

# TEKNOFEST

## HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

### PROJE DETAY RAPORU

#### ÜNİVERSİTE VE ÜZERİ SEVİYESİ PROJE KATEGORİSİ

TAKIM ADI

CRISPR.BOT

PROJE ADI

CRISPR.BOT: Robotik Otonom Sistemler ile Genetik Mühendislik

BAŞVURU ID

319502



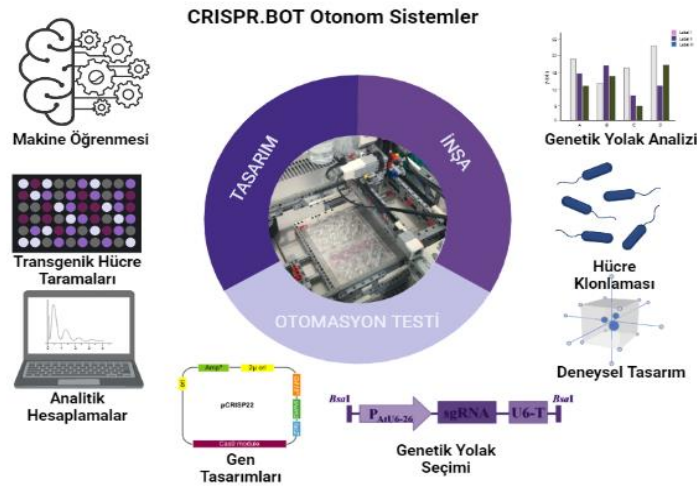
## İçindekiler

### 1. Proje Özeti (Proje Tanımı) (5 puan)

Otonom robotik sistemler, moleküler biyoloji ve genetik yöntemlerinin daha otomatize, hızlı, pratik bir şekilde 24 saat çalışabileceği bir sistem sağlamaktadır ve bu sistemlerin, protokollerini geliştirmek, güvenilirliği arttırmak amacıyla günden güne daha çok tercih edildiği görülmektedir. Bu sayede araştırmacılar tekrar eden deney süreçlerinden zaman kazanarak daha verimli üretken bir zaman geçirebilir ve sonuçları gözlemleyip yönetebilirler. Amacımız, robotik bir sistemle otomatize bir şekilde bakterilere transgen aktarımı (Green Fluorescent Protein, GFP ekspresyonu), sentetik gen kodlayan rekombinant virüsler ile insan hücrelerinde genetik düzenleme veya CRISPR gen mühendisliği teknolojisi ile genetik modifikasyon gerçekleştirmektir. Bu proje ile birlikte insan gücünü azaltmayı, hastalık yapıcı patojenik mikroorganizmalara (virüs veya bakteri örneğin SARS CoV-2 virüsü) el değmeden kapalı sistem içerisinde moleküler biyoloji ve genetik mühendisliğinin robotlar tarafından yapılabileceği bir alt yapının ilk versiyonlarını kurmayı hedefliyoruz.

### 2. Problem/Sorun (5 puan)

1. Manuel ilerleyen deney süreçlerinde aşamalar uzun süreli ve tekrarlanması gereken durumlar olabilmektedir. Aşamaların tekrarlanmasıyla hataya açık olmasının yanı sıra deney süreci için zaman kaybı ve maliyet verimsizliğine dönüşmektedir. Bu nedenle otonom sıvı işleyebilen sistemler çözüm olarak görülmektedir.
2. Tam otomatik sistemlerin maliyetlerinin çok fazla olması dışında bakımları da oldukça pahalıdır. Genellikle sistemlere özgü protokoller ve laboratuvar gereçleri kullanımı da gerektirdiğinden büyük bir maliyet kaybı oluşmaktadır (Turbak ve ark., 2002).
3. Kolay bir kurulum ve uygun fiyatlara sahip sistemlerin ulaşılabilir olmasında fayda vardır. Piyasaya bakıldığı zaman uygun fiyatlı, hassas ve aynı zamanda programlanabilme gereksinimlerini karşılayan makul moleküler biyoloji ve genetik düzenleme teknikleri gerçekleştirebilen özelleşmiş robotik sistemler bulunmamaktadır. Bu proje ile moleküler biyoloji ve genetik alanında uzaktan ve otonom robotik sistemlerin geliştirilmesiyle makine öğrenmesi, transgenik hücre taramaları, analitik hesaplamalar, gen tasarımları, genetik yolak seçimi, deneysel tasarım, hücre klonlaması ve genetik yolak analizleri insan eli değmeden hata payı çok düşük olacak şekilde gerçekleştirilebilecektir (**Şekil 1**).



**Şekil 1.** CRISPR.BOT Otonom Sistemler ile gerçekleştirilebilecek deneysel yaklaşımlar.

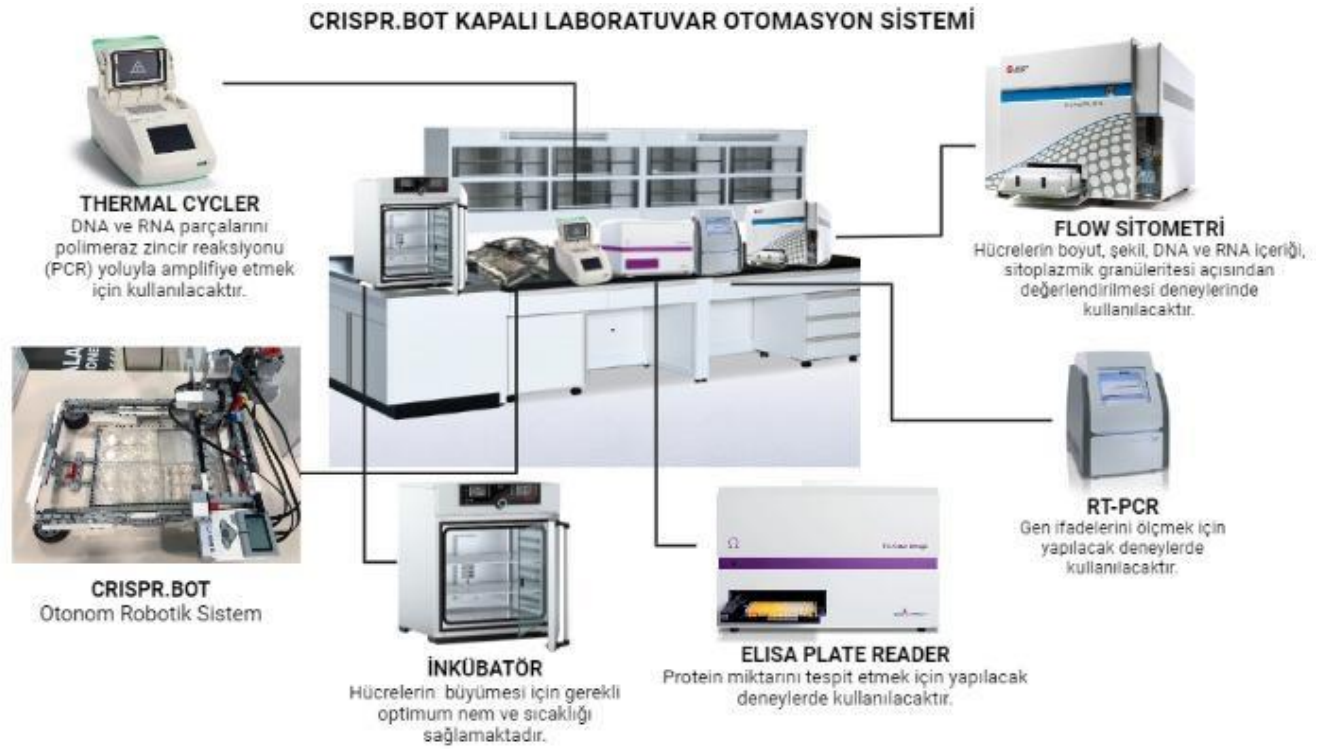
### 3.Çözüm (20 puan)

Sıvı işleyebilen sistemler teknolojisi yaşam bilimlerinin çeşitli alanlarında yer almaktadır. Sentetik biyoloji, mikrobiyoloji veya genetik gibi laboratuvar alanlarında protokolleri geliştirmek için ve güvenilirliği açısından günden güne otomatik sıvı işleme sistemleri kullanılmaktadır. Karmaşık sistemlerin programlanmasında yaygın olarak kullanılan ve geniş bir çalışma olanağı sunan Lego Mindstorms, robotik alanda makine prototiplerini tasarlamak gibi olanaklar sağlamaktadır. Sıvı işleyebilen Lego robotik sistemler biyoteknoloji deneylerinde kullanılabilmesi literatürde rapor edilmiştir (Gerber, 2017). Geleceğe yönelik olarak bu çalışmalar beraberinde biyoteknolojik uygulamalara ek olarak, rejeneratif tıp ve doku mühendisliği gibi gelişmekte olan alanlarda karmaşık ilaç verme deneyleri ve diğer birçok uygulama için yararlı olabileceği düşünülmektedir (Wagner, 2019).

Tam otomatik sistemlerin maliyetlerinin çok fazla olmasının yanı sıra aynı zamanda bakımları da oldukça pahalıdır. Genellikle sistemlere özgü protokoller ve laboratuvar gereçleri kullanımı da gerektirdiğinden büyük bir maliyet kaybı oluşmaktadır (Turbak, 2002). Uygun fiyatlı ve kolay kurulumu olan sistemlerin elimizin altında bulunmasında fayda vardır. Fakat piyasaya bakıldığı zaman uygun fiyatlı, hassas aynı zamanda programlanabilme gereksinimlerini karşılayan makul robotik sistemler bulunmamaktadır. CRISPR.BOT projesi ile Lego Mindstorms robotları ise bu boşluğu doldurarak hem maliyet açısından uygun hem de programlanabilirliği ile günlük laboratuvar rutinlerinde kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Ticari robotik sistemlerden yola çıkarak Lego Mindstorms tabanlı robotik sistemlerin maliyeti normal ticari robotlara kıyasla 50 kata kadar azaldığı tahmin edilmektedir. Akıllı ve çok yönlü bu robotik sistem moleküler biyoloji laboratuvarları için uygun maliyetlidir ve aynı zamanda geniş uygulama yelpazesi (**Şekil 2**) ile laboratuvar işlevlerine katkı sağlamaktadır (Wagner,2019).

Lego Mindstorms robotları, otonom robotik sistemlerle aynı deneysel verimi sağlayabilecek maliyet açısından daha uygun aynı zamanda programlanabilen ve uzaktan kontrolü sağlanabilen bir sistem sunmaktadır. Sıvı işleyebilen bu robotik sistemlerin biyoteknoloji deneylerinde ve laboratuvar rutinlerinde kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu CRISPR.BOT projesi sonunda gösterilmiştir. Biyoendüstri uygulamalarında maliyet etkin, pratik ve insan hatasından uzak inovasyonel bir teknolojinin ilk prototipini inşa ettik. Projemiz, otonom teknolojilerin birleşimi ile canlıların genetiğinin değiştirilebilmesinin nasıl hızlandırabileceğini kanıtlanmış oldu. Bakteriyel DNA transformasyonunun, lentivirüsler ile transgenik insan hücresi üretiminin ve CRISPR gen mühendisliği uygulanmış hücre geliştirme çalışmalarının el değmeden, uzaktan kontrollü, bütün deneysel aşamalarının tarafımızca planlanıp algoritma ve kodlamasının inşa edildiği ilk deneysel çalışmamız başarıyla gerçekleştirilmiş oldu (**Şekil 3-20**). Uzaktan kontrol ile sıvı işleyebilen ve programlanmış robotik sistem ile ilk deneyler gerçekleştirilerek otomatize bir şekilde bakteriler içerisinde veya insan hücrelerinde genetik aktarım yapılarak yeşil floresan proteini ifade edebilen transgenik bakteri veya insan hücreleri oluşturulmuştur. CRISPR.BOT projesi ile ilk defa CRISPR gen mühendisliği kodlayan rekombinant virüsler el değmeden otonom bir yaklaşımla hücrelerde genetik modifikasyonlar gerçekleştirilmiş ve alt klonlama işlemleri başarılmıştır.





**Şekil 2.** CRISPR.BOT Kapalı Laboratuvar Otonom Sistemlerinin Geliştirilmesi ve Laboratuvar analiz cihazları (RT-PCR, ELISA Plate Reader, Flow Sitometri, İnkübatör ve Thermal Cycler) ile entegrasyonu.

#### 4. Yöntem (20 puan)

1. Proje başlangıcında teknoloji hazırlık seviyesi 1 THS olan **Yöntem 0** 'CRISPR.BOT otonom ve uzaktan kontrol edilebilir robotik sistemin inşası' projenin ilk 12 ay sonunda gerçekleştirilmiştir.
2. CRISPR.BOT V1 inşası sonrası ilk deneysel yaklaşım olan **Yöntem 1** 'bakterilerde genetik transformasyon' süreci için programlama ve laboratuvar testleri gerçekleştirilmiştir.
3. CRISPR.BOT V2 inşası sonrası **Yöntem 2** 'İnsan hücrelerinde genetik aktarım', **Yöntem 3** 'CRISPR gen modifikasyonu' ve **Yöntem 4** 'genetik modifiye hücrelerin klonlama işlemlerinin' algoritmaları ve laboratuvar testleri gerçekleştirilmiştir.
4. Geliştirilen CRISPR.BOT sistemi ve moleküler biyoloji deney algoritmaları ile proje sonunda üretilen prototip, teknoloji hazırlık seviyesi 4 THS olmuştur.

#### **Yöntem 0: CRISPR.BOT otonom ve uzaktan kontrol edilebilir robotik sistemin inşası**

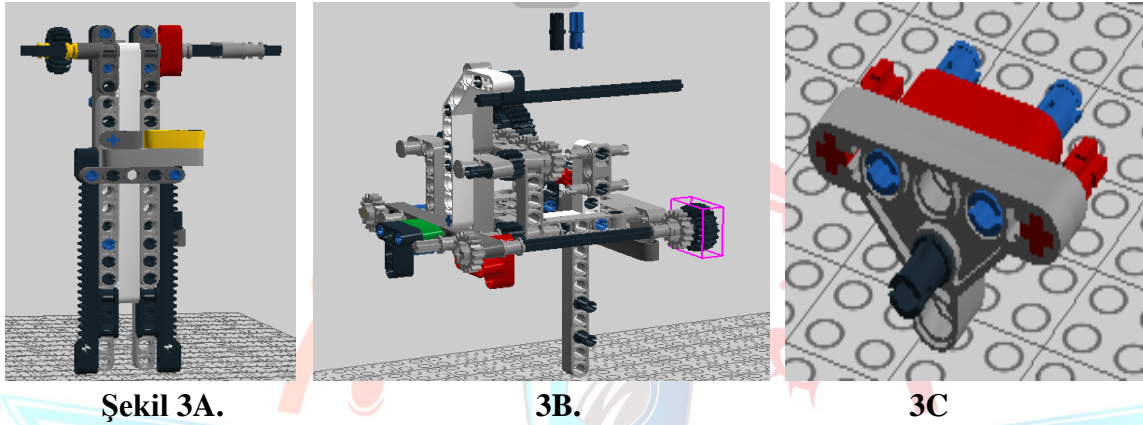
CRISPR. BOT V1 izlemek için:

<https://drive.google.com/file/d/1dAMVvnkI0DES3bo71ki12z7p-iDurkRc/view?usp=sharing>

CRISPR. BOT V2 izlemek için:

<https://drive.google.com/file/d/1LZHXS75L9G2tkSbr0kz31T87AnxwWWSC/view?usp=sharing>

Şırınganın hareketini sağlamak için parçalar **Şekil 3A** ve **3B**'deki parçalar bir araya getirilmiştir. **Şekil 3A** yalnızca şırınga pistonunun sabitlenmesi ile sıvı çekip bırakma işlemini yerine getirebilirken, **Şekil 3B**'nin iç kısmına yerleştirildiğinde ve bağlantılar sağlandığında iki yeni hareket sistemine daha sahip olmuştur. Bunlardan ilki pipet ucunun sıvıya girebilmesi için yukarı ve aşağı hareketlerini sağlamaktadır. Diğer ise mekanizmanın dört köşesinde bulunan çarklar bir tekerlek görevi görerek dişliler üzerinde hareket etmektedir ve çerçevenin üzerinde bulunan sistemde üzerine yerleştirilerek robotik sistem üzerinde hareket etme yetisine sahip olmaktadır. **Şekil 3C**, Şırıngayı sisteme bağlı tutan bir parçadır.



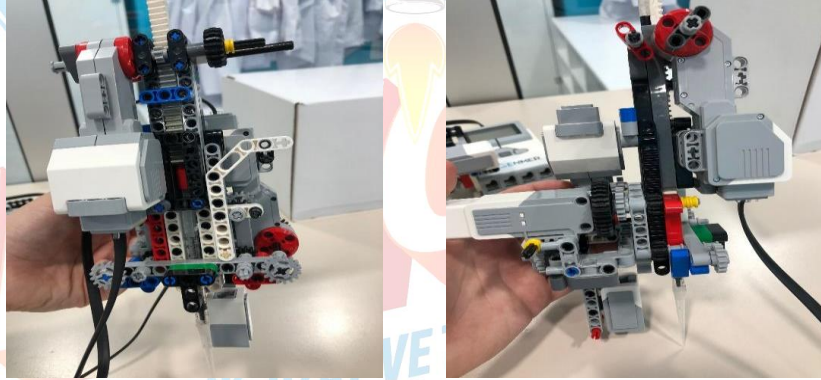
Şekil 3A.

3B.

3C

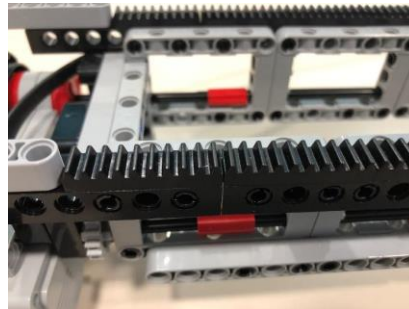
Şekil 3. CRISPR.BOT pipetleme sisteminin inşası.

Görselde bulunan sol yukarıdaki çark bir servo motora bağlanmıştır ve tek başına şırınga sistemi olarak adlandırdığımız sıvı çekip bırakma görevini gerçekleştirmiştir (**Şekil 4**).



Şekil 4. CRISPR.BOT pipetleme sisteminin servo motora entegrasyonu.

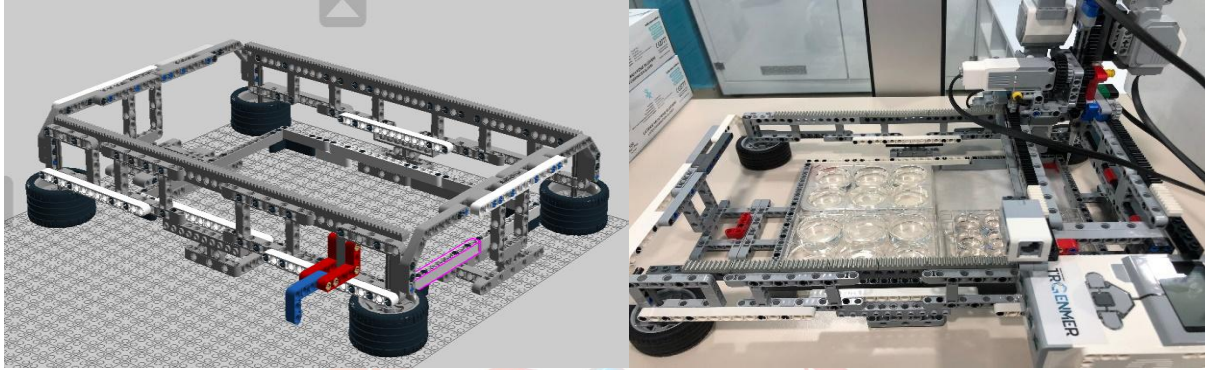
Çarkların hareketi dişli raylı plakalar ile sağlanarak pipetin yukarı ve aşağı doğru hareketi sağlanmıştır (**Şekil 5**).



Şekil 5. Çarkların üzerinde hareket edebilmesini sağlayan dişli parça.

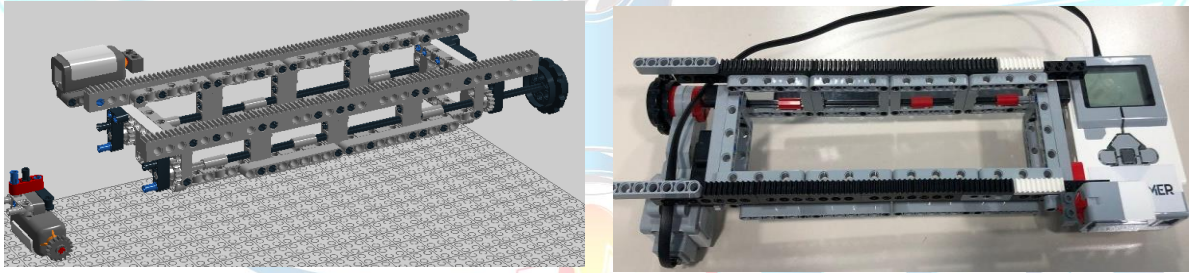


Pipet hareketlerini, sıvı alıp verme işlemlerini gerçekleştiren pipet sistemi, çerçevenin üzerine yerleştirilmiştir. Hareketler çerçeve üzerinde bulunan dişli parçalar ve pipet sisteminin alt kısmında bulunan çarklar sayesinde gerçekleştirilmiştir. Çerçeve sabittir herhangi bir hareket kabiliyeti bulunmamaktadır (Şekil 6).



Şekil 6. CRISPR.BOT robotik sistemin alt kısmıdır, çerçeve olarak adlandırılır.

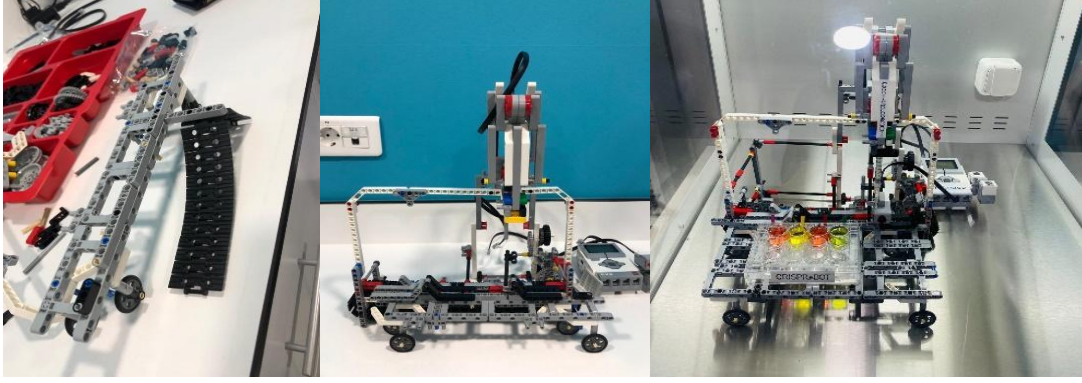
Pipet sisteminin sağa sola hareketini ve çerçeve üzerinde ileri geri hareketlerini sağlayan mekanizmadır (Şekil 7).



Şekil 7. Pipetin diğer kuyular arası sıvı geçiş hareketlerini sağlayan sistem.

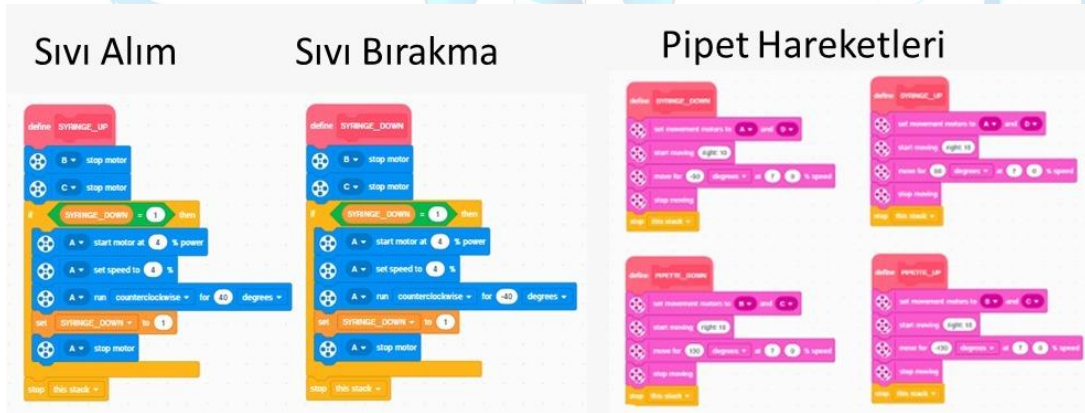
Kurulumu gerçekleştirilen yeni versiyon için sistem mekanizması tamamen değiştirilmiştir ve robotik sisteme yeni pipet hareketleri eklenmiştir. Pipet mekanizması CRISPR.BOT V1'de sadece yukarı ve aşağı hareketleri sağlanırken, kurulumu gerçekleştirilen CRISPR.BOT V2'de sağa ve sola hareketleri de sağlanabilmektedir. CRISPR.BOT V1 pipetin altında bulunan raylı bir sistem ile hareket sağlanarak işlem yapılacak olan well plate üzerinde bulunan kuyucuk pipetin hizasına getirilirken, CRISPR.BOT V2 ile pipet kendine ait raylı bir sistem ile istenilen yere götürülebilmektedir.

Lego Mindstorms serisindeki kitler programlanarak özelleştirilebilir bir robotik sistem oluşturmak için yazılım ve gerekli donanıma sahiptir (Montes, 2021). Lego Mindstorms EV3 Home Edition yazılımı, Lego web sitesinden indirilmiş ve **Yöntem 0** iş paketi sonunda robotlara belirli işlevler kazandırılmıştır (Şekil 8). Robota kod yüklemek için PC, tablet ya da akıllı telefon üzerinden erişim sağlanmıştır. Yapılan çalışmada Lego Digital Designer ile Lego yazılımı yardımı ile robota sıvı işleyebilme yeteneği sunarak **Yöntem 1-4**'te belirtilen deneysel yaklaşımların test edilmesi hedeflenmiştir. Her iki program da Mac, PC, İOS ve Android için uygun ve mevcuttur (Gerber, 2017).



Şekil 8. CRISPR.BOT V1 kurulum aşamaları.

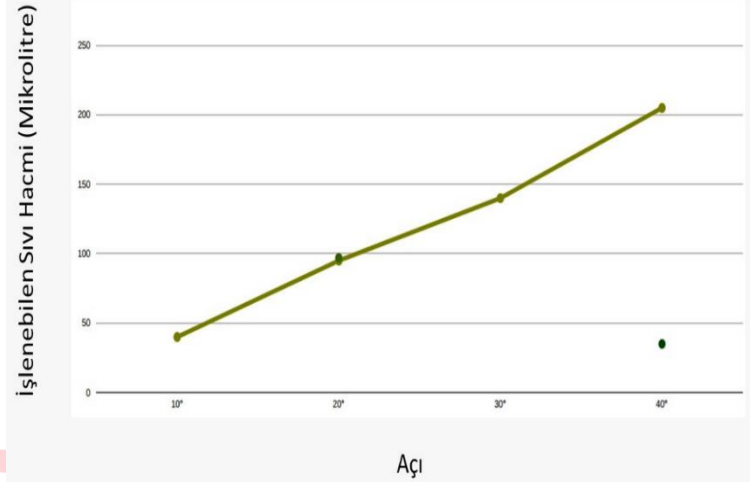
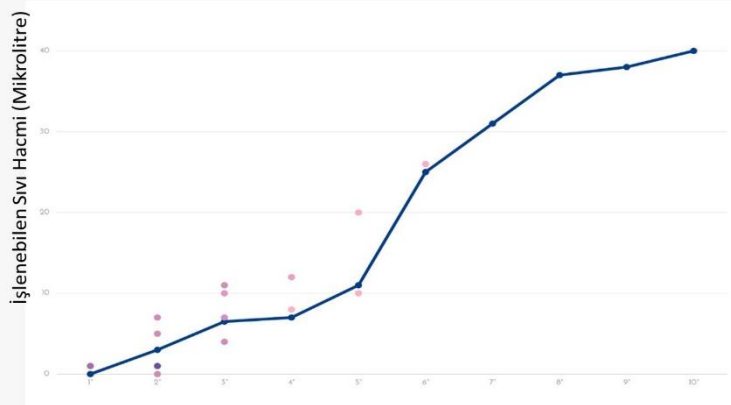
Programlama indirilerek gerçekleştirilmesi planlanan deneyler için belirli bloklar hazırlanmıştır. Bu blokların amacı her blok bir hareketi temsil etmekte ve hareketi başlatan komutun altına eklendiğinde sırası ile bloklarda bulunan komutları gerçekleştirmektir (Şekil 9). Hız ve Açısal Ölçümler ile Mikrolitre hacmindeki sıvıların işlenebilmeleri için Robotun her hareketi kodlanmıştır (Şekil 10). Derece sıfırlama bloğu ile her deney öncesi robotun kalibrasyonunun sıfırlanması ve hareketlerini daha doğru gerçekleştirmesi hedeflendi. Yapılacak olan deneylerde şırınganın her seferinde aynı miktarda çekim yapmasını sağlamak için programlama üzerinde farklı denemeler yapıldı ve her sıvı çekiminden sonra sıvılar bir pipet yardımı ile ölçülmüştür. Yapılan hız-mikrolitre ölçümleri sonucunda hazırlanan grafiklerden görüldüğü üzere hız değişiminin ölçülen mikrolitre miktarını değiştirmedığı gözlemlenmiştir (Şekil 10).



Şekil 9. Robotun Sıvı alım, sıvı bırakma ve pipet hareketlerinin kodlaması.



Hız ve Açısal Ölçümler ile Mikrolitre hacmindeki sıvıların işlenebilme testleri



**Şekil 10.** -25 ve 30 sabit hızda 10, 20, 30, 40 derece-mikrolitre ölçüm grafiği.

CRISPR.BOT V1 versiyonunda hız ölçüm optimizasyonu aşamasında programlamasında power ve speed üzerinde birçok denemeler yapılmıştır ve yüksek güç kullanımının daha etkili olduğu görüldüğü için CRISPR.BOT V2'nin optimizasyon çalışmaları bunun üzerinden devam ettirilerek power ve speed yüksek derecelerde sabit tutulmuştur. Deneylerde kullanılması planlanan 6 well plate, 12 well plate ve 96 well plate için ayrı ayrı planlamalar yapılarak programlamaları hazırlanmıştır. Öncelikle ray hareketi ikiye ayrılarak bir planlama yapılmıştır. İlk aşama çerçeve üzerinde bulunan pipeti istenen konuma götüren mekanizmanın ray hareketidir yani ileri geri hareketleridir. Bunun içinde her well plate için ayrı hesaplamalar gerçekleştirilmiştir. Birçok denemeden ve doğru programlamayı bulduktan sonra, hız ve ölçüm arasındaki bağlantıyı anlamak için farklı hızlarda ve farklı açılarda deneyler yapılmış ve her biri için bir çizelge hazırlanarak farklı hızların hacmi herhangi bir sabit derecede etkilemediği tespit edilmiştir. Grafiklerden deneysel programlamada hangi açının kullanılacağı belirlenerek programlaması düzenlenmiş olup robotla ilk bakteri transformasyon deneyi yapılmıştır.

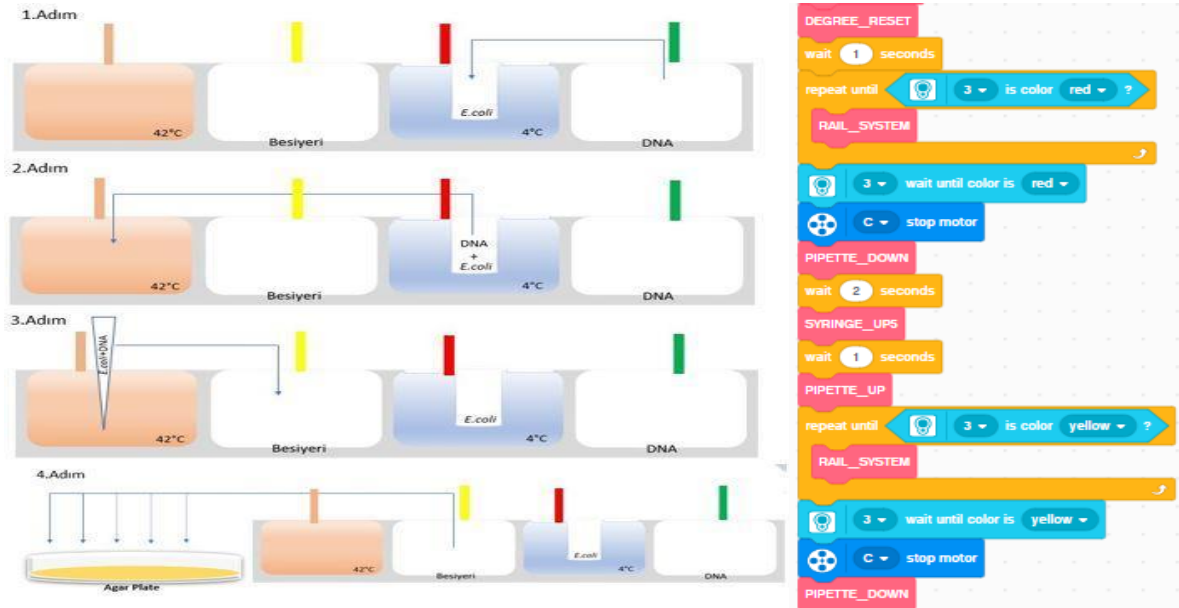
### **Yöntem 1: Bakterilerde Genetik Transformasyon**

Transformasyon deneyini izlemek için:

<https://drive.google.com/file/d/1UzVVautbBzsdWbKYAVo2E3aOgvmZmMPE/view?usp=sharing>

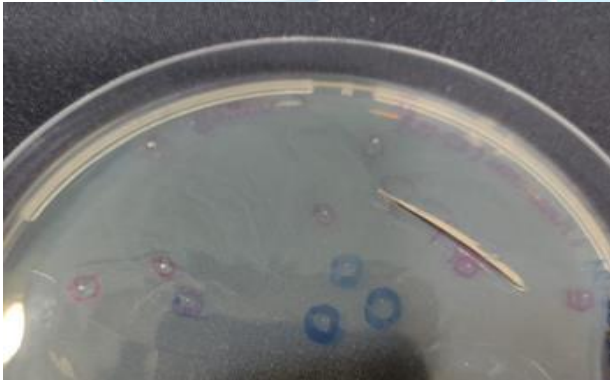
Hedeflenen bakteriyel transformasyon deneyi için hazırlanan hız-mikrolitre ölçüm grafiklerinden yola çıkarak deneyi doğru sıvı miktarları çekerek hatasız gerçekleştirmek için gerekli olan dereceler tespit edilmiştir. Deney programlamasını hazırlayabilmek için gerçekleştirilecek bakteriyel transformasyon deney aşamaları şematize edilerek planlaması yapılmıştır (**Şekil 11**).





**Şekil 11.** Robotik sistem tarafından gerçekleştirilecek bakteriyel transformasyon deney aşamaları şematik planlaması ve tasarladığımız algoritmanın örnek bir bölümü.

Otonom uzaktan kontrol edilebilen robotik sistemiyle DNA transformasyon sonucu oluşan beyaz kolonilerinin oluştuğu kırmızı ve mavi daireler içerisinde belirlenmiştir (**Şekil 12**).



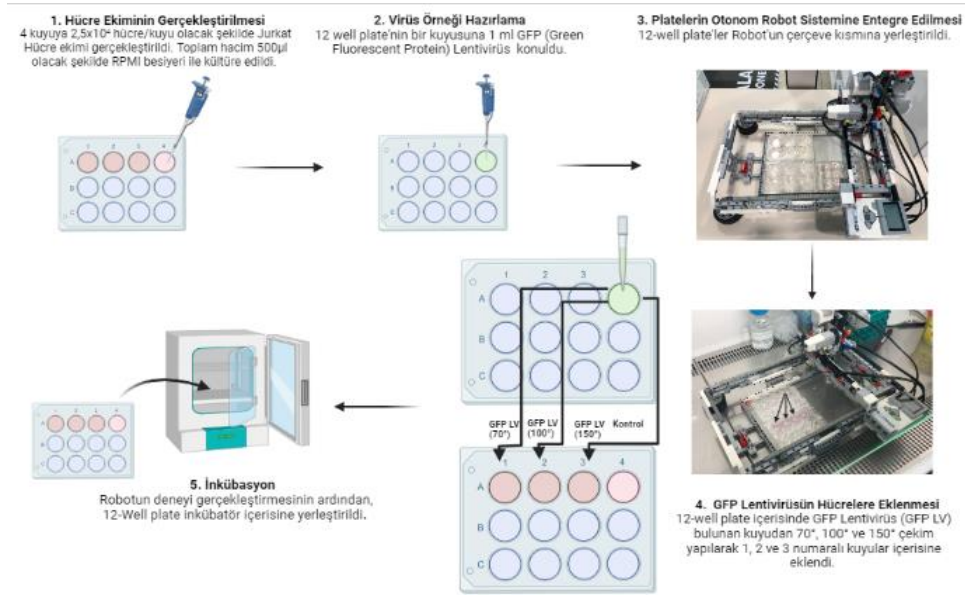
**Şekil 12.** GFP ve Ampisilin (Amp) direnç geni kodlayan plazmit DNA'nın *E.coli* bakterisine transformasyonu sonucu oluşan transgenik beyaz bakteri kolonileri.

## Yöntem 2: İnsan Hücrelerinde Genetik Aktarım:

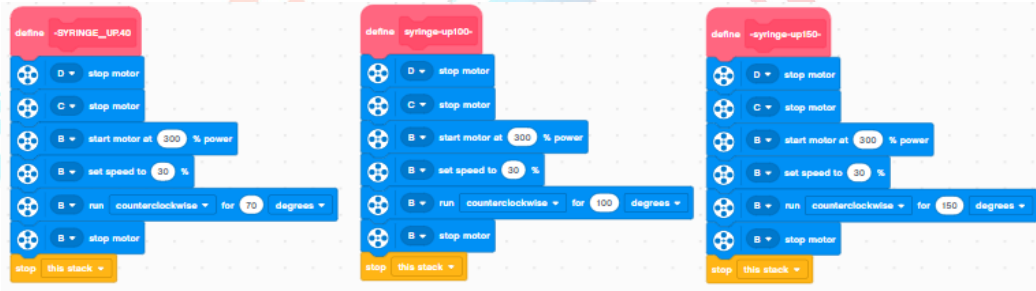
İzlemek için:

[https://drive.google.com/file/d/1L4GX1Z\\_ssDuZoal-4KZIC-ly8b6oh63S/view?usp=sharing](https://drive.google.com/file/d/1L4GX1Z_ssDuZoal-4KZIC-ly8b6oh63S/view?usp=sharing)

Robotik sistemin 2.versiyonu ile virüslerle insan hücrelerinin genetiğinin değiştirilebileceğini kanıtlamak için ilk deneyler gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen deneyde; GFP lentivirüs ile insan hücrelerinin genetiğini otomatik bir sistem ile değiştirebileceğinin kanıtlanması hedeflenmiştir (**Şekil 13**). Deney planlamasında 12 well plate'in yanyana bulunan 4 kuyucuğu için, ilk kuyucuk kontrol olarak ve diğer üç kuyucuğa artan miktarlarda GFP lentivirüs aktarımı olacak şekilde uygun kodlamalar gerçekleştirilmiştir (**Şekil 14**). İlk olarak kullanılacak olan 12 well plate'nin 4 kuyusuna her kuyucukta  $2,5 \times 10^4$  İnsan Jurkat hücre hattı olacak şekilde hücre ekimi yapılarak her kuyuda toplam hacim 500  $\mu$ l olacak şekilde RPMI besiyeri ile tamamlanmıştır. Diğer 12 well plate'in bir kuyusuna da 1 ml GFP kodlayan rekombinant lentivirüs eklenerek robotik sistemin çerçeve içerisine plate'ler yerleştirilmiştir.



Şekil 13. Deney şeması.



Şekil 14. Deney programlamasında hazırlanan pipet sistemini harekete geçirerek sıvı çekme işlemini gerçekleştiren 70°, 100° ve 150° blokları.

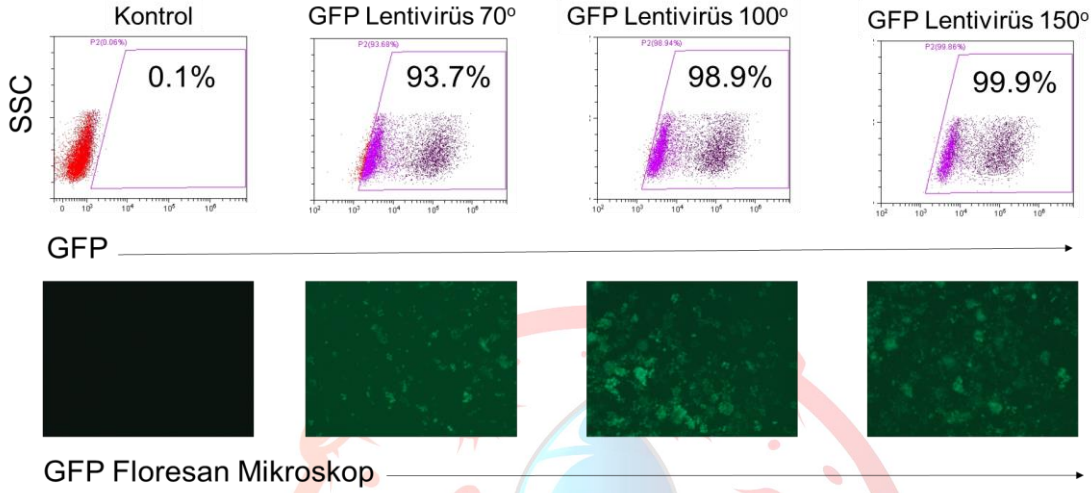
Robot, 70 derece açı (60µl-80µl) ile GFP lentivirüs çekimi gerçekleştirerek ilk 12 well plate'deki Jurkat hücresi ekilmiş olan 1. kuyucuğun üzerine virüsü eklemiştir. Daha sonra geri dönerek 100 derece açı (90µl-120µl) ile GFP lentivirüs çekimi yaparak Jurkat hücresi ekimi yapılmış 2. kuyucuğun üzerine virüsü eklemiştir. Son olarak aynı virüs içerinden 150 derece açı (160µl) ile çekim yaparak 3.kuyucuğun üzerine virüsü eklemiştir. Kontrol olarak 4. kuyuya 100 derece açı ile RPMI besiyeri eklenmiştir. Plate, 37<sup>0</sup>C %5 CO<sub>2</sub> içeren hücre kültürü inkübatörüne kaldırılmıştır. Hücre sayısı ve canlılığının kontrolü için 1:1 oranında hücre:trypan mavisi karıştırılarak Hücre Sayım cihazı (Biorad TC20) ile ölçümler alınmıştır (**Tablo-1**).

**Tablo-1:** 72 Saat Sonrası Hücre Sayısı ve Canlılık Oranları

Hücre Adı	Hücre Sayısı	Canlılık
Kontrol (Jurkat Hücresi)	2,04x10 <sup>5</sup>	%97
70 derece GFP Lentivirüs	2,53 x10 <sup>5</sup>	%84
100 derece GFP Lentivirüs	3,19x10 <sup>5</sup>	%94
150 derece GFP Lentivirüs	2,15x10 <sup>5</sup>	%78

Gerçekleştirilen bu deney ile kontrol grubunda herhangi bir GFP ekspresyonunun olmadığını, 70-100-150 derece açılarda ise sırasıyla artan bir GFP ekspresyonunun olduğunu

gözlemlenmiştir. Deneyin gerçekleştirilmesinden 72 saat sonra Akım Sitometri (Beckman Coulter Cytoflex Flow Cytometer) analizi ve floresan mikroskop görüntülemesi ile GFP ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir (**Şekil 15**).



**Şekil 15.** CRISPR.BOT modifiye transgenik insan hücrelerinde GFP protein ifadesinin Akım Sitometri ve floresan mikroskop altında analizi.

Gerçekleştirilen deney sonucunda kontrol grubunda herhangi bir virüs ekspresyonunun olmadığını, robotun pipet sistemi ile 70°-100°-150° açılarla yapmış olduğu enjekte işleminde ise sırasıyla artan bir virüs ekspresyonunun olduğu gözlemlenmiştir (**Şekil 15**). Böylelikle farklı miktarlarda aktarım yapılan virüslerle hücrelerin genetiğini maliyet etkin otonom sistem ile değiştirilebildiği kanıtlanmıştır. Yapılan deney ile transgenik hücrelerin otomatik üretilmesi ve çalışılması tehlikeli olan virüslerin el değmeden otonom sistemlerle uzaktan çalışılabilmesi hedeflenerek yapılmıştır. Gerçekleştirilen deneyler ile elde edilen sonuçlarla SARS-CoV2 gibi aşı çalışılmasının tehlikeli olduğu virüslerle yapılacak çalışmalarda, insan eli değmeden virüslerin üretilmesi, kullanılabilmesi, aşı ve ilaç çalışmalarının yapılabileceği bir sistemin ilk prototipi olma özelliği taşımaktadır.

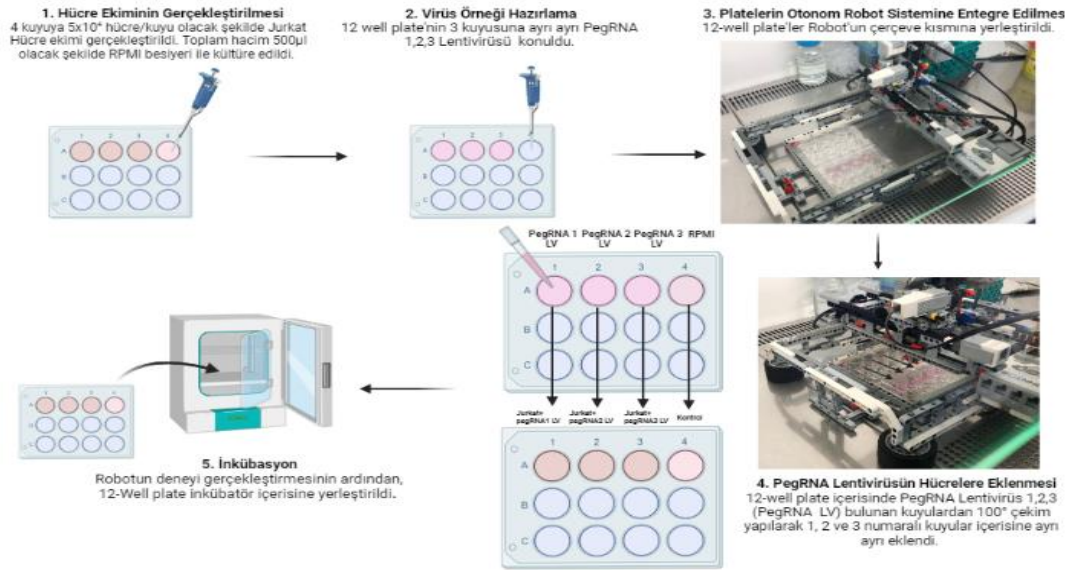
### Yöntem 3: CRISPR Gen Modifikasyonu:

İzlemek için:

<https://drive.google.com/file/d/16vGq9T99VS1300GIFbGG01EZfKEtbSsy/view?usp=sharing>

Bu deney ile robotun üç farklı CRISPR rehber RNA'nın hücelere aktarılması hedeflenmiştir. Kanıt niteliğinde olan deneyin geleceğe yönelik olarak asıl amacı, ihtiyaç duyulan genetik modifikasyonu hücre içerisinde gerçekleştirmek için CRISPR sistemi ile hangi rehber RNA'yı hangi hücreye eklemesi gerektiğini anlayarak deneyi gerçekleştirmektir. İlk 12 well plate'nin 4 kuyusuna her kuyucukta  $5 \times 10^4$  İnsan Jurkat hücresi olacak şekilde hücre ekimi yapılarak her kuyuda toplam hacim 500  $\mu$ l olacak şekilde RPMI besiyeri ile tamamlanmıştır. Diğer 12 well plate'nin kuyularına sırasıyla CRISPR sistemi ile rehber RNA 1 (gRNA1), rehber RNA 2 (gRNA2), rehber RNA 3 (gRNA3) kodlayan lentivirüsler, RPMI besiyerine 1:10 seyreltilerek eklenmiştir. Plate, 37°C %5 CO<sup>2</sup> içeren hücre kültürü inkübatörüne kaldırılmıştır (**Şekil 16**).



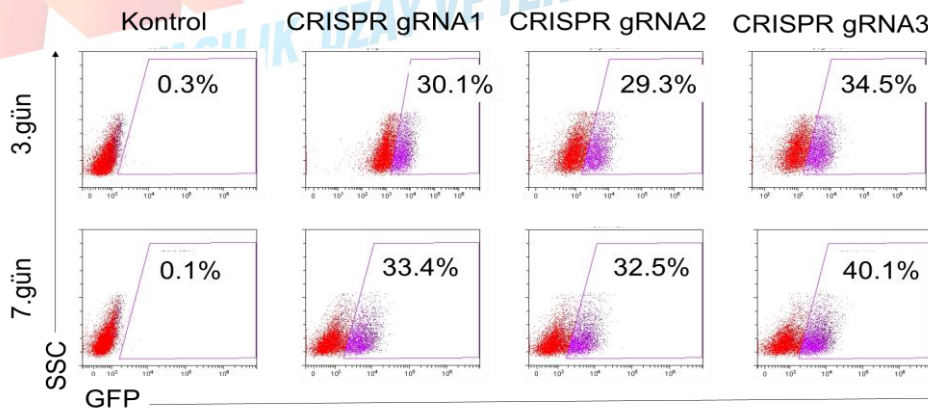


Şekil 16. Deney şeması.



Şekil 17. pegRNA1, pegRNA2, pegRNA3 rehber RNA çekimlerinde kullanılan 100° bloğu.

Gerçekleştirilen bu deney ile kontrol grubunda herhangi bir virüs ekspresyonunun olmadığını, 100 derece açılarda ise sırasıyla eklenen pegRNA1, pegRNA2 ve pegRNA3'ün %35-40 GFP ve rehber RNA ifade oranı sağladığı gözlemlenmiştir. Deneyin gerçekleştirilmesinden 3. ve 7.gün Akım Sitometri (Beckman Coulter Cytoflex Flow Cytometer) analizi ile ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir (Şekil 18).



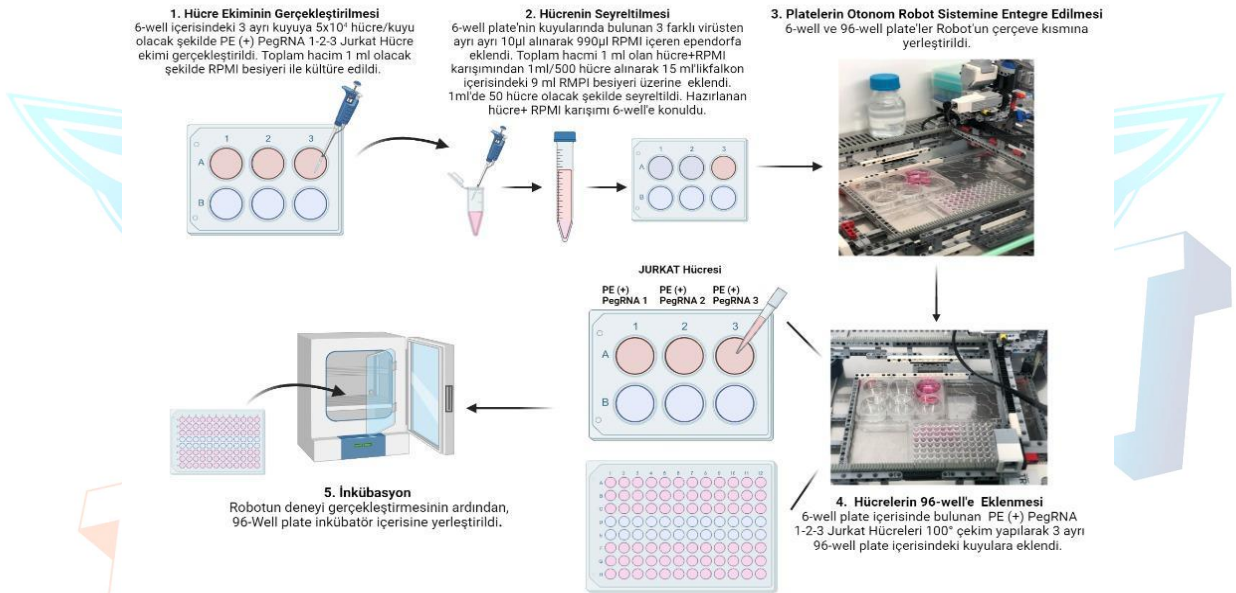
Şekil 18. CRISPR.BOT modifiye CRISPR rehber RNA'ları kodlayan transgenik insan hücrelerinde GFP protein ifadesinin Akım Sitometri ile analizi.

## Yöntem 4: Genetik Modifiye Hücrelerin Klonlama İşlemleri:

İzlemek için:

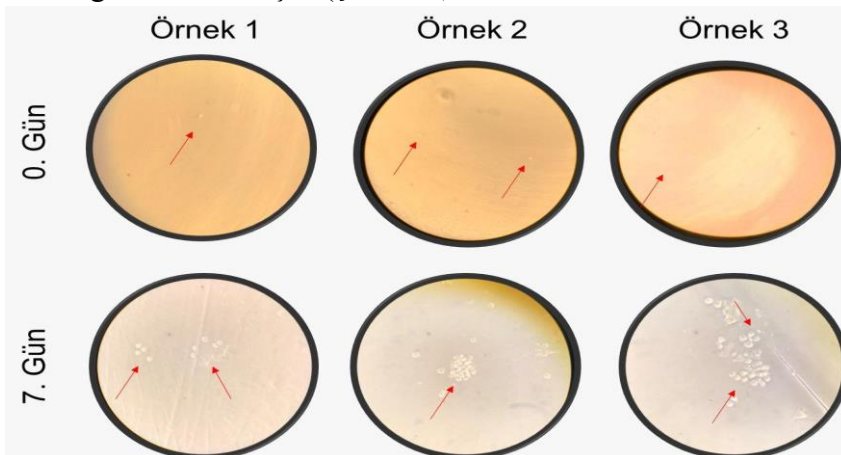
<https://drive.google.com/file/d/1B6elbjJYORL0gJE8GVw61Ux86fFs7IXx/view?usp=sharing>

Bu deney ile robotun FACS veya Flow sitometri gibi cihazların kullanıma gerek olmadan hücreleri tek düşürmesi hedeflenmiştir. Kanıt niteliğinde olan deneyin geleceğe yönelik olarak asıl amacı, yapay zekâ tabanlı otonom sistemler ile araştırmacıların diğer hücrelerin etkisi olmadan tek bir hücre popülasyonunun (alt klonlama, subcloning) özelliklerini daha iyi anlamalarına olanak sağlamaktır. 6 well plate'ye her kuyuda  $5 \times 10^4$  hücre olacak şekilde CRISPR rehber RNA'ları kodlayan İnsan Jurkat Hücresi ekimi yapılarak toplam hacimler 1 ml olacak şekilde RPMI besiyeri eklendi. Hazırlanan hücre örnekleri 6 well plate'e konularak Robot'un çerçeve kısmına yerleştirilmiştir. Daha sonra 96 well U Plate Robot'un çerçeve kısmına yerleştirilmiştir. 100 derece açı ile 6 well plate içerisindeki CRISPR rehber RNA'ları kodlayan İnsan Jurkat hücreleri farklı 96 well U plate'nin 72 kuyucuğuna ekim yapılmıştır. Hücre ekimi sonrası plate'ler  $37^{\circ}\text{C}$  %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatöre kaldırılmıştır (Şekil 19).



Şekil 19. Deney şeması.

24 saat sonra inverted mikroskop ile plate taramaları gerçekleştirilerek hücre fotoğrafları alınmıştır. 7 gün sonra tekrardan inverted mikroskop ile plate taramaları gerçekleştirilerek hücre fotoğrafları alınmıştır (Şekil 20).



Şekil 20. CRISPR.BOT alt klonlama uygulaması sonrası 0. ve 7.günde izole edilen hücreler.

### 5.Yenilikçi (İnovatif) Yönü (15 puan)

Yaşam bilimleri laboratuvarlarında da pratikliği ve verimliliği arttırmak amacıyla sıvı işleyen robotik sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır (Kong, 2012; Wohlsen,2014). Günümüzde otomatik sıvı işleyebilen ve numune dağıtımına işlevleri sunan sistemler yaşam bilimleri laboratuvarlarının çoğunda kullanılır hale gelmiştir (Chapman, 2003). Fakat bununla birlikte insan müdahalesi ortadan kalkmaz sadece hata riskini azaltmaktadır. Robotik sistemlerde ise deneyin başlamasıyla müdahale gerekmez bağımsız olarak çalışabilmektedir (Tegally, 2020). Deneylerde kullanılan numunelerin hacmini azaltmakta ve hem maddi olarak hem de işçilik olarak deneylerin verimliliğini arttırmaktadır (Kong, 2012). Otomasyon sistemleri yapay zeka (AI) ile entegre etme çalışmaları, benzersiz hücre tipleri ve hastalar için hedeflenen terapötik nanopartikülleri optimize edebilme yeteneği sağlamaktadır (Egorov, 2021). Tam otomatik sistemlerin maliyetlerinin çok fazla olması dışında bakımları da oldukça pahalıdır. Genellikle sistemlere özgü protokoller ve laboratuvar gereçleri kullanımı da gerektirdiğinden büyük bir maliyet kaybı oluşmaktadır (Turbak ve ark., 2002). Piyasaya bakıldığı zaman uygun fiyatlı, hassas ve aynı zamanda programlanabilme gereksinimlerini karşılayan makul moleküler biyoloji ve genetik düzenleme teknikleri gerçekleştirebilen özelleşmiş robotik sistemler ve aynı zamanda genetik mühendislik yapan robotik bir sistem bulunmamaktadır. CRISPR.BOT projesinde gerçekleştirilen kanıt niteliğinde olan deneylerin geleceğe yönelik asıl amacı moleküler biyoloji ve genetik alanında uzaktan ve otonom robotik sistemlerin geliştirilmesiyle makine öğrenmesi, transgenik hücre taramaları, analitik hesaplamalar, gen tasarımları, genetik yolak seçimi, deneysel tasarım, hücre klonlaması ve genetik yolak analizleri insan eli değmeden hata payı çok düşük olacak şekilde gerçekleştirilebilecektir (**Şekil 1**). Kurulumunu ve deneylere özgül olarak programlamasını gerçekleştirdiğimiz CRISPR.BOT otonom uzaktan kontrol edilebilir robotik sistem ile bakterilerde ve insan hücrelerinde gen aktarımı, genetik modifikasyon ve transgen hücre klonlanması geliştirdiğimiz algoritmalarla ilk kez otonom olarak gerçekleştirilmiştir (**Yöntem 1-4**). Geleceğe yönelik olarak bu çalışmalar beraberinde biyoteknolojik uygulamalara ek olarak, rejeneratif tıp ve doku mühendisliği gibi gelişmekte olan alanlarda karmaşık ilaç verme deneyleri ve diğer birçok uygulama için yararlı olabileceği düşünülmektedir. CRISPR.BOT projesi ile birlikte insan gücünü azaltmayı, hastalık yapıcı patojenik mikroorganizmalara (virüs veya bakteri örneğin SARS CoV-2 virüsü) el değmeden kapalı sistem içerisinde moleküler biyoloji ve genetik mühendisliğinin robotlar tarafından yapılabileceği bir alt yapının ilk versiyonlarını kurabildiğimizi gösterdik. Gerçekleştirilen deneyler ile elde edilen sonuçlarla SARS-CoV2 gibi inaktif aşı çalışmalarının tehlikeli olduğu virüslerle yapılacak çalışmalarda, insan eli değmeden virüslerin üretilebilmesi, kullanılabilmesi, aşı ve ilaç çalışmalarının yapılabileceği bir sistemin ilk prototipi olma özelliği taşımaktadır. Aynı zamanda bu projenin geliştirilmesiyle yapay zekâ ve otomatize robotik deneysel çalışmalar ile canlıların genetiğinde değişiklikler otonom halde gerçekleştirilebilecek yapay zekâ entegrasyonu ile rekombinant virüs sentezi, karakterizasyon, test etmek ya da deneyi *in vivo* ve *in vitro* tahmin edebilmek, plazmid izolasyonu ve birçok moleküler biyoloji deneylerini kendi kendine karar verip yapabilme konusunda önemli bir potansiyel yeterlilik sunmaktadır. Bununla birlikte yapay zekâ ve robot birleşimine yeni bir yön verilerek, moleküler biyoloji ve genetik yöntemlerinin daha otomatize, hızlı ve pratik bir şekilde 24 saat çalışabileceği bir sistem oluşturulmuş olacaktır.



### 6.Uygulanabilirlik (10 puan)

Aşı çalışmalarında, rekombinant virüsler ya da tehlikeli virüsler gibi transgenik hücre oluşturmalarında, genetik tedavilerde, kanser çalışmalarında, sentetik biyoloji, mikrobiyoloji veya genetik gibi laboratuvar alanlarında ve beraberinde biyoteknolojik uygulamalara ek olarak, rejeneratif tıp ve doku mühendisliği gibi gelişmekte olan alanlarda karmaşık ilaç verme deneyleri ve diğer birçok uygulama için yararlı olabileceği düşünülmektedir. Proje başlangıcında teknoloji hazırlık seviyesi 1 THS olan ‘CRISPR.BOT otonom ve uzaktan kontrol edilebilir robotik sistemin inşası’ projenin ilk 12 ay sonunda gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen CRISPR.BOT sistemi ve moleküler biyoloji deney algoritmaları ile proje sonunda üretilen prototip, teknoloji hazırlık seviyesi 4 THS olmuştur. İlk prototiplerini ürettiğimiz CRISPR.BOT Robotik sistemler ile uçtan uca, yüksek verimli bir laboratuvar otomasyon sisteminin hazır iş akış algoritmalarıyla birlikte üretilmesi, bir sonraki aşamada moleküler otonom sistemler üzerine bir gelişim şirketi kurmamızı sağlayacaktır. Dünyada mevcut otomasyon ve deneysel özelleştirmelere dayanan cihazların üretildiği şirketler (örneğin; Miltenyl Prodigy, Lonza Cocoon, Molecular Devices) bulunmaktadır. Laboratuvarlara özel uygulama gereksinimlerini karşılayan robotik sistemlerin yakın gelecekte artarak devam etmesi öngörülmektedir. CRISPR.BOT Robotik sistemleri mevcut rakiplerine kıyasla maliyet etkin, araştırmacılar tarafından kullanıcı dostu ve uzaktan kontrol edilebilmesi avantajlarıyla birlikte gelecekte öne çıkan bir gelişim şirketi olacaktır.

### 7.Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması (5 puan)

Yöntem No	İŞ PAKETLERİ ADI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
0	CRISPR.BOT otonom ve uzaktan kontrol edilebilir robotik sistemin inşası																				
1	Bakterilerde Genetik Transformasyon																				
2	İnsan Hücrelerinde Genetik Aktarım																				
3	CRISPR Gen Modifikasyonu																				
4	Genetik Modifiye Hücrelerin Klonlama İşlemleri																				

CRISPR.BOT sistemi ilk prototip olduğu için benzer bir proje bulunmamaktadır. Piyasada mevcut olarak satılan cihazlar Miltenyi Prodigy 210.000€, Lonza Cocoon 275.000€ ve Molecular Devices 150.000€ olarak satışı gerçekleştirilmektedir. CRISPR.BOT Robotik sistemin maliyeti diğer ticari robotik sistemlere kıyasla maliyet açısından daha uygun olup yaklaşık olarak 1.000\$’a temin edilebilmektedir. Malzeme listesi **Şekil 21**’de gösterilmiştir.

MALZEME ADI	ÜRÜN KODU	MARKA ADI
Lego Mindstorm EV3 45544 Core Set	45544	LEGO
Lego Mindstorm Education EV3 Jireskop Sensör	YP45505	LEGO
Lego Mindstorm Education EV3 Renk- Işık Sensör	YP45506	LEGO
Lego Mindstorm Education EV3 Büyük Servo Motor	YP45502	LEGO
LEGO® Education 10V DC Adaptörü	YP45517	LEGO

Şekil 21. CRISPR. BOT malzeme listesi

### 8.Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar) (5 puan)

CRISPR.BOT Robotik Otonom Sistemler, Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarları, ilaç şirketleri, araştırma laboratuvarları, aşı çalışmalarında, rekombinant virüsler ya da tehlikeli virüsler gibi transgenik hücre oluşturmalarında, genetik tedavilerde, kanser çalışmalarında, sentetik biyoloji, mikrobiyoloji veya genetik gibi laboratuvar alanlarında ve beraberinde biyoteknolojik uygulamalara ek olarak, rejeneratif tıp ve doku mühendisliği gibi gelişmekte olan alanlarda karmaşık ilaç verme deneyleri ve diğer birçok uygulama için yararlı olabileceği düşünülmektedir.

### 9. Riskler (10 puan)

Risk(ler)in Tanımı	Alınacak Tedbir(ler) (B Planı)
Otonom sistemlerde her deney için özgül algoritmalar yapılması bunun içinde bütün sistemin tekrar tekrar optimize edilmesi gerekmektedir. Pipetleme sistemi ile sıvı çekimleri, çark hareketleri, çalkalama işlemleri, raylı hareketleri gibi tüm komutların optimizasyonu yapılmalıdır. Optimizasyonun sağlanmaması halinde her deney için sıfırdan komut blokları yapılmaya başlanması ve tekrardan robotik sistemin inşa edilmesi deneyler arası geçişte zaman kaybına sebep olmaktadır.	Bunun önüne geçebilmek ve hangi deney gerçekleştirilecekse onun algoritmalarına hemen ulaşabilmek için tüm deney sistemlerinin algoritmaları optimize edilerek kaydedilmiştir. Gerçekleştirilen projenin devamında yeni deneysel aşamalar içinde algoritmalar optimize edilecektir. Bu sayede robotik sistem ile çalışacak olan başka laboratuvarların tekrar tekrar aynı iş yükünü alarak sıfırdan inşa etmelerindense, tarafımızca optimizasyonu sağlanan algoritmaları kullanarak ilerlemelerinin yolu açılacaktır.

<p>Sıvı işleyen otonom sistemler ile gerçekleştirilen moleküler biyoloji deneylerinde işlenecek sıvı miktarının mikrolitre seviyesinde litrenin bir milyonda biri hacmindeki solüsyonları hatasız işleyebilmesi bu sistemlerin etkili çalışabilmesi için çözülmesi gereken sorunlardan biridir.</p>	<p>Bu risk yönetimi için pipet temizleme bloğu yapılarak pistonun birkaç tur yukarı aşağı hareketi sonucu temizleme sağlanmaktadır. Bununla birlikte CRISPR.BOT sistemlerinin belirli hız, açı ve güçte işleyebileceği mikrolitre solüsyon miktarları detaylıca analiz edilmiş ve proje içerisinde şekillerde görselleştirilmiştir (<b>Şekil 9 ve Şekil 10</b>).</p>
<p>Deney aşamasında gerçekleşme riski bulunan durumlardan birisi farklı hızlar kullanıldığında çekilen mikrolitre miktarını değiştirmese de düşük dereceler kullanıldığında robotun şırınga sisteminin hassasiyetini etkilediğini ve düşük mikrolitre çekimlerinde hassasiyeti kaybettiği görülmüştür.</p>	<p>Çözüm olarak robotun deney aşamasında düşük derecede mikrolitreyi doğru çekebilmesi için her düşük mikrolitre çekiminden önce yüksek derecede kendi kendine çalıştırılarak hassasiyeti sağlanmıştır. Bununla ilgili algoritmalar geliştirilerek proje içerisinde gerçekleştirilen bütün deneylerde entegre edilmiştir (<b>Yöntem 1-4</b>).</p>

## 10. Kaynaklar (5 puan)

Chapman, Tim. "Lab automation and robotics: Automation on the move." *Nature* 421.6923 (2003): 661-663.

Egorov, Egor, et al. "Robotics, microfluidics, nanotechnology and AI in the synthesis and evaluation of liposomes and polymeric drug delivery systems." *Drug Delivery and Translational Research* 11.2 (2021): 345-352.

Kong, Fanwei, et al. "Automatic liquid handling for life science: a critical review of the current state of the art." *Journal of laboratory automation* 17.3 (2012): 169-185.

Montes, Nicolas, et al. "A Novel Real-Time MATLAB/Simulink/LEGO EV3 Platform for Academic Use in Robotics and Computer Science." *Sensors* 21.3 (2021): 1006.

Tegally, H., San, J. E., Giandhari, J., & de Oliveira, T. (2020). Unlocking the efficiency of genomics laboratories with robotic liquid-handling. *BMC genomics*, 21(1), 1-15.

Turbak, F., & Berg, R. (2002). Robotic design studio: Exploring the big ideas of engineering in a liberal arts environment. *Journal of Science Education and Technology*, 11(3), 237-253.

Wagner, S. G., Mähler, C., Polte, I., von Poschinger, J., Löwe, H., Kremling, A., & Pflüger-Grau, K. (2019). An automated and parallelised DIY-dosing unit for individual and complex feeding profiles: Construction, validation and applications. *PloS one*, 14(6), e0217268.

Wohlsen, M. (2014). This robot could make creating new life forms as easy as coding an app. *Wired*.