

Josip Madić

MOLEKULSKE OSNOVE PATOGENOSTI NEKIH HERPESVIRUSA

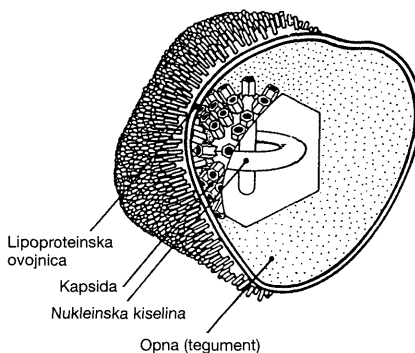
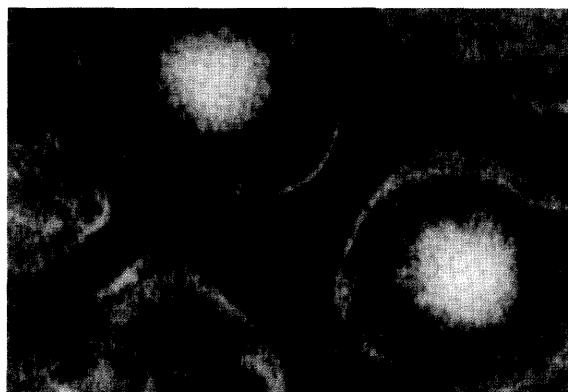
Uvod

Suvremene tehnike molekularne biologije omogućile su duboko pronicanje u srž molekularnih zbivanja na razini "virus-stanica" te uvelike pridonijele boljem poznavanju patogeneze virusnih infekcija. Smatra se da opis određenog virusa nije potpun ako u njegovu genomu nisu identificirani geni odnosno kodirajuće sekvencije za njegove glavne proteine te ako nije određena njihova uloga u ciklusu replikacije. Zahvaljujući životinjskim modelima, u novije doba razjašnjeni su mnogi temeljni događaji u interakciji herpesvirus-domaćin. U tom pogledu posebnu ulogu imaju glikoproteini virusne ovojnice i određeni proteini važni za neurotropizam i latenciju herpesvirusa. U ovom kratkom pregledu bit će riječi o novijim dostignućima u karakterizaciji herpesvirusnog genoma, glikoproteina i pojedinih enzima te njihovoj ulozi u nastanku infekcije, kao i o mogućnostima konstrukcije novih vakcinalnih sojeva genetičkim inženjeringom. Prvenstveno će se govoriti o virusu bolesti Aujeszzkoga (BA), virusu zaraznog rinotraheitisa goveda (ZRG), a zatim o virusima varicella-zoster i herpes simplex tip 1 (HSV-1) čovjeka.

Herpesvirusi su vrlo rasprostranjeni u prirodi i čine veliku, po patogenosti vrlo raznoliku skupinu virusa. Obzirom na podrijetlo i antigenski sastav do sada je opisano 106 različitih serotipova izdvojenih iz preko 50 životinjskih vrsta. Spomenimo samo kako je u čovjeka opisano 7 antigenski različitih herpesvirusa, u drugih primata 27, u goveda 5, konja 5, svinje 2, psa i mačke 1, a u domaće peradi i ptica 15. Ostali su dokazani u mnogih vrsta glodavaca, gmazova, vodozemaca i riba [1,2,3].

Svrstani su u potporodice: *Alphaherpesvirinae* (rodovi *Simplexvirus* i *Varicellovirus*), *Betaherpesvirinae* (rodovi *Cytomegalovirus*, *Muromegalovirus* i *Roseolovirus*) i *Gammapherpesvirinae* (rodovi *Lymphocryptovirus* i *Rhadinovirus*). Po morfologiji su svi herpesvirusi međusobno slični (sl. 1). Razlikuju se prema svojim biološkim osobinama, patogenosti i građi virusnog genoma. Dakako da svi nemaju jednako medicinsko značenje ni za humanu, a ni za veterinarsku medicinu. Virusi o kojima ćemo govoriti pripadaju alfaherpesvirusima roda *Varicellovirus*, a svrstani su pod nazivima: ljudski (humani) herpesvirus tip 3 (HHV-3), goveđi herpesvirus tip 1 (GHV-1) i svinjski herpesvirus tip 1 (SHV-1) [3].

HHV-3 je virus varicella-zoster, a uzrokuje vodene kozice kod djece i rijetku bolest "zoster" u odraslih. GHV-1 uzročnik je zaraznog rinotraheitisa (ZRG),



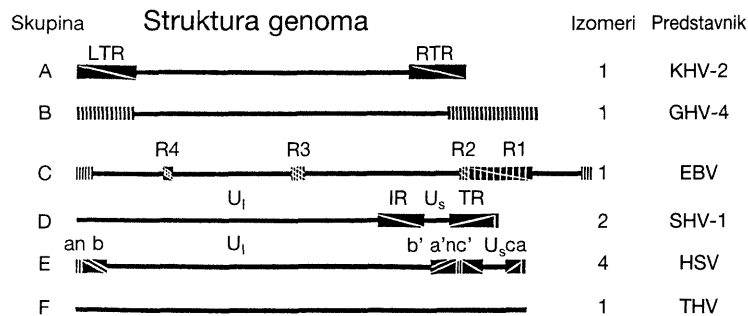
Sl. 1.

Morfologija herpesvirusa. (A) Elektronskomikroskopska snimka virusa herpes simplex. (B) Shematski prikaz herpesvirusne čestice (prema Horzinek, 1985¹¹). Herpesvirusi su veliki od 120 do 200 nm. Imaju lipoproteinsku ovojnicu na kojoj se nalaze izdanci (peplomere) dugi do 8 nm. Svaka peplomera predstavlja određeni glikoprotein. Kapsida im je ikozaedarne simetrije sa 162 prizmatične kapsomere. U kapsidu je u obliku vretena upakirana DNA. Bar: 100 nm.

zaraznoga pustularnog vulvovaginitisa odnosno balanopostitisa, pobačaja, ooforitis, encefalitisa i sistemnih infekcija goveda. SHV-1 uzročnik je bolesti Aujeszzkoga (BA) ili lažne bjesnoće. Redovito je smrtonosan za prasad u dobi do 2 tjedna i druge domaće i slobodno živuće sisavce, koje napada. Odrasle svinje su skladište uzročnika. HSV-1 uzrokuje akutni herpetični gingivostomatitis, herpetični egzem, keratokonjunktivitis, encefalitis i herpes labialis u čovjeka [4,5,6].

Grada Genoma Herpesvirusa

Genom herpesvirusa građen je od dvolančane DNA, koja, ovisno o vrsti virusa, sadrži od 124000 do 235000 parova baza. Iz toga proizlazi da bi oni najveći mogli kodirati za preko 100 proteina. Većina herpesvirusa u svom genomu ima ponavljajuće sekvencije veće od 100 parova baza, smještene na različitim mjestima pa se na osnovi toga i veličine genoma mogu svrstati u 6 skupina (sl. 2). U genomu skupine A, u kojoj se, uz druge, nalaze ljudski herpesvirus 6 i konjski herpesvirus 2, slijed s jednog kraja genoma se izravno ponavlja na drugom kraju. U skupini B, s goveđim herpesvirusom 4 i majmunskim herpesvirusom saimiri 2 kao predstavnicima, završni slijed se izravno ponavlja mnogo puta na oba kraja. U skupini C, čiji je predstavnik Epstein-Barrov virus (uzročnik infektivne mononukleoze čovjeka), broj završnih ponavljanja je malen, ali se na drugim mjestima u genomu mogu naći ponavljajuće sekvencije veće od 100 parova baza, koje dijele genom na nekoliko odsječaka. Skupina D, u koju su svrstani HHV-3, SHV-1 i GHV-1 ima genom sastavljen od jedinstvenoga dugog (unique long U_L) i jedinstvenoga kratkog područja (unique short U_S), koje je omeđeno završnim i unutarnjim ponavljajućim slijedom obratne orijentacije. Kod predstavnika skupine E, humanog virusa herpes simplex tip 1 i 2 (HSV-1 i HSV-2), oba područja, jedinstveno dugo i jedinstveno kratko, omeđena su ponavljajućim slijedovima obratne orijentacije. U genomu skupine F herpesvirusa, čiji je predstavnik majmunski tupaia herpesvirus, nema ponavljajućih slijedova [2,3].



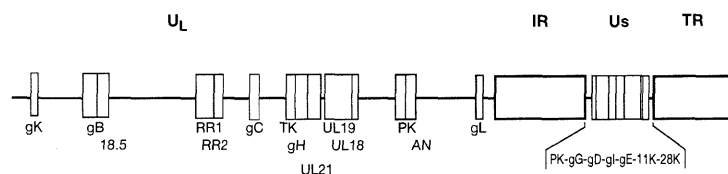
Sl. 2.

Shematski prikaz građe genoma herpesvirusa (prema Roizman i sur., 1995^o). KHV-2 = konjski herpesvirus tip 2; GHV-4 = goveđi herpesvirus tip 4; EBV = Epstein-Barrov virus; SHV-1 = svinjski herpesvirus tip 1; HSV = herpes simplex virus; THV = tupaia herpesvirus.

Genom SHV-1, GHV-1 i HHV-3

Genom naslovljenih herpesvirusa čini pravocrtna, dvolančana DNA molekula. Ona kod HHV-3 sadrži 124884 parova baza i može kodirati za 67 proteina od kojih

je identificirano oko polovice [7,8]. Genom SHV-1 sadrži oko 150000 parova baza i može kodirati za više od 70 proteina [9], a GHV-1 136000 i može kodirati za najmanje 69 proteina [10]. Raspored gena u genomu ovih virusa i HSV-1 čovjeka uvelike je sličan. Kao primjer ovdje prikazujemo kartu genoma SHV-1 (virus BA), na kojoj se vidi položaj pojedinih gena za glikoproteine o kojima se raspravlja (sl. 3). Osim toga, slijed aminokiselina mnogih proteina ovih virusa je također homologan te je i njihova biološka zadaća slična ili identična [8,9,10,11,12].



Sl. 3.

Karta genoma SHV-1 (prema Mulder i sur., 1997¹⁹). Genom se sastoji od jedinstvenoga dugog (UL) i jedinstvenog kratkog (US) područja. Oba područja međusobno su odijeljena obratnim, tzv. unutarnjim (IR) i završnim (TR) ponavljajućim sekvencijama. Izdvajamo gene koji kodiraju za glikoproteine B (gB), C (gC), D (gD), E (gE), G (gG), H (gH), I (gI), K (gK), i L (gL); podjedinice za ribonukleotid reduktaze RR1 i RR2, timidin kinazu (TK), alkalnu nukleazu (AN) i kodirajuća područja za proteinske kinaze (PK).

Virusni glikoproteini

Nositelji infektivnosti i virulencije herpesvirusa su njihovi glikoproteini, zatim neki enzimi važni za metabolizam DNA ili fosforilaciju te proteini koji sudjeluju u spajanju virusne DNA s kapsidom.

Ulazak herpesvirusa u stanicu domaćina zbiva se posredovanjem virusnih glikoproteina, koji poput izdanaka strše iz virusne lipoproteinske ovojnice (sl. 1). Za razliku od drugih virusa, herpesvirusi sadrže veći broj ovojničnih glikoproteina. Dosada ih je identificirano 11 u HSV-1, 10 u SHV-1, 10 u GHV-1 [10,12,13]. Kako su glikoproteini alfaherpesvirusa međusobno slični ili homologni, dogovoreno je da se označavaju velikim slovima abecede analogno HSV-1 (18th International Herpesvirus Workshop, Pittsburgh, Pennsylvania, 1993.). Tako sada nose oznake gB (prije gII za SHV-1 i gI za GHV-1), gC (prije gIII), gD (gp50), gE (gI za SHV-1 i gII za GHV-1), gG (gX), gH (gH), gI (gp63), gK (UL53), gL (UL1), gM i gN. Iako međusobno sličan, genom alfaherpesvirusa ipak nije podudaran. Tako je u HHV-3 poznato samo 6 glikoproteina. U njega nisu ustanovljeni gD i gG [8,14]. Također, postoje razlike u proteinskom sastavu npr. GHV-1 i HSV-1. Proteini UL0.5, UL3.5, *circ*, i US1.5 dokazani su u GHV-1, ali ne i u HSV-1. S druge strane drugih 12 proteina, među kojima je i glikoprotein gJ HSV-1 nije dokazano u GHV-1 [10]. Nadalje HSV-1 ima u US području 12, a HHV-3 samo 4 gena.

Virusni glikoproteini odgovorni su za adsorpciju virusa na stanične receptore te za penetraciju virusa u stanicu. Oni određuju virulenciju i tropizam virusa za

određeno tkivo, a prijeko su potrebni i za oslobađanje virusa iz stanice i njegov izravan prijenos sa stanice na stanicu. Neki glikoproteini služe kao receptori za Fc područje imunoglobulina G ili fragmenta C3b komplementa [15,16]. Njihova uloga u replikaciji i patogenezi razjašnjena je zahvaljujući upotrebi monoklonih protutijela, zasebnoj ekspresiji pojedinih njihovih gena u eukariotskim stanicama i proizvodnji delecijских mutanata.

Od nabrojanih glikoproteina, četiri (gC, gE, gI i gG) nisu nužna za umnožavanje virusa u staničnim kulturama pa su nazvani neesencijalnim (tablica 1). Međutim, svi su oni ustanovljeni u terenskim punovirulentnim izolatima virusa BA [17,18,19] i virusa ZRG [20] pa se smatraju važnima za preživljavanje virusa u životinjskoj populaciji. Suprotno njima gB, gD, gH i gL su esencijalni za infektivnost virusa, jer virusna čestica kojoj nedostaje jedan od njih ne može prodrijeti u stanicu domaćina [12].

Uloga glavnih glikoproteina alfa herpesvirusa

Glavnim glikoproteinima alfa herpesvirusa smatraju se gB, gD i gC. Glikoproteini gB i gD mogu se dokazati već za 2-3 sata nakon infekcije te se u procesu umnožavanja virusa javljaju kao rani (early) ili β proteini, dok je gC kasni ili γ protein [21,22]. Naime, proces umnožavanja herpesvirusa odvija se u jezgri domaćina u nekoliko faza. Prvo se prepisuju jako rani (immediate-early) geni, koji kodiraju za jako rane ili α proteine. Ti prepoznaju samo specifične sekvencije na virusnom genomu, što dovodi do transkripcije nove skupine tzv. ranih (early) gena, koji kodiraju za β proteine važne za sintezu DNA. Posljednja se eksprimira skupina gena, koji pretežito kodiraju za strukturne (gliko)proteine virusne čestice ili kasne γ proteine. Nakon sinteze svih komponenti, nove virusne čestice nastaju na unutar-njoj membrani stanične jezgre, putuju kroz endoplazmatski retikulum i Golgijev aparat te se oslobađaju iz stanice. Kao primjer navodimo da se novoumnoženi SHV-1 može dokazati već za 5 sati nakon inokulacije stanične kulture. Njegov titar naglo raste te za sljedećih 7 sati dostiže oko $10^{7.5}$ TCID₅₀ na 10^6 inokuliranih stanica [11].

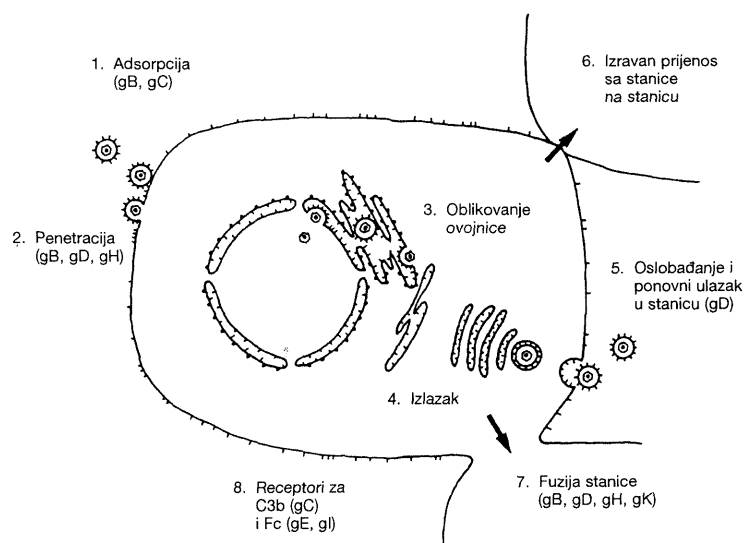
Glikoprotein gB je glavni protein virusne ovojnice alfa herpesvirusa i potiče tvorbu neutralizacijskih protutijela u inficiranom domaćinu. U svih homolognih virusa igra važnu ulogu u penetraciji slobodnog viriona u ciljnu stanicu, tj. u fuziji virusne ovojnice sa citoplazminom membranom stanice. Također je potreban za izravno širenje virusa s primarno inficirane stanice na susjednu neinficiranu stanicu (sl. 4; tablica 1.). Heterologni gB može zamijeniti homologni. Tako gB govedeg herpesvirusa 1 može zamijeniti i preuzeti ulogu gB svinjskog herpesvirusa 1, a gB svinjskog herpesvirusa 1 može zamijeniti gB virusa herpes simplex 1 čovjeka [23,24]. To jasno potvrđuje funkcionalnu sličnost glikoproteina gB u različitim vrstama alfa herpesvirusa.

Glikoprotein gC sudjeluje u adsorpciji SHV-1, GHV-1 i HSV-1 na stanicu domaćina. Taj glikoprotein veže se zapravo na heparan sulfat proteoglikan na površini stanice [13,25,26,27,28]. Međutim, ta veza je samo inicijalna i dosta labava. Za virus BA i HSV-1 ustanovljeno je kako se stabilna veza između virusa i stanice uspostavlja pomoću glikoproteina gD, koji se veže na do sada nepoznati stanični receptor [9,12,29]. Prisutnost heparan sulfat proteoglikana na površini većine stanica

Tablica 1.

Uloga glikoproteina virusa bolesti Aujeskoga (BA) i zaraznog rinotraheitisa goveda (ZRG) u procesu umnožavanja (prema Mettenleiter, 1994.⁸; Baranowski i sur., 1996.²²; Nauwynck, 1997.¹¹).

Glikoprotein	Esencijalan BA ZRG		Adsorpcija BA ZRG		Penetracija BA ZRG		Širenje sa st. na stan. BA ZRG		Virulencija BA ZRG	
gB	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
gC	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
gD	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
gE	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
gG	-	-	-	?	-	?	-	?	-	?
gH	+	+	-	-	+	+	+	(+)	-	-
gI	-	-	-	-	-	-	-	+	(+)	(+)
gK	-	-	?	?	?	?	+	?	?	?
gL	+	?	-	?	+	+	+	?	?	?
gM	-	-	?	?	(+)	?	-	?	?	(+)
gN	?		?		(+)		-		?	



Sl. 4.

Shematski prikaz uloge glikoproteina virusa herpes simplex tip 1 čovjeka (prema Manservigi i Cassai, 1991.¹⁴).

kralježnjaka koje imaju jezgru objašnjava veliku proširenost herpesvirusa u životinjskim svijetu. Proteoglikani se nalaze u rahlom vezivnom tkivu, bazalnoj membrani i citoplazmnoj membrani stanice. Kolageni i proteoglikani povezuju površinske komponente stanice s citoskeletnim elementima, a vjerojatno i jezgrom. Stoga oni djeluju kao vrlo osjetljivi radarski sustav koji stanici daje sve informacije o tome što se zbiva u njezinom mikrookolišu. Heparan sulfat proteoglikan je ustanovljen u stanicama plućnoga, jetrenog i drugih tkiva. Jetrena stanica ima čak 4×10^8 tih receptorskih molekula [30]. Iznenadujuće je to da gC nije esencijalan za virusno umnožavanje, što pretpostavlja da i drugi virusni glikoproteini prepoznaju heparan sulfat proteoglikan kao receptor. U odsutnosti homolognog gC, HSV-1 veže se na heparan pomoću gB [14,31,32]. Glikoprotein gC važan je i kao imunogen, jer potiče tvorbu humoralne i stanične imunosti. Čini se da je i tip citopatskog učinka u različitim staničnim kulturama uvjetovan količinom gC na površini inficirane stanice. Povećanjem njegove količine preteže zaokruživanje stanica, a smanjenjem ili njegovom odsutnošću preteže tvorba sincicija [33].

Glikoprotein gD je također esencijalan za virusnu infektivnost. On je odgovoran za penetraciju virusa u ciljnu stanicu. Za razliku od HSV-1 i GHV-1, on nije potreban za izravan prijenos SHV-1 iz stanice u stanicu te se virusna čestica bez njega može u domaćinu širiti samo izravno sa stanice na stanicu. Virioni koji se oslobode iz stanice, a ne posjeduju gD ne mogu više inficirati novu stanicu [34]. On je ujedno i najvažiji imunogen alfa herpesvirusa. Životinje cijepljene pročišćenim gD virusa BA bile su zaštićene od izazivačke infekcije virulentnim virusom [9].

Uloga drugih (manjih) glikoproteina alfa herpesvirusa

Glikoprotein gE tvori kompleks s **glikoproteinom gI**, koji je važan za intersticijsko širenje virusa u središnjem živčanom sustavu [35,36]. On je nositelj virulencije i neurotropizma alfa herpesvirusa. Posreduje u prenošenju virusa sa stanice na stanicu i oslobađanju virusa iz stanice [9,12,14,22,37]. Iako ne u svim sojevima jednako, nedostatak gE bitno smanjuje virulenciju SHV-1 i GHV-1 [38,39]. Zbog toga je on od velikog značenja za konstrukciju delecijских mutanti lišenih gena za gE, koje mogu poslužiti kao vakcinalni sojevi virusa BA i virusa ZRG [18,40,41]. Glikoprotein gE pojačava stupanj latencije alfa herpesvirusa [37]. Na površini stanica inficiranih HSV-1 ustanovljeni su receptori za Fc područje imunoglobulina. Ta aktivnost pridaje se prvenstveno glikoproteinu gE, ali kompleks s gI pojačava afinitet prema spomenutim receptorima [42]. Fc-receptorska aktivnost dosada nije ustanovljena u SHV-1 i GHV-1 [22]. Iako kompleks gE/gI čini funkcionalnu jedinicu alfa herpesvirusa, za GHV-1 je dokazano da nedostatak glikoproteina gI ipak učinkovitije smanjuje virulenciju virusa nego samo nedostatak gE [43].

Glikoprotein gG nije esencijalan za umnažanje virusa i nema učinka na virulenciju HSV-1 i SHV-1 [9,44]. Suprotno tome, glikoprotein gG-negativna mutanta GHV-1 ipak ima oslabljenu virulenciju [43].

Glikoprotein gH je strukturni protein. Važan je za penetraciju virusa u stanicu i njegovo širenje od stanice do stanice, ali za razliku od gB i gD ne sudjeluje u adsorpciji. Nekovalentnom vezom je vezan u kompleks gH/gL pa je uloga glikoproteina

gH i gL podudarna [9,22]. Glikoprotein gH sudjeluje u staničnoj fuziji HSV-1 [14]. Stvaranje kompleksa gH/gL bitno je za intracelularni transport HSV-1 [45].

Glikoprotein gK virusa herpes simplex 1 je odgovoran za fuziju inficiranih stanica, ali ne izravno. On ne dospijeva na površinu inficirane stanice, već se nakuplja u endoplazmatskom retikulumu i jezgri membrani [46]. Bez njega je onemogućen izlazak virusnih čestica iz inficirane stanice [47]. Biološke osobine gK zasad su nepoznate u SHV-1 i GHV-1.

Glikoprotein gM nije esencijalan za replikaciju HSV-1 u staničnoj kulturi. Mutanta lišena toga glikoproteina slabije se širi i umnaža u stanicama živčanog sustava, ali u njima ipak ostaje u latentnom obliku [48]. Nedostatak gM uvelike pridonosi oslabljivanju patogenosti SHV-1 [49], ali njegova uloga ipak ostaje nedorečenom budući da se u vakcinalnom soju Bartha lišenom gena za gM, virulencija može ponovno uspostaviti vraćanjem kompleksa gE/gI i gC [50].

Važniji virusni enzimi

Spomenut ćemo dva virusna enzima važna za replikaciju virusne DNA. Jedan je timidin kinaza (TK), a drugi ribonukleotid reduktaza (RR). Timidin kinaza je potrebna za fosforilaciju deoksitimidina do monofosfata, a ribonukleotid reduktaza reducira ribonukleotid-difosfate do deoksi-proizvoda, koji se koriste za sintezu virusne DNA. Kako se oba nalaze u stanicama koje se mogu dijeliti, ali ne i u stanicama koje se ne mogu dijeliti, nije teško zaključiti da su prijeko potrebni za umnožavanje virusa u stanicama koje se ne dijele, kao što su živčane i periferne mononuklearne stanice [11]. Virusne mutante bez TK i RR imaju smanjenu virulenciju i slabo su patogene za domaćina. U pokusnoj infekciji te mutante uzrokovala su blagu kliničku sliku BA u svinja. Mutanta lišena RR se 100 do 1000 puta slabije umnožava u nosnoj i orofaringealnoj sluznici od mutante bez TK. To znači da je RR potrebna za replikaciju virusa od TK [12].

Alkalna nukleaza (UL12) nije esencijalna za umnožavanje virusa u staničnim kulturama. Dokazano je da je odgovorna za virulenciju virusa BA u miša. U HSV-1 igra važnu ulogu prilikom dozrijevanja virusa odnosno upakiravanja DNA u kapsidu. dUTPaza nositelj je neurovirulencije HSV-1 za miša. Njezin homolog nije dokazan u SHV-1 i GHV-1 [12].

Proteinske kinaze (PK) reguliraju fosforilaciju proteina, a poznato je da one imaju glavnu ulogu u prenošenju signala, regulaciji rasta i diferencijaciji stanica. Jedna kodirajuća sekvencija za virusnu PK nalazi se u U_L13, a druga u U_S3 području genoma alfaherpesvirusa. Ukloni li se ona u području U_L13, SHV-1 se i nadalje može umnožavati u staničnoj kulturi i ostaje patogen za miša, dok mutanta lišena gena za PK u području U_S3 ima smanjenu virulenciju i sporije se replicira u staničnim kulturama. Ustanovljeno je da ne može normalno pupati na jezgri membrani epitelnih stanica nosne sluznice i stanične kulture SK-6. Stoga se virusne U_S3-mutante nakupljaju perinuklearno [12].

Neurotropizam i virulencija

Kao što je spomenuto, herpesvirusi o kojima raspravljamo uzrokuju infekcije središnjeg živčanog sustava (SŽS), što govori da su manje ili više neurotropni. Naročito izražen neurotropizam ima SHV-1. Taj virus u domaćina prodire kroz nazofaringealno područje. Infekcija započinje njegovim umnažanjem u stanicama sluznice nosa i ždrijela. Nakon infekcije perifernih živčanih stanica dopijeva intra-aksonalnim prijenosom do regionalnih živčanih ganglija. On se može replicirati u živčanim i glija stanicama i dospjeti u središnji živčani sustav, gdje uzrokuje encefalitis smrtonosan za prasac na sasi [35,51,52]. Za GHV-1 nije još potpuno razjašnjeno dopijeva li u središnji živčani sustav aksonalnim putem ili je posljedica viremije, što pretpostavlja prodiranje kroz hematoencefalnu prepreku. Prodiranje kroz hematoencefalnu prepreku moglo bi objasniti zagonetku zašto GHV-1 ipak samo sporadično uzrokuje encefalitis. Za razliku od njega SHV-1 se u preživaca redovito prenosi živčanim putem i redovito uzrokuje encefalitis [53].

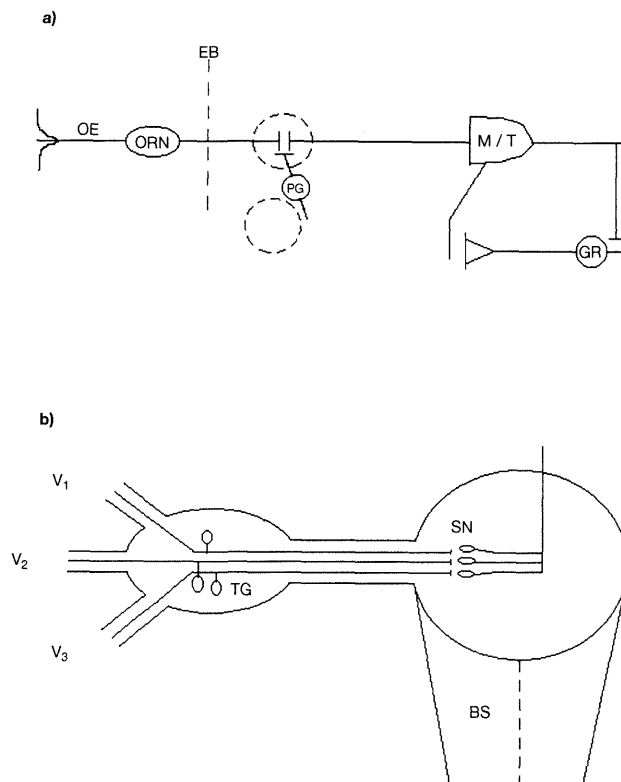
Na štakorskom modelu proučavan je način prodiranja herpes simplex virusa u SŽS. Ustanovljeno je da se virus prenosi preko sinaptički povezanih neurona pa su herpesvirusi poslužili i kao transneuronski markeri za proučavanje neuroanatomske organizacije [54,55].

Važnu ulogu u transneuronskom širenju SHV-1 ima neesencijalan gE, koji je, kako smo vidjeli, nositelj virulencije virusa. On ima određenu regulacijsku ulogu u širenju virusa sa stanice na stanicu. Prije je potreban za transneuronski (preko sinapsi) prijenos virusa. Virulentan virus u kojem je eksprimiran gE dopijeva u mozak prasadi za 4 do 7 dana, dok mutante u kojima nije eksprimiran gE tj. glikoprotein gE-negativne mutante teško dopijevaju u središnji živčani sustav. Naime, gE-negativna mutanta SHV-1 se, doduše, umnožava u perifernom živčanom tkivu i inficira neurone prvog reda te se širi prema središnjem živčanom sustavu olfaktornim i trigeminalnim putem, ali se, za razliku od virulentnog virusa, ne prenosi ili se u znatno manjoj mjeri prenosi na živčane stanice drugoga i trećeg reda (sl. 5) [35,56,57]. To znači da je gE važniji za transneuronski prijenos nego za penetraciju i umnožavanje SHV-1 u živčanim stanicama prvog reda. Osim toga, nužan je za širenje virusa u simpatikusu i parasimpatikusu [57]. Glikoproteini gE i gI omogućuju infekciju neurona prvoga reda retino-recipijentnog područja i odatle prijenos virusa do središnjeg živčanog sustava, ali određenu ulogu u širenju ima i koncentracija inokuliranog virusa [58,59]. Prema tome, kompleks gE/gI odgovoran je za prijenos virusa u živčevlju, jer omogućuje oslobađanje virusa iz živčanih stanica prvog reda i fuziju neurona na sinapsama [35,59]. Ipak, neki noviji radovi govore o mnoštvenoj ulozi gE te više ističu njegovo posredništvo u virulenciji i neurotropizmu, nego njegov izravni učinak u sklopu same virusne čestice [60].

Glikoprotein gE je nositelj neuroin vazivnosti i u GHV-1 [10] i HSV-1 [61,62], a pretpostavlja se i u HHV-3 [8].

Latencija

Herpesvirusi uzrokuju latentne infekcije. Tijekom latentne faze ne mogu se u inficiranom domaćinu dokazati infektivne virusne čestice ni virusni antigeni, ali se



Sl. 5.

Shematski prikaz transneuronskog širenja SHV-1 (a) olfaktornim putom i (b) trigeminalnim putom (prema Mulder i sur., 1994³⁹). (a) Olfaktorni receptorski neuroni (ORN) u olfaktornom epitelu (OE) pružaju aksone kroz etmoidnu kost (EB) u olfaktorni bulbus (OB), gdje završavaju u neuropilima, nazvanima glomeruli. Ovdje se aksoni sinapsama vežu na drugi red neurona, na periglobularne (PG) i mitralne (M/T). Konačno granulski neuroni (GR) (treći red neurona) stvara recipročne sinapse s mitralnima. (b) Neuroni u trigeminalnom gangliju (TG) primaju aferentne aksone iz oftalmičkog (V1), maksilarnog (V2) i mandibularnog (V3) živca i pružaju eferentne aksone trigeminalnim živcem, koji završavaju u moždanom deblu (BS). Tu se sinapsama vežu na drugi red neurona u senzornom nukleusu (SN) trigeminalnog živca.

osjetljivim suvremenim metodama, npr. pomoću lančane reakcije polimerazom ili hibridizacijom, može dokazati virusna DNA na mjestu latencije [53,63]. Pojava stre-

sa dovodi do reaktivacije virusa i njegovog ponovnog izlučivanja iz inficirane jedinke. Latentna DNA SHV-1 i GHV-1 pretežito se nalazi u trigeminalnim ganglijima, ali i u olfaktornom bulbusu, nosnoj sluznici, tonzilama i perifernim limfocitima [63,64,65]. Idealno mjesto ugnježđenja virusne DNA su, dakle, visoko diferencirane i dugo živuće stanice koje se ne dijele, kao što su živčane i limfoidne stanice. Latentno inficirane stanice ne smiju biti razorene, već zaštićene od apoptoze i destrukcije pomoću imunoloških mehanizama. Stoga se za vrijeme latentne faze virusni proteini ili uopće ne proizvode ili su podnošljivi za imunološki sustav [53].

Latencija SHV-1 uvelike ovisi o genotipu vakcinalnog soja i načinu njegove aplikacije. U intramuskularno vakciniranih svinja dokazana je manja količina latentnoga virulentnog virusa rabljenog za izazivačku infekciju nego u intranazalno vakciniranih [66].

Molekulni mehanizmi koji sudjeluju u uspostavljanju i održanju latencije nisu još poznati. Zna se da je u genomu HSV-1, SHV-1 i GHV-1 dokazana aktivnost tzv. LAT (latency associated transcripts) transkripcijske jedinice [9,10]. U genomu SHV-1 ona iznosi 12,6 kb, a pokriva cijeli regulacijski gen IE180 (immediate early 180) i većim dijelom regulacijski gen EP0 (early protein 0) [67]. Njezina uloga je ipak još uvijek spekulativna.

Za razliku od drugih alfa herpesvirusa, latencija HHV-3 nije povezana s prisutnošću LAT-a. Također nije poznati ni mehanizam reaktivacije toga virusa, premda se obično povezuje s imunosupresijom ili imunosnom disfunkcijom. Na štakorskom modelu ustanovljena je ekspresija nekoliko "otvorenih okvira čitanja" (open reading frames ORF) ORF 4, ORF 29, ORF 62, ORF 63 toga virusa [8].

Pretpostavlja se da reaktivaciju herpesvirusa vjerojatno potiče neuropeptid induciran stresom, što bi dovelo do ekspresije virusnoga ili staničnog transaktivatorskog proteina i posljedične replikacije virusa. Od jako ranih proteina (IE) nekoliko ih ima regulacijsku ulogu. Npr. ICP0 (infected cell protein) može aktivirati široki raspon virusnih gena. Indukcija ekspresije gena za ICP0 može biti dovoljna da započne reaktivacija latentnog herpesvirusa. Metabolizam dugo živućih, nereklicirajućih stanica u kojima virus ostaje u latentnoj fazi, vjerojatno nije dovoljno aktivan za uspješnu virusnu replikaciju. Stoga mora doći i do ekspresije virusnih gena koji kodiraju za virusne enzime. Tako je poznato da TK-negativne mutante herpesvirusa imaju slabu moć reaktivacije [53].

Delecijske mutante

Poznavanje funkcije pojedinih (gliko)proteina alfa herpesvirusa našlo je svoju primjenu u proizvodnji novih vakcina protiv herpesvirusnih zaraza životinja.

Poznate su prirodne delecijske mutante SHV-1 i GHV-1 s krnjim genomom za gE [18,40,68]. One se mogu proizvesti i genetskim inženjerstvom ukloni li se iz genoma herpesvirusa gen ili geni, koji kodiraju za (gliko)proteine odgovorne za njihovu virulenciju. Molekularna istraživanja vakcinalnog soja Bartha (prirodna mutanta) virusa BA pokazala su da mu je genom u odnosu na punovirulentne terenske izolate kraći za 3.6 kb u U_s području i da ne može kodirati za gE i gI [9,69]. Nedostatak gE bitno smanjuje virulenciju virusa BA [38]. U svinja kojima je intranazalno apliciran gE-negativan soj ne javljaju se više živčani poremećaji,

znakovi respiratorne bolesti, groznica ni anoreksija. Sojevi s istodobnom delecijom za gE, TK i gG ne prenose se s vakciniranih na nevakcinirane svinje [12]. U veterinarskoj medicini gE i TK/gG negativni sojevi upotrebljavaju se za proizvodnju tzv. "obilje-ženih ili markiranih" vakcina protiv herpesvirusnih zaraza. Uporabom tih vakcina mogu se razlikovati inficirane od vakciniranih životinja. To je važno za iskorjenjivanje životinjskih herpesvirusnih zaraza [18,39,40,70,71].

Vakcinalni soj Zagreb (Za) govedeg herpesvirusa 1

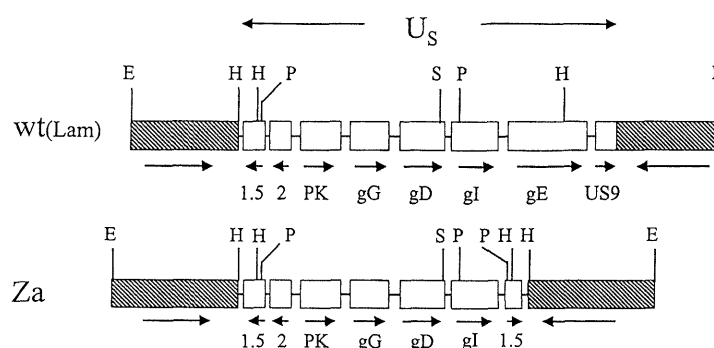
Budući da je vakcinalni soj Zagreb prva opisana prirodna gE-negativna mutanta GHV-1, slično kao i vrlo poznati soj Bartha SHV-1, osvrnut ćemo se ukratko na njegovo podrijetlo. Soj S1/85 GHV-1 bio je ugrađen u monovalentnu vakcinu protiv ZRG-a i bivalentnu protiv ZRG-a i parainfluence 3 goveda [72]. U virološkom laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu desetak puta je bio propasiran u kontinuiranoj staničnoj kulturi govedega embrijskog bubrega (bovine embryonic kidney, BEK) i liofiliziran. Dalje je bio obrađivan u Centraal Diergeneeskundig Instituut, Lelystad, u Nizozemskoj, gdje je s tim sojem napravljen čitav niz eksperimenata od 1990. do najnovijeg doba. Liofilizat je bio resuspendiran u destiliranoj vodi, dva puta propasiran u staničnoj liniji govede embrijske traheje (embryonic bovine trachea, EBTr) i nazvan Za1. Dalje je bio tri puta uzgajan u stanicama EBTr i pročišćen tako da je u svakoj pasaži nakon pojave citopatskog učinka odabran mali "plaque", jer se populacija virusa sastojala od mješavine malih i velikih plakova. Tada se već dugo znalo da gE delecijaska mutanta SHV-1 tvori male plakove, što je kasnije opisano i za gE delecijsku mutantu GHV-1[73]. Nakon trokratnog pročišćavanja dobiven je soj nazvan Zagreb 4, kasnije preimenovan samo u soj "Zagreb". Analiza njegova genoma restrikcijskim enzimom *HindIII* pokazala je kako mu u području U_S nedostaje fragment od 8.2 kb, ali se pojavio novi od 7.4 kb, što je upućivalo na deleciju u području U_S . U daljnjoj obradbi *EcoRI* (C) fragment, koji obuhvaća cijelo U_S područje bio je kloniran u pACYC 184 i nazvan p775. Analizom toga fragmenta restrikcijskim enzimima dokazano je kako soj Zagreb (Za) ima deleciju od 2.7 kb u U_S području, koja obuhvaća čitav "otvoreni okvir čitanja" za gen gE i gen U_{S9} (sl. 6). To je ujedno i prvi dokaz da je gen U_{S9} u GHV-1 neesencijalan [74].

Od soja Zagreb pripravljene su vrlo dobre "markirane" vakcine protiv ZRG-a [40,75].

Inače se u U_S području genoma GHV-1 nalazi barem šest neesencijalnih ($U_{S1.5}$, U_{S2} , U_{S3} (PK), U_{S4} (gG), U_{S7} (gI) U_{S8} (gE) i jedan esencijalan gen U_{S6} (gD)(76). Sada je dokazan i gen U_{S9} (74).

Vektorske i plazmidne vakcine

Genom virusa BA i ZRG može poslužiti i kao vektor stranih gena. Tako je gen koji kodira za protein E1 virusa svinjske kuge ugrađen u gE-negativni soj virusa BA. Svinje cijepljene tom rekombinantom bile su istodobno zaštićene od BA i



Sl. 6.

Shematski prikaz građe U_S područja punovirulentnog divljeg soja Lam GHV-1 i rekombinante Zagreb (Za). Soj Zagreb ima kraće područje U_S zbog delecije od 2.7 kb, koja obuhvaća gene gE i US9 (prema Rijsewijk i sur., 1999*).

svinjske kuge [77]. Goveda pak cijepljena gE-negativnom mutantom virusa ZRG u čiji je genom umjesto gena za gE ugrađen gen za protein G respiratornoga sincicijskog virusa bila su istodobno zaštićena od ZRG-a i infekcije govedim respiratornim sincicijskim virusom [78].

Premda još uvijek u eksperimentalnoj fazi, najznatniji napredak na području vakcinologije u novije doba postignut je proizvodnjom tzv. "DNA ili plazmidnih" vakcina. U tim vakcinama plazmidi su vektori gena koji kodiraju za imunogene glikoproteine gC i gD virusa BA [79]. DNA vakcina pripravljena od mješavine plazmida koji kodiraju za gB, gC, gD i gE virusa BA bila je djelotvornija od inaktivirane vakcine [80].

Zaključak

Molekularna virologija znatno je napredovala posljednjih dvadesetak godina. Omogućila je identifikaciju i određivanje funkcije pojedinih virusnih gena mnogih virusa. Određivanje sekvencije čitavog genoma alfaherpesvirusa olakšalo je razvitak vrlo osjetljivih i specifičnih dijagnostičkih postupaka i konstrukciju rekombinantnih virusa s krnjim genomom ili zamjenom pojedinih gena. Konačni cilj je do kraja odrediti ulogu pojedinih virusnih komponenata važnih u patogenezi herpesvirusnih zaraza kako bi se moglo smišljeno omesti virusnu replikaciju i prekinuti bilo akutnu litičku, bilo latentnu infekciju. Identifikacija virusnih komponenata i proučavanje molekularnih mehanizama replikacije virusa od velike su koristi za dijagnostiku, preventivu i antivirusnu terapiju.

LITERATURA

1. Roizman B, Baines J. The diversity and unity of *Herpesviridae*. *Comp Immun Microbiol infec Dis* 1991; 14: 63-79.
2. Roizman B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson AC, Studdert MJ. The family *Herpesviridae*. An update. *Arch Virol* 1992; 123: 425-49.
3. Roizman B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson AC, Studdert MJ. Family *Herpesviridae*. U: Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarwis AW, Martelli GP, Mayo MA, Summers MD, ur. *Virus Taxonomy*, 6th Rep. of the Int. Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol Suppl* 10; Wien, New York: Springer Verlag, 1995; 114-27.
4. Brudnjak Z. *Medicinska virologija*. Zagreb: Jumena, 1987.
5. Cvetnić S. Morbus Aujeszkyi u svinja. *Praxis vet* 1991; 39: 13-26.
6. Cvetnić S. Virusne bolesti životinja. Zagreb: HAZU, Školska knjiga, 1997.
7. Davison AJ, Scott JE. The complete DNA sequence of varicella-zoster virus. *J gen Virol* 1986; 67: 1759-816.
8. Rentier B, Piette J, Baudoux L, Debrus S, Defechereux P, Merville M-P, Sadzot-Delvaux C, Schoonbroodt S. Lessons to be learned from varicella-zoster virus. *Vet Microbiol* 1996; 53: 55-66.
9. Mettenleiter ThC. Pseudorabies (Aujeszky's disease) virus: state of the art. *Acta Vet Hung* 1994; 42: 153-77.
10. Schwytzer M, Ackermann M. Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Vet Microbiol* 1996; 53: 17-29.
11. Nauwynck HJ. Functional aspects of Aujeszky's disease (pseudorabies) viral proteins with relation to invasion, virulence and immunogenicity. *Vet Microbiol* 1997; 55: 3-11.
12. Mulder WAM, Pol JMA, Gruys E, Jacobs L, De Jong MCM, Peeters BPH, Kimman TG. Pseudorabies virus infection in pigs. Role of viral proteins in virulence, pathogenesis and transmission. *Vet Res* 1997; 28: 1-17.
13. Spear PG. Entry of alphaherpesviruses into cells. *Sem Virol* 1993; 4: 167-80.
14. Manservigi R, Cassai E. The glycoproteins of the human herpesviruses. *Comp Immun Microbiol infect Dis* 1991; 14: 81-95.
15. Dubin G, Frank I, Friedman HM. Herpes simplex virus type 1 encodes two Fc receptors which have different binding characteristics for monomeric immunoglobulin G (IgG) and IgG complexes. *J Virol* 1990; 64: 2725-31.
16. Litwin V, Sandor M, Grose C. Cell surface expression of the varicella-zoster virus glycoproteins and Fc receptor. *Virology* 1990; 178: 263-72.
17. Marchioli CC, Yance RY, Wardly RC, Thomsen BS, Post LE. A vaccine strain of pseudorabies virus with deletions in the thymidine kinase and glycoprotein X genes. *Am J Vet Res* 1987; 48: 1577-83.
18. Van Oirschot JT, Gielkens ALJ, Moormann RJM, Berns AJM. Marker vaccines, virus protein-specific antibody assays and the control of Aujeszky's disease. *Vet Microbiol* 1990; 23: 85-101.
19. Kit S. Genetically engineered vaccines for control of Aujeszky's disease virus (pseudorabies virus). *Vaccine* 1990; 8: 420-4.
20. Kaashoek MJ, Rijsewijk FAM, Maris-Veldhuis MA, Van Oirschot JT. Non essential glycoproteins gC, gG, gI and gE are expressed in all of 223 isolates of bovine herpesvirus 1. U: Kaashoek MJ, Marker vaccines against bovine herpesvirus 1 infections. PhD Thesis, Utrecht: University of Utrecht, 1995; 125-34.
21. Ludwig GV, Letchworth GJ 3d. Temporal control of bovine herpesvirus 1 glycoproteins synthesis. *J Virol* 1987; 61: 3292-94.

22. Baranowski E, Keil G, Lyaku J, Rijsewijk FAM, Van Oirschot JT, Pastoret P-P, Thiry E. Structural and functional analysis of bovine herpesvirus 1 minor glycoproteins. *Vet Microbiol* 1996; 53: 91-101.
23. Rauh I, Weiland F, Fehler F, Keil G, Mettenleiter ThC. Pseudorabies virus mutants lacking the essential glycoprotein gII can be complemented by glycoprotein I of bovine herpesvirus 1. *J Virol* 1991; 65: 621-31.
24. Mettenleiter ThC, Spear PG. Glycoprotein gB (gII) of pseudorabies virus can functionally substitute for glycoprotein gB in herpes simplex virus type 1. *J Virol* 1994; 68: 500-4.
25. Mettenleiter ThC, Schreuers C, Zuckermann F, Ben-Porat T, Kaplan AS. Role of glycoprotein gIII of pseudorabies virus in virulence. *J Virol* 1988; 62: 2712-17.
26. Wudunn D, Spear PG. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J Virol* 1989; 63: 52-8.
27. Mettenleiter ThC, Zsak L, Zuckermann F, Sugg N, Kern H, Ben-Porat T. Interaction of glycoprotein gIII with a cellular heparinlike substance mediates adsorption of pseudorabies virus. *J Virol* 1990; 64: 278-86.
28. Sawitzky D, Hampl H, Habermehl K-O. Comparison of heparin-sensitive attachment of pseudorabies virus (PRV) and herpes simplex virus type 1 and identification of heparin-binding PRV glycoproteins. *J gen Virol* 1990; 71: 1221-25.
29. Karger A, Mettenleiter ThC. Glycoproteins gIII and gp50 play dominant roles in the biphasic attachment of pseudorabies virus. *Virology* 1993; 194: 654-64.
30. Arias IM, Jacoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA. The liver. Biology and pathology. New York: Raven press, 2nd edition, 1988.
31. Herold BC, WuDunn D, Soltys N, Spear PG. Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cell and in infectivity. *J Virol* 1991; 65: 1090-98.
32. Herold BC, Visalli RJ, Susmarski N, Brandt CJ, Spear PG. Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. *J gen Virol* 1994; 75: 1211-22.
33. Katayama S, Okada N, Ohgitani T, Kokubu T, Shimizu Y. Influence of cell surface glycoprotein gC produced by pseudorabies virus on cytopathic effect. *J Vet Med Sci* 1998; 60: 905-9.
34. Hefner S, Kovacs F, Klupp B, Mettenleiter ThC. Glycoprotein gp50-negative pseudorabies virus: a novel approach toward a nonspreading live herpesvirus vaccine. *J Virol* 1993; 67: 1529-37.
35. Mulder W, Jacobs L, Priem J, Kok G, Wagenaar F, Kimman T, Pol J. Glycoprotein gE-negative pseudorabies virus has a reduced capability to infect second- and third-order neurons of the olfactory and trigeminal routes in the porcine central nervous system. *J gen Virol* 1994; 75: 3095-106.
36. Mulder W, Pol J, Kimman T, Kok G, Priem J, Peeters B. Glycoprotein gD-negative pseudorabies virus can spread transneuronally via direct neuron to neuron transmission in its natural host, the pig, but not after additional inactivation of gE or gI. *J Virol* 1996; 70: 2191-200.
37. Jacobs L. Glycoprotein E of pseudorabies virus and homologous proteins in other Alphaherpesvirinae. *Arch Virol* 1994; 137: 209-28.
38. Kimman T, de Wind N, Oei-Lie N, Pol J, Berns A, Gielkens A. Contribution of single genes within the unique short region of Aujeszky's disease virus (suid herpesvirus type 1) to virulence, pathogenesis and immunogenicity. *J gen Virol* 1992; 73: 243-51.
39. Van Engelenburg FAC, Kaashoek MJ, Rijsewijk FAM, Van der Burg L, Moerman A, Gielkens ALJ, Van Oirschot JT. A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 is avirulent in calves. *J gen Virol* 1994; 75: 2311-18.

40. Kaashoek MJ, Moerman A, Madić J, Rijsewijk FAM, Quak J, Gielkens ALJ, Van Oirschot JT. A conventionally attenuated glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine. *Vaccine* 1994; 12: 439-44.
41. Mengeling WL, Brockmeier SL, Lager KM, Vorwald AC. The role of biotechnologically engineered vaccines and diagnostics in pseudorabies (Aujeszky's disease) eradication strategies. *Vet Microbiol* 1997; 55: 49-60.
42. Bell S, Cranage M, Borysiewicz L, Minson T. Induction of immunoglobulin G Fc receptors by recombinant vaccinia viruses expressing glycoprotein E and I of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 1990; 64: 2181-86.
43. Kaashoek MJ, Rijsewijk FAM, Ruuls RC, Keil GM, Thiry E, Pastoret P-P, Van Oirschot JT. Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI or gE gene. *Vaccine* 1998; 16: 802-9.
44. Balan P, Davis-Poynter N, Bell S, Atkinson H, Browne H, Minson T. An analysis of the in vitro and in vivo phenotypes of herpes simplex virus type 1 lacking glycoproteins gG, gE, gI or the putative gJ. *J gen Virol* 1994; 75: 1245-58.
45. Roop C, Hutchinson L, Johnson DC. A mutant herpes simplex virus type 1 unable to express glycoprotein L cannot enter cells and its particules lack glycoprotein H. *J Virol* 1993; 67: 2285-97.
46. Hutchinson L, Roop-Beauchamp C, Johnson DC. Herpes simplex virus glycoprotein K is known to influence fusion of infected cell, yet is not on the cell surface. *J Virol* 1995; 69: 4556-63.
47. Hutchinson L, Johnson DC. Herpes simplex virus glycoprotein K promotes egress of virus particles. *J Virol* 1995; 69: 5401-13.
48. Baines JD, Roizman B. The UL10 gene of herpes simplex virus 1 encodes a novel viral glycoprotein, gM, which is present in the virion and in the plasma membrane of infected cells. *J Virol* 1993; 67: 1441-52.
49. Dijkstra JM, Gerdtz V, Klupp BG, Mettenleiter ThC. Deletion of glycoprotein gM of pseudorabies virus results in attenuation for the natural host. *J gen Virol* 1997; 78: 2147-51.
50. Dijkstra JM, Mettenleiter ThC, Klupp BG. Intracellular processing of pseudorabies virus glycoprotein M (gM): gM of strain Bartha lacks N-glycosylation. *Virology* 1997; 237: 113-22.
51. Lomniczi B, Watanabe W, Ben-Porat T, Kaplan AS. Genetic basis of neurovirulence of pseudorabies virus. *J Virol* 1984; 52: 198-205.
52. Nauwynck HJ, Pensaert MB. Cell-free and cell-associated viremia in pigs after oronasal infection with Aujeszky's disease virus. *Vet Microbiol* 1995; 43: 307-14.
53. Engels M, Ackermann M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet Microbiol* 1996; 53: 3-15.
54. Kuypers HGJM, Ugolini G. Viruses as transneuronal tracers. *Trends in Neurosciences* 1990; 13: 71-5.
55. Rinaman L, Card JP, Enquist LW. Spatiotemporal responses of astrocytes, ramified microglia, and brain macrophages to central neuronal infection with pseudorabies virus. *J Neurosci* 1993; 13: 685-702.
56. Sur JH, Kim SB, Osorio FA, Moon OK. Study of transneuronal passage of pseudorabies virus in the rat central nervous system by use of immunohistochemistry and in situ hybridization. *Am J Vet Res* 1995; 56: 1195-200.
57. Babic N, Klupp B, Brack A, Mettenleiter ThC, Ugolini G, Flamand A. Deletion of glycoprotein gE reduces the propagation of pseudorabies virus in the nervous system of mice after intranasal inoculation. *Virology* 1996; 219: 279-84.

58. Card JP, Whealy ME, Robbins AK, Moore RY, Enquist LW. Two alphaherpesvirus strains are transported differentially in the rodent visual system. *Neuron* 1991; 6: 957-69.
59. Card JP, Levitt P, Enquist LW. Different patterns of neuronal infection after intracerebral injection of two strains of pseudorabies virus. *J Virol* 1998; 72: 4434-41.
60. Tirabassi RS, Townley RA, Eldridge MG, Enquist LW. Characterization of pseudorabies virus mutants expressing carboxy-terminal truncations of gE: evidence for envelope incorporation, virulence, and neurotropism domains. *J Virol* 1997; 71: 6455-64.
61. Rajčani J, Herget U, Košťál M, Kaerner HC. Latency competence of herpes simplex virus strain ANG, ANGpath, and its gC and gE minus mutants. *Acta virol* 1990; 34: 477-86.
62. Kudelova M, Košťál M, Červenakova L, Rajčani J, Kaerner HC. Pathogenicity and latency competence for rabbits of the herpes simplex virus type 1 ANGpath gC and gE defective mutants. *Acta virol* 1991; 35: 438-49.
63. Maes RK, Sussman MD, Vilnis A, Thacker BJ. Recent developments in latency and recombination of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus. *Vet Microbiol* 1997; 55: 13-27.
64. Wheeler JG, Osorio FA. Investigation of sites of pseudorabies virus latency, using polymerase chain reaction. *Am J Vet Res* 1991; 52: 1799-803.
65. Van Engelenburg FAC, Kaashoek MJ, Van Oirschot JT, Rijsewijk FAM. A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 infects the same limited number of tissues in calves as wild-type virus, but for a shorter period. *J gen Virol* 1995; 76: 2387-92.
66. Vilnis A, Sussman MD, Thacker BD, Senn M, Maes RK. Vaccine genotype and route of administration affect pseudorabies field virus latency load after challenge. *Vet Microbiol* 1998; 62: 81-96.
67. Cheung AK. Cloning of the latency gene and the early protein 0 gene of pseudorabies virus. *J Virol* 1991; 55: 5260-71.
68. Bartha A. Experimental reduction of virulence of Aujeszky's disease virus. *Magyar allatorvosok lapja* 1961; 16: 42-5.
69. Petrovskis E, Timmins JG, Giermann TM, Post LE. Deletions in vaccine strains of pseudorabies virus and their effect on synthesis of glycoprotein gp63. *J Virol* 1986; 60: 1166-69.
70. Rijsewijk F, Kaashoek M, Keil G, Paal H, Ruuls R, Van Engelenburg F, Van Oirschot J. In vitro and in vivo phenotypes and immunogenic properties of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI or gE gene. *Proc. 19th herpesvirus Workshop, Vancouver, July 30- Aug 5, 1994*; 419.
71. Van Oirschot JT, Kaashoek MJ, Rijsewijk FAM. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. *Vet Microbiol* 1996; 53: 43-54.
72. Lugović B, Coetnic S, Madić J. Vaccination of calves with a bivalent vaccine of infectious bovine rhinotracheitis and bovine parainfluenza 3 prepared on cell line culture. *Vet arhiv* 1985; 55: 241-5.
73. Rebordosa X, Pinol J, Perez-Pons JA, Lloberas J, Naval J, Serra-Hartmann X, Espuna E, Querol E. Glycoprotein E of bovine herpesvirus type 1 is involved in virus transmission by direct cell-to-cell spread. *Virus Res* 1996; 45: 59-68.
74. Rijsewijk FAM, Verschuren SBE, Madić J, Ruuls RC, Renaud P, Van Oirschot JT. Spontaneous BHV1 recombinants in which the gI/gE/US9 region is replaced by duplication/inversion of the US1.5/US2 region. *Arch Virol* 1999; 144: 1527-37.
75. Kaashoek MJ, Moerman A, Madić J, Weerdmeester K, Maris-Veldhuis M, Rijsewijk FAM, Van Oirschot JT. An inactivated vaccine based on a glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus 1 induces protective immunity and allows serological differentiation. *Vaccine* 1995; 13: 342-46.

76. Furth JJ, Whitbeck JC, Lawrence WC, Bello LJ. Construction of a viable BHV-1 mutant lacking most of the unique short region. *Arch Virol* 1997; 142: 2373-87.
77. Van Zijl M, Wensvoort G, de Kluyver EP, Hulst MM, Van der Gulden H, Gielkens ALJ, Berns A JM, Moormann R JM. Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera. *J Virol* 1991; 65: 2761-65.
78. Schrijver RS, Langedijk JPM, Keil GM, Middel WGJ, Maris-Veldhuis M, Van Oirschot JT, Rijsewijk FAM. Immunization of cattle with a BHV-1 vector vaccine or a DNA vaccine both coding for the G protein of BRSV. *Vaccine* 1997; 15: 1908-16.
79. Gerdts V, Jöns A, Makoschey B, Mettenleiter ThC. DNA vaccination confers protection of pigs against Aujeszky's disease. Programme and Abstracts of the 4th International Congress of Veterinary Virology: Edinburgh, Scotland, 24-27 August, 1997; 79.
80. Gerdts V, Jöns A, Mettenleiter ThC. Potency of an experimental DNA vaccine against Aujeszky's disease in pigs. *Vet Microbiol* 1999; 66: 1-13.
81. Horzinek MC. Kompendium der allgemeinen Virologie. Berlin, Hamburg: Verlag Paul Parey, 1985.

SAŽETAK

Molekulne osnove patogenosti nekih herpesvirusa

U članku se ukratko raspravlja o nekim aspektima interakcije svinjskog herpesvirusa 1, govedeg herpesvirusa 1 te virusa herpes simplex i varicella-zoster čovjeka s prijemljivim stanicama domaćina. Prikazane su nove spoznaje o organizaciji herpesvirusnih genoma, fizička karta genoma svinjskog herpesvirusa 1 i smještaj gena za virusne glikoproteine. Govori se o ulozi pojedinih ovojničnih glikoproteina i drugih proteina važnih za infekciju, (neuro)virulenciju, latenciju i prijenos herpesvirusa. Spominju se delecije mutante i utjecaj suvremenih spoznaja na pripravu novih vakcina. U tom kontekstu prikazane su osnovne značajke genoma vakcinalnog soja Zagreb govedeg herpesvirusa 1.

SUMMARY

Molecular Level of the Pathogenicity of some Herpesviruses

In this brief review, several aspects of the interaction of suid herpesvirus 1, bovine herpesvirus 1, herpes simplex virus and varicella-zoster virus with host susceptible cells are presented. They include herpesviral genomes organization, physical map of the suid herpesvirus 1 and location of glycoprotein genes, functional analysis of viral envelope glycoproteins and some other proteins with relation to infection, (neuro)virulence, latency and transmission. Furthermore, deletion mutants and the impact of new advances on the construction of novel vaccines are presented. In this context, the genome characteristics of Zagreb vaccine strain of bovine herpesvirus 1 are given.

*Adresa:
Prof. dr. J. Madić
Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom
Veterinarski fakultet
Sveučilište u Zagrebu, Heinzelova 55, 10000 Zagreb*

