

271974712



# **BIOLOGISCHE SICHERHEIT**

**BAND 3 · 1994**

**Forschung  
Biotechnologie**

Gefördert durch das  
Bundesministerium für Forschung und Technologie  
im Rahmen des Programms  
„Biotechnologie 2000“

## Inhaltsverzeichnis

### Vorwort

#### Verbundprojekt

<b>Gentransfer bei Bakterien und Verhalten gentechnisch veränderter Bakterien im Boden und Wasser bei Freisetzungssimulation (Einführung) .....</b>	<b>1</b>
- DNA-Entlassung aus Bakterien, DNA-Überdauerung und genetische Transformation im natürlichen Lebensraum .....	9
<b>W. Wackernagel, M. Lorenz</b>	
- Gentransfer bei Bakterien und Überleben gentechnisch veränderter Bakterien im Boden- und Grundwasserbereich: Überlebensdauer, Adsorption und Transport .....	35
<b>H. Claus, Z. Filip</b>	
- A) Konjugativer Transfer gentechnisch veränderter Plasmide	
B) Konjugativer Transfer gentechnisch veränderter Plasmide bei Freisetzungssimulation ....	83
<b>W. Klingmüller, G. Rieder</b>	
- Konjugativer Gentransfer und Überleben gentechnisch veränderter Bakterien in Abwasser und Oberflächenwasser unter simulierten Freisetzungsbedingungen .....	107
<b>E. Schneider, B. Schaefer, I. Feuerpfeil</b>	

**Verbundprojekt**

**Biologische Sicherheitsforschung zur Freisetzung gentechnisch veränderter Rhizobium meliloti Stämme: Überleben, Verbreitung und Wechselwirkung des freigesetzten Organismus mit der endogenen Bodenmikroflora zweier Freisetzungsorte (Einführung) .....**

131

- Risikoanalysen zur Freisetzung gentechnologisch veränderter Rhizobien: Analyse der Wechselwirkung zwischen gentechnisch verändertem Organismus und Modell-Ökosystemen .....
- W. Selbitschka, M. Hagen, S. Niemann, A. Pühler**

137

- Entwicklung und praxisorientierte Erprobung genetischer Sonden zum Nachweis (Monitoring) von Rhizobium-Stämmen: Pilotprojekt Modellfreisetzungen .....
- P. Sieber, S. Ströhlein, D. Fuchs, W. Lotz**

157

- Entwicklung molekulargenetischer Monitoringverfahren für gentechnisch veränderte Rhizobium-Bakterien sowie Untersuchung ihrer genetischen Stabilität und Lebensfähigkeit

Minimierung des Transferrisikos rekombinanter DNS durch resistenzgenfreie chromosomale Integration heterologer Gene bei Rhizobium leguminosarum

Analyse von Insertionssequenzen und deren Erprobung als genetische Sonden für das Monitoring von Rhizobium leguminosarum Stämmen im Rahmen einer Langzeitstudie und darauf basierenden Modellfreisetzungen .....

**P. Lentzsch, A. Ulrich**

189

**Verbundprojekt**

**Extrachromosomale Fremd-DNA in transgenen Pflanzen**  
- Untersuchungen zur Persistenz von Agrobakterien und zum Gentransfer in Endophyten .....

- Teilprojekt BBA Braunschweig .....
- J. Schiemann, J. Landsmann, C. van der Hoeven, A. Riedel-Preuss, R. Zweigerdt, A. Matzk, R. S. Conlau, H. Gunson**

223

- Teilprojekt TU Braunschweig ..... 233  
**R.R. Mendel, M. Donath, K. Greger, T. Koprek,  
 J. Schulze, B. Zeller**

**Verbundprojekt**

**Ausbreitung und Evolution der Streptothricinacetyltransferase-Determinanten (Streptothricinresistenz) in Bakterien aus unterschiedlichen Habitaten - Modell zum Umweltmonitoring und zur Risikoabschätzung bei Freisetzungsexperimenten (Einführung) ..... 243**

- Analyse der molekularen Organisation der Streptothricinacetyltransferase und ihrer evolutionären Beziehungen ..... 251  
**H. Tschäpe, E. Tietze, R. Prager, K. Smalla**

- Untersuchungen zum Nachweis von Streptothricin-Resistenzgenen in Bodenhabitaten und zum Überleben und Transfer solcher Resistenzgene in Modellökosystemen und unter Feldbedingungen ... 289  
**R. Rukall, H. Tschäpe, K. Smalla**

- Vorkommen und molekulare Charakterisierung der SAT-Determinanten in *Campylobacter* spp. .... 315  
**J. Jacob, K. Bischoff**

**Verbundprojekt**

**Biologische Sicherheit gentechnisch veränderter Mikroorganismen in der Lebens- und Futtermittelbiotechnologie**

- Verhalten gentechnisch veränderter Bakterien bei der Herstellung von Rohwurst - ein Risikomodell auf der Grundlage von horizontalem Gentransfer ..... 335  
**R. F. Vogel, H. J. Knauf, M. Obst,  
 P. S. Tichaczek, W. P. Hammes**

- Entwicklung von Nachweismethoden ..... 365  
**Ch. Hertel, M. Ehrmann, W. Ludwig,  
 K. H. Schleifer**

- Verhalten gentechnisch veränderter Bakterien in Joghurt .....	381
<b>H. Neve, A. Geis, T. Janzen, K. Sieg, K. J. Heller</b>	
- Entwicklung eines Modellsystems zur Untersuchung der Biologischen Sicherheit gentechnisch veränderter Lactobacillen in der Fermentation von Lebensmitteln .....	401
<b>J. Klein, B. Henrich, Ch. Ulrich, E. Meyer, K. Stucky, K. Vongerichten, U. Schmidt, R. Plapp</b>	
- Entwicklung von Sicherheitsvektoren bei <i>Staphylococcus carnosus</i> und Untersuchung von Stabilität und Mobilität dieser Vektoren in der Fermentation und während der Rohwurstreifung .....	435
<b>E. Wagner, M. Gering, R. Brückner, F. Götz</b>	
—————	
- Biologische Sicherheit im Umgang mit rekombinanten Säugerzellen .....	463
<b>P. Artelt, J. Bode, Ch. Mielke, R. Grannemann, T. Heinemeyer, D. Klehr, M. Wirth, H. Hauser</b>	
- Gentechnik und Sicherheit im Freiland - Experimentelle Risikoabschätzung und Erteilung von Ausnahmegenehmigungen entsprechend den Richtlinien .....	503
<b>H. Backhaus, A. Dietz, C. van der Hoeven, J. Landsmann, F. Niepold, K. Wendt-Potthoff</b>	
- Begleitende Sicherheitsforschung zur Freisetzung gentechnisch veränderter Petunien .....	563
<b>J. Becker, H. Siegert, J. Logemann, J. Schell</b>	
- Identifizierung und Messung von Parametern zur Beurteilung der potentiellen Risiken bei der Entsorgung von rekombinanten tierischen Zellkulturen im Produktionsmaßstab .....	579
<b>K. Bergemann, W. Noé, F. Walz</b>	
- Genetische Stabilität des Tollwutvirus .....	633
<b>K. K. Conzelmann, M. Schnell, T. Mebatsion J. Cox</b>	

- Curriculum: "Sicherheit in der Biotechnologie" .....	64I
<b>A. J. Driesel</b>	
- Die Rolle des Genaustausches in der Biologi- schen Sicherheit und für die Variabilität in Streptomyces .....	673
<b>C. Fendrich, B. Kloß, S. Irnich, B. Kochte- Clemens, M. Redenbach, K. Vongerichten, W. Rörig, A. Arnold, J. Cullum</b>	
- Ökologische und analytische Studien an gentech- nisch veränderten industriellen Produktionsor- ganismen und Abbaustämmen in Klärfloren .....	69I
<b>J. Goldschmidt, K. Kassel, K. M. Taleghani, A. Mehling, C. Rössler, E. Schmidt, U. Wehmeier, W. Piepersberg</b>	
- Untersuchungen zur Übertragung von Genen zwischen Gram-negativen und Gram-positiven Mikroorganismen .....	725
<b>G. Gottschalk, P. Dürre</b>	
- Brauchbarkeit und Grenzen von Verfahren für den Nachweis von Baculoviren nach deren Freisetzung	74I
<b>G. Hachula, J. M. López-Pila, S. Gräff, J. Huber</b>	
- Ausbreitung, Nachweis und Genomstruktur von re- kombinanten Escherichia coli K12-Stämmen .....	779
<b>J. Hacker, M. Ott</b>	
- Auswirkungen der Freisetzung bakterieller Mono- kulturen auf die natürliche Mikroflora aquatischer Ökosysteme .....	795
<b>M. G. Höfle</b>	
- Versuche zur Untersuchung eines möglichen Gen- transfers zwischen transgenen höheren Pflanzen und Aspergillus niger .....	82I
<b>T. Hoffmann, C. Golz, O. Schieder</b>	
- Sicherheitsforschung zur Gentechnik bei Baculo- viren: Rekombination und Transposition als mögliche Ursachen eines horizontalen Gentransfers .....	833
<b>J. A. Jehle, E. Fritsch, H. Backhaus, J. Huber</b>	

- Studien zur Verwendung extrachromosomal replizierender Kopien der DNA1 des African Cassava Mosaic Virus-Vektoren für die Pflanzenforschung <b>H. Kaufmann, P. Meyer</b>	857
- Untersuchung zur Sicherheit mikrobiologischer und bakteriengenetischer Versuche an Gymnasien der BR Deutschland .....	879
<b>E. R. Lucius, H. Bayrhuber</b>	
- Untersuchungen zur in vivo-Transformation von Mikroorganismen in Oberflächengewässern .....	901
<b>M. Mieschendahl, G. Danneberg</b>	
- Mobilität von Genen in Klärfluren .....	917
<b>H. G. Rast, W. Springer</b>	
- Pseudorabiesvirus: Risikostudie gentechnisch hergestellter Lebendimpfstoffe .....	961
<b>H.-J. Rziha, W. Fuchs, M. Schlegel, R. Bernhard</b>	
- Kinetik der satzweisen thermischen Inaktivierung von rekombinanter DNA unter Variation von Temperatur, ph-Wert, Salz- und Proteinkonzentration .....	969
<b>E. A. Sanders, R. A. K. Egyptien, W.-D. Deckwer</b>	
- Möglichkeiten und Risiken der landwirtschaftlichen Nutzung gentechnologisch veränderter Mikroorganismen .....	985
<b>F. R. J. Schmidt, A. Brokamp, R. Henschke, E. Henschke, B. Happe</b>	
- Auswirkungen der Freisetzung nichteinheimischer Gehölzarten am Beispiel von Berlin und Brandenburg .....	1009
<b>H. Sukopp, I. Kowarik</b>	
- Einsatz von gentechnisch veränderten Mikroorganismen (GVO's) zum Abbau von Schadstoffen in der Umwelt (Bioremediation) .....	1035
<b>J. Wagner-Döbler, D. F. Dwyer, K. N. Timmis</b>	
<b>Glossar</b> .....	1057

**Genetische Stabilität des Tollwutvirus**

Karl Klaus Conzelmann

Matthias Schnell

Teshome Mebatsion

James Cox

Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere

Postfach 1149

72001 Tübingen

**ZUSAMMENFASSUNG**

Zur großflächigen Bekämpfung der Fuchstollwut werden heute vorwiegend attenuierte Tollwutviren als Lebendimpfstoffe eingesetzt, in einigen europäischen Ländern inzwischen zusätzlich rekombinante Vaccinia Viren. Ein Risiko bei der Freisetzung von Viren, deren Genom wie beim Tollwutvirus aus RNA besteht, ist deren normalerweise geringe genetische Stabilität, die schnell zur Veränderung der biologischen Eigenschaften der Viren führen kann. Experimentelle Daten, die eine Risikoabschätzung bei der Verwendung von attenuierten Tollwutviren ermöglichen, und die Voraussetzung sind für die Abwägung von Gefährdungspotentialen, die bei der Freisetzung von attenuierten Tollwutviren, bzw. rekombinanten Vaccinia Viren ausgehen, liegen bisher nicht vor. In dem 1992 begonnenen Projekt werden Faktoren untersucht, welche die genetische Stabilität des Tollwutvirus bestimmen, nämlich Mutationsrate und Vorkommen von Rekombinationen. Ein Grund für die hohe Mutationsrate von RNA Genomen ist die fehlende Korrekturfunktion ("proof-reading" Aktivität) von RNA Polymerasen. In unterschiedlich stark konservierten Bereichen des Tollwutvirusgenoms wird die Fehlerrate der Tollwutvirus RNA Polymerase beim Kopieren des Genoms bestimmt. Mechanismen, die an der Rekombination von Tollwutvirus RNA beteiligt sind, werden mit Hilfe von defekten interferierenden (DI) RNAs untersucht.

## EINFÜHRUNG

Im Zuge der Bekämpfung der Fuchstollwut in Europa werden seit einigen Jahren große Mengen Lebendimpfstoff freigesetzt. Dabei handelt es sich vor allem um das attenuierte Tollwutvirus SAD B19. Tollwutviren besitzen ein unsegmentiertes Negativ-Strang-RNA Genom und gehören der Familie Rhabdoviridae an. Im Hinblick auf die Anwendung als Lebendimpfstoff besitzen RNA Viren gegenüber Viren mit DNA-Genom einen entscheidenden Nachteil: Die viralen RNA Polymerasen besitzen keine Korrekturfunktion ("proof-reading" Aktivität). Dies resultiert in einer vergleichsweise hohen Fehlerrate beim Kopieren der viralen Genome und somit in einer hohen genetischen Variabilität der Viren (4,12,13). Dadurch können sich die biologischen Eigenschaften von RNA Viren relativ schnell verändern. Die Attenuierung von pathogenen Viren in der Zellkultur kann durch einzelne oder mehrere Punktmutationen in bestimmten Genombereichen, sogenannten "Virulenzmarkern" bewirkt werden. Wie in vielen RNA-Virussystemen - auch beim Tollwutvirus - gezeigt wurde, kann die Attenuierung des Virus durch Punktmutationen rückgängig gemacht werden. Beim Tollwutvirus wurde bisher lediglich ein Virulenzmarker identifiziert, der jedoch beim SAD B19 Impfvirus nicht betroffen ist (1,2). Die für die fehlende Pathogenität des Virus verantwortlichen Mutationen im Virusgenom konnten noch nicht identifiziert werden. Rekombination stellt ein weiteres wichtiges Element bei der Evolution von RNA Viren dar (14). Vor allem bei Plus-Strang-RNA Viren sind Rekombinationsereignisse zwischen Genomen verwandter Viren sowohl in der Zellkultur als auch unter natürlichen Bedingungen beschrieben. Darüberhinaus kann sogar zelluläre RNA in das Genom von Plus-Strang (BVDV, 7) oder Negativ-Strang RNA Viren (Influenza Virus, 5) eingebaut werden. Bei unsegmentierten Negativ-Strang-RNA Viren (Rhabdoviren und Paramyxoviren) wurde bislang nicht gezeigt, daß durch Rekombination zweier Virusgenome ein neues vermehrungsfähiges Virus entsteht. In beiden Virusfamilien treten jedoch sehr häufig DIs ("defective interfering particles") auf, deren Genome durch Rekombinationsereignisse aus kompletten Virusgenomen entstehen (6,10,11). Solche Tollwutvirus DIs stellen bei dem beschriebenen Projekt wichtige Hilfsmittel dar, mit denen in diesem Virussystem sowohl Rekombinationen als auch Mutationen analysiert werden können.

**METHODEN, ARBEITSPROGRAMM UND STAND DER ARBEITEN**

Erst seit kurzem sind die Voraussetzungen gegeben, um detaillierte Untersuchungen zur Genomstabilität und Rekombination bei Tollwutviren durchführen zu können. Diverse Tollwut- und Tollwut-verwandte Virusgenome wurden als cDNA kloniert und sequenziert (2,15,16, unveröffentlichte Daten). Durch Vergleich der Nukleotidsequenzen wurden stark konservierte und variable Genombereiche identifiziert. Mit entsprechenden differentiellen Hybridisierproben, Primern und definierten serologischen Reagentien können nun minimale Veränderungen in den Virusgenomen nachgewiesen werden. Das "Pseudogen", ein im Vergleich mit anderen Genombereichen hochvariabler Sequenzabschnitt, der keinem Selektionsdruck zu unterliegen scheint, ist für Analysen der Polymerase-Fehlerrate besonders geeignet. Darüberhinaus wurde in unserem Labor ein Tollwutvirus DI (SAD DI-1) isoliert und charakterisiert, dessen Genom lediglich das Polymerase (L) Gen fehlt (3). Das DI konnte daher zunächst nur in Zellen vermehrt werden, die gleichzeitig auch mit Tollwutvirus, das die virale Polymerase zur Verfügung stellt, infiziert sind.

Die erfolgreiche Expression der Polymerase in Kulturzellen, in die das L Gen eingeschleust wurde (unveröffentlichte Ergebnisse), ermöglichte es jedoch, SAD DI-1 völlig unabhängig von infektiösem Tollwutvirus in diesen Zellen (komplementierende Zellen) zu kultivieren, biologisch zu klonieren und zu passagieren. Nun können Veränderungen im Pseudogen des genetisch einheitlichen DI in zwei Systemen untersucht und verglichen werden. In Zellen, die mit infektiösem Tollwutvirus infiziert sind, wird das DI Genom durch die virale Polymerase, welche durch ihre eigene Fehlerrate selbst "variabel" ist, repliziert, in den komplementierenden Zellen aber durch das DNA-kodierte Protein, das genetisch sehr stabil sein sollte. Es werden nun aufeinanderfolgende Passagen des DI in beiden Systemen durchgeführt, die Veränderungen im Pseudogen der DIs werden anschließend durch Sequenzierung analysiert. Die Mutationsrate in Genombereichen von DIs und Tollwutviren, deren Sequenzen einem Selektionsdruck unterliegen, soll anschließend mit der Fehlerrate im Pseudogen verglichen werden. Besondere Bedeutung im Hinblick auf den Einsatz als Lebendvakzine hat hierbei die Stabilität von Neutralisations-epitopen und Virulenzmarkern des Virus.

Die Analyse und der Einsatz von DIs bietet auch für die Untersuchung von Rekombination im Tollwutvirussystem hervorragende Möglichkeiten. DI-RNAs entstehen bei der Replikation von Virusgenomen entweder durch intra- oder intermolekulare Rekombination. Es wird angenommen, daß sich die virale Polymerase während der Synthese der neuen Genom-RNA zusammen mit dieser von der Matritze ablöst, dann aber wieder auf dem noch unvollendeten RNA Strang initiiert und "zurück"-synthetisiert. Dies führt zu sogenannten "copyback" DIs. Alternativ kann eine Reinitiation wieder auf der ursprünglichen Matritze erfolgen (intramolekulare Rekombination), oder aber auf einer zweiten Matritze (intermolekulare Rekombination). Abhängig davon, an welcher Stelle des Genoms die Polymerase wieder initiiert, entstehen DI-RNAs, die gegenüber dem Standardgenom Deletionen besitzen ("internal deletion" DIs) (6,8,10). Die Analyse von DI Genom Sequenzen liefert Aufschluß darüber, ob das "polymerase jumping" in bevorzugten Bereichen des Genoms erfolgt. Bisher wurden fünf Tollwutvirus DIs gefunden, die alle eine Deletion im Bereich des L Gens besitzen. Die geplante Sequenzanalyse wird zeigen, ob ähnliche Sequenzen im Bereich der Rekombinationsstellen liegen.

Zum Nachweis von intermolekularen Rekombinationsereignissen ist der Einsatz von unterschiedlichen DIs vorgesehen. Zur Zeit wird nach DIs gesucht, die Deletionen in anderen Genombereichen als dem L Gen besitzen. Nach Coinfektion von Zellen mit mindestens zwei DIs könnten durch Rekombination neuartige DIs oder aber komplette, infektiöse Viren entstehen. Solche Versuche setzten bislang voraus, daß geeignete natürliche DIs identifiziert werden. Neueste Entwicklungen zeigen jedoch, daß es möglich ist, rekombinante Rhabdovirus DIs gentechnisch herzustellen (9, Manuskript eingereicht). Sowohl für Untersuchungen zur Rekombination als auch zur Mutationsrate würden solche DIs wertvolle Werkzeuge darstellen. Darüberhinaus ist abzusehen, daß in Zukunft auch gentechnisch veränderte Rhabdoviren als Impfstoffe verfügbar sein werden.

### BEZUG ZUM FÖRDERPROGRAMM

Im Zuge der Tollwutbekämpfung werden zwei grundsätzlich verschiedene Viren in die Umwelt freigesetzt, einerseits attenuiertes Tollwutvirus, andererseits gentechnisch verändertes Vaccinia Virus. Beide Viren haben bei der Verwendung als Lebendimpfstoffe Nachteile: Das DNA Virus Vaccinia ist potentiell humanpathogen, weist eine hohe Rekombinationshäufigkeit auf und kommt in der natürlichen Umwelt nicht vor. Attenuierte Tollwutviren besitzen eine eventuelle Restpathogenität und als RNA Viren vermutlich eine hohe genetische Variabilität, die auf eine hohe Mutationsrate und eventuell auf Rekombination zurückzuführen ist. Die Analyse der genetischen Stabilität von Tollwutviren ist Voraussetzung für die Möglichkeit der Abschätzung von Gefährdungspotentialen, die bei Verwendung des "natürlichen" Tollwutvirus oder des gentechnisch veränderten Vaccinia Virus ausgehen.

Darüberhinaus ist es in jüngster Zeit möglich geworden, defekte rekombinante Rhabdoviren herzustellen. In Zukunft werden vermutlich auch gentechnisch erzeugte und gezielt manipulierte infektiöse Tollwutviren verfügbar sein. Die genaue Kenntnis der Mechanismen, die zu Genomveränderungen im "normalen" Genom führen, ist vor allem auch im Hinblick auf die Beurteilung der Sicherheit der zu erwartenden rekombinanten Tollwutviren notwendig.

### LITERATUR

- (1) Benmansour, A., Leblois, H., Coulon, P., Tuffereau, C., Gaudin, Y., Flamand, A., and Lafay, F. (1991). Antigenicity of rabies virus glycoprotein. *J. Virol.* **65**, 4198-4203
- (2) Conzelmann K.K., Cox, J.H., Schneider, L.G., and Thiel, H.-J. (1990). Molecular Cloning and Complete Nucleotide Sequence of the Attenuated Rabies Virus SAD B19. *Virology* **175**, 485-499
- (3) Conzelmann K.K., Cox, J.H., and Thiel, H.-J. (1991). An L (Polymerase) Deficient Rabies Virus Defective Interfering Particle RNA is Replicated and transcribed by Heterologous Helper Virus Proteins. *Virology* **184**, 655-663

- (4) Holland, J.J., Domingo, E., de la Torre, J.C., and Stein-hauer, D.A. (1990). Mutation frequencies at defined single codon sites in vesicular stomatitis virus and Polio virus can be increased only slightly by chemical mutagenesis. *J. Virol.* **64**, 3960-3962
- (5) Khatchikian, D., Orlich, M., and Rott, R. (1989). Increased viral pathogenicity after insertion of a 28S ribosomal RNA sequence into the haemagglutinin gene of an influenza virus. *Nature* **340**, 156-157
- (6) Lazzarini, R.A., Keene, J.D., and Schubert, M. (1981). The origins of defective interfering particles of the negative-strand RNA viruses. *Cell* **26**, 145-154
- (7) Meyers, G., Rumenapf, T., and Thiel, H.-J. (1989). Ubiquitin in a togavirus. *Nature* **341**, 491
- (8) O'Hara P.J., Nichol, S.T., Horodyski, F.M., and Holland, J.J. (1984). Vesicular stomatitis virus defective interfering particles can contain extensive genomic sequence re-arrangements and base substitutions. *Cell* **36**, 915-924
- (9) Pattnaik, A.K., Ball, L.A., Le Grone, A.W., and Wertz, G.W. (1992). Infectious defective interfering particles of VSV from transcripts of a cDNA clone. *Cell* **69**, 1011-1020
- (10) Perrault, J. (1981). Origin and Replication of defective interfering particles. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **93**, 151-207
- (11) Schlesinger, S. (1988). The generation and amplification of defective interfering RNAs. In: "RNA Genetics", (Domingo, E., Holland, J.J., Ahlquist, P. Eds.), Vol II, CRC press, Boca Raton, FL.
- (12) Smith, D.B., and Inglis, S.C. (1987). The mutation rate and variability of eukaryotic viruses: an analytical review. *J. Gen. Virol.* **68**, 2729-2740
- (13) Steinhauser, D.A., and Holland, J.J. (1987). Rapid evolution of RNA viruses. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**, 409-433
- (14) Strauss, J.H., and Strauss, E.G. (1988). Evolution of RNA viruses. *Ann. Rev. Microbiol.* **42**, 657-683
- (15) Tordo, N., Poch, O., Ermine, A., and Keith, G., and Rougeon, F. (1986). Walking along the rabies genome: Is the large G-L intergenic region a remnant gene? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3914-3918.

- (16) Tordo, N., Poch, O., Ermine, A., and Keith, G., and Rougeon, F. (1988). Completion of the rabies virus genome sequence determination: Highly conserved domains among the L (Polymerase) proteins of unsegmented negative-strand RNA viruses. *Virology* **165**, 565-567.