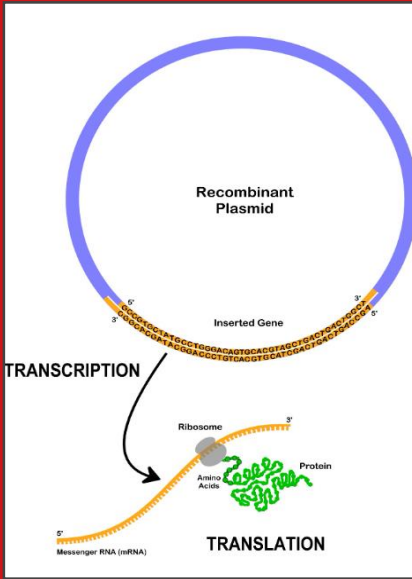


Burak ÇALIŞ



burak.calis@agu.edu.tr

0000-0003-4083-490X



Thesis Advisor

Dr. Öğr. Üyesi
Özkan FİDAN

ozkan.fidan@agu.edu.tr

RECOMBINANT PRODUCTION of GLP-1
ANALOGUE USING *Escherichia coli* HOST
ORGANISM

abstract Diabetes is the most serious metabolic disorder correlated with obesity, hypertension and cardiovascular conditions. High prevalence of Type II Diabetes Mellitus (T2DM) indicates the need for new medication development. In developing therapeutics, higher efficiency and fewer adverse effect features are targeted primarily. Recombinant protein-based biotechnological drug molecules have been developed and used for the treatment of T2DM. Especially, GLP-1 analogues are known by their self-limiting mechanism and insulinotropic effect. In this study, a novel GLP-1 analogue with increased stability and efficiency is produced using recombinant *E. coli*. The expression plasmid was constructed and confirmed by restriction digestion and whole plasmid sequencing. Then, it was transformed into various *E. coli* strains followed by optimized lysis, growth and expression conditions to maximize the yield of the GLP-1 analogue. Various parameters such as pre-induction time, induction point, induction IPTG concentration and post-induction temperature were tested for the successful expression with maximum yield. Consequently, it was achieved that *E. coli* BL21(DE3) as strain, 0.2 mM IPTG induction at OD_{600nm} of 0.6 and 18 °C overnight post-induction growth was the most promising conditions. Under these conditions, the GLP-1 analogue was obtained in the insoluble fraction. Following protein analysis and purification, quantification was performed and the highest titer of GLP-1 analogue was measured as 626 µg/ml. As future prospect, using another host organism and changing growth conditions can provide obtaining target protein in the soluble form.

keywords T2DM, GLP-1 analogue, recombinant DNA technology, protein expression, *E. coli*

özet Diyabet, obezite, hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilendirilen en ciddi metabolik bozukluktur. Özellikle Tip II Diyabet'in yüksek prevalansı, buna karşı yeni ilaç geliştirme ihtiyacını işaret etmektedir. Geliştirilen ilaçlarda öncelikle daha yüksek verimlilik ve daha az yan etki hedeflenmektedir. Rekombinant protein temelli biyoteknolojik ilaç molekülleri bu amaç için umut vericidir. Özellikle GLP-1 analogları, kendi kendini sınırlayan mekanizmaları ve insülinotropik etkileriyle bilinmektedir. Bu çalışmada, rekombinant *E. coli* kullanılarak artırılmış stabilite ve verimliliğe sahip yeni bir GLP-1 analogu üretilmiştir. Ekspresyon plazmidini, restriksiyon-ligasyon yöntemi ile oluşturulmuş ve tüm plazmit dizilimi ile doğrulanmıştır. Daha sonra, GLP-1 analogunun verimini en üst düzeye çıkarmak için optimize edilmiş lizis, büyüme ve ekspresyon koşulları izlenerek çeşitli *E. coli* suşlarına transform edilmiştir. Ön indüksiyon süresi, indüksiyon noktası, indüksiyon IPTG konsantrasyonu ve indüksiyon sonrası sıcaklık gibi çeşitli parametreler, maksimum verimle başarılı ifade için test edilmiştir. Sonuç olarak, *E. coli* BL21(DE3) suşu, 0.6 OD_{600nm}'de 0.2 mM IPTG indüksiyonu ve 18 °C'de gece boyunca indüksiyon sonrası büyümenin en verimli koşullar olduğu sonucuna ulaşıldı. Bu koşullar altında hedef protein GLP-1 analogu, çözünmeyen fraksiyon halinde elde edildi. Protein analizi ve saflaştırmanın ardından kantifikasyon yapıldı ve GLP-1 analogunun en yüksek titresi 626 µg/ml olarak ölçüldü. Gelecekteki beklentiler olarak, başka bir konak organizma kullanmak ve büyüme koşullarını değiştirmek, hedef proteinin çözünür formda elde edilmesini sağlayabilir.

anahtar kelime T2DM, GLP-1 analogu, rekombinant DNA teknolojisi, protein ekspresyonu, *E. coli*