

Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von
Allofrancisella frigidaquae
als Spender- oder Empfängerorganismus gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV

Allgemeines

Allofrancisella frigidaquae ist ein Gram-negatives, aerobes, unbewegliches und Katalase-positives Bakterium aus der Familie der *Francisellaceae*. Isolate wurden aus Wasserreservoir von Kühlsystemen in China isoliert [1, 2].

Auch *Francisella* sp. W12-1076 wurde aus dem Wasserreservoir eines Kühlsystems in Deutschland isoliert. Ein Vergleich der Gesamtgenomsequenz des Isolates *Francisella* sp. W12-1076 (GenBank accession number AWHF00000000) mit dem [Type Strain Genome Server](#) [3] des Leibniz Instituts DSMZ – Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ergibt, dass die Sequenz des Gens für die 16S rRNA und der GC-Gehalt in hohem Maße mit denen von *A. frigidaquae* identisch sind (99,9 % bzw. 100 %). Auch die Werte der digitalen DNA-DNA-Hybridisierung sind mit über 85 % sehr hoch, so dass *Francisella* sp. W12-1076 der Spezies *A. frigidaquae* zuzuordnen ist.

A. frigidaquae ist am engsten mit *Allofrancisella inopinata* und *Allofrancisella guangzhouensis* (früher: *Francisella guangzhouensis* [2]) verwandt, die ebenfalls aus Wasserreservoir von Kühlsystemen isoliert wurden. *A. frigidaquae* wächst in einem Temperaturbereich von 18 bis 37 °C [2]. Das Temperaturoptimum liegt bei 30 bis 32 °C [1, 2].

Vertreter der Gattung *Allofrancisella* produzieren β -Laktamasen und sind resistent gegen Chloramphenicol, aber empfindlich gegenüber Ciprofloxacin, Doxyzyklin, Gentamicin, Levofloxacin und Tetrazyklin [2].

Im Genom von *A. frigidaquae* konnten keine Gene mit großer Sequenzähnlichkeit zu den Genen der *Francisella*-Pathogenitätsinsel (FPI) identifiziert werden. Die FPI ist die wichtigste Virulenzdeterminante von *Francisella tularensis* und enthält 15 bis 19 offene Leserahmen (ORF), die u. a. für ein Typ-VI-Sekretionssystem (T6SS) kodieren. Die FPI ist wichtig für die Pathogenität und das intrazelluläre Wachstum von *F. tularensis*. Das Genom von *A. frigidaquae* enthält jedoch zwei *cluster* mit Ähnlichkeit zur FPI, die je 16 ORFs umfassen. Die *cluster* enthalten Homologe zu den Genen der FPI, die für die Bestandteile des T6SS kodieren. Daneben enthält das Genom von *A. frigidaquae* weitere Gene für mögliche Virulenzfaktoren wie Chitinasen, die für die Pathogenität von *Legionella* spp. für Mäuse relevant sind, Gene für Ankyrin-*repeat*-enthaltende Proteine, die bei *Legionella pneumophila* eine Rolle während der intrazellulären Vermehrung spielen, Antibiotikaresistenzgene, Gene für ein mögliches Typ-I-Sekretionssystem, Kapsel-Biosynthesegene, Gene für Homologe zu Virulenzregulatoren und für mehrere mögliche Typ-II-Toxin-Antitoxin-Systeme. Gene für

mögliche Typ-IV-Pili wurden ebenfalls identifiziert, wobei keine Pili in elektronenmikroskopischen Bildern beobachtet werden konnten [1].

An einer Sammlung von Transposonmutanten von *A. frigidaquae* wurde untersucht, an welchen Stellen des Genoms die Insertion von Transposons die Fähigkeit der Bakterien beeinträchtigt, in Ko-Kultur mit der Amöbe *Acanthamoeba lenticulata* zu wachsen. Auf diese Weise wurden Gene identifiziert, deren Produkte eine Bedeutung als Virulenz- oder Fitnessfaktoren haben können. Im Genom von im Wachstum beeinträchtigten Transposonmutanten waren Transposonkonstrukte in Genbereichen von Genen für die Lipopolysaccharid- und Kapsel-Biosynthese, in Stoffwechselgenen und in Genen für regulatorische Proteinen wie RelA, einem Regulator der Stringenten Kontrolle, integriert. Mutanten mit Insertionen in der Genominsel, in der sich Gene des möglichen T6SS befinden, wurden dabei nicht detektiert [5].

Das Bakterium persistiert in der humanen Makrophagen-Zelllinie U937, humanen Alveolarepithelzellen, der Maus-Makrophagen-Zelllinie J774A.1 und in der Amöbe *Acanthamoeba lenticulata*, ist aber nicht in der Lage, sich zu vermehren [1, 5, 6] und im Gegensatz zum attenuierten Lebendvakzinestamm LVS von *F. tularensis* ssp. *holarctica* nicht fähig, das Phagosom zu verlassen und ins Zytosol der infizierten Zelllinien zu gelangen. Eine Mutante, in deren Genom *ig/C*, ein Gen, das für einen Bestandteil des T6SS der FPI kodiert, deletiert war, konnte das Phagosom ebenfalls nicht verlassen [1, 6]. In einem *ex vivo*-Lungenmodell persistierte *A. frigidaquae* in einem ähnlichen Maße wie eine *ig/C*-Deletionsmutante von *F. tularensis* ssp. *holarctica* LVS, während *F. tularensis* ssp. *holarctica* LVS sich in den Lungenzellen vermehren konnte [6].

A. frigidaquae, *A. guangzhouensis* und *A. inopinata* werden in der TRBA 466 „Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea)“ der Risikogruppe 1 zugeordnet [7].

Empfehlung

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien in Anlage 1 GenTSV wird *Allofrancisella frigidaquae* (*Francisella* sp. W12-1067) als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten der **Risikogruppe 2** zugeordnet.

Begründung

Bei *A. frigidaquae* handelt es sich um ein Bakterium, das mit bakteriellen Krankheitserregern von Tieren und Menschen verwandt ist und intrazellulär in etablierten Zelllinien und Amöben persistiert. Es verfügt somit über Mechanismen, die die intrazelluläre Abtötung durch Makrophagen bzw. Amöben verhindern. Das Genom enthält mögliche Virulenz- und Fitnessfaktoren mit Ähnlichkeit zu Virulenz- und Fitnessfaktoren pathogener Bakterien. Eine Pathogenität von *A. frigidaquae* ist deshalb nicht auszuschließen [6, 8].

Literatur

1. Rydzewski K, Schulz T, Brzuszkiewicz E, Holland G, Lück C, Fleischer J, Grunow R, Heuner K (2014). Genome sequence and phenotypic analysis of a first German *Francisella* sp. isolate (W12-1067) not belonging to the species *Francisella tularensis*. *BMC Microbiol* **14**(1):1–15.
2. Qu P-H, Li Y, Salam N, Chen S-Y, Liu L, Gu Q, Fang B-Z, Xiao M, Li M, Chen C, Li W-J (2016). *Allofrancisella inopinata* gen. nov., sp. nov. and *Allofrancisella frigidaquae* sp. nov., isolated from

water-cooling systems, and transfer of *Francisella guangzhouensis* Qu et al. 2013 to the new genus as *Allofrancisella guangzhouensis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**(11):4832–8.

3. **Meier-Kolthoff JP, Göker M** (2019). TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nat Commun* **10**(1):1–10.
4. **Chaumeil P-A, Mussig AJ, Hugenholtz P, Parks DH** (2020). GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. *Bioinformatics* **36**(6):1925–7.
5. **Köppen K, Chen F, Rydzewski K, Eienkel R, Böttcher T, Morguet C, Grunow R, Eisenreich W, Heuner K** (2019). Screen for fitness and virulence factors of *Francisella* sp. strain W12-1067 using amoebae. *Int J Med Microbiol* **309**(6):151341.
6. **Köppen K** (2020). Pathogenetische und Molekularepidemiologische Studien zu *Francisella* in Deutschland. Dissertation. Freie Universität Berlin, Berlin.
7. **TRBA** (2015). Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen (TRBA 466) <https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/TRBA-466.html>. Besucht am 28.09.2021.
8. **Appelt S, Faber M, Köppen K, Jacob D, Grunow R, Heuner K** (2020). *Francisella tularensis* Subspecies *holarctica* and Tularemia in Germany. *Microorganisms* **8**(9):1448.