

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Eliška Protivová

Role komplexu Smc5/6 při DNA virové infekci
The role of the Smc5/6 complex in DNA viral infection

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Sandra Huérfano-Meneses, M.Sc., Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc.

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 6. 5. 2021

Eliška Protivová

.....

Poděkování:

Děkuji Sandře Huérfano-Meneses, M.Sc., Ph.D. a doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc. za cenné rady, připomínky, ochotu a trpělivost při zpracování bakalářské práce.

Abstrakt

Komplex Smc5/6 je eukaryotický proteinový komplex, který se spolu s kohezinem Smc1/3 a kondenzinem Smc2/4 podílí na zajištění stability genomu. K tomu přispívá svou účastí při organizaci a udržování chromozomových struktur a také při odpovědi na poškození DNA. Mimo to bylo zjištěno, že komplex Smc5/6 hraje významnou roli při virové infekci. Tato práce se zaměřuje na mechanismy interakce komplexu Smc5/6 s virovými DNA genomy, DNA intermediárními genomy a virovými proteiny. V případě HBV z čeledi *Hepadnaviridae* působí Smc5/6 jako restriční faktor. Stejně je tomu tak u HSV-1 z čeledi *Herpesviridae*, virů z čeledi *Papillomaviridae* a HIV-1 z čeledi *Retroviridae*. Také byla objevena interakce komplexu Smc5/6 s JC virem z čeledi *Polyomaviridae*. Význam této interakce však zůstává nepochopen. Některé z výše zmíněných virů dokážou této restriční funkci zabránit. Konkrétně HBV protein HBx zprostředkovává proteazomální degradaci komplexu Smc5/6 či HIV-1 protein Vpr indukuje degradaci proteinu SLF2, který je zodpovědný za lokalizaci komplexu Smc5/6 na DNA intermediární genom HIV-1.

Klíčová slova: komplex Smc5/6, oprava DNA, ATPáza, sumoylace, DNA viry, viry s DNA intermediárním genomem, inhibice, restriční faktor

Abstract

The Smc5/6 complex is an eukaryotic protein complex that, together with Smc1/3 cohesin and Smc2/4 condensin, is involved in ensuring genome stability. It contributes to this by participating in the organization and maintenance of chromosomal structures as well as in the response to DNA damage. In addition, the Smc5/6 complex has been shown to play an important role in viral infection. This thesis focuses on the mechanisms of interaction of the Smc5/6 complex with viral DNA genomes, DNA intermediate genomes and viral proteins. In the case of HBV of the *Hepadnaviridae* family, Smc5/6 acts as a restriction factor. The same is true for HSV-1 of the *Herpesviridae* family, viruses of the *Papillomaviridae* family and HIV-1 of the *Retroviridae* family. An interaction of the Smc5/6 complex with the JC virus of the *Polyomaviridae* family has also been discovered. Nevertheless, the meaning of this interaction remains elusive. Some of the above-mentioned viruses can prevent this restriction. In detail, HBx protein of HBV mediates proteasomal degradation of the Smc5/6 complex or Vpr protein of HIV-1 induces degradation of the SLF2 protein, which is responsible for the Smc5/6 localization on HIV-1 DNA intermediate genomes.

Keywords: Smc5/6 complex, DNA repair, ATPase, sumoylation, DNA viruses, viruses with a DNA intermediate genome, inhibition, restriction factor

Obsah

1	Úvod	1
2	Komplex Smc5/6 – člen SMC rodiny proteinových komplexů	3
2.1	Základní struktura SMC proteinu	3
2.2	Struktura a biochemické aktivity komplexu Smc5/6.....	4
2.2.1	Smc5-Smc6-Nse2/Mms21 subkomplex	5
2.2.2	Nse1-Nse3-Nse4 subkomplex	6
2.2.3	Nse5-Nse6 subkomplex.....	6
2.2.4	ATPázová aktivita	7
2.3	Funkce komplexu Smc5/6	8
2.3.1	Role v opravě DNA.....	8
2.3.1.1	Oprava dvouřetězcových zlomů DNA pomocí homologní rekombinace	8
2.3.1.2	Stabilizace, oprava a restart zastavených replikačních vidlic.....	9
2.3.2	Role v genomové integritě	12
2.3.2.1	Údržba repetitivních sekvencí	12
2.3.2.1.1	Telomery	12
2.3.2.1.2	rDNA a heterochromatin.....	13
2.3.2.2	Chromozomová topologie	14
3	Interakce komplexu Smc5/6 s DNA viry a viry s DNA intermediárním genomem ..	16
3.1	<i>Hepadnaviridae</i>	16
3.1.1	Virus hepatitidy B	16
3.2	<i>Herpesviridae</i>	20
3.2.1	Herpes simplex virus 1	20
3.3	<i>Papillomaviridae</i>	22
3.4	<i>Polyomaviridae</i>	26
3.4.1	JC virus.....	26
3.5	<i>Retroviridae</i>	28
3.5.1	HIV-1 virus	28
4	Závěr	31
5	Literatura.....	32

Seznam použitých zkratk

aa	amino acid	aminokyselina
ABC	ATP binding cassette	ATP vazebná kazeta
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome	syndrom získaného imunodeficitu
ALT	alternative lengthening of telomeres	alternativní prodloužení telomer
APBs	ALT-associated PML bodies	PML tělíska asociovaná s ALT
ARIP3	androgen receptor-interacting protein 3	protein 3 interagující s androgenním receptorem
Arp2/3	actin related protein 2/3 complex	aktinu příbuzný protein 2/3 komplex
ATP	adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
BLM	Bloom syndrome protein	protein Bloomova syndromu
BPV	bovine papillomavirus	bovinní (hovězí) papilomavirus
Brd4	bromodomain-containing protein 4	protein 4 obsahující bromodoménu
C	cysteine	cystein
CBF β	core-binding factor subunit β	β podjednotka core vazebného faktoru
cccDNA	covalently closed circular DNA	kovalentně uzavřená cirkulární DNA
cDNA	complementary DNA	komplementární DNA
CNS	central nervous system	centrální nervový systém
CPV	canine papillomavirus	psí papilomavirus
CRL4	Cullin-RING ubiquitin ligase complex 4	Cullin-RING ubikvitin ligázový komplex 4
CUL4	Cullin4	Cullin4
D	aspartic acid	kyselina asparagová
DCAF1	DDB1 and CUL4 associated factor 1	faktor 1 asociovaný s DDB1 a CUL4
DDB1	DNA-damage binding protein 1	protein 1 vázající poškození DNA
D-loop	displacement loop	vytěšňovací smyčka
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
DSB	double-strand break	dvouřetězcový zlom DNA
dsDNA	double-stranded DNA	dvouvláknová DNA
E	glutamic acid	kyselina glutamová
Esc2	establishment of silent chromatin protein 2	protein 2 vzniku tichého chromatinu
G	glycine	glycin
HBcAg	hepatitis B virus core antigen	HBV core antigen
HBeAg	hepatitis B virus E antigen	HBV E antigen
HBV	hepatitis B virus	virus hepatitidy B
HBx	hepatitis B virus protein X	HBV protein X
HCC	hepatocellular carcinoma	hepatocelulární karcinom
HHV-1	human herpes virus type 1	liský herpes virus
HIP	high-confidence interacting protein	vysoce spolehlivě interagující protein

HIV-1	human immunodeficiency virus type 1	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HJ	Holliday junction	Hollidayův spoj
HPV	human papillomavirus	lidský papilomavirus
HR	homologous recombination	homologní rekombinace
Hsc70	heat-shock cognate 70	příbuzný protein rodiny proteinů teplotního šoku Hsp70
HSV-1	herpes simplex virus type 1	herpes simplex virus
ICP0	infected cell protein 0	protein infikovaných buněk 0
IFN	interferon	interferon
JCPyV	JC polyomavirus	JC polyomavirus
K	lysine	lysin
kbp	kilobase pair	kilobáze
kDa	kilodaltons	kilodaltony
KITE	kleisin-interacting tandem winged-helix element	kleisin interagující tandemový prvek s winged-helix doménou
L	leucine	leucin
L-HBs	large hepatitis B virus surface antigen	velký HBV povrchový antigen
LTR	long terminal repeat	dlouhá terminální repetice
MAGE	melanoma-associated antigen	antigen asociovaný s melanomem
M-HBs	middle hepatitis B virus surface antigen	střední HBV povrchový antigen
Miz1	Myc-interacting zinc finger protein 1	Myc-interagující protein 1 s motivem zinkových prstů
MmPV	Macaca mulatta papillomavirus	makak rhesus papilomavirus
Mms21	methyl methanesulfonate sensitivity protein 21	protein 21 citlivosti na methylmethansulfonát
Mph1	mutator phenotype protein 1	protein 1 mutátorového fenotypu
Mre11	meiotic recombination protein 11	protein 11 meiotické rekombinace
MRN	Mre11-Rad50-Nbs1 complex	Mre11-Rad50-Nbs1 komplex
MRX	Mre11-Rad50-Xrs2 complex	Mre11-Rad50-Xrs2 komplex
ND10	nuclear domain 10	jaderná doména 10
NHEJ	non-homologous end joining	nehomologní spojování konců
NH-RING	Nse1-homolog really interesting new gene	Nse1-homologní skutečně zajímavý nový gen
NLS	nuclear localization signal	jaderný lokalizační signál
NMR	nuclear magnetic resonance	nukleární magnetická rezonance
NSE	non-structural maintenance of chromosomes elements	non-SMC prvky
NWD	normalized weighted D	normalizované vážené D skóre
OBD	origin-binding domain	origin vazebná doména
Obr.	figure	obrázek
ORF	open reading frame	otevřený čtecí rámeček

ori	origin of replication	replikační počátek
p53	protein 53	protein 53
peg-IFN α	pegylated interferon α	pegylovaný interferon α
pgRNA	pregenomic RNA	pregenomová RNA
PIAS	protein inhibitor of activated STAT	proteinový inhibitor aktivovaného STAT
PJA1	E3 ubiquitin-protein ligase Praja-1	E3 ubikvitin-protein ligáza Praja-1
PML	promyelotic leukemia	promyelocytární leukémie
PML	progressive multifocal leukoencephalopathy	progresivní multifokální leukoencefalopatie
Pol	polymerase	polymeráza
Rad51	radiation sensitive protein 51	protein 51 citlivý na záření
Rad52	radiation sensitive protein 52	protein 52 citlivý na záření
Rad60	radiation sensitive protein 60	protein 60 citlivý na záření
RAP1	repressor activator protein 1	protein aktivátoru represoru 1
Rb	retinoblastoma	retinoblastom
rcDNA	relaxed-circular DNA	relaxovaná cirkulární DNA
rDNA	ribosomal DNA	ribozomální DNA
RING	really interesting new gene	skutečně zajímavý nový gen
Rmi1	RecQ-mediated genome instability protein 1	protein 1 RecQ zprostředkované genomové nestability
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
ROC1	regulator of cullins protein 1	regulátor cullinů protein 1
RPA	replication protein A	replikační protein A
rRNA	ribosomal RNA	ribozomální RNA
S	serine	serin
SA2	stromal antigen 2	stromální antigen 2
Sc	supercoiling	nadšroubovicové vinutí
Sccl	sister chromatid cohesion 1	protein 1 soudržnosti sesterských chromatid
Sccl2	sister chromatid cohesion 2	protein 2 soudržnosti sesterských chromatid
SCI	sister chromatid intertwining	propletení sesterských chromatid
SCR	sister chromatid recombination	rekombinace sesterských chromatid
SfPV	Sylvilagus floridanus papillomavirus	papilomavirus králíka východoamerického
Sgs1	slow growth suppressor 1	supresor 1 pomalého růstu
S-HBs	small hepatitis B virus surface antigen	malý HBV povrchový antigen
SIM	SUMO-interacting motif	SUMO-interagující motiv
siRNA	small interfering RNA	malá interferující RNA
Siz1	SAP and Miz-finger domain-containing protein 1	protein 1 obsahující SAP a Miz prstovou doménu

SLF2	Smc5-Smc6 localization factor protein 2	protein 2 Smc5-Smc6 lokalizačního faktoru
SMC	structural maintenance of chromosomes	stukturní údržba chromozomů
Smc1/3	structural maintenance of chromosome1/3 (cohesin)	protein strukturní údržby chromozomu1/3 (kohezin)
Smc2/4	structural maintenance of chromosome2/4 (condensin)	protein strukturní údržby chromozomu2/4 (kondenzin)
Smc5/6	structural maintenance of chromosome5/6	protein strukturní údržby chromozomu5/6
Sp100	speckled 100 kDa protein	spekle 100 kDa protein
SP-RING	Siz/PIAS really interesting new gene	Siz/PIAS skutečně zajímavý nový gen
ssDNA	single-stranded DNA	jednovláknová DNA
ssRNA	single-stranded RNA	jednovláknová RNA
STR	Sgs1-Top3-Rmi1 complex	Sgs1-Top3-Rmi1 komplex
SUMO	small ubiquitin-like modifier	malý modifikátor podobný ubikvitinu
T	threonine	threonin
t-Ag	small tumor antigen	malý tumorogenní antigen
T-Ag	large tumor antigen	velký tumorogenní antigen
TIN2	TRF1-interacting nuclear protein 2	TRF1-interagující jaderný protein 2
Top1	DNA topoisomerase 1	DNA topoizomeráza 1
Top2	DNA topoisomerase 2	DNA topoizomeráza 2
Top3	DNA topoisomerase 3	DNA topoizomeráza 3
TRAX	translin-associated protein X	protein X asociovaný s translinem
TRF1	telomeric repeat-binding factor 1	faktor 1 vázající telomerické repetice
TRF2	telomeric repeat-binding factor 2	faktor 2 vázající telomerické repetice
TRIM14	tripartite motif-containing protein 14	protein 14 obsahující tripartitní motiv
Ub	ubiquitin	ubikvitin
uDNA	unintegrated DNA	neintegrovaná DNA
Unc45	uncoordinated mutant number 45	nekoordinovaný mutant 45
UV	ultraviolet	ultrafialové
Vpr	viral protein R	virový protein R
VprBP	viral protein R binding protein	Vpr vazebný protein
WHO	World Healt Organization	Světová zdravotnická organizace
wt	wild type	divoký typ
Xrs2	X-ray sensitive protein 2	protein 2 citlivý na rentgenové záření
Yku70	yeast KU protein	kvasinkový KU protein

1 Úvod

Proteiny strukturní údržby chromozomů (SMC; structural maintenance of chromosomes) se nachází u bakterií, archea i u eukaryot, tedy u všech žijících organismů napříč prokaryotickou a eukaryotickou linií. Jedná se o vysoce konzervovanou proteinovou rodinu. U eukaryot bylo identifikováno celkem šest různých SMC proteinů – SMC1 až SMC6. Tyto proteiny spolu s dalšími „non-SMC“ proteinovými podjednotkami tvoří heterodimerní SMC komplexy, kterými jsou kohezin Smc1/3, kondenzin Smc2/4 a zde studovaný komplex Smc5/6 (shrnuto v Hirano, 2002). První zmínky o komplexu Smc5/6 pochází přibližně z přelomu 20. a 21. století (Fousteri and Lehmann, 2000; Lehmann et al., 1995), kdy se již vědělo o existenci dalších dvou eukaryotických SMC komplexů, kohezinu a kondenzinu. Komplex Smc5/6 je nejméně pochopeným, ale rozhodně nejsložitějším SMC komplexem.

Funkce komplexu Smc5/6 sestávajícího z osmi proteinových podjednotek jsou spojovány především s opravou DNA poškození, genomovou integritou a segregací chromozomů během mitózy. Řada funkcí komplexu Smc5/6 je závislá na jeho enzymatických aktivitách, kterými jsou sumoylace, ubikvitinace a hlavně ATPázová aktivita (shrnuto v Solé-Soler and Torres-Rosell, 2020). Nicméně stále jsou zde mezery v pochopení molekulárních mechanismů fungování tohoto komplexu s ohledem na jeho vysoce důmyslnou strukturu. Právě otázce struktury a funkcí komplexu Smc5/6 se bude věnovat první část této bakalářské práce. Studie eukaryotického komplexu Smc5/6 byly většinou prováděny u kvasinkových modelových organismů, konkrétně u *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) a *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*). Některé studie jsou pak cíleny na savčí organismy, většinou na člověka. V této práci bude vždy uvedeno, kterého organismu se popisovaná věc týká. V řadě případů bude práce porovnávat strukturu a jednotlivé funkce komplexu Smc5/6 hlavně mezi výše zmíněnými organismy.

V současné době se ke komplexu Smc5/6 upírá velká pozornost, jelikož bylo nedávno zjištěno, že by mohl hrát významnou roli v životním cyklu HBV (hepatitis B virus) z čeledi *Hepadnaviridae*. Interakce HBV s komplexem Smc5/6 vede k umlčení virového genomu, což naznačuje zcela novou funkci eukaryotického komplexu Smc5/6 jako restričního faktoru (Decorsière et al., 2016; Murphy et al., 2016). Otázkou je, zda existuje podobný mechanismus i pro jiné DNA viry. Již byl započat výzkum definující možné role komplexu Smc5/6 u virů čeledi *Papillomaviridae* a *Herpesviridae*. Na samém prvopočátku je pak výzkum zkoumající interakce komplexu Smc5/6 s viry z čeledi *Polyomaviridae*. Druhá část této bakalářské práce se tak bude zabývat rolí komplexu Smc5/6 v životním cyklu HBV, HSV-1 (herpes simplex

virus type 1), virů z čeledi *Papillomaviridae* a JCPyV (JC polyomavirus). Jedná se o všechny DNA viry, u kterých byla prozatím definována interakce s komplexem Smc5/6. Velmi aktuálním zjištěním je zapojení komplexu Smc5/6 do replikačního cyklu HIV-1 (human immunodeficiency virus type 1) z čeledi *Retroviridae*. HIV-1 je zde zmíněn i přesto, že se jedná o RNA virus. V rámci svého replikačního cyklu totiž využívá procesu reverzní transkripce a jak bude ukázáno, tak komplex Smc5/6 interaguje právě s DNA formou tohoto viru.

Cílem této bakalářské práce je:

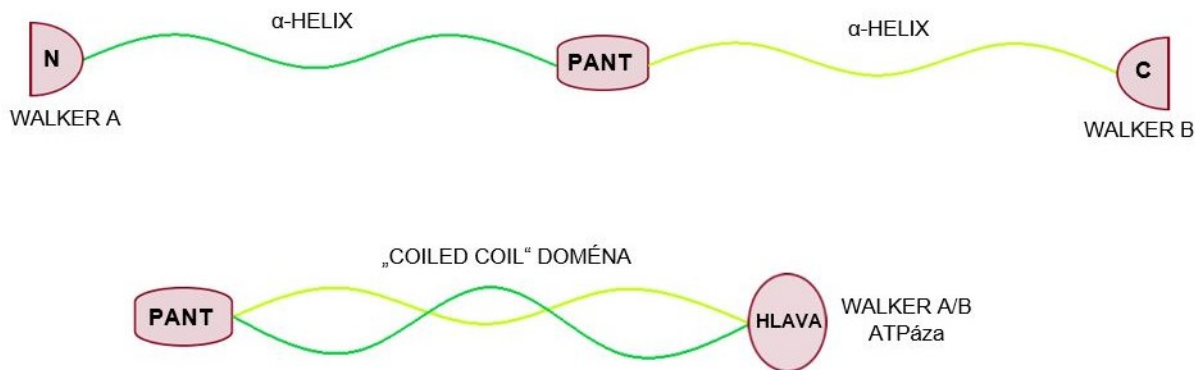
- **Popsat strukturu komplexu Smc5/6 a představit jeho základní funkce v eukaryotické buňce.**
- **Shrnout dosud známé poznatky týkající se možných rolí komplexu Smc5/6 při infekci DNA viry nebo při infekci viry s DNA intermediárním genomem.**

2 Komplex Smc5/6 – člen SMC rodiny proteinových komplexů

Stejně jako kohezin Smc1/3 a kondenzin Smc2/4 je i Smc5/6 jedním ze tří SMC komplexů nacházejících se u eukaryot. Všechny tyto tři komplexy jsou v buňce zapojeny do procesů, jejichž hlavním cílem je udržení stability genomu během buněčného cyklu. Kohezin drží pohromadě dvě sesterské chromatidy, kondenzin je důležitý pro kondenzaci chromozomů v mitóze a komplex Smc5/6 se podílí na opravě DNA, replikaci a chromozomové segregaci, a to jak v mitotických, tak v meiotických buňkách. Mimo to jsou známy i další funkce těchto SMC komplexů (shrnuto v Aragón, 2018). V této kapitole bude popsána obecná struktura SMC proteinu a následně se práce již zaměří na komplex Smc5/6. Bude popsána jeho architektura a přiblíženy základní funkce.

2.1 Základní struktura SMC proteinu

Pro eukaryotické komplexy kohezin, kondenzin i komplex Smc5/6 je typické, že sdílí charakteristickou strukturu SMC proteinové rodiny (Obr. 1). SMC proteinová rodina byla poprvé definována při popisu Smc1 u *S. cerevisiae* (Strunnikov et al., 1993) a následně i u obratlovců (Saitoh et al., 1994). Konzervovaná struktura SMC proteinu o velikosti 115 až 165 kDa je rozdělena na pět částí – pantová doména (hinge domain), dvě dlouhá ramena tvořena α -helixy a na koncích se nacházející N- a C-koncové domény obsahující Walker A a B motiv (Strunnikov et al., 1993; Saitoh et al., 1994). Walkerovy motivy byly poprvé popsány ve studii (Walker et al., 1982). Walker A motiv se vyznačuje sekvencí GXXGXGKS/T (kde X značí jakoukoliv aminokyselinu). Walker B motiv obsahuje sekvenci hhhhD (kde h značí hydrofóbní aa). Tyto motivy se podílí na vazbě nukleotidů a jsou typické například pro ABC (ATP-binding cassette) rodinu ATPáz (shrnuto v Schneider and Hunke, 1998). Pantová doména SMC proteinu je flexibilní a dochází v ní k ohybu, díky čemuž se N- a C-koncové domény přikládají k sobě za vzniku hlavové domény (head domain). Hlavová doména pak má funkci ATPázy s DNA vazebnou aktivitou. Dva α -helixy se k sobě přikládají antiparalelně a tvoří intramolekulární oblast svinuté cívky (coiled coil domain). SMC proteiny dimerizují prostřednictvím svých pantových domén (Haering et al., 2002; Löwe et al., 2001; Melby et al., 1998). Hlavové domény dvou SMC proteinů propojuje kleisinová podjednotka za vzniku kruhově uzavřených SMC komplexů (Haering et al., 2002; Schleiffer et al., 2003).

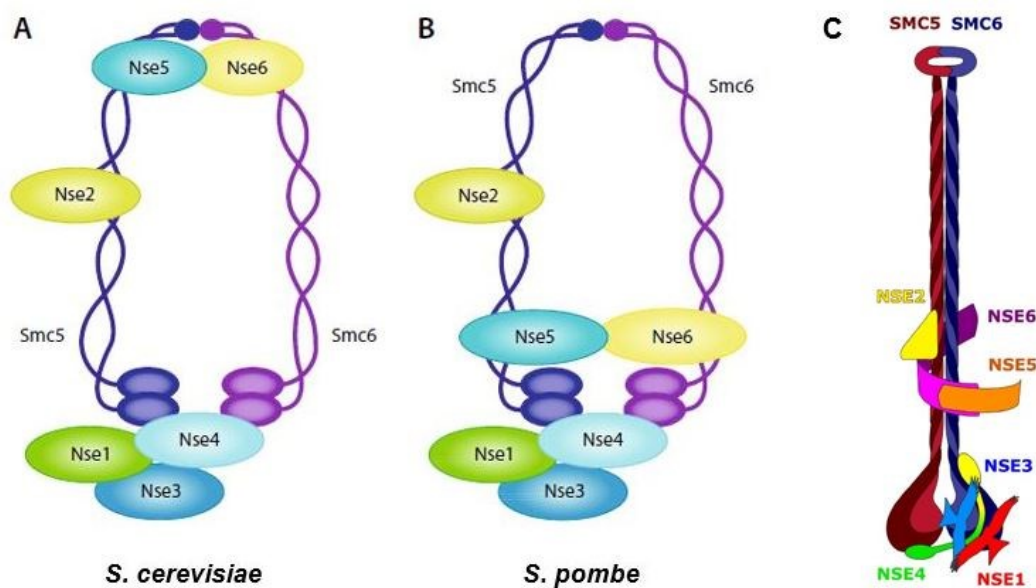


Obrázek 1: Struktura SMC proteinu. SMC protein je sklopen ve své centrální pantové doméně. To umožňuje, aby se Walkerovy motivy v N- a C-koncové doméně přiložily k sobě a vytvořily ATPázu, která je připojena k pantové doméně prostřednictvím dlouhé „coiled coil“ oblasti. Inspirováno (Kegel and Sjögren, 2010).

2.2 Struktura a biochemické aktivity komplexu Smc5/6

Komplex Smc5/6 se skládá celkem z osmi proteinových podjednotek, kterými jsou proteiny Smc5, Smc6 a šest „non-SMC“ podjednotek (NSE; non-structural maintenance of chromosomes (SMC) elements). Mezi NSE podjednotky patří Nse1, Nse2/Mms21, Nse3, Nse4, Nse5 a Nse6 (shrnuto v Aragón, 2018). Sofistikovaná struktura komplexu Smc5/6 je zásadní pro jeho fungování, přičemž několik studií prokázalo, že mutace v jednom z proteinů tohoto komplexu vedou k několika chorobám (Crabben et al., 2016; Payne et al., 2014). Mutace v některé z podjednotek komplexu Smc5/6 také činí buňky hypersenzitivní k činitlům, která poškozují DNA. Mezi takováto činitla patří UV záření, ionizující záření, hydroxymočovina nebo methylmethansulfonát (Fujioka et al., 2002; Morikawa et al., 2004; Pebernard et al., 2004; Verkade et al., 1999).

Jelikož prvotní základ v objevu komplexu Smc5/6 je u kvasinky *S. pombe* (Fousteri and Lehmann, 2000; Lehmann et al., 1995), bude na tomto organismu ukázáno, jak spolu jednotlivé proteinové podjednotky interagují. Na základě několika studií u *S. pombe* může být komplex Smc5/6 rozdělen do tří dílčích subkomplexů, kterými jsou Smc5-Smc6-Nse2/Mms21, Nse1-Nse3-Nse4 (Sergeant et al., 2005) a později objevený heterodimer Nse5-Nse6 (Pebernard et al., 2006). Na Obr. 2 je zobrazen komplex Smc5/6 zde popisovaných organismů – kvasinek *S. pombe* a *S. cerevisiae* a lidský komplex Smc5/6.



Obrázek 2: Celkové schéma komplexu Smc5/6. (A) *Saccharomyces cerevisiae*. (B) *Schizosaccharomyces pombe*. (C) lidský komplex Smc5/6. Převzato a upraveno z (Adamus et al., 2020; Verver et al., 2016).

2.2.1 Smc5-Smc6-Nse2/Mms21 subkomplex

Právě Smc5 a Smc6 jsou proteiny s charakteristickou strukturou SMC proteinové rodiny (Fousteri and Lehmann, 2000; Lehmann et al., 1995), která již byla popsána výše. Bylo prokázáno, že Smc5 a Smc6 spolu interagují a jsou si heterodimerními partnery (Fousteri and Lehmann, 2000). Tato vazba je zprostředkována jejich pantovými doménami (Sergeant et al., 2005), což odpovídá typickému chování SMC proteinů.

Nse2/Mms21 vykazuje podobnost s doménou Miz1/Siz1/PIAS/ARIP3 nalezenou v SUMO E3 ligázách (McDonald et al., 2003). V jeho C-koncové doméně se nachází SP-RING (Siz/PIAS really interesting new gene) doména, která je zodpovědná za SUMO E3 ligázovou aktivitu Nse2/Mms21 (Andrews et al., 2005). Sumoylace je posttranslační modifikace, která vede ke konjugaci malých modifikátorů podobných ubikvitinu (SUMO; small ubiquitin-like modifier) na cílové proteiny. Sumoylace hraje roli při aktivaci proteinů. Nse2/Mms21 jako SUMO E3 ligáza sumoyluje sebe sama a několik dalších cílových proteinů, mezi které patří i podjednotky komplexu Smc5/6, především v reakci na poškození DNA a v rámci procesu opravy DNA (Andrews et al., 2005). Příklady těchto cílových proteinů jsou Nse3 a Smc6 u *S. pombe* (Andrews et al., 2005) a Smc5 a opravný protein Yku70 u *S. cerevisiae* (Zhao and Blobel, 2005). V lidských buňkách jsou cílovými proteiny Nse2/Mms21 SUMO E3 ligázy například Smc5, Smc6, opravný protein TRAX, kohezinové podjednotky Scc1 a SA2

a podjednotky shelterinového komplexu TRF1, TRF2, RAP1 a TIN2 (Potts and Yu, 2005, 2007; Potts et al., 2006; Taylor et al., 2008). U *S. pombe* se protein Nse2/Mms21 prostřednictvím své N-koncové domény váže k Smc5 podjednotce, konkrétně k její střední části oblasti „coiled coil“, a společně tak tvoří subkomplex Smc5-Smc6-Nse2/Mms21 (Sergeant et al., 2005). Stejně je tomu tak i u *S. cerevisiae* (Duan et al., 2009; Zhao and Blobel, 2005) a u člověka (Adamus et al., 2020; Potts and Yu, 2005).

2.2.2 Nse1-Nse3-Nse4 subkomplex

U *S. pombe* tvoří tyto tři podjednotky stabilní heterotrimerní subkomplex (Pebernard et al., 2006; Sergeant et al., 2005). Nse1 interaguje s Nse3 prostřednictvím své N-koncové domény a zároveň stabilizuje interakci mezi Nse3 a Nse4 (Sergeant et al., 2005). Nse1-Nse3-Nse4 se váže k hlavovým doménám Smc5-Smc6, přičemž Nse4 zde funguje jako kleisinová podjednotka, která překlenuje hlavy Smc5-Smc6 (Palecek et al., 2006). Díky tomu je vytvořena kruhově uzavřená struktura komplexu Smc5/6. Stejně tak u *S. cerevisiae* a u člověka se trimer Nse1-Nse3-Nse4 váže k hlavovým doménám Smc5-Smc6 (Adamus et al., 2020; Duan et al., 2009).

Nse1 obsahuje NH-RING (Nse1-homolog really interesting new gene) doménu ve své C-koncové doméně, která je podobná té v ubikvitin E3 ligázách, a je stejně jako Nse2/Mms21 zapojen v procesu opravy DNA (McDonald et al., 2003; Pebernard et al., 2008). Zda Nse1 vykazuje aktivitu ubikvitin E3 ligázy v rámci komplexu Smc5/6 není zcela známo (Solé-Soler and Torres-Rosell, 2020). Nse3 má sekvenční podobnost s MAGE (melanoma-associated antigen) proteinovou rodinou (Pebernard et al., 2004).

2.2.3 Nse5-Nse6 subkomplex

Nse5 a Nse6 jsou si navzájem heterodimerními partnery a tvoří jeden ze subkomplexů, který jako jediný není esenciální pro *S. pombe* (Pebernard et al., 2006). Nse5-Nse6 se váže k hlavovým doménám komplexu Smc5/6, ale na odlišném místě než Nse4, pravděpodobně blíže k „coiled coil“ oblastem (Palecek et al., 2006). Naproti tomu je subkomplex Nse5-Nse6 u *S. cerevisiae* esenciální (Pebernard et al., 2006). Studie (Duan et al., 2009) navíc zjistila, že u *S. cerevisiae* interaguje dimer Nse5-Nse6 s pantovými doménami Smc5-Smc6. Tato studie tak naznačuje, že subkomplex Nse5-Nse6 reguluje dynamiku pantových domén Smc5-Smc6 (Duan et al., 2009). U *S. pombe* a *S. cerevisiae* se tedy ukázalo, že se pozice dimeru Nse5-Nse6 v rámci komplexu Smc5/6 liší. Odlišná pozice Nse5-Nse6 byla pozorována i u lidského komplexu Smc5/6. V lidských buňkách se totiž dimer Nse5-Nse6 váže k „coiled coil“ oblastem

Smc5-Smc6, konkrétně mezi hlavové domény a Nse2 vazebné místo. Tato interakce je však zprostředkována pouze Nse6, nikoli Nse5. Také u člověka může tento subkomplex přispívat k regulaci dynamiky komplexu Smc5/6 (Adamus et al., 2020). Celkově tyto poznatky značí určitou variabilitu komplexu Smc5/6 mezi různými organismy. Poloha subkomplexu Nse5-Nse6 v rámci komplexu Smc5/6 u těchto třech organismů je zřetelně vidět na Obr. 2.

2.2.4 ATPázová aktivita

Jak již bylo řečeno, SMC proteiny mají uzavřenou kruhovou strukturu a jejich hlavové domény vykazují ATPázovou aktivitu, díky které jsou SMC proteiny schopné vázat DNA. Mechanismus topologického zachycení molekuly DNA uvnitř kruhu SMC proteinu je regulován vazbou ATP, kdy dojde k otevření kruhu. Na topologickém zachycení se pravděpodobně podílí kleisinová podjednotka. Hydrolýzou ATP se poté kruh uzavírá (shrnuť v Solé-Soler and Torres-Rosell, 2020).

To platí i pro komplex Smc5/6. Studie u kvasinek a u člověka prokázaly, že komplex Smc5/6 má ATPázovou aktivitu a je tak schopen vázat preferenčně dvouvláknovou DNA (dsDNA; double-stranded DNA), ale i jednovláknovou DNA (ssDNA; single-stranded DNA) (Alt et al., 2017; Foustari and Lehmann, 2000; Gutierrez-Escribano et al., 2020; Zabrady et al., 2016). Na vazbě Smc5/6 k DNA se významně podílí i trimer Nse1/Nse3/Nse4, jelikož bylo objeveno, že konkrétně Nse3 podjednotka interaguje s DNA (Zabrady et al., 2016). Nicméně i pantové domény komplexu Smc5/6 jsou schopny vázat DNA (Alt et al., 2017). Pro přímou interakci komplexu Smc5/6 s molekulou DNA je potřeba vazba ATP na Smc6. Poté může díky hydrolýze ATP dojít k topologickému zachycení molekuly DNA. Komplex Smc5/6 vykazuje katenáčnickou aktivitu, protože je schopen vázat dvě nezávislé molekuly DNA. Bylo objeveno, že i stimuluje na Top2 (DNA topoisomerase 2) závislou katenaci plazmidů a rozpoznává a stabilizuje terciární struktury DNA se zkříženými helixy (Gutierrez-Escribano et al., 2020; Kanno et al., 2015). ATPázová aktivita komplexu Smc5/6 má vliv i na jeho SUMO ligázovou aktivitu. Díky vazbě ATP na ATPázové hlavy Smc5/6 totiž dojde ke konformační změně a aktivaci Nse2/Mms21 SUMO E3 ligázy, která tak může modifikovat cílové proteiny například v rámci opravy DNA (Bermúdez-López et al., 2015). Navíc se ukázalo, že navázáním KITE (kleisin-interacting tandem winged-helix element) proteinů Nse1 a Nse3 na kleisin Nse4 došlo ke zvýšení stability komplexu Smc5/6 v nepřítomnosti ATP. Naproti tomu vazba ATP na komplex Smc5/6 obsahující KITE podjednotky významně snížila stabilitu komplexu Smc5/6 v oblasti Nse4 propojení. To značí, že tento Nse1-Nse3-Nse4 subkomplex se podílí na otevírání kruhu, a proto usnadňuje dynamickou funkci komplexu Smc5/6 v rámci ATPázového cyklu

(Vondrova et al., 2020). Navzdory skutečnosti, že ATPázová aktivita hraje jedinečnou roli v celkové funkčnosti proteinů komplexu Smc5/6, není definován zcela přesný molekulární mechanismus, který řídí její aktivitu a jak ovlivňuje jednotlivé funkce proteinů.

2.3 Funkce komplexu Smc5/6

V následujících podkapitolách budou popsány vybrané funkce komplexu Smc5/6 v eukaryotické buňce. Pro fungování komplexu Smc5/6 je důležitá jeho ATPázová aktivita. Bude popsána role komplexu Smc5/6 v procesech opravy DNA, jeho role v genomové integritě či v rámci chromozomové topologie.

2.3.1 Role v opravě DNA

Nejčastěji skloňovanou funkcí komplexu Smc5/6 je zcela určitě jeho účast v procesech opravy DNA pomocí mechanismu homologní rekombinace. Jako příklady těchto procesů budou popsány role komplexu Smc5/6 při opravě dvouřetězcových zlomů DNA a při replikaci DNA.

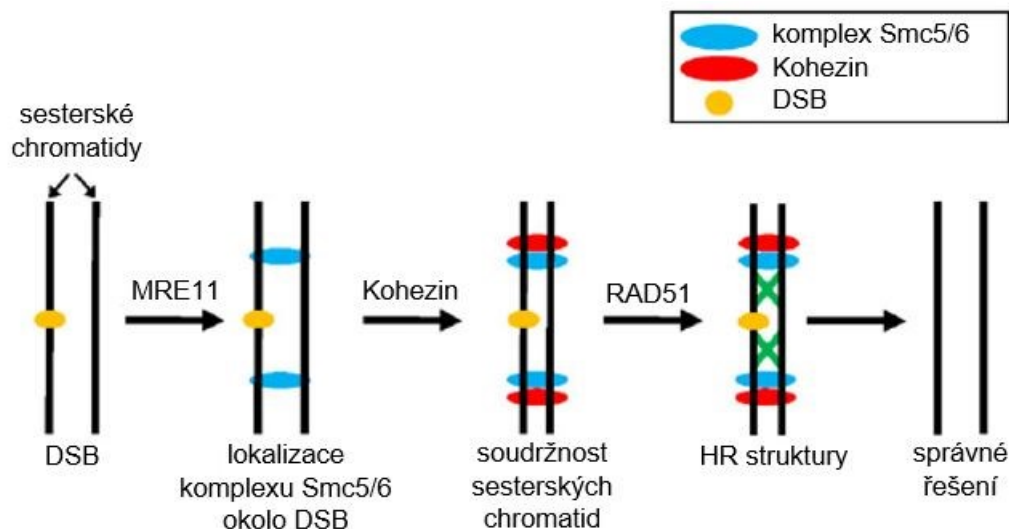
2.3.1.1 Oprava dvouřetězcových zlomů DNA pomocí homologní rekombinace

Bylo zjištěno, že Smc6 u *S. pombe* je zapojen v rekombinační dráze pro opravu DNA poškození indukovaného UV a ionizujícím zářením, konkrétně v rekombinační opravě dvouřetězcových zlomů (DSBs; double-strand breaks) (Lehmann et al., 1995; Verkade et al., 1999). To byl první náznak, že komplex Smc5/6 funguje v procesech opravy DNA pomocí homologní rekombinace.

U lidských i kvasinkových buněk bylo ukázáno, že je komplex Smc5/6 lokalizován do míst okolo DSBs a je důležitý pro zprostředkování opravy DNA homologní rekombinací (HR; homologous recombination) mezi sesterskými chromatidy (Betts Lindroos et al., 2006; De Piccoli et al., 2006; Potts et al., 2006). Protein Mre11 opravující dvouřetězcovou DNA (součást lidského MRN/kvasinkového MRX komplexu rozpoznávajícího DSBs) navádí komplex Smc5/6 na tyto zlomy v G2/M fázi buněčného cyklu (Betts Lindroos et al., 2006). V této opravné dráze funguje Smc5/6 společně s kohezinem a to tak, že Smc5/6 umožňuje lokalizaci kohezinu na DSBs (Potts et al., 2006). Naproti tomu účast komplexu Smc5/6 na opravě pomocí nehomologního spojování konců (NHEJ; non-homologous end joining) nebyla prokázána (De Piccoli et al., 2006; Potts et al., 2006). Když je v lidských buňkách nebo u kvasinek inhibován komplex Smc5/6, vede to ke snížení opravy DNA DSBs pomocí HR sesterských chromatid (De Piccoli et al., 2006; Potts et al., 2006). Buňky, které postrádají

funkční aktivitu Nse2/Mms21 SUMO E3 ligázy, jsou defektní v lokalizaci kohezinu na DSBs (McAleenan et al., 2012). Nse2/Mms21 SUMO E3 ligáza také sumoyluje některé podjednotky kohezinu, například Scc1, a podporuje tím tak rekombinaci sesterských chromatid (SCR; sister chromatid recombination) (Wu et al., 2012). Schéma opravy DSB pomocí HR je zobrazeno na Obr. 3. Celkově vzato, komplex Smc5/6 podporuje HR tím, že drží dva řetězce DNA uvnitř svého kruhu, a to v takové pozici, která umožní proběhnutí HR. Jeho funkce také závisí na sumoylačních aktivitách komplexu (shrnuto v Kegel and Sjögren, 2010).

Co se týče opravy DNA, komplex Smc5/6 hraje také roli v rámci aktivace kontrolních bodů buněčného cyklu, konkrétně udržuje buněčný cyklus v pozastavené fázi v přítomnosti poškození DNA. Oprava DNA při absenci komplexu Smc5/6 vede k deaktivaci kontrolních bodů poškození DNA a k vysoce aberantním mitózám u *S. pombe* (Harvey et al., 2004; Verkade et al., 1999).



Obrázek 3: Model pro funkci komplexu Smc5/6 v homologní rekombinaci. Komplex Smc5/6 se lokalizuje na DSB (dvouřetězcový zlom) způsobem závislým na Mre11. Dále komplex Smc5/6 usnadňuje lokalizaci kohezinového komplexu Smc1/3 a dojde k navození soudržnosti sesterských chromatid na DSB. Výsledkem je invaze Rad51 (rekombinační protein) a výměna vláken, aby mohlo dojít k bezchybné opravě DSB. Převzato a upraveno z (Potts, 2009).

2.3.1.2 Stabilizace, oprava a restart zastavených replikačních vidlic

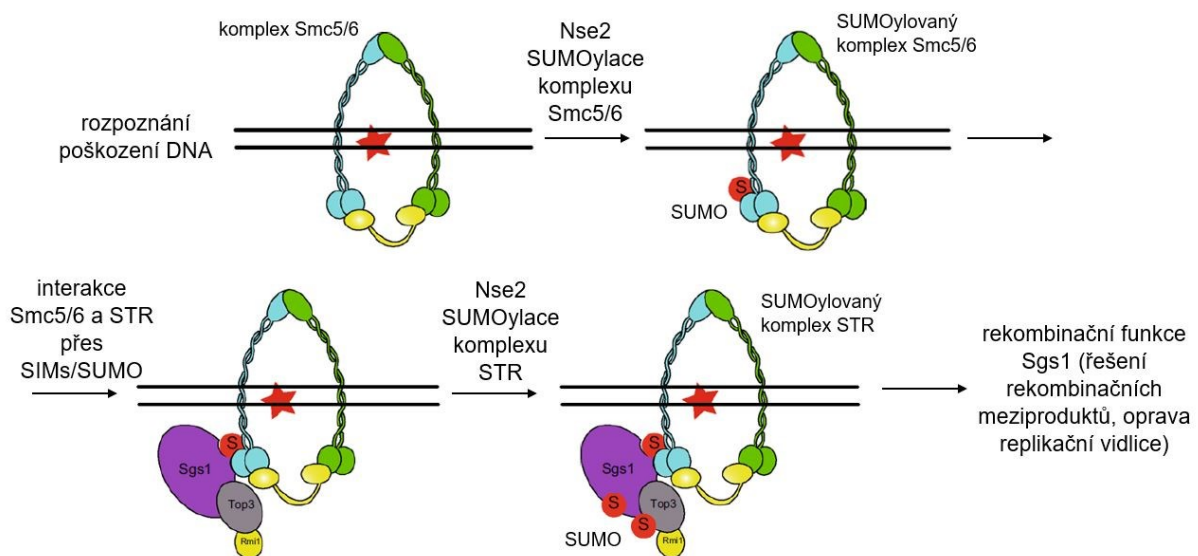
První náznak, že komplex Smc5/6 může hrát roli v replikaci DNA, byl učiněn již na základě objevu a analýzy proteinu Smc6 u *S. pombe* (Lehmann et al., 1995). Studie u kvasinek ukázaly, že komplex Smc5/6 je lokalizován na zastavené replikační vidlici, které vykazují značnou nestabilitu a hroutí se (Ampatzidou et al., 2006; Betts Lindroos et al., 2006;

Morikawa et al., 2004). Funguje zde tak, že drží pohromadě dvě nově replikované sesterské chromatidy v těsné blízkosti, takže může dojít k HR opravě zlomů vytvořených replikačním blokem (Morikawa et al., 2004). Nicméně pozdější studie naznačují, že spíše než pro stabilizaci těchto vidlic (Pebernard et al., 2004), je komplex Smc5/6 vyžadován přímo pro HR opravu zlomů a následné obnovení replikace (Ampatzidou et al., 2006). Komplex Smc5/6 tedy funguje jak v časně fázi HR, tak i ve fázi pozdní (Irmisch et al., 2009). V časně fázi komplex udržuje zastavené replikační vidlice v rekombinačně kompetentní konformaci připravené k restartu vidlice (Irmisch et al., 2009). Dále mohou být na zlomy nezávisle na Smc5/6 lokalizovány rekombinační proteiny jako Rad52 a RPA (Ampatzidou et al., 2006; Irmisch et al., 2009). V pozdní fázi HR opravy se již komplex Smc5/6 podílí na správném řešení rekombinačních meziproductů, které zabraňují dokončení replikace na zablokovaných a poškozených replikačních vidlicích (Ampatzidou et al., 2006; Bermúdez-López et al., 2010; Irmisch et al., 2009; Pebernard et al., 2006). Mezi rekombinační meziproducty patří Hollidayovy spoje (HJs; Holliday junctions) či D-smyčka (D-loop; displacement-loop), které se tvoří během homologního párování a DNA syntézy v rámci HR opravy související například i s replikací (shrnuto v Sarbajna and West, 2014). Na zabránění akumulace toxických meziproductů na vidlici během HR opravy spojené s replikací se spolu s komplexem Smc5/6 podílí i jiné proteiny. Mezi ty patří například s Smc5/6 interagující protein Rad60, protein Esc2, DNA helikáza Mph1 nebo helikáza Sgs1 (Ampatzidou et al., 2006; Bermúdez-López et al., 2016; Chen et al., 2009; Sollier et al., 2009). V následujících odstavcích bude popsána souhra mezi Smc5/6, Mph1 a Sgs1 helikázami v rámci HR opravy.

Bylo zjištěno, že Sgs1 helikáza u kvasinek (lidská BLM helikáza) se podílí na řešení rekombinačních meziproductů na zastavených replikačních vidlicích (Liberi et al., 2005). Později se ukázalo, že klíčovým regulátorem těchto rekombinačních funkcí komplexu STR (Sgs1-Top3-Rmi1) je komplex Smc5/6 a jeho Nse2/Mms21 SUMO E3 ligázová aktivita (Obr. 4) (Bermúdez-López et al., 2016; Bonner et al., 2016). Nejprve dochází k autosumoylaci komplexu Smc5/6. Takto sumoylovaný komplex Smc5/6 rozpoznává Sgs1 helikáza prostřednictvím svých dvou SUMO-interagujících motivů (SIMs; SUMO-interacting motifs). Následně dojde k sumoylaci STR komplexu ligázou Nse2/Mms21 SUMO E3 přítomnou v komplexu Smc5/6 a účinnému odstranění toxických rekombinačních meziproductů díky aktivitě STR (Bermúdez-López et al., 2016; Bonner et al., 2016).

U *S. cerevisiae* komplex Smc5/6 interaguje s rekombinačním faktorem zapojeným v HR opravě spojené s replikací, DNA helikázou Mph1 (Chen et al., 2009). Bylo zjištěno, že u mutantů *smc6* a *mms21* je během replikace helikázová aktivita Mph1 zodpovědná

za akumulaci rekombinačních struktur ve tvaru X (Chen et al., 2009). V tomto kontextu je pojem rekombinační struktury ve tvaru X odvozen od toho, že když se buňky s mutací v komplexu Smc5/6 replikovaly v přítomnosti methylmethansulfonátu, tak na 2D gelové elektroforéze byly detekovány rekombinační struktury jako molekuly DNA ve tvaru X (Branzei et al., 2006; Sollier et al., 2009). Pokud tedy dojde k nadměrné expresi Mph1, zhorší se projevy mutací komplexu Smc5/6. Naopak odstranění Mph1 helikázy potlačí defekty způsobené mutacemi v komplexu Smc5/6, například se sníží úroveň nevyřešených rekombinačních meziproductů u mutantů *smc5/6*. Komplex Smc5/6 tak zřejmě zabraňuje akumulaci aberantních rekombinačních struktur generovaných Mph1 helikázou (Chavez et al., 2011; Chen et al., 2009).



Obrázek 4: Komplex STR a jeho lokalizace a aktivace závislá na sumoylaci komplexem Smc5/6. Schematické znázornění pro-rekombinogenních funkcí Sgs1 helikázy. Při poškození DNA, které vyžaduje funkce STR, je Smc5/6 schopen rozpoznat vhodné DNA substráty pro Sgs1. Vazba Smc5/6 na DNA vede k aktivaci Nse2/Mms21 SUMO E3 ligázy. Nse2 pak sumoyluje několik podjednotek komplexu Smc5/6. Lokalizace Sgs1 (jako součásti komplexu STR) nastává díky rozpoznání sumoylovaného komplexu Smc5/6 prostřednictvím SIM domén Sgs1. Poté může Nse2 sumoylovat Sgs1 a Top3. Nse2-závislá sumoylace Sgs1 a Top3 vede k aktivaci funkcí STR v rekombinaci. Převzato a upraveno z (Bermúdez-López and Aragon, 2017).

Role komplexu Smc5/6 v rámci procesu opravy DNA je obdobná i v meiotických buňkách. Několik studií u *S. cerevisiae* tvrdí, že je komplex Smc5/6 lokalizován na meiotické DSBs a hraje roli v dokončení opravy v rámci meiotické rekombinace. Smc5/6 totiž podporuje integritu meiotických opravných procesů tím, že zpracovává a zabraňuje akumulaci aberantních rekombinačních meziproductů mezi homologními chromozomy, které potlačují meiotické

dělení. Bylo zjištěno, že na těchto meiotických rekombinačních procesech se podílí i Nse2/Mms21 SUMO E3 ligáza komplexu Smc5/6 (Copsey et al., 2013; Farmer et al., 2011; Lilienthal et al., 2013; Xaver et al., 2013).

2.3.2 Role v genomové integritě

2.3.2.1 Údržba repetitivních sekvencí

U *S. cerevisiae* bylo ukázáno, že se komplex Smc5/6 nachází na repetitivních oblastech chromatinu, konkrétně v oblasti ribozomální DNA (rDNA; ribosomal DNA) a na telomerách a centromerách (Betts Lindroos et al., 2006; Torres-Rosell et al., 2005).

2.3.2.1.1 Telomery

Studie u *S. cerevisiae* ukázala, že aktivita Nse2/Mms21 SUMO E3 ligázy komplexu Smc5/6 je zásadní pro správnou organizaci telomer. Mutantní buňky *mms21-11* postrádající SP-RING doménu s SUMO E3 ligázovou aktivitou totiž vykazovaly defekty ve shlukování telomer, jejich umlčování a regulaci délky (Zhao and Blobel, 2005). Mutantní buňky *nse3-1* vykazovaly částečně podobné fenotypy (Moradi-Fard et al., 2016). A u mutantních buněk *smc5/6* byla navíc zaznamenána vyšší frekvence zlomových událostí na telomerách (Noël and Wellinger, 2011). Komplex Smc5/6 také zabraňuje hromadění rekombinačních meziproductů ve tvaru X na telomerách v procesu stárnutí, které je zpomaleno stimulací aktivity Smc5/6 a jeho Nse2/Mms21 SUMO E3 ligázy (Chavez et al., 2010). To je v souladu se studií, která také prokázala, že Nse2/Mms21 SUMO E3 ligáza komplexu Smc5/6 je potřebná ke zpomalení stárnutí buněk postrádajících telomerázu (Noël and Wellinger, 2011).

Přibližně 10–15 % rakovinných buněk využívá ke své neomezené buněčné proliferaci mechanismus alternativního prodloužení telomer (ALT; alternative lengthening of telomeres), který je závislý na homologní rekombinaci a dochází k němu v nepřítomnosti telomerázy. Pro buňky využívající ALT mechanismus je typické, že jsou telomery lokalizovány do modifikovaných PML tělísek (promyelocytic leukemia bodies) známých jako APBs (ALT-associated PML bodies). Pro buňky, které udržují své telomery prostřednictvím ALT mechanismu a vykazují určité charakteristické znaky, se používá označení ALT buňky (shrnutí v Cesare and Reddel, 2010). Studie u lidských buněk prokázaly, že se komplex Smc5/6 lokalizuje do APBs v ALT buňkách a je zodpovědný za homologní rekombinaci telomer. Při absenci komplexu Smc5/6 dochází k buněčnému stárnutí, protože telomery v ALT buňkách procházejí progresivním zkracováním. Za nábor telomer do APBs je zodpovědná ligáza

Nse2/Mms21 SUMO E3 komplexu Smc5/6, která sumoyluje TRF1 a TRF2 podjednotky shelterinového komplexu vázaného na konce telomer. Dále ligáza Nse2/Mms21 SUMO E3 sumoyluje také RAP1 a TIN2 podjednotky shelterinu (Potts and Yu, 2007).

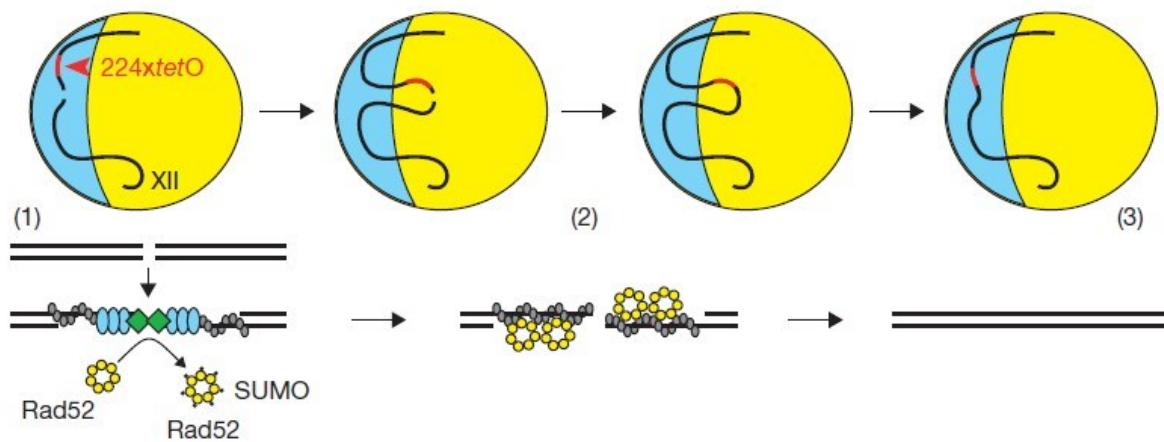
2.3.2.1.2 rDNA a heterochromatin

Jak shrnuje jedna novější práce (Tsekrekou et al., 2017), rDNA nacházející se v jadérku kóduje ribozomální RNA (rRNA; ribosomal RNA), což je hlavní složka ribozomů. rDNA je vzhledem ke své repetitivní povaze náchylná k mimořádným rekombinačním událostem a DNA poškození, což často vede k tvorbě DSBs. Tyto DSBs jsou následně opraveny pomocí HR v nukleoplazmě, tedy mimo jadérko (shrnutu v Tsekrekou et al., 2017).

Následně bude popsáno, jak je komplex Smc5/6 zapojen v opravě zlomů vyskytujících se na rDNA. Autoři studie (Torres-Rosell et al., 2007) ukázali, že pokud se na rDNA u *S. cerevisiae* vyskytne DSB, je opraven pomocí HR mimo jadérko. DSBs na rDNA v jadérku jsou rozpoznány DNA opravným komplexem MRX (Mre11-Rad50-Xrs2). Dále dochází k vytvoření 3' ssDNA převisů a navázání proteinu RPA. Navázání dalších HR opravných proteinů jako Rad51 a Rad52 již probíhá pouze po relokizaci DSB mimo jadérko (Torres-Rosell et al., 2007). Komplex Smc5/6 se vyskytuje v jadérku, kde je vyžadován pro udržení stability rDNA, což bylo objeveno u *S. cerevisiae* (Torres-Rosell et al., 2005). Díky komplexu MRX je komplex Smc5/6 lokalizován na DSBs rDNA. Smc5/6 a hlavně jeho sumoylační aktivita zabraňují tvorbě ohnisek Rad52 v jadérku. Mimo jadérko tedy dochází k homologní rekombinaci (Torres-Rosell et al., 2007). Během jiných HR procesů probíhá vazba HR proteinů na stejném místě jako navázání MRX komplexu. Na Obr. 5 je zobrazeno schéma průběhu HR opravy rDNA DSB.

Podobná pozorování byla učiněna i v případě DSBs vyskytujících se v oblasti heterochromatinu. Bylo zjištěno, že u *Drosophila* a myších buněk jsou heterochromatické DSBs opraveny pomocí HR mimo tuto doménu. Do heterochromatických DSBs je lokalizován komplex Smc5/6 společně s komplexem Arp2/3 (actin related protein 2/3 complex). Do těchto DSBs je dále lokalizován aktivátor myosinu Unc45 díky Smc5/6 a jeho interakci s nukleárními myosiny. K relokizaci DSBs mimo heterochromatin dochází prostřednictvím schopnosti myosinů pohybovat se podél aktinových vláken sestavených v místech opravy pomocí Arp2/3. Teprve mimo heterochromatin může dojít k účinné opravě DSBs pomocí HR a opravného proteinu Rad51. Komplex Smc5/6 blokuje tvorbu Rad51 ohnisek v heterochromatinu a zabraňuje tak aberantním rekombinačním událostem. Dále Smc5/6 a jeho SUMO E3 ligázová

aktivita zde plní úlohu v rámci regulace aktivace a lokalizace Arp2/3 a Unc45 do heterochromatických DSBs (Caridi et al., 2018; Chiolo et al., 2011).



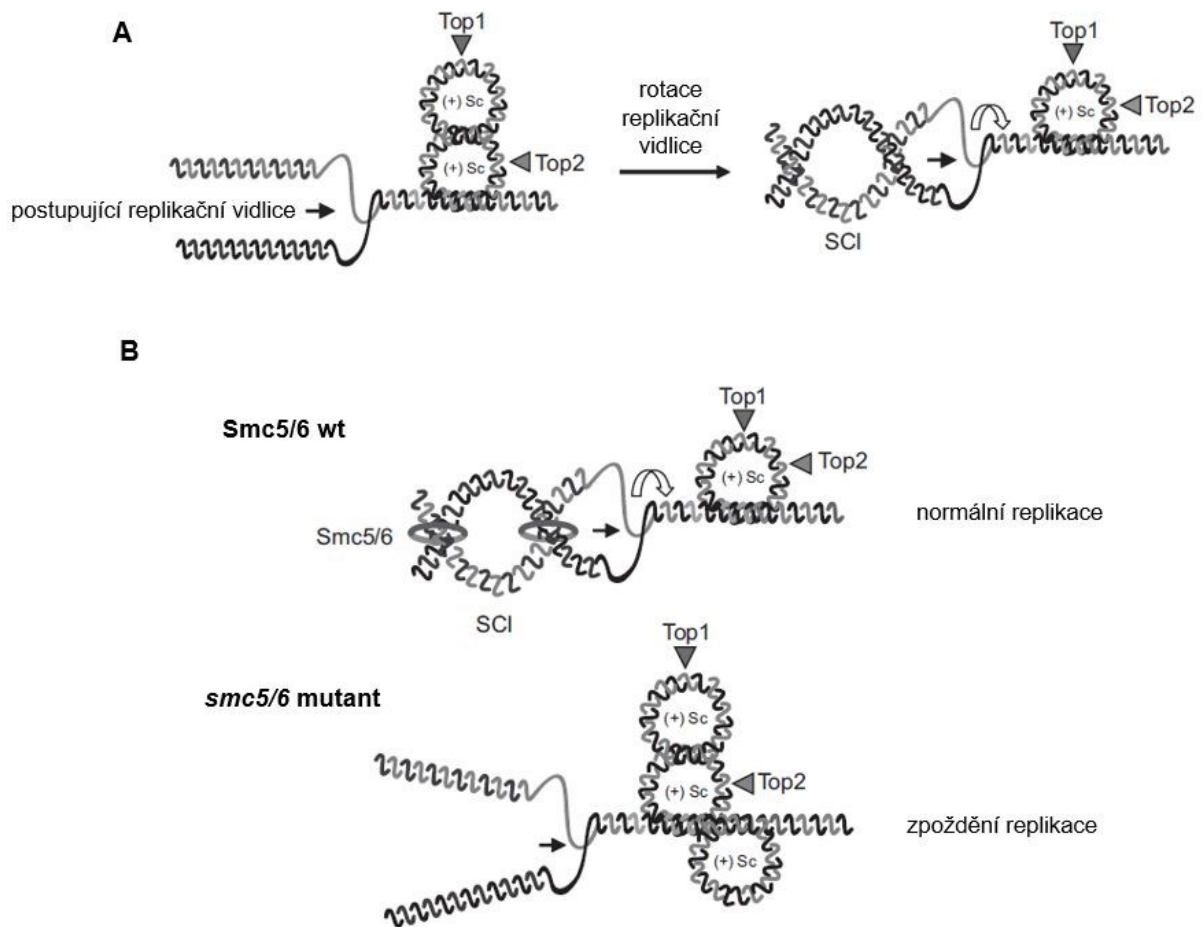
Obrázek 5: Model pro opravu DSBs v rDNA. Jadérko (modré) je obohaceno o komplex Smc5/6 (modré oválky), zatímco Rad52 (žluté kruhy) je nejhojnější mimo jadérko. DSB v rDNA je nejprve rozpoznán komplexem MRX (zelené kosočtverce), který usnadňuje navázání komplexu Smc5/6 na tento zlom. Sumoylace Rad52 a vysoká lokální koncentrace komplexu Smc5/6 zabraňuje tvorbě Rad52 ohnisek v jadérku (1). Inhibiční účinek komplexu Smc5/6 je zmírněn, když DSB přechodně opustí jadérko. To umožňuje navázání nesumoylovaného Rad52 na DSB pomocí proteinu RPA (šedá vlákna) po disociaci komplexu MRX (2). Když je oprava dokončena, rDNA repeticce znovu vstoupí do jadérka (3). Převzato z (Torres-Rosell et al., 2007). 224xtetO: místo pro vazbu červeného fluorescenčního proteinu, aby bylo možné sledovat pohyb rDNA s DBS

2.3.2.2 Chromozomová topologie

Pojem chromozomová topologie je úzce spojen s rolí DNA topoizomeráz. Ty dokážou vyřešit topologické problémy DNA, které nastávají například během replikace v důsledku oddělování dvou rodičovských řetězců dsDNA. DNA molekula se přetáčí, což způsobuje akumulaci nadšroubovicových vinutí (DNA supercoils) (shrnuto v Wang, 2002).

Studie u *S. cerevisiae* ukázala, že lokalizace komplexu Smc5/6 na chromozomy v nepoškozených buňkách, kde hraje roli v chromozomové segregaci, je podobná kohezinu a je ovlivněna proteinem Scc2. Komplex Smc5/6 se nejčastěji nachází na duplikovaných chromozomech a počet jeho vazebných míst se lineárně zvyšuje s rostoucí délkou chromozomů (Betts Lindroos et al., 2006). Spolu s rostoucí délkou chromozomů se zvyšuje i míra superhelikálního napětí vyvolaného replikací. Kromě enzymů topoizomeráz typu I a II se i komplex Smc5/6 podílí na zpracování superhelikálního napětí, a to v rámci mechanismu rotace replikační vidlice (Obr. 6). Smc5/6 napomáhá rotaci replikační vidlice prostřednictvím

sekvestrace propletení sesterských chromatid (SCIs; sister chromatid intertwinings), a tím dochází k zabránění akumulace pozitivních nadšroubovicových vinutí před postupující replikační vidlicí (Kegel et al., 2011). To, že se komplex Smc5/6 váže na SCIs a zpracovává je nezávisle na Top2, je v souladu s pozdějším a již výše zmíněným pozorováním, že Smc5/6 rozpoznává a stabilizuje terciární struktury DNA se zkříženými helixy (Gutierrez-Escribano et al., 2020; Jeppsson et al., 2014).



Obrázek 6: Schéma replikací indukovaného superhelikálního napětí a jeho řešení. (A) Během replikace se DNA před postupující replikační vidlicí přetáčí z důvodu separace dvou rodičovských řetězců DNA. Tato pozitivní nadšroubovicová vinutí DNA (+ Sc, positive supercoiling) musí být odstraněna, aby se zabránilo inhibici replikace. To je vyřešeno topoizomerázami (Top1 a Top2), které uvolňují napětí prostřednictvím přechodné tvorby DNA zlomů. Dalším mechanismem, aby se zabránilo hromadění + Sc před vidlicí, je rotace replikační vidlice. Tato rotace vede k tvorbě propletení sesterských chromatid (SCIs) za vidlicí. (B) Potenciální role komplexu Smc5/6 je rozlišení superhelikálního napětí. Smc5/6 sekvestruje SCIs za postupující vidlicí, a tím usnadňuje otáčecí mechanismus (Smc5/6 wt, wild type). Pokud je Smc5/6 nefunkční, otáčení mechanismus je potlačen. + Sc se hromadí před vidlicí, což vede ke zpoždění replikace (mutant *smc5/6*). Převzato a upraveno z (Kegel and Sjögren, 2010).

3 Interakce komplexu Smc5/6 s DNA viry a viry s DNA intermediárním genomem

V této kapitole bude popsáno, jak buněčný komplex Smc5/6 interaguje s vybranými DNA viry. Konkrétně bude popsána interakce komplexu Smc5/6 s HBV z čeledi *Hepadnaviridae*, HSV-1 z čeledi *Herpesviridae*, viry z čeledi *Papillomaviridae* a s JC virem z čeledi *Polyomaviridae*. Experimenty byly většinou prováděny s lidskými buňkami. Výzkum této problematiky začal poměrně nedávno, proto je množství informací omezené. Nejvíce je prozkoumána role komplexu Smc5/6 při HBV a papilomavirové infekci. Bude také zmíněna interakce komplexu Smc5/6 s RNA virem HIV-1 z čeledi *Retroviridae*, jehož genom v určité fázi infekčního cyklu funguje ve formě DNA.

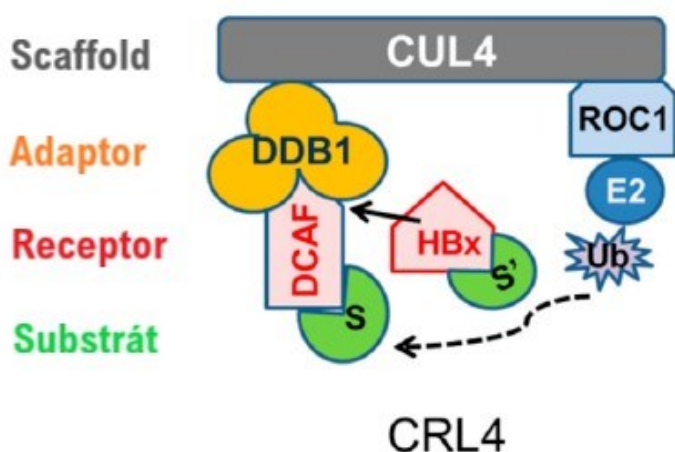
3.1 *Hepadnaviridae*

3.1.1 Virus hepatitidy B

Virus hepatitidy B (HBV; hepatitis B virus) je virus řadící se do čeledi *Hepadnaviridae*. U lidí napadá HBV játra a způsobuje akutní i chronickou hepatitidu. Chronická hepatitida B může vést až k rozvoji cirhózy jater nebo hepatocelulárního karcinomu (HCC). HBV je obalený DNA virus s ikosahedrální kapsidou. Genom HBV je tvořen přibližně 3,2 kbp dlouhou relaxovanou kruhovou DNA (rcDNA; relaxed-circular DNA). Jedná se o kruhovou dsDNA s ssDNA úseky – kompletní (-) řetězec a nekompletní (+) řetězec. rcDNA genom je replikován prostřednictvím pregenomové RNA (pgRNA; pregenomic RNA). Po vstupu HBV do jádra hepatocytu je rcDNA opravena hostitelskými enzymy za vzniku kovalentně uzavřené kruhové DNA (cccDNA; covalently closed circular DNA). Tato cccDNA následně slouží jako templát pro syntézu všech virových RNA transkriptů včetně pgRNA. V cytoplazmě je RNA přepsána celkem do 7 virových proteinů, kterými jsou virová polymeráza (Pol), E antigen (HBeAg), „core“ protein (HBcAg), tři různě dlouhé povrchové proteiny (L-HBs, M-HBs, S-HBs) a protein X (HBx). pgRNA je enkapsidována a dochází k reverzní transkripci virovou polymerázou zpět do podoby rcDNA (shrnutí v Gómez-Moreno and Garaigorta, 2017; Tsukuda and Watashi, 2020).

HBx je regulační protein o hmotnosti přibližně 17 kDa a délce 154 aa. Hraje roli v mnoha procesech, z nichž nejvýznamnější je pravděpodobně replikace a transkripce HBV. Dále je známo, že HBx interaguje s několika buněčnými faktory a modifikuje tak různé pochody v buňce. Má vliv například na progresi buněčného cyklu, apoptózu, genovou expresi, různé

signální dráhy či se podílí na rozvoji HCC (shrnutí v Livingston et al., 2017; Slagle and Bouchard, 2016). Příkladem interagujícího buněčného faktoru je interakce HBx s proteinem DDB1 (DNA-damage binding protein 1) (Lee et al., 1995; Lin-Marq et al., 2001). DDB1 se váže na Cullin4 (CUL4) za vzniku ubikvitin E3 ligázového komplexu DDB1-CUL4 (souhrnně CRL4) (Angers et al., 2006; Shiyanov et al., 1999). Podrobné schéma komplexu CRL4 s popisem je zobrazeno na Obr. 7. Protein HBx a jeho interakce s komplexem DDB1-CUL4 jsou uvedeny právě z hlediska své důležitosti v rámci této práce.

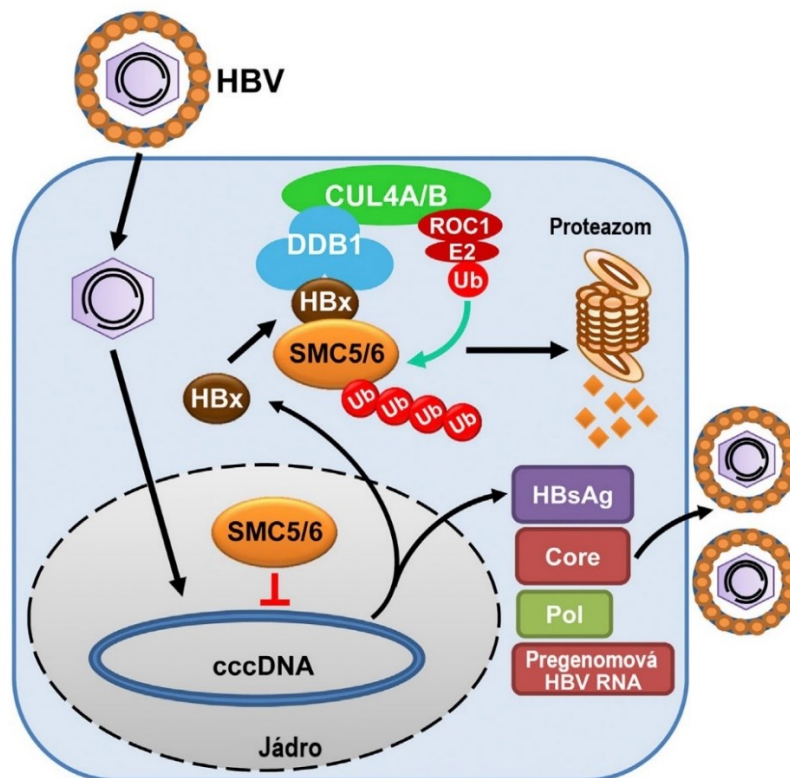


Obrázek 7: Ubikvitin ligázový komplex Cullin-4 RING (CRL4). Komplex CRL4 má modulární strukturu skládající se CUL4 lešení (scaffold), DDB1 jako adaptorového proteinu, a DCAF (DDB1- and CUL4-associated factor 1) receptorových proteinů, které rekrutují substrátové (S) proteiny pro ubikvitinaci a degradaci. S s čárkou (S') označuje odlišné substráty rekrutované proteinem HBx. ROC1 (regulator of cullins protein 1) obsahuje RING (really interesting new gene) finger doménu, která váže enzym E2 a ubikvitin (Ub). HBV protein X (HBx) je virový DCAF, který se váže k DDB1. Převzato a upraveno z (Minor et al., 2020).

označuje odlišné substráty rekrutované proteinem HBx. ROC1 (regulator of cullins protein 1) obsahuje RING (really interesting new gene) finger doménu, která váže enzym E2 a ubikvitin (Ub). HBV protein X (HBx) je virový DCAF, který se váže k DDB1. Převzato a upraveno z (Minor et al., 2020).

Jakou roli zde tedy hraje komplex Smc5/6? Dvě nezávislé studie (Decorsière et al., 2016; Murphy et al., 2016) lidských hepatocytů publikované přibližně se čtyř měsíčním rozestupem demonstrují stejné výsledky. Poměrně novým a podstatným zjištěním je, že komplex Smc5/6 funguje jako hostitelský restriční faktor HBV. Smc5/6 se totiž váže na HBV cccDNA a inhibuje virovou transkripci (Decorsière et al., 2016; Murphy et al., 2016). To, že je komplex Smc5/6 schopen vázat kruhové DNA, bylo ukázáno již dříve (Kanno et al., 2015). Přesný mechanismus detekce a inhibice transkripce HBV cccDNA pomocí Smc5/6 však není znám. (Decorsière et al., 2016; Murphy et al., 2016). Nicméně nedávná studie (Xu et al., 2018) popsala nový protein, který hraje roli v Smc5/6 mechanismu inhibice transkripce HBV, herpes simplex viru či epizomální DNA. Bylo zjištěno, že PJA1 (E3 ubikvitin-protein ligáza Praja-1) v jádře interaguje s komplexem Smc5/6 a usnadňuje vazbu Smc5/6 na virovou a epizomální DNA. Autoři se domnívají, že PJA1-Smc5/6 komplex rozpoznává a umlčuje DNA způsobem závislým na DNA topoizomerázách (Xu et al., 2018). Další podrobnosti mechanismu interakce

PJA1 s genomy byly studovány u herpes simplex viru a budou popsány níže (kapitola 3.2). Nyní však zpět k inhibici transkripce HBV cccDNA pomocí komplexu Smc5/6. HBV má vlastní obranný mechanismus, jak zabránit této inhibici transkripce, a to právě prostřednictvím svého regulačního proteinu HBx. HBx v interakci s ubikvitin E3 ligázovým komplexem DDB1-CUL4 cílí na svůj substrát, kterým je komplex Smc5/6. Dojde k ubikvitinaci Smc5/6 a jeho následné degradaci v proteazomu (Obr. 8). Díky tomu může opět dojít k transkripci HBV z cccDNA. Protein HBx a komplex Smc5/6 si jsou tedy navzájem antagonisty (Decorsière et al., 2016; Murphy et al., 2016). Tento antagonistický vztah HBx a Smc5/6 je u savců evolučně konzervován. Bylo totiž zjištěno, že proteiny HBx savčích HBV mají schopnost degradovat komplex Smc5/6 a působit tak proti jeho antivirové aktivitě, a to druhově nezávislým způsobem (Abdul et al., 2018). Tento mechanismus degradace komplexu Smc5/6 pomocí HBx a DDB1-CUL4 ubikvitin E3 ligázového komplexu potvrdila i novější studie (Minor et al., 2020), která také odhalila, že tímto mechanismem dochází k degradaci i jiných restričních faktorů HBV (Minor et al., 2020).



Obrázek 8: Schéma restričního faktoru Smc5/6 cíleného proti HBV a jeho HBx zprostředkované degradace. Protein HBx se v cytoplazmě váže na komplex DDB1-CUL4 za vzniku HBx-DDB1-CUL4 a cílí na komplex Smc5/6. Následně dojde k ubikvitinaci (Ub) Smc5/6 a jeho proteazomální degradaci. Převzato a upraveno z (Murphy et al., 2016).

Dalším důležitým poznatkem v rámci této problematiky bylo objevení souvislosti mezi komplexem Smc5/6, inhibicí transkripce HBV a PML jadernými tělísky také známými jako ND10 (nuclear domain 10). Bylo ukázáno, že pro umlčení HBV transkripce z cccDNA v nepřítomnosti HBx je nutné umístění Smc5/6 do ND10 jaderných tělísek. Přičemž ND10 jaderná tělíška zde hrají roli pouze jako jakýsi podpůrný systém podporující lokalizaci a funkce Smc5/6 při inhibici HBV transkripce (Niu et al., 2017). Tomuto závěru předcházelo několik důležitých pozorování. Nejprve bylo zjištěno, že v neinfikovaných lidských hepatocytech dochází k překryvům ohnisek Smc5/6 s PML a Sp100, jakožto strukturních komponentů ND10 jaderných tělísek. Lokalizace Smc5/6 v jádrech lidských hepatocytů je tedy shodná s ND10. Dále bylo pozorováno, že v hepatocytech infikovaných HBV dochází k degradaci Smc5/6 z ND10 pomocí HBx, ale hladiny PML a Sp100 se nemění (Niu et al., 2017).

Souhrnně řečeno, komplex Smc5/6 funguje jako hostitelský antivirový faktor. Při absenci funkčního HBx totiž reprimuje transkripci HBV. Naopak funkční HBx se podílí na degradaci komplexu Smc5/6. Protein HBx tedy významně podporuje transkripci HBV cccDNA. Stále je však mnoho nevyřešených nejasností týkajících se této problematiky. Kromě mechanismu detekce a inhibice transkripce HBV genomu komplexem Smc5/6 není známo ani to, jak může být protein HBx exprimován právě při zmíněné transkripční inhibici. Existují domněnky, že některé mRNA pro HBx mohou být přepsány dříve, než komplex Smc5/6 zablokuje HBV transkripci. Další možností je, že HBx mRNA se dostává do buňky z extracelulárního prostředí (shrnuto v Livingston et al., 2017). Zajímavé je, že vzhledem ke strukturní příbuznosti komplexu Smc5/6 s kohezinem a kondezinem, pouze Smc5/6 je degradován způsobem závislým na HBx. To podporuje jedinečnou funkci Smc5/6 jako restričního faktoru HBV (Murphy et al., 2016).

Co se týče léčby chronické hepatitidy B, je zapotřebí eliminace nebo trvalá deaktivace HBV cccDNA. To se ale současným terapeutickým přístupům nedaří. Ty sice určitým způsobem dokážou potlačit virovou infekci, ale HBV cccDNA v infikovaných buňkách stále přetrvává. Současná antivirová terapie chronické hepatitidy B je tedy omezena na přímo působící antivirotika nebo na léčbu pomocí interferonů (IFN). Bylo už však prokázáno, že léčba interferony vede k částečné ztrátě HBV cccDNA. Často je využíván regulační protein HBx jako cíl terapeutické léčby chronické hepatitidy B (shrnuto v Levrero et al., 2016). Následně bude uvedeno pár příkladů léčby HBV mající souvislost s komplexem Smc5/6. TRIM14, jakožto IFN-I stimulovaný gen, interaguje s proteinem HBx a zamezuje, aby komplex HBx-DDB1-CUL4 cílil na Smc5/6. TRIM14 tedy inhibuje transkripci HBV v hepatocytech (Tan et al., 2018). Podobně funguje CBF β (core-binding factor subunit β) indukovaný IFN-III

(Xu et al., 2019). K potlačení HBV transkripce dále významně přispívá antivirotikum nitazoxanid. Nitazoxanid je inhibitor interakce proteinu HBx s DDB1, díky čemuž nedochází k degradaci komplexu Smc5/6 (Sekiba et al., 2019). Jako poslední budou uvedeny terapeutické přístupy využívající siRNA (small interfering RNA) nebo peg-IFN α (pegylated interferon α). Ty ukazují, že v lidských hepatocytech dochází ke snížení hladin proteinu HBx. Zároveň ale dochází k znovuoobjevení se komplexu Smc5/6, jeho navázání na HBV cccDNA a inhibici transkripce (Allweiss et al., 2021).

3.2 *Herpesviridae*

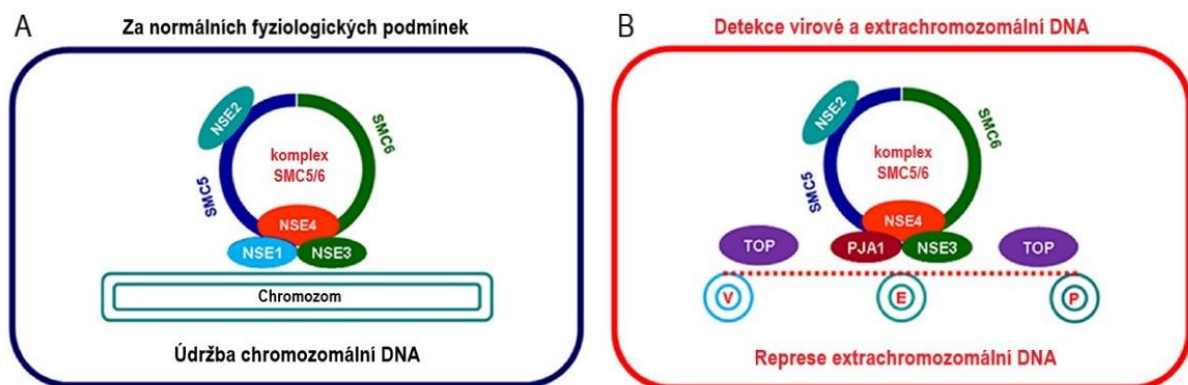
3.2.1 Herpes simplex virus 1

Čeleď *Herpesviridae* je velmi rozšířenou skupinou živočišných virů napadajících lidi a zvířata. Podle dat WHO (World Health Organization) je až 90 % lidské populace infikováno virem z této čeledi. *Herpesviridae* zahrnuje tři podčeledi, kterými jsou α -, β - a γ -herpesvirinae. Jedním z virů podčeledi α -herpesvirinae je i herpes simplex virus 1 (HSV-1) označovaný také jako lidský herpesvirus 1 (HHV-1; human herpes virus type 1) (shrnuto v Kukhanova et al., 2014; Riaz et al., 2017). HSV-1 u lidí způsobuje opary v horní části těla, kdy jsou infikována zejména ústa a oko (shrnuto v Arduino and Porter, 2008). Jedná se o obalený DNA virus s ikosahedrální kapsidou. Mezi obalem a kapsidou se nachází tegument. Genomem HSV-1 je lineární dsDNA, v kapsidě ve formě toroidu, o délce přibližně 152 kbp. Co se týče replikačního cyklu, je u HSV-1, stejně jako u celé čeledi *Herpesviridae*, rozdělen na lytickou a latentní fázi. Po vstupu HSV-1 do jádra hostitelské buňky dochází k cirkularizaci dsDNA. Následuje časově oddělená transkripční kaskáda bezprostředně časných (IE, immediate-early), časných (E, early) a pozdních (L, late) genů (shrnuto v Kukhanova et al., 2014). Latence a reaktivace HSV-1 pak probíhá v senzoryckých neuronech. Během latence setrvává genom HSV-1 v cirkulární a epizomální podobě (shrnuto v Arduino and Porter, 2008; Riaz et al., 2017).

I zde platí, že se komplex Smc5/6 váže na HSV-1 DNA a funguje jako restriční faktor inhibující virovou transkripci (Xu et al., 2018). Avšak o mechanismu vazby a inhibice transkripce HSV-1 DNA je toho známo opravdu velmi málo. Jediným známým zjištěním je, že zde hraje roli PJA1 E3 ubikvitin-protein ligáza, stejně jako v případě HBV. Autoři zjistili, že PJA1 potlačuje transkripci a replikaci HSV-1. Působí tedy jako restriční faktor HSV-1 přímo, bez indukce odpovědi vrozené imunity. V jádře dochází k interakci mezi PJA1 a komplexem Smc5/6, přičemž PJA1 působí jako zprostředkovatel vazby Smc5/6 na HSV-1 DNA. Koordinací mezi PJA1 a komplexem Smc5/6 dochází k rozpoznání a restriční

HSV-1 genomu. Na tomto umlčení exprese HSV-1 DNA se podílí DNA topoizomerázy (Xu et al., 2018). Působení PJA1 a jeho kooperace s komplexem Smc5/6 jsou tedy u HSV-1 podobné jako u HBV. Následně bude přiblížen podrobnější mechanismus toho, jak PJA1 usnadňuje vazbu Smc5/6 na virovou DNA. Studie předpokládá, že takto to funguje u DNA virů, tedy u HSV-1 i HBV.

Interakce PJA1 s jednotlivými podjednotkami komplexu Smc5/6 byly zkoumány pomocí konfokální mikroskopie. Bylo zjištěno, že PJA1 ovlivňuje interakci mezi Nse1 a Nse4, a to v negativním slova smyslu. Nebylo však pozorováno, že by PJA1 měl vliv na interakci Nse4 s Nse3 a Smc5. PJA1 tedy tlumí interakci mezi Nse1 a Nse4. Ukazuje se, že PJA1 a Nse1 kompetují o vazebné místo v rámci komplexu Smc5/6. PJA1 může nahradit Nse1 a usnadní tak interakci Smc5/6 s virovou DNA (Xu et al., 2018). Již dříve bylo ukázáno, že na vazbě Smc5/6 k DNA se podílí trimer Nse1/Nse3/Nse4 (Zabradý et al., 2016). Na základě těchto tvrzení došli autoři k následujícímu závěru. Trimer Nse1/Nse3/Nse4 se podílí na normálních funkcích komplexu Smc5/6 při údržbě chromozomů. Když ale PJA1 nahradí Nse1 za vzniku trimerního PJA1/Nse3/Nse4, komplex Smc5/6 funguje jako restriční faktor virové DNA. Svou roli zde pravděpodobně hrají RING domény Nse1 a PJA1 (Xu et al., 2018). Schématické znázornění je vidět na Obr. 9. Jedná se o první studii, která poskytuje porozumění mechanismu Smc5/6 zprostředkované restrikce a rozpoznání virové, epizomální a extrachromozomální DNA. Je však zapotřebí provést více studií a zjistit, zda PJA1 hraje roli i v rozpoznávání jiných DNA genomů.



Obrázek 9: DNA topoizomerázy se účastní proteinem PJA1 zprostředkované restrikce virové a epizomální DNA. (A) Za normálních podmínek subkomplex Nse1/Nse3/Nse4 zajišťuje, že komplex Smc5/6 funguje při údržbě hostitelského chromozomu. (B) V reakci na virovou a epizomální DNA, PJA1 nahrazuje Nse1 za vzniku subkomplexu PJA1/Nse3/Nse4, který převádí funkci komplexu Smc5/6 na restrikci virové (V), extrachromozomální (E) a plazmidové (P) molekuly DNA. Převzato a upraveno z (Xu et al., 2018).

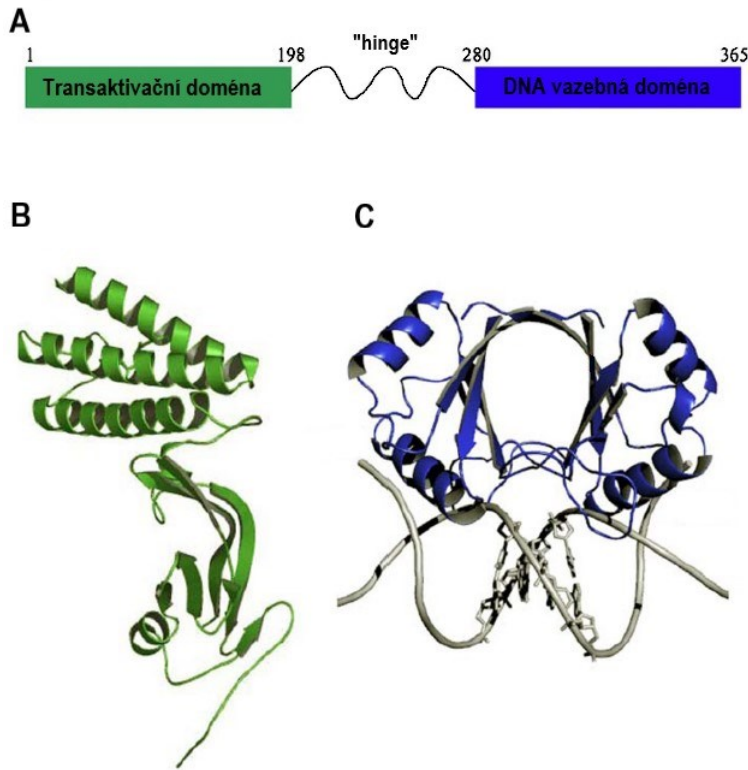
Mezi HBV a HSV-1 lze tedy vidět velké podobnosti role komplexu Smc5/6 jako restriktivního faktoru či zapojení PJA1 ubikvitin-protein ligázy. Zda při komplexem Smc5/6 zprostředkované inhibici transkripce genomu HSV-1 hrají nějakou roli ND10 jaderná tělíška jako v případě HBV lze pouze spekulovat. Nicméně bylo zjištěno, že ND10 sami reprimují genovou expresi HSV-1 (Everett et al., 2006, 2008; Glass and Everett, 2013). Avšak HSV-1 IE protein ICP0 (infected cell protein 0) dokáže této inhibici zabránit tím, že indukuje proteazomální degradaci ND10 (Boutell et al., 2002; Chelbi-Alix and de Thé, 1999; Everett et al., 2006).

3.3 *Papillomaviridae*

Viry čeledi *Papillomaviridae* jsou viry napadající více než 20 různých druhů savců, od plazů a ptáků až po člověka (Doorbar, 2005). Vlastnosti, struktura genomu a replikační cyklus budou následně popsány u lidských papilomavirů. Skupina lidských papilomavirů (HPVs; human papillomaviruses) je velmi početná, existuje více než 200 různých typů HPVů. HPVů jsou vysoce nakažlivé a infikují kožní a slizniční epitelální buňky. Způsobují benigní léze, typické jsou bradavice na rukou, chodidlech či genitální bradavice. Vysoce rizikové HPVů jsou původci rakovinových onemocnění, z nichž nejrozšířenější je rakovina děložního čípku způsobená zejména HPV16 a HPV18 (shrnutí v Graham, 2017). Papilomaviry jsou neobalené DNA viry s ikosahedrální kapsidou. Jejich genom je tvořen kruhovou dsDNA o délce přibližně 8 kbp. Ke svému replikačnímu cyklu využívají papilomaviry procesu samoobnovy vícevrstevného kožního a slizničního epitelu. HBV napadá bazální epitelální buňky a po vstupu do jádra je zahájena časná transkripce. Produkty časné exprese jsou proteiny E1, E2, E4, E5 a onkoproteiny E6 a E7. Proteiny E1 a E2 jsou vyžadovány pro počáteční virovou replikaci. E1 se váže do replikačního počátku (ori; origin of replication) a iniciuje replikaci, přičemž E2 stabilizuje protein E1 v replikačním ori. Poté nastává udržovací fáze replikace. V terminálně diferencovaných buňkách v nejvrchnějších vrstvách epitelu pak dochází k vegetativní replikaci virové DNA a pozdní transkripci. Produkty pozdní exprese jsou kapsidové proteiny L1 a L2 (shrnutí v Graham, 2017; McBride, 2017).

E2 je regulační protein kódovaný všemi papilomaviry, který interaguje s mnoha hostitelskými i virovými faktory. Jak již bylo řečeno, je spolu s E1 nezbytný pro iniciaci virové replikace. Dále E2 funguje jako transkripční aktivátor či represor a podílí se na údržbě virového genomu. Co se týče struktury E2 proteinu, na jeho N-konci se nachází transaktivační doména o velikosti přibližně 200 aa, která interaguje s hostitelským chromatinem. Následuje flexibilní sekvence (často nazývána jako „hinge“), která spojuje transaktivační doménu s DNA vazebnou

doménou na C-konci. DNA vazebná doména o velikosti přibližně 100 aa zprostředkovává interakci s vazebnými místy virového genomu (shrnutí v McBride, 2013, 2017). Struktura proteinu E2 je zobrazena na Obr. 10. Následující odstavce se budou věnovat roli komplexu Smc5/6 při papilomavirové infekci. Jak bude popsáno níže, následující poznatky neplatí jen pro jeden konkrétní papilomavirus jako v případě HBV a HSV-1, ale vztahují se na celou čeleď.



Obrázek 10: E2 protein HPV16. (A) Schématické znázornění E2 proteinu. (B) Struktura E2 transaktivační domény. (C) Struktura DNA vazebné domény E2. Převzato a upraveno z (Blakaj et al., 2009).

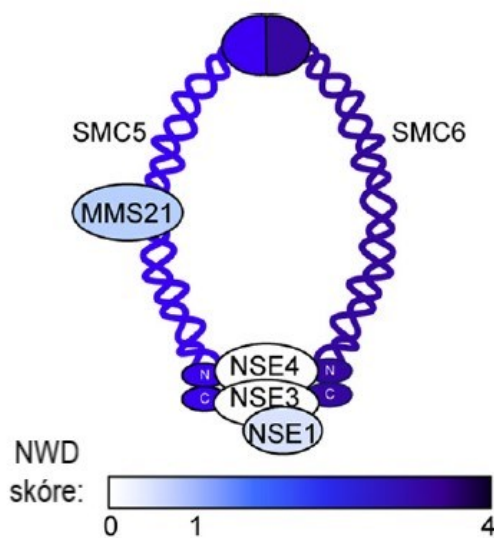
Studie (Wu et al., 2006) primárně zkoumající vztah mezi E2 proteinem HPV11 a Brd4 (bromodomain-containing protein 4) v lidských buňkách zjistila, že E2 protein interaguje s proteiny Smc5 a Smc6 (Wu et al., 2006), složkami buněčného komplexu Smc5/6. O několik let později proteomická analýza zkoumající interagující partnery proteinu E2 u BPV1 (bovine papillomavirus), CPV1 (canine papillomavirus), CPV2, HPV1, HPV8, HPV11, HPV16, HPV18, HPV31, SfPV1 (*Sylvilagus floridanus* papillomavirus) a MmPV1 (*Macaca mulatta* papillomavirus) také odhalila interakci s Smc5 a Smc6 (Jang et al., 2015). Shodují se tedy na tom, že protein E2 interaguje s komplexem Smc5/6 a tato interakce je pozorována napříč čeledí *Papillomaviridae* (Jang et al., 2015; Wu et al., 2006). Nedávno se této problematice věnovala studie (Bentley et al., 2018) a nově také studie (Gibson and Androphy, 2020), které jako první poměrně podrobně charakterizovaly vztah E2 se Smc5/6 a možné role Smc5/6 v replikačním cyklu papilomavirů. Poznatky z těchto studií budou následně popsány.

Na základě pokusů u BPV1, HPV5, HPV6b, HPV8, HPV18 a HPV31 studie (Bentley et al., 2018; Gibson and Androphy, 2020) potvrdily interakci proteinu E2 s komplexem Smc5/6

a zachovalost této interakce mezi několika různými papilomaviry (Bentley et al., 2018; Gibson and Androphy, 2020). Zkoumaly však tento vztah do větších detailů. Pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií a následnou proteomickou analýzou byly zjišťovány proteiny interagující s E2 BPV1. Každému proteinu bylo přiřazeno normalizované vážené D skóre (NWD; normalized weighted D) (Bentley et al., 2018). Čím je interagující protein hojněji zastoupen nebo interakce s ním vykazuje reprodukovatelnost v daném experimentu, tím je NWD skóre vyšší. Proteiny vykazující NWD skóre ≥ 1 jsou pak definovány jako vysoce spolehlivé interagující proteiny (HIPs; high-confidence interacting proteins). Jak se dalo očekávat, proteiny Smc6 (NWD = 3,9) a Smc5 (NWD = 1,84) byly identifikovány jako HIPs pro E2. Dále byla odhalena interakce E2 s Nse1 a Nse2/Mms21 podjednotkami komplexu Smc5/6. Nicméně ty vykazovaly NWD skóre menší než 1 a tyto interakce tak nejsou považovány za významné (Bentley et al., 2018). Na Obr. 11 je znázorněn komplex Smc5/6 a NWD skóre jeho jednotlivých podjednotek s ohledem na interakci s E2. Z obrázku je zřejmé, že Nse3 a Nse4 neinteragují s proteinem E2 (Bentley et al., 2018). S těmito výsledky se shoduje i pozdější studie (Gibson and Androphy, 2020), která při svých experimentech s HPV31 demonstrovala interakci E2 se Smc6, ale neprokázala asociaci E2 s Nse3 (Gibson and Androphy, 2020). Existuje hypotéza, že interakce E2 s komplexem Smc5/6 je zprostředkována proteinem Smc6, který vykazuje nejvyšší NWD skóre. Nebylo to však potvrzeno (Bentley et al., 2018). U HPV31 bylo dále zkoumáno, která oblast proteinu E2 je potřebná pro interakci s komplexem Smc5/6. Bylo zjištěno, že Smc5/6 pravděpodobně interaguje s E2 v celé jeho délce. Pro interakci je konkrétně vyžadována transaktivační doména E2 a interakci s DNA vazebnou doménou E2 autoři nevyloučili (Gibson and Androphy, 2020). Asociace komplexu Smc5/6 s jiným proteinem časně exprese než s E2 nebyla prokázána. Konkrétně byla zkoumána interakce s proteiny E1 a E6 (Bentley et al., 2018; Gibson and Androphy, 2020).

Co se týče možných rolí komplexu Smc5/6 v replikačním cyklu papilomavirů, bylo zjištěno následující. Studie (Bentley et al., 2018) zkoumala, zda je u papilomavirů Smc5/6 restriktivním faktorem jako v případě HBV. Nicméně výsledky předpokládají spíše pozitivní roli Smc5/6 v papilomavirovém cyklu. Zjistili, že komplex Smc5/6 má vliv na údržbu virového genomu. Naopak nebylo zjištěno, že by komplex Smc5/6 nějak ovlivňoval transkripční funkce proteinu E2, konkrétně transkripční aktivaci, nebo transkripci virových genů (Bentley et al., 2018). Navíc bylo prokázáno, že hladiny proteinu Smc6 nejsou ovlivněny přítomností E2 (Bentley et al., 2018), na rozdíl od situace u HBV infekce, kdy se protein HBx podílí na degradaci komplexu Smc5/6 (Murphy et al., 2016). Dále bylo zjištěno, že u HPV31 je

komplex Smc5/6 lokalizován v ohniscích replikace DNA, což podporuje roli Smc5/6 v některých aspektech replikace a údržby papilomavirových genomů. Autoři předpokládají, že během udržovací fáze virové replikace se komplex Smc5/6 podílí na asociaci HPV31 genomů k mitotickému chromatinu či na rozkladu multimerní virové DNA na monomerní formy. Naopak není vyžadován pro počáteční virovou replikaci zprostředkovanou E1 a E2. Bylo totiž ukázáno, že v buňkách s Smc6 „knockdown“ nebyly redukovány hladiny replikované virové DNA. Komplex Smc5/6 také není vyžadován pro vegetativní amplifikaci papilomavirové DNA závislé na buněčné diferenciaci (Bentley et al., 2018).



Obrázek 11: Komplex Smc5/6. Barvy představují NWD skóre každého koimunoprecipitovaného komponentu detekovaného hmotnostní spektrometrií v 293T buňkách. NWD skóre ≥ 1 značí vysokou spolehlivost interakce s BPV1 E2 proteinem. Převzato a upraveno z (Bentley et al., 2018).

Naproti tomu studie (Gibson and Androphy, 2020) přinesla zcela odlišné výsledky. Na modelu HPV31 bylo ukázáno, že přechodné vyčerpání Smc6 a Nse3 v buňkách vyústilo ve zvýšení virové replikace a transkripce. Autoři tudíž dospěli k závěru, že komplex Smc5/6 funguje jako restriční faktor papilomavirového replikačního cyklu (Gibson and Androphy, 2020), stejně jako je tomu u HBV a HSV-1. Bylo zjištěno, že E2 proteiny HPV31 a HPV16 nemají vliv na stabilitu a hladiny proteinu Smc6 (Gibson and Androphy, 2020), což se shoduje s poznatky studie (Bentley et al., 2018). Dále se ukázalo, že se Smc5/6 nachází na epizomálním genomu HPV31, kde v E2 vazebných místech asociuje s proteinem E2. Interakce Smc5/6 s E2 byla ale v přítomnosti proteinu E1 snížena. Autoři se proto domnívají, že Smc5/6 a E1 kompetují o vazbu s E2. Narušením interakce E1 s E2 komplex Smc5/6 pravděpodobně inhibuje počáteční fázi papilomavirové replikace. Celkově však není jasné, zda komplex Smc5/6 inhibuje virovou transkripci, replikaci či oba tyto procesy. Není znám ani přesný mechanismus této restrikce papilomavirového cyklu (Gibson and Androphy, 2020).

V objasnění by měly budoucímu výzkumu pomoci poznatky právě z výše zmíněných studií (Bentley et al., 2018; Gibson and Androphy, 2020).

I v případě HPV infekce fungují ND10 jaderná tělíška jako restriční faktor. Konkrétně bylo zjištěno, že Sp100 jakožto strukturální komponent ND10 inhibuje replikaci a transkripci HPV18, ale pouze v rámci počáteční fáze infekce (Stepp et al., 2013). Později se ukázalo, že Sp100 reprimuje HPV i v diferencovaných buňkách během pozdní fáze infekce (Stepp et al., 2017). Stejně jako v případě HSV-1 se lze pouze domnívat, zda je zde nějaká souvislost mezi komplexem Smc5/6 a ND10 jadernými tělíšky v umlčení virové exprese jako je tomu u HBV.

3.4 *Polyomaviridae*

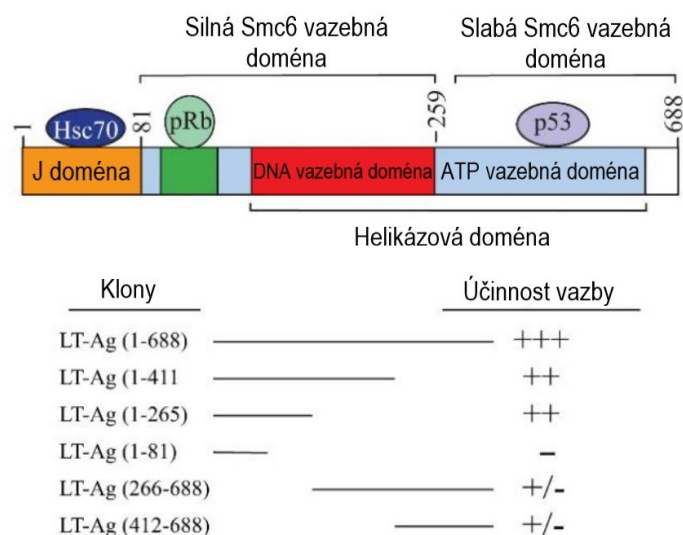
3.4.1 JC virus

JC polyomavirus (JCPyV) je pojmenován podle pacienta, ze kterého byl poprvé izolován, tedy John Cunningham virus. Jedná se o lidský virus patřící do čeledi *Polyomaviridae*. U imunosuprimovaných jedinců způsobuje JC virus progresivní multifokální leukoencefalopatii (PML; progressive multifocal leukoencephalopathy). PML je demyelinizační onemocnění mozku, které postihuje zejména dospělé osoby (shrnuto v Bellizzi et al., 2013). Co se týče struktury JCPyV, jde o neobalený DNA virus mající kapsidu s ikosahedrální symetrií. Genom JC viru tvoří kruhová dsDNA o délce přibližně 5,1 kbp. Replikační cyklus JC viru, a obecně celé čeledi *Polyomaviridae*, zahrnuje časnou fázi, replikaci virové DNA a pozdní fázi. Po vstupu JCPyV do jádra hostitelské buňky dochází k časně transkripci. Produkty časně transkripce jsou malý tumorogenní antigen (t-Ag; small tumor antigen) a velký tumorogenní antigen (T-Ag; large tumor antigen). T-Ag se poté váže do počátku replikace a umožňuje replikaci virové DNA hostitelskou polymerázou. Následuje pozdní transkripce za vzniku VP1, VP2 a VP3 produktů, což jsou kapsidové proteiny, a agnoproteinu (shrnuto v Delbue et al., 2017; Maginnis and Atwood, 2009).

S ohledem na pokračování této práce bude přiblížena struktura a funkce T-Ag. Jak již bylo řečeno, T-Ag je produkt časně transkripce JCPyV. Jedná se o regulační protein o délce téměř 700 aa, který iniciuje replikaci JCPyV a stimuluje expresi pozdních genů. Kromě toho je T-Ag hlavním onkogenním proteinem JCPyV podílejícím se na buněčné transformaci. Byla objevena souvislost mezi JC virem a rozvojem lidských nádorů, konkrétně nádory centrální nervové soustavy (CNS; central nervous system) a rakovinou tlustého střeva. Co se týče struktury JCPyV T-Ag, na jeho N-konci se nachází J doména, která váže buněčný chaperon HSc70 (heat-shock cognate 70). Následuje LxCxE motiv, což je vazebná doména pro členy

rodiny retinoblastomových proteinů (Rb; retinoblastoma), které jsou významnými tumor supresory. Na C-konci T-Ag je vazebná doména pro p53, což je také tumor supresor. Mimo to se zde nachází také OBD doména (origin-binding domain) vázající počátek JCPyV replikace, NLS (nuclear localization signal) doména nezbytná pro jadernou lokalizaci proteinu a helikázová doména (shrnutí v Delbue et al., 2017; Maginnis and Atwood, 2009).

Při proteomické analýze JCPyV T-Ag a t-Ag interagujících proteinů bylo mimo jiné zjištěno, že JCPyV T-Ag interaguje s buněčným komplexem Smc5/6. Autoři tvrdí, že je preferována asociace T-Ag s těmi podjednotkami komplexu Smc5/6, které vykazují určité enzymatické aktivity. Konkrétně byla prokázána interakce JCPyV T-Ag s Smc5, Smc6, Nse1, Nse3 a Nse4 (Saribas and Safak, 2020). Nicméně interakce s Nse2/Mms21 s významnou enzymatickou aktivitou SUMO E3 ligázy v této studii prokázána nebyla. Podrobně pak byla zkoumána asociace JCPyV T-Ag s proteinem Smc6, která je zobrazena na Obr. 12. Byla odhalena silná interakce Smc6 s oblastmi T-Ag zahrnujícími aminokyseliny 1-265 a 1-411. Slabé interakce vykazovala oblast aa 266-688. Naopak žádná interakce nebyla zjištěna mezi Smc6 a J doménou T-Ag, která zahrnuje aa 1-81. Na základě těchto výsledků autoři soudí, že JCPyV T-Ag pravděpodobně obsahuje dvě SMC vazebné domény potřebné pro interakci se Smc6. Jedná se o silnou Smc6 vazebnou doménu zahrnující aa 82-266 na N-konci a o slabou Smc6 vazebnou doménu zahrnující aa 412-688 na C-konci. Význam této interakce mezi JCPyV T-Ag a komplexem Smc5/6 ještě nebyl pochopen a podle autorů by měl být předmětem dalšího zkoumání s ohledem na onkogenní vlastnosti spojené s JCPyV T-Ag (Saribas and Safak, 2020).



Obrázek 12: Grafické znázornění JCPyV T-Ag domén a účinnosti vazby mezi JCPyV T-Ag a Smc6. Stupnice pro jednotlivé účinnosti vazby je +++: silná, ++: střední a +/-: slabá vazba. Převzato a upraveno z (Saribas and Safak, 2020).

3.5 *Retroviridae*

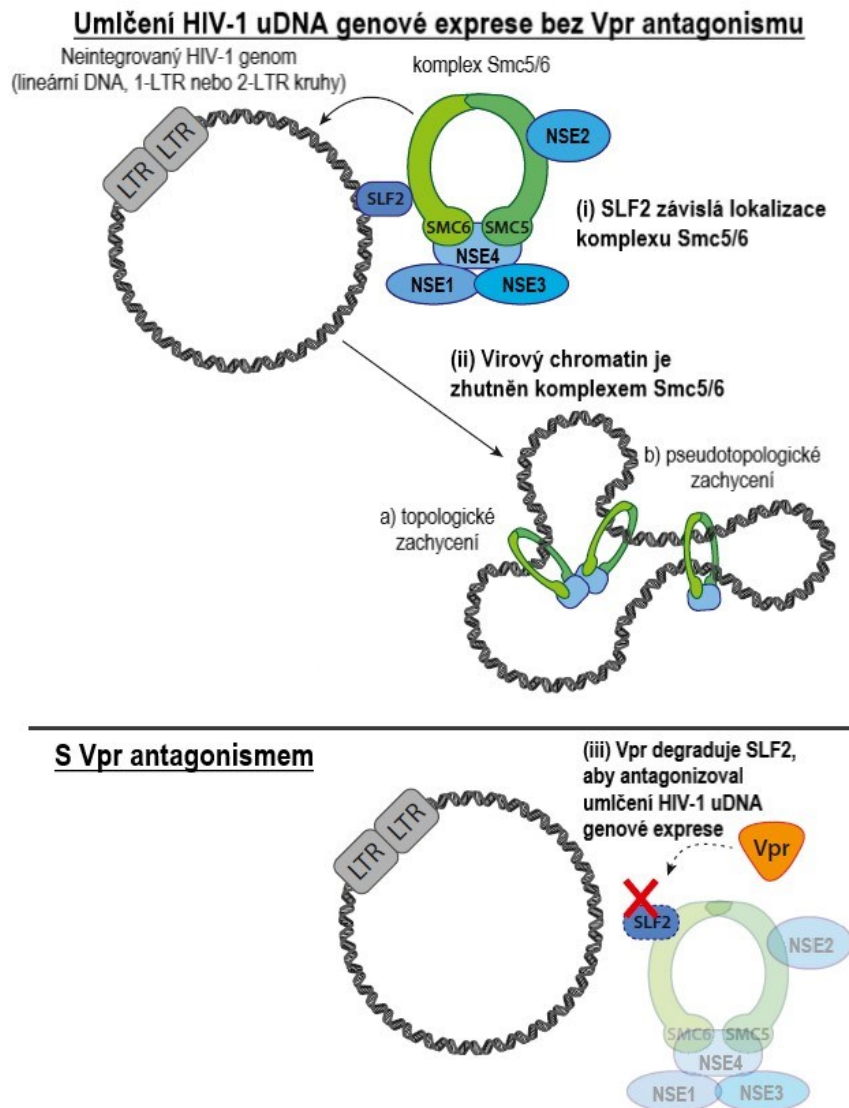
3.5.1 HIV-1 virus

Jako poslední bude popsána role komplexu Smc5/6 při infekci virem HIV-1 (human immunodeficiency virus type 1). HIV způsobuje syndrom získaného imunodeficitu (AIDS; acquired immunodeficiency syndrome). HIV-1 je obalený RNA virus s kónickou kapsidou. Genom HIV-1 tvoří dvě molekuly pozitivní jednovláknová RNA (+ssRNA, positive single-stranded RNA) o velikosti přibližně 9,5 kbp (shrnutí v Girard et al., 2011). I když je HIV-1 virus s RNA genomem, v určité fázi svého životního cyklu funguje ve formě DNA. Po vstupu HIV-1 do hostitelské buňky dochází v cytoplazmě k reverzní transkripci, tedy konverzi RNA na lineární cDNA (complementary DNA). Lineární HIV-1 cDNA je translokována do jádra, kde dochází k integraci do hostitelského genomu, a následuje dokončení HIV-1 replikačního cyklu. Může ale také dojít k tomu, že se HIV-1 cDNA po vstupu do jádra neintegruje do genomu hostitele. Neintegrováný HIV-1 genom zahrnuje lineární uDNA (unintegrated DNA), 1-LTR (long terminal repeat) a 2-LTR kruhy, přetrvává v infikovaných buňkách a je také schopen genové exprese (shrnutí v Hamid et al., 2017).

Zcela nová studie (Dupont et al., 2021) demonstrovala zapojení buněčného komplexu Smc5/6 do problematiky HIV-1 uDNA a definovala jeho funkce. Bylo zjištěno, že protein SLF2 (Smc5-Smc6 localization factor protein 2) v časně fázi infekce rekrutuje komplex Smc5/6 na HIV-1 uDNA. Přesný mechanismus však není znám. Následně dochází ke změnám virového chromatinu, kdy Smc5/6 vytváří represivní chromatinovou strukturu, díky čemuž dojde k umlčení exprese HIV-1 genů. Komplex Smc5/6 tedy funguje jako restriční faktor HIV-1 uDNA. Nicméně HIV-1 dokáže tomuto umlčení genové exprese zabránit, a to pomocí proteinu Vpr (viral protein R) (Dupont et al., 2021). Jiné případy umlčení uDNA u retrovirů již byly také pozorovány (Geis and Goff, 2019; Zhu et al., 2018). Tato práce se však zaměří pouze na komplex Smc5/6.

Vpr je regulační protein o hmotnosti 14 kDa a délce 96 aa kódovaný *vpr* ORF (open reading frame), u něhož NMR analýza definovala terciární strukturu skládající se ze tří α -helixů ohraničených N- a C-terminálními doménami (Cohen et al., 1990; Morellet et al., 2003). Mezi funkce Vpr patří například role v patogenitě HIV-1, kdy je nezbytný pro účinnou replikaci HIV-1 v mononukleárních fagocytech (Connor et al., 1995). V rámci této práce je ale důležitým zjištěním, že Vpr až 20násobně zvyšuje genovou expresi uDNA HIV-1 (Poon and Chen, 2003), což potvrdila i nejnovější studie (Dupont et al., 2021). Vpr také interaguje s řadou buněčných faktorů, které shrnuje například novější práce (Fabryova and Strebel, 2019). Podobně jako

v případě proteinu HBx u viru hepatitidy B, protein Vpr interaguje s buněčným DDB1-CUL4A ubikvitin E3 ligázovým komplexem. Interakce je zprostředkována VprBP (viral protein R binding protein), což je vlastně DCAF1. Díky této interakci protein Vpr mimo jiné indukuje proteazomální degradaci některých buněčných substrátů (Belzile et al., 2007; Le Rouzic et al., 2007; Schröfelbauer et al., 2007).



Obrázek 13: Model pro umlčení HIV-1 uDNA komplexem Smc5/6. (i) Při absenci Vpr antagonismu je komplex Smc5/6 pomocí SLF2 rekrutován na neintegrováný HIV-1 genom. (ii) To vede ke zhutnění virového chromatinu topologickým nebo pseudotopologickým zachycením DNA. Je vytvořeno represivní chromatinové prostředí a virová genová exprese je umlčena. (iii) HIV-Vpr degraduje SLF2 a antagonizuje tak restriční funkci komplexu Smc5/6. Vpr zachraňuje genovou expresi z neintegrováného virového genomu. Převzato a upraveno z (Dupont et al., 2021).

Nicméně zpět ke komplexu Smc5/6 a jeho SLF2 zprostředkované roli restričního faktoru uDNA HIV-1. Protein SLF2 byl identifikován jako jeden z cílových substrátů Vpr. Díky interakci Vpr s DDB1-CUL4A ubikvitin E3 ligázovým komplexem dochází k ubikvitinaci SLF2 a jeho následné proteazomální degradaci. Komplex Smc5/6 tak nemůže být rekrutován na virovou uDNA a reprimovat její expresi. Protein Vpr a komplex Smc5/6 jsou tedy v antagonistickém vztahu, kdy Smc5/6 umlčuje expresi HIV-1 uDNA a Vpr ji pomocí výše zmíněného mechanismu znovu umožňuje. Bylo zjištěno, že Vpr zprostředkovaná degradace SLF2 je u lentivirů, mezi které patří právě zde popisovaný HIV-1, evolučně konzervována (Dupont et al., 2021). Celkově je zde vidět velká podobnost s HBV, kdy komplex Smc5/6 inhibuje virovou transkripci a protein HBx se podílí na jeho degradaci a obnovuje tak transkripci HBV genomu (Murphy et al., 2016). U HBV i HIV-1 je degradace zprostředkována cílením CUL4 ubikvitin E3 ligázového komplexu na substrát s tím rozdílem, že substrátem HBx je komplex Smc5/6 a substrátem Vpr je protein SLF2 (Dupont et al., 2021; Murphy et al., 2016). To soudí i autoři studie (Dupont et al., 2021), kteří tak poskytli důkaz konvergentní virové evoluce. Dva nepříbuzné viry HBV a HIV-1 využívají podobný mechanismus k zabránění restričním funkcím komplexu Smc5/6 (Dupont et al., 2021). Na Obr. 13 je znázorněn model pro umlčení uDNA HIV-1 komplexem Smc5/6.

4 Závěr

Tato bakalářská práce poskytuje souhrnný přehled o struktuře a funkcích eukaryotického komplexu Smc5/6 včetně jeho interakce s viry. Komplex Smc5/6 se skládá celkem z osmi proteinových podjednotek, kdy kostru tohoto komplexu tvoří proteiny Smc5 a Smc6. Komplex se vyznačuje především enzymatickou aktivitou ATPázy, která je důležitá pro interakci komplexu s DNA a pro jeho další fungování v buňce s cílem zajistit stabilitu genomu. Přestože nebylo možné zajít do větších detailů, tato práce popisuje a porovnává strukturu a funkce komplexu Smc5/6 zejména u *S. pombe*, *S. cerevisiae* a u člověka. Celkově se však jedná o velice široké téma, kdy řada vlastností a funkcí komplexu Smc5/6 není stále plně pochopena. Komplex Smc5/6 je tak předmětem studia současných a zcela určitě i budoucích studií.

Stěžejní částí této bakalářské práce však bylo shrnout poznatky týkající se rolí komplexu Smc5/6 při infekci DNA virem a při infekci virem s DNA intermediárním genomem. Odrazovým můstkem pro tuto práci byla zjištění z roku 2016 demonstrující, že komplex Smc5/6 funguje jako restriční faktor HBV infekce. HBV protein HBx však zprostředkovává proteazomální degradaci Smc5/6. V případě HSV-1 bylo zjištěno, že zde komplex Smc5/6 působí také jako restriční faktor. Pro tyto dva viry je společné zapojení PJA1 ubikvitin-protein ligázy v mechanismu rozpoznání a restrikce virového genomu zprostředkovaných Smc5/6. Je pravděpodobné, že komplex Smc5/6 rozpoznává jen některé části genomu. Mohly by to být například právě oblasti vykazující DNA poškození. Překvapivé výsledky přinesly studie zabývající se rolí komplexu Smc5/6 při papilomavirové infekci. Tomuto tématu se zatím podrobněji věnovaly pouze dvě studie, které ale demonstrují rozporuplné výsledky. Komplex Smc5/6 se podílí na údržbě virového genomu v pozitivním slova smyslu, ale funguje také jako restriční faktor. Zatím však není vyloučena ani jedna možnost a budoucí studie by to měly objasnit. Dalším popisovaným virem byl JC virus, u kterého byla pouze prokázána interakce s komplexem Smc5/6, kdy se váže na oblasti JCPyV T-Ag zahrnující především jeho DNA vazebnou doménu a také ATP vazebnou doménu. Na závěr se práce věnovala interakci komplexu Smc5/6 s RNA virem HIV-1, pro který je typický DNA intermediární genom během infekce, s kterým právě díky proteinu SLF2 interaguje komplex Smc5/6. Bylo zjištěno, že Smc5/6 působí jako restriční faktor HIV-1. Nicméně HIV-1 protein Vpr indukuje proteazomální degradaci SLF2 a zabraňuje tak komplexu Smc5/6 umlčet HIV-1 genom.

I přesto, že je výzkum této oblasti něčím zcela novým, jsou prozatimní role komplexu Smc5/6 u zde popisovaných virů velmi podobné. V antivirové léčbě by tak komplex Smc5/6 mohl mít velký potenciál.

5 Literatura

(* = sekundární zdroj)

- Abdul, F., Filleton, F., Gerossier, L., Paturel, A., Hall, J., Strubin, M., and Etienne, L. (2018). Smc5/6 antagonism by HBx is an evolutionarily conserved function of hepatitis B virus infection in mammals. *J Virol* 92, e00769-18.
- Adamus, M., Lelkes, E., Potesil, D., Ganji, S.R., Kolesar, P., Zabradý, K., Zdrahal, Z., and Palecek, J.J. (2020). Molecular insights into the architecture of the human SMC5/6 complex. *Journal of Molecular Biology* 432, 3820–3837.
- Allweiss, L., Giersch, K., Pirosu, A., Volz, T., Muench, R.C., Beran, R.K., Urban, S., Javanbakht, H., Fletcher, S.P., Lütgehetmann, M., et al. (2021). Therapeutic shutdown of HBV transcripts promotes reappearance of the SMC5/6 complex and silencing of the viral genome in vivo. *Gut* 0, 1–10.
- Alt, A., Dang, H.Q., Wells, O.S., Polo, L.M., Smith, M.A., McGregor, G.A., Welte, T., Lehmann, A.R., Pearl, L.H., Murray, J.M., et al. (2017). Specialized interfaces of Smc5/6 control hinge stability and DNA association. *Nat Commun* 8, 14011.
- Ampatzidou, E., Irmisch, A., O’Connell, M.J., and Murray, J.M. (2006). Smc5/6 is required for repair at collapsed replication forks. *Molecular and Cellular Biology* 26, 9387–9401.
- Andrews, E.A., Palecek, J., Sergeant, J., Taylor, E., Lehmann, A.R., and Watts, F.Z. (2005). Nse2, a component of the Smc5-6 complex, is a SUMO ligase required for the response to DNA damage. *Molecular and Cellular Biology* 25, 185–196.
- Angers, S., Li, T., Yi, X., MacCoss, M.J., Moon, R.T., and Zheng, N. (2006). Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery. *Nature* 443, 590–593.
- *Aragón, L. (2018). The Smc5/6 complex: New and old functions of the enigmatic long-distance relative. *Annu. Rev. Genet.* 52, 89–107.
- *Arduino, P.G., and Porter, S.R. (2008). Herpes simplex virus type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 37, 107–121.
- *Bellizzi, A., Anzivino, E., Rodio, D.M., Palamara, A.T., Nencioni, L., and Pietropaolo, V. (2013). New insights on human polyomavirus JC and pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Clinical and Developmental Immunology* 2013, e839719.
- Belzile, J.-P., Duisit, G., Rougeau, N., Mercier, J., Finzi, A., and Cohen, É.A. (2007). HIV-1 Vpr-mediated G2 arrest involves the DDB1-CUL4AVPRBP E3 ubiquitin ligase. *PLOS Pathogens* 3, e85.
- Bentley, P., Tan, M.J.A., McBride, A.A., White, E.A., and Howley, P.M. (2018). The SMC5/6 complex interacts with the papillomavirus E2 protein and influences maintenance of viral episomal DNA. *J Virol* 92, e00356-18.
- Bermúdez-López, M., and Aragon, L. (2017). Smc5/6 complex regulates Sgs1 recombination functions. *Curr Genet* 63, 381–388.
- Bermúdez-López, M., Ceschia, A., de Piccoli, G., Colomina, N., Pasero, P., Aragón, L., and Torres-Rosell, J. (2010). The Smc5/6 complex is required for dissolution of DNA-mediated sister chromatid linkages. *Nucleic Acids Research* 38, 6502–6512.
- Bermúdez-López, M., Pociño-Merino, I., Sánchez, H., Bueno, A., Guasch, C., Almedawar, S., Bru-Virgili, S., Garí, E., Wyman, C., Reverter, D., et al. (2015). ATPase-dependent control of the Mms21 SUMO ligase during DNA repair. *PLoS Biol* 13, e1002089.

- Bermúdez-López, M., Villoria, M.T., Esteras, M., Jarmuz, A., Torres-Rosell, J., Clemente-Blanco, A., and Aragon, L. (2016). Sgs1's roles in DNA end resection, HJ dissolution, and crossover suppression require a two-step SUMO regulation dependent on Smc5/6. *Genes Dev.* *30*, 1339–1356.
- Betts Lindroos, H., Ström, L., Itoh, T., Katou, Y., Shirahige, K., and Sjögren, C. (2006). Chromosomal association of the Smc5/6 complex reveals that it functions in differently regulated pathways. *Molecular Cell* *22*, 755–767.
- Blakaj, D.M., Fernandez-Fuentes, N., Chen, Z., Hegde, R., Fiser, A., Burk, R.D., and Brenowitz, M. (2009). Evolutionary and biophysical relationships among the papillomavirus E2 proteins. *Front Biosci* *14*, 900–917.
- Bonner, J.N., Choi, K., Xue, X., Torres, N.P., Szakal, B., Wei, L., Wan, B., Arter, M., Matos, J., Sung, P., et al. (2016). Smc5/6 mediated sumoylation of the Sgs1-Top3-Rmi1 complex promotes removal of recombination intermediates. *Cell Reports* *16*, 368–378.
- Boutell, C., Sadis, S., and Everett, R.D. (2002). Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP0 and its isolated RING finger domain act as ubiquitin E3 ligases in vitro. *J Virol* *76*, 841–850.
- Branzei, D., Sollier, J., Liberi, G., Zhao, X., Maeda, D., Seki, M., Enomoto, T., Ohta, K., and Foiani, M. (2006). Ubc9- and Mms21-mediated sumoylation counteracts recombinogenic events at damaged replication forks. *Cell* *127*, 509–522.
- Caridi, C.P., D'Agostino, C., Ryu, T., Zapotoczny, G., Delabaere, L., Li, X., Khodaverdian, V.Y., Amaral, N., Lin, E., Rau, A.R., et al. (2018). Nuclear F-actin and myosins drive relocalization of heterochromatic breaks. *Nature* *559*, 54–60.
- *Cesare, A.J., and Reddel, R.R. (2010). Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet.* *11*, 319–330.
- Chavez, A., George, V., Agrawal, V., and Johnson, F.B. (2010). Sumoylation and the structural maintenance of chromosomes (Smc) 5/6 complex slow senescence through recombination intermediate resolution. *J. Biol. Chem.* *285*, 11922–11930.
- Chavez, A., Agrawal, V., and Johnson, F.B. (2011). Homologous recombination-dependent rescue of deficiency in the structural maintenance of chromosomes (Smc) 5/6 complex. *J. Biol. Chem.* *286*, 5119–5125.
- Chelbi-Alix, M.K., and de Thé, H. (1999). Herpes virus induced proteasome-dependent degradation of the nuclear bodies-associated PML and Sp100 proteins. *Oncogene* *18*, 935–941.
- Chen, Y.-H., Choi, K., Szakal, B., Arenz, J., Duan, X., Ye, H., Branzei, D., and Zhao, X. (2009). Interplay between the Smc5/6 complex and the Mph1 helicase in recombinational repair. *PNAS* *106*, 21252–21257.
- Chiolo, I., Minoda, A., Colmenares, S.U., Polyzos, A., Costes, S.V., and Karpen, G.H. (2011). Double-strand breaks in heterochromatin move outside of a dynamic HP1a domain to complete recombinational repair. *Cell* *144*, 732–744.
- Cohen, E.A., Terwilliger, E.F., Jalinoos, Y., Proulx, J., Sodroski, J.G., and Haseltine, W.A. (1990). Identification of HIV-1 vpr product and function. *J Acquir Immune Defic Syndr* *3*, 11–18.
- Connor, R.I., Chen, B.K., Choe, S., and Landau, N.R. (1995). Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology* *206*, 935–944.
- Copsey, A., Tang, S., Jordan, P.W., Blitzblau, H.G., Newcombe, S., Chan, A.C., Newnham, L., Li, Z., Gray, S., Herbert, A.D., et al. (2013). Smc5/6 coordinates formation and resolution of joint molecules with chromosome morphology to ensure meiotic divisions. *PLoS Genet* *9*, e1004071.

- Crabben, S.N. van der, Hennis, M.P., McGregor, G.A., Ritter, D.I., Nagamani, S.C.S., Wells, O.S., Harakalova, M., Chinn, I.K., Alt, A., Vondrova, L., et al. (2016). Destabilized SMC5/6 complex leads to chromosome breakage syndrome with severe lung disease. *J Clin Invest* 126, 2881–2892.
- De Piccoli, G., Cortes-Ledesma, F., Ira, G., Torres-Rosell, J., Uhle, S., Farmer, S., Hwang, J.-Y., Machin, F., Ceschia, A., McAleenan, A., et al. (2006). Smc5–Smc6 mediate DNA double-strand-break repair by promoting sister-chromatid recombination. *Nat Cell Biol* 8, 1032–1034.
- Decorsière, A., Mueller, H., van Breugel, P.C., Abdul, F., Gerossier, L., Beran, R.K., Livingston, C.M., Niu, C., Fletcher, S.P., Hantz, O., et al. (2016). Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor. *Nature* 531, 386–389.
- *Delbue, S., Comar, M., and Ferrante, P. (2017). Review on the role of the human polyomavirus JC in the development of tumors. *Infect Agents Cancer* 12, 10.
- Doorbar, J. (2005). The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology* 32, 7–15.
- Duan, X., Yang, Y., Chen, Y.-H., Arenz, J., Rangi, G.K., Zhao, X., and Ye, H. (2009). Architecture of the Smc5/6 complex of *Saccharomyces cerevisiae* reveals a unique interaction between the Nse5-6 subcomplex and the hinge regions of Smc5 and Smc6. *J. Biol. Chem.* 284, 8507–8515.
- Dupont, L., Bloor, S., Williamson, J.C., Cuesta, S.M., Shah, R., Teixeira-Silva, A., Naamati, A., Greenwood, E.J.D., Sarafianos, S.G., Matheson, N.J., et al. (2021). The SMC5/6 complex compacts and silences unintegrated HIV-1 DNA and is antagonized by Vpr. *Cell Host & Microbe* 29, 1–14
- Everett, R.D., Rechter, S., Papior, P., Tavalai, N., Stamminger, T., and Orr, A. (2006). PML contributes to a cellular mechanism of repression of herpes simplex virus type 1 infection that is inactivated by ICP0. *J Virol* 80, 7995–8005.
- Everett, R.D., Parada, C., Gripon, P., Sirma, H., and Orr, A. (2008). Replication of ICP0-null mutant herpes simplex virus type 1 is restricted by both PML and Sp100. *Journal of Virology* 82, 2661–2672.
- Fabryova, H., and Strebel, K. (2019). Vpr and its cellular interaction partners: R we there yet? *Cells* 8, 1310.
- Farmer, S., San-Segundo, P.A., and Aragón, L. (2011). The Smc5–Smc6 complex is required to remove chromosome junctions in meiosis. *PLoS ONE* 6, e20948.
- Fousteri, M.I., and Lehmann, A.R. (2000). A novel SMC protein complex in *Schizosaccharomyces pombe* contains the Rad18 DNA repair protein. *The EMBO Journal* 19, 1691–1702.
- Fujioka, Y., Kimata, Y., Nomaguchi, K., Watanabe, K., and Kohno, K. (2002). Identification of a novel non-structural maintenance of chromosomes (SMC) component of the SMC5-SMC6 complex involved in DNA Repair. *J. Biol. Chem.* 277, 21585–21591.
- Geis, F.K., and Goff, S.P. (2019). Unintegrated HIV-1 DNAs are loaded with core and linker histones and transcriptionally silenced. *PNAS* 116, 23735–23742.
- Gibson, R.T., and Androphy, E.J. (2020). The SMC5/6 complex represses the replicative program of high-risk human papillomavirus type 31. *Pathogens* 9, 786.
- *Girard, M.P., Osmanov, S., Assossou, O.M., and Kieny, M.-P. (2011). Human immunodeficiency virus (HIV) immunopathogenesis and vaccine development: A review. *Vaccine* 29, 6191–6218.
- Glass, M., and Everett, R.D. (2013). Components of promyelocytic leukemia nuclear bodies (ND10) act cooperatively to repress herpesvirus infection. *Journal of Virology* 87, 2174–2185.
- *Gómez-Moreno, A., and Garaigorta, U. (2017). Hepatitis B virus and DNA damage response: Interactions and consequences for the infection. *Viruses* 9, 304.

- *Graham, S.V. (2017). The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clinical Science* *131*, 2201–2221.
- Gutierrez-Escribano, P., Hormeño, S., Madariaga-Marcos, J., Solé-Soler, R., O'Reilly, F.J., Morris, K., Aicart-Ramos, C., Aramayo, R., Montoya, A., Kramer, H., et al. (2020). Purified Smc5/6 complex exhibits DNA substrate recognition and compaction. *Molecular Cell* *80*, 1–16.
- Haering, C.H., Löwe, J., Hochwagen, A., and Nasmyth, K. (2002). Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Molecular Cell* *9*, 773–788.
- *Hamid, F.B., Kim, J., and Shin, C.-G. (2017). Distribution and fate of HIV-1 unintegrated DNA species: a comprehensive update. *AIDS Research and Therapy* *14*, 9.
- Harvey, S.H., Sheedy, D.M., Cuddihy, A.R., and O'Connell, M.J. (2004). Coordination of DNA damage responses via the Smc5/Smc6 complex. *Molecular and Cellular Biology* *24*, 662–674.
- *Hirano, T. (2002). The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes & Development* *16*, 399–414.
- Irmisch, A., Ampatzidou, E., Mizuno, K., O'Connell, M.J., and Murray, J.M. (2009). Smc5/6 maintains stalled replication forks in a recombination-competent conformation. *EMBO J* *28*, 144–155.
- Jang, M.K., Anderson, D.E., van Doorslaer, K., and McBride, A.A. (2015). A proteomic approach to discover and compare interacting partners of papillomavirus E2 proteins from diverse phylogenetic groups. *Proteomics* *15*, 2038–2050.
- Jeppsson, K., Carlborg, K.K., Nakato, R., Berta, D.G., Lilienthal, I., Kanno, T., Lindqvist, A., Brink, M.C., Dantuma, N.P., Katou, Y., et al. (2014). The chromosomal association of the Smc5/6 complex depends on cohesion and predicts the level of sister chromatid entanglement. *PLoS Genet* *10*, e1004680.
- Kanno, T., Berta, D.G., and Sjögren, C. (2015). The Smc5/6 complex is an ATP-dependent intermolecular DNA linker. *Cell Reports* *12*, 1471–1482.
- *Kegel, A., and Sjögren, C. (2010). The Smc5/6 complex: More than repair? *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* *75*, 179–187.
- Kegel, A., Betts-Lindroos, H., Kanno, T., Jeppsson, K., Ström, L., Katou, Y., Itoh, T., Shirahige, K., and Sjögren, C. (2011). Chromosome length influences replication-induced topological stress. *Nature* *471*, 392–396.
- *Kukhanova, M.K., Korovina, A.N., and Kochetkov, S.N. (2014). Human herpes simplex virus: life cycle and development of inhibitors. *Biochemistry* *79*, 1635–1652.
- Le Rouzic, E., Belaïdouni, N., Estrabaud, E., Morel, M., Rain, J.-C., Transy, C., and Margottin-Goguet, F. (2007). HIV1 Vpr arrests the cell cycle by recruiting DCAF1/VprBP, a receptor of the Cul4-DDB1 ubiquitin ligase. *Cell Cycle* *6*, 182–188.
- Lee, T.H., Elledge, S.J., and Butel, J.S. (1995). Hepatitis B virus X protein interacts with a probable cellular DNA repair protein. *J Virol* *69*, 1107–1114.
- Lehmann, A.R., Walicka, M., Griffiths, D.J., Murray, J.M., Watts, F.Z., McCready, S., and Carr, A.M. (1995). The rad18 gene of *Schizosaccharomyces pombe* defines a new subgroup of the SMC superfamily involved in DNA repair. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 7067–7080.
- *Levrero, M., Testoni, B., and Zoulim, F. (2016). HBV cure: why, how, when? *Current Opinion in Virology* *18*, 135–143.
- Liberi, G., Maffioletti, G., Lucca, Ch., Chiolo, I., Baryshnikova, A., Cotta-Ramusino, C., Lopez, M., Pellicoli, A., Haber, J.E., and Foiani, M. (2005). Rad51-dependent DNA structures accumulate at damaged replication forks in *sgs1* mutants defective in the yeast ortholog of BLM RecQ helicase. *Genes & Development* *19*, 339–350.

- Lilienthal, I., Kanno, T., and Sjögren, C. (2013). Inhibition of the Smc5/6 complex during meiosis perturbs joint molecule formation and resolution without significantly changing crossover or non-crossover levels. *PLoS Genet* 9, e1003898.
- Lin-Marq, N., Bontron, S., Leupin, O., and Strubin, M. (2001). Hepatitis B virus X protein interferes with cell viability through interaction with the p127-kDa UV-damaged DNA-binding Protein. *Virology* 287, 266–274.
- *Livingston, C., Ramakrishnan, D., Strubin, M., Fletcher, S., and Beran, R. (2017). Identifying and characterizing interplay between hepatitis B virus X protein and Smc5/6. *Viruses* 9, 69.
- Löwe, J., Cordell, S.C., and van den Ent, F. (2001). Crystal structure of the SMC head domain: an ABC ATPase with 900 residues antiparallel coiled-coil inserted. *Journal of Molecular Biology* 306, 25–35.
- *Maginnis, M.S., and Atwood, W.J. (2009). JC Virus: An oncogenic virus in animals and humans? *Seminars in Cancer Biology* 19, 261–269.
- McAleenan, A., Cordon-Preciado, V., Clemente-Blanco, A., Liu, I.-C., Sen, N., Leonard, J., Jarmuz, A., and Aragón, L. (2012). SUMOylation of the α -kleisin subunit of cohesin is required for DNA damage-induced cohesion. *Current Biology* 22, 1564–1575.
- *McBride, A.A. (2013). The papillomavirus E2 proteins. *Virology* 445, 57–79.
- *McBride, A.A. (2017). Mechanisms and strategies of papillomavirus replication. *Biological Chemistry* 398, 919–927.
- McDonald, W.H., Pavlova, Y., Yates, J.R., and Boddy, M.N. (2003). Novel essential DNA repair proteins Nse1 and Nse2 are subunits of the fission yeast Smc5-Smc6 complex. *J. Biol. Chem.* 278, 45460–45467.
- Melby, T.E., Ciampaglio, C.N., Briscoe, G., and Erickson, H.P. (1998). The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes (SMC) and MukB proteins: Long, antiparallel coiled coils, folded at a flexible hinge. *J Cell Biol* 142, 1595–1604.
- Minor, M.M., Hollinger, F.B., McNeese, A.L., Jung, S.Y., Jain, A., Hyser, J.M., Bissig, K.-D., and Slagle, B.L. (2020). Hepatitis B virus HBx protein mediates the degradation of host restriction factors through the Cullin 4 DDB1 E3 ubiquitin ligase complex. *Cells* 9, 834.
- Moradi-Fard, S., Sarthi, J., Tittel-Elmer, M., Lalonde, M., Cusanelli, E., Chartrand, P., and Cobb, J.A. (2016). Smc5/6 is a telomere-associated complex that regulates Sir4 binding and TPE. *PLoS Genet* 12, e1006268.
- Morellet, N., Bouaziz, S., Petitjean, P., and Roques, B.P. (2003). NMR structure of the HIV-1 regulatory protein VPR. *Journal of Molecular Biology* 327, 215–227.
- Morikawa, H., Morishita, T., Kawane, S., Iwasaki, H., Carr, A.M., and Shinagawa, H. (2004). Rad62 protein functionally and physically associates with the Smc5/Smc6 protein complex and is required for chromosome integrity and recombination repair in fission yeast. *Molecular and Cellular Biology* 24, 9401–9413.
- Murphy, C.M., Xu, Y., Li, F., Nio, K., Reszka-Blanco, N., Li, X., Wu, Y., Yu, Y., Xiong, Y., and Su, L. (2016). Hepatitis B virus X protein promotes degradation of SMC5/6 to enhance HBV replication. *Cell Reports* 16, 2846–2854.
- Niu, C., Livingston, C.M., Li, L., Beran, R.K., Daffis, S., Ramakrishnan, D., Burdette, D., Peiser, L., Salas, E., Ramos, H., et al. (2017). The Smc5/6 complex restricts HBV when localized to ND10 without inducing an innate immune response and is counteracted by the HBV X protein shortly after infection. *PLoS ONE* 12, e0169648.
- Noël, J.-F., and Wellinger, R.J. (2011). Abrupt telomere losses and reduced end-resection can explain accelerated senescence of Smc5/6 mutants lacking telomerase. *DNA Repair* 10, 271–282.

- Palecek, J., Vidot, S., Feng, M., Doherty, A.J., and Lehmann, A.R. (2006). The Smc5-Smc6 DNA repair complex: Bridging of the Smc5-Smc6 heads by the kleisin, Nse4, and non-kleisin subunits. *J. Biol. Chem.* *281*, 36952–36959.
- Payne, F., Colnaghi, R., Rocha, N., Seth, A., Harris, J., Carpenter, G., Bottomley, W.E., Wheeler, E., Wong, S., Saudek, V., et al. (2014). Hypomorphism in human NSMCE2 linked to primordial dwarfism and insulin resistance. *J Clin Invest* *124*, 4028–4038.
- Pebernard, S., McDonald, W.H., Pavlova, Y., Yates, J.R., and Boddy, M.N. (2004). Nse1, Nse2, and a novel subunit of the Smc5-Smc6 complex, Nse3, play a crucial role in meiosis. *Molecular Biology of the Cell* *15*, 4866–4876.
- Pebernard, S., Wohlschlegel, J., McDonald, W.H., Yates, J.R., and Boddy, M.N. (2006). The Nse5-Nse6 dimer mediates DNA repair roles of the Smc5-Smc6 complex. *Molecular and Cellular Biology* *26*, 1617–1630.
- Pebernard, S., Perry, J.J.P., Tainer, J.A., and Boddy, M.N. (2008). Nse1 RING-like domain supports functions of the Smc5-Smc6 holocomplex in genome stability. *Molecular Biology of the Cell* *19*, 4099–4109.
- Poon, B., and Chen, I.S.Y. (2003). Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr enhances expression from unintegrated HIV-1 DNA. *J Virol* *77*, 3962–3972.
- Potts, P.R. (2009). The yin and yang of the MMS21–SMC5/6 SUMO ligase complex in homologous recombination. *DNA Repair* *8*, 499–506.
- Potts, P.R., and Yu, H. (2005). Human MMS21/NSE2 is a SUMO ligase required for DNA repair. *Molecular and Cellular Biology* *25*, 7021–7032.
- Potts, P.R., and Yu, H. (2007). The SMC5/6 complex maintains telomere length in ALT cancer cells through SUMOylation of telomere-binding proteins. *Nat Struct Mol Biol* *14*, 581–590.
- Potts, P.R., Porteus, M.H., and Yu, H. (2006). Human SMC5/6 complex promotes sister chromatid homologous recombination by recruiting the SMC1/3 cohesin complex to double-strand breaks. *EMBO J* *25*, 3377–3388.
- *Riaz, A., Kifayatullah, M.-U.-H., and Akhtar, N. (2017). Recent understanding of the classification and life cycle of herpesviruses: A review. *Sci Lett* *5*, 195–207.
- Saitoh, N., Goldberg, I.G., Wood, E.R., and Earnshaw, W.C. (1994). ScII: An abundant chromosome scaffold protein is a member of a family of putative ATPases with an unusual predicted tertiary structure. *The Journal of Cell Biology* *127*, 303–318.
- *Sarbjana, S., and West, S.C. (2014). Holliday junction processing enzymes as guardians of genome stability. *Trends in Biochemical Sciences* *39*, 409–419.
- Saribas, S., and Safak, M. (2020). A comprehensive proteomics analysis of the JC virus (JCV) large and small tumor antigen interacting proteins: Large T primarily targets the host protein complexes with V-ATPase and ubiquitin ligase activities while small t mostly associates with those having phosphatase and chromatin-remodeling functions. *Viruses* *12*, 1192.
- Schleiffer, A., Kaitna, S., Maurer-Stroh, S., Glotzer, M., Nasmyth, K., and Eisenhaber, F. (2003). Kleisins: A superfamily of bacterial and eukaryotic SMC protein partners. *Molecular Cell* *11*, 571–575.
- *Schneider, E., and Hunke, S. (1998). ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: Functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiology Reviews* *22*, 1–20.
- Schröfelbauer, B., Hakata, Y., and Landau, N.R. (2007). HIV-1 Vpr function is mediated by interaction with the damage-specific DNA-binding protein DDB1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 4130–4135.

- Sekiba, K., Otsuka, M., Ohno, M., Yamagami, M., Kishikawa, T., Suzuki, T., Ishibashi, R., Seimiya, T., Tanaka, E., and Koike, K. (2019). Inhibition of HBV transcription from cccDNA with nitazoxanide by targeting the HBx–DDB1 interaction. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 7, 297–312.
- Sergeant, J., Taylor, E., Palecek, J., Foustieri, M., Andrews, E.A., Sweeney, S., Shinagawa, H., Watts, F.Z., and Lehmann, A.R. (2005). Composition and architecture of the *Schizosaccharomyces pombe* Rad18 (Smc5-6) complex. *Molecular and Cellular Biology* 25, 172–184.
- Shiyanov, P., Nag, A., and Raychaudhuri, P. (1999). Cullin 4A associates with the UV-damaged DNA-binding Protein DDB. *Journal of Biological Chemistry* 274, 35309–35312.
- *Slagle, B.L., and Bouchard, M.J. (2016). Hepatitis B virus X and regulation of viral gene expression. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6, a021402.
- *Solé-Soler, R., and Torres-Rosell, J. (2020). Smc5/6, an atypical SMC complex with two RING-type subunits. *Biochemical Society Transactions* 48, 2159–2171.
- Sollier, J., Driscoll, R., Castellucci, F., Foiani, M., Jackson, S.P., and Branzei, D. (2009). The *Saccharomyces cerevisiae* Esc2 and Smc5-6 proteins promote sister chromatid junction-mediated intra-S repair. *Molecular Biology of the Cell* 20, 1671–1682.
- Stepp, W.H., Meyers, J.M., and McBride, A.A. (2013). Sp100 provides intrinsic immunity against human papillomavirus infection. *MBio* 4, e00845-13.
- Stepp, W.H., Stamos, J.D., Khurana, S., Warburton, A., and McBride, A.A. (2017). Sp100 colocalizes with HPV replication foci and restricts the productive stage of the infectious cycle. *PLoS Pathog* 13, e1006660.
- Strunnikov, A.V., Larionov, V.L., and Koshland, D. (1993). SMC1: An essential yeast gene encoding a putative head-rod-tail protein is required for nuclear division and defines a new ubiquitous protein family. *The Journal of Cell Biology* 123, 1635–1648.
- Tan, G., Xu, F., Song, H., Yuan, Y., Xiao, Q., Ma, F., Qin, F.X.-F., and Cheng, G. (2018). Identification of TRIM14 as a type I IFN-stimulated gene controlling hepatitis B virus replication by targeting HBx. *Front. Immunol.* 9, 1872.
- Taylor, E.M., Copsey, A.C., Hudson, J.J.R., Vidot, S., and Lehmann, A.R. (2008). Identification of the proteins, including MAGEG1, that make up the human SMC5-6 protein complex. *Molecular and Cellular Biology* 28, 1197–1206.
- Torres-Rosell, J., Machín, F., Farmer, S., Jarmuz, A., Eydmann, T., Dalgaard, J.Z., and Aragón, L. (2005). SMC5 and SMC6 genes are required for the segregation of repetitive chromosome regions. *Nat Cell Biol* 7, 412–419.
- Torres-Rosell, J., Sunjevaric, I., De Piccoli, G., Sacher, M., Eckert-Boulet, N., Reid, R., Jentsch, S., Rothstein, R., Aragón, L., and Lisby, M. (2007). The Smc5–Smc6 complex and SUMO modification of Rad52 regulates recombinational repair at the ribosomal gene locus. *Nat Cell Biol* 9, 923–931.
- *Tsekrekou, M., Stratigi, K., and Chatzinikolaou, G. (2017). The nucleolus: In genome maintenance and repair. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 1411.
- *Tsukuda, S., and Watashi, K. (2020). Hepatitis B virus biology and life cycle. *Antiviral Research* 182, 104925.
- Verkade, H.M., Bugg, S.J., Lindsay, H.D., Carr, A.M., and O’Connell, M.J. (1999). Rad18 is required for DNA repair and checkpoint responses in fission yeast. *Molecular Biology of the Cell* 10, 2905–2918.
- Verver, D.E., Hwang, G.H., Jordan, P.W., and Hamer, G. (2016). Resolving complex chromosome structures during meiosis: versatile deployment of Smc5/6. *Chromosoma* 125, 15–27.

- Vondrova, L., Kolesar, P., Adamus, M., Nociar, M., Oliver, A.W., and Palecek, J.J. (2020). A role of the Nse4 kleisin and Nse1/Nse3 KITE subunits in the ATPase cycle of SMC5/6. *Sci Rep* *10*, 9694.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* *1*, 945–951.
- *Wang, J.C. (2002). Cellular roles of dna topoisomerases: a molecular perspective. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *3*, 430–440.
- Wu, S.-Y., Lee, A.-Y., Hou, S.Y., Kemper, J.K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Chiang, Ch.-M. (2006). Brd4 links chromatin targeting to HPV transcriptional silencing. *Genes & Development* *20*, 2383–2396.
- Wu, N., Kong, X., Ji, Z., Zeng, W., Potts, P.R., Yokomori, K., and Yu, H. (2012). Scc1 sumoylation by Mms21 promotes sister chromatid recombination through counteracting Wapl. *Genes & Development* *26*, 1473–1485.
- Xaver, M., Huang, L., Chen, D., and Klein, F. (2013). Smc5/6-Mms21 prevents and eliminates inappropriate recombination intermediates in meiosis. *PLoS Genet* *9*, e1004067.
- Xu, F., Song, H., Xiao, Q., Li, N., Zhang, H., Cheng, G., and Tan, G. (2019). Type III interferon-induced CBF β inhibits HBV replication by hijacking HBx. *Cell Mol Immunol* *16*, 357–366.
- Xu, W., Ma, C., Zhang, Q., Zhao, R., Hu, D., Zhang, X., Chen, J., Liu, F., Wu, K., Liu, Y., et al. (2018). PJA1 coordinates with the SMC5/6 complex to restrict DNA viruses and episomal genes in an interferon-independent manner. *J Virol* *92*, e00825-18.
- Zabradý, K., Adamus, M., Vondrova, L., Liao, C., Skoupilova, H., Novakova, M., Jurcisinova, L., Alt, A., Oliver, A.W., Lehmann, A.R., et al. (2016). Chromatin association of the SMC5/6 complex is dependent on binding of its NSE3 subunit to DNA. *Nucleic Acids Res* *44*, 1064–1079.
- Zhao, X., and Blobel, G. (2005). From the cover: A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *102*, 4777–4782.
- Zhu, Y., Wang, G.Z., Cingöz, O., and Goff, S.P. (2018). NP220 mediates silencing of unintegrated retroviral DNA. *Nature* *564*, 278–282.