

# 轮状病毒感染机制研究进展

韩郝涛<sup>1</sup>, 杨学磊<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>新疆医科大学研究生院, 新疆 乌鲁木齐

<sup>2</sup>新疆维吾尔自治区人民医院医学研究与转化中心, 新疆 乌鲁木齐

收稿日期: 2024年1月27日; 录用日期: 2024年2月21日; 发布日期: 2024年2月28日

## 摘要

轮状病毒是世界范围内引起儿童腹泻死亡的最重要的病原体之一。其感染机制一直是研究热点, 近年来在分子水平及免疫学等方面已取得了显著进展。本文对轮状病毒的一般生物学特征进行了描述, 并对轮状病毒感染与宿主之间的相关免疫反应以及轮状病毒编码蛋白(包括结构蛋白和非结构蛋白)在感染中的作用的研究进展加以综述。

## 关键词

轮状病毒, 致病机制, 结构蛋白, 非结构蛋白

# Research Progress of Rotavirus Infection Mechanism

Haotao Han<sup>1</sup>, Xuelei Yang<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang

<sup>2</sup>Medical Research and Translational Center, Xinjiang Uygur Autonomous Region People's Hospital, Urumqi Xinjiang

Received: Jan. 27<sup>th</sup>, 2024; accepted: Feb. 21<sup>st</sup>, 2024; published: Feb. 28<sup>th</sup>, 2024

## Abstract

Rotavirus is one of the most important pathogens causing diarrhea deaths in children worldwide. The mechanism of infection has been the focus of research, and remarkable progress has been made in molecular level and immunology in recent years. In this paper, the general biological characteristics of rotavirus are described, and the relevant immune response between rotavirus

\*通讯作者。

**infection and host and the role of rotavirus encoded proteins (including structural and non-structural proteins) in infection are reviewed.**

## Keywords

**Rotavirus, Pathogenic Mechanism, Structural Protein, Nonstructural Protein**

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

A 组轮状病毒(Rota Virus, RV)是全球 5 岁以下婴儿和儿童(U5)患中至重度急性胃肠炎的主要原因,在低收入和中等收入国家尤为突出[1]。尽管截至 2022 年底, RV 疫苗已在 121 个国家推行,其中 3 个国家在其部分地区推行,其全球覆盖率估计为 51%,但全球每年仍约有 17 亿例感染病例和 525,000 例死亡病例[2]。近年,因 RV 反向遗传学系统的发展,为 RV 生物学研究做出了突出贡献。本文就近年来相关研究进展进行综述。

## 2. RV 的一般特征

RV 是一种双链 RNA 病毒,其基因组由 11 个片段组成,编码 6 种结构蛋白和 6 种非结构蛋白[3]。其中两种结构蛋白(VP7 和 VP4),形成病毒的外层衣壳,参与 RV 附着和进入宿主细胞,并被识别为中和抗原。在结构上,VP4 形成从 RV VP7 层突出的刺突,可以被胰蛋白酶切割成两种蛋白 VP5\*和 VP8\* [4]。与聚糖受体相互作用的 VP8\*负责 RV 附着到宿主细胞,而 VP5\* 则参与病毒渗透到宿主细胞膜内[5] [6]。根据编码 VP7 和 VP4 的基因序列, RV 分别分为不同的 G 和 P 基因型。其中,VP7 (G1~G4、G9 和 G12)与 VP4 (P[4]、P[6]和 P[8])结合,导致了全球大多数人类 RV 腹泻[7]。

## 3. 轮状病毒感染和宿主免疫

由于 RV 依赖于宿主细胞,在复制和传播的过程中,它们进化出了许多逃避和/或损害宿主免疫的策略,例如:通过扰乱宿主先天免疫反应所必需的转录因子的表达和活化从而逃避宿主免疫识别,亦或其自身结构蛋白及非结构蛋白通过结合宿主受体、抑制宿主细胞翻译、下调抗病毒物质表达而损害宿主免疫功能。针对 RV 的先天免疫反应始于诱导干扰素的产生,而干扰素的产生是由病毒 dsRNA 介导的[8]。病毒穿透宿主细胞后, RV 的复制立即被宿主受体识别。下面对 RV 感染和宿主免疫相关研究现状进行了描述。

RV 感染主要局限于肠粘膜。RV 性腹泻是由病毒的多种活动引起的。一种机制是,病毒的广泛复制、肠上皮细胞的大量坏死、肠道相关酶(如麦芽糖酶、蔗糖酶和乳糖酶)的丧失[9],以及形成脂滴的相关酶缺失,导致肠吸收不良,肠腔渗透压升高,随后出现腹泻[10]。第二种机制是 RV 感染的细胞释放有效的信号分子,使邻近的未感染的细胞失调[11]。其中包括肠毒素 NSP4 与相邻的未感染肠上皮细胞结合,激活 Ca<sup>2+</sup>激活的氯通道,导致分泌性腹泻[12]。第三种机制是基于病毒肠毒素对肠神经系统的刺激。即 NSP4 介导的细胞内钙浓度的增加诱导了 5-羟色胺(5-HT)的分泌,触发小肠神经的激活,从而增加肠动力,引发腹泻[13]。

### (1) 干扰素及与干扰素相关的宿主免疫

抵抗病毒感染的第一道防线之一是宿主的先天免疫反应,感染的结果取决于病毒与这些反应之间的

相互作用。干扰素(IFN)介导的信号通路是这种先天反应的关键,对宿主抗病毒反应尤为重要。IFN分为三种类型(I、II和III),典型I型IFN和III型IFN诱导是肠道粘膜中免疫应答的关键[14]。RV已经进化出许多机制,通过IFN信号的拮抗来逃避宿主免疫应答[15]。一些研究表明,RV感染诱导I型和III型IFN激活,当这两种类型的干扰素受体在小鼠模型中缺失时,抗病毒反应大大减弱[16]。先前的研究表明,I型IFN引发快速和急性的免疫反应,而III型IFN以延迟和持续的方式引发反应[17]。虽然外源性I型和III型IFN都能有效地保护细胞免受RV感染[18],但是最近Patricio Doldan等人的研究通过利用活细胞荧光显微镜来直观了解RV感染和传播期间IFN的产生,存在IFN拮抗剂病毒蛋白NSP1的情况下,III型IFN也能非常有效地在大量细胞中建立抗病毒状态,强调了内源性III型IFN是限制RV感染人肠道细胞的关键[19]。

黑色素瘤分化相关蛋白5(MDA5)是一种重要的细胞质受体,它一方面是一种诱导干扰素产生的基因,另一方面也是ISG[20]。最近的研究发现MDA5的过度表达激活了STAT1的磷酸化,此为JAK-STAT激活级联的标志,是干扰素通路的下游级联。以此IFN样的反应诱导重要抗病毒ISG的转录,而不触发功能性IFN的产生[21]。N6-甲基腺苷(m6A)是一种丰富的mRNA修饰,影响许多生物过程,通过m6A相关的写入器、擦除器和读取器调节多种细胞功能[22]。最近,一项研究发现了在RV感染IEC过程中m6A修饰的一种新的抗病毒功能[23],包括:RV感染通过下调m6A擦除器ALKBH5的表达而诱导m6A在mRNA转录上的全局修饰,确定IRF7是干扰素应答的主要调节因子(IRF7是IFN和ISG上游的一个关键转录因子),是RV感染过程中M6A修饰的靶点之一。其展示了一种新的宿主M6A-IRF7-干扰素抗病毒信号级联反应,可以在体内限制RV的感染。Zhaoxia Pang等人通过细胞实验发现在没有干扰素诱导的跨膜蛋白3(IFITM3,是一种ISG,主要表达于细胞核内体和溶酶体)的情况下,干扰素诱导的抗病毒作用显著减弱,而在有IFITM3的情况下,IFITM3延迟了RV从内体的逃逸,提示内源性IFITM3在I型干扰素介导的抗病毒反应中起重要作用[24]。

#### (2) 其他相关宿主免疫

核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复的受体(NLR)是一类蛋白质总称,其可作为病原体识别受体,通过激活参与入侵病原体的细胞内免疫监视[25]。NLR蛋白家族可以根据不同的氨基末端效应域进一步分为几个亚家族。在N端含有pyrin结构域(PYD)的蛋白质称为NLR家族pyrin结构域(NLRP)蛋白质,NLR的几个成员,特别是NLRP1和NLRP3,能够形成称为炎性小体的胞质寡聚信号平台,以介导对病原体,损伤和应激的免疫反应[26]。最近的证据表明,NLRP9还能够在肠道中启动炎症小体的形成,以限制RV感染带来的复制和损害[27]。近期一项实验通过使用新生未哺乳仔猪空肠中上皮中分离出的IPEC-J2细胞系,发现SB通过激活受体GPR109A介导的AMPK-Nrf2信号通路,减少RV感染引起的氧化应激,恢复肠粘膜机械屏障功能[28]。

## 4. RV结构蛋白与非结构蛋白功能

反向遗传学(RG)允许从cDNA克隆中获得重组病毒,从而使产生的表型与基因型精确相关。此前获得重组病毒的成功率很低,但在2017年,建立了一个基于质粒的RV反向遗传学系统,该系统使用NBV FAST(融合相关小跨膜)蛋白,可以诱导大量合胞体的形成[29]。将编码RV基因的互补DNA(cDNA)与快速表达的质粒共转染,获得重组病毒。在这份报告之后,RV的反向遗传学方案得到了进一步改进,并为RV生物学研究做出了贡献。

#### (1) VP1和VP2

VP1和VP2分别由RV第1基因片段及第2基因片段编码,VP1是一种空心球形聚合酶,中央是保守的聚合酶区域,可能通过多种步骤发挥RNA聚合酶活性。VP2为病毒的核蛋白,能与病毒核酸形成

RNA 蛋白产物,除在病毒核心锚定 VP1 外,VP2 也是促进 VP1 开始合成双链 RNA 的一个必需辅因子[30]。最近发现,VP1 的 RNA 复制受内衣壳层蛋白 VP2 调控,Steger 等人研究确定了 VP1-VP2 相互作用所需的几个关键区域/残基[31]。并且发现含有 VP1、VP2 和 VP6 的双层病毒样颗粒(VLP)的形成确定了 VP1 和 VP2 暴露部位之间的直接接触。VP1 接触位点的丙氨酸突变表明,3 个位点的突变导致体外 dsRNA 合成减少[32]。

#### (2) VP3

VP3 和 VP1 与 11 个 dsRNA 片段一起被包裹在 RV 颗粒的核心中,RV 颗粒被由四种结构蛋白(VP2、VP6、VP7 和 VP4)形成的三个同心二十面体衣壳层包围。尽管构成多层衣壳的 RV 蛋白的结构和 VP1 的结构被很好地定义,但 VP3 的结构仍然不清楚。最近获得了 VP3 的低温电磁结构,通过冷冻电镜、X 射线晶体学和生化分析,发现 VP3 形成了一个稳定的四聚体组装体,每个亚基都有一个模块化的结构域组织,负责转录后(+)SSRNA 封顶的不同步骤;确定了鸟苷酰转移酶和甲基转移酶、RNA 三磷酸酶和解旋酶活性的结构元件,提出 RNA 三磷酸酶是启动转录产物封盖所必需的,RNA 解旋酶可能是分离内源性转录过程中短暂形成的 RNA 双链所必需的等相关观念[33]。Song, Y 等人发现了宿主干扰素诱导的 2'-5'-寡腺苷酸合成酶(OAS)和核糖核酸酶 L (RNase L)途径有效抑制异源 RV 毒株复制的证据[34],来自同源 RV 的 VP3 依赖于其 2'-5'-磷酸二酯酶(PDE)结构域来抵消 RNase L 介导的抗病毒信号传导,揭示了 VP3 磷酸二酯酶活性在抑制 RNase L 信号转导和促进肠道病毒在体内复制中的作用。最近一项实验补充发现,VP3 通过在病毒复制过程中诱导线粒体抗病毒信号(MAVS)蛋白降解来抑制干扰素表达[35]。

#### (3) VP4

VP4 是一种非糖基化蛋白,由第 4 基因片段编码。VP4 在成熟病毒颗粒表面呈钉突样结构,是病毒的受体结合蛋白。经胰酶作用可裂解为 VP5\*和 VP8\*两个片段,在细胞吸附和穿透中具有重要作用,使病毒具有致病性。粪口病原体在复制和传播过程中在肠道中遇到组成型表达的肠道  $\alpha$ -防御素, $\alpha$ -防御素则具有有效的抗病毒作用。最近发现 VP4 与  $\alpha$ -防御素之间的相关作用可调控 RV 感染[36],VP4 作为 RV 附着和膜穿透蛋白,可以决定  $\alpha$ -防御素对 RV 感染的中和活性。尽管还没有正式排除决定感染结果的  $\alpha$ -防御素活性的细胞靶点,但其研究强烈表明  $\alpha$ -防御素与病毒而非细胞的结合至关重要。这种机制也与其他人为广泛的非包膜病毒确定的防御素依赖机制一致[37]。从机制上讲, $\alpha$ -防御素可以直接与 VP4 竞争受体结合,并且通过研究来自多个物种的防御素对不同 RV 株的感染性的影响,发现一些 RV 感染可以被防御素抑制。另外,也有研究表明[38],VP4 在裂解为 VP5\*后,发现其 385 和 393 位的氨基酸发生替换(D385N, D393H),这些 D $\rightarrow$ N 和 D $\rightarrow$ H 的替换代表了从带负电(天冬氨酸)到不带负电荷(天冬酰胺(极性不带电)/组氨酸(带部分正电荷))氨基酸的根本性变化,可能导致该表位的构象变化,最终对 RV 产生抑制。其实验数据表明 VP4 疏水区域可能在 RV 衰减中发挥重要作用,AA385 和 AA393 可能是使用反向遗传学和位点特异性诱变开发 RV 疫苗的潜在靶点。

#### (4) VP6

RV 是一种三层颗粒,大量证据表明,针对中间衣壳层 VP6 蛋白的抗体在预防 RV 感染方面起着关键作用。VP6 仅在三层病毒颗粒进入细胞且含有 VP4 和 VP7 的外层未被包覆以释放双层颗粒(DLP)后暴露[39]。这强烈表明靶向 VP6 的抗体在细胞内起作用。虽然多聚免疫球蛋白受体(PIGR)转胞系统已被提出抗 VP6 IgAs,但 VP6 特异性 IgG 介导保护的机制尚不清楚。最近有一项实验研究[40],发现 VP6 特异性抗体利用多种机制阻断 RV 复制,如先前大量研究所示的 DLP 孔的阻断,以及 TRIM21 (一种胞质抗病毒蛋白)介导的亚病毒颗粒的蛋白酶体降解。通过将这种方法扩展到小鼠模型中的体内感染,表明 IgG 在保护中起着重要作用。

### (5) VP7

VP7 是一种钙离子结合的糖基化蛋白, 与 VP4 和 NSP4 形成多聚体, 在病毒核心出芽时装配到病毒表面。既往发现 VP7 的表达缺失不影响其他病毒蛋白的表达或分布, 但是病毒颗粒的成熟却依赖 VP7 的表达[41]。这可能是因为 VP7 能通过与 VP4 相互作用而影响 VP4 与细胞受体的结合效率, 从而影响 RV 的复制效率。作为病毒的主要中和抗原, VP7 同 VP4 一样已被深入研究, 因为 RV 流行株具有多样性且动态变化, 所以长期监测 RV 流行株基因型特征及演化分析, 为 RV 疫苗研制应用提供动态信息, 为腹泻防治提供背景资料是极其重要的。

### (6) NSP1

NSP1 作为 RV 非结构蛋白, 已被鉴定为干扰素(IFN)拮抗剂, 具有几种不同的机制, 可增强病毒复制[42]。来自许多动物 RV 毒株的 NSP1 结合并促进干扰素调节因子 3 (IRF3)的蛋白酶体降解来逃避宿主免疫, NSP1 还识别并降解 IRF5、IRF7 和 IRF9, 此外, NSP1 可以直接靶向信号转导子和转录激活子 1(STAT1)磷酸化和/或易位到细胞核中, 以进一步阻断 IFN 扩增途径[43]。以上所有这些研究都已证实 NSP1 是宿主 IFN 应答的有效抑制剂, 以促进 RV 复制。近年来, Gennaro Iaconis 等人研究发现[44], NSP1 蛋白在几种人和动物 RV 株中拮抗 III 型和 I 型干扰素诱导, 同时还发现所有 NSP1 蛋白都是比 IRF-3 或 IRF-7 更有效的 IRF-1 抑制剂。Rahul Bhowmick 等人的研究发现 NSP1 通过靶向肿瘤抑制蛋白 p53 调控细胞凋亡机制, NSP1 与 p53 的 DNA 结合域相互作用, 导致 p53 的泛素化和蛋白酶体降解[45]。总体结果突出了 NSP1 进化的多种策略来对抗宿主免疫反应。

### (7) NSP2

病毒质组装需要 NSP2 和 NSP5, 任一蛋白质的抑制都会阻止病毒质的形成, 并显著降低感染性病毒的产量。Geiger 等人提出, 通过液-液相分离发生病毒质体组装, 其中 RNA 结合蛋白 NSP2 和内在无序的 NSP5 蛋白形成蛋白质 RNA 浓缩物[46]。之前的研究发现, NSP2 蛋白以两种结构上不同的形式存在: 作为细胞质分散形式(dNSP2)和病毒浆定位形式(vNSP2), 通过构象特异性单克隆抗体进行区分[47]。值得注意的是, dNSP2 和 vNSP2 分别与低磷酸化和高磷酸化的 NSP5 有差异地相互作用, 这导致发现了调节病毒浆组装的协调磷酸化依赖机制[48]。Jeanette M. Criglar 等人的研究, 显示了 RV NSP2 和脂滴相关蛋白磷酸化脂滴包被蛋白 1 的早期相互作用, 并可以初步确定 RV 诱导的脂滴形成的部分机制[49]。近期一项研究发现, NSP2 的 C 末端区域(CTR; 残基 291-317)是灵活的, 其能够参与结构域交换相互作用, 从而促进八聚体间的反应并可能促进病毒质形成[50]。

### (8) NSP4

非结构蛋白 4 (NSP4)是最早发现的病毒肠毒素, 也是 RV 的主要毒力因子, 负责肠细胞溶解、吸收不良、分泌性和渗透性腹泻, 已被证明是 RV 疫苗的靶点[51]。此外, NSP4 是病原体相关分子模式的一个组成部分, 可增强促炎细胞因子的分泌, 可能作为免疫刺激分子, 改善宿主对共免疫蛋白抗原的免疫反应[52]。最近, 一项研究证明了 NSP4 作为抗原, 它可以在 RV SA11 株诱导的腹泻小鼠模型中产生有效的保护作用, 特别是当与 VP8\*协同作用时, 可能阻断肠道毒素对肠壁的侵袭[53]。Mahmoud Soliman 等人的研究发现 RV 及其 NSP4 蛋白可以通过激活受体相互作用蛋白激酶 1 (RIPK1)/受体相互作用蛋白激酶 3 (RIPK3)/混合谱系激酶结构域样蛋白(MLKL)坏死性凋亡途径诱导培养细胞的坏死性凋亡[54]。而另一项研究则通过细胞及小鼠实验[55], 发现若去除 NSP4 的两个保守 N-糖基化位点, 则病毒复制将明显减弱, 提示此 N-糖基化在病毒致病性中同样发挥着至关重要的作用。

### (9) NSP5

NSP5 由基因组片段 11 编码, 是一种磷酸化的富含丝氨酸和苏氨酸的蛋白质(占总氨基酸的 25%),

通常以二聚体的形式出现[56]。在 NSP4 介导的  $\text{Ca}^{2+}$  调控下, 富含丝氨酸和苏氨酸的 NSP5 在低磷酸化和高磷酸化同种型之间转换[57]。通过与 NSP2 的相互作用, NSP5 参与病毒质的形成, 并在 RV 复制中发挥关键作用。Yan Zhou 等人的实验发现, miR-7 通过下调 RV NSP5 的表达而影响病毒质的形成并抑制 RV 的复制[58]。最近 Papa 等人的研究揭示了 RV 基因组可以用 CRISPR-CAS 系统在病毒质体中编辑, 病毒工厂以融合到 NSP5 蛋白的 CRISPR-CAS I 型 RNA 核酸内切酶 CAS6F (也称为 CSY4) 为靶向, 这一发现进一步支持了最近对病毒质代表 NSP5 和 NSP2 复制浓缩物的认识[59]。Rakesh Sarkar 等的一项研究表明[60], RV NSP5 与上移蛋白 1 (UPF1 是无义介导的 mRNA 衰变途径的主要介质) 结合并促进其依赖蛋白酶体的降解, 以此促进感染, UPF1 的异位表达导致病毒蛋白和病毒 RNA 的表达减少, 从而减少了具有感染性的 RV 颗粒的产生。其首先证明了 NMD 途径在 RV 感染中的抗病毒作用, 而后揭示了 RV 压倒 NMD 途径以建立成功复制的潜在机制。

#### (10) NSP6

NSP6 是一种 12kDa 蛋白质, 具有高度保守的 N 端序列。最近的研究揭示了 NSP6 的一些性质, 发现 NSP6 与 NSP2 和 NSP5 一起积聚在称为病毒质的细胞质内含物中[61]。NSP6 直接与 NSP2 和 NSP5 结合, 并与 RV A 基因组单链 RNA 和 dsRNA 结合, 与核苷酸序列无关[62]。因此, 有人提出 NSP6 可能将病毒质粒与线粒体连接起来, 为病毒复制提供能量[63], 并可能抑制 RNA 激活的先天细胞免疫应答。在之前的研究[64]中, 发现通过反向遗传学从猴 SA11-L2 病毒制备的重组 NSP6-缺陷型 RV a (rSA11-delNSP6 病毒) 在细胞培养中生长良好, 尽管其生长不如重组亲本毒株 SA11-L2 (rSA11-L2 病毒) 丰富。在 Saori Fukuda 等人最近的研究中, 通过使用反向遗传学制备的重组 NSP6 缺陷病毒, 发现感染 NSP6 缺陷病毒的乳鼠明显出现腹泻, 尽管症状较轻, 腹泻持续时间也比感染真正 SA11-L2 毒株的小鼠短[65]。直接评估了 NSP6 对乳鼠腹泻的必要性, 因此, 结合先前的研究结果, 可以得出结论, NSP6 不一定是体外和体内复制和致病所必需的。

## 5. 结语

目前, 主要的方法学成就使轮状病毒研究领域取得了一系列的成绩, 关于轮状病毒感染机制的研究虽已取得了一定进展, 但是还有许多待更深入的研究, 如 RV 感染与宿主先天免疫的对抗, RV 特异蛋白与多种细胞化学物质的相互作用, 颗粒成熟过程中 DLPS 周围瞬态包络形成的影响因素等。进一步研究 RV 引起的先天免疫反应及其编码的蛋白在疾病发展过程中的作用, 为系统揭示轮状病毒感染机理、未来疫苗发展、有效防治轮状病毒感染提供新的思路。

## 参考文献

- [1] Lanata, C.F., Fischer-Walker, C.L., Olascoaga, A.C., Torres, C.X., Aryee, M.J., *et al.* (2013) Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children, 5 Years of Age: A Systematic Review. *PLOS ONE*, **8**, e72788. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072788>
- [2] Introduction of Rotavirus Vaccine. [https://immunizationdata.who.int/pages/vaccine-intro-by-antigen/rotavirus.html?ISO\\_3\\_CODE=&YEAR=](https://immunizationdata.who.int/pages/vaccine-intro-by-antigen/rotavirus.html?ISO_3_CODE=&YEAR=)
- [3] Greenberg, H.B. and Estes, M.K. (2009) Rotaviruses: From Pathogenesis to Vaccination. *Gastroenterology*, **136**, 1939-1951. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.02.076>
- [4] Arias, C.F., Silva-Ayala, D. and López, S. (2015) Rotavirus Entry: A Deep Journey into the Cell with Several Exits. *Journal of Virology*, **89**, 890-893. <https://doi.org/10.1128/JVI.01787-14>
- [5] López, S. and Arias, C.F. (2004) Multistep Entry of Rotavirus into Cells: A Versaillesque Dance. *Trends in Microbiology*, **12**, 271-278. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.04.003>
- [6] Sánchez-San Martín, C., López, T., Arias, C.F. and López, S. (2004) Characterization of Rotavirus Cell Entry. *Journal of Virology*, **78**, 2310-2318. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.5.2310-2318.2004>

- [7] Dórá, R., László, B., Martella, V., Leshem, E., Gentsch, J., *et al.* (2014) Review of Global Rotavirus Strain Prevalence Data from Six Years Post Vaccine Licensure Surveillance: Is There Evidence of Strain Selection from Vaccine Pressure? *Infection, Genetics and Evolution*, **28**, 446-461. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.08.017>
- [8] Sen, A. and Greenberg, H.B. (2016) Innate Immune Responses Torotavirus Infection. In: Svensson, L. *et al.*, *Eds.*, *Viral Gastroenteritis*, Academic Press, Cambridge, MA, 243-263. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802241-2.00012-2>
- [9] Bishop, R.F., Davidson, G.P., Holmes, I.H. and Ruck, B.J. (1973) Virus Particles in Epithelial Cells of Duodenal Mucosa from Children with Viral Gastroenteritis. *The Lancet*, **302**, 1281-1283. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(73\)92867-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(73)92867-5)
- [10] Liu, Z., Smith, H., *et al.* (2023) Rotavirus-Mediated DGAT1 Degradation: A Pathophysiological Mechanism of Viral-Induced Malabsorptive Diarrhea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **120**, e2302161120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2302161120>
- [11] Hagbom, M., Sharma, S., Lundgren, O. and Svensson, L., (2012) Towards a Human Rotavirus Disease Model. *Current Opinion in Virology*, **2**, 408-418. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.05.006>
- [12] Ousingsawat, J., *et al.* (2011) Rotavirus Toxin NSP4 Induces Diarrhea by Activation of TMEM16A and Inhibition of Na<sup>+</sup> Absorption. *Pflügers Archiv*, **461**, 579-589. <https://doi.org/10.1007/s00424-011-0947-0>
- [13] Viskovska, M., Anish, R., Hu, L., *et al.* (2014) Probing the Sites of Interactions of Rotaviral Proteins Involved in Replication. *Journal of Virology*, **88**, 12866-12881. <https://doi.org/10.1128/JVI.02251-14>
- [14] Ingle, H., Peterson, S. and Baldrige, M. (2018) Distinct Effects of Type I and III Interferons on Enteric Viruses. *Viruses*, **10**, Article 46. <https://doi.org/10.3390/v10010046>
- [15] Chen, S., Li, P., Wang, Y., Yin, Y., *et al.* (2020) Rotavirus Infection and Cytopathogenesis in Human Biliary Organoids Potentially Recapitulate Biliary Atresia Development. *mBio*, **11**, e1000280. <https://doi.org/10.1128/mBio.01968-20>
- [16] Neil, J.A., Matsuzawa-Ishimoto, Y., Kernbauer-Hözl, E., *et al.* (2019) IFN-I and IL-22 Mediate Protective Effects of Intestinal Viral Infection. *Nature Microbiology*, **4**, 1737-1749. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0470-1>
- [17] Pervolaraki, K., Rastgou Talemi, S., Albrecht, D., Bormann, F., *et al.* (2018) Differential Induction of Interferon Stimulated Genes between Type I and Type III Interferons Is Independent of Interferon Receptor Abundance. *PLOS Pathogens*, **14**, e1007420. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007420>
- [18] Nolan, L.S. and Baldrige, M.T. (2022) Advances in Understanding Interferon-Mediated Immune Responses to Enteric Viruses in Intestinal Organoids. *Frontiers in Immunology*, **13**, Article 943334. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.943334>
- [19] Doldan, P., Dai, J., Metz-Zumaran, C., Patton, J.T., *et al.* (2022) Type III and Not Type I Interferons Efficiently Prevent the Spread of Rotavirus in Human Intestinal Epithelial Cells. *Journal of Virology*, **96**, e0070622. <https://doi.org/10.1128/jvi.00706-22>
- [20] Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.K., *et al.* (2005) Identification and Characterization of MAVS, a Mitochondrial Antiviral Signaling Protein That Activates NF-KappaB and IRF3. *Cell*, **122**, 669-682. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.012>
- [21] Li, Y., Yu, P., *et al.* (2020) MDA5 against Enteric Viruses through Induction of Interferon-Like Response Partially via the JAK-STAT Cascade. *Antiviral Research*, **176**, Article 104743. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104743>
- [22] Roundtree, I.A., Evans, M.E., Pan, T. and He, C. (2017) Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation. *Cell*, **169**, 1187-1200. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.045>
- [23] Wang, A., Tao, W., *et al.* (2022) M6A Modifications Regulate Intestinal Immunity and Rotavirus Infection. *eLife*, **11**, e73628. <https://doi.org/10.7554/eLife.73628>
- [24] Pang, Z., *et al.* (2022) Interferon-Inducible Transmembrane Protein 3 (IFITM3) Restricts Rotavirus Infection. *Viruses*, **14**, Article 2407. <https://doi.org/10.3390/v14112407>
- [25] Xue, Y., Enosi, T.D., Tan, W.H., Kay, C. and Man, S.M. (2019) Emerging Activators and Regulators of Inflammasomes and Pyroptosis. *Trends in Immunology*, **40**, 1035-1052. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.09.005>
- [26] Lamkanfi, M. and Dixit, V.M. (2012) Inflammasomes and Their Roles in Health and Disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **28**, 137-161. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155745>
- [27] Mullins, B. and Chen, J. (2020) NLRP9 in Innate Immunity and Inflammation. *Immunology*, **162**, 262-267. <https://doi.org/10.1111/imm.13290>
- [28] Dong, X., Wang, Y., *et al.* (2023) Sodium Butyrate Protects against Rotavirus-Induced Intestinal Epithelial Barrier Damage by Activating AMPK-Nrf2 Signaling Pathway in IPEC-J2 Cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, **228**, 186-196. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.12.219>
- [29] Kanai, Y., Komoto, S., Kawagishi, T., Nouda, R., Nagasawa, N., *et al.* (2017) Entirely Plasmid-Based Reverse Genetics System for Rotaviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **114**,

- 2349-2354. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618424114>
- [30] McDonald, S.M. and Patton, J.T. (2011) Rotavirus VP2 Core Shell Regions Critical for Viral Polymerase Activation. *Journal of Virology*, **85**, 3095-3105. <https://doi.org/10.1128/JVI.02360-10>
- [31] Steger, C.L., Boudreaux, C.E., LaConte, L.E., *et al.* (2019) Group A Rotavirus VP1 Polymerase and VP2 Core Shell Proteins: Intergenotypic Sequence Variation and *in Vitro* Functional Compatibility. *Journal of Virology*, **93**, e01642-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01642-18>
- [32] Steger, C.L., Brown, M.L., Sullivan, O.M., *et al.* (2019) *In Vitro* Double-Stranded RNA Synthesis by Rotavirus Polymerase Mutants with Lesions at Core Shell Contact Sites. *Journal of Virology*, **93**, e01049-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.01049-19>
- [33] Kumar, D., Yu, X., Crawford, S.E., *et al.* (2020) 2.7 Å Cryo-EM Structure of Rotavirus Core Protein VP3, a Unique Capping Machine with a Helicase Activity. *Science Advances*, **6**, eaay6410. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay6410>
- [34] Song, Y., *et al.* (2020) Reverse Genetics Reveals a Role of the Rotavirus VP3 Phosphodiesterase Activity in Inhibiting RNase L Signaling and Contributing to Intestinal Viral Replication *in Vivo*. *Journal of Virology*, **94**, e01952-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.01952-19>
- [35] Dai, J., Agbemabiese, C.A., Griffin, A.N. and Patton, J.T. (2023) Rotavirus Capping Enzyme VP3 Inhibits Interferon Expression by Inducing MAVS Degradation during Viral Replication. *mBio*, **14**, e0225523. <https://doi.org/10.1128/mbio.02255-23>
- [36] Hu, C.T., Diaz, K., Yang, L.C., Sharma, A., *et al.* (2022) VP4 Is a Determinant of Alpha-Defensin Modulation of Rotaviral Infection. *Journal of Virology*, **96**, e0205321. <https://doi.org/10.1128/jvi.02053-21>
- [37] Holly, M.K., Diaz, K. and Smith, J.G. (2017) Defensins in Viral Infection and Pathogenesis. *Annual Review of Virology*, **4**, 369-391. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-041734>
- [38] Yu, S.G., *et al.* (2020) Amino Acid Substitutions in Positions 385 and 393 of the Hydrophobic Region of VP4 May Be Associated with Rotavirus Attenuation and Cell Culture Adaptation. *Viruses*, **12**, Article 408. <https://doi.org/10.3390/v12040408>
- [39] Estes, M. and Greenberg, H. (2013) Rotaviruses. In: *Fields Virology*, 6th Edition, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1347-1401.
- [40] Buttafuoco, A., Michaelsen, K., Tobler, K., Ackermann, M., *et al.* (2020) Conserved Rotavirus NSP5 and VP2 Domains Interact and Affect Viroplasm. *Journal of Virology*, **94**, 01965-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.01965-19>
- [41] Lopez, T., Camacho, M., Zayas, M., *et al.* (2005) Silencing the Morphogenesis of Rotavirus. *Journal of Virology*, **79**, 184-192. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.1.184-192.2005>
- [42] Sen, A., Rott, L., Phan, N., *et al.* (2014) Rotavirus NSP1 Protein Inhibits Interferon-Mediated STAT1 Activation. *Journal of Virology*, **88**, 41-53. <https://doi.org/10.1128/JVI.01501-13>
- [43] Holloway, G., Dang, V.T., Jans, D.A. and Coulson, B.S. (2014) Rotavirus Inhibits IFN-Induced STAT Nuclear Translocation by a Mechanism That Acts after STAT Binding to Importin- $\alpha$ . *Journal of General Virology*, **95**, 1723-1733. <https://doi.org/10.1099/vir.0.064063-0>
- [44] Iaconis, G., Jackson, B., Childs, K., Boyce, M., *et al.* (2021) Rotavirus NSP1 Inhibits Type I and Type III Interferon Induction. *Viruses*, **13**, Article 589. <https://doi.org/10.3390/v13040589>
- [45] Bhowmick, R., Halder, U.C., Chattopadhyay, S., *et al.* (2013) Rotavirus-Encoded Nonstructural Protein 1 Modulates Cellular Apoptotic Machinery by Targeting Tumor Suppressor Protein P53. *Journal of Virology*, **87**, 6840-6850. <https://doi.org/10.1128/JVI.00734-13>
- [46] Geiger, F., Acker, J., *et al.* (2021) Liquid-Liquid Phase Separation Underpins the Formation of Replication Factories in Rotaviruses. *The EMBO Journal*, **40**, e107711. <https://doi.org/10.15252/embj.2021107711>
- [47] Criglar, J.M., Hu, L., Crawford, S.E., Hyser, J.M., *et al.* (2014) A Novel Form of Rotavirus NSP2 and Phosphorylation-Dependent NSP2-NSP5 Interactions Are Associated with Viroplasm Assembly. *Journal of Virology*, **88**, 786-798. <https://doi.org/10.1128/JVI.03022-13>
- [48] Criglar, J.M., Crawford, S.E., Zhao, B., Smith, H.G., Stossi, F. and Estes, M.K. (2020) A Genetically Engineered Rotavirus NSP2 Phosphorylation Mutant Impaired in Viroplasm Formation and Replication Shows an Early Interaction between VNSP2 and Cellular Lipid Droplets. *Journal of Virology*, **94**, e00972-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00972-20>
- [49] Criglar, J.M., *et al.* (2022) Rotavirus-Induced Lipid Droplet Biogenesis Is Critical for Virus Replication. *Frontiers in Physiology*, **13**, Article 836870. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.836870>
- [50] Nichols, S.L., Nilsson, E.M., *et al.* (2023) Flexibility of the Rotavirus NSP2 C-Terminal Region Supports Factory Formation via Liquid-Liquid Phase Separation. *Journal of Virology*, **97**, e0003923. <https://doi.org/10.1128/jvi.00039-23>



- [51] Liu, C., Huang, P., Zhao, D., *et al.* (2021) Effects of Rotavirus NSP4 Protein on the Immune Response and Protection of the S<sub>R69A</sub>-VP8\* Nanoparticle Rotavirus Vaccine. *Vaccine*, **39**, 263-271. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.12.005>
- [52] Afchangi, A., Arashkia, A., Shahosseini, Z., *et al.* (2018) Immunization of Mice by Rotavirus NSP4-VP6 Fusion Protein Elicited Stronger Responses Compared to VP6 Alone. *Viral Immunology*, **31**, 233-241. <https://doi.org/10.1089/vim.2017.0075>
- [53] Cao, H., Wu, J., Luan, N., Wang, Y., Lin, K. and Liu, C. (2022) Evaluation of a Bivalent Recombinant Vaccine Candidate Targeting Norovirus and Rotavirus: Antibodies to Rotavirus NSP4 Exert Antidiarrheal Effects without Virus Neutralization. *Journal of Medical Virology*, **94**, 3847-3856. <https://doi.org/10.1002/jmv.27809>
- [54] Mahmoud, S., *et al.* (2022) Opposite Effects of Apoptotic and Necroptotic Cellular Pathways on Rotavirus Replication. *Journal of Virology*, **96**, e0122221. <https://doi.org/10.1128/JVI.01222-21>
- [55] Nurdin, J.A., Kotaki, T., *et al.* (2023) N-Glycosylation of Rotavirus NSP4 Protein Affects Viral Replication and Pathogenesis. *Journal of Virology*, **97**, e0186122. <https://doi.org/10.1128/jvi.01861-22>
- [56] Martin, D., Ouldali, M., Menetrey, J. and Poncet, D. (2011) Structural Organisation of the Rotavirus Nonstructural Protein NSP5. *Journal of Molecular Biology*, **413**, 209-221. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.08.008>
- [57] Sotelo, P.H., Schumann, M., Krause, E. and Chnaiderman, J. (2010) Analysis of Rotavirus Non-Structural Protein NSP5 by Mass Spectrometry Reveals a Complex Phosphorylation Pattern. *Virus Research*, **149**, 104-108. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.12.006>
- [58] Yan, Z., *et al.* (2020) MicroRNA-7 Inhibits Rotavirus Replication by Targeting Viral NSP5 *in Vivo* and *in Vitro*. *Viruses*, **12**, Article 209. <https://doi.org/10.3390/v12020209>
- [59] Papa, G., *et al.* (2020) CRISPR-Csy4-Mediated Editing of Rotavirus Double-Stranded RNA Genome. *Cell Reports*, **32**, Article 108205. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108205>
- [60] Sarkar, R., *et al.* (2021) Rotaviral Nonstructural Protein 5 (NSP5) Promotes Proteasomal Degradation of Up-Frame-shift Protein 1 (UPF1), a Principal Mediator of Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD) Pathway, to Facilitate Infection. *Cellular Signalling*, **89**, Article 110180. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110180>
- [61] Papa, G., Borodavka, A. and Desselberger, U. (2021) Viroplasm: Assembly and Functions of Rotavirus Replication Factories. *Viruses*, **13**, Article 1349. <https://doi.org/10.3390/v13071349>
- [62] Rainsford, E.W. and McCrae, M.A. (2007) Characterization of the NSP6 Protein Product of Rotavirus Gene 11. *Virus Research*, **130**, 193-201. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.06.011>
- [63] Holloway, G., Johnson, R.I., Kang, Y., Dang, V.T., *et al.* (2015) Rotavirus NSP6 Localizes to Mitochondria via a Predicted N-Terminalhelix. *Journal of General Virology*, **96**, 3519-3524. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000294>
- [64] Komoto, S., Kanai, Y., Fukuda, S., Kugita, M., Kawagishi, T., *et al.* (2017) Reverse Genetics System Demonstrates That Rotavirus Nonstructural Protein NSP6 Is Not Essential for Viral Replication in Cell Culture. *Journal of Virology*, **91**, e00695-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00695-17>
- [65] Fukuda, S., Kugita, M., Higashimoto, Y., Shiogama, K., Tsujikawa, H., Moriguchi, K., *et al.* (2022) Rotavirus Incapable of NSP6 Expression Can Cause Diarrhea in Suckling Mice. *Journal of General Virology*, **103**. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001745>