

**Posudok z posúdenia rizika v uzavretých priestoroch  
(podľa §4 Vyhlášky č. 274/2019 Z.z.)**

**Posudok vypracovaný pre *E. coli Stb13* transformované vektormi:  
pLVTHM-hADAM17-2061  
pLVTHM-hADAM10-1947**

(1) Posudok z posúdenia rizika používania v uzavretých priestoroch obsahuje

- a) identifikáciu škodlivých vplyvov geneticky modifikovaných organizmov, vid' bod (2)
- b) charakteristiky činností, v ktorých je použitá génová technika, GMO vznikne transformáciou kompetentných buniek *E.coli Stb13* plazmidmi pLVTHM-hADAM17-2061, pLVTHM-hADAM10-1947. GMO sa použije na pomnoženie plazmidu metódou kultivácie transformovaných *E.coli*, po ukončení ktorej (18 - 20 hod) bude zlikvidovaný lýzou buniek počas izolácie plazmidovej DNA.
- c) údaje o intenzite účinkov škodlivých vplyvov,  
Žiadne škodlivé vplyvy.
- d) vyhodnotenie pravdepodobnosti výskytu škodlivých vplyvov.  
Výskyt škodlivých vplyvov sa nepredpokladá.

(2) Identifikácia škodlivých vplyvov podľa odseku 1 písm. a) spojených s

- a) organizmom **prijímateľa** obsahuje údaje o
  1. povahe patogénnosti a virulencie, infekčnosti, alergénosti, toxicity a vektorov prenosu chorôb, *E.coli Stb13* je laboratórny bakteriálny kmeň výlučne závislý na chemicky a fyzikálne definovaných kultivačných podmienkach. Je nepatogénny, nevirulentný, neinfekčný, nealergénny, netoxický, bez vektorov prenosu chorôb.
  2. povahe autochtónnych vektorov a náhodných činiteľov v prípadoch, keď mobilizujú vložený genetický materiál, a frekvencii mobilizácie,  
Kmeň *E.coli Stb13* nemá autochtónne vektory, cudzí genetický materiál môže prijímať iba v tzv. kompetentnom stave.
  3. povahe a stabilite blokujúcich mutácií,  
Blokujúce mutácie stabilné v recipientnom organizme: F<sup>mcrB mrrhsdS20</sup>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub>) *recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20*(Str<sup>R</sup>) *xyl-5 λ leumtl-1*
  4. predchádzajúcich genetických modifikáciách,  
Kmeň *E.coli Stb13* je komerčne dostupný, teda certifikovaný s presnou charakterizáciou genotypu. Vplyv predchádzajúcich mutácií nepredpokladaný.
  5. rozsahu hostiteľov,  
*E.coli Stb13* je baktéria, ktorá nemá hostiteľský organizmus, nakoľko v prostredí organizmu, z ktorého bola vyšľachtená je neživotaschopná.
  6. významných fyziologických charakteristikách, ktoré môžu byť v konečnom geneticky modifikovanom organizme zmenené, a významné údaje o ich stabilite,  
Žiadne
  7. prirodzených biotopoch a geografickom rozložení,  
Prirodzeným biotopom *E.coli* je gastrointestinálny trakt, v ktorom je však kmeň *E.coli Stb13* absolútne neživotaschopný.

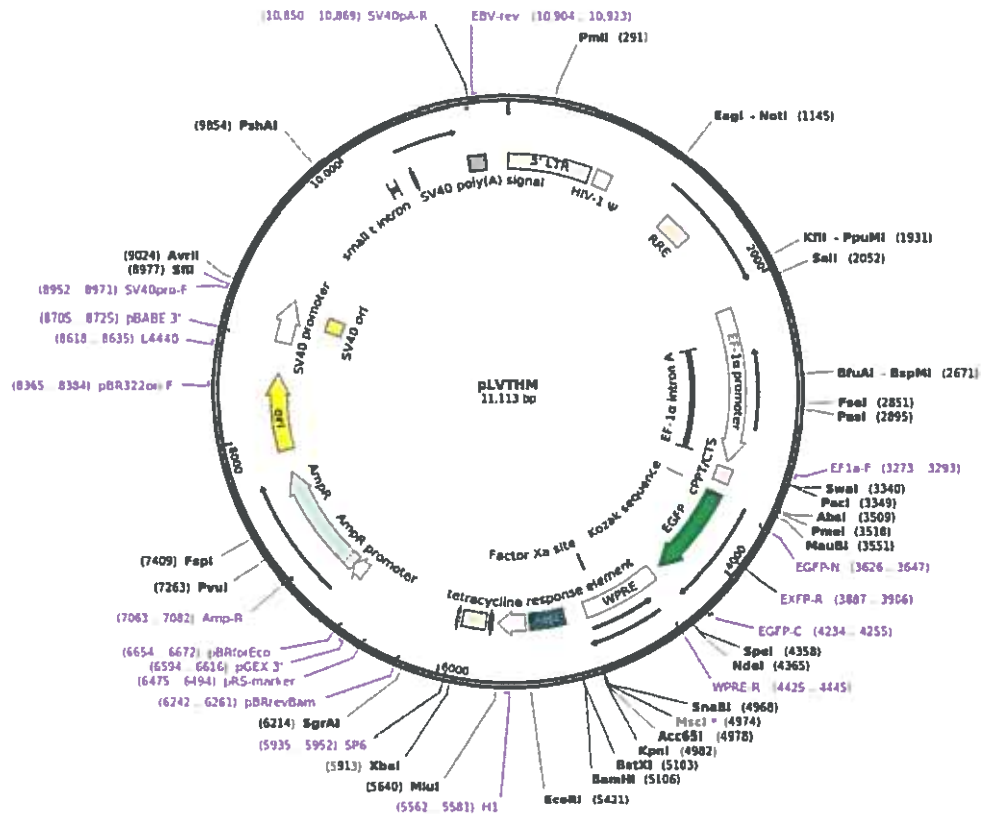
8. významných zapojeniach do environmentálnych procesov, napríklad fixácia dusíka alebo regulácia pH,  
Súvis s fixáciou dusíka reguláciou pH nepotvrdený, nepravdepodobný.
9. vzájomnom pôsobení s inými organizmami v životnom prostredí a účinkoch na ne vrátane pravdepodobne konkurenčných, patogénnych alebo symbiotických vlastností,  
Žiadne vzájomné pôsobenie s inými organizmami, ani v životnom prostredí, ani v uzavretom priestore.
10. schopnosti vytvárať štruktúry schopnosti prežitia, napríklad spóry alebo sklerócie,  
Nemá

b) organizmom **darca** obsahuje údaje o

1. povahe patogénnosti a virulencie, infekčnosti, alergénosti, toxicity a vektorov prenosu chorôb,  
Darcom sú rekombinantné vektory: **pLVTHM-hADAM17-2061**, **pLVTHM-hADAM10-1947**, ktorých DNA sme získali darom zo zahraničného vedeckého pracoviska. Sú nepatogénne, nevirulentné, neinfekčné, nealergénne, netoxické, bez vektorov prenosu chorôb.
2. povahe autochtónnych vektorov, napríklad sekvencia, frekvencia mobilizácie a špecifickosti,  
Prírodný vektor nemajú, nie sú mobilný element.
3. rozsahu hostiteľov,  
Nemajú.
4. iných fyziologických charakteristikách,  
Žiadne.
5. prítomnosti génov, ktoré spôsobujú odolnosť proti antimikrobiálnym látkam vrátane antibiotík,  
Darca - rekombinantné vektory **pLVTHM-hADAM10-1947**, **pLVTHM-hADAM17-2061** obsahujú sekvenciu génu pre rezistenciu na antibiotiká, konkrétne pre ampicilín.

c) vektorom obsahuje údaje o

1. povahe a zdroji vektora,  
Parentálnym vektorom týchto rekombinantných vektorov – darcov je komerčne dostupný plazmid **pLVTHM (Addgene)**.
2. štruktúre a množstve nukleovej kyseliny akéhokoľvek vektora alebo darca, ktoré zostáva v konečnej konštrukcii modifikovaného organizmu,  
Vektor je kompatibilný s prokaryotmi, veľkosti 11113 bp, vhodný na klonovanie v prokaryotických bunkách, so štandardne používanými regulačnými oblasťami.  
V bunkách *E.coli Stbl3* sa darca amplifikuje epizomálne synchronne s bunkovým delením.  
V geneticky modifikovaných bunkách je počet epizomálnych kópií darca cca 1000 na bunku.  
Obrázok 1: Mapa vektora pLVTHM.



3. frekvencii mobilizácie vloženého vektora, ak je prítomný v konečnom modifikovanom mikroorganizme, alebo schopnosti prenosu genetického materiálu, Žiadna mobilizácia.

d) vloženým genetickým materiálom obsahuje údaje o

1. osobitnej identite a funkcii vloženého genetického materiálu,  
Do vektora pLVTHM (Addgene) bola vložená sekvencie kódujúce shRNA targetujúce gény ADAM17 alebo ADAM10. Slúžia na utlmenie expresie génov ADAM17 alebo ADAM10 v cieľových bunkách.
2. úrovni prejavovania vloženého genetického materiálu,  
Fenotypicky žiadna – tento gén sa exprimuje len v eukaryotických bunkách.
3. zdroji genetického materiálu, identite organizmu darcu a charakteristike,  
Zdrojom génu je cDNA *H. sapiens*.
4. histórii predchádzajúcich genetických modifikácií,  
Nie sú.
5. mieste, kam je genetický materiál vložený s uvedením možnosti aktivácie alebo deaktivácie hostiteľských génov,  
Do MCS vektora.

e) výsledným geneticky modifikovaným organizmom obsahuje údaje o

1. očakávaných toxických alebo alergénnych účinkoch geneticky modifikovaného organizmu alebo jeho produktov,  
Žiadne.

2. porovnaní modifikovaného organizmu s organizmom prijemcu alebo s rodičovským organizmom vzhľadom na jeho patogénnosť,  
Nezmenená patogénnosť – oba organizmy sú nepatogénne.
3. očakávanej kolonizačnej schopnosti,  
Žiadna.
4. infekčnej dávke, chorobách, ktoré spôsobuje, možnosti prežitia mimo ľudského hostiteľa, biologickej stability, profiloch odolnosti proti antibiotikám, alergénnosti, toxigénnosti, existencii vhodných terapií a profylaktických opatrení, ak je organizmus patogénny pre imunokompetentných ľudí,  
Výsledné GMO nie sú infekčné, nespôsobujú choroby, mimo laboratórnych podmienok sú neživotaschopné, sú rezistentné na ampicilín, sú nealergénne a netoxické.
5. ekosystémoch, do ktorých môže byť organizmus neúmyselne uvoľnený z prostredia uzavretého používania,  
Vplyvy na ekosystémy nepredpokladané.
6. očakávanej schopnosti prežitia, rozmnožovania a rozsahu rozšírenia modifikovaného organizmu v identifikovaných ekosystémoch,  
GMO nemá schopnosť prežitia mimo definované médium.
7. predpokladanom výsledku vzájomného pôsobenia medzi modifikovaným organizmom a organizmami alebo mikroorganizmami, ktoré sú vystavené jeho pôsobeniu pri neúmyselnom uvoľnení do životného prostredia,  
Žiadne.
8. známych alebo predpokladaných účinkoch na rastliny a zvieratá, ako je patogénnosť, toxicita, alergénnosť, vektor niektorého patogénu, zmenené profily odolnosti proti antibiotikám, zmenený tropizmus alebo špecifickosť hostiteľa, kolonizácia,  
Žiadne účinky na rastliny a zvieratá.
9. známych alebo predpokladaných zapojeniach do biogeochemických procesov.  
GMO konštrukt, vzhľadom k vlastnostiam, množstvu a spôsobu manipulácie s ním nemá žiadnu možnosť zapojiť sa 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.

**Záver:** Používané geneticky modifikované organizmy, v súlade s §3, ods. (5) Vyhlášky č. 274/2019 Z.z., zaraďujem do rizikovej triedy 1.

Posudok vypracovala: Mgr. Ivana Kajanová, PhD.

09/2019