ZKBS
Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit

Az. 402.08020203.0002.0010[1] aktualisiert Juli 2025

Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung gentechnisch veränderter Baculoviren gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV

Baculoviren

Viren der Familie *Baculoviridae* (Baculoviren) kommen in der Natur verbreitet vor und infizieren Larvenstadien von Insekten der Ordnung *Lepidoptera* (Schmetterlinge), *Hymenoptera* (Hautflügler) und *Diptera* (Zweiflügler) [1]. In der Landwirtschaft werden sie als Insektizide eingesetzt [2]. Es sind umhüllte Viren mit einem doppelsträngigen, zirkulären DNA-Genom von 80 – 180 kbp. Transkription, DNA-Replikation und Bildung des Nukleokapsides erfolgen im Kern der infizierten Wirtszelle. Während der produktiven Infektion in permissiven Zellen erfolgt keine Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom [3, 4]. Charakteristisch für den Infektionszyklus ist die Ausbildung zweier unterschiedlicher Virionphänotypen: zum frühen Zeitpunkt des Replikationszyklus, ab 6 – 8 h nach Infektion, wird das *budded virus* (BV) an der Zytoplasmamembran gebildet und zum späten Zeitpunkt, ab 18 h nach Infektion, das *occlusion-derived virus* (ODV) im Zellkern [4]. Das BV vermittelt im infizierten Tier die Übertragung von Zelle zu Zelle und ist daher auch in Zellkultur infektiös. Sein Eintritt in die Wirtszelle erfolgt über Rezeptor-vermittelte Endozytose. Das virale GP64 ist ein Membranfusionsprotein und bei BV für das virale *budding*, den Viruseintritt in die Zelle und die Übertragung von Zelle zu Zelle essenziell [5]. Bei oraler Aufnahme von BV durch Larvenstadien der Wirtstiere findet keine Infektion statt, da die Partikel die Magen-Darm-Passage nicht überstehen [6]. Die horizontale Übertragung auf andere Wirtstiere findet über in einer Hüllmatrix verpackte ODV, den *occlusion bodies* (OB), statt, die dafür oral aufgenommen werden müssen. In einem OB befinden sich ca. 1 bis 100 ODV. Die Hülle der OB schützt darin enthaltene ODV gegen äußere Umwelteinflüsse. Die vorherrschende Proteinkomponente dieser Schutzhülle ist Polyhedrin (Granulin bei Vertretern der Gattung *Betabaculovirus*). Polyhedrin wird erst in einem sehr späten Stadium der Virusreplikation gebildet. Nach oraler Aufnahme der OB durch Wirtstiere bewirkt der basische pH im Darmlumen die Auflösung der Polyhedrinstruktur der OB und in Folge dessen die Freisetzung infektiöser ODV. Diese gelangen durch direkte Membranfusion an der Zelloberfläche in die Darmzellen des Wirtstieres [1]. Erfolgreiche Infektionen mit Baculoviren sind für die Wirtstiere letal [7]. Die erst gegen Ende des Replikationszyklus exprimierten viralen Enzyme Chitinase und Cathepsin zerstören das Wirtsgewebe vollständig und führen zu einer weitgehenden Verflüssigung des Tierkörpers [8]. Die Flüssigkeit enthält OBs. Eine Ausnahme sind Vertreter der Gattung *Betabaculovirus*, bei denen die Infektion auf den Verdauungstrakt begrenzt ist und die Übertragung fäkal-oral erfolgt [7]. Je nach Baculovirusspezies und beeinflusst durch die Umwelt können infektiöse ODV durch die schützende Polyhedrinstruktur der OB-Hüllmatrix auf Pflanzenteilen bis zu einigen Wochen und in Böden Monate bis Jahre überdauern [9–11].

[1]Ehemaliges Az. 6790-05-02-41

BVL_FO_05_4100_402_V1.9

In Böden sind die OBs an Erdpartikel adsorbiert und stehen für Reinfektionen in der folgenden Vegetationsperiode nicht mehr zur Verfügung [12].

Da Baculoviren auch als Pestizide Einsatz finden, wurden Wechselwirkungen mit Nicht-Zielorganismen untersucht. Auf solitäre und soziale Bienen haben Baculoviren keine negativen Auswirkungen [13]. Weiterhin zeigte sich, dass Baculoviren auch von Vertebratenzellen, einschließlich humanen Zellen [2] aufgenommen werden. Jedoch wird in diesen Zellen das virale Genom weder exprimiert noch repliziert [14, 15], so dass auch keine neuen Viruspartikel ausgebildet werden. In Säugerzellen, die mit dem Wildtyp-Virus inokuliert wurden, konnten keine zytogenetischen Auswirkungen auf die Chromosomen der Wirtszelle wie Chromosomen-Aberrationen und Schwester-Chromatiden-Austausche festgestellt werden [16]. Baculovirale Viruspartikel werden in Säugern durch das Komplementsystem, primär über den klassischen Signalweg über den Komplementfaktor C5, inaktiviert [17, 18].

Baculoviren werden gemäß § 5 Abs. 1 und Abs. 6 i. V. m. Anlage 1 Nr. 1 GenTSV als Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten der **Risikogruppe 1** zugeordnet.

Gentechnisch veränderte Baculoviren

Rekombinante Baculoviren haben für die Expression heterologer Proteine in Insektenzellen große Bedeutung erlangt [17, 19–24]. Das hierfür in der Regel eingesetzte und am besten charakterisierte Baculovirus ist das *Alphabaculovirus aucalifornicae* (Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus, AcMNPV). Das Genom der meist verwendeten Klone 6 und E2 ist vollständig sequenziert und umfasst ca. 133,9 kbp [25].

Im Genom rekombinanter AcMNPV ist zumeist das Polyhedrin-Gen (*ph*-Gen) deletiert und durch eine Expressionskassette ersetzt. Polyhedrin ist der essentielle Proteinbaustein der Hüllmatrix der OBs [17, 18]. Diese Hüllmatrix schützt die in den OBs befindlichen ODV vor äußeren Einflüssen und ermöglicht so das Überdauern der infektiösen ODV bis zum Fraß von OB-kontaminierten Pflanzenteilen durch Wirtstiere. Auch für die Passage durch den Verdauungstrakt sind die OB essentiell und gewährleisten die Freisetzung von ODV im Darm. Die Replikation der Baculoviren, einschließlich des Zusammenbaus der Kapside und der Verpackung der viralen DNA, findet im Kern am virogenen Stroma statt. Zum frühen Zeitpunkt des Replikationszyklus, wenn noch nicht so viele Genome in Kapsiden verpackt vorliegen, können diese frühen Nukleokapside aus dem Kern transportiert werden, gelangen zur Zellmembran und werden dort über einen *budding*-Prozess als von Zellmembran umhüllte BV freigesetzt [26]. Zu einem späteren Zeitpunkt des Replikationszyklus werden so viele Nukleokapside im Kern gebildet, dass ein einfacher Transport über die Kernmembran nicht mehr möglich ist. Stattdessen werden die Nukleokapside von der Zellkernmembran umhüllt. Bei diesen Kernmembran-umhüllten Nukleokapsiden oder Bündeln von Nukleokapsiden handelt es sich um ODV [26]. Im Anschluss kommt es zur Bildung von OBs durch den Einschluss von ODV in eine parakristalline Polyhedrinstruktur [8]. Bei Deletion des *ph*-Gens akkumulieren unbehüllte ODV in der Zelle [6]. ODV sind im Gegensatz zu BV für *Lepidoptera*-Raupen infektiös und bei 4 °C für mehrere Tage stabil [6]. Es ist daher nicht auszuschließen, dass nach Infektion von *Lepidoptera*-Raupen mit rekombinanten *ph*-deletierten AcMNPV ODV gebildet und nach Verflüssigung des Tierkörpers abgegeben werden. Für kurze Zeiträume könnten sich rekombinante *ph*-deletierte AcMNPV somit in der Umwelt verbreiten. Weiterhin ist nicht auszuschließen,

dass es bei einer Ko-Infektion mit anderen Wildtyp-Baculoviren in infizierten Raupen zur Bildung der kristallinen Polyhedrin-Hüllmatrix der rekombinanten AcMNPV in *trans* durch das Polyhedrin des anderen Baculovirus kommt [27, 28].

Häufig wird in rekombinanten AcMNPV auch das Gen für das P10-Protein deletiert. Die Funktion von P10 ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wurde berichtet, dass P10 beim Aufbau der zusätzlichen Polysaccharidschicht von OBs, der Umstrukturierung des Zytoskelettes und der Lyse der Zellkern- und Zellmembran beteiligt ist [29, 30]. Für die Zelllyse ist P10 essentiell [29]. Für die Bildung von ODV und deren Verpackung in OBs ist P10 nicht essenziell, jedoch verhindert die Deletion des *p10*-Gens Zelllyse und OB-Freisetzung [31].

Rekombinante AcMNPV können von Säugerzellen über Endozytose oder Phagozytose aufgenommen werden. Bei der Aufnahme spielt das Membranfusionsprotein GP64 eine entscheidende Rolle. So nehmen humane und Primatenzellen abhängig von diesen Glykoprotein pseudotypisierte Viren effizient auf [32]. Die Mehrzahl der AcMNPV-spezifischen Promotoren werden in Säugerzellen nicht erkannt [33]. Eine Ausnahme bildet der *early to late* (ETL) Promotor von AcMNPV, der auch in einigen Säugerzellen aktiv ist [34]. Liegt das eingebrachte Transgen jedoch unter Expressionskontrolle von in Säugerzellen aktiven Expressionskassetten vor, werden neben den frühen viralen auch die heterologen Gene transient exprimiert [17, 19–22]. Ein vollständiger viraler Replikationszyklus kann in der Säugerzelle nicht ablaufen, so dass keine viralen Partikel gebildet und abgegeben werden [17]. Die eingebrachte baculovirale DNA gelangt zwar in den Zellkern der transduzierten Zelle, eine Integration erfolgt jedoch nur bei entsprechendem Selektionsdruck [22, 35, 36]. Bei entsprechendem Selektionsdruck kann es zur illegitimen Rekombination kommen, bei der 3,8 bis 17,9 kbp große DNA-Fragmente ins Genom mit einer Häufigkeit von einem positiven Klon je 39 bis 100 Zellen integrieren können [35, 36]. Ohne Selektionsdruck verbleibt die baculovirale DNA i. d. R. bis zu 14 Tage in Säugerzellen [37–42]. Eine Expression von Transgenen über diesen Zeitpunkt hinaus ist i. d. R. nicht nachweisbar [43–46]. In Abhängigkeit von Zelltyp und Transduktionsbedingungen konnte virale DNA in differenzierten Myotuben noch nach 63 Tagen [42] und eine Transgenexpression in Fischzellen noch nach 80 Tagen nachgewiesen werden [47].

Im rekombinanten AcMNPV-Genom mit *p10*- und/oder *ph*-Deletion können bis zu 38 kbp fremder DNA aufgenommen werden [48]. Die Expression des Transgens unterliegt in der Regel dann der Kontrolle insektenspezifischer Promotoren. Zur Herstellung rekombinanter AcMNPV wurden anfänglich die heterologen Gene über homologe Rekombination in das AcMNPV-Genom eingefügt. Im Jahr 1993 wurde eine Methode beschrieben, nach der über spezifische Transposition das fremde Gen von einem Spender-Plasmid auf klonierte AcMNPV-DNA (Bacmid) in *E. coli* DH10 übertragen wird. Das Bacmid ist eine rekombinante baculovirale DNA, die in *E. coli* als Plasmid replizieren kann und für *Lepidoptera*-Zellen infektiös ist. Sie enthält ein mini-F-Replikon, einen Antibiotika-Resistenzmarker und die Zielnukleinsäuresequenz *att*Tn7 des Transposons Tn7. Eine Expressionskassette mit dem heterologen Gen unter regulatorischer Kontrolle des *ph*- oder *p10*-Promotors und des SV40-Polyadenylierungssignals, die vom linken und rechten Ende von Tn7 flankiert wird und auf dem Spender-Plasmid liegt, kann in *E. coli* dann in die *att*Tn7-Stelle des Bacmids transponiert werden, wenn die Transpositionsfunktion von Tn7 in *trans* durch ein Helfer-Plasmid zur Verfügung gestellt wird. Diese Methode wurde als *Bac-to-Bac*-System bezeichnet [49] und in der Folge weiter entwickelt [50, 51]. Um rekombinante Baculoviren für die Genexpression in Säugerzellen zu optimieren, wurden beispielsweise Vektorsysteme entwickelt, die zwei Expressionskassetten gleichzeitig auf AcMNPV-DNA übertragen, wobei eine Kassette das heterologe Gen von Interesse enthält und

BVL_FO_05_4100_402_V1.9

die zweite das Gen eines Glykoproteins, welches zur effizienten Transduktion von Säugerzellen in die virale Hülle eingebaut wird, wie z. B. das Glykoprotein von *Vesiculovirus indiana* (VSV) [52]. Ein weiterer Ansatz verfolgt die gezielte Expression eines Transgens in der Säugerzelle. Das Transgen unterliegt dabei der Expressionskontrolle eines RNA-Polymerase-II-spezifischen Promotors, wie z. B. des SV40-Promotors oder des *Cytomegalovirus human-beta5 (Human cytomegalovirus*, HCMV*) major immediate early*-Promotors (HCMV-MIE-Promotors) und des SV40-Polyadenylierungssignals (BacMam-Technologie [19, 33]).

Baculovirale Vektoren können *in vivo* in Säugern aufgrund der Inaktivierung durch das Komplementsystem nur in immunprivilegierten Gewebetypen eingesetzt werden. Die Transduktionsrate baculoviraler Vektoren ist bei Applikation in das Auge von Kaninchen vergleichbar mit der Transduktionsrate von Vektoren, die von Adeno-assoziierten Viren (AAV) abgeleitet sind [53]. Genauso wie bei *in vitro*-Untersuchungen ist die Expression von Transgenen maximal zwei Wochen nachweisbar. In Geweben mit aktivem Komplementsystem werden nur sehr vereinzelt Zellen transduziert, wobei v. a. Zellen nahe der Einstichstelle transduziert werden [54].

In definierten baculoviralen Vektorsystemen werden zusätzlich die Gene *chiA* und *v-cath* deletiert, die für eine Chitinase bzw. die Cysteinprotease Cathepsin kodieren [55, 56]. Die Deletion beider Gene bewirkt, dass die Vektoren die Tierkörper nicht mehr verflüssigen können [56–58]. Als Nebeneffekt ist die Expression membrangebundener, nukleärer, sekretorischer und zytoplasmatischer Proteine mit diesen Vektorsystemen verbessert [59, 60]. Die Virulenz und Bildung von ODV und OBs wird durch die Deletion beider Gene nicht beeinflusst [57]. Durch das Ausbleiben der Verflüssigung des Wirtsorganismus gelangen weniger oder gar keine OBs mit infektiösen ODV in die Umwelt. Dadurch kommt es zu einer Unterbrechung des baculoviralen Übertragungszyklus.

Neben rein baculoviralen Vektorsystemen wurden auch Hybridsysteme entwickelt, um die Verweildauer viraler DNA in Vertebratenzellen zu erhöhen und die Expressionszeiträume entsprechend zu verlängern. Dafür wurden u. a. Hybride mit AAV erzeugt, bei denen ein Nukleinsäureabschnitt für die *inverted terminal repeat* zusammen mit dem *rep*-Leserahmen von AAV in das baculovirale Genom integriert wurden, um eine episomale Replikation bzw. eine Integration in das humane Chromosom 19, wo das Genom von AAV-Vektoren bevorzugt integriert wird, zu ermöglichen [44]. In anderen Ansätzen wurden Epstein-Barr-Virus-(EBV)-Hybridvektoren erzeugt, bei denen der *oriP*-Replikationsursprung und das *EBNA-1*-Gen, welches die episomale Replikation des EBV kontrolliert, in das baculovirale Genom integriert wurden [45]. Die vorliegende Stellungnahme deckt nicht die Bewertung solcher Hybridvektoren ab.

Empfehlungen

1) Rekombinante AcMNPV mit unveränderter oder pseudotypisierter Hülle, die ein heterologes Gen ohne Gefährdungspotenzial übertragen, werden gemäß § 5 Abs. 1 i. V. m. Anlage 1 Nr. 2 GenTSV der **Risikogruppe 1** zugeordnet. Dabei ist es nicht relevant, welcher Promotor die Expression des Gens kontrolliert.

2) Rekombinante AcMNPV mit unveränderter oder pseudotypisierter Hülle, die heterologe Gene mit Gefährdungspotenzial für Säuger, wie z. B. Gene für immunmodulierende Proteine (Ausnahmen: Toxine, Onkogene und Prion-Protein-Gene), unter Kontrolle eines in Säugerzellen oder Insektenzellen aktiven Promotors übertragen, werden gemäß § 5 Abs. 1 i. V. m. Anlage 1 Nr. 2 GenTSV der **Risikogruppe 1** zugeordnet.

BVL_FO_05_4100_402_V1.9

3) Rekombinante AcMNPV mit unveränderter Hülle, die heterologe Gene mit Gefährdungspotenzial für Insekten unter Kontrolle eines insektenspezifischen Promotors kodieren, werden gemäß § 5 Abs. 1 i. V. m. Anlage 1 Nr. 2 GenTSV der **Risikogruppe 1** zugeordnet, wenn in ihrem Genom die *chiA-, v-cath*-, *p10*- und *ph*-Gene inaktiviert wurden. Sind die rekombinanten AcMNPV in der Form pseudotypisiert, dass sich der Wirtsbereich auf weitere Insektenspezies erweitert, und/oder liegt in ihrem Genom das *chiA*- und *v-cath*-Gen aktiv vor, so bedarf es einer Einzelfallbewertung.

4) Rekombinante AcMNPV mit unveränderter oder pseudotypisierter Hülle, die Gene für Toxine ohne insektizide Wirkung, Onkogene gemäß der Stellungnahme der ZKBS zu Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Nukleinsäuren mit neoplastisch transformierendem Potenzial (Az. 6790-10-01, aktualisiert Dezember 2016) oder ein Prion-Protein (PrP)-Gen mit Deletionen im C-Terminus oder anderer PrP-Varianten mit hoher Wahrscheinlichkeit zur spontanen Konversion entsprechend der Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von gentechnischen Arbeiten zur Expression von Prion-Proteinen (Az. 402.08020203.0002.0006, aktualisiert März 2025) unter Kontrolle eines nur in Insektenzellen aktiven Promotors tragen (Ausnahme hochwirksame Toxine gem. § 3 Satz 5 GenTSV), werden gemäß § 5 Abs. 1 i. V. m. Anlage 1 Nr. 2 GenTSV der **Risikogruppe 1** zugeordnet.

5) Rekombinante AcMNPV mit unveränderter oder pseudotypisierter Hülle, die ein Onkogen gemäß der Stellungnahme der ZKBS zu Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Nukleinsäuren mit neoplastisch transformierendem Potenzial (Az. 6790-10-01, aktualisiert Dezember 2016) oder ein PrP-Gen mit Deletionen im C-Terminus oder anderer PrP-Varianten mit hoher Wahrscheinlichkeit zur spontanen Konversion entsprechend der Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von gentechnischen Arbeiten zur Expression von Prion-Proteinen (Az. 402.08020203.0002.0006, aktualisiert März 2025) in Säugerzellen exprimieren können, werden gemäß § 5 Abs. 1 i. V. m. Anlage 1 Nr. 2 GenTSV der **Risikogruppe 2** zugeordnet.

6) Rekombinante AcMNPV mit unveränderter oder pseudotypisierter Hülle, die Gene für Toxine unter Kontrolle eines in Säugerzellen aktiven Promotors oder Gene für hochwirksame Toxine unter Kontrolle eines in Insektenzellen aktiven Promotors tragen, bedürfen einer Einzelfallbewertung.

Begründung

Obwohl Baculoviren in der Landwirtschaft als Pestizide eingesetzt werden und von humanen und zahlreichen tierischen Zellen aufgenommen werden können, sind keine schädlichen Auswirkungen auf den Menschen oder Tiere (Ausnahme: Larven von *Lepidoptera, Hymenoptera* und *Diptera*) festgestellt worden. Nach Pseudotypisierung mit heterologen Glykoproteinen kann dabei von einer erhöhten Effizienz der Virusaufnahme ausgegangen werden. Die übertragene DNA ist aber lediglich für die Zellen der entsprechenden Insektenwirte infektiös.

Ist das heterologe Gen ohne pathogenes Potenzial, erhöht sich das Gefährdungspotenzial des rekombinanten AcMNPV gegenüber Wildtyp-Baculoviren nicht. Die virale DNA repliziert nicht in Säugerzellen und wird ohne artifiziellen Selektionsdruck nicht in das Genom der Wirtszelle integriert. Die Expression des heterologen Gens in Zellen von Vertebraten erfolgt nur, wenn

ein geeigneter Promotor verwendet wird und lediglich transient (abhängig vom Zelltyp für einen Zeitraum von einer bis zu elf Wochen).

Werden jedoch Gene mit neoplastisch transformierendem Potenzial, oder aber solche, die für PrP kodieren, die eine hohe Wahrscheinlichkeit zur spontanen Konversion ohne physikalisch-chemische Vorbehandlung aufweisen, hoch exprimiert, kann unter bestimmten Umständen ein geringes Risiko für den Experimentator nicht ausgeschlossen werden. Liegen diese Gene in Kassetten vor, die eine hohe Expression in Säugerzellen ermöglichen, werden für den Umgang mit den rekombinanten Viruspartikeln Maßnahmen der Sicherheitsstufe 2 empfohlen.

Für die baculovirale Expression von PrP in Zellkultur ist Abschnitt 2.4 der Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von gentechnischen Arbeiten zur Expression von Prionproteinen (Az. 402.08020203.0002.0006) zu beachten.

Das Gefährdungspotenzial baculoviraler Vektoren, die Gene mit neoplastisch transformierendem Potenzial übertragen, wird von der Dauer und Stärke der Expression bestimmt, ebenso wie von deren in dem kurzen Zeitfenster grundsätzlich erreichbaren Wirkung. Eine Herabstufung der GVO in Risikogruppe 1 ist aufgrund der Literaturlage und/oder experimenteller Evaluierung möglich. Als zusätzliche Sicherheitsmaßnahme empfiehlt die ZKBS beim Umgang mit solchen GVO folgende Vorsichtsmaßnahmen für den Personenschutz einzuhalten:

- Tragen einer Schutzbrille
- Tragen von Einmalhandschuhen
- Tragen eines Mund- und Nasenschutzes zur Vermeidung einer nasalen oder oralen Aufnahme durch direkten Kontakt
- diese Arbeiten sollten nicht von Menschen mit Barrierestörungen der Haut durchgeführt werden

Wird ein sonstiges heterologes Gen mit Gefährdungspotenzial mit einem rekombinanten AcMNPV übertragen, kommt es zur transienten Expression des Gens in infizierten Insekten- oder Säugerzellen. Für abwehrgesunde Säuger besteht i. d. R. kein Gefährdungspotenzial, da auch rekombinante Partikel durch das Komplementsystem inaktiviert werden und die Expression in einzelnen, ggf. infizierten Zellen keine systemischen Effekte hat und nur transient erfolgt. Ist in dem AcMNPV-Genom das *chiA*-, *v-cath*-, *p10*- und *ph*-Gen inaktiviert, so ist eine Verbreitung solcher rekombinanter Partikel in *Lepidoptera*-, *Hymenoptera*- und *Diptera*-Populationen auszuschließen, da keine OBs gebildet werden und aufgrund der ausbleibenden Zelllyse in infizierten Wirtszellen und der ausbleibenden Verflüssigung des Tierkörpers die Freisetzung infektiöser ODV stark verringert ist. Von diesen rekombinanten Partikeln geht auch für die Larven der Wirtstiere (*Lepidoptera, Hymenoptera* und *Diptera*) kein Gefährdungspotenzial aus.

BVL_FO_05_4100_402_V1.9

Literatur

1. **Friesen PD** (2013). Insect Viruses. *In* Knipe DM, Howley PM (Hrsg.), Fields virology, 6th ed.. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.
2. **Volkman LE, Goldsmith PA** (1983). *In Vitro* Survey of *Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus* Interaction with Nontarget Vertebrate Host Cells. *Appl Environ Microbiol* **45**(3):1085–93.

3. **O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA** (1994). Baculovirus expression vectors. A laboratory manual. Oxford University Press, New York
4. **van Oers MM, Vlak JM** (2007). Baculovirus genomics. *Curr Drug Targets* **8**(10):1051–68.
5. **Hefferon KL, Oomens AGP, Monsma SA, Finnerty CM, Blissard GW** (1999). Host Cell Receptor Binding by Baculovirus GP64 and Kinetics of Virion Entry. *Virology* **258**(2):455–68.
6. **Wood HA, Trotter KM, Davis TR, Hughes PR** (1993). Per Os Infectivity of Preoccluded Virions from Polyhedrin-Minus Recombinant Baculoviruses. *J Invertebr Pathol* **62**(1):64–7.
7. **Federici BA** (1997). Baculovirus Pathogenesis. *In* Miller LK (Hrsg.), The Baculoviruses, S. 33–59. Springer US, Boston, MA.
8. **Summers MD** (2006). Milestones leading to the genetic engineering of baculoviruses as expression vector systems and viral pesticides. *Adv Virus Res* **68**:3–73.
9. **Williams T** (2023). Soil as an Environmental Reservoir for Baculoviruses: Persistence, Dispersal and Role in Pest Control. *Soil Syst* **7**(1):1–23.
10. **Peng F, Fuxa JR, Richter AR, Johnson SJ** (1999). Effects of Heat-Sensitive Agents, Soil Type, Moisture, and Leaf Surface on Persistence of Anticarsia gemmatalis (Lepidoptera: Noctuidae) Nucleopolyhedrovirus. *Environ Entomol* **28**(2):330–8.
11. **Prater CA, Redmond CT, Barney W, Bonning BC, Potter DA** (2006). Microbial control of black cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) in turfgrass using Agrotis ipsilon multiple nucleopolyhedrovirus. *J Econ Entomol* **99**(4):1129–37.
12. **Fuxa JR, Matter MM, Abdel-Rahman A, Micinski S, Richter AR, Flexner JL** (2001). Persistence and Distribution of Wild-Type and Recombinant Nucleopolyhedroviruses in Soil. *Microb Ecol* **41**(3):222–31.
13. **Erler S, Eckert JH, Steinert M, Alkassab AT** (2022). Impact of microorganisms and entomopathogenic nematodes used for plant protection on solitary and social bee pollinators: Host range, specificity, pathogenicity, toxicity, and effects of experimental parameters. *Environ Pollut* **302**:1–24.
14. **Tjia ST, Altenschildesche GM zu, Doerfler W** (1983). *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV) DNA does not persist in mass cultures of mammalian cells. *Virology* **125**(1):107–17.
15. **Gröner A, Granados RR, Burand JP** (2008). Interaction of *Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus* with Two Nonpermissive Cell Lines. *Intervirology* **21**(4):203–9.
16. **Miltenburger HG, Reimann R** (1980). Viral pesticides : biohazard evaluation on the cytogenetic level. *Dev Biol Stand* **46**:217–22.
17. **Kost TA, Condreay JP** (2002). Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends Biotechnol* **20**(4):173–80.
18. **Hofmann C, Strauss M** (1998). Baculovirus-mediated gene transfer in the presence of human serum or blood facilitated by inhibition of the complement system. *Gene Ther* **5**(4):531–6.
19. **Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL** (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol* **23**(5):567–75.
20. **Condreay JP, Kost TA** (2007). Baculovirus expression vectors for insect and mammalian cells. *Curr Drug Targets* **8**(10):1126–31.
21. **Ghosh S, Parvez MK, Banerjee K, Sarin SK, Hasnain SE** (2002). Baculovirus as mammalian cell expression vector for gene therapy: an emerging strategy. *Mol Ther* **6**(1):5–11.
22. **Chen C-Y, Lin C-Y, Chen G-Y, Hu Y-C** (2011). Baculovirus as a gene delivery vector: recent understandings of molecular alterations in transduced cells and latest applications. *Biotechnol Adv* **29**(6):618–31.
23. **Sari-Ak D, Alomari O, Shomali RA, Lim J, Thimiri Govinda Raj DB** (2022). Advances in CRISPR-Cas9 for the Baculovirus Vector System: A Systematic Review. *Viruses* **15**(1):54.
24. **Gupta K, Tölzer C, Sari-Ak D, Fitzgerald DJ, Schaffitzel C, Berger I** (2019). MultiBac: Baculovirus-Mediated Multigene DNA Cargo Delivery in Insect and Mammalian Cells. *Viruses* **11**(3):1–17.
25. **Maghodia AB, Jarvis DL, Geisler C** (2014). Complete Genome Sequence of the *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus Strain E2. *Genome Announc* **2**(6):1–2.

BVL_FO_05_4100_402_V1.9

26. **Zhao S, He G, Yang Y, Liang C** (2019). Nucleocapsid Assembly of Baculoviruses. *Viruses* **11**(7):1–9.
27. **Hamblin M, van Beek NA, Hughes PR, Wood HA** (1990). Co-occlusion and persistence of a baculovirus mutant lacking the polyhedrin gene. *Appl Environ Microbiol* **56**(10):3057–62.
28. **Wood HA, Hughes PR, Shelton A** (1994). Field Studies of the Co-Occlusion Strategy with a Genetically Altered Isolate of the Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus. *Environ Entomol* **23**(2):211–9.
29. **Carpentier DCJ, King LA** (2009). The long road to understanding the baculovirus P10 protein. *Virol Sin* **24**(4):227–42.
30. **Carpentier DCJ, Griffiths CM, King LA** (2008). The baculovirus P10 protein of Autographa californica nucleopolyhedrovirus forms two distinct cytoskeletal-like structures and associates with polyhedral occlusion bodies during infection. *Virology* **371**(2):278–91.
31. **Williams GV, Rohel DZ, Kuzio J, Faulkner P** (1989). A cytopathological investigation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p10 gene function using insertion/deletion mutants. *J Gen Virol* **70 (Pt 1)**:187–202.
32. **Oomens AGP, Wertz GW** (2004). The baculovirus GP64 protein mediates highly stable infectivity of a human respiratory syncytial virus lacking its homologous transmembrane glycoproteins. *J Virol* **78**(1):124–35.
33. **Boyce FM, Bucher NL** (1996). Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(6):2348–52.
34. **Liu Y-k, Chu C-c, Wu T-y** (2006). Baculovirus ETL promoter acts as a shuttle promoter between insect cells and mammalian cells. *Acta Pharmacol Sin* **27**(3):321–7.
35. **Merrihew RV, Clay WC, Condreay JP, Witherspoon SM, Dallas WS, Kost TA** (2001). Chromosomal integration of transduced recombinant baculovirus DNA in mammalian cells. *J Virol* **75**(2):903–9.
36. **Condreay JP, Witherspoon SM, Clay WC, Kost TA** (1999). Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(1):127–32.
37. **Ho Y-C, Chen H-C, Wang K-C, Hu Y-C** (2004). Highly efficient baculovirus-mediated gene transfer into rat chondrocytes. *Biotechnol Bioeng* **88**(5):643–51.
38. **Lo W-H, Hwang S-M, Chuang C-K, Chen C-Y, Hu Y-C** (2009). Development of a Hybrid Baculoviral Vector for Sustained Transgene Expression. *Mol Ther* **17**(4):658–66.
39. **Kitajima M, Hamazaki H, Miyano-Kurosaki N, Takaku H** (2006). Characterization of baculovirus Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus infection in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **343**(2):378–84.
40. **Sung L-Y, Lo W-H, Chiu H-Y, Chen H-C, Chung C-K, Lee H-P, Hu Y-C** (2007). Modulation of chondrocyte phenotype via baculovirus-mediated growth factor expression. *Biomaterials* **28**(23):3437–47.
41. **Wang K-C, Wu J-C, Chung Y-C, Ho Y-C, Chang MD-T, Hu Y-C** (2005). Baculovirus as a highly efficient gene delivery vector for the expression of hepatitis delta virus antigens in mammalian cells. *Biotechnol Bioeng* **89**(4):464–73.
42. **Shen H-C, Yeh C-N, Chen G-Y, Huang S-F, Chen C-Y, Chiu Y-C, Hu Y-C** (2008). Sustained baculovirus-mediated expression in myogenic cells. *J Gene Med* **10**(11):1190–7.
43. **Martyn JC, Dong X, Holmes-Brown S, Pribul P, Li S, Drummer HE, Gowans EJ** (2007). Transient and stable expression of the HCV envelope glycoproteins in cell lines and primary hepatocytes transduced with a recombinant baculovirus. *Arch Virol* **152**(2):329–43.
44. **Palombo F, Monciotti A, Recchia A, Cortese R, Ciliberto G, La Monica N** (1998). Site-specific integration in mammalian cells mediated by a new hybrid baculovirus-adeno-associated virus vector. *J Virol* **72**(6):5025–34.
45. **Shan L, Wang L, Yin J, Zhong P, Zhong J** (2006). An OriP/EBNA-1-based baculovirus vector with prolonged and enhanced transgene expression. *J Gene Med* **8**(12):1400–6.

BVL_FO_05_4100_402_V1.9

46. **Liu X, Li Y, Hu X, Yi Y, Zhang Z** (2017). Gene delivery and gene expression in vertebrate using baculovirus Bombyx mori nucleopolyhedrovirus vector. *Oncotarget* **8**(62):106017–25.
47. **Huang F, Cao S, Cui X, Xiong C, Wang M, Lu Y, Wang W, Ye J, Liu X** (2011). Efficient gene delivery into fish cells by an improved recombinant baculovirus. *J Virol Methods* **173**(2):294–9.
48. **Cheshenko N, Krougliak N, Eisensmith RC, Krougliak VA** (2001). A novel system for the production of fully deleted adenovirus vectors that does not require helper adenovirus. *Gene Ther* **8**(11):846–54.
49. **Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO** (1993). Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol* **67**(8):4566–79.
50. **Trowitzsch S, Palmberger D, Fitzgerald D, Takagi Y, Berger I** (2012). MultiBac complexomics. *Expert Rev Proteomics* **9**(4):363–73.
51. **Berger I, Fitzgerald DJ, Richmond TJ** (2004). Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes. *Nat Biotechnol* **22**(12):1583–7.
52. **El-Sheikh AAK, van den Heuvel JJMW, Koenderink JB, Russel FGM** (2007). Interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with multidrug resistance protein (MRP) 2/ABCC2- and MRP4/ABCC4-mediated methotrexate transport. *J Pharmacol Exp Ther* **320**(1):229–35.
53. **Kinnunen K, Kalesnykas G, Mähönen AJ, Laidinen S, Holma L, Heikura T, Airenne K, Uusitalo H, Ylä-Herttuala S** (2009). Baculovirus is an efficient vector for the transduction of the eye: comparison of baculovirus- and adenovirus-mediated intravitreal vascular endothelial growth factor D gene transfer in the rabbit eye. *J Gene Med* **11**(5):382–9.
54. **Heikura T, Nieminen T, Roschier MM, Karvinen H, Kaikkonen MU, Mähönen AJ, Lesch HP, Rissanen TT, Laitinen OH, Airenne KJ, Ylä-Herttuala S** (2012). Baculovirus-mediated vascular endothelial growth factor-D(ΔNΔC) gene transfer induces angiogenesis in rabbit skeletal muscle. *J Gene Med* **14**(1):35–43.
55. **Slack JM, Kuzio J, Faulkner P** (1995). Characterization of v-cath, a cathepsin L-like proteinase expressed by the baculovirus Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus. *J Gen Virol* **76 (Pt 5)**:1091–8.
56. **Hawtin RE, Zarkowska T, Arnold K, Thomas CJ, Gooday GW, King LA, Kuzio JA, Possee RD** (1997). Liquefaction of *Autographa californica nucleopolyhedrovirus*-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. *Virology* **238**(2):243–53.
57. **Suzuki T, Kanaya T, Okazaki H, Ogawa K, Usami A, Watanabe H, Kadono-Okuda K, Yamakawa M, Sato H, Mori H, Takahashi S, Oda K** (1997). Efficient protein production using a Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus lacking the cysteine proteinase gene. *J Gen Virol* **78 (Pt 12)**:3073–80.
58. **Hom LG, Volkman LE** (2000). Autographa californica M nucleopolyhedrovirus *chiA* is required for processing of V-CATH. *Virology* **277**(1):178–83.
59. **Kaba SA, Salcedo AM, Wafula PO, Vlak JM, van Oers MM** (2004). Development of a chitinase and v-cathepsin negative bacmid for improved integrity of secreted recombinant proteins. *J Virol Methods* **122**(1):113–8.
60. **Hitchman RB, Possee RD, Siaterli E, Richards KS, Clayton AJ, Bird LE, Owens RJ, Carpentier DCJ, King FL, Danquah JO, Spink KG, King LA** (2010). Improved expression of secreted and membrane-targeted proteins in insect cells. *Biotechnol Appl Biochem* **56**(3):85–93.