

Aan de staatssecretaris van Openbaar Vervoer en Milieu
Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat
De heer Ch.A. Jansen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 23 januari 2025
KENMERK CGM/250123-01
ONDERWERP Advies inschaling werkzaamheden VEEV TC-83 replicons en wt alfavirussen

Geachte heer Jansen,

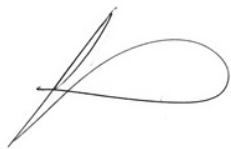
Naar aanleiding van een adviesvraag over het dossier IG 16-053_III-013 getiteld 'Arbovirus interacties met de aangeboren afweer van de gastheer', ingediend door Wageningen Universiteit, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden waarbij onderzoek gedaan wordt naar de kans op recombinitie tussen VEEV TC-83 replicons en wildtype alfavirussen uit pathogeniteitsklasse 2 of 3. Om mogelijk ontstane recombinante virussen te selecteren, wordt gebruik gemaakt van cellijnen (G3BP DKO) waarin alleen recombinante virussen die het nsP3-eiwit van VEEV TC-83 hebben verworven, kunnen vermenigvuldigen. De aanvrager verzoekt de werkzaamheden uit te mogen voeren op ML-III met enkele aanvullende voorschriften. De recombinante virussen waar tijdens de werkzaamheden op wordt geselecteerd, zullen een fitnessvoordeel hebben op G3BP DKO cellen. Hoewel het onwaarschijnlijk is, kan het niet geheel uitgesloten worden dat de recombinante virussen ook een fitnessvoordeel hebben op wildtype cellen. Echter, omdat de resulterende recombinante virussen alleen door muggen verder verspreid kunnen worden, en muggen niet aanwezig zijn in de experimenten, is het risico op verdere verspreiding van de recombinante alfavirussen verwaarloosbaar klein. Alles in overweging nemende, kan de COGEM instemmen met de door de aanvrager voorgestelde inschaling op ML-III van de voorgenomen werkzaamheden, met de voorgestelde aanvullende voorschriften. De COGEM is van oordeel dat de risico's voor mens en milieu bij uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden op ML-III, verwaarloosbaar klein zijn.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c.

- Drs. Y. de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
- Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's, DG Milieu en Internationaal

Met het oog op belangenverstrengeling is COGEM lid prof. dr. ir. G.P. Pijlman niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies

Advies inschaling werkzaamheden met VEEV TC-83 replicons en wildtype alfavirussen uit PG 2 en 3 op ML-III

COGEM advies CGM/250123-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden waarbij onderzoek gedaan wordt naar mogelijke recombinatie tussen VEEV TC-83 replicondeeltjes en wildtype alfavirussen uit pathogeniteitsklassen (PG) 2 en 3. De aanvraag is afkomstig van de Wageningen Universiteit (IG 16-053). De aanvrager verzoekt deze werkzaamheden uit te mogen voeren op inperkingsniveau ML-III met inachtneming van aanvullende voorschriften. De COGEM is gevraagd of zij kan instemmen met dit verzoek.

2. Algemene kenmerken alfavirussen

Alfavirussen (genus *Alphavirus*; familie *Togaviridae*) hebben een breed gastheerbereik en kunnen onder andere vogels, zoogdieren, vissen en insecten infecteren.^{1,2} Alfavirussen kunnen verspreid worden via bloedzuigende insecten, met name muggen.¹ Het genus *Alphavirus* kent 32 species³, waaronder verscheidene soorten die ziekten veroorzaken bij mens of dier, zoals Chikungunya virus (CHIKV, tegenwoordig *Alphavirus chikungunya*), Ross River virus (RRV, tegenwoordig *Alphavirus rossriver*), Semliki Forest virus (SFV, tegenwoordig *Alphavirus semliki*), Sindbis virus (SINV tegenwoordig *Alphavirus sindbis*) en Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV tegenwoordig *Alphavirus venezuelan*). Voor veel alfavirussen wordt de mens als 'dead-end-host' beschouwd, omdat de virale titers niet hoog genoeg zijn om muggen te infecteren.^{2,4,5} Voor CHIKV is echter wel mens-mug-mens besmetting gerapporteerd.^{2,6}

Alfavirusdeeltjes bevatten een positief enkelstrengs RNA-genoom van 9,7 tot 11,8 kb.² Replicatie van het virusgenoom vindt plaats in het cytoplasma van de gastheercel. Op het genoom liggen twee grote 'open reading frames' (ORF's). De niet-structurele eiwitten (nsP1 – nsP4) worden vanaf het ORF aan het 5'-uiteinde van het genoom afgelezen als een polyproteïne; na klieving door het virale protease in nsP2 worden de individuele eiwitten gevormd. Deze eiwitten zijn betrokken bij de replicatie van het virale RNA.^{7,8} Het ORF aan het 3'-uiteinde van het genoom codeert voor de structurele eiwitten. Dit ORF komt tot expressie vanaf een subgenomisch mRNA, dat getranscribeerd wordt vanaf een interne promotor, 26S, gelegen in het gebied tussen het structurele en het niet-structurele ORF.^{1,8} Virale en cellulaire proteases klieven de structurele polyproteïnes in de individuele eiwitten (C, E3, E2, 6K en E1). In sommige gevallen leidt '(-1) frame-shifting' tijdens de translatie tot de productie van een extra eiwit, TF genaamd.⁹ Aan beide uiteinden van het genoom liggen de 'non-coding regions', en het virale RNA heeft een 5'-cap-structuur en een poly-A-staart aan het 3'-uiteinde.

Het RNA in het virusdeeltje wordt omgeven door het capsid-eiwit (C) en tezamen vormen deze het nucleocapsid. Om de eiwitmantel bevindt zich een lipidenmembraan met daarin de glycoproteïnen (envelopeiwitten, E1 en E2) die betrokken zijn bij de aanhechting en infectie van de gastheercel.¹⁰ De

glycoproteïnen zijn daarmee direct van invloed op het gastheerbereik.² De assemblage en ‘budding’ van nieuwe virusdeeltjes vindt plaats op het plasmamembraan van de gastheercel.¹¹

2.1 Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) vaccinstam TC-83

VEEV kan milde tot ernstige ziekte veroorzaken in paardachtigen, variërend van koorts tot ernstige encefalitis, en kan daarnaast ook ziekte veroorzaken bij de mens. Bij volwassenen leidt een infectie doorgaans tot ziekteverschijnselen als koorts, hoofdpijn, spierpijn en keelontsteking. In jonge kinderen kan een infectie leiden tot hersenontsteking (encefalitis),^{12,13} met soms blijvende neurologische problemen. Bij zwangere vrouwen kan een infectie leiden tot foetale afwijkingen en miskramen.¹² Het virus wordt voornamelijk verspreid via muggensoorten behorende tot het genus *Culex*, subgenus *Melanoconion*, die veelal in (sub)tropische gebieden in Zuid-Amerika voorkomen.^{14,15} Van VEEV zijn er gevallen beschreven waarbij onder laboratoriumomstandigheden aerogene verspreiding heeft plaatsgevonden.¹⁶ Het is onduidelijk in hoeverre aerogene verspreiding onder natuurlijke omstandigheden een rol speelt.

VEEV TC-83 is een levend verzwakt VEEV-vaccin dat als veterinair vaccin toegelaten is in de VS.¹⁷ Deze vaccinstam wordt ook onder een ‘Investigational New Drug protocol’ van de Amerikaanse ‘Food and Drug Administration’ (FDA) toegediend aan laboratorium- en veldmedewerkers die het risico lopen om geïnfecteerd te worden met een virulente stam van VEEV.¹⁸

Het vaccin is geproduceerd door de virulente stam *Trinidad donkey 83* keer te passeren in hartcellen afkomstig van cavia’s. Het genoom van het geattenuëerde virus is op 12 plaatsen gemuteerd.^{19,20} De verzwakking van het gemuteerde virus berust op 2 van deze 12 mutaties, de eerste gelegen in de 5’ non-coding region en de tweede in structureel eiwit E2.^{20,21} Reversie naar wildtype VEEV is niet uitgesloten.²²

2.2 Replicons afgeleid van alfavirussen

Virale RNA-replicons zijn zelf-replicerende RNA-constructen. VEEV wordt veel gebruikt voor de constructie van deze repliconsystemen. In zogenaamde ‘naakte’ replicons is het ORF dat codeert voor de structurele genen verwijderd, en wordt een eventueel transgen op de positie van het structurele ORF geïnsereerd. Bij de productie van replicondeeltjes (‘viral replicon particles’, VRP’s) worden de structurele genen *in trans* aangeboden. Meestal vindt co-transfectie plaats van het replicon-RNA met één of meerdere helperconstructen, waarvan de structurele eiwitten getransleerd worden. Er wordt onderscheid gemaakt tussen ‘single-helper’-strategieën, waarbij de structurele genen op één helper-RNA worden aangeboden, en de ‘split-helper-systemen’ waarbij het C-gen en de genen coderend voor de glycoproteïnen op twee verschillende helper-RNA’s liggen.²³

3. Voorgenomen werkzaamheden

De werkzaamheden vinden in twee stappen plaats. In de eerste stap worden cellen die in een eerder stadium zijn getransfecteerd met het VEEV TC-83 split-helper systeem, geïnfecteerd met wildtype alfavirussen uit pathogeniteitsklasse 3 (i.e., CHIKV, SFV en Mayaro virus (MAYV)) of uit pathogeniteitsklasse 2 (Bebaru virus, Barmah forest virus (BFV), Getah virus (GETV), Middelburg virus (MIDV), Southern elephant seal virus (SESV), Una virus (UNAV), VEEV TC-83, en Whataroa virus

(WHAV)). In elk experiment zal telkens co-infectie plaatsvinden met één wildtype alfavirus; er zullen niet meerdere wildtype alfavirussen in het hetzelfde experiment gecombineerd worden. De transfectie van cellen met het VEEV TC-83 split-helper systeem op ML-II is onder een andere vergunning verleend. Er wordt in de huidige aanvraag geen achtergrondinformatie gegeven over het VEEV TC-83 split-helper systeem, enkel dat markerogenen (geen schadelijke of virale sequenties) als donorsequentie worden gebruikt.

Vervolgens wordt als tweede stap het supernatant van de eerdere werkzaamheden, waarin wildtype alfavirussen, VEEV TC-83 replicondeeltjes en eventueel ontstane recombinante (chimere) virussen aanwezig kunnen zijn, gebruikt om cellen te infecteren. Hiervoor worden Hela en U2OS dubbele knock-out (DKO) G3BP1 en -2 cellen, en reguliere Hela, U2OS, Vero-E6 cellen gebruikt. De meeste wildtype alfavirussen kunnen niet op G3BP DKO cellen repliceren, maar VEEV kan dit wel door een andere samenstelling van het nsP3-eiwit. De Hela en U2OS DKO G3BP1 en -2 cellen worden daarom als 'recombination trap' gebruikt; alleen recombinanten die het VEEV TC-83 nsP3 uit het split-helper systeem hebben verworven, kunnen hierop repliceren.

De aanvrager verzoekt om de werkzaamheden uit te voeren op ML-III inperkingsniveau, waarbij onder andere de standaardmaatregelen gelden dat er handschoenen gedragen worden tijdens de werkzaamheden en dat open handelingen in een veiligheidskabinet van klasse II (VKII) worden uitgevoerd. De aanvrager stelt daarnaast voor ook het aanvullende voorschrift van 9.1.1.3.3.10 (voor activiteiten met genetisch gemodificeerde micro-organismen die infectieus zijn via wondjes van de huid) uit de Regeling ggo te hanteren; namelijk dat tijdens de werkzaamheden handschoenen tot over de mouw van de werkkleding worden gedragen. De aanvrager vermeldt in het dossier tevens dat er bij de handelingen geen 'sharps' worden gebruikt.

4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft VEEV ingeschaald in pathogeniteitsklasse 3. De VEEV vaccinstam TC-83 is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.^{24,25} De COGEM heeft meerdere keren geadviseerd over replicons afgeleid van VEEV (TC-83) met verschillende donorsequenties.^{0.a.26,27,28,29,30,31} In 2022 heeft zij een advies uitgebracht over de generieke omlaagschaling van werkzaamheden met virale replicons afgeleid van alfavirussen en flavivirussen.³² De COGEM heeft eerder over werkzaamheden met alfa- en flavivirus-chimeren geadviseerd, waarbij één chimeer van VEEV TC-83 met CHIKV geconstrueerd is als positieve controle voor experimenten waarin recombinitie-evenementen tussen VEEV repliconvectoren en wildtype alfavirussen bestudeerd worden. In dit chimere virus zijn de niet-structurele genen, de 26S promotor en de 5' en 3' UTR-sequenties afkomstig van VEEV TC-83 en de structurele genen van CHIKV.³³ De COGEM heeft destijds ingestemd met een inschaling op ML-III, met inachtnaam van enkele aanvullende voorschriften. Verder heeft de COGEM niet eerder geadviseerd over werkzaamheden met alphavirus chimereën zoals beschreven in deze aanvraag.

5. Overweging

In de onderhavige aanvraag zal onderzoek gedaan worden naar de mogelijke recombinitie tussen VEEV TC-83 replicons en verscheidene wildtype alfavirussen. Naar aanleiding van de vergunning-

aanvraag heeft Bureau GGO aanvullende vragen gesteld over de recombinante virussen die mogelijk kunnen ontstaan. De COGEM is gevraagd of zij kan instemmen met het voorstel tot inschaling, met inbegrip van de aanvullende voorschriften, gebaseerd op de risicoanalyse van de aanvrager. Hieronder zal op verschillende aspecten van de milieurisicoanalyse worden ingegaan.

5.1 Recombinatie tijdens de werkzaamheden

Door infectie van cellen met het VEEV TC-83 split-helper repliconsysteem met een wildtype alfavirus kan recombinatie optreden. De aanvrager stelt dat in het gebruikte systeem alle mogelijk ontstane recombinante virussen altijd de structurele genen van het gebruikte wildtype PG2 of PG3 alfavirus zullen hebben, waardoor het gastheerbereik/weefsel tropisme onveranderd blijft. De glycoproteïnen (E1 en E2) van alfavirussen zijn betrokken bij de aanhechting en infectie van de gastheercel en spelen een belangrijke rol bij het gastheerbereik en tropisme.^{2,10,34} De informatie die is aangeleverd over de eerste stap van de werkzaamheden, en het VEEV TC-83 split-helper systeem is beperkt. In het split-helper systeem zullen alleen sequenties van VEEV TC-83 (replicongenoom, de capside-eiwitten en de glycoproteïnen) aanwezig zijn. Wanneer de infectie van wildtype alfavirussen plaatsvindt in cellen waarin de onderdelen van het split-helper systeem aanwezig zijn, zou mogelijk ook uitwisseling kunnen plaatsvinden van de structurele genen van VEEV TC-83 en het wildtype alfavirus. In een volgende stap zal selectie plaatsvinden van chimereën met (een deel van) nsP3. Door het gebruik van een split-helper systeem is de COGEM van oordeel dat de kans verwaarloosbaar klein is dat een chimeer virus zowel het nsP3, als de VEEV TC-83 structurele eiwitten bemachtigt.

Om te selecteren op chimere virussen, wordt het supernatant toegevoegd aan G3BP DKO cellijnen waarin alleen replicatie mogelijk is van chimereën die het nsP3-eiwit van VEEV TC-83 verworven hebben. Het nsP3-eiwit van veel alfavirussen bindt aan 'GTPase-activating protein-binding proteins 1 en 2' (G3BP1 en 2).^{35,36} Deze G3BP zijn RNA-bindende eiwitten die gevonden worden in zogenaamde 'stress granules' (SG's), die worden gevormd bij cellulaire stress door bijvoorbeeld virale infectie. SG's reguleren verschillende immuunresponses en slaan grote hoeveelheden mRNA op. Hierdoor wordt translatie van gastheer mRNA gestopt. Binding van het alfavirus nsP3 aan G3BP blokkeert de vorming van SG's en daarmee de SG-gemedieerde antivirale respons.

Het nsP3 van VEEV is hierop een uitzondering en gaat geen interactie aan met G3BP, maar wel met het gastheereiwit 'Fragile X mental retardation protein' (FMRP), dat eveneens een RNA-bindend eiwit is dat betrokken is bij de vorming van SG's. Een interactie van VEEV nsP3 met FMRP kan daarmee ook de stressrespons van de gastheercel onderdrukken. Alfavirussen die wel G3BP binden kunnen ook een interactie aangaan met FMRP, maar alleen in aanwezigheid van G3BP.³⁶

De interactie van nsP3 en de SG-eiwitten (G3BPs en eiwitten uit de 'fragile X syndrome' (FXR) familie) speelt ook een rol bij de replicatie van het alfavirus-genoom.^{37,38,39} In afwezigheid van G3BP kunnen alfavirussen die G3BP binden, slecht of niet meer repliceren, terwijl de replicatie van VEEV niet beïnvloed wordt.^{37,39} Replicatie van VEEV wordt wel sterk negatief beïnvloed in cellen waarin FXR-eiwitten niet meer tot expressie komen.³⁹

Door de afwezigheid van G3BP in de Hela en U2OS cellijnen zullen ontstane chimereën die het VEEV (TC-83) nsP3 hebben verworven, wel op G3BP DKO cellen kunnen repliceren, en de overige wildtype

PG2 en PG3 alfavirussen uit de aanvraag niet. Hierbij is een verandering opgetreden van de eigenschappen het chimere virus ten opzichte van het wildtype virus.

5.2 Mogelijk fitnessvoordeel van een chimeer alfavirus

De aanvrager sluit niet uit dat een mogelijke introductie van een of meerdere van de nsPs van de VEEV TC-83 vaccinstam in een wildtype PG2 of PG3 alfavirus een verandering in de interactie met intracellulaire eiwitten veroorzaakt. De aanvrager acht het echter zeer onwaarschijnlijk dat een selectievoordeel een pathogener virus oplevert.

De functie van het nsP3 bij de replicatie van het alfavirusgenoom is nog grotendeels onbekend. In wetenschappelijke literatuur wordt opgemerkt dat de interacties die het nsP3 eiwit aangaat met gastheereiwitten, gerelateerd zijn aan de geografische en evolutionaire oorsprong van de virussen; het nsP3 van zogenaamde 'Old World' alfavirussen (zoals SINV, CHIKV) bindt aan G3BP, en de zogenaamde 'New World' alfavirussen (waaronder VEEV) binden aan FXR-eiwitten.³⁹ De 'Old World' alfavirussen worden daarnaast gekenmerkt door een ziektebeeld bij mensen dat voornamelijk gekenmerkt wordt door artritis, terwijl infectie van 'New World' alfavirussen bij mensen kan leiden tot encefalitis. Aanwijzingen voor een directe associatie tussen de interactie van nsP3 met gastheereiwitten en klinische symptomen zijn er, voor zover bekend, echter niet. Wel is in de wetenschappelijke literatuur gerapporteerd dat het nsP3 van het alfavirus O'nyong nyong virus (ONNV) – het enige alfavirus dat door muggen uit het genus *Anopheles* wordt verspreid – een rol speelt bij de vectorspecificiteit van dit virus.^{40,41} Ook kan in sommige alfavirussen het nsP3 een rol spelen bij de mate van neurovirulentie, maar dit is voornamelijk beschreven bij 'Old World' alfavirussen en niet zozeer bij 'New World' virussen.^{41,42} NsP3 zelf is niet de enige bepalende factor voor virulentie.

Door selectie op G3BP DKO cellen in de proefopzet wordt specifiek gekeken naar chimere alfavirussen die (een deel van) het VEEV nsP3 hebben verworven. De aanvrager verwacht dat een ontstaan chimeer alfavirus met een (deel van) VEEV nsP3, dat in G3BP KO cellen een voordeel heeft ten opzichte van de gebruikte wildtype PG2 en PG3 alfavirussen, geen voordeel zal ondervinden in wildtype cellen. Een dergelijke chimeer heeft de mogelijkheid tot binden van G3BP verloren, waardoor te verwachten is dat de fitness in wildtype cellen af zal nemen en dit eerder zal leiden tot een afname van pathogeniteit en verminderde transmissie. Met het nsP3 van VEEV bestaat echter nog wel de mogelijkheid tot binden aan FMRP. Er kan daarom niet geheel uitgesloten worden dat het chimere virus in wildtype cellen een fitnessvoordeel kan ontwikkelen. Aangezien VEEV TC-83 een geattenuëerde stam is, is de verwachting dat het verwerven van mogelijke andere niet-structurele eiwitten naast nsP3 weinig invloed zal hebben op de virulentie van het virus.

Een ontstaan chimeer alfavirus zal altijd afhankelijk blijven van een vector (steekmug) voor verspreiding. In de voorgenomen experimenten zal echter niet met muggen worden gewerkt. De COGEM merkt verder op dat de mens voor de meeste alfavirussen een dead-end-host is, en dat bij onbedoelde blootstelling van de medewerker aan deze virussen of recombinanten daarvan de kans op verdere verspreiding verwaarloosbaar klein is.

Alhoewel niet uit te sluiten is dat een ontstaan chimeer alfavirus mogelijk een (beperkt) fitnessvoordeel ondervindt in wildtype cellen ten opzichte van het wildtype alfavirus, is de COGEM van oordeel dat de afwezigheid van de vector tijdens de experimenten voldoende inperking biedt om verspreiding van de chimere virussen te voorkomen.

5.3 Voorstel tot inschaling en voorgenomen aanvullende voorschriften

De aanvrager verzoekt om de werkzaamheden uit te voeren op ML-III inperkingsniveau. De cellijnen zullen in een VK-II worden geïnfecteerd, en de aanvrager is voornemens tijdens de werkzaamheden handschoenen tot over de mouw van de werkkleding te dragen. De aanvrager vermeldt in het dossier tevens dat er bij de handelingen geen 'sharps' worden gebruikt. De COGEM merkt op dat het dragen van handschoenen tot over de mouw in veel laboratoria standaardpraktijk is. Het biedt extra bescherming om de kans op infectie via wondjes van de huid te voorkomen. De COGEM stemt in met de voorgestelde voorschriften van de aanvrager om het risico op infectie van de medewerker verder te minimaliseren.

6. Advies

Concluderend stemt de COGEM in met een inschaling van de voorgenomen werkzaamheden op ML-III, met inachtneming van de door de aanvrager voorgestelde voorschriften. De COGEM is van oordeel dat op het genoemde inperkingsniveau de risico's voor mens en milieu van de voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Griffin DE (2013). Alphaviruses. In: Fields Virology, 6th edition. Edited by Knipe DM & Howley PM, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
2. International Committee on Taxonomy of Viruses. *Togaviridae*. <https://ictv.global/report/chapter/togaviridae/togaviridae> (bezoekt: 13 januari 2025)
3. International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy: 2023 Release <https://ictv.global/taxonomy> (bezoekt: 13 januari 2025)
4. Skidmore AM & Bradfute SB (2023). The life cycle of the alphaviruses: From an antiviral perspective. *Antiviral Res.* 209: 105476
5. Griffin DE (1992). Alphaviruses, Flaviviruses, and Bunyaviruses. In: *Neuropathogenic Viruses and Immunity*, pp 255–274, Editors: Specter S, Bendinelli M en Friedman H, Springer New York, NY
6. US Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Transmission of Chikungunya Virus. <https://www.cdc.gov/chikungunya/php/transmission/index.html> (bezoekt: 16 januari 2025)
7. Pietilä MK *et al.* (2017). Alphavirus polymerase and RNA replication. *Virus Res.* 234: 44–57
8. Rupp JC *et al.* (2015). Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *J. Gen. Virol.* 96: 2483–2500
9. Firth AE *et al.* (2008). Discovery of frameshifting in Alphavirus 6K resolves a 20-year enigma. *Virol. J.* 5:108
10. Jose J *et al.* (2009). A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiol.* 4: 837–856
11. Elmasri Z *et al.* (2021). Alphavirus-induced membrane rearrangements during replication, assembly, and budding. *Pathogens* 10: 984

12. Griffin DE (2008). Togaviruses: Equine Encephalitic Viruses. In: Encyclopedia of Virology, third edition. Ed. Mahy BWJ & Van Regenmortel MHV, Elsevier Ltd.
13. Taylor KG & Paessler S (2013). Pathogenesis of Venezuelan equine encephalitis. *Vet. Microbiol.* 167: 145-150
14. Griffin DE (2013). Alphaviruses. In: Fields Virology, 6th edition. Edited by Knipe DM & Howley PM, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
15. Laurito M & Arias-Alzate A (2024). Current and future potential distribution of *Culex (Melanoconion)* (Diptera: Culicidae) of public health interest in the Neotropics. *J. Med. Entomol.* 61: 354-366
16. Paessler S & Weaver SC (2009). Vaccines for Venezuelan equine encephalitis. *Vaccine* 27: D80-D85
17. Guerbois *et al.* (2013). IRES-driven expression of the capsid protein of the Venezuelan equine encephalitis virus TC-83 vaccine strain increases its attenuation and safety. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9: 7: e2197
18. Grabenstein JD *et al.* (2006). Immunization to protect the US Armed Forces: heritage, current practice, and prospects. *Epidemiol. Rev.* 28: 3-26
19. Kinney RM *et al.* (1989). The full-length nucleotide sequences of the virulent Trinidad donkey strain of Venezuelan equine encephalitis virus and its attenuated vaccine derivative, strain TC-83. *Virology* 170: 19-30
20. Kinney RM *et al.* (1993). Attenuation of Venezuelan equine encephalitis virus strain TC-83 is encoded by the 5'-noncoding region and the E2 envelope glycoprotein. *J. Virol.* 67: 1269-1277
21. Kulasegaran-Shylini R *et al.* (2009). The 5'UTR-specific mutation in VEEV TC-83 genome has a strong effect on RNA replication and subgenomic RNA synthesis, but not on translation of the encoded proteins. *Virology* 387: 211-221
22. Kenney JL *et al.* (2011). Stability of RNA virus attenuation approaches. *Vaccine* 29: 2230-2234
23. Pushko P *et al.* (1997). Replicon-helper systems from attenuated *Venezuelan equine encephalitis virus*: expression of heterologous genes in vitro and immunization against heterologous pathogens in vivo. *Virology* 239: 389-401
24. COGEM (2024). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificatielijsten met humaan- en dierpathogene DNA- en RNA-virussen (2024). COGEM advies CMG/241210-02
25. COGEM (2017). Pathogeniteitsclassificatie van Venezuelan equine encephalitis virus vaccinstam TC-83. COGEM advies CGM/170328-05
26. COGEM (2023). Inschaling van werkzaamheden met chimere Binjari en Palm Creek virussen (gg-BinJV en gg-PCV) en VEEV replicondeeltjes in muggen. COGEM advies CGM/230828-01
27. COGEM (2017). Werkzaamheden met gg-VEEV en gg-SPDV replicons met aquatische donorsequenties. COGEM advies CGM/171030-03
28. COGEM (2017). Werkzaamheden met gg-alphavirus-replicons (SFV, SINV en VEEV) met donorsequenties van griepvirussen, Human respiratory syncytial virus, en Marburg- en Ebolavirussen. COGEM advies CGM/171024-01
29. COGEM (2017). Omlaagschaling van *in vivo* en *in vitro* werkzaamheden met *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV) replicons. COGEM advies CGM/170224-01 51
30. COGEM (2016). Inschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met replicons afgeleid van *Venezuelan equine encephalitis virus*. COGEM advies CGM/160815-01
31. COGEM (2016). Onderbouwing van omlaagschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met gg-VEEV replicons. COGEM advies CGM/160906-02

32. COGEM (2022). Generieke omlaagschaling van werkzaamheden met virale replicons afgeleid van alfavirussen en flavivirussen. COGEM-advies 221223-01
33. COGEM (2020). Inschaling van productie- en infectiewerkzaamheden met verschillende flavivirus en alphavirus chimere. COGEM advies CGM/201105-01
34. Zimmerman O *et al.* (2023). Entry receptors — the gateway to alphavirus infection. *J. Clin. Invest.* 133: e165307
35. Panas MD *et al.* (2014). The C-Terminal Repeat Domains of nsP3 from the Old World Alphaviruses Bind Directly to G3BP. *J. Virol.* 88: 5888-5893
36. Nowee G *et al.* (2021). A Tale of 20 Alphaviruses; Inter-species Diversity and Conserved Interactions Between Viral Non-structural Protein 3 and Stress Granule Proteins. *Front. Cell Dev. Biol.* 9: 625711
37. Götte B *et al.* (2020). Sensitivity of Alphaviruses to G3BP Deletion Correlates with Efficiency of Replicase Polyprotein Processing. *J. Virol.* 94: 01681-19
38. Scholte FEM *et al.* (2014). Stress Granule Components G3BP1 and G3BP2 Play a Proviral Role Early in Chikungunya Virus Replication. *J. Virol.* 89: 4457-4469
39. Kim DY *et al.* (2016). New World and Old World Alphaviruses Have Evolved to Exploit Different Components of Stress Granules, FXR and G3BP Proteins, for Assembly of Viral Replication Complexes. *PLoS Pathog.* 12: e1005810
40. Saxton-Shaw KD *et al.* (2013). O'nyong nyong Virus Molecular Determinants of Unique Vector Specificity Reside in Non-Structural Protein 3. *PLoS Negl Trop Dis.* 7: e1931
41. Götte B *et al.* (2018). The Enigmatic Alphavirus Non-Structural Protein 3 (nsP3) Revealing Its Secrets at Last. *Viruses* 10: 105. doi: 10.3390/v10030105
42. Atkins GJ & Sheahan BJ (2016). Molecular determinants of alphavirus neuropathogenesis in mice. *J. Gen. Virol.* 97: 1283-1296