

ZNACZENIE AKTYWNOŚCI PROTEAZY KAPSYDOWEJ CP W ROZWOJU INFEKCJI ALFAWIRUSOWYCH

THE ROLE OF CAPSID PROTEASE CP ACTIVITY IN
THE DEVELOPMENT OF ALPHAVIRAL INFECTIONS


**Karolina Torzyk, Marcin Skoreński,
Marcin Sieńczyk***

*Katedra Chemii Organicznej i Medycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika
Wrocławska, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, Polska
e-mail: marcin.sienczyk@pwr.edu.pl

Abstract
Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń
Wprowadzenie
1. Alfawirusy
 1.1. Występowanie i objawy zakażenia
 1.2. Cykl replikacyjny
 1.3. Proteaza kapsydowa CP
2. Inhibitory proteazy kapsydowej
Uwagi końcowe
Piśmiennictwo cytowane


Mgr inż. Karolina Torzyk – doktorantka Katedry Chemii Organicznej i Medycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Od 2013 roku związana jest z Politechniką Wrocławską, gdzie w 2018 roku zdobyła tytuł magistra biotechnologii oraz rozpoczęła studia doktoranckie pod opieką dr hab. inż. Marcina Sieńczyka, prof. uczelni. Uczestniczka projektu „BioTechNan”, realizuje interdyscyplinarny doktorat, którego badania skupiają się na projektowaniu oraz syntezie inhibitorów proteazy kapsydowej CP wirusa O’nyong-nyong.



 <https://orcid.org/0000-0003-3432-2529>


Dr inż. Marcin Skoreński – pracownik Katedry Chemii Organicznej i Medycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. W 2016 roku obronił pracę doktorską pt. „Synteza estrów kwasów 1-aminoalkilofosfonowych jako inhibitorów wirusowych proteaz serynowych”, którą realizował pod opieką prof. Józefa Oleksyszyna w Zakładzie Chemii Medycznej i Mikrobiologii Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Obecnie zajmuje się projektowaniem oraz syntezą inhibitorów proteazy kapsydowej CP wirusa O’nyong-nyong.



 <https://orcid.org/0000-0001-8578-8957>

Dr hab. inż. Marcin Sieńczyk, prof. uczelni – Kierownik Katedry Chemii Organicznej i Medycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Badania kierowane przez prof. Sieńczyka obejmują projektowanie i syntezę związków biologicznie aktywnych, projektowanie nowych narzędzi diagnostycznych oraz projektowanie czynników hamujących replikację wirusów.



 <https://orcid.org/0000-0002-5528-5264>

ABSTRACT

Alphaviruses belong to the worldwide distributed *Togaviridae* family and *Alphavirus* genus. They are spherical, enveloped, single-stranded RNA arthropod-borne viruses. Alphaviruses are mostly transmitted by mosquitoes (*Aedes spp.* and *Anopheles spp.*) and are geographically distributed in restricted areas where appropriate vectors are present (**Fig.1.**). The most recognized members of this genus are Sindbis (SINV), Semliki Forest (SFV), Venezuelan equine encephalitis (VEEV), Ross River (RRV), and Chikungunya (CHIKV) viruses. Alphaviruses are infection agents for humans and many animals. Clinically, most human infections with arthritogenic alphaviruses are associated with symptoms such as fever, headache, joint pain, rash, chronic arthritis, and encephalitis. Major events during the alphaviral infection are virus entry, replication, assembly, and budding of new virions. Alphaviral RNA encodes four nonstructural and five structural proteins. Nonstructural proteins are mainly involved in the replication process and virus pathogenesis, while structural proteins form new virions. Both groups of viral proteins are produced as single polyproteins which undergo autoproteolytic maturation. This process is carried out by the two viral proteases, cysteine protease nsP4 and C protein serine protease (CP), and is considered to be critical for virus replication. The capsid protease CP is a chymotrypsin-like serine protease with the catalytic triad including His₁₄₅, Asp₁₆₇, and Ser₂₁₉. What is important, after a suicidal autoproteolytic event the side chain of Trp₂₆₇ remains bound in a hydrophobic S1 pocket thus inhibiting further trans-proteolytic activity. Alphaviral capsid protein undergoes a single proteolytic reaction before maturation and then, after self-inactivation, it assembles to form a viral capsid shell. Inhibitors of the capsid protease have significant antiviral activity. Compounds belonging to this group can be good candidates for new antiviral drugs.

Keywords: alphaviruses, arboviruses, serine proteases, capsid protease CP, inhibitors
Słowa kluczowe: alfawirusy, arbowirusy, proteazy serynowe, proteaza kapsydowa CP, inhibitory

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AVCP	– proteaza kapsydowa wirusa Aura
CHIKV	– wirus Chikungunya
CP	– proteaza kapsydowa
CVCP	– proteaza kapsydowa wirusa Chikungunya
EEEV	– wirus wschodniego końskiego zapalenia mózgu
MAYV	– wirus Mayaro
ONNV	– wirus O'nyong-nyong
RRV	– wirus rzeki Ross
SFV	– wirus Semliki Forest
SINV	– wirus Sindbis
VEEV	– wirus wenezuelskiego końskiego zapalenia mózgu
WEEV	– wirus zachodniego końskiego zapalenia mózgu

WPROWADZENIE

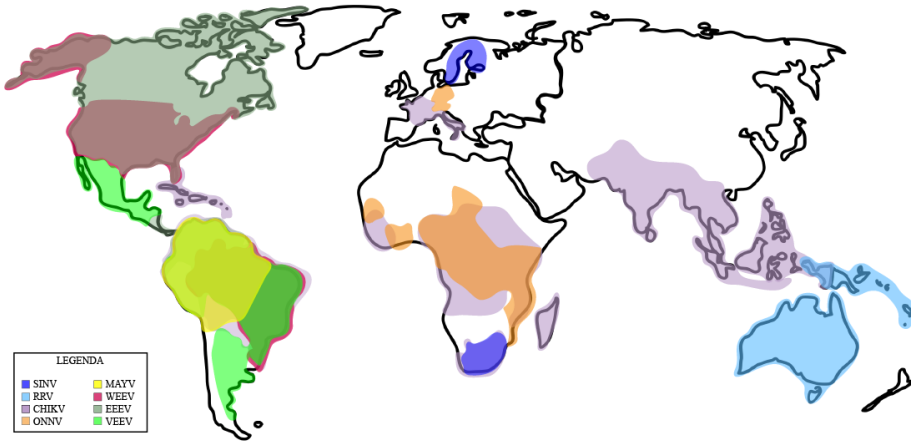
Wirusy należące do rodzaju *Alphavirus* rodziny *Togaviridae* to kuliste RNA-wirusy, otoczone nukleokapsydem i otoczką glikolipidową. Wywołują choroby obejmujące najczęściej gorączkę, wysypkę, zapalenie stawów oraz zapalenie mózgu. Są niebezpieczne zarówno dla ludzi jak i dla zwierząt, chociaż dla większości z nich człowiek stanowi żywiciela przypadkowego. Głównymi wektorami alfawirusów są komary z rodzaju *Aedes* oraz *Anopheles*, które występują na całym świecie, jednak największe zagęszczenie infekcji alfawirusowych obserwowane jest w rejonach klimatu tropikalnego i umiarkowanego. Chociaż alfawirusy znane są od dawna to nadal pozostają tematem wielu badań naukowych. Potwierdzają to najnowsze publikacje dotyczące tej grupy wirusów, opisujące poszukiwanie związków o charakterze przeciwwirusowym oraz opracowywanie szczepionek przeciwko infekcjom spowodowanym przez wirusy Chikungunya i O'nyong-nyong [1–6].

Proteazy serynowe pełnią kluczowe role w cyklach życiowych alfawirusów, umożliwiając utworzenie dojrzałych białek strukturalnych, niezbędnych do zbudowania nowych cząsteczek potomnych wirusa. Zahamowanie aktywności tych enzymów jest skutecznym sposobem kontrolowania rozwoju infekcji alfawirusowej na poziomie cyklu replikacyjnego, a związki o charakterze inhibitorów proteaz serynowych stanowią potencjalną grupę związków o właściwościach przeciwwirusowych.

1. ALFAWIRUSY

1.1. WYSTĘPOWANIE I OBJAWY ZAKAŻENIA

Rodzina *Togaviridae* obejmuje wirusy z rodzaju *Alphavirus*, oraz *Rubivirus*. Alfawirusy to arbowirusy przenoszone przez komary, w większości z rodzaju *Aedes*, *Anopheles* oraz *Culex spp.* i *Culiseta spp.* [7,8]. Do rodzaju *Alphavirus* należy ponad 40 przedstawicieli, są to m.in. wirus Sindbis (SINV), wirus Semliki Forest (SFV), wirus wenezuelskiego końskiego zapalenia mózgu (VEEV), wirus wschodniego końskiego zapalenia mózgu (EEEV), wirus zachodniego końskiego zapalenia mózgu (WEEV), wirus rzeki Ross (RRV), wirus Mayaro (MAYV), wirus Chikungunya (CHIKV) czy wirus O'nyong-nyong (ONNV). Chociaż rozmieszczenie alfawirusów jest mocno ograniczone do obszarów występowania ich wektorów, to wirusy z tego rodzaju rozprzestrzenione są na całym świecie (**Rys. 1.**) [8,9].



Rysunek 1. Miejsca występowania wybranych przedstawicieli z rodzaju Alphavirus [8,9]

Figure 1. Places of occurrence of selected viruses of the Alphavirus genus [8,9]

Do infekcji alfawirusowych może dojść podczas żerowania zainfekowanego komara na organizmie człowieka. W trakcie tego procesu z gruczołów ślinowych stawonoga do krwi żywiciela wraz ze śliną dostają się cząsteczki wirusa, jeśli ich miano we krwi jest wystarczająco wysokie, a proces pożywania trwa wystarczająco długo, dochodzi do zainfekowania organizmu gospodarza [10]. Zakażenia spowodowane przez alfawirusy mogą występować sporadycznie i dotyczyć kilku przypadków, lub rozrastać się do epidemii. Pierwsze objawy chorobowe pojawiają się zazwyczaj po upływie od kilku do około 14 dni od infekcji. Zakażenie początkowo może przyjąć postać samoograniczającej się kilkudniowej choroby, która w przebiegu przypomina przeziębienie z łagodnymi objawami, głównie grypopodobnymi m.in. wysoką gorączką, bólem głowy, mięśni czy stawów, dreszczami, nudnościami, a także wysypką. Ta łagodna forma może jednak rozwinąć się w ciężki lub długotrwały stan chorobowy z objawami charakterystycznymi dla infekcji wywołanych przez alfawirusy, takimi jak: zapalenie wielostawowe, artropatia, limfadenopatia, rozległa wysypka gruzdkowo-kostna, zapalenie mięśnia sercowego, objawy neurologiczne w tym zapalenie opon mózgowych, zapalenie mózgu i rdzenia. W większości przypadków ciężki przebieg choroby prowadzi do wielomiesięcznej terapii, zespołu astenii lub do nagłej śmierci [11–17].

Tabela 1. Porównanie charakterystycznych objawów klinicznych infekcji wywoływanych przez kilku przedstawicieli z rodzaju *Alphavirus*
 Table 1. Comparison of the characteristic clinical symptoms of infections caused by several representatives of the *Alphavirus* genus

	Czas inkubacji	Charakterystyczne objawy kliniczne
wirus Chikungunya [12,15,22,23]	2 – 12 dni	gorączka, ból mięśni, ból i obrzęk stawów, rozległa wysypka rumieniowa, obezwładniający ból stawów, zapalenie mózgu, encefalopatie, zapalenie mięśnia serowego, zapalenie wątroby
wirus Mayaro [7,12,13,19]	3 - 12 dni	ostre bóle stawów, ból mięśni, wysypka grudkowo-plamista, gorączka, ból głowy, dreszcze, obrzęk stawów, krwotoki, zapalenie mózgu
wirus O'nyong-nyong [7,24–27]	8 - 12 dni	gorączka, ból głowy, wysypka grudkowo-plamista, obezwładniający ból stawów, ostre długotrwałe zapalenie wielostawowe, limfadenopatia
wirus Ross River [14,20,21]	7 – 14 dni	gorączka, bóle głowy, mięśni i stawów, wysypka grudkowo-plamista, objawy reumatyczne, ciężkie długotrwałe zapalenie wielostawowe, chroniczne zmęczenie
wirus Sindbis [9,16–18]	2 - 10 dni	gorączka, bóle głowy i mięśni, zmęczenie, nudności, wysypka, bóle stawowe

Mało specyficzne objawy początkowej fazy infekcji przypominające klasyczne przeziębienie utrudniają diagnozę choroby wirusowej, dodatkowo większość infekcji wywołanych przez alfawirusy charakteryzuje się podobnymi objawami (**Tab. 1.**), co również może prowadzić do błędnego rozpoznania. Trudności diagnostyczne oraz łatwość przemieszczania się wektorów sprawiają, że infekcje wywoływane przez alfawirusy posiadają wysoki potencjał epidemiczny. W bardzo krótkim czasie mogą opanować ogromne obszary geograficzne i wywołać epidemie, co skutkuje milionami zakażeń oraz prowadzi do głębokiego kryzysu ekonomicznego. W dotychczasowej historii w ten sposób zapisały się już epidemie wywołane przez wirusy MAYV [19,28], SINV [18,29], RRV [20,21], CHIKV [30,31], ONNV [24,27].

1.1. CYKL REPLIKACYJNY

Genom alfawirusów stanowi pojedyncza dodatnio spolaryzowana nić RNA. Materiał genetyczny wspólnie z białkiem kapsydowym C tworzy rdzeń wirusa, który dodatkowo otoczony jest przez warstwę lipidową zbudowaną z powtarzających się sekwencji glikoprotein E1/E2/E3/6K [32,33]. Alfawirusowe RNA koduje cztery białka niestrukturalne (nsP1-P4), odpowiedzialne za przeprowadzanie procesów replikacyjnych, oraz pięć białek strukturalnych (C,E1,E2,E3,6K), zaangażowanych w budowanie nowych cząsteczek wirusa. Obie grupy białek produkowane są jako prekursorzy w postaci dwóch pojedynczych poliprotein, które w trakcie cyklu replikacyjnego ulegają krytycznemu procesowi autoproteolitycznego dojrzewania [34].

Cząsteczka wirusa po rozpoznaniu i związaniu się do odpowiedniego receptora błonowego wnika do komórki gospodarza na drodze endocytozy, jest to pierwszy etap infekcji. W powstałym endosomie, na skutek obniżenia pH, dochodzi do fuzji glikolipidowej otoczki wirusowej oraz błony endosomu, rozpadu nukleokapsydu i uwolnienia materiału genetycznego wirusa do cytoplazmy [35]. W wyniku translacji części wirusowego RNA powstaje poliproteina P1234, z której po autoproteolizie, przeprowadzanej przez proteazę cysteinową nsP2, uwolnione zostaje dojrzałe białko nsP4. Pozostała poliproteina P123 działa jako polimeraza podczas syntezy ss(-)RNA wirusa, które dalej staje się matrycą do syntezy subgenomowego ss(+)RNA. W dalszym etapie poliproteina P123 ulega ponownej autoproteolizie, co prowadzi do uwolnienia kolejnych białek niestrukturalnych nsP1, nsP2, nsP3 oraz utworzenia aktywnego kompleksu replikacyjnego [36]. Białka strukturalne wirusa powstają w analogiczny sposób po translacji subgenomowego ss(+)RNA jako pojedyncza poliproteina. Następnie po posttranslacyjnej autoproteolizie przeprowadzanej przez serynową proteazę kapsydową CP, uwolnione zostaje dojrzałe białko kapsydowe C, mogące budować nowe nukleokapsydy. Kolejne modyfikacje pozostałej poliproteiny w retikulum endoplazmatycznym i aparacie Golgiego prowadzą do uwolnienia ostatnich białek strukturalnych, które następnie są gotowe aby odtworzyć otoczkę glikolipidową wirusa [37].

Punktami krytycznymi cyklu replikacyjnego alfawirusów są miejsca autoproteolitycznego dojrzewania, zależne od aktywności cysteinowej proteazy nsP2 oraz serynowej proteazy kapsydowej CP.

1.3. PROTEAZA KAPSYDOWA CP

Proteaza kapsydowa wirusa Sindbis zbudowana jest z 264 reszt aminokwasowych, które tworzą trzy funkcjonalnie i strukturalnie odmienne regiony. Region pierwszy (reszty 1-80) dzięki obecności dużej liczby zasadowych aminokwasów uczestniczy w tworzeniu niespecyficznego oddziaływań z RNA wirusa oraz neutralizuje jego ładunek. Region drugi (reszty 81-113) odpowiada za specyficzne wiązanie się do wirusowego RNA, natomiast C-końcowy region trzeci (reszty 114-264) zawiera domenę proteazy oraz tworzy kapsomery [38,39]. Proteaza kapsydowa białka C to proteaza serynowa podobna do chymotrypsyny, posiadającą charakterystyczną sekwencję reszt Gly-Asp-Ser-Gly konserwatywną dla większości proteaz chymotrypsynopodobnych [40,41]. W swoim centrum aktywnym posiada klasyczną triadę katalityczną składającą się z reszt His₁₃₅, Asp₁₆₇ oraz Ser₂₁₉. Znaczącą różnicą w strukturze wirusowej proteazy jest występowanie dwóch nici β zamiast α -helisy na C-końcu. Taki układ struktur drugorzędowych jest niezbędny dla aktywności, ponieważ umożliwia zginanie łańcucha białkowego, dzięki czemu miejsce katalityczne enzymu uzyskuje dostęp do miejsca cięcia znajdującego się pomiędzy resztami Trp₂₆₇↓Ser₂₆₈. Po autoproteolizie łańcuch boczny reszty Trp₂₆₇ pozostaje związany w hydrofobowej kieszeni wiążącej S1, a nowo powstała C-końcowa grupa karboksylowa oddziałuje z atomem N^{ε2} reszty His₁₄₅ oraz atomem O^γ reszty Ser₂₁₉ tworząc wiązania wodorowe i powstrzymując w ten sposób dalszą aktywność trans-proteolityczną. Chociaż miejsce autoproteolitycznego cięcia jest konserwatywne u alfawirusów (CHIKV, SFV, SINV, EEEV, RRV) to elementem niezbędnym do przeprowadzenia katalizy jest wyłącznie obecność reszty Trp, reszta Ser nie jest wymagana [42]. Proteaza ulega autoinaktywacji. Z tego względu alfawirusowe białka kapsydowej ulegają tylko pojedynczej autoproteolizie podczas procesu dojrzewania, a następnie jako dojrzałe formy mogą tworzyć otoczkę kapsydową wirusa [43].

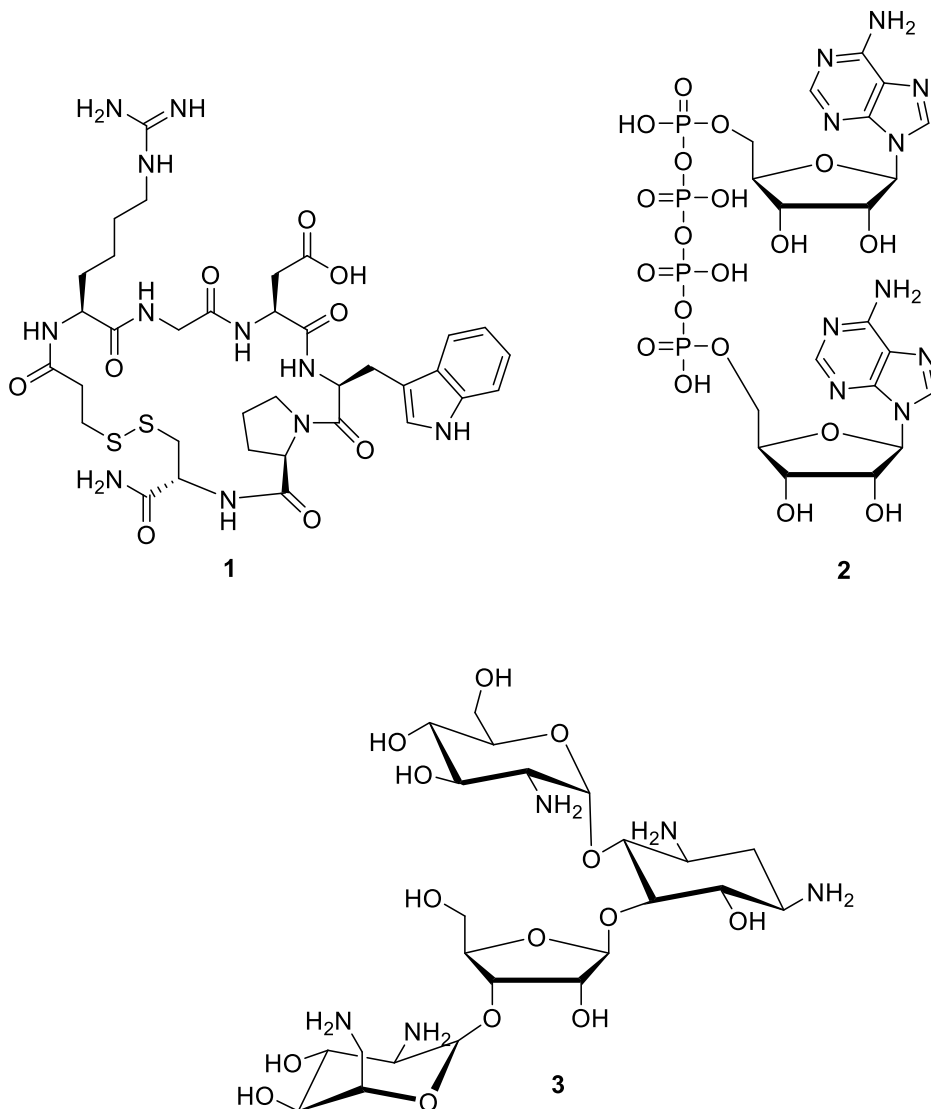
2. INHIBITORY PROTEAZY KAPSYDOWEJ

Pierwsze doniesienia o poszukiwaniu inhibitorów kapsydowej proteazy alfawirusów pochodzą z 2015 roku [44]. Aggarwal M et al. przedstawili wyniki, wysokosprawnych testów przesiewowych (*ang. high throughput screening*, HTS), w których wykorzystali wcześniej opracowaną metodę badania aktywności proteazy CP z użyciem fluorogenicznego substratu FRET [45]. Żadne z badanych, prostych analogów substratów proteazy CP (Glu-Trp; Glu-Trp-Ser; 3-acetylundol) nie wykazywały aktywności inhibitorowej. Dodatkowo, standardowe inhibitory proteaz

serynowych takie jak: fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF) czy keton chlorometylowy tosylo-*L*-fenyloalaniny (TPCK) nie wpływały na aktywność proteolityczną badanej proteazy CP z wirusa Chikungunya.

Dwa lata później ta sama grupa badawcza opublikowała badania w której przedstawia aktywność inhibitorowej małej cząsteczki - piperazyny względem proteazy CP wirusa Aura (AVCP) oraz Chikungunya (CVCP) [46]. Struktura krystaliczna proteazy AVCP z piperazyną wykazała iż cząsteczka organiczna wiąże się w tzw. kieszeni hydrofobowej białka. Reszty Met₁₃₅, Glu₁₃₆, Lys₁₃₈, Tyr₁₈₃, Trp₂₅₀ oraz Gly₂₅₄ tworzą oddziaływania hydrofobowe z cząsteczką piperazyny. Reszta Trp₂₅₀ odpowiedzialna jest za oddziaływania typu π - π z cząsteczką piperazyny. Dodatkowo reszta Asn₂₅₁ tworzy wiązanie wodorowe z cząsteczką wody, która z kolei tworzy kolejne wiązanie wodorowe z resztą NH piperazyny. Testy przeciwwirusowe - badanie oparte na immunofluorescencji oraz test „łysinkowy” wykazały przeciwwirusową aktywność piperazyny względem CHIKV. Należy zauważyć jednak, iż do osiągnięcia aktywności przeciwwirusowej konieczne było użycie wysokiego stężenia inhibitora. Stężenie równe 6 mM powodowało 98% inhibicji replikacji wirusa w komórkach. Wyniki tych badań skłaniają do poszukiwań nowych inhibitorów proteazy CP alfawirusów na bazie struktury piperazyny.

W 2020 roku Fatma et al. przeprowadzili wirtualne badania przesiewowe. Z biblioteki związków LOPAC (*Sigma Aldrich*) zidentyfikowali, trzy o potencjalnej aktywności względem proteazy CVCP: octan eptifibatydu (EAC, **1**), P1,P4-Di(adenozyno-5')tetrafosforan (AP4, **2**) oraz siarczan paromomycyny (PSU, **3**), (**Rys. 2.**) [1]. Badanie aktywności powyższych związków wykazały ich zdolność do hamowania aktywności proteolitycznej CVCP. Dodatkowo testy aktywności przeciwwirusowej wykazały zdolność do inhibicji replikacji wirusa Chikungunya. EAC, AP4 i PSU wykazały EC₅₀ równe odpowiednio: 4.01 μ M, 10.66 μ M oraz 22.91 μ M. Badania wykazały, że związki **1,2** oraz **3** hamują namnażanie wirusa podczas późnego etapu cyku replikacji (6-12 hpi, *ang. hours post infection*) co sugeruje hamowanie aktywności proteolitycznej enzymu CP.



Rysunek 2. Struktury znanych inhibitorów proteazy CVCP
 Figure 2. Structures of known CVCP protease inhibitors

UWAGI KOŃCOWE

Alfawirusy to grupa arbowirusów wywołujących choroby związane z zapaleniem wielostawowym oraz zapaleniem mózgu u ludzi, a także u zwierząt. Pomimo ograniczonych obszarów występowania, przedstawiciele tej grupy wirusów występują praktycznie na całym świecie. Wszystkie infekcje alfawirusowe charakteryzują się

podobnymi objawami klinicznymi, co w przypadku braku specyficznego testu diagnostycznego może prowadzić do trudności diagnostycznych.

Epidemia wirusa SARS-CoV2 pokazała jak ważna jest podstawowa wiedza na temat biologii wirusa w kontekście projektowanie i produkcji szczepionek oraz leków. Wcześniejsze badania nad wirusem SARS-CoV umożliwiły szybkie opracowanie skutecznych szczepionek oraz inhibitorów wirusowych enzymów stosowanymi w czasie epidemii SARS-CoV2. Chociaż badania nad alfawirusami doprowadziły do szeregu ciekawy informacji to, w porównaniu z koronawirusami o alfawirusach wiemy zdecydowanie mniej. Dlatego tak ważne jest prowadzenie badań mających na celu poznanie biologii wirusa i identyfikacji cząsteczek będących jego inhibitorami.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] B. Fatma, R. Kumar, V.A. Singh, S. Nehul, R. Sharma, P. Kesari, R.J. Kuhn, S. Tomar, *Antiviral Res.*, 2020, **179**, 104808.
- [2] J.R. Hwu, M. Kapoor, N.K. Gupta, S.C. Tsay, W.C. Huang, K.T. Tan, Y-C. Hu, P. Lyssen, J. Neyts, *Eur. J. Med. Chem.*, 2022, **232**, 114164.
- [3] J. Verma, N. Subbarao, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2022, **40**, 2048080.
- [4] P. Sharma, P. Sharma, S. Ahmad, A. Kumar, *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 2022, **28**, 50.
- [5] J. Waggoner, C.J. Heath, B. Ndenga, F. Mutuku, M.K. Sahoo, A. Mohamed-Hadley, J. Vulule, D. Mukoko, A. Desiree LaBeaud, B.A. Pinsky, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2017, **97**, 121.
- [6] A. Septembre-Malaterre, Y. Bedoui, C. Giry, P. Gasque, P. Guiraud, J. Sélambarom, *Sci. Rep.*, 2021, **11**, 6369.
- [7] L. Pezzi, M. Diallo, M.G. Rosa-Freitas, A. Vega-Rua, L.F.P. Ng, S. Boyer, J.F. Drexler, N. Vasilakis, R. Lourenco-de-Oliveira, S.C. Weaver, A. Kohl, X. de Lamballerie, A-B. Failloux, *Antiviral Res.*, 2020, **174**, 104670.
- [8] G.J. Atkins, *International Scholarly Research Notices*, 2012, **2013**, 861912.
- [9] M. Laine, R. Luukkainen, A. Toivanen, *J. Intern. Med.*, 2004, **256**, 457.
- [10] H. Artsob, R. Lindsay, M. Drebot, *International Encyclopedia of Public Health*, Elsevier Inc., 2017, 154.
- [11] J.D. Beckham, K.L. Tyler, *Neuroinfectious Disease*, 2015, **21**, 1599.
- [12] A. Suhrbier, M-C. Jaffar-Bandjee, P. Gasque, *Nature Reviews Rheumatology*, 2012, **8**, 420.
- [13] R.S.S. Azevedo, E.V.P. Silva, V.L. Carvalho, S.G. Rodrigues, J.P.N. Neto, H.A.O. Monteiro, V.S. Peixoto, J.O. Chiang, M.R.T. Nunes, P.F.C. Vasconcelos, *Emerg. Infect. Dis.*, 2009, **15**, 1830.
- [14] D. Harley, A. Sleigh, S. Ritchie, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2001, **14**, 909.
- [15] A.S. Lima Neto, G.S. Sousa, O.J. Nascimento, M.C. Castroid, *PLoS. Negl. Trop. Dis.*, 2019, **13**, e0007575.
- [16] Å. Gylfe, Å. Ribers, O. Forsman, G. Bucht, G-M. Alenius, S. Wällberg-Jonsson, C. Ahlm, M. Evander, *Emerg. Infect. Dis.*, 2018, **24**, 1141.
- [17] S. Adouchief, T. Smura, J. Sane, O. Vapalahti, S. Kurkela, *Rev. Med. Virol.*, 2016, **26**, 221.
- [18] M. Skogh, Å. Espmark, *The Lancet*, 1982, **1**, 795.
- [19] C. Lorenz, A. Freitas Ribeiro, F. Chiaravalloti-Neto, *Acta. Trop.*, 2019, **198**, 105093.
- [20] R.C. Russell, *Annu. Rev. Entomol.*, 2002, **47**, 1.
- [21] W. Qian, C. Hurs, K. Glass, D. Harley, E. Viennet, *Trop. Med. Infect. Dis.*, 2021, **6**, 145.

- [22] A.M. Powers, C.H. Logue. *J. Gen. Virol.*, 2007, **88**, 2363.
- [23] S. Hossain, M.R. Choudhury, Md.A. Islam, Md.M. Hassan, S. Yeasmin, F. Hossain, M.M. Zaman, *Trop. Med. Health.*, 2022, **50**, 21.
- [24] E.J. Sanders, E.B. Rwaguma, J. Kawamata, N. Kiwanuka, J.J. Lutwama, F.P. Ssengooba, R. Najjemba, W.A. Were, M. Lamunu, G. Bagambisa, T.R. Burkot, L. Dunster, J.J. Lutwama, D.A. Martin, C.B. Cropp, N. Karabatsos, R.S. Lanciotti, T.F. Tsai, G.L. Campbell, *Clin. Infect. Dis.*, 1999, **29**, 1243.
- [25] G. Rezza, R. Chen, S.C. Weaver, *Pathog. Glob. Health*, 2017, **111**, 271.
- [26] R.J. Schoepp, T.L. Clements, C.A. Rossi, A.K. Irish, K. Kibuuka, L.A. Eller, L.M. Robb, P. Kataaha, N.L. Michael, L.E. Hensley, R.J. Schoepp, *Open Forum Infect. Dis.*, 2019, **6**, ofz001.
- [27] M.C. Williams, J.P. Woodall, J.D. Gillett, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1965, **59**, 186.
- [28] W.G. Lima, R.S. Pereira, W.S. da Cruz Nizer, J.C.M. Brito, I.P. Godoi, V.N. Cardoso, S.O.A. Fernandes, J.M.S. Ferreira, *Arch. Virol.*, 2021, **166**, 347.
- [29] M. Brummer-Korvenkontio, O. Vapalahti, P. Kuusisto, P. Saikku, T. Manni, P. Koskela, T. Nygren, H. Brummer-Korvenkontio, A. Vaheri, *Epidemiol Infect.*, 2002, **129**, 335.
- [30] F. Simon, H. Savini, P. Parola, *Med. Clin. North. Am.*, 2008, **92**, 1323.
- [31] J.E. Erin, R.F. Breiman, A.M. Powers, *Clin. Infect. Dis.*, 2009, **49**, 942.
- [32] S. Mukhopadhyay, W. Zhang, S. Gabler, P.R. Chipman, E.G. Strauss, J.H. Strauss, T.S. Baker, R.J. Kuhn, M.G. Rossmann, *Structure*, 2006, **14**, 63.
- [33] R.S. Levinson, J.H. Strauss, E.G. Strauss, *Virology*, 1990, **175**, 110.
- [34] E.G. Strauss, C.M. Rice, J.H. Strauss, *Virology*, 1984, **133**, 92.
- [35] G. Shin, S.A. Yost, M.T. Miller, E.J. Elrod, A. Grakoui, J. Marcotrigiano, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, **109**, 16534.
- [36] J. Yat-Sing Leung, M. Mah-Lee Ng, J. Jang Hann Chu, *Adv. Virol.*, 2011, **2011**, 249640.
- [37] J. Jose, J.E. Snyder, R. Kuhn, *Future Microbiol.*, 2009, **4**, 837.
- [38] E.M. Hong, R. Perera, R.J. Kuhn, *Viruses*, 2018, **10**, 138.
- [39] R. Perera, K.E. Owen, T.L. Tellinghuisen, A.E. Gorbalenya, R.J. Kuhn, *J. Virol.*, 2001, **75**, 1.
- [40] H-K. Choi, L. Tong, W. Minor, P. Dumas, U. Boege, M.G. Rossmann, G. Wengler, *Nature*, 1991, **354**, 37.
- [41] L. Tong, G. Wengler, M.G. Rossmann, *J. Mol. Biol.*, 1993, **230**, 228.
- [42] S. Thomas, J. Rai, L. John, S. Günther, C. Drosten, B.M. Pützer, S. Schaefer, *Virol. J.*, 2010, **7**, 327.
- [43] M. Morillas, H. Eberl, F.H.T. Allain, R. Glockshuber, E. Kuennemann, *J. Mol. Biol.*, 2008, **376**, 721.
- [44] M. Aggarwal, R. Sharma, P. Kumar, P. Manmohan, S. Tomar, *Sci. Rep.*, 2015, **5**, 14753.
- [45] M. Aggarwal, S. Dhindwal, P. Kumar, R.J. Kuhn, S. Tomar, *J. Virol.*, 2014, **88**, 12242.
- [46] M. Aggarwal, R. Kaura, A. Saha, R. Mudgal, R. Yadav, P. K. Dash, M. Parida, P. Kumar, S. Tomar, *Antiviral Res.*, 2017, **146**, 102.

Praca wpłynęła do Redakcji 8 maja 2022 r.

