

Posudok z posudzovania rizika v uzavretých priestoroch

(podľa §4 Vyhlášky č. 274/2019 Z. z.)

Posudok vypracovaný pre: *E. coli* a hmyzie bunky transformované/transfekované vektormi s *Is86-1* a *Is86-2* a ich derivátmi

Žiadateľ: RNDr. Juraj Koči, PhD.

Zariadenie: Ústav zoológie SAV, v. v. i. v Bratislave

Klonovanie a expresia génov z *Ixodes scapularis* v *Escherichia coli* a líniiach hmyzích buniek

Génové technológie: klonovanie, sekvenovanie a expresia proteínu

Spôsob využitia: základný vedecký výskum

Možný nepriaznivý účinok: žiaden

Hodnotenie rizika: žiadne

Manažment rizika: RT1

Celkový dopad a záver: nepredstavuje riziko pre človeka a ŽP

Organizmy prijímateľa:

baktérie: Escherichia coli K12 a jej deriváty, *Escherichia coli B* a jej deriváty,

hmyzie bunky: ovariálne bunkové línie motýľa Spodoptera frugiperda Sf 9 a Sf 21, bunkové línie z vajícok motýľa Trichoplusia ni HighFive™

Organizmy darcu:

kliešť: Ixodes scapularis

Vektory:

pET28a-c(+) – *f1, canr, lacI, PT7, MCP, 6xHis*

pRSET-A – *f1, ampr, pUCori, PT7, 6xHis, XpressEpitope, MCP*

pFastBac1 – *f1, ampr, pUC, Tn7R, genr, MCP, SV40, Tn7L (Bac-to-Bac™ Baculovirus expression system)*

pGEM-T Easy – *f1, ampr, MCP, pUC/M13R, lacZ, pUC/M13L*

a ich deriváty

Vložený genetický materiál:

Is86-1 (predpokladaný gén kódujúci proteín z čreva kliešťa *Ixodes scapularis*) a jeho EGF domény,

Is86-2 (predpokladaný gén kódujúci proteín z čreva kliešťa *Ixodes scapularis*) a jeho EGF domény.

(1) Potenciálne škodlivé účinky vplyvu novovzniknutých GMO, ako aj minimalizácia ich vplyvu na životné prostredie a manažment rizika je sumarizovaný v Prílohe 1: Hodnotenie génov.

- A. *E. coli* a hmyzie bunky transformované/transfekované vektormi s *Is86-1* a *Is86-2* a ich EGF derivátmi sú bez škodlivých vplyvov na zdravie ľudí a životné prostredie. Detailné charakteristiky vid'. bod (2).
- B. Vedecko-výskumná činnosť: génová technika bude použitá na nadprodukciiu a izoláciu rekombinantných proteínov *Is86-1* a *Is86-2* (proteíny z čreva kliešťa *Ixodes scapularis*) a ich EGF domén. Rekombinantný proteín bude následne podrobený skríningu úlohy počas infekcie kliešťa *Ixodes scapularis* rôznymi mikroorganizmami.

- C. Žiadne škodlivé vplyvy nepredpokladáme.
- D. Výskyt škodlivých vplyvov je nepravdepodobný.

(2) Identifikácia škodlivých vplyvov GMO:

A. organizmy prijímateľa:

1. Prijemcom génov sú baktéria *E. coli* K12 a jej deriváty, *E. coli* B a jej deriváty, línie hmyzích buniek Sf9, Sf21 a HighFive™, sú nepatogénne bez známeho škodlivého vplyvu na zdravie človeka a životné prostredie.
2. Neobsahujú autochtónne vektory, ktoré by mohli mobilizovať vnesený genetický materiál.
3. Uvedené bakteriálne kmene a hmyzie línie sú laboratórne kmene s výrazne zníženou schopnosťou prežitia v prírodnom prostredí, čo je spôsobené požiadavkou špecifických podmienok pre rast a rozmnožovanie týchto mikroorganizmov/organizmov.
4. Dlhá história ich používania v biotechnológiách preverila ich bezpečnosť v RT1.
5. Rozsah hostiteľov je bezpredmetné posudzovať v uzavretom priestore zariadenia.
6. Nedôjde k významným zmenám fyziologických charakteristík v konečnom GMM/GMO.
7. Posudzovať biotopy a geografické rozloženie je bezpredmetné v uzavretom priestore zariadenia.
8. Posudzovať zapojenie do environmentálnych procesov je bezpredmetné v uzavretom priestore zariadenia.
9. Posudzovať vzájomné pôsobenie na iné mikroorganizmy/organizmy je bezpredmetné v uzavretom priestore zariadenia.
10. Posudzovať schopnosť tvorby spór alebo sklerócií je bezpredmetné v uzavretom priestore zariadenia.

Záver: Uvedené organizmy prijímateľa (*E. coli* K12 a B, hmyzie bunky) sú zatriedené do RT 1.

B. organizmy darcu:

1. Darcom génov sú kliešte: *Ixodes scapularis*
Kliešte sú krv cicajúce ektoparazity parazitujúce na cicavcoch, vtákoch a plazoch. Môžu byť vektorom prenosu chorôb. V našich experimentoch použijeme nepatogénne jedince z laboratórneho chovu (Ústave zoológie SAV, v. v. i. v Bratislave).
2. Autochtónne vektory nemajú význam v uzavretom priestore.
3. Rozsah hostiteľov nemá význam v uzavretom priestore.
4. Iné fyziologické charakteristiky vo vzťahu ku GMO a mikroorganizmom nie sú relevantné.
5. Nie sú relevantné na prítomnosť génov, ktoré spôsobujú odolnosť proti antimikrobiálnym látkam vrátane antibiotík.

Záver: Uvedené organizmy darcov sú zatriedené do rizikovej triedy 1.

C. klonovacie vektory:

pET28a-c(+) – *f1*, *canr*, *lacI*, *PT7*, *MCP*, *6xHis*
pRSET-A – *f1*, *ampr*, *pUCori*, *PT7*, *6xHis*, *XpressEpitope*, *MCP*
pGEM-T Easy – *f1*, *ampr*, *MCP*, *pUC/M13R*, *lacZ*, *pUC/M13L*
pFastBac1 – *f1*, *ampr*, *pUC*, *Tn7R*, *genr*, *MCP*, *SV40*, *Tn7L* (*Bac-to-Bac*™ *Baculovirus expression system*)
a ich deriváty

1. Všetky použité klonovacie vektory (uvedené vyššie) sú bežné, komerčne dostupné.
2. Neobsahujú gény alebo sekvencie, ktoré by mohli dať výslednému organizmu taký fenotyp, ktorý by bol škodlivý pre človeka, rastliny, zvieratá alebo životné prostredie. Gény kódujúce rezistenciu

voči antibiotikám, ktoré sa nachádzajú na plazmidoch, kódujú rezistenciu voči antibiotikám používaným v klinickej praxi (ampicilín, kanamycín, gentamicín). Plazmidy sa však používajú len v procesoch prebiehajúcich v uzavretých laboratórnych podmienkach, takže šírenie génu kódujúceho rezistenciu voči klinicky využívanému antibiotiku v prírodnej populácii mikroorganizmov nie je pravdepodobné.

3. Sú imobilné a ani po vložení fragmentu DNA do ich štruktúry sa nezvyší ich frekvencia a neintegrujú sa do chromozómu.

Záver: Uvedené vektory sú zatriedené do rizikovej triedy 1.

D. vložený genetický materiál:

1. *Is86-1 a jeho EGF domény, Is86-2 a jeho EGF domény – gény kódujúce proteíny z čreva kliešťa Ixodes scapularis.*

2. Použitie expresné systémy *E. coli* neumožňujú sekréciu produkovaných bielkovín do okolitého prostredia, tieto zostávajú v bunke a ich uvoľnenie do média je možné len v prípade lýzy buniek. Produkcia rekombinantných proteínov v *E. coli* a hmyzích bunkách, rovnako ako ani ich nadprodukcia v týchto organizmoch, nepredstavuje žiadne riziko z toxického ani alergénneho hľadiska.

3. Zdroj, identita organizmu darcu a charakteristika sú opísané v časti b. „Organizmy darcu“ tohto posúdenia.

4. História predchádzajúcich genetických modifikácií nie je známa.

5. Genetický materiál bol vložený do plazmidov a jeho vloženie nedôjde k aktivácii alebo deaktivácii hostiteľských génov.

Záver: Uvedený vložený genetický materiál je zatriedený do rizikovej triedy 1.

E. výsledné GMO:

1. Výsledným geneticky modifikovaným mikroorganizmom/organizmom budú kmene *E. coli* K12 a B a línie hmyzích buniek, ktoré nebudú mať toxické ani alergénne účinky.

2. Výsledné GMO v porovnaní s hostiteľským alebo rodičovským organizmom nebudú patogénne ani infekčné.

3. Výsledné GMO v porovnaní s hostiteľským alebo rodičovským organizmom nebudú mať zvýšenú kolonizačnú schopnosť.

4. Výsledné GMO nie sú infekčné, nespôsobujú choroby, mimo laboratórnych podmienok sú neživotaschopné, sú rezistentné na ampicilín, kanamycín, gentamicín, sú nealergénne a netoxické.

5. Výsledné GMO sú bez negatívneho dopadu na životné prostredie.

6. V ekosystéme neprežijú ani pri neúmyselnom uvoľnení.

7. Posudzovať vzájomné pôsobenie na iné mikroorganizmy je bezpredmetné v uzavretom priestore zariadenia a vzhľadom na charakter experimentálnych techník.

8. Výsledné GMO nebudú pôsobiť na rastliny a zvieratá.

9. Výsledné GMO sa nezapoja do biogeochemických procesov.

Používané geneticky modifikované organizmy majú tieto vlastnosti:

- a) je nepravdepodobné, že organizmus prijímateľa alebo rodičovský organizmus spôsobí poškodenie zdravia ľudí alebo poškodenie zdravia zvierat a rastlín v životnom prostredí, ak sú vystavené jeho účinkom,
- b) je predpoklad, že povaha vektora a vloženého genetického materiálu nedávajú geneticky modifikovanému organizmu fenotyp, ktorý spôsobí poškodenie zdravia ľudí, poškodenie zdravia zvierat a rastlín v životnom prostredí, ak sú vystavené jeho účinkom, alebo ktorý má za následok škodlivé vplyvy na životné prostredie a
- c) je predpoklad, že geneticky modifikovaný organizmus nespôsobí ochorenie ľudí ani ochorenie zvierat a rastlín v životnom prostredí, ak sú vystavené jeho účinkom, a že nevplyva škodlivo na životné prostredie.

Výsledok posúdenia: Génové technológie a práca s uvedenými GMO sú bezpečné pre človeka, rastliny a zvieratá, nepredstavujú riziko ani pre životné prostredie a preto sú v súlade s §3, ods. (5) Vyhlášky č. 274/2019 Z. z., zaradené do rizikovej triedy 1.

Dátum: 01. 10. 2024

Vypracoval: RNDr. Juraj Koči, PhD.