

Brock Mikrobiologie

15., aktualisierte Auflage

**Michael T. Madigan
Kelly S. Bender
Daniel H. Buckley
W. Matthew Sattley
David A. Stahl**



Pearson

**EXTRAS
ONLINE**

Translation genomischer RNA gemacht. Stattdessen wird nur ein Teil des Genoms translatiert, insbesondere die Region, welche für die RNA-Replikase codiert (►Abbildung 10.19b). Letztere benutzt dann die genomische DNA als Matrize und stellt somit komplementäre Negativstränge her; von diesen werden dann wieder mehrere monocistronische mRNAs erzeugt. Und von diesen („sekundären“) mRNAs werden schließlich die Proteine des Coronavirus translatiert (Abbildung 10.19b). Aus den Volllängen-Negativsträngen können auch Volllängen-RNA-Genome erzeugt werden. Neue Virionen von Coronaviren werden im Golgi-Apparat zusammengebaut, einer wesentlichen Organelle für die Sekretion in Eukaryoten (Abschnitt 2.16). Die fertigen Virionen werden schließlich auf der Zelloberfläche freigesetzt.

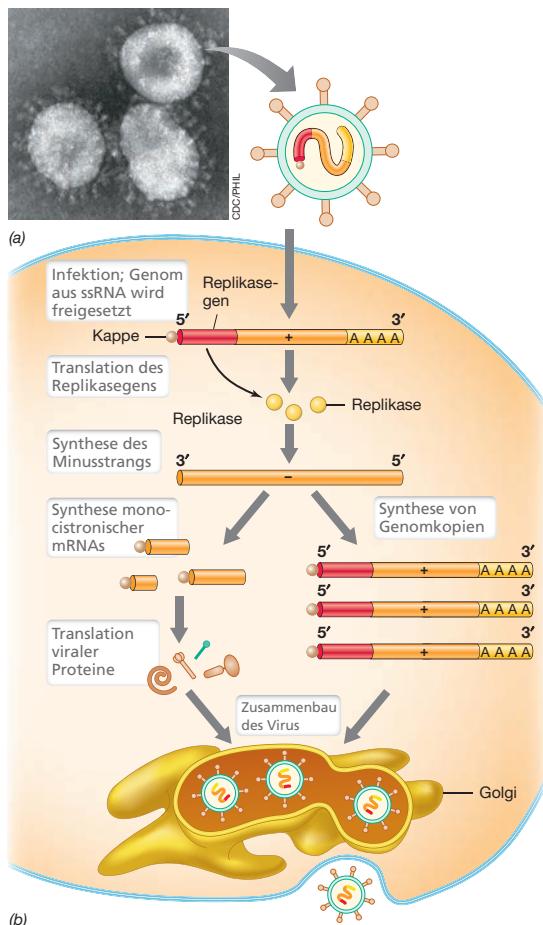


Abbildung 10.19: Coronaviren. (a) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Coronaviruses; ein Virion hat etwa 150 nm Durchmesser. (b) Replikationsschritte des Coronaviruses. Die mRNA, die virale Proteine codiert, wird vom Negativstrang aus transkribiert, den die RNA-Replikase mithilfe des viralen Genoms, das als Matrize dient, herstellt.

Mini-Quiz

- Wie kann die RNA des Poliovirus im Cytoplasma erzeugt werden, während die RNA der Wirtszelle im Zellkern synthetisiert werden muss?
- Woraus besteht das Polyprotein des Poliovirus?
- Worin ähneln sich die Proteinsynthese und die Genomreplikation des Poliovirus und des SARS-Virus, und worin unterscheiden sie sich?

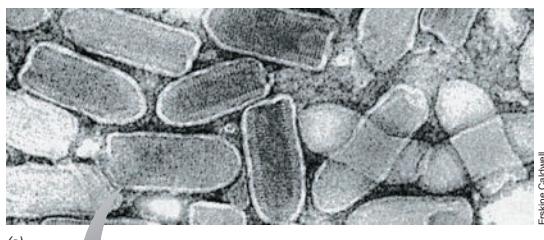
Tierische RNA-Viren mit Negativstrang

10.9

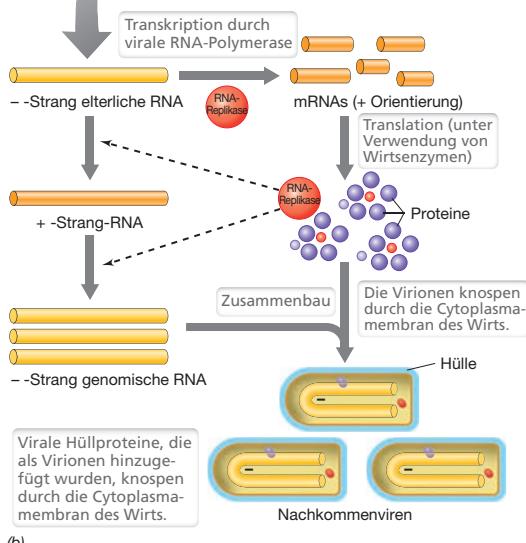
Einige tierische Viren besitzen Negativstrang-RNA-Genome (Baltimore-Klasse V, Abbildung 10.2 und Abbildung 10.3). Im Gegensatz zu den gerade behandelten Positivstrang-Viren sind die Genome der Negativstrang-RNA-Viren *komplementär* zur gebildeten mRNA. Wir besprechen hier zwei wichtige Beispiele für Negativstrang-RNA-Viren, das Tollwutvirus und das Influenzavirus. Bisher kennt man keine Negativstrang-RNA-Bakteriophagen oder archaeelle Viren mit Negativstrang-RNA.

Das Tollwutvirus

Das Tollwutvirus, welches die tödlich verlaufende neuronale Entzündungs-Erkrankung Tollwut verursacht, wird als Rhabdovirus bezeichnet (die Bezeichnung „rhabdo“ bedeutet „Stäbchen“ und bezieht sich auf die Form des Viruspartikels). Die Rhabdoviren sind patronenförmige Viren (►Abbildung 10.20a) mit Hülle, wobei es sich um eine große und komplexe Lipidhülle handelt, welche das helikale Nucleocapsid umgibt. Das Virion der Rhabdoviren enthält mehrere für den Infektionsvorgang unerlässliche Enzyme, insbesondere eine RNA-Replikase. Das Genom von Negativstrang-Viren kann ja nicht direkt translatiert werden, sondern es muss zuerst mittels der RNA-Replikase in den Positivstrang umgewandelt werden. Dies geschieht im Cytoplasma und erzeugt zwei unterschiedliche RNA-Klassen. Bei der ersten Klasse handelt es sich um eine Reihe von mRNAs, die strukturelle Gene des Virus codieren. Bei der zweiten RNA-Klasse handelt es sich um eine Positivstrang-RNA, eine Kopie des vollständigen viralen Genoms; sie dient als Matrize für die Synthese von genomischen Negativstrang-RNA-Molekülen für neue Virionen (►Abbildung 10.20b).



(a)



(b)

Abbildung 10.20: Negativstrang-RNA-Viren – Rhabdoviren. (a) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme des vesikulären Stomatitisvirus; ein Virion hat ca. 65 nm Durchmesser. (b) Ablaufdiagramm bei der Replikation eines Negativstrang-RNA-Virus. Beachten Sie die Bedeutung der vom Virus codierten RNA-Replikase.

Der Zusammenbau eines Virions von Rhabdoviren ist ein komplex regulierter Vorgang. Es werden zwei unterschiedliche Hüllproteine gemacht, solche für das Nucleocapsid und andere für die Hülle. Das Nucleocapsid wird als Erstes durch Zusammenbau der einzelnen Untereinheiten um das virale RNA-Genom gebildet. Die Hüllproteine sind Glykoproteine, sie werden zur Cytoplasmamembran transportiert und in diese eingelagert. Die Nucleocapside wandern dann zu Bereichen der Cytoplasmamembran, in welche die viruspezifischen Glykoproteine eingelegt sind, und knospen durch diese Bereiche aus der Zelle. Über diesen Vorgang werden sie mit Glycoprotein-reichen Bereichen der Cytoplasmamembran eingehüllt. Als Endergebnis sind so neue Vironen freigesetzt worden, die benachbarte Zellen infizieren können.

Das Influenzavirus

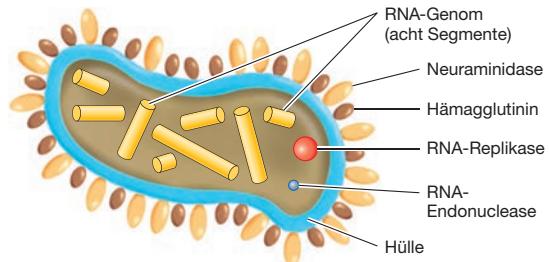
Eine weitere Gruppe der Negativstrang-Viren enthält ein wichtiges Pathogen des Menschen, das *Influenzavirus*. Das Influenzavirus wurde über viele Jahre hinweg eingehend untersucht; dies begann während der Influenzaepidemie im Jahr

1918, die weltweit Millionen von Menschen das Leben kostete (*Abschnitte 29.8 und 30.8*). Die Influenzaviren sind Viren mit Hülle, bei denen die virale RNA im Virion in mehreren Einzelstücken vorliegt, ihr *Genom ist segmentiert*. Im Fall des Influenza-A-Virus ist das Genom in acht lineare, einzelsträngige Moleküle segmentiert, deren Größe zwischen 890 und 2341 Nucleotiden liegt. Das helikale Nucleocapsid des Influenzavirus hat einen Durchmesser von circa 6–9 nm und ist etwa 60 nm lang; es ist in eine Hülle eingebettet, die eine Reihe viruspezifischer Proteine besitzt, sowie ein Lipid, das vom Wirt stammt. Aufgrund der Art und Weise, wie das Influenzavirus beim Verlassen der Zelle knospt, besitzt das Virion keine definierte Form; man bezeichnet es als pleomorph (*► Abbildung 10.21a*).



CDC/PHL, Oynithia Goldsmith and T. Turnpenny

(a)



(b)

Abbildung 10.21: Der Influenzavirus. (a) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von Dünnschnitten der Virionen des menschlichen Influenzavirus. (b) Die Hauptkomponenten des Influenzavirus, mit seinem segmentierten Genom.

Mehrere Proteine auf der Außenseite der Hülle des Vironen treten mit der Zelloberfläche des Wirts in Wechselwirkung. Eines dieser Proteine ist das *Hämagglyutinin*, das stark immunogen wirkt (das Immunsystem stark anregt); Antikörper gegen das Hämagglyutinin verhindern die Infektion. Über diesen Mechanismus kann man gegen (einen bestimmten Typ von) Influenza immunisieren (*Abschnitt 30.8*). Ein zweiter Proteintyp auf der Oberfläche des Influenzavirus ist das Enzym *Neuraminidase* (*► Abbildung 10.21b*). Die Neuraminidase baut den Sialinsäurebestandteil, ein Derivat der Neuraminsäure, der Cytoplasmamembran des Wirts ab. Die Neuraminidase wirkt vor allem beim

Zusammenbau des Virions mit, indem sie die Sialinsäure der Wirtsmembran zerstört, die sonst den Zusammenbau blockieren oder in den reifen Viruspertikel aufgenommen werden würde. Außer dem Hämagglyutinin und der Neuraminidase besitzen Influenza-Virionen noch zwei weitere Schlüsselenzyme, eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (RNA-Replikase), die das Negativstrang-Genom in ein Positivstrang-Genom umwandelt, und eine RNA-Endonuclease. Diese schneidet von der mRNA des Wirts die „Kappen“ ab und fügt diese an die viralen mRNAs an, womit letztere durch den Translationsapparat der Wirtszelle translatiert werden können.

Nachdem das Virion in die Zelle eingedrungen ist, trennt sich das Nucleocapsid von der Hülle und wandert zum Zellkern. Durch das Absondern der Hülle wird die RNA-Replikase des Virus aktiviert und die Transkription beginnt. Die acht Segmente des Influenzavirus codieren für 10 Proteine: Sechs mRNAs von sechs Genomsegmenten codieren für je ein Protein, und die beiden anderen für je zwei. Einige der viralen Proteine werden für die Replikation des Influenzavirus benötigt, und andere sind Strukturproteine des Virus. Die Synthese der genetischen RNA gleicht jener der Rhabdoviren (Abbildung 10.20b), da Volllängen-Positivstrang-RNA als Matrize benutzt wird, um die genetische Negativstrang-RNA herzustellen. Die fertigen, umhüllten Virionen entstehen über Knospung, wie dies auch bei den Rhabdoviren der Fall ist.

Das segmentierte Genom des Influenzavirus hat bedeutende Konsequenzen, insbesondere in medizinischer Hinsicht. Das Influenzavirus zeigt ein Phänomen, das man als *antigene Shift* bezeichnet: Segmente aus zwei unterschiedlichen Stämmen des Virus, die eine einzige Zelle infizieren, werden neu geordnet (= in einem Viruspertikel liegt eine neue Kombination der Segmente vor). So werden „Hybrid-Virionen“ des Influenzavirus hergestellt, die eine neue Kombination von Oberflächenproteinen exprimieren, die nicht vom Immunsystem erkannt werden. Über die antigene Shift werden neue Großausbrüche von Influenza erzeugt, weil Immunität gegen die neuen Formen in der Bevölkerung nicht existiert. Die antigene Shift und ein ähnliches Phänomen, die *antigene Drift*, werden wir in Abschnitt 30.8 diskutieren.

Mini-Quiz

- Wieso ist es essentiell, dass Negativstrang-Viren ein Enzym in ihren Virionen besitzen?
- Was ist ein segmentiertes Genom?
- Was ist beim Influenzavirus die antigene Shift und wie kommt sie zustande?

Doppelsträngige RNA-Viren

10.10

Viren mit doppelsträngigen RNA-Genomen (Baltimore-Klasse III, Abbildung 10.2) infizieren Tiere, Pflanzen, Pilze und einige Bakterien. Die *Reoviren* sind eine wichtige Klasse der dsRNA-Viren von Tieren, und wir konzentrieren uns hier auf diese.

Das Rotavirus ist ein typisches Reovirus und die häufigste Ursache für Durchfall bei Kindern im Alter von 6 bis 24 Monaten. Andere Reoviren erzeugen Infektionen der Atemwege und einige infizieren Pflanzen. Die Virionen der Reoviren bestehen aus einem Capsid mit 60–80 nm Durchmesser, sie sind von einer doppelten Schicht mit ikosaedrischer Symmetrie umhüllt (►Abbildung 10.22a, b). Genauso wie die einzelsträngigen RNA-Viren müssen die Virionen der doppelsträngigen

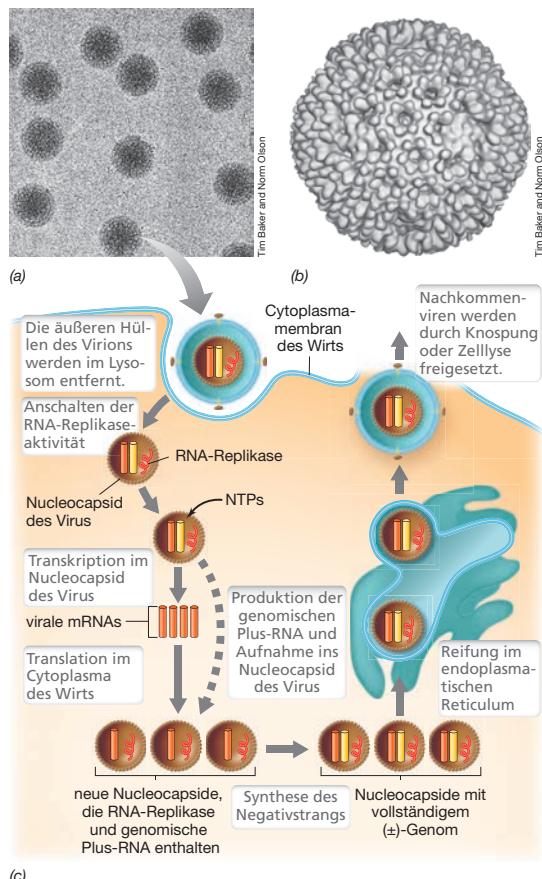


Abbildung 10.22: Doppelsträngige RNA-Viren – das Reovirus. (a) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der Virionen eines Reovirus (Durchmesser ca. 70 nm). (b) Dreidimensionales Computermodell eines Virions des Reovirus erstellt über cryoelektronenmikroskopische Aufnahmen. (c) Der Lebenszyklus von Reoviren. Alle Schritte der Replikation und Transkription erfolgen innerhalb des Nucleocapsids. NTPs: Nucleotidtriphosphate.

RNA-Viren ihr eigenes Enzym enthalten, um ihre mRNA zu erzeugen und ihr Genom zu replizieren. Wie das Genom des Influenzavirus ist auch das Genom der Reoviren segmentiert, in ihrem Fall in 10–12 Moleküle linearer, doppelsträngiger RNA, mit einer Gesamtlänge von 18 kb.

Zu Beginn der Infektion bindet das Virion eines Reovirus an ein zelluläres Rezeptorprotein. Das angeheftete Virus tritt dann in die Zelle ein und wird in die Lysosomen transportiert, wo es normalerweise zerstört würde (*Abschnitt 2.16*). Das Lysosom entfernt aber nur die äußeren Hüllen des Virions; so wird das Nucleocapsid freigesetzt und ins Cytoplasma entlassen. Dieser „Auspakvorgang“ aktiviert die virale RNA-Replikase, womit die Virusreplikation eingeleitet wird (*► Abbildung 10.22c*).

Die Replikation des Reovirus

Die Replikation des Reovirus findet zwar ausschließlich im Cytoplasma der Wirtszelle statt, allerdings innerhalb des Nucleocapsids des Virus (*Abbildung 10.22c*); die Wirtszelle besitzt Enzyme, die doppelsträngige RNA als fremd erkennen und so das Virusgenom abbauen würden. Der Positivstrang des Reovirus-Genoms besitzt keine mRNA-Aktivität, und deshalb ist der erste Schritt bei der Replikation des Reovirus die Synthese von Positivstrang-mRNA durch eine RNA-abhängige, vom Virus codierte RNA-Replikase, bei der die Negativstrang-RNA als Matrize dient. Die dafür nötigen Nucleotidtriphosphate werden vom Wirt geliefert (*Abbildung 10.22c*). Die mRNA wird mit einem methylierten Nucleotid „gecappt“ (= mit einer Kappe versehen, *Abschnitt 4.6*), aus dem Nucleocapsid in das Cytoplasma exportiert und dort von den Ribosomen der Wirtszelle translatiert.

Im Allgemeinen codiert jedes RNA-Molekül des Genoms ein einzelnes Protein. Es gibt aber auch Fälle, in denen das gebildete Protein gespalten wird und daraus die Endprodukte hervorgehen. Eine der mRNAs des Reovirus codiert tatsächlich zwei Proteine, aber diese RNA muss nicht prozessiert werden, um beide zu translatieren. Stattdessen „verpasst“ ein Ribosom in seltenen Fällen das Startcodon für das erste Gen in dieser mRNA und wandert weiter zum Startcodon des zweiten Gens. Dabei wird dann das zweite Protein synthetisiert, das in geringer Menge benötigt wird, aber nicht das erste. Diesen „molekularen Fehler“ kann man als eine primitive Form der Translationskontrolle ansehen, die sicherstellt, dass die viralen Proteine in der benötigten Menge produziert werden.

Wenn die viralen Proteine im Cytoplasma der Wirtszelle synthetisiert wurden, lagern sie sich zusammen und bilden ein neues Nucleocapsid aus, wobei sie RNA-Replikase-Moleküle einschließen (*Abbildung 10.22c*). Diese neu gebildeten

Nucleocapside nehmen dann die richtigen genomischen (Positivstrang-)RNA-Fragmente auf – wahrscheinlich wird dazu jedes Fragment durch eine spezifische Sequenz erkannt –, und beim Eintritt der einzelsträngigen RNAs in dieses Nucleocapsid wird durch die darin bereits vorhandene RNA-Replikase die doppelsträngige Form erzeugt. Wenn die Genomsynthese komplett erfolgt ist, werden im endoplasmatischen Reticulum der Wirtszelle virale Hüllproteine angefügt, und schließlich werden reife Virionen des Reovirus durch Knospung oder Zellyse freigesetzt (*Abbildung 10.22c*).

Reoviren und ihre RNA-Replikation

Reoviren haben nicht nur eine ungewöhnliche Genomstruktur, die sie zwingt, spezielle Mechanismen zu verwenden, um ihre doppelsträngigen RNA-Genome vor dem Abbau durch Ribonucleasen des Wirts zu schützen. Auch ihre Genomreplikation ist besonders und unterscheidet sich ganz prinzipiell von der aller anderen Viren und der von allen Zellen.

Weil das RNA-Genom eines Reovirus doppelsträngig ist, könnte man meinen, dass seine Replikation der von Organismen mit doppelsträngiger DNA folgen würde – dem ist aber nicht so. Die Replikation der RNA der Reoviren erfolgt tatsächlich durch einen *konservativen* Vorgang und nicht durch den *semikonservativen* Mechanismus, den wir für die DNA-Replikation aller Zellen – und aller Viren mit doppelsträngigem DNA-Genom – kennen (*Abschnitt 4.3* und *Abbildung 10.2*)! Dies ist so, weil die Synthese der mRNA von Reoviren ausschließlich vom Negativstrang der infizierenden Nucleocapside ausgeht; die Synthese der doppelsträngigen genomischen RNA in den neu gebildeten Virionen dagegen erfolgt *ausschließlich* von den darin „eingesammelten“ einzelsträngigen Positivstrang-RNA-Kopien (*Abbildung 10.22c*). Demzufolge haben also Reoviren nicht nur ungewöhnliche doppelsträngige RNA-Genome, sie verwenden auch eine ungewöhnliche Molekularbiologie, weil sie für die Replikation einen Mechanismus verwenden, der weder semikonservativ ist, noch nach dem Rolling-Circle-Mechanismus (*Abbildung 10.7*) abläuft.

Mini-Quiz

- Woraus besteht das Genom der Reoviren?
- Wie ähnelt die Replikation des Reovirus-Genoms der des Influenzavirus, und worin unterscheidet sie sich von dieser?
- Wieso müssen Vorgänge der Replikation des Reovirus im Nucleocapsid ablaufen?

Viren, die Reverse Transkriptase verwenden

10.11

Zwei verschiedene Virenklassen benutzen Reverse Transkriptase, sie unterscheiden sich im Typ der Nucleinsäure ihres Genoms: Retroviren haben *RNA-Genome*, während Hepadnaviren *DNA-Genome* enthalten (Baltimore-Klassen VI und VII, Abbildung 20.2). Diese Viren haben nicht nur ungewöhnliche molekulare Eigenschaften, beide Klassen enthalten auch wichtige menschliche Pathogene, wie HIV (ein Retrovirus) und Hepatitis B (ein Hepadnavirus).

Retroviren: Integration viraler Gene in das Wirtsgenom

Retroviren besitzen umhüllte Virionen, die zwei identische Kopien des RNA-Genoms enthalten (Abbildung 8.21a). Das Virion enthält mehrere Enzyme, darunter die Reverse Transkriptase, und auch eine spezifische tRNA. Die Enzyme für die Replikation des Retrovirus müssen sich im Virion befinden, denn das Genom des Retrovirus wird nicht direkt als mRNA verwendet, obwohl es in der Plusrichtung vorliegt. Stattdessen wird eine der Kopien des Genoms durch die Reverse Transkriptase in DNA umgewandelt und in das Wirtsgenom aufgenommen. Die im Nucleocapsid gebildete DNA liegt als lineares, doppelsträngiges Molekül vor und wird dann ins Cytoplasma entlassen. Die ►Abbildung 10.23 gibt einen Überblick über die Schritte bei der reversen Transkription.

Die Reverse Transkriptase hat drei enzymatische Aktivitäten: (1) die für *reverse Transkription* (die Synthese von DNA von einer RNA-Matrize), (2) die einer *Ribonuclease* (Abbau des RNA-Strangs von einem RNA-DNA-Hybrid) und (3) die einer *DNA-Polymerase* (die Synthese doppelsträngiger DNA aus einzelsträngiger DNA). Die Reverse Transkriptase benötigt für die DNA-Synthese einen Primer. Unter Zuhilfenahme des Primers werden Nucleotide nahe am 5'-Ende der RNA revers in DNA transkribiert. Wenn diese reverse Transkription das 5'-Ende der RNA erreicht hat, hört der Vorgang auf. Für das Kopieren der „restlichen“ RNA kommt ein weiterer Vorgang ins Spiel. Zunächst werden terminale Wiederholungssequenzen am 5'-Ende des Moleküls durch die Reverse Transkriptase entfernt. Dies führt zur Bildung einer kurzen, einzelsträngigen DNA, die komplementär ist zu einem RNA-Bereich am *anderen Ende* der viralen RNA. Diese kurze, einzelsträngige DNA hybridisiert dann mit dem anderen Ende des viralen RNA-Moleküls und nun kann die Synthese von Negativstrang-

DNA erfolgen. Für die weiteren Schritte wird auf Abbildung 10.23 verwiesen.

Durch diese weitere reverse Transkription wird schlussendlich ein doppelsträngiges DNA-Molekül mit langen terminalen Wiederholungen erzeugt (Abbildung 10.23, unten) und diese helfen bei der Integration der retroviralen DNA ins Wirtsgenom mit. Im Falle von HIV ist die Integration nicht zufällig. Über eine spezielle Art der Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass HIV in chromosomal Loci integriert, die nahe am Außenbereich des Zellkerns liegen (Foto-Inset der Abbildung 10.23). Diese Lage wird wahrscheinlich durch die kurze Lebenszeit der viralen Integrase bedingt. Erinnern Sie sich (Abschnitt 8.8), dass die reverse Transkription eines Retrovirus im Nucleocapsid passiert. Demzufolge muss die retrovirale DNA schnell in das Wirtsgenom integriert werden, sobald sie in den Kern gelangt.

Retroviren: Die Induktion der Ausbildung neuer Virionen

Das integrierte, retrovirale Genom kann induziert werden, es kann aber auch in einem Ruhestadium verbleiben und nicht exprimiert werden. Nach der Induktion wird die retrovirale DNA von einer zellulären RNA-Polymerase transkribiert; es werden RNA-Transkripte erzeugt. Sie können entweder als genomische RNA in Virionen verpackt werden oder als mRNA dienen, sodass Virusproteine entstehen. In der ►Abbildung 10.24 sind die Translation und Prozessierung einer solchen mRNA aus einem Retrovirus dargestellt. Alle bekannten Retroviren besitzen drei Gene, *gag*, *pol* und *env*, die in dieser Reihenfolge im Genom angeordnet sind (Abbildung 8.21). Das *gag*-Gen am 5'-Ende der mRNA codiert mehrere kleine, virale Strukturproteine. Diese werden zuerst als Polyprotein synthetisiert, das dann von einer Protease prozessiert wird (welche selbst Teil des Polyproteins ist). Die Strukturproteine bilden das Capsid; die Protease wird in das Virion verpackt.

Anschließend wird das *pol*-Gen in ein großes Polyprotein translatiert, das auch die Gag-Proteine enthält (►Abbildung 10.24a). Verglichen mit der Menge benötigter Strukturproteine werden die Pol-Produkte nur in sehr geringen Mengen benötigt. Dies wird dadurch reguliert, dass für die Synthese des Pol-Proteins das Ribosom entweder ein Stoppcodon am Ende des *gag*-Gens überlesen muss, oder in einen anderen Leserahmen wechseln muss. Beide Vorgänge ereignen sich äußerst selten, man kann sie als eine Art der Translationskontrolle bezeichnen. Nachdem das Pol-Genprodukt hergestellt wurde, wird es in die Gag-Proteine, die Reverse Transkriptase und die Integrase prozessiert.

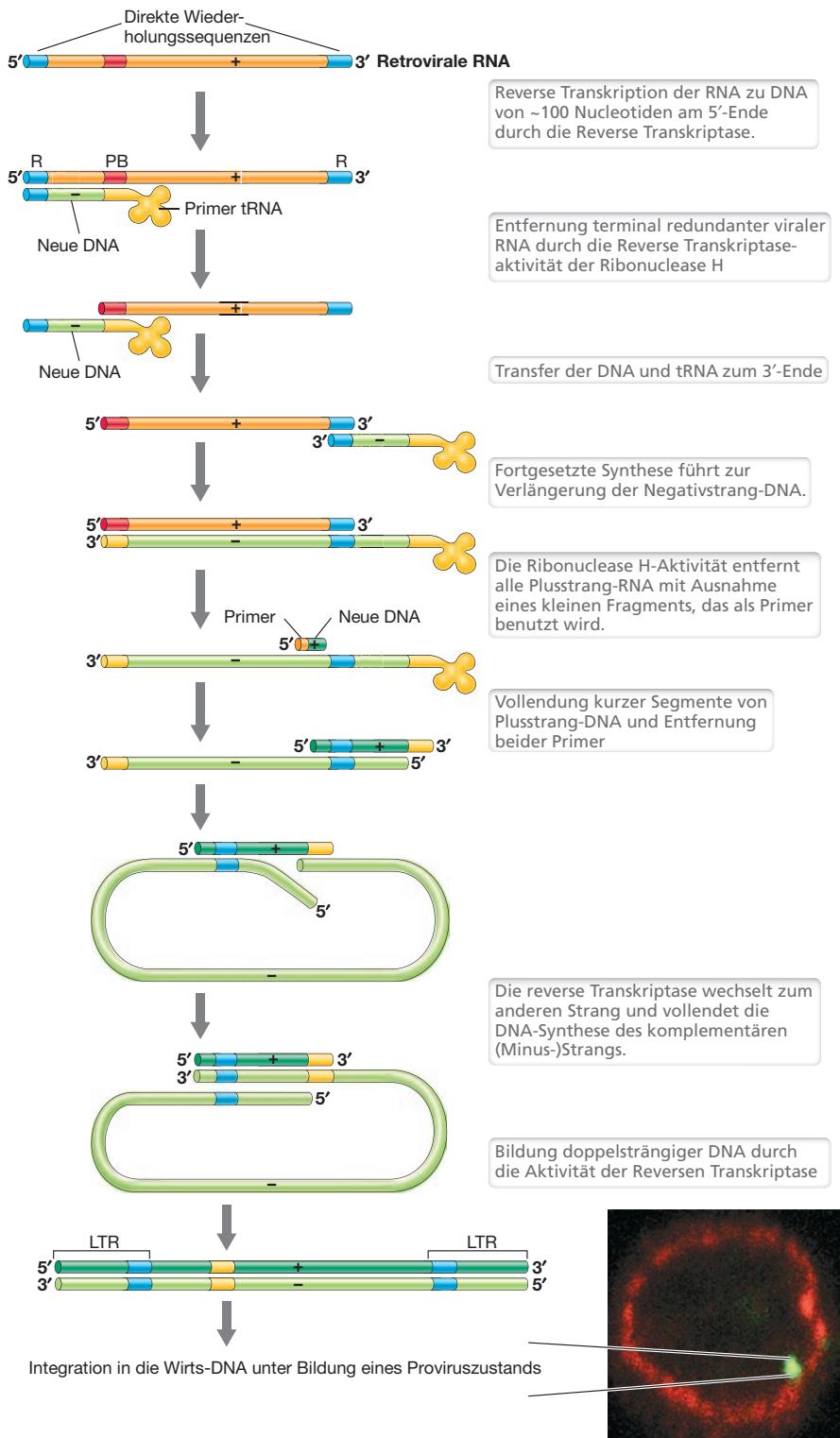


Abbildung 10.23: Die Bildung doppelsträngiger DNA aus dem einzelsträngigen RNA-Genom von Retroviren. Die mit R gekennzeichneten Sequenzen auf der RNA sind direkte Wiederholungen, die an jedem Ende vorkommen. An der mit PB markierten Sequenz bindet der Primer (tRNA). Beachten Sie, dass die von der DNA-Synthese hervorgebrachten direkten Wiederholungen länger sind als jene, die ursprünglich auf der RNA waren. Dieses sind die sogenannten langen terminalen Wiederholungen (LTRs; long terminal repeats). Inset: Eine spezielle Art der Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht es, den Ort der Integration des HIV-Genoms (grün) ins Wirtsgenom festzuhalten; dies passiert im Bereich der Kernmembran (rot) eines CD4-Lymphozyten. (Bild von Mariana Lusic, Universitätsklinikum Heidelberg).

Die Integrase wird für die Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom benötigt. Damit das *env*-Gen translatiert werden kann, wird zuerst die vollständige mRNA prozessiert, indem die *gag*- und *pol*-Regionen entfernt werden. Dann wird das Env-Produkt gebildet und durch die viruscodierte Protease zu zwei verschiedenen Hüllproteinen prozessiert (►Abbildung 10.24b). Der Zusammenbau des Retrovirus geschieht an der Innenseite der Cytoplasmamembran des Wirts und die Virionen werden durch Knospung aus der Membran entlassen (Abbildung 8.22).

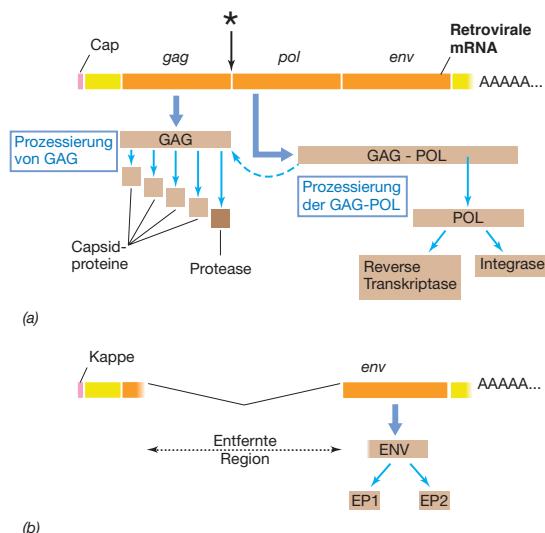


Abbildung 10.24: Die Translation retroviraler mRNA und die Prozessierung der Proteine. (a) Die vollständige mRNA mit den drei Genen *gag*, *pol* und *env* ist im oberen Teil dargestellt. Der Stern verweist auf die Stelle, an der ein Ribosom ein Stoppcodon überlesen muss oder ein genauer Leserahmenwechsel stattfinden muss, um das GAG-POL-Polyprotein zu synthetisieren. Die dicken grauen Pfeile zeigen die Translation an, und die schwarzen Pfeile weisen auf Ereignisse der Proteinprozessierung hin. Eines der Produkte des Gens *gag* ist eine Protease. Das POL-Produkt ergibt nach seiner Prozessierung durch diese Protease die Reverse Transkriptase (RT) und die Integrase (IN), die beiden Schlüsselenzyme der Replikation der Retroviren (Abbildung 10.23). (b) Die mRNA wurde prozessiert, um den größten Teil der *gag-pol*-Region zu entfernen. Diese verkürzte mRNA wird translatiert und es entsteht das ENV-Polyprotein, das in zwei Hüllproteine, EP1 und EP2, gespalten wird.

Wir erkennen also, dass die Replikation der Retroviren über das wohl komplexeste Schema aller Viren abläuft. Trotz dieser Komplexität der Retroviren legen molekulare Untersuchungen nahe, dass sie früh entstanden sind und wohl von wesentlicher Bedeutung sind für den Übergang von selbst-replizierenden „RNA-Lebensformen“ zur heutigen DNA-Welt der zellulären Organismen. Das wesentliche Enzym der Retroviren – die Reverse Transkriptase, das einzige Enzym, das DNA aus RNA herstellen kann – stellt die Retroviren ins evolutionäre Rampenlicht. Es könnte also

sein, dass alle heutigen Zellen ihre Existenz dieser Klasse der Viren verdanken (Abschnitt 10.2 und Abbildung 10.4).

Hepadnaviren

Außer den Retroviren benutzt noch eine zweite Klasse ungewöhnlicher Viren das Enzym Reverse Transkriptase; dies sind die **Hepadnaviren**, wie zum Beispiel das menschliche Hepatitis-B-Virus (►Abbildung 10.25a). Die winzigen DNA-Genome der Hepadnaviren sind ungewöhnlich, weil sie weder einzel- noch doppelsträngig sind; sie sind *teilweise doppelsträngig*. Trotz ihres kleinen Genoms (3–4 kb) codieren Hepadnaviren für mehrere Proteine, wozu sie überlappende Gene benutzen, eine Strategie, die wir schon für sehr kleine Viren kennengelernt haben (Abschnitte 10.3 und 10.8).

Neben den Aktivitäten der Reversen Transkriptase, die wir bisher kennengelernt haben (Abbildung 10.23), stellt die Reverse Transkriptase der Hepadnaviren auch einen Proteinprimer für die Synthese eines ihrer eigenen DNA-Stränge dar. In Bezug auf die Rolle bei der Replikation spielt die Reverse Transkriptase allerdings unterschiedliche Rollen für die Genome der Retroviren und der Hepadnaviren. Das DNA-Genom der Hepadnaviren wird über ein *RNA-Zwischenprodukt* repliziert, während das RNA-Genom der Retroviren über ein DNA-Intermediat repliziert wird (Abbildung 10.23 und Abbildung 10.25).

Nach der Infektion wird das Nucleocapsid der Hepadnaviren in den Zellkern der Wirtszelle aufgenommen, und das partiell doppelsträngige DNA-Genom wird von der viralen Polymerase in ein vollständiges doppelsträngiges Molekül überführt. Die Transkription durch die RNA-Polymerase des Wirts ergibt vier Größenklassen viraler mRNAs (►Abbildung 10.25b), die anschließend translatiert werden, wodurch die Proteine der Hepadnaviren entstehen. Das größte Transkript ist etwas größer als das virale Genom und wird – zusammen mit der Reversen Transkriptase – von viralen Proteinen im Cytoplasma der Wirtszelle für die Ausbildung neuer Virionen benutzt. Im Virion bildet die Reverse Transkriptase ausgehend von diesem langen Transkript einzelsträngige DNA – also den Negativstrang des DNA-Genoms. Letzterer wird dann als Matrize benutzt, um Teile des Positivstrangs zu bilden, womit das partiell doppelsträngige Genom der Hepadnaviren entsteht, das für sie ja charakteristisch ist (Abbildung 10.25b). Nach der Erzeugung reifer Virionen lagern sich diese an Membranen des endoplasmatischen Reticulums und des Golgi-Apparats an, und von dort aus werden sie über die Cytoplasmamembran durch Knospung entlassen.

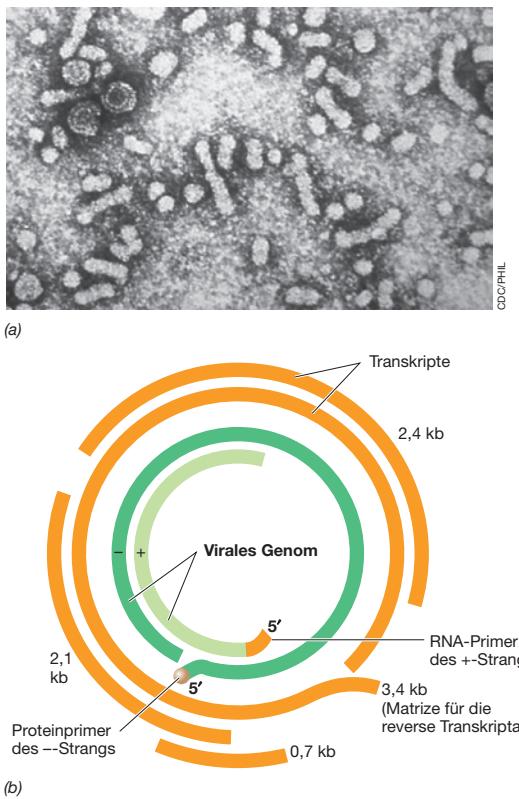


Abbildung 10.25: Hepadnaviren. (a) Elektronenmikroskopische Aufnahme von Hepatitis-B-Virionen. (b) Das Hepatitis-B-Genom. Das teilweise doppelsträngige Genom ist grün unterlegt. Beachten Sie, dass der positive Strang unvollständig vorliegt. Die Größen der Transkripte sind gleichfalls angegeben; alle Gene des Hepatitis-B-Virus überlappen. Die Reverse Transkriptase bildet das DNA-Genom aus einer einzigen mRNA, die von der Wirtszell-RNA-Polymerase gemacht wurde und die Länge eines Genoms hat.

Mini-Quiz

- Wieso sind Protease-Inhibitoren für die Behandlung von AIDS gut geeignet?
- Stellen Sie die Genome von HIV und des Hepatitis-B-Virus gegenüber.
- Wie unterscheidet sich die Rolle der Reversen Transkriptase im Replikationszyklus von Retroviren und Hepadnaviren?

IV Die Ökologie von Viren

Viren findet man auf und in der Erde überall, wo es zelluläres Leben gibt (also auch auf und in Tieren und Pflanzen); sie kommen in einigen Bereichen in enormen Zahlen vor. Die Zahl der Bakterien- und Archaeenzellen auf der Erde ist bei

weitem größer als die Gesamtzahl der eukaryotischen Zellen; Schätzungen von Zellzahlen aller prokaryotischen Zellen gehen von der Größenordnung 10^{30} aus. Die Zahl der Viren ist aber, mit wohl 10^{31} nochmals größer! Demzufolge kann man erwarten, dass – trotz ihrer Kleinheit – die Viren eine maßgebliche ökologische Rolle in der Natur spielen. Wir werden hier einige Aspekte der viralen Ökologie betrachten, unter anderem auch einen Mechanismus, der *Archaea* und *Bacteria* vor der Zerstörung durch Viren schützt (und auch Gegenmaßnahmen, welche die Viren daraufhin entwickelten), und wir werden die Welt der Viren diskutieren, die im und auf dem menschlichen Körper existiert, das *humane Virom*.

Die bakterielle und archaeelle Virosphäre 10.12

Die besten Abschätzungen der Gesamtzahlen von Zellen der *Bacteria* und *Archaea* sowie ihrer Viren kommen aus quantitativen Untersuchungen von Meerwasser. Man kennt auch Schätzungen für andere Habitate, in denen viele Mikroben vorkommen und Viren, welche diese als Futter benutzen, wie Untersuchungen des Bodens, von Süßwasser, von tiefen Erdschichten, Mikromatten etc. Wir legen hier unser Hauptaugenmerk auf Meerwasser, um ein Gespür zu bekommen, von welchen Zahlen auszugehen ist, und wie Viren mit ihren prokaryotischen Wirten interagieren.

Bakteriophagen und archaeelle Viren im Meerwasser

Pro Milliliter Meerwasser kommen ca. 10^6 prokaryotische Zellen vor, und ca. 10 Mal so viele Viren. Es wurde abgeschätzt, dass zwischen 5–50 % aller *Bacteria* im Meer pro Tag durch Bakteriophagen abgetötet werden; weitere werden durch Protozoen abgegrast. Syn5 ist zum Beispiel ein Bakteriophage, der *Synechococcus*-Arten infiziert und lysiert (►Abbildung 10.26); diese Bakterien sind zusammen mit ihren Verwandten *Prochlorococcus* die wesentlichen Primärproduzenten im Ozean, sie fixieren weltweit über 30 % des gesamten CO₂ (Abschnitt 20.10). Durch den Angriff der Viren auf diese Zellen wird Cytoplasma freigesetzt (►Abbildung 10.26c), und dieses ist ein signifikanter Anteil des organischen Materials, das anderen Mikroben im Meer zur Verfügung steht. Viren machen zwar den überwiegenden Teil der Gesamt-mikrobenanzahl im Meerwasser aus, aber wegen ihrer geringen Größe tragen sie nur zu ca. 5 % zur gesamten Biomasse bei (►Abbildung 10.27).

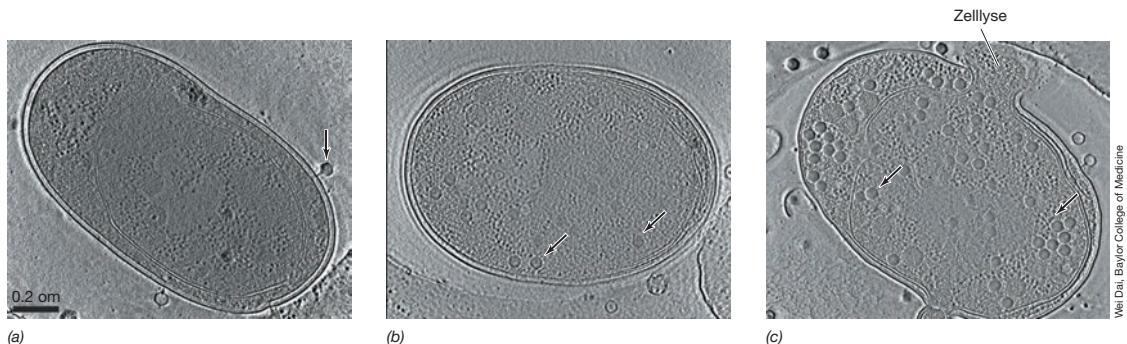


Abbildung 10.26: Die Infektion von *Synechococcus* mit dem Cyanophagen *Syn5*. Phasenkontrast-Elektronenzytographie- „Schnitte“ von Zellen in verschiedenen Phasen der Infektion. (a) früh; (b) intermediär; (c) spät. Pfeile deuten auf Virionen.

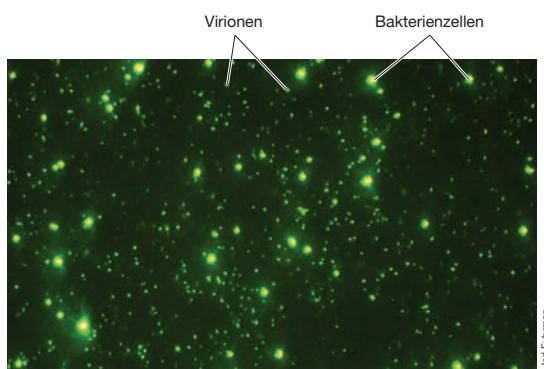


Abbildung 10.27: Viren und Bakterien im Meerwasser. Eine Fluoreszenzaufnahme von Meerwasser, das mit dem Farbstoff SYBR-Grün gefärbt wurde, womit prokaryotische Zellen und Viren dargestellt werden können. Viren sind zwar zu klein, als dass man sie mit einem Lichtmikroskop sehen könnte, die Fluoreszenz eines gefärbten Virus ist aber sichtbar.

Die häufigsten Bakteriophagen in den Weltmeeren sind Kopf-Schwanz-Viren mit doppelsträngigen DNA-Genomen (Baltimore-Klasse I, Abbildung 10.2); RNA-haltige Phagen sind dagegen recht selten. Wir haben bereits gesehen, dass lysogene Bakteriophagen in die Genome ihrer bakteriellen Wirtszellen integrieren können (Abschnitt 8.7) und dadurch den Wirtszellen neue Eigenschaften verleihen können. Zusätzlich können einige lytische Phagen den Transfer bakterieller Gene zwischen verschiedenen Zellen über die Transduktion erleichtern. Dieser Mechanismus stellt eine wesentliche Quelle des horizontalen Gentransfers dar; Viren können als Genführern dienen, Wirts-DNA in ihr Virion einbauen, und so zu nicht mehr lytischen, *transduzierenden Phagen* werden (Abschnitt 11.7). Man glaubt, dass Bakteriophagen, wegen ihrer Möglichkeit der Transduktion, wesentliche Treiber der bakteriellen Evolution sind. Die durch sie übertragenen Gene können zum Beispiel neue Stoffwechselwege codieren, oder den Rezipienten andere Vorteile verschaffen und es ihnen ermöglichen, neue Habitate zu erschließen.

Ein gutes Beispiel für den Gentransfer durch Phagen sind die Cyanophagen, für die man zeigen konnte, dass sie einige Gene für die Photosynthese zwischen verschiedenen Stämmen von *Synechococcus* und *Prochlorococcus* transferieren können. Wenn diese Phagen aus ihren lysierten Wirtszellen freigesetzt werden (Abbildung 10.26c), nehmen einige von ihnen Gene, die für das Photosystem II (PS II) codieren, auf – eine der wesentlichen Komponenten für die oxygene Photosynthese (Abschnitt 14.4). Wenn ein solcher Phage eine neue Zelle infiziert, überträgt er dem neuen Wirt Gene für ein modifiziertes PS II. Man argumentiert, dass unterschiedliche Komponenten von PS-II-Proteinen die Fitness der Zellen und der Phagen erhöhen, weil sie es der Wirtszelle ermöglichen, sich besser an veränderte Umweltbedingungen anzupassen – zum Beispiel Veränderungen in der Intensität oder auch der Qualität des Lichtes – und dadurch können sie mehr Cyanophagen produzieren.

In den Meeren sind viele *Archaea* vorhanden; eine wesentliche Gruppe mariner *Archaea* sind die *Thaumarchaeota*, die ökologische Bedeutung haben (Abschnitt 17.5). Diese ammoniumoxidierenden Chemolithotrophen können die verschwindend geringen Mengen von Ammonium verwerten, die im offenen (planktonischen) Meerwasser vorkommen. Bisher hat man zwar für diese Gruppe keine lytischen *Archaeen*-Viren isoliert, aber die Genomsequenzierungen mehrerer Arten der Gattung *Nitrosopumilus* (Angehörige der *Thaumarchaeota*) zeigen auf, dass sie virale Genome im Chromosom vorliegen haben. Das Vorkommen dieser Proviren lässt vermuten, dass es sich entweder um dsDNA-haltige Kopf-Schwanz-Viren handelt (Abschnitt 10.4) oder um ikosaedrische Viren, die den Herpesviren (Abschnitt 10.7) ähneln (Abbildung 10.3b). Demzufolge ist es wahrscheinlich, dass zumindest einige (eventuell sogar viele) der Viren im Meerwasser marine *Archaea*, und nicht marine *Bacteria*, infizieren. Dafür spricht auch, dass alle bisher bekannten archaellen Viren doppelsträngige DNA-Genome (Abbildung 10.3a) besitzen; und genau diese Virenform ist die häufigste in den Ozeanen.

Überlebensstrategien und Metagenomik von Viren in der Natur

Da ja (potenzielle) Wirtszellen in der Natur häufig vorkommen, erwartet man, dass die Bakteriophagen ihren lytischen Lebensstil darauf anpassen und demzufolge große Zahlen der Wirtszellen abgetötet werden. Wenn dagegen die Zahl der Wirtszellen gering ist, sollte es für die Viren schwierig werden, einen neuen Wirt zu finden, und unter solchen Bedingungen sollte dann die Lysogenie (*Abschnitt 8.7*) überwiegen, wenn das Virus lysogen ist. Das Virus würde dann als Prophage überleben, bis die Zahl der Wirtszellen wieder deutlich ansteigt, und dann könnte es wieder zum lytischen Lebensstil kommen. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, dass in den Tiefen der Weltmeere, wo die Bakterienzahlen deutlich geringer sind als in den Oberflächenwasserschichten, ungefähr die Hälfte aller untersuchten Bakterien einen oder mehrere lysogene Viren tragen. Bis heute kennt man keinen einzelsträngigen DNA-Virus oder keinen RNA-Virus, der lysogen werden kann, sodass man nicht weiß, wie diese Viren Situationen überleben können, bei denen die Zahl der möglichen Wirte gering ist.

Der größte Bereich der genetischen Diversität auf der Erde wird von den Viren abgedeckt, fast immer sind dies Bakteriophagen. Das *virale Metagenom* ist die Gesamtheit aller Viren in einer speziellen Umgebung. Es wurden mehrere virale Metagenomuntersuchungen durchgeführt und alle zeigen auf, dass auf der Erde eine immense virale Diversität vorkommt. So zeigen zum Beispiel ca. 75 % aller Gensequenzen aus viralen Metagenomstudien keinerlei Ähnlichkeit zu anderen Genen in allen vorhandenen Datenbanken (unabhängig davon, ob diese von Viren oder von Zellen stammen). Im Vergleich dazu ergeben Untersuchungen von bakteriellen Metagenomen nur ca. 10 % an unbekannten Genen. Also sind die meisten Viren bisher noch nicht entdeckt, und die meisten Gene der Viren besitzen (noch?) unbekannte Funktionen. Und dies macht dann die Untersuchungen der Virophäre und der viralen Diversität zu einem der spannendsten Bereiche der heutigen Mikrobiologie!

Mini-Quiz

- Welcher Typ von Bakteriophagen ist der häufigste in den Weltmeeren?
- Wie können Bakteriophagen die Evolution der Bakterien beeinflussen?
- Was sagt das virale Metagenom über unser Wissen der viralen Diversität aus?

Abwehrmechanismen von Bacteria und Archaea gegen Viren 10.13

Man kann die Viren der *Bacteria* und *Archaea* von zwei verschiedenen Seiten sehen: als tödliche Räuber, die sich durch Zellpopulationen fressen, oder als Agenzien der Diversität, die ihre Werte über Gentransfer bereichern. Trotz der Bedeutung des letzteren Aspekts sehen wir ja, dass die Viren gegenüber ihren prokaryotischen Wirten um den Faktor 10 überwiegen, weshalb es nicht erstaunt, dass *Bacteria* und *Archaea* ein ganzes Arsenal an Strategien entwickelt haben, um sich gegen ihre viralen Räuber zu wehren; diese werden wir uns nun ansehen.

Das Wettrüsten der Mikroben

Das Verhältnis zwischen Bakteriophagen und ihren Wirten ist nicht statisch, sondern im Gegenteil extrem dynamisch. Die Bakterien besitzen zwar einige Waffen, um dem Angriff von Phagen zu begegnen, aber die Phagen bekämpfen diese Waffen mit ihren eigenen – und dies führt zu einem „Wettrüsten“ zwischen dem Überleben der Zellen und der Verbreitung von Phagen.

Wir haben früher diskutiert, dass *Bacteria* Restriktionsenzyme produzieren – Proteine, die fremde DNA erkennen und zerstören – und dass der Bakteriophage T4 den Angriff durch Restriktionsenzyme seines Wirts *Escherichia coli* dadurch kontert, dass er in seinem Genom die Base Cytosin durch 5-Hydroxymethylcytosin ersetzt (*Abschnitt 8.5*). Daraufhin haben einige *E. coli*-Stämme veränderte Restriktionsenzyme entwickelt, welche diese DNA-Modifikation erkennen und eintretende T4-DNA dann doch abbauen, womit sie die Infektion verhindern. Dies hat dazu geführt, dass einige T4-Bakteriophagen ihre DNA in einer anderen Art und Weise modifizieren – indem sie spezifische Basen der DNA glykosilieren (Zucker anhängen). Wie man für ein fortlaufendes Wettrüsten erwarten kann, haben einige *E. coli*-Stämme Restriktionsenzyme entwickelt, die glykosillierte virale DNA erkennen und abbauen. Als Gegenmaßnahme haben daraufhin einige Phagenstämme ein Protein evolviert, das diese modifizierten Restriktionsenzyme hemmt. Andere *E. coli*-Stämme haben sodann Endonucleasen entwickelt, die von diesem Inhibitor nicht beeinflusst werden ... Und so geht das Wettrüsten weiter, weil beide Seiten – der Räuber und die Beute (Viren beziehungsweise Bakterien) – darum kämpfen, überleben zu können und sich trotz Anwesenheit des jeweiligen „Feindes“ zu vermehren.

Ein weiterer häufiger Mechanismus, um die Infektion durch Viren zu vermeiden, ist die Veränderung von Rezeptoren für Viren. Damit ein Virus an eine Wirtszelle anheften kann, muss er diese ja zunächst erkennen und an einen Zellrezeptor binden (*Abschnitt 8.5* und *Abbildung 8.11*). Um die Infektion durch ein Virus zu verhindern, können die Wirtszellen die Struktur des Rezeptors auf der Zelle verändern, oder sie können den unveränderten Rezeptor schützen, indem sie einen Schutzschild, wie zum Beispiel eine Kapsel auf der Oberfläche (*Abschnitt 2.7*) exprimieren. Viren können diese Schutzmechanismen unterlaufen, indem sie einen mutierten Virusrezeptor ausbilden, der wieder an das modifizierte Gegenstück auf der Wirtszelle binden kann, oder sie tragen Enzyme im Capsid mit sich, welche die Kapsel abbauen können. Einige temperante Bakteriophagen (*Abschnitt 8.7*) stellen ihr Überleben sicher, indem sie das vom Wirt codierte Toxin-Antitoxin-System (*Abschnitt 7.11*) kapern. Das erreichen sie, indem sie ein prophagencodiertes Protein besitzen, welches das Antitoxin der Wirtszelle inaktiviert, und es durch ein vom Phagen codiertes Antitoxin ersetzen. Damit also die Wirtszelle die Toxizität ihres eigenen, chromosomal codierten Toxins verhindert – dieses Toxin verlangsamt das Wachstum unter Stressbedingungen, um Ressourcen zu schonen, aber macht die Zellen bei genügend Nahrung unkompetitiv, wenn nicht das Antitoxin seine Wirkung verhindert –, wird die Zelle gezwungen, den Prophagen zu erhalten, um sich durch dessen Antitoxin zu schützen.

Das antivirale System von Bacteria und Archaea: CRISPR

Eine sehr bedeutende antivirale Verteidigungsstrategie der *Bacteria* und *Archaea* stellt CRISPR

dar (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*), die in Chromosomen von vielen Arten der Prokaryoten vorkommt und zum Schutz vor der Infektion durch Bakteriophagen dient (*Abschnitt 11.12*). CRISPR-Regionen enthalten kurze Wiederholungen von *konstanter DNA-Sequenz*, die mit kurzen, *variablen Sequenzen* abwechseln, welche *Spacer* genannt werden (*► Abbildung 10.28* und *Abbildung 11.33*). Diese *Spacer* entsprechen Stücken viraler oder anderer fremder DNA, sie wirken als eine Art „Gedächtnis“ von vorhergehenden Konfrontationen mit einem Virus; dies ist analog zum Immunsystem von Tieren, welche Antikörper und langlebige Gedächtniszellen gegen infizierende Viren produzieren (adaptive Immunität, *Kapitel 27*).

Außer den *Spacer*-Regionen stellen die *Cas-Proteine* (CRISPR associated) einen weiteren essenziellen Bestandteil des CRISPR-Systems dar. Diese Proteine besitzen Endonuclease-Aktivität, sie bekämpfen zum einen Fremd-DNA und bauen zum anderen neue *Spacer*-Bereiche in die CRISPR-Region ein. Wenn ein Virus an eine Wirtszelle anheftet und seine DNA injiziert, können die Cas-Proteine einer CRISPR-Region spezielle DNA-Sequenzen der Fremd-DNA erkennen, die als *PAMs* (protospacer adjacent motifs) bezeichnet werden (*► Abbildung 10.28a*). Das Cas-Protein spaltet dann die DNA in der Nähe der PAM-Sequenz, erzeugt so einen *Protospacer*, und inseriert diese kurze DNA-Region in den CRISPR-Bereich des Chromosoms, wodurch der *Spacer* entsteht (*Abbildung 10.28a*). Die Insertion eines Spacers in die CRISPR-Region verleiht der Zelle ein „genetisches Gedächtnis“ (das auch als *Immunisierung* bezeichnet wird) und stellt die Weichen für spätere Exposition mit demselben Virus.

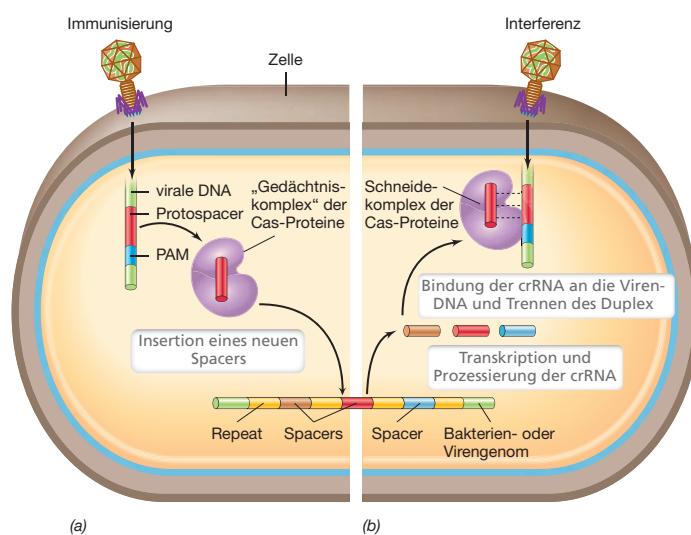


Abbildung 10.28: Die Bekämpfung von Viren durch CRISPR. (a) Immunisierung. Die eindringende virale DNA wird über den Gedächtniskomplex der Cas-Proteine angegriffen. Der Komplex wählt eine Protospacer-Region aus, durch die Erkennung einer Sequenz, die als „Protospacer Adjacent Motif“ (PAM) bezeichnet wird. Nachdem der Protospacer aus dem Virengenom ausgeschnitten wurde, inseriert der Gedächtniskomplex den Protospacer in die CRISPR-Region des prokaryotischen Chromosoms, wodurch eine neue Spacer-Sequenz in diesem Chromosom vorliegt. (b) Interferenz. Die chromosomale CRISPR-Region wird transkribiert und in crRNAs prozessiert, wobei diese den einzelnen Spacer-Regionen entsprechen. An diese crRNAs binden Cas-Proteine und suchen nach komplementärer DNA. Wenn eine solche crRNA an die DNA eines eindringenden Virus bindet, bildet sich ein Hybrid aus crRNA:Viren-DNA, was die Aktivität des Spaltkomplexes anschaltet, wodurch die eindringende DNA abgebaut wird.

Copyright

Daten, Texte, Design und Grafiken dieses eBooks, sowie die eventuell angebotenen eBook-Zusatzdaten sind urheberrechtlich geschützt. Dieses eBook stellen wir lediglich als **persönliche Einzelplatz-Lizenz** zur Verfügung!

Jede andere Verwendung dieses eBooks oder zugehöriger Materialien und Informationen, einschließlich

- der Reproduktion,
- der Weitergabe,
- des Weitervertriebs,
- der Platzierung im Internet, in Intranets, in Extranets,
- der Veränderung,
- des Weiterverkaufs und
- der Veröffentlichung

bedarf der **schriftlichen Genehmigung** des Verlags. Insbesondere ist die Entfernung oder Änderung des vom Verlag vergebenen Passwort- und DRM-Schutzes ausdrücklich untersagt!

Bei Fragen zu diesem Thema wenden Sie sich bitte an: **info@pearson.de**

Zusatzdaten

Möglicherweise liegt dem gedruckten Buch eine CD-ROM mit Zusatzdaten oder ein Zugangscode zu einer eLearning Plattform bei. Die Zurverfügungstellung dieser Daten auf unseren Websites ist eine freiwillige Leistung des Verlags. **Der Rechtsweg ist ausgeschlossen.** Zugangscodes können Sie darüberhinaus auf unserer Website käuflich erwerben.

Hinweis

Dieses und viele weitere eBooks können Sie rund um die Uhr und legal auf unserer Website herunterladen:

<https://www.pearson-studium.de>