



## Rotavirus Enfeksiyonunun Moleküler Patogenezi

Zeynep AKKUTAY YOLDAR, Feray ALKAN

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Ankara-TÜRKİYE

\*Sorumlu Yazar: Dr. Zeynep AKKUTAY YOLDAR; E-mail: akkutay@ankara.edu.tr; ORCID: 0000-0002-1178-5347

Cite this article as: Akkutay Yoldar Z, Alkan F. Rotavirus enfeksiyonunun moleküler patogenezi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(1): 66-73.

**Özet:** Rotaviruslar çocuklar ve birçok hayvan türünün yeni doğanlarında ishalin en önemli nedenlerindedir. Çevre şartlarında uzun süre değişmeden kalabilen virusun gıda ve su ile de yayılması mümkündür. Ağız yoluyla organizmaya giren virus; ince bağırsak epitellerinde çoğalarak saçılımını gerçekleştirir ve ishale yol açar. Virusun çoğalması ve viral patogenezi konularında yapılan araştırmalar virus ile mücadelede araştırmacılara ışık tutmaktadır. Bu derleme rotavirus enfeksiyonunun moleküler patogenezi hakkında genel bilgi verilmesi amacıyla hazırlanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Patogenezi, replikasyon, rotavirus

### Molecular Pathogenesis of Rotavirus Infection

**Summary:** Rotaviruses are the most important cause of diarrhea in children and newborns of many animal species. It is possible to spread the virus which can stay in a stable state for a long time under environmental conditions, with food and water. Virus that enters the organism through one's mouth; proliferates in the small intestine epithelium, and causes diarrhea. Studies on virus propagation and viral pathogenesis shed light on researchers in combating viruses. This review is intended to provide general information about the molecular pathogenesis of rotavirus infection.

**Key words:** Pathogenesis, replication, rotavirus

### Giriş

Rotavirus ilk olarak virus morfolojisinin elektron mikroskop ile incelenmesinin ardından 1974 yılında reovirus benzeri viral antijen olarak tanımlanmış; ilerleyen dönemlerde uluslararası taksonomi komitesi tarafından (ICTV) rotavirus ismiyle reoviridae familyası içinde sınıflandırılmıştır. Rotavirus, 65-70 nm büyüklüğünde, 12 proteini kodlayan (6 yapısal protein VP1-4, VP6, VP7 ve 6 yapısal olmayan protein NSP1-6) 11 segmentli, çift iplikçikli RNA bir içeren bir virus olarak tanımlanmıştır (Şekil 1) (20,21). Farklı türlerde enfeksiyon oluşturan rotaviruslar VP6 kodlayan gen bölgesi analizine göre 9 farklı serogrup (A,B,C,D,E,F,G,H,I) olarak sınıflandırılır (22,53). Kedi ve köpeklerde tespit edilen rotaviruslar I genogrup olarak sınıflanmışlardır (53,61). Gerek çocuklarda ve gerekse birçok hayvan türünde enfeksiyona neden olan rotaviruslar sıklıkla Grup A rotaviruslardır. Enfeksiyonu takiben serotip spesifik nötralizan antikorların oluşumuna yol açan dış kapsit proteinleri olan VP4 ve VP7 kodlayan gen bölgelerinin dizinlerine göre Grup A rotaviruslar sırasıyla proteaz (P) ve glikoprotein (G) genotip olarak sınıflandırılmaktadır (52,53). Bugüne kadar kanatlılar ve memelilerde en azından 31 G ve 44 P genotip tanımlanmıştır (41-44,53). Grup A rotavirusları ise en az 27 G türünü ve 37 P tipi içermektedir (43). Virusun segmentli RNA yapısı reassortment nedeniyle mutasyonlara neden olabildiğinden, virusun

genomik diziliminin kolayca değişebilmesi ve farklı genomik/antijenik yapıda yeni saha viruslarının oluşumu mümkündür (18).

Rotavirusun replikasyon mekanizması, proteinlerinin fonksiyonları ve patogenezi ile ilgili araştırmalar ilgi çekicidir. Virusün yapısal özelliklerinin kryo-elektron mikroskopik analizleri ve çeşitli tekniklerle (RNA interferens) virus konakçı ilişkileri araştırılmaktadır (4,27). Rotavirus enfeksiyonunun patogenezi hedef dokusu olarak sadece enterositler bilinmesine rağmen virusun kanda viremi dönemini geçirebildiği gösterilmiş ve akciğer, karaciğer, merkezi sinir sistemi gibi dokularda virus RNA'sı tespit edilebilmiştir (11,17,60).

### 1. Rotavirusun Yapısal Özellikleri

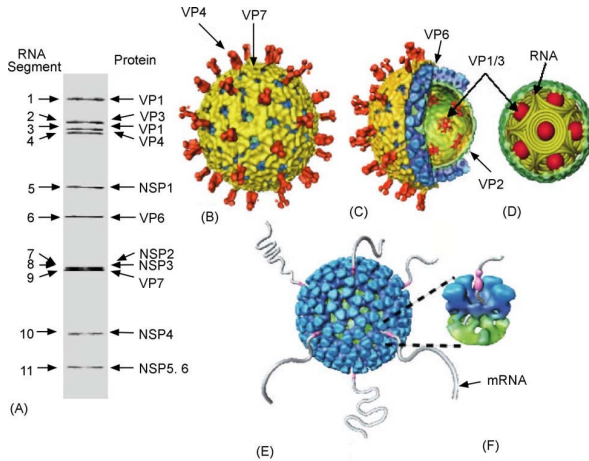
Rotavirus, Reoviridae ailesinde zarsız, ikozahedral, çift sarmal RNA (dsRNA) içeren bir virustur. Rotavirus kapsidinin işlevi bütün virus kapsidlerinde olduğu gibi genomunu korumak ve virus partikülünün kendi kopyalarını yapacağı uygun konakçıya aktararak, başarılı bir şekilde replike olmasını sağlamaktır (30).

Virus tarafından kodlanan farklı proteinlerin, kapsid sınırları içerisinde genomunu nasıl transkribe ettiği, infekte konakçı hücrenin sitoplazmasında rotaviral genlerin translasyonunu arttırmak için konakçı hücrenin translasyonunu nasıl kontrol ettiği, transkribe mRNA'yı şablon olarak kullanıp negatif sarmal sentezleyerek genom replikasyonunu sağlaması ve replike olmuş dsRNA genomunun paketlenmesi ve tam

virus partikülünün oluşturulması için kapsid tabakalarının toplanması gibi konular yapılan biyokimyasal çalışmalar sayesinde ortaya çıkmaya başlamıştır (30).

Konakçı hücrenin dsRNA'yı transkripsiyon gerçekleştirmesi amacıyla mRNA molekülüne çevirecek enzimatik mekanizmaya sahip olamaması nedeniyle, rotavirustaki dsRNA genom, kendi genomik çift sarmal RNA'larından mRNA molekülünü sağlayacak mekanizmaya sahiptir. Hücresel nükleazlar tarafından yapılan degradasyondan ve konakçı hücrede dsRNA'nın artmış konsantrasyonuna bağlı olarak tetiklenebilecek konakçı hücre antiviral cevabından korunmalıdır. Bu sebeple tüm dsRNA virusları transkripsiyon için kendi enzimlerini kodlar ve böylece kendi genomlarını endojenik olarak transkribe ederler. Endojen transkripsiyonun bu temel özelliği ve bu virustaki kapsid yapısı konakçıyla olan spesifik reaksiyonda önemli yer tutar (30,40).

Rotavirus genomu ikozahedral yapıya, üç katmanlı protein tabaka (Triple layered particle, TLP) tarafından korunur. Bu kalın protein (TLP) tabaka virusun bağırsakta bulunan asit ve sindirim enzimlerinin saldırısından korunmasını sağlar. Rotaviruslar özellikle şeker ve peptitleri parçalayıp sindirim sırasında onları dokulara ileten enterositleri (ileum villilerinin ucunda bulunan epitelium hücreleri) enfekte ederler. Virusun VP2'den yapılmış olan iç kapsit tabakası, genomik çift sarmal RNA'yı kuşatır. Özellikle VP2 katmanının



**Şekil 1.** Rotavirusun yapısal özellikleri

(A) Rotavirus genomunu oluşturan 11 dsRNA segmenti  
 (B) Rotavirus üç katmanlı parçacığının (TLP) Cryo-EM rekonstrüksiyonu. Spike proteini VP4 ve en dış VP7 katmanı gösterilmiştir  
 (C) İçte VP6, VP2 katmanlarını ve beş-yüzlü ekseninde VP2'ye bağlanan transkripsiyonel enzimleri gösteren rotavirus üç katmanlı parçacığının kesit görüntüsü  
 (D) Rotavirusta genom organizasyonunun şematik tasviri (Genom segmentleri transkripsiyon enzimi VP2 katmanının içinde saran ters çevrilmiş konik spiraller olarak sunulmuş)  
 (E ve F) Transkribe edilen çift-katmanlı parçacıkların (DLP) Cryo-EM rekonstrüksiyon modeli (30)

iç yüzeyi ile yakın ilişki içinde olan kısım, ikozahedral olarak düzenlenmiştir. VP2'nin iç yüzeyinde ikozahedral tepelere bağlanmış iki protein, VP1 ve VP3, tüm partikülün içinde genom transkripsiyonuna yol açar. Orta kapsit tabakası T=13 (levo) ikozahedral tel kafesi üzerine organize olan VP6 trimerinden oluşmuştur (Şekil 1) (21,22,30,45). Enfeksiyöz virusta en dış tabaka ana kapsit glikoproteini VP7 ve hemaglutinin spike proteini VP4'ten oluşmuştur. VP7 katmanının altında geniş ölçüde VP6 ile etkileşime giren VP4'e ait geniş globüler bir domain vardır (15,22).

## 2. Rotavirus Çoğalma ve Patogenezi

Rotavirus fekal oral yolla bulaşan, 100 virus partikülünden daha azının alınmasıyla dahi enfeksiyon oluşturabilen, tüm dünyada çocuklar ve birçok hayvan türünün yeni doğanlarında ishal meydana getiren enterik bir virustur (1,2,25,34). Rotavirus enfeksiyonu ishal, enterosit hasarından kaynaklanan malabsorpsiyon, enterik sinir sisteminin aktivasyonu ve epitelium hücre permeabilitesini ve klorid sekresyonunu değiştiren NSP4 viral proteininin faaliyeti gibi çeşitli mekanizmalarla sonuçlanır (32,55).

Rotavirus enfeksiyonu ince bağırsağın proksimal kısmında başlar ve distale yayılır. Genellikle en belirgin değişiklikler proksimal ince bağırsakta gözlenir (51). Rotavirus olgun enterositlerin villus uçlarında çoğalır (62). Enfeksiyon sonucu gelişen hücre ölümü villus epiteliumunun dökülmesine ve buna cevaben sekretorik kript hücrelerinin proliferasyonuna yol açar. Lümen içinde sıvı ve elektrolit kaybı artarken bağırsağın emilim kapasitesi düşer. Enterosit kaybı sonucunda sindirim enzimlerinin salınımı azalır ve bunu takiben karbonhidrat malabsorpsiyonu ve ishal gelişir. Ozmotik dengenin bozulmasından ileri gelen bu ishale ek olarak yapısal olmayan protein NSP4'ün hücresel iletim ve kalsiyum mobilizasyonunu etkilemesi de sekretorik ishale yol açar. Ayrıca NSP4 bazı prostaglandin ve bazı sitokinleri uyarak bağırsak sinir sistemini aktif hale geçirir ve sıvı sekresyonunu artırır (23,55).

Gittikçe sayısı artan raporlar, gastrointestinal sistemden kaçan rotavirusun çocuklarda antijenemiye, hayvan modellerinde de viremiye yol açtığını göstermiştir. Rotavirus antijeni ya da RNA'sı dokularda (karaciğer, akciğer, kalp, santral sinir sistemi) tespit edilmiştir (17,24,60). Rotaviruslar hücrenin sitoplazmasında çoğalırlar. Konakçı hücredeki replikasyon ve morfogenezlerini sağlamak için çeşitli yapısal olmayan proteinler kodlarlar. Virusun 11 dsRNA segmenti altı yapısal olmayan (NSP1-6) ve altı yapısal protein (VP1-4, VP6, VP7) kodlar. Yapısal proteinlerin isimlendirmeleri moleküler ağırlıkları baz alınarak konulur. En büyük VP1 125 kDa ağırlığındadır. İki proteolitik fragmenti olan VP4 ise en küçük ağırlığa sahiptir (28kDa) (49).

Yapısal proteinler çok katmanlı rotavirus partikülünü oluştururken, NSP1 dışındaki diğer yapısal olmayan proteinler virus replikasyonu için zorunludur. NSP1 ise interferon düzenleyici faktör-3 (IRF-3) ile etkileşime giren RNA'yı bağlayan proteindir (24). Hücre kültürlerinde NSP1'in yokluğu rotavirus replikasyonunu olumsuz yönde etkilememektedir. Bununla birlikte bazı hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda Type I interferon cevabına antagonist etki yaratarak viral patogeneze rol aldığı anlaşılmıştır (8). Virüslerin konakta hastalık oluşturma mekanizması olarak tanımlanan viral patogeneze etkenin organizmaya girişi, virüsün tipi, konakçı hücre ilişkileri, konağın cevabı gibi birçok bileşeni içerir. Bunların içinde en önemlilerinden biri de etkenin konağın çeşitli hücrelerinde başarılı bir şekilde üremesidir (16).

### 2.1. Virüsün hücreye girişi ve spike proteini VP4:

Rotavirüsler bağırsak epitel hücrelerini enfekte ederler. Virüsün en dış katmanı hücreye tutunma ve hücre içine virüsün girişinde rol oynar. Rotavirüsün hücreye giriş mekanizmasında önceleri VP7 üzerinde durulmuş ise de daha sonra yapılan çalışmalar VP4'ün bu mekanizmada ana oyuncu olduğunu göstermiştir. VP7'nin VP4'ün hücreye giriş ve tutunmasında fonksiyonu bulunmaktadır (31). Glikoprotein VP7 virion yüzeyini kaplar ve VP4 proteinini yerine kilitlet (56). VP7, yapısal geçişleri düzenlemek için VP5 ile etkileşime girer (59). Hücreye girişteki ilk olay transkripsiyonel olarak aktif olan iki katmanlı partiküllerin (double-layered particle - DLP) sitoplazmada var olabilmesi için dış katman tabakasının kaybolmasıdır (39). Rotavirüs dış kapsit proteini VP7 kalsiyuma bağlanır ve serbest kalsiyum iyonlarının ( $Ca_2^+$ ) uzaklaştırılması, VP7 trimerlerini monomerlerine ayrıştırarak VP7 proteininde yapısal değişikliklerle yol açar. Böylelikle viriondan VP7 salınır ve VP4'te yapısal değişiklikler başlatır (3,31). VP4 ise hücreye tutunma ve penetrasyon yanısıra hemagglütinasyon, nötralizasyon ve virulansta da rol almaktadır. VP4'ün proteolitik ayrılması virüs enfektivitesini birkaç kat arttırdığı gibi aynı zamanda virüsün hücreye girişini kolaylaştırır (16). Proteolizis sırasında VP4 (88 kDa), VP8 (28 kDa aa 1-247) ve VP5 (60 kDa, aa 248-776)'e ayrılır ve ayrılma ürünleri viriona birleşik bir şekilde kalır. Proteoliz rotavirüsün hücreye girişinin etkinliğinde anahtar bir rol oynar. Rotavirüslerin proteaz yönünden zengin ince bağırsaklarda replike olması da bununla ilişkilidir (31).

Rotavirüsün reseptörleriyle ilgili hipotez hala kanıtlanmadığından virüsün hücreye pinositoz ya da direk penetrasyonla girdiği tahmin edilmektedir. Birçok çalışma rotavirüsün hücreye girişinin sialik asit içeren reseptörleri ve integrinleri de kapsayan kompleks bir işlem olduğunu göstermiştir (19). İntegrin hücre dışı matrikste bulunan fibronektin, kollajen ve fibrinojen gibi yapışma proteinlerindeki arjinin, glisin, aspartik asitten oluşan tripeptitlere bağlanan hücre zarındaki reseptör gruplarından biridir (33). Bu işlem sırasında

VP8 sialik asit ile etkileşime girerken, VP5'te integrinlerle ilişki içinde olur. Bazı rotavirüs suşlarında VP8 proteini karbonhidrat bağlayıcı domain olarak düşünülmüştür. Bu domainin hücreye tutunmanın başlangıcında düzenleyici görevi gördüğü düşünülmüştür. VP4'ün alt birimi olan VP8, bağlanmada sialik asit (SA) içeren glikokonjugatı tanıyarak aracılık eder (19,62). Karbonhidrat tanıyan domain VP8'in sialik asit içeren konakçı hücre yüzey glikanlarına bağlandığı ve bunun ardından gelecek virus-hücre etkileşimlerinin sürdüğü düşünülmüştür (7,14).

**2.2. Endojen transkripsiyon:** Replikasyon siklusunda sırada gelen basamak dsRNA segmentleri şablon olarak kullanılarak, rotavirüs proteinlerini üretecek mRNA molekülü transkripsiyondur. Hücreye giriş sırasında dış katmanın uzaklaştırılması sonucuna sitoplazmada DLP olarak bulunan viral partiküller içinde dsRNA segmentleri transkribe edilirler. Transkripsiyon sırasında yeni oluşan ürünler DLP'nin içindeki VP2 ve dıştaki VP6 kapsid tabakalarının içine gömülmüş olan tip 1 kanal vasıtasıyla çıkarlar ve böylece DLP'nin yapısında bir değişiklik meydana gelmez (36).

DLP, mRNA transkriptlerini ve her bir mRNA'nın hücresel translasyon mekanizması tarafından kolayca translasyonu için gerekli olan 5'sonunun cap yapısının metillenmesi ve guanillenmesinde ihtiyaç duyulan bütün enzimatik aktiviteleri yapısında gerçekleştirebilmektedir (36). Bu enzimatik fonksiyonlar VP1, (RNA bağımlı RNA polimeraz) ve VP3 (guaniltransferaz ve metiltransferaz) tarafından gerçekleştirilir (49).

**2.2.1. Endojen transkripsiyonda VP6'nın rolü:** VP6 enzimatik fonksiyonlar yönünden eksik olmasına rağmen genomun endojen transkripsiyonunda zorunlu bir proteindir. Prasad ve ark. (50) tarafından çift katmanlı parçacıkların (DLP) ilk elektron mikroskopi çalışmaları VP6 katmanında fark edilen kanalların mRNA çıkışı için kullanılabileceği fikri ortaya atılmış; daha sonra aktif olarak transkripsiyon yapan DLP'lerle yapılan çalışmalar VP6 katmanında üç tip kanal olduğu gösterilmiştir. Yeni üretilmiş mRNA transkriptleri tip 1 kanallarından dışarı çıkar (36).

VP6 iki domaine sahiptir distal domain sekiz paralel sarmalla sandviç katı meydana getirir ve bununla VP7 katmanı ile ilişki kurar. Altaki domain ise bir heliks kümesinden oluşur ve içindeki VP2 katmanı ile iletişim kurar. VP6 katmanının tabanı baştan sona negatif elektrostatik potansiyel göstermesine karşılık VP6 ve VP2 arasındaki etkileşim ağırlıklı olarak hidrofobiktir. VP6 oldukça kararlı trimerler oluşturur. Bu sabit yapıyı sağlamak için yaptığı şeylerden biri de çinko iyonu bağı oluşturmaktır (31).

**2.3. Genom replikasyonu ve paketlenmesi:** Endojen transkripsiyonu ve transkriptlerin salınmasını takiben rotavirüs replikasyon siklusunda birbirini takip eden üç ana basamak gözlenir. 1-Translasyon ve

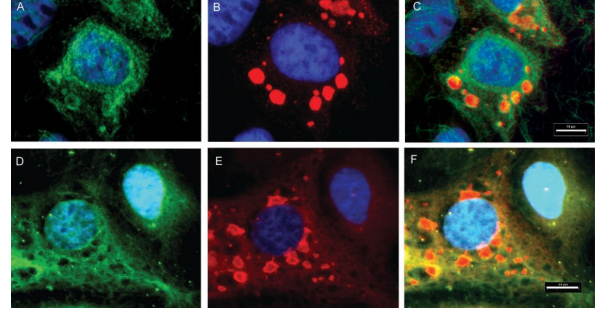
viral proteinlerin sentezi, 2-Replikasyon, genom paketlenmesi ve DLP toplanması, 3-Yeni oluşmuş DLPs'lerin (çift katmanlı parçacıklar) endoplazmik retikulumda tomurcuklanması dış katmanın olgun TLPs'leri (üç katmanlı parçacıklar) oluşturmak için toplanması (5,37).

**2.4. NSP3 ve genom translasyonu:** Rotavirus hücreye girdiğinde kendi mRNA'sını hücrenininki ile değiştirir. Normal RNA PABP adı verilen proteinle birlikte protein sentezini tetikleyen poly-A kuyruğuna sahiptir. Rotavirus bu proteinlere sahip değildir; bunun yerine NSP3 adı verilen farklı bir protein kullanır. Translasyonun başlangıcında rotaviruslar konakçı translasyon mekanizmasını ele geçirirler ve hücre protein sentezini keskin bir şekilde durdururlar. Rotavirus mRNA'sı poly(A) kuyruğuna sahip değildir ama onun yerine 3' ucunda viral yapısal olmayan NSP3 proteini tarafından bağlanan konsensus bir sekansa sahiptir. Bu sekans poly(A) bağlanma proteininin (PABP) yararlandığı bölgeleri kullanarak Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 (eIF4G1) ile etkileşime girer. Hücresel mRNA translasyonu, ekspres edilen NSP3 tarafından inhibe edilir ve PABP'nin ve hücresel mRNA'ların kendilerinin hücre çekirdeğinde birikmesine yol açar (26,47,54).

Yapısal olmayan NSP3 proteini rotaviral mRNA'nın spesifik tanınmasında ve hücresel mekanizmayı kullanarak mRNA translasyonu kolaylaştırılmasında fonksiyon görür. NSP3 hücresel poly (A) bağlayan proteinin (PABP) fonksiyonel homologudur. NSP3 N-terminal domaini rotavirus mRNA'sının C-terminal konsensus sekansı ile etkileşime girerken mRNA'nın sirkülasyonunu ve onun viral protein sentezi için ribozoma taşınmasını sağlamak için C-terminal domainde eIF4G ile etkileşim halindedir. (49). RNA bağlayan domainler kalp şekilli asimetrik dimerler meydana getirirken C-terminal domaini çubuk şeklinde bir simetri meydana getirir. Dimerik N-terminal domaini mRNA'nın 3' konsensusuna sıkıca bağlanır. NSP3'ün bu bağlanması yeni yapılmış mRNA'ların replikasyonun hemen ardından viroplazmaya taşınması için de muhtemel bir mekanizma olabileceğini düşündürür (26, 49).

**2.5. NSP2 ve NSP5:** Reoviridae ailesindeki virüsler genom paketlenmesi, replikasyon ve erken seviye virion toplanmasına hizmet eden sitoplazmik inklüzyon cisimcikleri (viroplazmalar) üretirler (Şekil 2, A-F), (13). Rotavirus enfekte hücrelerde viroplazmaların çekirdeklenmesi iki yapısal olmayan proteine (NSP2 ve NSP5) bağlıdır (58), (Şekil 2, A-F). Bu yapısal olmayan proteinler sadece viroplazma oluşumunda değil aynı zamanda genom replikasyonu ve paketlenmesinde de görev alırlar (13). Enfekte olmayan hücrelerde NSP2 ve NSP5'in birlikte ifadesi viroplazma benzeri yapıları (VLP) oluşturur. NSP2 viroplazma oluşumunda, genom replikasyonu ve paketlenmesinde zorunlu bir proteindir (58). RNA-bağlama ve heliks

-destabilize etme özelliklerinin yanı sıra NSP2 nükleosit trifosfat aktivitesi sergiler. Bu enzimatik aktivite için korunmuş histidin (H225) katalitik rezidü olarak fonksiyon görür ve bu rezidünün mutasyonu viroplazm formasyonunu etkilemeden çift RNA sentezini ortadan kaldırır (35).



**Şekil 2.** Rotavirus enfekte hücrelerde mikrotübül ve viroplazmaların yerleşimlerinin floresan mikroskopi ile gösterilmesi **A:** Rotavirus ile enfekte olmuş hücrelerin mikrotübülleri; **B:** Anti-NSP5 ile görülen rotavirus viroplazmaları; **C:** A ve B fotoğraflarının birleşimi; **D:** Rotavirus ile enfekte olmuş hücrelerin mikrotübülleri; **E:** Anti-NSP2 ile görülen rotavirus viroplazmaları; **F:** D ve E fotoğraflarının birleştirilmesi (13)

Yapısal olmayan protein NSP5, Serin ve Threonin kalıntılarından zengin dimerik bir fosfoproteindir ve enfeksiyondan 2 saat sonra tespit edilebilir (10). NSP5'in görevi replikasyon ve paketlenme işlemi sırasında NSP2 ile bağlanmayı düzenlemektir. In vivo çalışmalarda da bu iki proteinin (NSP2 ve NSP5), yapısal proteinlerden VP1 (viral RNA polimerase), VP2 ve VP3 ile birlikte viroplazma içinde lokalize olduğu ve replikasyon araçlarının ana bileşenleri olduğu gösterilmiştir (8). NSP2 ve NSP5'in viroplazm oluşumuna, genom replikasyonuna ve virion toplanmasına katıldığına kanıt olarak siRNA teknikleri kullanılarak çalışmalar hem NSP2 hem de NSP5'in susturulmasının viroplazm oluşumunu, genom replikasyonunu ve viral toplanmayı inhibe ettiği göstermiştir (57).

NSP2 heliks destabilizasyonu gerçekleştiren NTPase, RTPase aktivitesiyle RNA bağlayan bir proteindir (28,31). Protein, yığılmış şekilde iki tetramerden meydana gelmiş halka şekilli, 35 Å genişliğinde bir çukur bulunan ve çörek şeklinde bir oktamerden oluşmuştur. Bu oktamerin kenarlarında bulunan oluklar RNA bağlayan kenarlar olması beklenen temel rezidülerle sınırlandırılmışlardır. Oktamer yüzeyinde yayılmış olan elektropozitif kanallar rekabetçi bir şekilde iki liganda bağlanır; ssRNA ve NSP5 (58). Böylece NTPaz aktivitesi monomerik alt üniteye yerleşeceği zaman RNA'ya ve oktamerin oluşumu için gerekli olan NSP5 ve VP1 gibi proteinlere bağlanma kabiliyetine sahip olur (30,31).

**2.6. Rotavirus genomunun kapsit ile kuşatılması (kapsidasyon) modeli:** Her bir virionda dsRNA'nın 11 segmentinin doğru bir şekilde enkapside edilmeli-

dir. dsRNA genomu segmentlerinin önceden oluşmuş boş kapsidlere yerleşiyor olması da makul bulunmaktadır. Bunun yerine enkapsidasyonun, kapsid toplanmasıyla (assembly) eş zamanlı olarak gerçekleşebileceği düşünülmektedir. + RNA'ların ve viral proteinlerin enkapsidasyon öncesi veya sırasında işlevleri tam bilinmiyor (46, 49). Kapsidin toplanması 12 birimin birleşmesiyle başlar. Bu birleşim SLP oluşumu ve peşi sıra gelecek VP6 toplanması iskelet yapısı için gereklidir ki bu toplanmada DLP toplanmasına öncülük eder (9). VP2'nin N-terminal bölgesi, VP1'in enkapsidasyonu için gereklidir (12).

**2.7. Olgunlaşma ve salınım:** Olgunlaşma ve salınım rotavirus replikasyon siklusunun son basamaklarıdır. İlk olarak DLP'ler proksimal olarak yerleşmiş endoplazmik retikulum tomurcuklanırlar ve mekanizması bilinmeyen bir şekilde çift katmanlı parçacıklar VP7 ve VP4'ü içeren en dış katmanı kazanırlar. Bu işlem sırasında geçici olarak zarlanmış bir partikül oluşur ve dış kapsid proteinleri bu partiküller üzerinde yerleşir. Olgun partiküller endoplazmik retikulum lümeninde toplanırlar (20). Bu tomurcuklanma işlemi VP6 proteini için bir bağlanma bölgesi bulunan yapısal olmayan protein NSP4 tarafından kolaylaştırılır. Hem VP4 hem de dış katman proteini VP7 endoplazmik retikulumla ilişkili ribozomlarda sentezlenir ve birlikte endoplazmik retikulum girelir.

NSP4 ağırlıklı olarak  $\alpha$ -helikal bir glikoproteindir. Endoplazmik retikulumun sitoplazmik kısmında C-terminalinin 131 terminal rezidüleriyle tetramer oluşturur. C-terminal rezidüleri VP6 için bir bağlanma kısmı oluştururlar ve DLP'ler için hücre içi bir reseptör görevi görür ve maturasyonda rol alır (48). NSP4'ün hücre içinde  $Ca^{2+}$  salınımında da fonksiyonu vardır (29). NSP4'ün bilinen asıl fonksiyonu ise viral enterotoksin vazifesi görüp diareyi indüklemesidir (6,37,38).

VP4 proteini bağımsız olarak sitoplazmik membranda yapılan bir proteindir. Fakat olgun virus partikülünün oluşabilmesi için VP7 katmanına eklenmelidir. VP7 proteini ise endoplazmik retikulumda toplanan bir proteindir. Farklı yerlerde toplanma aşamalarını (assembly) geçiren bu proteinlerin en dış katmanı oluşturmak için bir araya gelmektedir (4). Rotavirus parçacıkları endoplazmik retikulum içinde başlangıçta geçici olarak zarlıdır, fakat VP4 ve VP7'yi içeren dış tabakayı oluşturduğunda zarf kaybolur (22). VP4 proteini de nasıl meydana geldiği bilinmeyen bir şekilde üç katmanlı parçacıklara eklendikten sonra enfeksiyöz virus partikülü şekillenmiş olur ve virus farklılaşmış enterosit hücrelerinde apikal yüzeyden hücreyi terk eder. Virusun bilinen asıl salınımı hücreyi lize ederek dışarı çıkmasıdır (4).

## Sonuç

Bugüne dek bildirilen yapısal ve biyokimyasal araştırmalar ile rotavirusun replikasyonu ve moleküler pato-

genezi hakkında birçok bilgi sağlanmış olup, halen konu hakkında araştırmalar devam etmektedir. Söz konusu bu araştırmalar; virus-hücre reseptör ilişkisi, NSP4'ün DLP ve TLP oluşumuna ne şekilde katkı sağladığı, VP4'ün olgunlaşma aşamasında virusa nasıl entegre olduğu, virusun generalize enfeksiyon meydana getirip getirmediği gibi konuları kapsamaktadır.

Ülkemizde rotavirus enfeksiyonlarının insanlar yanı sıra, farklı hayvanlardan izolasyonu gerçekleştirilmiştir (1,2). Hayvancılığın önemli yer tuttuğu Türkiye'de; ekonomik kayıplara yol açan rotavirus enfeksiyonlarının özellikle buzağılarda seyreden genotiplerinin aydınlatılmasına yönelik çalışmalar; ileride geliştirilmesi düşünülen aşılarda için temel oluşturmaktadır (1,2). Ayrıca bu çalışmalarda kazanılan izolatlar, virusun patogenezi anlamaya yönelik çalışmalar yapmayı da mümkün kılmaktadır. Bu bağlamda; yeni doğanlarda gastroenteritis ile seyreden rotavirus enfeksiyonları önemli bir sıklığa sahip olup; virusun moleküler düzeyde patogenezi aydınlatacak her çalışma nihai hedef olan bu enfeksiyondan korunma konusunda önemli verilerin sağlanması adına değerli çalışmalar olarak yer tutacaktır.

## Kaynaklar

1. Alkan F, Gulyaz V, Timurkan MO, Iyisan S, Ozdemir S, Turan N, Buonavoglia C, Martella V. A large outbreak of enteritis in goat flocks in Marmara, Turkey, by G8P [1] group A rotaviruses. Arch Virol 2012; 157(6):1183-7.
2. Alkan F, Ozkul A, Oguzoglu TC, Timurkan MO, Caliskan E, Martella V, Burgu I. Distribution of G (VP7) and P (VP4) genotypes of group A bovine rotaviruses from Turkish calves with diarrhea, 1997-2008. Vet Microbiol 2010; 141(3): 231-7.
3. Aoki ST, Settembre EC, Trask SD, Greenberg HB, Harrison SC, Dormitzer PR. Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab. Science 2009; 324(5933): 1444-7.
4. Arias CF, Dector MA, Segovia L, López T, Camacho M, Isa P, Espinosa R, López S. RNA silencing of rotavirus gene expression. Virus Res 2004; 102(1): 43-51.
5. Baker TS, Olson NH, Fuller SD. Adding the third dimension to virus life cycles: Three-dimensional reconstruction of icosahedral viruses from cryo-electron micrographs. Microbiol Mol Biol R 1999; 63(4): 862-922.
6. Ball JM, Tian P, Zeng CQ, Morris AP, Estes MK. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. Science 1996; 272 (5258): 101-4.

7. Banda K, Kang G, Varki A. 'Sialidase sensitivity' of rotaviruses revisited. *Nat Chem Biol* 2009; 5 (2): 71.
8. Barro M, Patton JT. Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. *PNAS* 2005; 102(11): 4114-9.
9. Berois M, Sapin C, Erk I, Poncet D, Cohen J. Rotavirus nonstructural protein NSP5 interacts with major core protein VP2. *J Virol* 2003; 77(3): 1757-63.
10. Blackhall J, Munoz M, Fuentes A, Magnusson G. Analysis of rotavirus nonstructural protein NSP5 phosphorylation. *J Virol* 1998; 72(8): 6398-405.
11. Blatt SE, Fenaux M, Warfield KL, Greenberg HB, Conner ME. Active viremia in rotavirus-infected mice. *J Virol* 2006; 80(13): 6702-5.
12. Boudreaux CE, Vile DC, Gilmore BL, Tanner JR, Kelly DF, McDonald SM. Rotavirus core shell subdomains involved in polymerase encapsidation into virus-like particles. *J Gen Virol* 2013; 94 (8): 1818-26.
13. Cabral-Romero C, Padilla-Noriega L. Association of rotavirus viroplasm with microtubules through NSP2 and NSP5. *Mem I Oswaldo Cruz* 2006; 101(6): 603-11.
14. Ciarlet M, Crawford SE, Estes MK. Differential infection of polarized epithelial cell lines by sialic acid-dependent and sialic acid-independent rotavirus strains. *J Virol* 2001; 75(23): 11834-50.
15. Crawford SE, Mukherjee SK, Estes MK, Lawton JA, Shaw AL, Ramig RF, Prasad BV. Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike. *J Virol* 2001; 75(13): 6052-61.
16. Desselberger U. Rotaviruses. *Virus Res* 2014; 190: 75-96.
17. Dickey M, Jamison L, Michaud L, Care M, Bernstein DI, Staat MA. Rotavirus meningoencephalitis in a previously healthy child and a review of the literature. *Pediatr Infect Dis* 2009; 28(4): 318-21.
18. Dóro R, László B, Martella V, Leshem E, Gentsch J, Parashar U, Bányai K. Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: Is there evidence of strain selection from vaccine pressure? *Infect Genet Evol* 2014; 28: 446-61.
19. Dormitzer PR, Sun ZY, Wagner G, Harrison SC. The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *EMBO J* 2002; 21(5): 885-97.
20. Estes MK, Cohen JE. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* 1989; 53(4): 410-49.
21. Estes M, Kapikian A. Rotaviruses. Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, eds. In: *Fields Virology*. Fourth Edition. Philadelphia: Kluwer/Lippincott, Williams and Wilkins, 2007; pp.1917-74.
22. Estes MK, Greenberg HB. Rotaviruses. Knipe DM, Howley PM, Cohen JI, Griffin DE, Lamb R, Martin MA, Racaniello VR, Roizman B, eds. In: *Fields Virology*. Sixth Edition Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams and Wilkins, 2013; pp.1347-401.
23. Ge Y, Mansell A, Ussher JE, Brooks AE, Manning K, Wang CJ, Taylor JA. Rotavirus NSP4 triggers secretion of proinflammatory cytokines from macrophages via toll-like receptor 2. *J Virol* 2013; 87(20): 11160-7.
24. Graff JW, Mitzel DN, Weisend CM, Flenniken ML, Hardy ME. Interferon regulatory factor 3 is a cellular partner of rotavirus NSP1. *J Virol* 2002; 76(18): 9545-50.
25. González AM, Azevedo MS, Saif LJ. Intestinal and systemic immunity to rotavirus in animal models and humans. Vajdy M, ed. In: *Immunity Against Mucosal Pathogens*. Dordrecht: Springer, 2008; pp. 263-97.
26. Harb M, Becker MM, Vitour D, Baron CH, Vende P, Brown SC, Bolte S, Arold ST, Poncet D. Nuclear localization of cytoplasmic poly (A)-binding protein upon rotavirus infection involves the interaction of NSP3 with eIF4G and RoXaN. *J Virol* 2008; 82(22): 11283-93.
27. Hirsch AJ. The use of RNAi-based screens to identify host proteins involved in viral replication. *Future Microbiol* 2010; 5(2): 303-11.
28. Hu L, Chow DC, Patton JT, Palzkill T, Estes MK, Prasad BV. Crystallographic analysis of rotavirus NSP2-RNA complex reveals specific recognition of 5' GG sequence for RTPase activity. *J Virol* 2012; 86(19): 10547-57.
29. Hyser JM, Collinson-Pautz MR, Utama B, Estes MK. Rotavirus disrupts calcium homeostasis by NSP4 viroporin activity. *MBio* 2010; 1(5): e00265-10.
30. Jayaram H, Estes MK, Prasad BV. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res* 2004; 101(1): 67-81.

31. Jayaram H, Taraporewala Z, Patton JT, Prasad BV. Rotavirus protein involved in genome replication and packaging exhibits a HIT-like fold. *Nature* 2002; 417(6886): 311.
32. Jones S. A brush with rotavirus. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4(12): 877-8.
33. Karol S, Suludere Z, Ayvalı C. *Biyoloji Terimleri Sözlüğü*. Beşinci Baskı. Ankara: TDK Yayınları, 2010; s. 306.
34. Karayel I, Fehér E, Marton S, Coskun N, Bányai K, Alkan F. Putative vaccine breakthrough event associated with heterotypic rotavirus infection in newborn calves, Turkey, 2015. *Vet Microbiol* 2017; 201: 7-13.
35. Kumar M, Jayaram H, Vasquez-Del Carpio R, Jiang X, Taraporewala ZF, Jacobson RH, Patton JT, Prasad BV. Crystallographic and biochemical analysis of rotavirus NSP2 with nucleotides reveals a nucleoside diphosphate kinase-like activity. *J Virol* 2007; 81(22): 12272-84.
36. Lawton JA, Estes MK, Prasad BV. Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nat Struct Mol Biol* 1997; 4(2): 118.
37. López T, Camacho M, Zayas M, Nájera R, Sánchez R, Arias CF, López S. Silencing the morphogenesis of rotavirus. *J Virol* 2005; 79(1): 184-92.
38. Lorrot M, Vasseur M. How do the rotavirus NSP4 and bacterial enterotoxins lead differently to diarrhea? *Virol J* 2007; 4(1): 31.
39. Ludert JE, Michelangeli F, Gil F, Liprandi F, Esparza J. Penetration and uncoating of rotaviruses in cultured cells. *Intervirology* 1987; 27(2): 95-101.
40. Long CP, McDonald SM. Rotavirus genome replication: Some assembly required. *PLoS Pathog* 2017; 13(4): e1006242.
41. Martella V, Ciarlet M, Baselga R, Arista S, Elia G, Lorusso E, Banyai K, Terio V, Madio A, Ruggeri FM, Falcone E. Sequence analysis of the VP7 and VP4 genes identifies a novel VP7 gene allele of porcine rotaviruses, sharing a common evolutionary origin with human G2 rotaviruses. *Virology* 2005; 337(1): 111-23.
42. Martella V, Ciarlet M, Banyai K, Lorusso E, Cavalli A, Corrente M, Elia G, Arista S, Camero M, Desario C, Decaro N. Identification of a novel VP4 genotype carried by a serotype G5 porcine rotavirus strain. *Virology* 2006; 346(2): 301-11.
43. Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Bányai K, Brister JR, Buesa J, Esona MD, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol* 2011; 156(8): 1397-413.
44. Matthijnssens J, Van Ranst M. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Curr Opin Virol* 2012; 2(4): 426-33.
45. McClain B, Settembre E, Temple BR, Bellamy AR, Harrison SC. X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *J Mol Biol* 2010; 397(2): 587-99.
46. McDonald SM, Patton JT. Assortment and packaging of the segmented rotavirus genome. *Trends Microbiol* 2011; 19(3): 136-44.
47. Montero H, Arias CF, Lopez S. Rotavirus non-structural protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J Virol* 2006; 80(18): 9031-8.
48. O'Brien JA, Taylor JA, Bellamy AR. Probing the structure of rotavirus NSP4: a short sequence at the extreme C terminus mediates binding to the inner capsid particle. *J Virol* 2000; 74(11): 5388-94.
49. Pesavento JB, Crawford SE, Estes MK, Prasad BV. Rotavirus proteins: Structure and assembly. Roy P. ed. In: *Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis*. Berlin: Springer, 2006; pp. 189-219.
50. Prasad BV, Rothnagel R, Zeng CY, Jakana J, Lawton JA, Chiu W, Estes MK. Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature* 1996; 382(6590): 471.
51. Ramig RF. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol* 2004; 78(19): 10213-20.
52. Reidy N, Lennon G, Fanning S, Power E, O'Shea H. Molecular characterisation and analysis of bovine rotavirus strains circulating in Ireland 2002-2004. *Vet Microbiol* 2006; 117(2-4): 242-7.
53. Rubio RM, Mora SI, Romero P, Arias CF, López S. Rotavirus prevents the expression of host responses by blocking the nucleocytoplasmic transport of polyadenylated mRNAs. *J Virol* 2013; 87(11): 6336-45.
54. Sastri NP, Crawford SE, Estes MK. Pleiotropic properties of rotavirus nonstructural protein 4 (NSP4) and their effects on viral replication and pathogenesis. Svensson L, Desselberger U, Estes M, Greenberg H. eds. In: *Viral Gastroenteri-*

- tis. Oxford: Academic Press Elsevier, 2016; pp.145-74.
55. Settembre EC, Chen JZ, Dormitzer PR, Grigorieff N, Harrison SC. Atomic model of an infectious rotavirus particle. *EMBO J* 2011; 30(2): 408-16.
  56. Silvestri LS, Taraporewala ZF, Patton JT. Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasms. *J Virol* 2004; 78(14): 7763-74.
  57. Taraporewala ZF, Kumar M, Prasad BV, Patton JT. Structure and function of the rotavirus NSP2 octamer, an essential component of the viroplasm. Patton JT. ed. In: *Segmented Double-Stranded Rna Viruses: Structure and Molecular Biology*. Norfolk: Caister Academic Press, 2008; pp. 273-89.
  58. Trask SD, Ogden KM, Patton JT. Interactions among capsid proteins orchestrate rotavirus particle functions. *Curr Opin Virology* 2012; 2(4): 373-9.
  59. Von Sochaczewski CO, Pintelon I, Brouns I, Dreier A, Klemann C, Timmermans JP, Petersen C, Kuebler JF. Rotavirus particles in the extrahepatic bile duct in experimental biliary atresia. *J Pediatr Surg* 2014; 49(4): 520-4.
  60. Vonsover A, Shif IL, Silberstein I, Rudich H, Aboudy YA, Mendelson E, Shulman L, Nakagomi T, Nakagomi O. Identification of feline-and canine-like rotaviruses isolated from humans by restriction fragment length polymorphism assay. *J Clin Microbiol* 1993; 31(7): 1783-7.
  61. Zhang YD, Li H, Liu H, Pan YF. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the VP8\* sialic acid-binding domain of porcine rotavirus strain OSU. *Acta Crystallogr F* 2007; 63(2): 93-5.