

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

Posudok vypracovaný pre geneticky modifikované ľudské nádorové bunkové línie NCC-IT a 2102EP
s nefunkčnými miRNA 371, miRNA 372 a miRNA 373.

Názov výsledného GMO	Príjemca (parentálny organizmus)		Darca		
	Názov	Zdrojový organizmus	Vektor	Názov vloženého proteínu/génu	Zdrojový organizmus proteínu/génu
NCCIT 371KO cl1	NCC-IT (RRID:CVCL_1451)	<i>Homo sapiens</i>	-	Cas9 + guide miRNA 371a-3p	<i>S. pyogenes, Homo sapiens</i> - syntetické
NCCIT 371KO cl3	NCC-IT (RRID:CVCL_1451)	<i>Homo sapiens</i>	-	Cas9 + guide miRNA 371a-3p	<i>S. pyogenes, Homo sapiens</i> - syntetické
NCCIT 371KO cl5	NCC-IT (RRID:CVCL_1451)	<i>Homo sapiens</i>	-	Cas9 + guide miRNA 371a-3p	<i>S. pyogenes, Homo sapiens</i> - syntetické
NCCIT 371KO cl10	NCC-IT (RRID:CVCL_1451)	<i>Homo sapiens</i>	-	Cas9 + guide miRNA 371a-3p	<i>S. pyogenes, Homo sapiens</i> - syntetické
NCCIT 371KO cl11	NCC-IT (RRID:CVCL_1451)	<i>Homo sapiens</i>	-	Cas9 + guide miRNA 371a-3p	<i>S. pyogenes, Homo sapiens</i> - syntetické
NCCIT 371KO cl12	NCC-IT (RRID:CVCL_1451)	<i>Homo sapiens</i>	-	Cas9 + guide miRNA 371a-3p	<i>S. pyogenes, Homo sapiens</i> - syntetické
N23c-3 DKO	NCC-IT (RRID:CVCL_1451)	<i>Homo sapiens</i>	-	Cas9 + guide miRNA 372 a miRNA 373	<i>S. pyogenes, Homo sapiens</i> - syntetické
N23c-4 CTRL	NCC-IT (RRID:CVCL_1451)	<i>Homo sapiens</i>	-	Cas9 + guide miRNA scrambled (bez cieľovej sekvencie)	<i>S. pyogenes, Homo sapiens</i> - syntetické
E371KO clone B	2102EP (RRID:CVCL_C522)	<i>Homo sapiens</i>	-	Cas9 + guide miRNA 371a-3p	<i>S. pyogenes, Homo sapiens</i> - syntetické
E371KO clone C	2102EP (RRID:CVCL_C522)	<i>Homo sapiens</i>	-	Cas9 + guide miRNA 371a-3p	<i>S. pyogenes, Homo sapiens</i> - syntetické
E371KO clone G	2102EP (RRID:CVCL_C522)	<i>Homo sapiens</i>	-	Cas9 + guide miRNA 371a-3p	<i>S. pyogenes, Homo sapiens</i> - syntetické

- (1) Posudok z posudzovania rizika používania v uzavretých priestoroch obsahuje
- a) identifikáciu všetkých možných škodlivých vplyvov geneticky modifikovaných organizmov,
Používané GMO sú bez škodlivého vplyvu na zdravie ľudí a životné prostredie, vid' charakteristiky v bode (2)
 - b) charakteristiky činností, v ktorých sa má použiť génová technika,
Používané GMO vznikli **tranzientnou transfekciou** nádorových buniek NCC-IT a 2102EP ribonukleoproteínovým komplexom zloženým z Cas9 proteínu a duplexnej gRNA (cRNA a tracrRNA) namierenej voči miRNA 371, miRNA 372 alebo miRNA 373. GMO línie sú darom od spolupracovníkov z pracoviska v Holandsku (Princess Máxima Center for Pediatric Oncology, Utrecht).

- c) údaje o intenzite účinkov možných škodlivých vplyvov,
Žiadne škodlivé vplyvy nepredpokladáme.
- d) vyhodnotenie pravdepodobnosti výskytu možných 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,
Ľudské nádorové bunkové línie NCC-IT a 2102EP sú nepatogénne, neinfekčné, netoxické, nemajú virulentné vlastnosti, nevyvolávajú alergické reakcie u ľudí a nemali by obsahovať ani vektory prenosu chorôb.
 - 2. povahe autochtónnych vektorov a náhodných činiteľov v prípadoch, keď mobilizujú vložený genetický materiál, a frekvencii mobilizácie,
Autochtónne vektory – nemajú; cudzí genetický materiál môže byť vnesený len genetickými technológiami.
 - 3. povahe a stability blokujúcich mutácií
Neidentifikované/nešpecifikované.
 - 4. predchádzajúcich genetických modifikáciách
Žiadna z predchádzajúcich genetických modifikácií parentálnej bunkovej línie NCCIT a 2102EP nie je známa.
 - 5. rozsahu hostiteľov
Nemajú hostiteľov.
 - 6. významných fyziologických charakteristikách, ktoré môžu byť v konečnom geneticky modifikovanom organizme zmenené a významné údaje o ich stability,
Absencia miRNA 371, miRNA 372 alebo miRNA 373 nespôsobuje žiadne zmeny v morfológických a fyziologických charakteristikách výsledných GMO buniek.
 - 7. prirodzených biotopoch a geografickom rozložení
Parentálne aj geneticky modifikované ľudské nádorové bunkové línie vyžadujú prísne definované kultivačné podmienky a nie sú schopné prežívať a množiť sa mimo laboratórnych podmienok.
 - 8. významných zapojeniach do environmentálnych procesov, napríklad fixácia dusíka alebo regulácia pH
Súvis s fixáciou dusíka alebo reguláciou pH nepotvrdený, nepravdepodobný.
 - 9. vzájomnom pôsobení s inými organizmami v životnom prostredí a účinkoch na ne vrátane pravdepodobne konkurenčných, patogénnych alebo symbiotických vlastností
Parentálne aj geneticky modifikované ľudské nádorové bunkové línie nie sú schopné prežívať a množiť sa mimo laboratórnych podmienok, preto ich akékoľvek vzájomné pôsobenie s inými organizmami v životnom prostredí je nepravdepodobné.
 - 10. Schopnosti vytvárať štruktúry schopné prežitia, napríklad spóry alebo sklerócie,
Nemajú.
- b) organizmom **darca** obsahuje údaje o
 - 1. povahe patogénnosti a virulencie, infekčnosti, alergénosti, toxicity a vektorov prenosu chorôb,
Genetická zmena bola vytvorená metódou Crispr-Cas9. Do buniek bol tranzientne transfekovaný ribonukleoproteínový komplex zložený z Cas9 proteínu + duplexnej gRNA (crRNA a tracrRNA) namierenej voči miRNA 371, miRNA 372 alebo miRNA 373.
Organizmom, z ktorého pochádza proteín Cas9 je *Streptococcus pyogenes*. gRNA sú namierené voči ľudským miRNA 371, miRNA 372 a miRNA 373. Komerčne dostupné Cas9 aj gRNA sú syntetického pôvodu (Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium), bez patogénnych, virulentných, alergénnych a toxických vlastností, sú neinfekčné a neprenášajú žiadne ochorenie.
 - 2. povahe autochtónnych vektorov, napríklad sekvencia, frekvencia mobilizácie a špecifickosti,

Autochtónne vektory nemajú.

3. rozsahu hostiteľov,
Nemajú.
4. iných fyziologických charakteristikách,
Žiadne.
5. prítomnosti génov, ktoré spôsobujú odolnosť proti antimikrobiálnym látkam vrátane antibiotík,
Žiadne.

c) **vektorom**, obsahuje údaje o

1. povahe a zdroji vektora,
Vektor sa pri tvorbe genetickej zmeny nepoužíva.
2. štruktúre a množstve nukleovej kyseliny akéhokoľvek vektora alebo darcu, ktoré zostáva v konečnej konštrukcii modifikovaného organizmu,
V konečnom GMO trvalo nezostala žiadna zo zložiek ribonukleoproteínového komplexu Cas9/gRNA – jedná sa len o „tranzientnú transfekciu“. Tento komplex sa ihneď po vstupe do bunky translokuje do jadra, kde gRNA rozpozná cieľovú sekvenciu, Cas9 ju poštiepi a modifikuje bunkovú DNA inzerciou/deléciou (InDels) v génoch kódujúcich miRNA 371a-3p alebo miRNA 372 alebo miRNA 373. Komplex sa z bunky rýchlo odstráni (do 24 hodín), čím sa minimalizuje šanca štiepenia DNA mimo cieľovej sekvencie (off-target).
3. frekvencii mobilizácie vloženého vektora, ak je prítomný v konečnom modifikovanom mikroorganizme alebo schopnosti prenosu genetického materiálu,
V konečnom GMO nie je prítomný ani vektor a ani proteín Cas9 a gRNA.

d) **vloženým genetickým materiálom**, obsahuje údaje o

1. osobitnej identite a funkcii vloženého genetického materiálu,
Do buniek sa nevkladal genetický materiál – DNA, ani RNA. Bunky boli „tranzientne transfekované“ ribonukleoproteínovým komplexom Cas9/gRNA, ktorý sa ihneď po vstupe do bunky translokoval do jadra, kde gRNA rozpoznala cieľovú sekvenciu v génoch kódujúcich miRNA 371a-3p alebo miRNA 372 alebo miRNA 373, Cas9 ju poštiepil a modifikoval bunkovú DNA inzerciou/deléciou (InDels), čím sa narušil čítací rámec miRNA 371a-3p alebo miRNA 372 alebo miRNA 373. Výsledkom je, že výsledné GMO bunky neexprimujú a, b, 3p a 5p varianty miRNA 371, alebo miRNA 372, alebo miRNA 373.
2. úrovni prejavu vloženého genetického materiálu,
Absencia expresie variantov miRNA 371 (a, b, 3p a 5p) alebo miRNA 372 alebo miRNA 373.
3. zdroji genetického materiálu, identite organizmu darcu a charakteristike,
Syntetické - Cas9 proteín a duplexná gRNA.
4. histórii predchádzajúcich genetických modifikácií,
Nie sú.
5. mieste, kam bol genetický materiál vložený s uvedením možnosti aktivácie alebo deaktivácie hostiteľských génov,
Genetický materiál sa do genómu hostiteľských buniek nevkladal - ribonukleoproteínový komplex Cas9/gRNA spôsobil cieleňú a špecifickú deaktiváciu hostiteľských génov miRNA 371a-p, alebo miRNA 372, alebo miRNA 373.

e) **výsledným geneticky modifikovaným organizmom**, obsahuje údaje o

1. očakávaných toxických alebo alergénnych účinkoch geneticky modifikovaného organizmu alebo jeho produktov,
Žiadne toxické alebo alergénne účinky GMO alebo jeho produktov.
2. porovnaní modifikovaného organizmu s organizmom príjemcu alebo s rodičovským organizmom vzhľadom na jeho patogenosť,
Nezmenená patogenosť - žiadna.

3. očakávanej kolonizačnej schopnosti,
Žiadna.
4. infekčnej dávke, chorobách, ktoré spôsobuje, možnosti prežitia mimo ľudského hostiteľa, biologickej stabilite, profíloch odolnosti proti antibiotikám, alergénosti, toxigénosti, existencii vhodných terapií a profylaktických opatrení, ak je organizmus patogénny pre imunokompetentných ľudí,
GMO sú neinfekčné, nealergénne, netoxické, nepatogénne a mimo definované laboratórne podmienky neživotaschopné.
5. ekosystémoch, do ktorých by mohol byť organizmus neúmyselne uvoľnený z prostredia uzavretého používania,
Prežitie GMO pri neúmyselnom uvoľnení z prostredia uzavretého priestoru nie je vzhľadom na ich náročné podmienky kultivácie možné. Za daných podmienok nepredstavuje GMO riziko pre človeka a pre životné prostredie.
6. očakávanej schopnosti prežitia, rozmnožovania a rozsahu rozšírenia modifikovaného organizmu v identifikovaných ekosystémoch,
Žiadna, GMO nemajú schopnosť prežitia mimo definované médium.
7. predpokladanom výsledku vzájomného pôsobenia medzi modifikovaným organizmom a organizmoch alebo mikroorganizmoch ktoré sú vystavené jeho pôsobeniu pri neúmyselnom uvoľnení do životného prostredia,
Vzhľadom na vlastnosti GMO uvedené v bodoch 4 - 6 nepredpokladáme žiadne vzájomné pôsobenie medzi GMO a inými organizmami.
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 známe ani predpokladané účinky na rastliny a zvieratá.
9. známych alebo predpokladaných zapojeniach do biogeochemických procesov.
GMO vzhľadom k vlastnostiam, množstvu a spôsobu manipulácie s ním nemá žiadnu možnosť zapojiť sa do biogeochemických procesov.

Záver:

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 nevplýva škodlivo na životné prostredie.

Tomuto riziku je možné zamedziť a ľahko ho odstrániť ochrannými opatreniami, najmä fyzickými zábranami, a systémom práce zavedeným v laboratóriách RT1 BMC SAV, v. v. i., ktoré sú definované v Prevádzkovom poriadku konkrétneho laboratória.

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

Vedúca projektu: RNDr. Zuzana Kozovská, PhD.

e. č.: 55/12/11