

FUNCIONES DEL GEN RELACIONADO A LA LATENCIA (GEN LR) DEL HERPES VIRUS BOVINO TIPO 1 (BoHV-1) Y OTRAS PROTEÍNAS EXPRESADAS DURANTE LA LATENCIA

Pérez SE

Investigadora de CONICET
Departamento de Sanidad Animal y Medicina Preventiva (SAMP),
Área de Virología. Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional del Centro de la Pcia de Buenos Aires, Argentina.

Resumen: *El herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) causa diversos síndromes clínicos en el ganado. Al igual que otros alfa-herpesvirus, el ciclo de vida del BoHV-1 puede dividirse en tres etapas: infección aguda, latencia y reactivación. Durante la infección aguda, BoHV-1 expresa una cascada de genes altamente regulados. Sin embargo, durante la latencia, la expresión de genes virales se ve restringida al gen relacionado a la latencia (gen LR) y al ORF-E. El gen LR es poliadenilado y sufre empalmes alternativos, por lo cual puede dar origen a una familia de proteínas. En esta revisión se analizan las propiedades del gen LR en relación a la inhibición de los genes virales inmediatamente-tempranos, el ciclo celular, la respuesta a interferón, la apoptosis, la infiltración de células mononucleares en ganglio trigémino, la interacción con C/EBP- α y la latencia viral en tejido linfóide. Se describen brevemente los hallazgos recientes sobre ORF-E.*

Palabras claves: gen LR, latencia, reactivación, herpesvirus, ORF-E.

FUNCTIONS OF THE LATENCY-RELATED GENE (LR GENE) OF BOVINE HERPESVIRUS TYPE 1 (BoHV-1) AND OTHER PROTEINS EXPRESSED DURING LATENCY

Abstract: *Bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) causes several clinical syndromes in cattle. Like other alpha-herpesviruses, the life cycle of BoHV-1 can be divided in three stages: acute infection, latency and reactivation. During acute infection, BoHV-1 expresses a highly regulated cascade of genes. However, during latency, the expression of viral genes is restricted to the latency-related gene (LR gene) and ORF-E. The LR gene is polyadenylated and undergoes alternative splicing, giving rise to a family of proteins. In this review, the properties of the LR gene are analyzed in relation to the inhibition of viral immediate-early genes, the cell cycle, interferon response, apoptosis, infiltration of mononuclear cells in trigeminal ganglion, interaction with C/EBP- α and latency in lymphoid tissue. Briefly, the most recent findings on ORF-E are described.*

Keywords: LR gene, latency, reactivation, herpesvirus, ORF-E.

Fecha de recepción: 27/02/09

Fecha de aprobación: 06/03/09

Dirección para correspondencia: Sandra E. Pérez, Pinto 399. Tandil (7000) Buenos Aires (Argentina)

Te: + 54 2293 441912

E-mail: seperez@vet.unicen.edu.ar

INTRODUCCIÓN

El herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1), un miembro de la subfamilia *Alfa-herpesvirinae*, es responsable de una variedad de síndromes clínicos en el ganado, incluyendo desórdenes respiratorios, conjuntivitis, infecciones genitales, encefalitis, abortos y una enfermedad multisistémica fatal en terneros neonatos. La infección aguda del tracto respiratorio puede producir inmunosupresión, lo cual predispone al ganado a la colonización bacteriana secundaria, pudiendo ocasionar neumonía e incluso la muerte del animal (53).

Luego de la replicación inicial en las superficies mucosas, los alfa-herpesvirus establecen infecciones latentes, principalmente en las neuronas sensoriales de los ganglios trigéminos (GT) y sacro (51). Durante la latencia no se aísla virus infeccioso y no se detectan antígenos virales en las células infectadas (41). Los animales latentemente infectados pueden identificarse por la presencia de anticuerpos séricos específicos dirigidos contra el BoHV-1 (22). La reactivación del virus latente puede ocurrir como consecuencia de estrés natural o puede inducirse mediante la administración de glucocorticoides. Durante la reactivación espontánea o inducida, el virus es transportado nuevamente al sitio original de infección donde tiene lugar la replicación y el virus re-excretado se transmite a otros huéspedes susceptibles. La reactivación constituye el principal mecanismo de diseminación de la enfermedad en un rodeo. El estímulo antigénico causado por la reactivación del BoHV-1 produce un efecto "booster" en la respuesta inmunitaria que es detectable por la elevación en los títulos de anticuerpos (3).

INFECCIÓN AGUDA

El ciclo lítico de los alfa-herpesvirus ocurre en una cascada altamente regulada. Un componente del virión (bTIF), activa la expresión de los genes inmediatamente tempranos (IE), los cuales tienen un papel regulador sobre la activación de los genes tempranos (E) y tardíos (L). La replicación del ADN ocurre en el núcleo, luego de la expresión de los genes E (18). BoHV-1 posee cuatro proteínas IE que son homólogas a las proteínas codificadas por el herpes simplex virus tipo 1 (HSV-1). Las proteínas ICP0, ICP4, ICP27 e ICP22 del HSV-1 participan en el control de la expresión de los genes virales. ICP47 es un gen IE que interfiere con la presentación de antígenos en las células infectadas. BoHV-1 no codifica un homólogo de ICP47. Sin embargo, la inhibición de la presentación de antígenos por el CMH-1 depende de una pequeña proteína de membrana codificada por el gen UL49.5. ICP0 estimula la expresión de todos los genes virales y es necesario para que la infección lítica ocurra eficientemente, especial-

mente a bajas multiplicidades de infección (moi). ICP4 estimula la transcripción de los genes E y L y ICP27 regula el empalmado, la terminación y la exportación nuclear de los transcritos virales e incrementa los niveles de traducción de los genes L. Ambos genes se requieren para la replicación eficiente en cultivos celulares (18). ICP22 es necesario para la replicación en ciertos tipos de células y reprime la expresión de ICP0 y ICP4 (4). A diferencia del ICP27 del HSV-1, el cual se expresa en forma inmediatamente temprana (IE), el gen homólogo en BoHV-1, bICP27, se expresa con una cinética temprana (E) (49). Al igual que ICP27, bICP27 probablemente esté involucrado en el procesamiento en 3' de los mRNA virales (49). Los genes E están involucrados en el metabolismo de los ácidos nucleicos, mientras que los genes L codifican las proteínas estructurales del virión (18).

LATENCIA Y REACTIVACIÓN

Se estima que aproximadamente entre un 10% y un 30% de las neuronas en el ganglio sensorial pueden alojar virus latente (52). Las infecciones con bajos títulos virales se correlacionan con GT que contiene un número reducido de neuronas latentemente infectadas, lo cual, a su vez, determina una menor probabilidad de reactivación viral. La replicación viral no es compatible con la sobrevivencia de la célula, por lo tanto, la reactivación solo ocurre en unas pocas neuronas por episodio a fin de mantener un pool de neuronas latentemente infectadas (44). Por el contrario, un número elevado de copias virales incrementará las probabilidades de reactivación del estado latente debido a que los genes virales serán capaces de neutralizar efectivamente a los factores que silencian su transcripción y aumentará la disponibilidad de moldes para la transcripción en los eventos iniciales de la reactivación (43). En contraste a la abundante expresión de genes que ocurre durante la infección aguda, en las neuronas latentemente infectadas, la expresión de genes está restringida a una pequeña región del genoma del BoHV-1, el gen relacionado a la latencia (gen LR). Recientemente, se demostró que otra proteína, denominada ORF-E, también es detectable en las neuronas durante la infección latente (15).

El virus latente puede reactivarse exitosamente mediante el tratamiento de los animales con glucocorticoides sintéticos como la dexametasona (DEX) (29). Sin embargo, los mecanismos que regulan la reactivación viral son aún desconocidos y el papel de los genes IE en el proceso de reactivación no está claro. Factores no virales, como el ambiente neuronal y el sistema inmunitario también estarían involucrados en el inicio y la regulación de la reactivación. Debido a que la reactivación viral es el mecanismo más

importante para la diseminación del BoHV-1 en los rodeos, es esencial determinar los factores y los genes virales y/o celulares que están involucrados en el inicio de estos episodios.

EL GEN LR DEL BoHV-1

El gen LR se localiza en la región larga y única del genoma viral, adyacente a las inversiones repetidas. Se superpone con la unidad de transcripción inmediatamente temprana 1 (IETu1) (20) y es anti-sentido al gen bICP0. El gen LR del BoHV-1 es homólogo al gen asociado a la latencia (LAT) del HSV-1. A diferencia del LAT, el cual aparentemente no codifica una proteína, el transcripto LR es poliadenilado y codifica una familia de proteínas. El gen LR tiene dos marcos de lectura abiertos (ORF), ORF-1 y ORF-2 y dos marcos de lectura (RF) sin un ATG iniciador, designados RF-B y el RF-C (18).

El promotor del gen LR contiene un dominio específico de unión a factores neuronales y tiene actividad transcripcional específica en las neuronas (1, 2) lo cual demuestra que la expresión génica es altamente dependiente de los factores neuronales. Devireddy y Jones (6) demostraron que el empalme alternativo del gen LR puede dar origen a distintas proteínas. Los autores observaron que el empalmado del ARN del gen LR que ocurre a los 7 días post-infección (dpi) es diferente al empalmado que tiene lugar a los 15 y 60 dpi, sugiriendo que los distintos productos del gen LR tienen funciones diversas en los diferentes estadios de la infección. El empalme alternativo a los días 1 y 60 post-infección es responsable de la generación de una proteína de fusión entre ORF-1 y RF-C. La fusión de ORF-2 con ORF-1 a los 7 dpi o con RF-B a los 15 dpi genera una proteína de 35 a 45 kDa, lo cual indica que existe la posibilidad de que una familia de proteínas se exprese en momentos específicos del ciclo infeccioso viral. Una proteína de 40 kDa codificada por el gen LR fue identificada durante la infección productiva tardía y también es detectable en un subgrupo de neuronas durante la latencia (16, 17). Inicialmente, a esta proteína se la designó como "proteína LR".

Recientemente, Meyer y col (27) demostraron mediante microscopía confocal que ORF-1 se expresa en el citoplasma y en el núcleo de células de riñón bovino infectadas, mientras que RF-C se expresa en el citoplasma celular. Estudios inmunohistoquímicos realizados sobre secciones de GT latentemente infectados con BoHV-1 demostraron que ORF-1 también se localiza en el núcleo y el citoplasma neuronal. A diferencia de la localización citoplasmática en las células infectadas en forma productiva, RF-C se localiza en el núcleo de las neuronas latentemente infectadas. Aunque RF-C carece de un codón de iniciación ATG, los marcos de lectura sin una metionina ini-

ciadora también pueden expresarse. Por ejemplo, los marcos de lectura crípticos, sin un ATG o AUG convencional, pueden usar codones alternativos (CUG) que se decodifican como leucina en lugar de metionina. Los mecanismos de iniciación que usan codones no-AUG se observan frecuentemente en la traducción de los transcriptos virales (47). También es posible que ocurra un pequeño empalme cercano al inicio de RF-C, el cual puede fusionar una ATG para iniciar la traducción de RF-C (17). Los estudios de Meyer y col (27) también sugirieron que ORF-1 probablemente no se exprese como una proteína intacta, sino como una proteína de fusión con ORF-2, como consecuencia del empalme alternativo del gen LR. En conclusión, estos hallazgos confirmaron que tanto *in vitro* como *in vivo*, el gen LR da origen a diferentes proteínas que podrían poseer funciones específicas en las distintas etapas del ciclo de latencia y reactivación viral.

FUNCIONES DEL LAT DEL HERPES SIMPLEX VIRUS-1

Dada la importancia del HSV-1 en los seres humanos, existen numerosos estudios sobre la regulación del ciclo de latencia y reactivación, los cuales están mayormente destinados a definir el rol del LAT en la patogenia de la infección. La principal diferencia entre el LAT y el gen LR se evidencia a nivel genético, dado que este último codifica una proteína, mientras que la forma más abundante del LAT es un intrón estable de 2 kb que se origina a partir de un transcripto de 8,3 kb y no existe una proteína que medie su función (8). La existencia de una familia de proteínas, también determina que el gen LR tenga funciones adicionales a las descritas para el LAT del HSV-1 (18). El LAT no es absolutamente requerido, aunque facilitaría el establecimiento de la latencia en los modelos de infección (ratón y conejo) normalmente usados a nivel experimental (39). Sin embargo, este gen tendría una función directa en el proceso de reactivación (21, 39). Las mutantes LAT⁻ generalmente presentan una inadecuada reactivación *in vivo* (21). Con frecuencia se observa un retraso significativo en la recuperación de virus infeccioso a partir de los GT infectados con mutantes LAT⁻, lo cual se correlacionaría con un establecimiento de latencia menos eficiente por parte de estas cepas, aunque se desconoce si ésta es la principal causa de la baja eficiencia o si existiría un efecto directo sobre el proceso de reactivación. La función del LAT del HSV-1 involucrada en la reactivación espontánea se localiza en las primeras 1,5 kb del transcripto, una región que no se superpone con los genes ICP0 o ICP34.5γ, lo cual sugiere que un mecanismo de regulación anti-sentido mediado por LAT no es responsable de la reactivación espontánea. El gen LR del BoHV-1 y el LAT del HSV-1 poseen activi-

dad anti-apoptótica y esta función desempeñaría un papel en el proceso de reactivación (18, 39). Durante la reactivación se observa una reducción en la expresión del LAT, lo cual demuestra que no se requiere la inhibición total de la expresión del gen para que la reactivación tenga lugar o que sólo sufren episodios de reactivación aquellas neuronas en las que el LAT es inhibido (50). Rock y col (41) observaron también una disminución en la transcripción del gen LR en las neuronas sensoriales del GT de conejos entre las 24 y las 48 horas luego de la administración de DEX. Sin embargo, esta disminución es transitoria y se detectan niveles de expresión normales a las 72 horas post-tratamiento. Esta disminución regulada del ARN del gen LR se correlacionó con la reactivación de la latencia. Por lo tanto, estos estudios sugieren que se requiere que el efecto inhibitorio del gen LR, probablemente ejercido sobre los genes virales de la infección aguda, sea reprimido para que los episodios de reactivación ocurran.

CEPA MUTANTE DEL GEN LR

Para estudiar las funciones del gen LR, Inman y col (14) construyeron una cepa mutante del gen LR. Esta cepa contiene 3 codones de terminación al inicio del extremo 5' del transcripto LR. La mutante expresa el transcripto pero no las proteínas codificadas por ORF-2 (17). La construcción de este tipo de mutantes mediante la inserción de un oligonucleótido conteniendo codones de terminación es necesaria para no afectar la expresión de bICP0, cuya secuencia se superpone en sentido contrario a la del gen LR. Los títulos infecciosos en células bovinas y en la cavidad nasal de los terneros infectados con la mutante LR son similares a los observados con la cepa salvaje de BoHV-1 (14). Sin embargo, los terneros infectados con la mutante LR presentan títulos virales más bajos en las secreciones oculares y exhiben síntomas clínicos menos severos que los terneros experimentalmente infectados con la cepa salvaje de BoHV-1. Además, se detectan niveles más bajos de virus infeccioso y de ADN en los GT de los terneros infectados con el virus mutante. Finalmente, la mutante LR no se reactiva *in vivo* cuando se administra DEX a los terneros latentemente infectados (23). Esta cepa mutante permitió identificar numerosas propiedades del gen LR, tanto *in vitro* como *in vivo*.

EL GEN LR Y LA INHIBICIÓN DE LOS GENES IE.

Los genes IE son necesarios para iniciar la infección productiva. Bratanich y col (1) demostraron mediante ensayos de transfección que el gen LR inhibe el potencial transactivador de bICP0 al interferir con su expresión. De este

modo, el gen LR interrumpiría la infección viral productiva y facilitaría el establecimiento de latencia. En los modelos murinos de latencia del HSV-1, las mutantes con supresiones del gen ICP0 tienen un patrón de reactivación ineficiente, lo cual sugiere que se requiere la actividad transactivadora de ICP0 para que ocurran los episodios de reactivación (21). La reducción transitoria que se observa en la expresión del gen LR en las primeras 24-48 horas post-reactivación (41) permitiría la expresión de bICP0 y facilitaría el inicio de los ciclos de infección productiva. Debido a que ICP0 es especialmente importante a bajas *moi*, su expresión sería esencial en los estadios iniciales de la reactivación (21), cuando se producen pequeñas cantidades de virus.

EL GEN LR Y EL CICLO CELULAR

La actividad de las quinasas dependientes de ciclinas (*cdk*) se basa en su asociación con las subunidades regulatorias de éstas últimas (32). Ambas moléculas actúan como reguladores positivos o aceleradores del ciclo celular. El ciclo de una célula somática se divide en cuatro etapas: la fase S o sintética, en la cual se genera una copia del material genético, la fase M o mitosis en la que los componentes celulares se dividen entre dos células hijas y las fases G1 y G2 que corresponden a los períodos en los que las células se preparan para las fases S y M, respectivamente. En los inicios de la fase G1 actúan las *cdk4* y *cdk6* junto con las ciclinas del tipo D, probablemente en respuesta a factores de crecimiento. Los complejos de *cdk2* con las ciclinas E y A son importantes para la transición de G1 a S y para la replicación del ADN, respectivamente. La acción conjunta de las ciclinas A y B con la quinasa *cdc2* es esencial para la fase M. El pasaje de las células de un estadio a otro del ciclo es estrictamente regulado a nivel de la transcripción de los genes de las ciclinas, la degradación de las mismas, la acción de inhibidores proteicos y la modificación de las subunidades de las quinasas mediante fosforilación (31).

La expresión de las *cdk* y las ciclinas en las neuronas promueve la replicación viral (45, 59) y las neuronas que expresan ciclinas durante la infección aguda y la reactivación están destinadas a la muerte celular (59). En los GT de terneros infectados con BoHV-1, Winkler y col (59) detectaron la expresión de ciclina D1, ciclina E y ciclina A a los 7 dpi. Las mismas ciclinas se detectaron en un pequeño porcentaje de neuronas durante la reactivación inducida con DEX. Aproximadamente un 50% de las neuronas que expresaban ciclinas también contenían ADN viral. En un modelo de infección experimental en conejo, Schang y col (46) demostraron que el BoHV-1 induce la expresión de ciclina A en GT durante la infección aguda y su expresión se prolonga cuando los co-

nejos latentemente infectados son tratados con DEX. La expresión de ciclina A podría facilitar la expresión de genes virales y la replicación durante el ciclo de vida lítico. Por el contrario, durante la latencia, la ciclina A se asocia con la proteína LR y esto promovería la sobrevivencia neuronal. La reactivación del HSV-1 inducida mediante el explante de tejido ocurre en aquellas neuronas que expresan exclusivamente cdk2 y cdk4. La roscovitina, un inhibidor de la actividad de la cdk2, inhibe la reactivación, lo cual demuestra que la actividad de cdk2 es esencial para la reactivación del HSV-1. Aunque se desconoce la función exacta de esta quinasa en la reactivación, se sugiere que induciría modificaciones en ICPO que activarían su función transactivadora o fosforilaría alguna proteína celular requerida para la reactivación (45). Jiang y col (16) demostraron que la proteína LR se asocia en forma estable con los complejos de cdk2-ciclina E en las células infectadas en forma productiva. Los complejos cdk2-ciclina E fosforilarían y activarían a los factores necesarios para estimular la replicación del ADN (12). Aunque se desconoce el papel exacto que desempeñaría la unión de la proteína LR con los complejos de cdk2-ciclina E, se presume que ésta promovería la sobrevivencia de las neuronas al bloquear los efectos de la activación de los factores del ciclo celular producidos como consecuencia de la replicación viral (16, 59). En conclusión, BoHV-1 es capaz de manipular el ciclo celular para obtener una máxima replicación y producción de viriones durante la infección aguda y la reactivación. Durante la latencia, el gen LR "inactivaría" la acción de los complejos cdk-ciclinas para favorecer el establecimiento de latencia.

EL GEN LR Y LA RESPUESTA A INTERFERÓN

Los interferones (IFN) son una familia de citoquinas multifuncionales que están involucradas en la defensa antiviral, la regulación del crecimiento celular y la activación de las células inmunitarias. Estas citoquinas son la primera línea de defensa contra las infecciones virales y se las implicó en la vigilancia inmunológica de las células malignas. Los IFN se clasifican en dos grupos principales: tipo I o IFN viral (principalmente IFN- α , - β , - ω , y - τ) y tipo II o IFN inmune (IFN- γ). Los IFN tipo I y tipo II no comparten una homología estructural obvia. El IFN tipo I se produce en respuesta directa a la infección viral; el IFN- α deriva principalmente de los leucocitos, mientras que los fibroblastos son la principal fuente de IFN- β , aunque también puede ser sintetizado por diferentes tipos celulares. El IFN tipo II es sintetizado primariamente por linfocitos T activados y por las células NK luego del reconocimiento de las células infectadas (11). Con respecto a los

bovinos, Capon y col (5) describieron una familia de genes de IFN- α (bIFN) semejante a la clase I de los IFN de los seres humanos IFN (HuIFN)- α , y una familia novedosa con características estructurales diferentes (clase II). Velan y col (56) también identificaron cinco genes del bIFN- α , que están estrechamente relacionados a nivel de su secuencia aminoacídica (93%). Cuatro de estos genes (A, B, C y D) codifican diferentes polipéptidos, mientras que se sugiere que el quinto (E) es una forma alélica del bIFN- α C. La homología de estos IFN- α con los subtipos de los IFN- α de los seres humanos y murinos es de aproximadamente un 60%. A diferencia de la mayoría de los mamíferos, en los que el IFN- β es codificado por un único gen, el IFN- β bovino consiste en una familia compleja de múltiples genes (57).

Recientemente, Peng y col (33), usaron una mutante del HSV-1 que no expresa el LAT y demostraron que esta región del genoma viral interfiere y retrasa la expresión de IFN *in vitro* y en los GT de ratones infectados en forma aguda.

Los codones de terminación en la cepa mutante LR impiden la expresión de productos proteicos, sin afectar la expresión del gen (14). En células bovinas infectadas, la mutante LR del BoHV-1 expresa prematuramente niveles de ARN más altos que el virus salvaje y estimula una respuesta a IFN más potente. El ARN del gen LR contiene regiones con la capacidad de formar estructuras de doble cadena, un estímulo potente para la inducción de IFN. También es probable que la hibridización del gen LR con bICPO origine la formación de dobles cadenas de ARN que induzcan esta potente respuesta a interferón. En las tonsilas de terneros infectados en forma aguda con la mutante LR se detectaron niveles elevados de IFN- α 1, IFN- β e IFN- γ . Por el contrario, no se detectó la expresión de ningún tipo de IFN en los GT de los animales infectados con el virus salvaje o la mutante LR en el mismo estadio del ciclo viral. Consecuentemente, el gen LR promovería las primeras fases del establecimiento de latencia a través de la inducción de una respuesta temprana a IFN durante la infección productiva (37), la cual, *in vivo*, es evidente a nivel de los tejidos periféricos.

EL GEN LR Y LA APOPTOSIS

La apoptosis es un proceso controlado de muerte celular que funciona en el desarrollo y la homeostasis de los organismos multicelulares a través de la remoción selectiva de las células dañadas o que no resultan necesarias. La apoptosis también puede actuar como una respuesta celular a la infección viral, la cual limita el tiempo y la maquinaria celular disponible para la replicación (55). Debido a que la muerte celular programada es un mecanismo de defensa contra la infección, evitar la apoptosis de la célula

huésped también representa una etapa esencial en el ciclo de vida de los virus. Por otro lado, los virus pueden tomar ventajas de la apoptosis para destruir a las células inmunitarias o para inducir la muerte de las células infectadas y favorecer así la diseminación viral. El HSV-1 tiene la capacidad de inducir e inhibir la apoptosis. Entre los genes con capacidad antiapoptótica se identificaron al ICP27, US3, US5, gJ, gD y LAT. Las propiedades antiapoptóticas de estos genes promoverían la sobrevivencia neuronal durante la infección aguda (10). Sin embargo, durante el establecimiento y mantenimiento de la latencia, la función de estos genes estaría silenciada, excepto por el gen LAT, el cual es abundantemente expresado en este estadio y cuya actividad anti-apoptótica resultaría esencial para mantener un pool de neuronas latentemente infectadas (18). La proteína p53 es una de las moléculas principales involucradas en la respuesta celular al estrés mediante la regulación de la apoptosis, el arresto del ciclo celular, la senescencia, el daño al ADN y la estabilidad genética (54). Al igual que el HSV-1, BoHV-1 induce apoptosis de las células de riñón bovino, en parte a través de la inducción de p53, lo cual facilitarían la liberación de los viriones durante la infección productiva (7). No obstante, durante la infección latente, el virus debe ser capaz de prevenir la apoptosis y este proceso ocurre a través de mecanismos que involucran al gen LR. Aunque se desconocen los mecanismos exactos por los cuales el gen LR inhibiría la apoptosis, recientemente se identificó la interacción de la proteína LR con dos proteínas pro-apoptóticas, Bid y Cdc42 (27). Henderson y col (13) también demostraron que durante la infección productiva, el gen LR inhibe la escisión de la caspasa 9 y de la caspasa 3, siendo esta última un efector crítico en las vías de señalización que conducen a la apoptosis celular.

Lovato y col (23), analizaron la frecuencia de apoptosis en el pico de la infección aguda y durante el establecimiento de la latencia en los GT de terneros infectados con la cepa mutante LR y con la cepa salvaje de BoHV-1 y demostraron que a los 14 dpi (establecimiento de la latencia) la mutante LR inducía niveles más altos de apoptosis, a pesar de que los GT contenían niveles más elevados de ADN del virus salvaje. A los 6 dpi, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de neuronas que presentaban tinción inmunohistoquímica positiva para caspasa 3 en los GT de animales infectados con la mutante LR o la cepa salvaje. Por el contrario, a los 14 dpi, las señales positivas para caspasa 3 eran de un 15% y de un 7,6% para la mutante LR y el BoHV-1 salvaje, respectivamente, y estas diferencias resultaron estadísticamente significativas. Resultados similares se obtuvieron cuando el número de neuronas apoptóticas se evaluó mediante la

técnica de TUNEL. En conclusión, estos hallazgos demostraron que el gen LR posee propiedades anti-apoptóticas *in vivo* y que la inhibición de la muerte neuronal promueve el establecimiento de latencia.

EL GEN LR Y LA REGULACIÓN DE LOS INFILTRADOS MONONUCLEARES EN GT

Durante el pico de la infección aguda (6 dpi), los terneros experimentalmente infectados con el BoHV-1 salvaje presentaban infiltrados de células mononucleares moderados a severos en los GT. En contraste, al mismo tiempo post-infección, no se observaron infiltrados celulares en los GT de terneros infectados con la mutante LR. Sin embargo, a los 14 dpi se detectaron numerosos focos inflamatorios en los GT de terneros infectados con la cepa mutante, aunque no en aquellos infectados con el BoHV-1 salvaje. Estas observaciones se asociaron con un probable papel de la proteína LR en la regulación de los infiltrados linfocitarios en GT (35). Varios estudios con el HSV-1 (30) sugirieron que la respuesta mediada por células jugaría un papel en el control de la infección de las neuronas sensoriales. Durante la etapa de replicación aguda, numerosos linfocitos T CD8⁺ infiltran el GT, los cuales son la principal fuente de IFN- γ (19). Las células inflamatorias y la expresión de citoquinas persisten durante varios meses luego de la infección primaria y se propone que la actividad no citolítica de los linfocitos T CD8⁺ (30) es responsable de la preservación de un reservorio neuronal latente y de la prevención de la reactivación de la latencia. Pérez y col (35) seleccionaron focos de células inflamatorias en secciones de GT de terneros infectados con la cepa mutante LR o con el virus salvaje y utilizaron la microdissección mediante captura por láser (LCM) para analizar neuronas rodeadas por infiltrados mononucleares. Las áreas ganglionares que contenían los infiltrados celulares se colectaron en forma separada a las neuronas. A partir de ambas muestras se extrajo ADN para determinar la presencia del genoma viral mediante PCR. Durante el pico de la infección aguda de los bovinos infectados con el BoHV-1 salvaje, la presencia de infiltrados mononucleares y de ADN viral en los GT se correlacionó con los niveles elevados de replicación del virus en esta etapa. Estos hallazgos también demostraron que no sólo las neuronas contienen ADN viral, sino también las células satelitales y, probablemente, las células mononucleares infiltrantes. A diferencia de las observaciones durante el pico de la infección aguda, a los 14 dpi no se detectó replicación del virus salvaje o de la cepa mutante. Sin embargo, la presencia de varios focos de células mononucleares en los GT de terneros infectados

con la mutante LR sugiere que la migración de linfocitos y monocitos ocurre más lentamente que en los tejidos infectados por el virus salvaje y que estas células persisten aún cuando no se detecta replicación viral. En parte, estos hallazgos están asociados con el crecimiento reducido de la cepa mutante en el sistema nervioso periférico. También es probable que la mutante LR no pueda controlar la migración de células inflamatorias durante la replicación aguda. La infiltración de células inmunitarias en GT ocurre como consecuencia de la replicación y expresión de genes virales, como se observa en el caso de la infección con BoHV-1 salvaje, y la migración de células inflamatorias cesa cuando la replicación viral aguda desaparece. En ausencia de la proteína LR podría ocurrir un incremento en el ciclo de muerte celular e infiltración de linfocitos durante los estadios finales de la infección aguda (establecimiento de la latencia). El incremento en las señales apoptóticas inducido por la mutante LR en el GT (23) probablemente incrementa la infiltración de linfocitos, en parte, debido a que se describió que ciertas caspasas involucradas en la apoptosis tienen propiedades anti-inflamatorias (24). En conjunto, estas observaciones sugieren que la muerte celular inducida por la mutante LR facilita la respuesta inflamatoria cerca del final de la infección aguda. Consecuentemente, el número de neuronas infectadas se reduce debido al proceso apoptótico, llevando a una disminución en la cantidad de ADN viral en GT y a una reducción drástica en la frecuencia de la reactivación de la latencia. En conclusión, para que ocurra el establecimiento y mantenimiento de la latencia es necesario que existan mecanismos que inhiban la actividad del sistema inmunitario contra el virus, especialmente que impidan el reconocimiento de la/las proteínas codificadas por el gen LR. Por lo tanto, se puede asumir que dichas proteínas poseen mecanismos que, directa o indirectamente, inhiben los mecanismos inmunológicos en GT (36). No obstante se requieren nuevos estudios que permitan esclarecer el rol de gen LR en relación a la respuesta inmunitaria en el sistema nervioso periférico.

UNA NUEVA PROTEÍNA EXPRESADA DURANTE LA LATENCIA: ORF-E

Recientemente, se identificó un pequeño ORF de 135 aminoácidos que está contenido en la secuencia del promotor del gen LR, al cual se lo denominó ORF-E. ORF-E es anti-sentido al transcripto LR, en dirección 3' con respecto al ORF del gen bICP0, aunque no se superpone a su secuencia (15). Pérez y col (36) observaron que ORF-E contiene sitios potenciales de fosforilación para la caseína quinasa 2 y para la proteína quinasa C. La presencia de esta pequeña proteína se detectó consistentemente en células bovinas

infectadas (15, 36). Una proteína de fusión ORF-E/GFP se detectó en el núcleo de líneas celulares de origen neuronal y en el núcleo y citoplasma de células de origen no neural (15). En líneas celulares neuronales, ORF-E induce proyecciones semejantes a las neuritas (prolongaciones del soma neuronal), probablemente a través de la cooperación con factores celulares, por lo cual se sugirió que ORF-E podría desempeñar un papel en el reestablecimiento de la función neuronal luego de la infección viral (36). En forma similar, el HSV-1 codifica un transcripto anti-sentido al LAT, el cual ocupa una localización genómica similar al transcripto ORF-E; sin embargo, no existe similitud a nivel de la secuencia aminoacídica (38).

También se detectó la expresión de ORF-E *in vivo*, en las neuronas de los GT de terneros latentemente infectados (15, 36). A las 24 horas posteriores a la administración de DEX para inducir la reactivación, la proteína expresada a partir del ORF-E se detectó consistentemente en células satelitales o células inflamatorias, cerca de la periferia de las neuronas del GT. A las 48 horas post-reactivación, algunos núcleos neuronales presentaron tinción positiva para ORF-E. En comparación con la proteína LR, un mayor porcentaje de neuronas presentó reactividad positiva para ORF-E durante la infección aguda, latencia y reactivación (36). A diferencia del gen LR, ORF-E no induce arresto del ciclo celular y no posee actividad anti-apoptótica (15), por lo cual se asume que contribuye al ciclo infeccioso del BoHV-1 a través de mecanismos diferentes a los utilizados por el gen LR. Aunque se requieren más estudios para identificar el papel exacto que desempeña ORF-E en el ciclo vital del BoHV-1, los resultados preliminares sugieren que, al igual que el gen LR, su función sería importante en las etapas de latencia y reactivación.

INTERACCIÓN DEL GEN LR CON C/EBP-A

Entre las proteínas que interactúan con el gen LR se describió a la proteína alfa potenciadora de unión al CCAAT (C/EBP- α), una proteína cuya expresión es inducida en las neuronas del GT durante la infección productiva y la reactivación de terneros latentemente infectados. Las proteínas potenciadoras de unión al CCAAT son factores de transcripción que poseen un dominio bZIP de dimerización y unión al ADN. Estas proteínas están involucradas en diversos procesos como el control y la diferenciación celular, el metabolismo y la inflamación (40). Al igual que en la infección por el virus de Epstein-Barr (EBV) y el herpes virus humano 8 (HHV-8), C/EBP- α también activa ciertos promotores de BoHV-1 durante la infección lítica (26). En forma sinérgica con bTIF, C/EBP- α activa a la unidad de transcrip-

ción inmediatamente temprana (IEtu1) que activa la expresión de dos genes virales, bICP0 y bICP4 (25). Por lo tanto, se sugiere que la interacción de la proteína LR con C/EBP- α inhibiría la infección viral productiva en las neuronas y permitiría el establecimiento de la latencia.

EL GEN LR Y EL ESTABLECIMIENTO DE LATENCIA EN TEJIDO LINFOIDE

El principal sitio para el establecimiento de latencia de los alfa-herpesvirus son las neuronas sensoriales. No obstante, las infecciones latentes o persistentes también pueden ocurrir en sitios no-neurales. Al igual que las neuronas sensoriales, las células linfoides son células altamente diferenciadas y tienen una vida media larga. Por lo tanto, son sitios adecuados para alojar al virus durante la latencia. Diversos estudios demostraron que el ADN del virus de la pseudorabia (42), del herpesvirus equino-1 (48) y del herpesvirus canino-1 (28) estaba presente en tejido linfóide. El ADN del BoHV-1 se detectó consistentemente en las tonsilas (34), leucocitos, ganglios linfáticos y bazo, en ausencia de virus infeccioso, lo cual indica que el virus puede establecer latencia o persistir en estas células. La infección de las células mononucleares sanguíneas (PBMC) por BoHV-1 lleva a la alteración de sus actividades inmunológicas y los estudios de Winkler y col (58, 60) demostraron que durante la infección aguda, BoHV-1 infecta e induce apoptosis de los linfocitos T CD4⁺.

Utilizando la cepa mutante LR, Pérez y col (34) demostraron que el gen LR estimula el crecimiento viral en las tonsilas bovinas. Los títulos de esta cepa en las tonsilas durante la infección aguda fueron más bajos que para el virus salvaje y mediante hibridización *in situ* no se logró detectar el ADN de la cepa mutante durante la infección aguda de las tonsilas. A pesar de los niveles más bajos de virus infeccioso y de ADN viral durante la infección aguda, mediante PCR semicuantitativo se determinó que ambas cepas alcanzan niveles similares de ADN en las tonsilas durante la latencia. Este estudio sugiere que el gen LR estimula el crecimiento del BoHV-1 en este tejido. La presencia de ADN viral a los 60 días post-infección, en ausencia de niveles detectables de la expresión de genes IE, E y L, confirma que las tonsilas son un sitio específico para la latencia del BoHV-1. La recuperación de virus

infeccioso sólo fue posible mediante el explante y co-cultivo de las tonsilas, lo cual es consistente con las características de una infección latente (34). La mutante LR no se reactiva *in vivo* luego de la administración de DEX. Sin embargo, la recuperación de la cepa mutante a partir de los explantes tonsilares también demostró que el ADN viral es infeccioso luego del establecimiento de la latencia. Como se describió previamente, Lovato y col (23) demostraron que la mutante LR induce niveles más elevados de apoptosis en GT hacia el final de la infección aguda. Aunque el ARN del gen LR se expresa abundantemente en los GT del ganado infectado (18), este ARN no se detecta en forma abundante en las tonsilas (34, 58), lo cual sugiere que las proteínas codificadas por el gen LR tampoco se expresan a altos niveles. A diferencia de los resultados en GT, el gen LR no desempeñaría un papel importante en la regulación de la apoptosis en tejido linfóide, en parte porque éste no sería abundantemente expresado. El transcripto LR sufre empalmes que son específicos del tejido neuronal (7), por lo cual es probable que no ocurra un empalme adecuado en las tonsilas y, por lo tanto, la proteína LR podría no tener una actividad anti-apoptótica potente en este tejido. También es posible que el virus infecte un número muy bajo de células en las tonsilas. De acuerdo a este concepto, Fuchs y col (9) demostraron que la infección de los PBMC es un evento común durante la infección aguda del ganado, aunque sólo un pequeño número de leucocitos (10^{-4} a 10^{-2}) en la sangre periférica contienen ADN del BoHV-1.

Las células linfoides son tipos celulares altamente diferenciados al igual que las neuronas; no obstante, también debe considerarse que los factores de transcripción y/o los factores regulatorios involucrados en el control del ciclo celular, pueden afectar la actividad de los genes virales en una forma dependiente del tejido. En resumen, estos resultados demuestran que el gen LR no sería esencial para el ciclo de latencia y reactivación en las tonsilas como lo es en las neuronas sensoriales de los bovinos. Sin embargo, el establecimiento de la latencia en células linfoides y la probabilidad de un mecanismo diferente involucrado en la regulación de la latencia del BoHV-1 imponen una mayor complejidad para el control de la enfermedad.

Cuadro 1. Principales funciones del gen LR en el ciclo de latencia y reactivación del herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1).

Inhibición de la expresión de los genes virales inmediatamente tempranos
Inhibición de la actividad de los complejos cdk-ciclinas
Inhibición de la apoptosis
Inducción temprana de la respuesta a interferón
Inhibición de la infiltración de células mononucleares hacia el final de la infección aguda

CONCLUSIÓN

En el Cuadro 1 se resumen las principales funciones del gen LR que participarían en el ciclo de latencia y reactivación del BoHV-1. A diferencia de lo que ocurre con el LAT del HSV-1, el cual es importante pero no esencial para el ciclo de latencia y reactivación viral, las funciones del gen LR del BoHV-1 son críticas en estas etapas del ciclo infeccioso. Las funciones descritas utilizan mecanismos para manipular la maquinaria celular y permitir la perpetuación del virus en el huésped y la naturaleza. Se requieren más investigaciones para determinar y discernir las propiedades de la familia de proteínas codificadas por el gen LR y ORF-E.

Muchos países utilizan vacunas vivas modificadas contra el BoHV-1. Sin embargo, estas vacunas pueden establecer latencia y el virus vacunal puede reactivarse del estado latente. La reactivación del BoHV-1 es el principal medio de transmisión del virus en los rodeos. El hecho de que la cepa mutante LR no se reactiva, determina que la introducción de mutaciones en el gen LR puede permitir el desarrollo de cepas capaces de proteger a los animales de la infección y a su vez evitar los riesgos de reactivación. El entendimiento de los mecanismos que utiliza el virus para establecer y mantener el estado latente es esencial para lograr el desarrollo de inmunógenos eficaces que permitan controlar la infección.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece especialmente al Dr. Gustavo Bretschneider por la lectura y comentarios sobre el manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bratanich AC, Hanson ND, Jones CJ. The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 inhibits the activity of immediate-early transcription unit 1. *Virology*. 1992 Dec;191(2):988-91.
2. Bratanich AC, Jones CJ. Localization of cis-acting sequences in the latency-related promoter of bovine herpesvirus 1 which are regulated by neuronal cell type factors and immediate-early genes. *J Virol*. 1992 Oct;66(10):6099-106.
3. Brown GA, Field HJ. Experimental reactivation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) by means of corticosteroids in an intranasal rabbit model. *Arch Virol*. 1990;112(1-2):81-101.
4. Cai W, Astor TL, Liptak LM, Cho C, Coen DM, Schaffer PA. The herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0 enhances virus replication during acute infection and reactivation from latency. *J Virol*. 1993 Dec;67(12):7501-12.
5. Capon DJ, Shepard HM, Goeddel DV. Two distinct families of human and bovine interferon-alpha genes are coordinately expressed and encode functional polypeptides. *Mol Cell Biol*. 1985 Apr;5(4):768-79.
6. Devireddy LR, Jones C. Alternative splicing of the latency-related transcript of bovine herpesvirus 1 yields RNAs containing unique open reading frames. *J Virol*. 1998 Sep;72(9):7294-301.
7. Devireddy LR, Jones CJ. Activation of caspases and p53 by bovine herpesvirus 1 infection results in programmed cell death and efficient virus release. *J Virol*. 1999 May;73(5):3778-88.
8. Farrell MJ, Dobson AT, Feldman LT. Herpes simplex virus latency-associated transcript is a stable intron. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Feb 1;88(3):790-4.
9. Fuchs M, Hübert P, Dettner J, Rziha HJ. Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. *J Clin Microbiol*. 1999 Aug;37(8):2498-507.
10. Galvan V, Brandimarti R, Roizman B. Herpes simplex virus 1 blocks caspase-3-independent and caspase-dependent pathways to cell death. *J Virol*. 1999 Apr;73(4):3219-26.
11. Goodbourn S, Didcock L, Randall RE. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol*. 2000 Oct;81(Pt 10):2341-64.
12. Heichman KA, Roberts JM. Rules to replicate by. *Cell*. 1994 Nov 18;79(4):557-62.
13. Henderson G, Perng GC, Nesburn AB, Wechsler SL, Jones C. The latency-related gene encoded by bovine herpesvirus 1 can suppress caspase 3 and caspase 9 cleavage during productive infection. *J Neurovirol*. 2004 Feb;10(1):64-70.
14. Inman M, Lovato L, Doster A, Jones C. A mutation in the latency-related gene of bovine herpesvirus 1 leads to impaired ocular shedding in acutely infected calves. *J Virol*. 2001 Sep;75(18):8507-15.
15. Inman M, Zhou J, Webb H, Jones C. Identification of a novel bovine herpesvirus 1 transcript containing a small open reading frame that is expressed in trigeminal ganglia of latently infected cattle. *J Virol*. 2004 May;78(10):5438-47.
16. Jiang Y, Hossain A, Winkler MT, Holt T, Doster A, Jones C. A protein encoded by the latency-related gene of bovine herpesvirus 1 is expressed in trigeminal ganglionic neurons of latently infected cattle and interacts with cyclin-dependent kinase 2 during productive infection. *J Virol*. 1998 Oct;72(10):8133-42.
17. Jiang Y, Inman M, Zhang Y, Posadas NA, Jones C. A mutation in the latency-related gene of bovine herpesvirus 1 inhibits protein expression from open reading frame 2 and an adjacent reading frame during productive infection. *J Virol*. 2004 Mar;78(6):3184-9.
18. Jones C. Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. *Clin Microbiol Rev*. 2003 Jan;16(1):79-95.
19. Kodukula P, Liu T, Rooijen NV, Jager MJ, Hendricks RL. Macrophage control of herpes simplex virus type 1 replication in the peripheral nervous system. *J Immunol*. 1999 Mar 1;162(5):2895-905.
20. Kutish G, Mainprize T, Rock D. Characterization

- of the latency-related transcriptionally active region of the bovine herpesvirus 1 genome. *J Virol.* 1990 Dec;64(12):5730-7.
21. Leib DA, Bogard CL, Kosz-Vnenchak M, Hicks KA, Coen DM, Knipe DM, Schaffer PA. A deletion mutant of the latency-associated transcript of herpes simplex virus type 1 reactivates from the latent state with reduced frequency. *J Virol.* 1989 Jul;63(7):2893-900.
22. Lemaire M, Weynants V, Godfroid J, Schynts F, Meyer G, Letesson JJ, Thiry E. Effects of bovine herpesvirus type 1 infection in calves with maternal antibodies on immune response and virus latency. *J Clin Microbiol.* 2000 May;38(5):1885-94.
23. Lovato L, Inman M, Henderson G, Doster A, Jones C. Infection of cattle with a bovine herpesvirus 1 strain that contains a mutation in the latency-related gene leads to increased apoptosis in trigeminal ganglia during the transition from acute infection to latency. *J Virol.* 2003 Apr;77(8):4848-57.
24. Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to auto-inflammatory diseases. *Cell.* 2004 May 28;117(5):561-74.
25. Meyer F, Jones C. The cellular transcription factor, CCAAT enhancer-binding protein alpha (C/EBP-alpha), has the potential to activate the bovine herpesvirus 1 immediate-early transcription unit 1 promoter. *J Neurovirol.* 2008 Dec 29:1-8.
26. Meyer F, Pérez S, Geiser V, Sintek M, Inman M, Jones C. A protein encoded by the bovine herpesvirus 1 latency-related gene interacts with specific cellular regulatory proteins, including CCAAT enhancer binding protein alpha. *J Virol.* 2007 Jan;81(1):59-67.
27. Meyer F, Pérez S, Jiang Y, Zhou Y, Henderson G, Jones C. Identification of a novel protein encoded by the latency-related gene of bovine herpesvirus 1. *J Neurovirol.* 2007 Dec;13(6):569-78.
28. Miyoshi M, Ishii Y, Takiguchi M, Takada A, Yasuda J, Hashimoto A, et al. Detection of canine herpesvirus DNA in the ganglionic neurons and the lymph node lymphocytes of latently infected dogs. *J Vet Med Sci.* 1999 Apr;61(4):375-9.
29. Narita M, Inui S, Nanba K, Shimizu Y. Recrudescence of infectious bovine rhinotracheitis virus and associated neural changes in calves treated with dexamethasone. *Am J Vet Res.* 1981 Jul;42(7):1192-7.
30. Nash AA. T cells and the regulation of herpes simplex virus latency and reactivation. *J Exp Med.* 2000 May 1;191(9):1455-8.
31. Park MT, Lee SJ. Cell cycle and cancer. *J Biochem Mol Biol.* 2003 Jan 31;36(1):60-5.
32. Payton M, Coats S. Cyclin E2, the cycle continues. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002 Apr;34(4):315-20.
33. Peng W, Henderson G, Inman M, BenMohamed L, Perng GC, Wechsler SL, et al. The locus encompassing the latency-associated transcript of herpes simplex virus type 1 interferes with and delays interferon expression in productively infected neuroblastoma cells and trigeminal Ganglia of acutely infected mice. *J Virol.* 2005 May;79(10):6162-71.
34. Pérez S, Inman M, Doster A, Jones C. Latency-related gene encoded by bovine herpesvirus 1 promotes virus growth and reactivation from latency in tonsils of infected calves. *J Clin Microbiol.* 2005 Jan;43(1):393-401.
35. Pérez S, Lovato L, Zhou J, Doster A, Jones C. Comparison of inflammatory infiltrates in trigeminal ganglia of cattle infected with wild-type Bovine herpesvirus 1 versus a virus strain containing a mutation in the LR (latency-related) gene. *J Neurovirol.* 2006 Oct;12(5):392-7.
36. Pérez S, Meyer F, Henderson G, Jiang Y, Sherman S, Doster A, et al. A protein encoded by the bovine herpesvirus 1 open reading frame E gene induces neurite-like morphological changes in mouse neuroblastoma cells and is expressed in trigeminal ganglionic neurons. *J Neurovirol.* 2007 Apr;13(2):139-49.
37. Pérez S, Meyer F, Saira K, Doster A, Jones C. Premature expression of the latency-related RNA encoded by bovine herpesvirus type 1 correlates with higher levels of beta interferon RNA expression in productively infected cells. *J Gen Virol.* 2008 Jun;89(Pt 6):1338-45.
38. Perng GC, Maguen B, Jin L, Mott KR, Kurylo J, BenMohamed L, et al. A novel herpes simplex virus type 1 transcript (AL-RNA) antisense to the 5' end of the latency-associated transcript produces a protein in infected rabbits. *J Virol.* 2002 Aug;76(16):8003-10.
39. Perng GC, Slanina SM, Yukht A, Ghiasi H, Nesburn AB, Wechsler SL. The latency-associated transcript gene enhances establishment of herpes simplex virus type 1 latency in rabbits. *J Virol.* 2000 Feb;74(4):1885-91.
40. Ramji DP, Foka P. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J.* 2002 Aug 1;365(Pt 3):561-75.
41. Rock D, Lokensgard J, Lewis T, Kutish G. Characterization of dexamethasone-induced reactivation of latent bovine herpesvirus 1. *J Virol.* 1992 Apr;66(4):2484-90.
42. Sabó A, Rajcáni J. Latent pseudorabies virus infection in pigs. *Acta Virol.* 1976 Jun;20(3):208-14.
43. Sawtell NM, Poon DK, Tansky CS, Thompson RL. The latent herpes simplex virus type 1 genome copy number in individual neurons is virus strain specific and correlates with reactivation. *J Virol.* 1998 Jul;72(7):5343-50.
44. Sawtell NM. The probability of in vivo reactivation of herpes simplex virus type 1 increases with the number of latently infected neurons in the ganglia. *J Virol.* 1998 Aug;72(8):6888-92.
45. Schang LM, Bantly A, Schaffer PA. Explant-induced reactivation of herpes simplex virus occurs in neurons expressing nuclear cdk2 and cdk4. *J Virol.* 2002 Aug;76(15):7724-35.
46. Schang LM, Hossain A, Jones C. The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 encodes a product which inhibits cell cycle progression. *J Virol.* 1996 Jun;70(6):3807-14.
47. Schwab SR, Shugart JA, Horng T, Malarkannan S, Shastri N. Unanticipated antigens: translation

- initiation at CUG with leucine. *PLoS Biol.* 2004 Nov;2(11):e366.
48. Scott JC, Dutta SK, Myrup AC. In vivo harboring of equine herpesvirus-1 in leukocyte populations and subpopulations and their quantitation from experimentally infected ponies. *Am J Vet Res.* 1983 Jul;44(7):1344-8.
49. Singh M, Fraefel C, Bello LJ, Lawrence WC, Schwyzer M. Identification and characterization of BICP27, an early protein of bovine herpesvirus 1 which may stimulate mRNA 3' processing. *J Gen Virol.* 1996 Apr;77 (Pt 4):615-25.
50. Spivack JG, Fraser NW. Expression of herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts in the trigeminal ganglia of mice during acute infection and reactivation of latent infection. *J Virol.* 1988 May;62(5):1479-85.
51. Stevens JG, Cook ML. Latent herpes simplex virus in spinal ganglia of mice. *Science.* 1971 Aug 27;173(999):843-5.
52. Thompson RL, Sawtell NM. The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript gene regulates the establishment of latency. *J Virol.* 1997 Jul;71(7):5432-40.
53. Tikoo SK, Campos M, Babiuk LA. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. *Adv Virus Res.* 1995;45:191-223.
54. Vaseva AV, Moll UM. The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Oct 25.
55. Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell.* 1994;76:777-79.
56. Velan B, Cohen S, Grosfeld H, Leitner M, Shafferman A. Bovine interferon alpha genes. Structure and expression. *J Biol Chem.* 1985 May 10;260(9):5498-504.
57. Wilson V, Jeffreys AJ, Barrie PA, Boseley PG, Slocombe PM, Easton A, et al. A comparison of vertebrate interferon gene families detected by hybridization with human interferon DNA. *J Mol Biol.* 1983 Jun 5;166(4):457-75.
58. Winkler MT, Doster A, Jones C. Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. *J Virol.* 2000 Jun;74(11):5337-46.
59. Winkler MT, Schang LS, Doster A, Holt T, Jones C. Analysis of cyclins in trigeminal ganglia of calves infected with bovine herpesvirus-1. *J Gen Virol.* 2000 Dec;81(Pt 12):2993-8.
60. Winkler MT, Doster A, Jones C. Bovine herpesvirus 1 can infect CD4(+) T lymphocytes and induce programmed cell death during acute infection of cattle. *J Virol.* 1999 Oct;73(10):8657-68.