers and its involvement in tumorigenesis. *Clin. Cancer Res.*, 2004; 10: 8386–8395
- [27] Hall P.A., Levison D.A., Woods A.L., Yu C.C., Kellock D.B., Watkins J.A., Barnes D.M., Gillett C.E., Camplejohn R., Dover R., Waseem N.H., Lane D.P.: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J. Pathol.*, 1990; 162: 285–294
- [28] Hiraiwa A., Fujita M., Nagasaka T., Adachi A., Ohashi M., Ishibashi M.: Immunolocalization of hCDC47 protein in normal and neoplastic human tissues and its relation to growth. *Int. J. Cancer*, 1997; 74: 180–184
- [29] Honeycutt K.A., Chen Z., Koster M.I., Miers M., Nuchtern J., Hicks J., Roop D.R., Shohet J.M.: Deregulated minichromosomal maintenance protein MCM7 contributes to oncogene driven tumorigenesis. *Oncogene*, 2006; 25: 4027–4032
- [30] Kato H., Miyazaki T., Fukai Y., Nakajima M., Sohda M., Takita J., Masuda N., Fukuchi M., Manda R., Ojima H., Tsukada K., Asao T., Kuwano H.: A new proliferation marker, minichromosome maintenance protein 2, is associated with tumor aggressiveness in esophageal squamous cell carcinoma. *J. Surg. Oncol.*, 2003; 84: 24–30
- [31] Kulartz M., Knippers R.: The replicative regulator protein geminin on chromatin in the HeLa cell cycle. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 41686–41694
- [32] Labib K., Gambus A.: A key role for the GINS complex at DNA replication forks. *Trends Cell Biol.*, 2007; 17: 271–278
- [33] Laskey R.: The Croonian Lecture 2001 Hunting the antisocial cancer cell: MCM proteins and their exploitation. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, 2005; 360: 1119–1132
- [34] Lei M., Tye B.K.: Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *J. Cell Sci.*, 2001; 114: 1447–1454
- [35] Leone G., DeGregori J., Yan Z., Jakoi L., Ishida S., Williams R.S., Nevins J.R.: E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase. *Genes Dev.*, 1998; 12: 2120–2130
- [36] Liu H., Takeuchi S., Moroi Y., Lin N., Urabe K., Kokuba H., Imafuku S., Dainichi T., Uchi H., Furue M., Tu Y.: Expression of *minichromosome maintenance 5* protein in proliferative and malignant skin diseases. *Int. J. Dermatol.*, 2007; 46: 1171–1176
- [37] Lutzmann M., Maiorano D., Méchali M.: Identification of full genes and proteins of MCM9, a novel, vertebrate-specific member of the MCM2-8 protein family. *Gene*, 2005; 362: 51–56
- [38] Maiorano D., Lutzmann M., Méchali M.: MCM proteins and DNA replication. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2006; 18: 130–136
- [39] Maiorano D., Rul W., Méchali M.: Cell cycle regulation of the licensing activity of Cdt1 in *Xenopus laevis*. *Exp. Cell Res.*, 2004; 295: 138–149
- [40] Malinowski D.P.: Molecular diagnostic assays for cervical neoplasia: emerging markers for the detection of high-grade cervical disease. *Biotechniques*, 2005; 38 (Suppl.4): S17–S23
- [41] McGarry T.J., Kirschner M.W.: Geminin, an inhibitor of DNA replication is degraded during mitosis. *Cell*, 1998; 93: 1043–1053
- [42] Moyer S.E., Lewis P.W., Botchan M.R.: Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 10236–10241
- [43] Mukherjee G., Muralidhar B., Bafna U.D., Laskey R.A., Coleman N.: MCM immunocytochemistry as a first line cervical screening test in developing countries: a prospective cohort study in a regional cancer centre in India. *Br. J. Cancer*, 2007; 96: 1107–1111
- [44] Murphy N., Ring M., Heffron C.C., Martin C.M., McGuinness E., Sheils O., O'Leary J.J.: Quantitation of CDC6 and MCM5 mRNA in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix. *Mod. Pathol.*, 2005; 18: 844–849
- [45] Musahl C., Holthoff H.P., Lesch R., Knippers R.: Stability of the replicative Mcm3 protein in proliferating and differentiating human cells. *Exp. Cell Res.*, 1998; 241: 260–264
- [46] Nguyen V.Q., Co C., Li J.J.: Cyclin-dependent kinases prevent DNA replication through multiple mechanisms. *Nature*, 2001; 411: 1068–1073
- [47] Nishihara K., Shomori K., Tamura T., Fujioka S., Ogawa T., Ito H.: Immunohistochemical expression of geminin in colorectal cancer: Implication of prognostic significance. *Oncol. Rep.*, 2009; 21: 1189–1195
- [48] Nowak M., Madej J.A., Dziegiel P.: Correlation between MCM-3 protein expression and grade of malignancy in mammary adenocarcinomas and soft tissue fibrosarcomas in dogs. *In Vivo*, 2009; 23: 49–53
- [49] Nowak M., Madej J.A., Podhorska-Okołów M., Dziegiel P.: Expression of extracellular matrix metalloproteinase (MMP-9), E-cadherin and proliferation-associated antigen Ki-67 and their reciprocal correlation in canine mammary adenocarcinomas. *In Vivo*, 2008; 22: 463–469
- [50] Ohtani K., Iwanaga R., Nakamura M., Ikeda M., Yabuta N., Tsuruga H., Nojima H.: Cell growth-regulated expression of mammalian MCM5 and MCM6 genes mediated by the transcription factor E2F. *Oncogene*, 1999; 18: 2299–2309
- [51] Pacek M., Tutter A.V., Kubota Y., Takisawa H., Walter J.C.: Localization of MCM2-7, Cdc45, and GINS to the site of DNA unwinding during eukaryotic DNA replication. *Mol. Cell*, 2006; 21: 581–587
- [52] Padmanabhan V., Callas P., Phillips G., Trainer T.D., Beatty B.G.: DNA replication regulation protein Mcm7 as a marker of proliferation in prostate cancer. *J. Clin. Pathol.*, 2004; 57: 1057–1062
- [53] Pierzchała R.P., Pasz-Walczyk G., Jeziorski A.: Nowe czynniki rokownicze w raku piersi – przegląd piśmiennictwa. *Współczesna Onkologia*, 2004; 8: 429–434
- [54] Ricke R.M., Bielinsky A.K.: Mcm10 regulates the stability and chromatin association of DNA polymerase- α . *Mol. Cell*, 2004; 16: 173–185
- [55] Scarpini C., White V., Muralidhar B., Patterson A., Hickey N., Singh N., Mullerat J., Winslet M., Davies R.J., Phillips M.L., Stacey P., Laskey R.A., Miller R., Nathan M., Coleman N.: Improved screening for anal neoplasia by immunocytochemical detection of minichromosome maintenance proteins. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2008; 17: 2855–2864

- [56] Scott I.S., Odell E., Chatrath P., Morris L.S., Davies R.J., Vowler S.L., Laskey R.A., Coleman N.: A minimally invasive immunocytochemical approach to early detection of oral squamous cell carcinoma and dysplasia. *Br. J. Cancer*, 2006; 94: 1170–1175
- [57] Speck C., Chen Z., Li H., Stillman B.: ATPase-dependent cooperative binding of ORC and Cdc6 to origin DNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2005; 12: 965–971
- [58] Sterner J.M., Dew-Knight S., Musahl C., Kornbluth S., Horowitz J.M.: Negative regulation of DNA replication by the retinoblastoma protein is mediated by its association with MCM7. *Mol. Cell. Biol.*, 1998; 18: 2748–2757
- [59] Stoerber K., Swinn R., Prevost A.T., de Clive-Lowe P., Halsall I., Dilworth S.M., Marr J., Turner W.H., Bullock N., Doble A., Hales C.N., Williams G.H.: Diagnosis of genito-urinary tract cancer by detection of *minichromosome maintenance 5 protein* in urine sediments. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2002; 94: 1071–1079
- [60] Strati K., Pitot H.C., Lambert P.F.: Identification of biomarkers that distinguish human papillomavirus (HPV)-positive versus HPV-negative head and neck cancers in a mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 14152–14157
- [61] Szajerka A., Dziegiel P., Szajerka T., Zabel M., Winowski J., Grzebieniak Z.: Immunohistochemical evaluation of metallothionein, Mcm-2 and Ki-67 antigen expression in tumors of the adrenal cortex. *Anticancer Res.*, 2008; 28: 2959–2965
- [62] Szczuraszek K., Mazur G., Jeleń M., Dziegiel P., Surowiak P., Zabel M.: Prognostic significance of Ki-67 antigen expression in non-Hodgkin's lymphomas. *Anticancer Res.*, 2008; 28: 1113–1118
- [63] Szelachowska J., Dziegiel P., Jelen-Krzyszewska J., Jelen M., Matkowski R., Pomiecko A., Spytowska B., Jagas M., Gisterek I., Kornafel J.: Mcm-2 protein expression predicts prognosis better than Ki-67 antigen in oral cavity squamocellular carcinoma. *Anticancer Res.*, 2006; 26: 2473–2478
- [64] Tachibana K.E., Gonzalez M.A., Coleman N.: Cell-cycle-dependent regulation of DNA replication and its relevance to cancer pathology. *J. Pathol.*, 2005; 205: 123–129
- [65] Takei Y., Swietlik M., Tanoue A., Tsujimoto G., Kouzarides T., Laskey R.: MCM3AP, a novel acetyltransferase that acetylates replication protein MCM3. *EMBO Rep.*, 2001; 2: 119–123
- [66] Tokuyasu N., Shomori K., Nishihara K., Kawaguchi H., Fujioka S., Yamaga K., Ikeguchi M., Ito H.: Minichromosome maintenance 2 (MCM2) immunoreactivity in stage III human gastric carcinoma: clinicopathological significance. *Gastric Cancer*, 2008; 11: 37–46
- [67] Tsuji T., Ficarro S.B., Jiang W.: Essential role of phosphorylation of MCM2 by Cdc7/Dbf4 in the initiation of DNA replication in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell*, 2006; 17: 4459–4472
- [68] Tsuruga H., Yabuta N., Hashizume K., Ikeda M., Endo Y., Nojima H.: Expression, nuclear localization and interactions of human MCM/P1 proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997; 236: 118–125
- [69] Tye B.K., Sawyer S.: The hexameric eukaryotic MCM helicase: building symmetry from nonidentical parts. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 34833–34836
- [70] Vargas P.A., Cheng Y., Barrett A.W., Craig G.T., Speight P.M.: Expression of Mcm-2, Ki-67 and geminin in benign and malignant salivary gland tumours. *J. Oral Pathol. Med.*, 2008; 37: 309–318
- [71] Wang Y., Xu F., Hall F.L.: The MAT1 cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) assembly/targeting factor interacts physically with the MCM7 DNA licensing factor. *FEBS Lett.*, 2000; 484: 17–21
- [72] Wentzensen N., Vinokurova S., Von Knebel Doeberitz M.: Molecular markers of cervical squamous cell cancer precursor lesions. *CME J. Gynecol. Oncol.*, 2006; 11: 30–40
- [73] Whitfield M.L., George L.K., Grant G.D., Perou C.M.: Common markers of proliferation. *Nat. Rev. Cancer*, 2006; 6: 99–106
- [74] Williams G.H., Romanowski P., Morris L., Madine M., Mills A.D., Stoerber K., Marr J., Laskey R.A., Coleman N.: Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 14932–14937
- [75] Wohlschlegel J.A., Dwyer B.T., Dhar S.K., Cvetec C., Walter J.C., Dutta A.: Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to Cdt1. *Science*, 2000; 290: 2309–2312

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.