

TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

ÜNİVERSİTE VE ÜZERİ SEVİYESİ FİKİR

KATEGORİSİ

TAKIM ADI

p53: GENOM GARDİYANLARI

PROJE ADI

CRISPR-Cas9 TEKNOLOJİSİ KULLANILARAK ASKERİ

ALANIN GÜÇLENDİRİLMESİ

BAŞVURU ID

459354



İçindekiler

Proje Özeti (Proje Tanımı)	2
Problem/Sorun	4
Çözüm	5
Yöntem	6
Yenilikçi (İnovatif) Yönü	13
Uygulanabilirlik	13
Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması	14
Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar)	15
Riskler	16
Kaynaklar	17

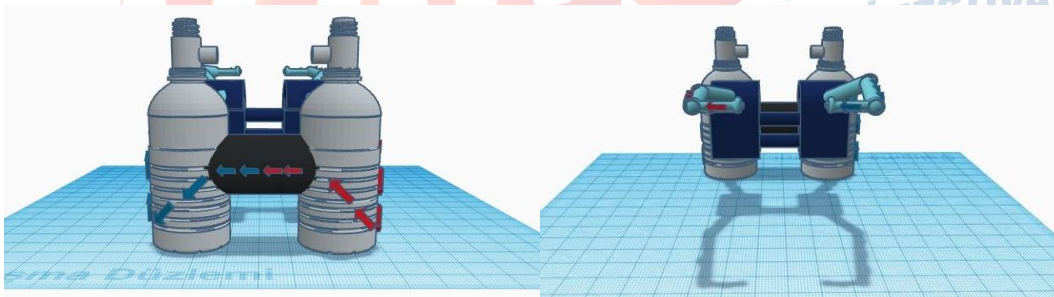
1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

Günümüzde ülkelerin ve orduların gücü sadece asker sayısı ve silah üstünlüğü ile değil, sahip oldukları teknolojiler ve teknolojileri kullanabilme yetenekleri ile ölçülmektedir. Bu da, ülkelerin sahip oldukları ekonomik gücü ve gelişmişlik düzeyi ile paralel olarak artmaktadır. Bu sebepten dolayı projede gerçekleştirilmek istenen düzenek ile ülke ordusuna, moleküler biyolojiye dayalı olarak geliştirilen rekombinant DNA teknolojisi ve biyoteknoloji alanında katkı sağlanması hedeflenmektedir. Buradan yola çıkılarak yapılan uzun süreli araştırmalar sonucunda askeri alanda dünyanın en zor askeri eğitimine katlanmış havada, karada ve suda görev alabilen Su Altı Taarruz (SAT) komandolarının faydasını görebileceği bir sistem tasarlanması hedeflenmektedir. SAT komandolarının eğitimleri incelendiğinde su altında verdikleri mücadelede kullandıkları dalış tüplerinin belirli bir sürede yeterli olduğu ve su altındaki zamanlarının kısıtlı olduğu görülmektedir. Buradan yola çıkılarak tüplerde sirkülasyon sağlayacak ve sualtı kalış süresini arttıracak bir tüp tasarlanması ve bu tüpte de mikroalglerin kullanılması düşünülmektedir. Dünya'nın ihtiyaç duyduğu oksijenin %78'ini karşılayan fitoplanktonlar ve diatomların DNA'sında değişiklik yapılarak oksijen üretme hızları artırılıp oksijen tüplerinde kullanılması hedeflenmektedir. Bu sayede oksijen tüpü içerisinde minimum bir sürede verilen CO₂ gazı O₂ gazına dönüştürülmesi hedeflenmektedir. Projede, CRISPR-Cas9 teknolojisi ile bitki, hayvan ve mikroorganizmaların DNA'ları son derece kolay ve yüksek bir hassasiyetle değiştirilebilmektedir.

Bilim ve teknoloji alanında yaşanan hızlı gelişmeler, askeriyeyi de sürekli olarak yeni alanlara uyum sağlamaya zorlamakta ve dönüştürmektedir. Son yıllarda oldukça dikkat çeken

mikroalgler sağlık, gıda, kozmetik, çevre ve biyoyakıt üretimi alanlarında kullanım potansiyeli bulunan yeni nesil hammadde kaynaklarıdır. Yeryüzünün en eski yaşam formlarından biri olan mikroalgler, genetik ve fenotipik çeşitlilikleriyle biyosferin hemen hemen her yerinde bulunabilen, fototrofik, heterotrofik ya da mikсотrofik olarak yaşayan, genellikle basit morfolojide organizmalardır. Prokaryotik ya da ökaryotik olabilen mikroalgler, basit yapılarıyla dinamik ve kompleks rekabetçi çevrede, yüksek derecede tuzluluk ve yüksek sıcaklık gibi sert iklim koşullarında, ışık ve besin yoksunluğu durumlarında hayatta kalabilirler. Diatomlar (Bacillariophyceae), yeşil algler (Chlorophyceae), ve altın sarısı algler (Chrysophyceae) doğada bulunma miktarı bakımından en önemli mikroalg gruplarıdır. Mikroalgler, farklı ürünlere hammadde olabilecek şekilde yüksek miktarda protein, lipit ve karbonhidrat içeriğine sahip olabilirler ancak hücresel içerik türden türe ve yetiştirilme şartlarına göre değişiklik göstermektedir. Özellikle diatomlar özgün hücresel yapılarıyla ağır metal absorpsiyonu gerektiren biyoremediasyon uygulamalarında, biyomedikal implantlarda, su saflaştırma ya da kromatografik ayırmada kullanılan filtrasyon prosesleri ve biyosensör gibi alanlarda kullanım potansiyeline sahiptirler. Algler, sucul ortamda en önemli birincil üreticiler olup, biyolojik CO₂/O₂ döngüsünde görev alırlar. Bu nedenle organizmalar içinde en değerli ekolojik gruplardan biridir.

Projede kurulması istenilen düzenekte yukarıda bahsedilen mikroalglerden diatomların *Fistulifera sp.* türü kullanılarak CO₂/O₂ sirkülasyonu sağlayacak bir sistem kurulacaktır. Bu sistemde kullanılacak diatomların geninde CRISPR-Cas9 teknolojisi kullanılarak düzenlemeler yapılacaktır. Bu düzenlemeler promotör bölge tespit edilerek ve sayısı artırılarak diatomun ürettiği O₂ seviyesinin hızlandırılması hedeflenmektedir. Bu sayede düzeneğin, gelen CO₂ gazını daha hızlı ve verimli bir şekilde O₂ gazına dönüştürmesi hedeflenmektedir. Düzenek iki adet tüpten oluşmaktadır. İlk tüp tamamen bir insanın solunması için gerekli havanın sıkışmış halde bulunduğu tüptür ve soluma bu tüp ile gerçekleştirilecektir. İkinci tüpte ise solunum sonrası verilen CO₂ gazının bulunduğu tüptür. Bu iki tüp arasında diatomların yaşam alanı olan bir fotobiyoreaktör bulunmaktadır. Burada solunum sonrası biriken CO₂ gazı verilerek O₂ gazına dönüşümü sağlanmaktadır. Daha sonrasında dönüşüm sağlanan o gazı tekrar ilk tüpe aktararak solunum için kullanılan havanın daha uzun süreli kullanılması amaçlanmıştır. Bu sistem ile SAT komandolarının su altında kullandığı tüplerin daha uzun süreli verimli olması hedeflenmektedir. Aynı zamanda gerçekleşmesi istenen proje ile sadece askeri alanda değil oksijen tüpü kullanılan her alanda yani; astronotlara, su dalgıçlarına, itfaiyecilerde vb. alanlara yönelik de katkı sağlanması beklenmektedir.



Resim 1 ve 2 : Çizimi yapılan dalış tüpünün ön ve arka kısımlarının görünümü

2. Problem/Sorun

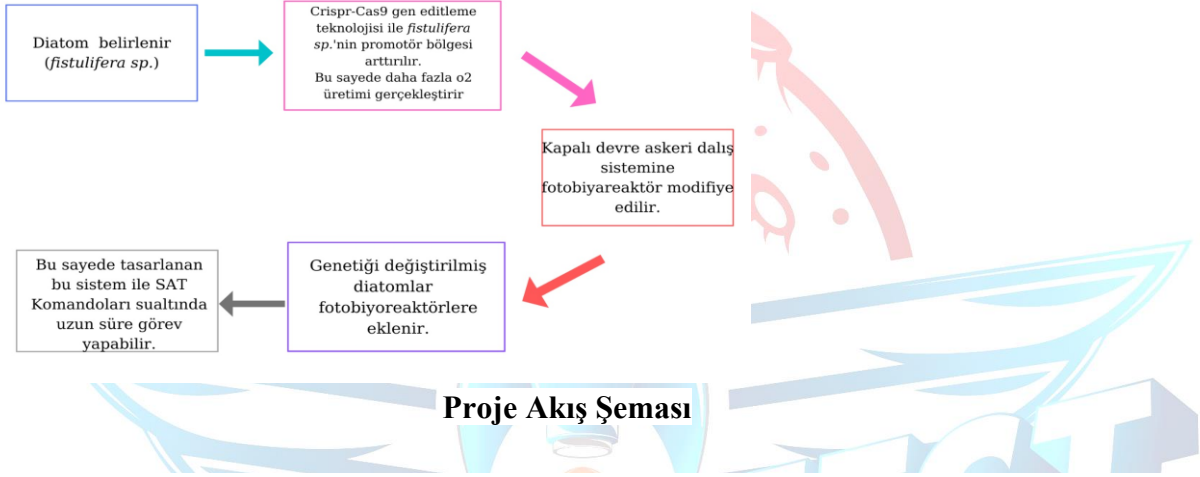
Ülkemizde Milli teknoloji hamlesine biyoteknoloji alanında gelişme sağlayabilecek, genetik hastalıklara umut vaat eden, diğer tedavi yöntemlerine nazaran ucuz ve hızlı cevap veren CRISPR-Cas9 teknolojisinin Milli Savunma Sanayi gibi alanlarda yok denecek kadar az çalışmaların bulunduğu tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda ülkemizde biyolojik inovasyon ve savunma alanı için ortaya çıkan biyoteknolojileri tam olarak kullanmada, çevik iş modellerinin ve insan sermayesinin yetersizliği bir sorun teşkil etmektedir. Askeri alanda yaşanan sorunlara bakıldığında, su altında görevlerini gerçekleştiren askerler solunum açısından olumsuzluklara maruz kaldıkları tespit edilmiştir.

Su altında kullanılacak dalış tüplerinde, dizel ve benzin motoru ile çalıştırılan yüksek basınç kompresörlerinin emiş hortumlarına motorun egzozundan çıkan hava karıştığı durumlarda, dalış tüpüne basılan havanın içinde de karbonmonoksit birikimi olacaktır. Dalış tüpünde bulunabilen karbonmonoksit gazı, çok düşük değerlerde olsa dahi belirli bir derinlikten sonra kısmi basıncı yükselerek zehirleyici etkiler gösterir. Oksijen, dokulara alyuvarlar içinde bulunan bir protein olan hemoglobin ile taşınır. Karbonmonoksitin hemoglobine bağlanabilme kapasitesi oksijene kıyasla yaklaşık olarak 300 kat daha fazladır. Bu özelliği dolayısıyla karbonmonoksit, solunum havasında oldukça az miktarlarda dahi bulunuyor olsa, oksijenin hemoglobin ile dokulara taşınmasını sınırlandırarak dokuda hipoksi oluşmasına sebep olabilmektedir. Derinlikle orantılı biçimde artan karbonmonoksit kısmi basıncı nedeniyle dalış sırasında oluşan karbonmonoksit zehirlenmesi karada oluşan zehirlenmeye göre çok daha hızlı gelişebilir. Karbonmonoksit zehirlenmesine bağlı olarak su altında meydana gelen bayılma, sonrasında boğulmanın gerçekleşmesine neden olacak ve dalıcının bu süreçte dokuları çok hızlı bir şekilde hipoksi etkisine girecektir. Karbonmonoksit zehirlenmesi saptandığında hastaya en kısa sürede %100 oksijen solutulması gerekmektedir. Yapılan araştırmalar insanların nefes alma dürtülerinin vücutlarındaki oksijen kullanımı sonucunda açığa çıkan karbondioksit miktarına göre denetlendiğini göstermiştir. Yine yapılan araştırmalar sonucunda deniz seviyesinde (1 atm ortam basıncında) normal hareket edecek olan bir insanın dakikada ortalama 25 litre hava tüketebileceği görülmüştür. Ancak artan derinlik dalıcının fiziksel ve fizyolojik yeterliliklerinden bağımsız olarak meydana gelen basınç değişimi dolayısıyla hava tüketim oranının artışına sebep olacaktır. Derinlik arttıkça ortam basıncı da artacak ve solunan hava miktarı da artış gösterecektir. Örneğin deniz seviyesinde ortam 1 atm olduğu için ortalama hava tüketimi 25 litreyken, 10 metre derinlikte ortam basıncı 2 atm olduğundan, ortalama hava tüketimi de 50 litreye ulaşacaktır. Dalış tüplerinde kullanılan rezerv hava, tüm dalgıçların güvenliği için önemli bir ayrıntıdır. Her dalıcı dalış planını yapmadan önce sahip olduğu havanın 50 bar lık kısmını rezervi hava olarak ayırmalı ve geri kalan hava miktarına göre dalış planını yapmalıdır. Son olarak hava kaynağını sırtında taşıyan dalıcılar için su altında yaşamsal öneme sahip olan dalış tüplerinin değeri paha biçilemezdir. Su altındaki güvenlik ve dalış planının tutarlılığı için sahip olunan havanın ne kadar olduğunu bilmek ve tahmini de olsa su altında ne kadarının harcadığını hesaplamak hem dalış güvenliği hem de dalış planlaması açısından vazgeçilmezdir. Projenin hedefi, askeri teknolojilerde CRISPR-Cas9 teknolojisinin kullanılması ile Savunma Sanayisinde Türkiye'ye katkı sağlamaktır.

3. Çözüm

Su Altı Taarruz (SAT) komandoları için tasarlanan bu projede, yapılması düşünülen dalış tüpünde mikroalgler kullanılarak CO₂-O₂ dönüşümlü bir sistem kurulması hedeflenmektedir. Bu sistem içerisinde O₂ üretimini sağlayacak diatomlar bulunacaktır ve bu diatomlarda CRISPR Cas-9 teknolojisi kullanılarak DNA larında düzenleme gerçekleştirilecektir. Genlerinde düzenleme yapılacak diatomların öncelikle DNA sekansında promotor bölgesi tespit edilip daha sonrasında promotor bölge sayısı fazlaştırılarak O₂ üretiminin hızlandırılması düşünülmüştür. Ayrıca tasarlanan tüplerde oluşabilecek risklere karşı tüm gaz sensörleri aktifleşmeye hazır halde bulunacak ve filtreleme yöntemiyle bu risklerin önlenmesi planlanmıştır.

Ülkemizde milli teknoloji hamlesine yönelik olarak Savunma Sanayisine katkı sağlayacak bu projede günümüzde askeri kapalı devre ya da normal dalış tüplerine nazaran oksijen üretimi sağlamanın yanında ergonomik dalış tüpleri SAT Komandolarına göre tasarlanmış olsa da itfaiyeciler, steril oda çalışanları, ISS (İnternational Space Station), derin deniz araştırma ve mühendislik dalgıçları vb. alanlar için de kullanılabilir. Projedeki akış süreci şu şekilde ilerlemektedir;



Dalış esnasında kullanılacak tüp uygulanacak teknolojinin şartlarına bağlı olarak 20 ile 25 litre arasında değişmesi öngörülmüştür. Bir tüp oksijen doluyken diğer tüp kullanım esnasında CO₂ dolacak bu sebeple 2 tane tüp kullanılması uygun görülmüştür. Ayrıca tüpler arasında mikroalglerin yaşam alanı olan fotobiyoreaktör yer alacaktır ve bu sayede CO₂ gazı O₂ gazına dönüştürülecektir. Fotobiyoreaktör içerisinde O₂ dönüşümünü sağlayacak canlıların yaşaması için uygun ortam bulunmaktadır. Tüplerde filtreleme sistemine benzer bir sistem kullanılmıştır. Fitoplanktonların yaşadığı tüpte farklı zehirli gazlar da üretilebilir ve bu insan sağlığını etkileyebilmektedir. Bundan dolayı CO, CO₂ ve O₂ gibi gazları ölçen iki sensör kullanılmıştır. Karbon Monoksit, Klor, Nitrik Oksit, Azot Dioksit, Fosfin, Etilen Oksit, Kükürt Dioksit, Hidrojen Sülfür, Hidrojen, Amonyak gibi maddelerin varlığını ölçen kimyasal sensör dışında sadece oksijen seviyesini belirleyen hassas sensör kullanılmıştır. O₂ sensörü hem diatom reaktöründe hem de dalış tüpünde yer alırken, diğer maddeleri ölçen kimyasal sensörler sadece biyoreaktör tüpünde yer almaktadır.

4. Yöntem

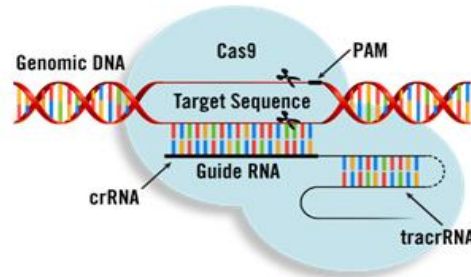
Bu projede, hem bulunma miktarı hem de fonksiyonları bakımından önemli olan mikroalg sınıfları araştırılmıştır. En yaygın mikroalg türleri olarak diatomlar, yeşil algler ve altın renkli algler bulunmaktadır. Kullanılması hedeflenen mikroalg türü olarak diatomlar tercih edilmiştir. Bu projede diatomların seçilme nedeni okyanuslarda üretilen birincil karbonun en az %30'unun üretiminden sorumlu olmaları ve diğer mikroalgelere nazaran dışarıdan aldığı ışık enerjisini toplayarak fotosentez yolu ile kimyasal enerjiye dönüştüren moleküllere (klorofil a, klorofil c) sahip olmasıdır. Diatom türlerinin sayısı tahmini olarak 20.000 - 2 milyon arasında değişmektedir. Diatomlar suda yaşayan dairesel hilal ve mekik gibi farklı şekillerde olan ve dış kabukları özellikle tasarlanmış şeffaf yapıdadırlar. Öncelikle nehir yatağından uygun, geniş, düz yüzeyli taşlar toplanır, taşın yüzeyinde kahverengi silim tabakası olmasına dikkat edilmelidir. Silim tabakasında diatomlar bol miktarda bulunmaktadır. Plastik kaba alınan taş bir diş fırçası yardımı ile fırçalanır ve taşın üzerindeki kahverengi film tabakasının tamamı kazınmaya çalışılmalıdır. Diatomları toplamak için taşın sadece suya bakan kısmından çıkarma işlemi yapılmalıdır. Son olarak pipet yardımıyla taşta tazyikli su fişkırtılarak taşın yüzeyi temizlenmelidir. Diatomlar plastik kabın tabanında toplanan kahverengi suda bulunmaktadır. Toplanan diatomlar mikroskop altında hareket yeteneğine göre incelenirler. Bir pipet kullanarak küçük şişenin tabanına biraz örnek alındıktan sonra bu örnek bir santrifüj tüpüne yerleştirilir ve çalıştırılır. Diatomlar tüpün dibine çöktüğünde süpernatant ismi verilen üstteki kısım atılır ve tüpe diatom örneğinin 2-3 katı kadar ticari temizleme ürünü ilave edilir, pipet kullanılarak karışım yavaşça karıştırılır. Daha sonra yaklaşık 20 dk beklenir ve bu sürede karışımın 2 kez daha karıştırılması gerekmektedir. 20 dk bekledikten sonra distile su kullanılarak karışım yıkanır ve suyun eklenmesi ile 2 tüpteki sıvı oranı birbirine eşitlenmelidir. Bu işlem sonrasında tüpler santrifüje tekrar yerleştirilir ve burada diatomların çökmesi sağlanır. Santrifüj sonrasında süpernatant boşaltılır ve tüpler ters çevrilerek yıkama işlemi en az 3 kez tekrarlanır. Bu işlem temizleme ürününün uzaklaştırılması için gereklidir eğer ürün uzaklaştırılmazsa doğru preparat hazırlanamaz.

Diatom örneklerinin yıkanıp temizlenmesi için karışıma, rengi bulanık olana kadar distile su eklenir. Diatomların preparatta yoğun olarak bulunmaları gözlemlenmelerini zorlaştırmaktadır. Bu yüzden karışımın preparat halinde hazırlanması için ısıtılması gerekmektedir. İlk olarak seramik karo elektrikli ısıtıcı üzerine bir lamel konur ve lamel üzerine birkaç damla yıkanmış solüsyon konur. Seramik karo üzerindeki sıvı buharlaşmaya kadar ısıtılır. Sıvı buharlaştıktan sonra soğuması için bekletilir. Daha sonra lamel, karo üzerinden dikkatli bir şekilde alınır. Lamel, lam üzerine dikkatli bir şekilde ters çevrilerek konulur. Lam lamele bir bant yardımıyla sabitlenir. Böylece preparasyon tamamlanır. Bu metodla geçici preparat hazırlanmış olur.

Preparasyonun diğer bir yolu da dairesel preparat hazırlamaktır. Yaklaşık bir damla kloraks bir lam üzerine konulur. Sonra üzerinde önceden buharlaşmış diatome solüsyonu konularak kloraksın üzerine ters çevrilerek kapatılır. Seramik karo üzerinde ısıtma işlemi gerçekleştirilir. Klorakstaki mevcut alkolün buharlaşması sağlanır. Lam üzerinde ilk önce hava kabarcıkları oluşur. Ancak alkol buharlaştığında kabarcıklar azalır. Kabarcık tekrar oluşmaya başladığında karo üzerinden preparat alınır, lam bir lamelin üzerine ters çevrilerek

konur ve bir pens yardımıyla bastırılarak kapatılır. Bu şekilde hava kabarcıkları çıkartılır. Kloraks çok çabuk kurduğu için bu yöntem hızlı bir şekilde yapılmalıdır. Birkaç dk sonra kloraks tamamen sertleşir ve preparasyon işlemi tamamlanmış olur. Hangi metot kullanılırsa kullanılsın diatomların detaylı gözlenmesi mümkündür. Türü keşfedilen diatomun DNA'sı kullanılmak üzere crispr aşamasına geçilir.

Belirlediğimiz *Fistulifera sp.* diatomunun gen dizilimine bir rehber RNA tasarlarken özellikle Cas enziminin tanıyacağı 'PAM (Protospacer Adjacent Motifs)' dizisinin ortaya çıkarılması gerekmektedir. PAM dizisi, CRISPR Cas sistemi izole edildiğine canlının türüne göre değişiklik göstermektedir. Rehber RNA'nın tasarımı yapılırken PAM dizisinin eklenmesine gerek yoktur, fakat hedeflenen genin bölge içerisinde rehber RNA'nın 3'(üç üssü) ucunda bu PAM dizisinin olması gerekmektedir.



Resim 3: Bakteriyi enfekte eden virüs DNA'sının belirli kısımları ve tekrar genleriyle birlikte CRISPR bölgesi

Rehber RNA'nın (gRNA) özellikle tanıyan bölgesinin 20 nükleotid uzunluğunda olması gerekmektedir. tracrRNA ve crRNA'nın geri kalan bölümleri ile birleştirildiğinde toplamda 100 bazı geçmektedir. Bir total gRNA CRISPR Cas enzimi çalışmalarında özellikle hedef dışı mutasyonların aktivitesinin belirlenmesi önemli bir rol almaktadır. Çünkü Cas9 enzimi kullanıldığında, DNA çift zincir kırılmasına sebep olacaktır ve bu da indel mutasyonlarını oluşturma ve onkogeneze oluşturma riskini arttırmaktadır. Dolayısıyla bir gRNA ya da gRNA tasarımında ilk olarak; doğru gRNA hedef bölgelerinin belirlenmesi ve bu bölgeyi belirledikten sonra tasarlanan gRNA'nın, en düşük seviyede, hedef dışı mutasyon etkinlik potansiyelinin belirlenmesi gereklidir. Aynı zamanda on target yani optimum hedef konum ilişkisini belirlenmesi de gerekmektedir. Dolayısıyla tasarlanan gRNA, hedeflenen bölge için spesifikliği çok yüksek olmalı ve hedef dışı bölgelerle etkileşim oranının az olup, istenmeyen mutasyon oluşturma olasılığının düşük olması beklenmektedir.

Adımlar ile gRNA tasarımı;

1.ADIM : Hedeflenen gende yapılmak istenen mutasyona gRNA seçilir. Seçilen bölgelerde (intronik bölge, Enhansır bölge, ekzonik bölge) CAS sistemi kullanılabilir.

2.ADIM : Hedeflenen gen içerisinde PAM dizilerine özellikli rehber RNA dizileri belirlenir.

3.ADIM : Tasarlanan 20-25 nükleotiddeki gRNA dizisinin, genom boyunca başka yerlerde benzerlik gösterebileceği belirlenmektedir. Bu belirlenen olasılığın içine uyumsuzluk (mismatch) puanı da eklenmektedir. Uyumsuzluk puanı yeni nükleotid içerisinde 3, 5 tane nükleotidin farklı olmasının CRISPR Cas sistemi tarafından kabul edilebileceğini ve bu kabul

edilme sonucunda da, hedef dışı (off-target) mutasyon olasılığını artırabileceği belirlenmektedir.

ADIM 4: Tasarladığımız gRNA'nın, hedeflenen bölge ile on- target yani hedef spesifikliğı skorunun belirlenmesi gerekmektedir.

ADIM 5: Özellikle rehber RNA'nın ne tür bir şekilde aktarılacağı ile ilgili yöntemleri belirlenmesi gerekmektedir.

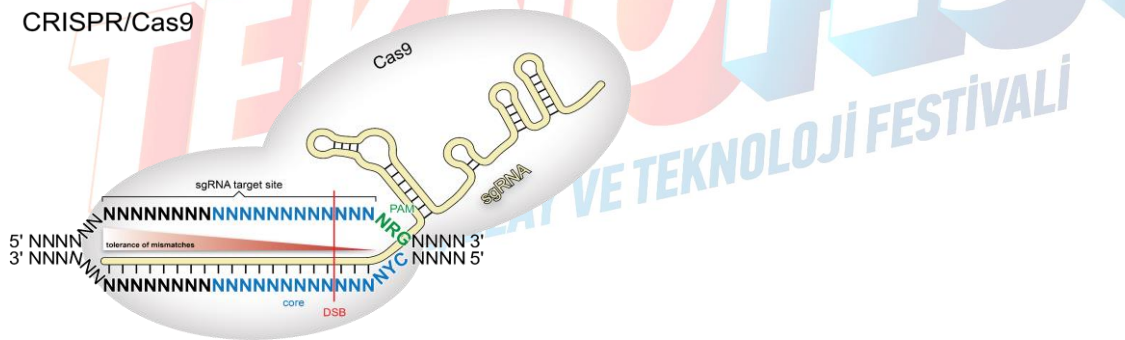
Birinci aşamada hedef gen analizine bakıldığında, bir canlıda hedeflenen bir gen dizilimini bulabilmek için özellikle NCBI veya ENSEMBL gibi veritabanları kullanılmaktadır. Bu veri tabanları içerisinde hedeflenen hücrenin veya organizmanın genomik bilgilerinin olması gerekmektedir. Diğer taraftan hedeflenen gen veri tabanlarında bulunduğu modifiye etmek istenilen bölgenin intronik (kodlanmayan bölge), ekzonik (kodlanan bölge) ya da kodlanmayı regüle eden promotor gibi bölgeler olma durumlarının belirlenmesi gerekmektedir.

Hedef dizi: 5'- GTGTAAACGGATAATGGACANGG

Merkezden uzak Çekirdek PAM

Resim 4: Hedef dizinin gösterimi

gRNA tasarlarken, 20 Nükleotidin başına Guanin (G) eklenmektedir. Guanin eklenmesinin nedenlerinden biri de Sitozinle (S) arasındaki üçlü bağ sebebiyle G, C kontentini artırarak gRNA'nın DNA ile 3. bir zincir oluştururken (triple- helix yapısı) guanin desteğiyle, bağlanma affinitesi artırılmaktadır. Fotoğrafta görülen gRNA'da merkezden uzak, çekirdek isimli iki bölge ayrılmış ve yapılan çalışmalar da istenmeyen mutasyon riskinin merkezden uzaklaştıkça yani 5' (beş üssü) ucuna doğru arttığı ve böylelikle bu siyah olan bölgede birkaç nükleotidin CAS enzimi tarafından o bölgeyi kesileceğini görebiliyoruz. Bu sebeple gRNA'yı tasarladıktan sonra, aynı zamanda bunun merkezden uzak bölgelerinin genom içerisinde başka hangi bölgelerle iletişime geçebileceği, komplementer oluşturabileceğini hesaplamak gerekiyor. Bu hesaplamalar Software araçlar ile yapılabilmektedir.

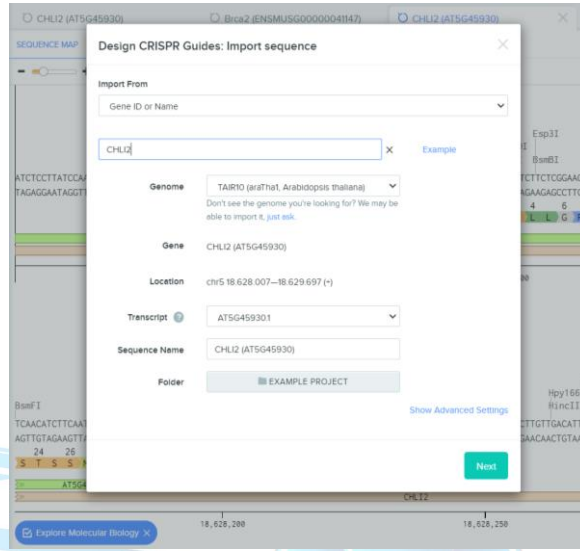


Resim 5: gRNA'nın 5' ucuna doğru (siyah alan) düzenlenmesi ile yanlış hizalama toleransının artırılması

Resimde görüldüğü gibi, özellikle gRNA'nın 5' ucuna doğru (siyah alan) düzenlenmesi ile yanlış hizalama toleransının artırıldığını görülmektedir. Bunun sonucunda ise hedef dışı istenmeyen mutasyon oranında artışın oluşması belirlenmektedir.

Böyle bir durumda 20 nükleotiddeki gRNA dizisi bölgesinin 17, 18 nükleotide düşürüldüğünde istenmeyen mutasyon oluşturma riskinin düşeceği açıklanmıştır. Böylelikle hedef dışı özgülük büyük ölçüde artmakla birlikte daha özgün bir şekilde hedeflediğimiz bölgeyi modifiye edebilmenin önünü açmaktadır.

Bu projede diatomların promotor bölgesi Eukaryotic Promoter Database'de bulunmamaktadır. Bu nedenle *Arabidopsis Thaliana* (Fare kulağı teresini)'nin klorofil geni ve diatomların CHLI2 geni (klorofil biyosentez geni) aynı olduğu için *Arabidopsis Thaliana* bitkisi baz alınarak promotor bölgesi tasarlanmıştır. Buna alternatif olarak diatomların promotor bölgesi genetik hazırlama şirketlerinden satın alınarak yapılabilir.



Resim 6: gRNA'nın 5' ucuna doğru (siyah alan) düzenlenmesi ile yanlış hizalama toleransının artırılması

gRNA'ya 20 nükleotid dizisini tasarlamak için benchling sitesi kullanılmaktadır. Bu sistemi kullanarak CRISPR Guides sekmesi ile resimde görünen seçenekler ayarlanmaktadır. Bu ekrana hedeflediğimiz geni (CHLI2, Klorofil biyosentez geni) yazdıktan sonra genimizin tüm lokasyon ve transkript bölgeleri çıkmaktadır.

TEKNOLOJİ FESTİVALI
HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALI

Design CRISPR Guides: Guide parameters

Design Type

- Single guide
Wild-type Cas9, single gRNA (higher efficiency)
- Paired guides
Double Cas9 nickase, two gRNAs (lower off-target effects)
- Guides for "base editing" (Komor et al., 2016)
C → T (or G → A) substitution, no dsDNA breaks

Guide Length

Genome

Don't see the genome you're looking for? We may be able to import it, [just ask](#).

PAM

[Hide Advanced Settings](#)

Masked Regions

 Include masked regions in off-target search

Off-Target Score

- Use the scoring method from Hsu et al., 2013
- Use the Cutting Frequency Determination (CFD) score from Doench, Fusi et al., 2016. Only available for NGG PAM sites and 20mer guides.

Off-Target Weights

 When calculating MIT off-target scores, use weights designed for SpCas9 nucleases (from Hsu et al., 2013).

On-Target Score

 Use Optimized Score from Doench, Fusi et al., 2016. Only available for SpCas9.

Sequence Display

- Show only cuts in the target region(s)
- Show all potential cuts on the sequence
- Show cut if on-target score is over
- Show cut if off-target score is over

Guide Composition Settings

	Min	Max
% A	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="80"/>
% T	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="80"/>
% C	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="80"/>
% G	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="80"/>

 Save these as my default CRISPR settings

Resim 7 :Dizayn tipinde tek bir gRNA'nn tasarlanmasını istediğimiz için single guide seçeneği seçilmektedir

Resim 8: Sequence display yani on target ve off target (Hedef dışı ve hedef içi) mutasyon skorlarının 10' dan büyük ya da 25'den küçük olması gibi puanlama sınırlarımızı ayarlayarak, belirlediğimiz değerler ve kriterler içerisinde istediğimiz kalite seviyesinde, gRNA otomatik olarak tasarlanmaktadır.

Dizayn tipinde tek bir gRNA'nn tasarlanmasını istediğimiz için single guide seçeneği seçilmektedir. Son olarak Sequence display yani on target ve off target (Hedef dışı ve hedef içi) mutasyon skorlarının 10' dan büyük ya da 25'den küçük olması gibi puanlama sınırlarımızı ayarlayarak, belirlediğimiz değerler ve kriterler içerisinde istediğimiz kalite seviyesinde, gRNA otomatik olarak tasarlanmaktadır. Bunun takibinde resimde görüldüğü gibi gRNA içerisinde adenin, timin, guanin ve sitozin oranları belirlenebilir. Bu da bizim daha spesifik bir gRNA tasarlamamızın önünü açmaktadır. Rehber RNA dizisinin nasıl bir uzunlukta olması istediğimizi resimde görünen sekmelerde ayarlanabilmekte, genomumuz belli olduğu için CAS enzimiz ve PAM dizimiz otomatik olarak isteğe göre seçenekler halinde belirlenmektedir. PAM dizisini seçtikten sonra gen sekansımız ortaya çıkar ve belirlediğimiz seçeneklerdeki verilere göre sistem bize gRNA bölgelerini hemen hesaplamaktadır.

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ



Resim 9: CHLI2 geninin transkripsiyon başlama bölgesi seçilmiştir

Export	Save	Assembly	0 selected	1 of 12	Prev	Next
<input type="checkbox"/>	Cut Position	Strand	Guide Sequence	PAM	On-Target Score	Off-Target Score
<input type="checkbox"/>	18628146	-	GAGGAGCGAGAAATACS	AGG	73.7	82.8
<input type="checkbox"/>	18628145	-	AGGAGCGAGAAATACGA	GGG	69.1	82.9
<input type="checkbox"/>	18628093	+	GAGAGCTCACTAGCAA	TGG	60.7	97.4
<input type="checkbox"/>	18628161	-	GACATTGAGATGTTGAGGA	AGG	58.4	88.5
<input type="checkbox"/>	18628125	-	GGCAGTCAAGATTGAGA	AGG	58.3	94.1
<input type="checkbox"/>	18628141	-	AGGAGAAATACGAGGCG	AGG	57.4	98.5
<input type="checkbox"/>	18628195	-	ATGGGACATTGAAGATGTTG	AGG	54.2	91.0
<input type="checkbox"/>	18628187	+	TCAATGCCACTCTGCTT	CGG	50.9	98.9
<input type="checkbox"/>	18628193	+	TCCCATCTGCTCGGACC	AGG	47.2	99.8
<input type="checkbox"/>	18628106	+	CTAGCAATGGGCTCTCTCT	CGG	38.6	96.9
<input type="checkbox"/>	18628017	-	ttttttGTTGTTGGATA	AGG	36.0*	94.2

Resim 10: En uygun gRNA seçilmiştir

Fotoğrafta gösterilen on target oranları ve off target oranlarının en düşük 70'in üstünde olması gerekmektedir. İkinci plan olarak ya on target oranı yüksek olan ya da off target oranı yüksek olan seçenek seçilip gRNA dizayn edilmektedir. Bunun nedeni CAS'in başarılı bir mutasyon gerçekleştirebilmesi içindir. Off target oranı burada farklı bir anlama sahiptir. Yüksek olması hedef dışı mutasyon olasılığımızın düşüklüğünü gösterir. Resim 9'da sekans üzerinde seçilen alan promotör sonrası klorofil biyosentez geninin ifadesinin (transkripsiyon) başlangıç yeridir. Burada göstermiş olduğumuz Arabidopsis thaliana (Fare kulağı teresini)'daki CHLI 2 (klorofil biyosentez geni) geninin promotör bölgesi, Eukaryotic Promoter Database ile bulunmuştur. (Resim 10)

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

1. *Türkiye’de askeri alanda biyoteknolojiye yönelik çalışmaların olması.* Yapılan araştırmalar sonucunda Türkiye’de genetik çalışmaların diğer ülkelere göre geride kaldığı ve özellikle askeri alanda hiç kullanılmaması dikkat çekmiştir. Bunun üzerine projede biyoteknoloji alanında çalışmalar yapılmasına odaklanılmıştır.
2. *Su Altı Taarruz Komandolarına yönelik su altında kullanılacak eşsiz bir tüp kullanılması.* SAT Komandolarının kullandıkları dalış tüpleri görevlerini belirli bir süreye kısıtlamaktadır, bu sebepten tasarlanan dalış tüpü ile su altında kalma oranlarının artırılması hedeflenmektedir.
3. *Tasarlanan dalış tüpünde oksijen üretimi yapılması.* Dünya üzerinde oksijen üretiminin %78’ini mikroalglerin yaptığı tespit edilmiştir. Fakat bu projede inovatif yönü kapalı bir biyoreaktör içerisinde oksijen üretimi sağlayarak insan kullanımına uygun hale getirilmesi planlanmaktadır.
4. *Dalış tüpünde oksijen sirkülasyonunun sağlanması.* Yapılan araştırmalara bakıldığında dalış tüplerinde filtreleme yapılmış fakat atık olan gazların geri solunum sistemine gaz olarak dönüşmediği gözlemlenmiştir. Projede atık gaz olan CO₂’nin O₂’ye dönüşerek sirkülasyonunun sağlanması yenilikçi yönlerinden biridir.
5. *Tasarlanacak dalış tüpünde oksijen üretimi için mikroalglerin kullanılması.* Şimdiye kadar hiçbir dalış tüpünde mikroalgler kullanılmamıştır. Projedeki kullanım amacı ise tamamen oksijen üretiminin sağlanmasına yöneliktir ve bu özellik projenin inovatif özelliklerinin başında yer almaktadır.
6. *Kullanılacak mikroalglerin DNA’sında değişiklikler yapılarak yani promotor sayısı artırılarak üretilen oksijenin daha çok olması.* Mikroalglerin DNA’larında değişiklikler yapılarak biyoyakıt üretimi gibi çalışmalar bulunmaktadır. Fakat yapılan araştırmalar doğrultusunda diatomların ürettiği oksijen seviyesinin artırılmadığı gözlemlenmiştir.
7. *Tasarlanacak tüpte bir insanın soluması gereken tüm gazların sensörler ile kontrol edilmesi.* Şu ana kadar tasarlanan ve kullanılan dalış tüplerinde sadece sıkıştırılmış hava ve solunum sonrası gazın birikebilecek ikinci bir tüp bulunmaktadır. Fakat bu tüplerin hiçbirisinde içerideki gazı su altında kontrol edebilecek ve ölçümler yapacak sensörler bulunmamaktadır.
8. *Bilinen dalış tüplerinin aksine kendi kendine yetebilen bir cihaz olması.* Tasarlanacak dalış tüplerinin sadece su altında değil kara üzerinde de diatomlar sayesinde O₂ gazı üretecek kapasiteye sahip olacağı düşünülmektedir.
9. *Teknolojinin sadece dalışta değil O₂ gerekliliği olan birçok alanda kullanılabilir olması.* Yapılması planlanan dalış tüpünün sadece askeri alanda değil dalış ve oksijen tüplerinin kullanıldığı her alanda kullanılması düşünülmektedir.
10. *Tasarımın spesifik özelliğinden dolayı su altında kalış süresinin uzun olması.* Kurulacak bu sistem ile su altında görev alan insanların su altındaki kalma sürelerinin uzatılması hedeflenmektedir.

6. Uygulanabilirlik

İleriki zamanlarda su altı çalışmalarında tasarlanacak olan sistemin, dalgıçların kullanabileceği sürdürülebilir gaz akışının sağlandığı ve bu sistemden faydalanacak her türlü mesleklerin aktif bir şekilde kullanılması hedeflenmektedir. Sürdürülebilir bu sistemde, öncelikle kullanılacak dalış tüpü ile solunum sonrası verilen CO2 gazının dönüştürülmesi hedeflenmektedir. Bu dönüşümün aynı dünyada olduğu gibi mikroalgler kullanılarak yapılması projenin uygulanabilir olduğunun en büyük kanıtıdır. Projede yenilikçi yönümüz algler üzerinde CRISPR-Cas9 teknolojisi kullanımı ile O2 gazının dönüşümü hızlandırılmasıdır. Projedeki amacımız O2 gazının çoğaltılması olmasından kaynaklı yine uygulanabilirlik yönünü arttırmaktadır.

Günümüz şartlarında projede hedeflenen sistemin ticari ürüne dönüştürülme olasılığı fazladır. Bunun sebebi ise geliştirilmiş olan SCUBA dalış tüplerine sadece biyoreaktör eklenerek algere yaşam alanı oluşturulmasıdır ve bunun yapımı kısa zaman ve minimum iş gücü isteyen bir aşamadan oluşmaktadır. Bundan sonraki aşamalarda diatomda yapılacak olan CRISPR-Cas9 teknolojisi ile düzenlemenin minimum iş günü 10 ile 15 arasındadır. Projenin ticari ürüne dönüştürülme hızı oldukça yüksektir. Böylece yapılması düşünülen dalış tüpünün, doğru sonuçlar elde edildiği sürece kullanımı kolaylaşacaktır. Teknoloji hazırlık seviyesinde (THS) şu anda 2 de olmakla beraber ilerleyen süreçlerde proje desteklenirse laboratuvar ortamlarında deneysel aşamalara geçerek THS 3 ve THS 4'e geçiş hedeflenmektedir. Deneysel veriler de doğrulandığında, THS 5'e geçiş yapılarak projedeki sistemin hazır hale getirilmesi hedeflenmektedir.

7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması

Sıra No	Malzeme Adı	Fiyatı
1	Fitoplanktonları muhafaza edecek oksijen tüpü	500 \$
2	Oksijen sensörü	2 \$
3	Crispr-Cas9 kiti	500 \$
4	Biyoreaktör	200 \$
5	Ağırlık	170 \$
6	Dalış elbisesi	160 \$
7	Yüzerlilik ekipmanı	200 \$
8	Denge yelegi	400 \$
9	Tehlikeli gazların tespiti için sensör	28 \$
10	Fener	15 \$
11	Bıçak	18 \$
12	Yazı tahtası	7 \$
13	Pusulula	12 \$

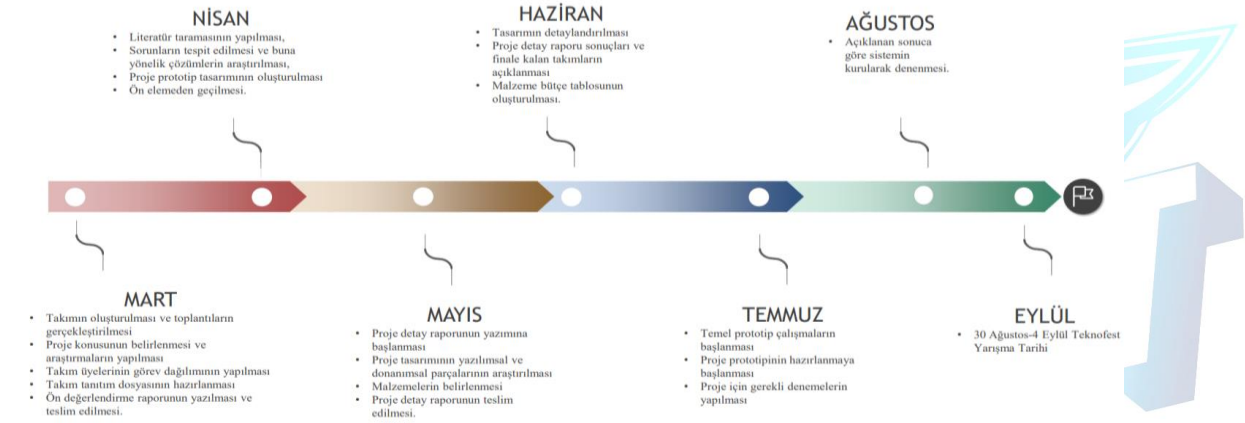
14	Sualtı düdüğü	10 \$
15	Maske	200 \$
16	Palet	200 \$
17	Şnorkel	240 \$
	TOPLAM	2862 \$

Tablo 1: Kullanılması planlanan malzemelerin fiyat listesi

Dalış için gerekli olan malzemeler dalış yapacak olan kişinin ihtiyaçlarına göre değişiklik gösterebilir. Dalış yapacak kişinin boyuna, kilosuna ve dalışın amacına göre düzenlenebilir bir dalış seti oluşturulmuştur. Tasarlanan hava tüpünün diğer dalış malzemelerine uygunluğu önceliğimiz olmuştur. Özel olarak tasarladığımız oksijen tüpünün ve dalış malzemelerinin tahmini bütçesi 25 bin türk lirası ile 30 bin türk lirası arasında değişebilir olduğunu tahmin etmekteyiz.

Projemizin en az maliyetle uygulanabilir olması yine malzemelerin kullanım şartlarına ve kullanan kişinin özelliklerine göre değişiklik göstermektedir. Dalış ürünlerini kullanacak olan kişi alanında uzman olduğu için yapılacak dalışın güvenliği adına malzemelerin doğru seçilmesinde öncülük edecektir.

Prototip modellemesi aşamasında elektronik ve mekanik aksamların tasarlanmasında kullanılacak malzemeler için farklı firmalardan alınan proformalar doğrultusunda en az maliyetli bütçe tablosu oluşturulmuştur.



Resim 12: Projenin tahmin edilen çalışma süresi çizelgesi

8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar)

Proje öncelikli olarak su altında görev alan SAT komandolarına yönelik tasarlanmıştır. Fakat gerçekleştirmek istediğimiz bu proje, su altında görev alan su dalgıçlarına ve oksijen tüpü kullanılan itfaiyeciler gibi her türlü mesleğe hitap edilebilmektedir. Proje gerçekleştiğinde askeri alanda kullanımı artırılarak askeri görevde olan komutanların iş

yükünü hafifletmek ve hem teknolojik hem de genetik alanda bir çığır açarak yeni bir döneme geçiş yapılması planlanmaktadır. Bu sebepten dolayı asıl hedef kitlemiz su altında görev alan askerlerdir.

9. Riskler

Projemizin hayata geçiş aşamasında ve hayata geçtikten sonra öngörülen bazı riskler aşağıda sıralanmıştır. Tablo 2 de görülen risklere uygun çözüm önerileri olarak B planı oluşturulmuştur. Projemizin riskleri SAT Komandolarının su altındaki sağlığını etkilediği için incelikte düşünülmüştür.

Risk No	RİSKLER	B Planı
1	CRIPSR'ın doğru çalışmaması. Belirlenen genin artırılması üzerine tasarlanan gRNA hedef dışı mutasyona sebep olması.	Belirlenen rehber RNA'nın yedeğinde bulunan off-target oranı ya da on-target oranı yüksek olan diğer rehber RNA'lar kullanıma geçirilir.
2	Tüplerdeki hava yollarının diatomlar veya diğer organizmalar tarafından tıkanması.	Tüplerin hava yollarında beklenen tıkanmalara karşı hava hortumları yanında yedek havayolu yani by-pass yapılır.
3	Genetiği değiştirilmiş organizmanın daha sonra olasılığı çok düşük olsa da (%1) epigenetik mekanizmalar tarafından bastırılıp oksijen üretme seviyesinin düşürülmesi.	Genetiği değiştirilmiş diatom yılda bir kez genetik testlere tabii tutularak gende değişiklik olup olmadığı kontrol edilir.
4	Tüpteki sensörlerin çalışmaması.	Sensörler çalışmadığı zamanda yedek sensörler devreye dalgıç kontrolünde girer ve su altında göreve devam edilir. 2 sensöründe durması halinde kalan oksijenle göreve devam edilir.
5	Biyoreaktöre, diatomların Azot ihtiyacını karşılaması açısından girecek olan deniz suyunun giriş yolunda tıkanıklık olması.	Tıkanıklık olması halinde biyoreaktörde bulunan Azot sensörünün devreye girmesiyle belirlenebilir. Otomatik temizleme sistemi devreye girer.
6	Diatomların ölmesi.	Diatomların ölmesi halinde O2 miktarındaki düşüş sensörler tarafından algılanır ve dalgıça erken ileti sağlanır. Dalgıç su yüzeyine çıktığında, fotobiyoreaktöre diatom ilavesi yapılır.

Tablo 2: Riskler ve B planı tablosu

10. Kaynaklar

- Çınar, S (2019). Denizel diatom izolasyonu, tanımlanması ve besin maddelerinin diatom büyümesi üzerine etkisinin incelenmesi. *Gazi Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi*. 34(3). 1146-1149.
- Fakıoğlu Ö ve Demir N (2011). Göllerin Ekolojik Durumunun Değerlendirilmesinde Fitoplankton Topluluklarının Kullanılması. *Ankara Üniversitesi Çevre Bilimleri Dergisi*. 3(1). 99-105.
- Sevinç, F (2018). Boş Zaman Aktivitesi Olarak Dalış ve Yaşam Doyumu İle İlişkisi. *Dokuz Eylül Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi*. 20(3). 403-406.
- Soysal, T (2019). Crispr Genom Düzenleme Teknolojileri: Patentlenebilirlikleri ve Covid-19 Salgınında Kullanımı. *Adalet Dergisi*. Sayı:66. 233-236.
- Şahin Y. ve Akyurt İ (2010). Planktonlar ve Fotobiyoreaktörler. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi / The Black Sea Journal of Sciences*. 1(2). 83-92.
- Tanaka, T, Maeda M ve Mayama S (2011). High-throughput Pyrosequencing of the Chloroplast Genome of a Highly Neutral-lipid-producing Marine Pennate Diatom, *Fistulifera* sp. strain JPCC DA05080. *Photosynth Res*. Sayı:109. 225-228.
- Vehapı, M (2016). *Makro ve Mikroalglerin Antimikrobiyal ve Antioksidan Etkilerinin İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. İstanbul.
- URL-1:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> Erişim Tarihi: 25.04.2022
- URL-2:https://epd.epfl.ch/cgi-bin/get_doc?db=atEpdNew&format=genome&entry=AT5G45930_1 Erişim Tarihi:25.04.2022
- URL-3:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/GCA_002217885.1/ Erişim Tarihi: 05.05.2022
- URL-4:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/BDSP01000020.1> Erişim Tarihi: 27.04.2022
- URL-5:<https://sgx.cdstore.com/products/sgx-sensortech/electrochemical-gas-sensohttps://www.sem.com.tr/temel-laboratuar-sistemleri/bioreaktor/> Erişim Tarihi:8.05.2022
- URL-6:
<http://acikerisim.erdogan.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/11436/631/543456.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Erişim Tarihi: 25.04.2022
- Resim-3:(<https://www.dijitalx.com/2019/05/18/son-yillarin-gozdesi-crispr-cas9-yontemine-genel-bakis/>) Erişim Tarihi: 03.05.2022
- Resim-5:<https://cctop.cos.uni-heidelberg.de:8043/help.html> Erişim Tarihi: 28.04.2022
- Resim-6,7,8,9,10:<https://benchling.com> Erişim Tarihi: 25.04.2022
- Resim-11:https://epd.epfl.ch/cgi-bin/get_doc?db=atEpdNew&format=genome&entry=AT5G45930_1