

## ÖZET

### ROSEBURIA FLAGELLIN VE İMMÜN MODÜLASYONU

- 5 Mevcut buluş, bir denekte bir dokunun veya bir organın enflamasyonunu modüle etmekte kullanım için *Roseburia* flagellinler ve/ veya söz konusu *Roseburia* flagellinleri kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya bakteri
- 10 ihtiva eden, söz konusu vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya bakteri ihtiva eden, söz konusu polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ile ilgilidir.

## İSTEMLER

1. Roseburia flagellin ve/ veya söz konusu Roseburia flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya  
5 bahsedilen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya bahsedilen vektörü içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre **olup, özelliği**; bir denekte bir enflamatuvar bozukluğun ve/ veya bir otoimmün bozukluğun  
10 tedavisinde ve/ veya önlenmesinde kullanılmasıdır.

2. İstem 1'e göre kullanım için Roseburia flagellin ve/ veya polinükleotit dizisi ve/ veya vektör ve/ veya bahsedilen vektörü içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren, bakteri ihtiva eden  
15 bir konak hücre **olup, özelliği**; bahsedilen Roseburia flagellinin aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilmesi:

SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 veya SEQ ID NO: 12 veya bunların varyantları, homologları, fragmanları veya türevleri ve bunların kombinasyonları ile en  
20 az % 75 özdeşliğe sahip polipeptitler; ve bahsedilen Roseburia flagellini kodlayan polinükleotit dizisinin aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilmesidir:

SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 veya SEQ ID NO: 12 veya bunun varyantlarına, homologlarına,  
25 fragmanlarına veya türevleri ile en az % 75 özdeşliğe sahip bir polipeptidi kodlayan polinükleotit dizileri;

SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 veya SEQ ID NO: 11 veya bunların varyantları, homologları, fragmanları veya türevleri ile en az % 75 özdeşliğe sahip  
30 polinükleotit dizileri;

ve bunların kombinasyonları.

3. İstem 1'e göre kullanım için Roseburia flagellin ve/ veya polinükleotit dizisi ve/ veya vektör ve/ veya bahsedilen vektörü içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre ve/ veya  
35 bahsedilen polinükleotit dizisini içeren, bakteri ihtiva eden

bir konak hücre **olup, özelliği;** söz konusu enflamatuar bozukluk ve/ veya bir otoimmün bozukluğun, romatoid artirit, sedef hastalığı, multipl skleroz, tip I diyabet, çölyak hastalığı, atopik dermatit, rinit, irritabl bağırsak sendromu (IBS), kolit, enflamatuar barsak hastalığı (IBD), ülseratif kolit, kese iltihabı, Crohn hastalığı, fonksiyonel dispepsi, atopik hastalıklar, nekrotizan enterokolit ve bunların kombinasyonlarından meydana gelen gruptan seçilmesidir.

**4.** İstem 1'e göre kullanım için Roseburia flagellin ve/ veya söz konusu Roseburia flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya bahsedilen vektörü içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre **olup, özelliği;** Roseburia flagellin ve/ veya söz konusu Roseburia flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya bahsedilen vektörü içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücrenin bir denekte T düzenleyici hücrelerinin üretimini artırmasıdır.

**5.** İstem 1'e göre kullanım için Roseburia flagellin ve/ veya söz konusu Roseburia flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya bahsedilen vektörü içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre **olup, özelliği;** Roseburia flagellin ve/ veya söz konusu Roseburia flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya bahsedilen vektörü içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücrenin bir deneğin bir hücresinde veya hücrelerinde IL- 10 ve/ veya TGFβ'nın üretimini artırmasıdır.

6. İstem 1'e göre kullanım için Roseburia flagellin ve/ veya söz konusu Roseburia flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya bahsedilen vektörü içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre **olup, özelliği;** Roseburia flagellin ve/ veya söz konusu Roseburia flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya bahsedilen vektörü içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücrenin bir deneğin bir hücresinde veya hücrelerinde immün yanıtlar ve antijen tanımaya katılan CD40, I- A/I- E, CD317/BST- 2, CD103, CD80, CD86, CD83 ve/ veya Siglec- H gibi hücre yüzey markörlerinin ve/ veya eşdeğer türlerin üretimini artırmasıdır.

7. İstem 6'ya göre kullanım için Roseburia flagellin ve/ veya polinükleotit dizisi ve/ veya vektör ve/ veya bahsedilen vektörü içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre **olup, özelliği;** immün yanıtlar ve antijen tanımaya katılan CD40, I- A/I- E, CD317/BST- 2, CD103, CD80, CD86, CD83 ve/ veya Siglec- H gibi hücre yüzey markörlerinin ve/ veya eşdeğer türlerin üretiminin dendritik hücreler tarafından yapılmasıdır.

8. İstem 1'e göre kullanım için Roseburia flagellin ve/ veya söz konusu Roseburia flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya bahsedilen vektörü içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre **olup, özelliği;** Roseburia flagellin ve/ veya söz konusu Roseburia flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya bahsedilen vektörü içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre ve/ veya



bahsedilen polinükleotit dizisini içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücrenin bir deneğin bir hücresinde veya hücrelerinde çok sayıda Tip IFN genlerinden birinin ifadesini azaltmasıdır.

5 **9.** Roseburia flagellin ve/ veya söz konusu Roseburia flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya bahsedilen vektörü içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren, bakteri  
10 ihtiva eden bir konak hücre **olup, özelliği;** bir deneğin iştahını uyarmak için kullanılmasıdır.

**10.** İstem 9'a göre kullanım için Roseburia flagellin ve/ veya söz konusu Roseburia flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren bir  
15 vektör ve/ veya bahsedilen vektörü içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre **olup, özelliği;** bir deneğin kanında kolesistokinin (Cck) ve/ veya glukagon (Gcg) seviyesinin azaltılmasıdır.

20 **11.** Farmasötik bir bileşim ve/ veya bir besin takviyesi **olup, özelliği;** Roseburia flagellin ve/ veya söz konusu Roseburia flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya bahsedilen vektörü içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre  
25 ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücreyi ve farmasötik ve/ veya besleyici olarak kabul edilebilir eksipiyan, taşıyıcı veya seyrelticiyi içermesidir.

**12.** İstem 11'e göre farmasötik bir bileşim ve/ veya bir besin  
30 takviyesi **olup, özelliği;** söz konusu Roseburia flagellin ve/ veya söz konusu Roseburia flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya bahsedilen vektörü içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre ve/ veya bahsedilen

polinükleotit dizisini içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücrenin kapsüllenmesidir.

13. İstem 11 veya 12'ye göre farmasötik bileşim ve/ veya besin takviyesi **olup, özelliği**; bir denekte bir bozukluğun tedavisinde kullanım için olmasıdır, burada bozukluk bir enflamatuvar bozukluk ve/ veya bir otoimmün bozukluktur.

14. İstem 11 veya istem 12'ye göre farmasötik bileşim ve/ veya besin takviyesi **olup, özelliği**; bir deneğin iştahını uyarmak üzere kullanılmasıdır.

15. İstem 11'e göre bir farmasötik bileşim ve/ veya besin takviyesini üretmek için bir proses **olup, özelliği**; söz konusu prosesin adı geçen *Roseburia flagellin* ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen vektör ve/ veya bahsedilen vektörü içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücrenin farmasötik veya besleyici olarak kabul edilebilir bir eksipiyan, taşıyıcı veya seyreltici ile karıştırılmasını içermesi; isteğe bağlı olarak adı geçen *Roseburia flagellin* ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen vektör ve/ veya bahsedilen vektörü içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücrenin kapsüllenmesidir.

16. İstemler 1 ila 10'dan herhangi birine göre kullanım için *Roseburia flagellin* ve/ veya polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen vektör ve/ veya bahsedilen vektörü içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre, İstemler 11 ila 14'den herhangi birine göre farmasötik bileşim ve/ veya besin takviyesi ve İstem 15'e göre proses **olup, özelliği**; söz konusu *Roseburia flagellin* *Roseburia hominis*'den türetililebilir olmasıdır.

17. İstem 16'ya göre kullanım için *Roseburia hominis* flagellin ve/ veya polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen vektör ve/ veya bahsedilen vektörü içeren, bakteri ihtiva eden bir konak

hücre ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre **olup, özelliği**; söz konusu *Roseburia hominis* flagellinin SEQ ID NO: 2 veya SEQ ID NO: 4 ile en az % 99 özdeşliğe sahip bir polipeptit olması ve söz

5 konusu *Roseburia hominis* flagellini kodlayan polinükleotit dizisinin SEQ ID NO: 2 veya SEQ ID NO: 4 ile en az % 99 özdeşliğe sahip bir polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi olması veya SEQ ID NO: 1 veya SEQ ID NO: 3 ile en az % 99 özdeşliğe sahip bir polinükleotit dizisi olmasıdır.

10 **18.** İstem 16 veya 17'ye göre kullanım için *Roseburia hominis* flagellin ve/ veya polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen vektör ve/ veya bahsedilen vektörü içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren, bakteri ihtiva eden bir konak hücre **olup, özelliği**;

15 söz konusu *Roseburia hominis* flagellinin SEQ ID NO: 2 veya SEQ ID NO: 4 olarak gösterilen polipeptit dizisine sahip olması ve söz konusu *Roseburia hominis* flagellini kodlayan polinükleotit dizisinin SEQ ID NO: 2 veya SEQ ID NO: 4 olarak gösterilen diziye sahip bir polipeptidi kodlayan bir polinükleotit

20 dizisine sahip olması veya SEQ ID NO: 1 veya SEQ ID NO: 3 olarak gösterilen polinükleotit dizisine sahip olmasıdır.

## TARİFNAME

### ROSEBURIA FLAGELLIN VE İMMÜN MODÜLASYONU

#### 5 **Buluşun Alanı**

Bu buluş, çeşitli terapötik ve besinsel kullanımlar için *Roseburia* flagellinler ve/ veya sözü geçen *Roseburia* flagellinleri kodlayan polinükleotit dizileri ve/ veya adı geçen polinükleotit dizilerini içeren vektörler ve/ veya adı geçen vektörleri içeren bakteriler de dahil olmak üzere konak hücreler ve/ veya adı geçen polinükleotit dizilerini içeren bakteriler de dahil olmak üzere konak hücrelere ile ilgilidir.

#### **Buluşun Arka Planı**

İnsan bağırsağının rahim içinde steril olduğu düşünülmektedir, ancak doğumdan hemen sonra çok çeşitli maternal ve çevresel mikroplara maruz kalmaktadır. Bundan sonra, doğum şekli, çevre, beslenme ve konak genotipi gibi faktörlerden etkilenen dinamik bir dönem olan mikrobiyal kolonizasyon ve ardıllık meydana gelir ve bunların tümü, özellikle erken yaşta bağırsak mikrobiyotasının bileşimini etkiler. Daha sonra, mikrobiyota stabilize olur ve yetişkinlere benzer hale gelir (Spor, Koren & Ley 2011). İnsan bağırsak mikrobiyotası temelde iki büyük bakteri bölümüne ait 500- 1000'den fazla farklı filotip içermektedir: Bacteroidetes ve Firmicutes (Eckburg vd. 2005). İnsan bağırsağının bakteriyel kolonizasyonundan kaynaklanan başarılı simbiyotik ilişkiler çok çeşitli metabolik, yapısal, koruyucu ve diğer faydalı işlevler ortaya koymuştur. Kolonize bağırsağın arttırılmış metabolik faaliyetleri, başka türlü sindirilemeyen diyet bileşenlerinin, konak için önemli bir besin kaynağı sağlayan yan ürünlerin serbest bırakılmasıyla bozunmasını sağlar. Benzer şekilde, bağırsak mikrobiyotasının immunolojik önemi iyi bilinir ve ortakçı bakterilerin girişini takiben işlevsel olarak yeniden yapılandırılan bozulmuş bağışıklık sistemine sahip mikropsuz hayvanlarda

örneklendirilir (Macpherson vd. 2001, Macpherson, Martinic & Harris 2002, Mazmanian vd. 2005).

Tek başına mikrobiyal kolonizasyondan etkilenen sekresyonlu bağırsak IgA'sının üretilmesine karşıt olarak (Chung, Kasper

5 2010, Macpherson 2006), T hücresi gelişimi ve farklılaşmasının, spesifik ortakçı mikro organizmalar tarafından kolonileştirilmeyi gerektirmektedir. Clostridium türleri ve özellikle spor oluşturan segmente filamentöz bakterinin (SFB), bağırsak ve kolonik Th1, Th17 ve Tregs'lerin  
10 (Gaboriau- Routhiau) farklılaşması ve olgunlaşması için güçlü bir uyarıcı olduğu görülmektedir vd. 2009, Ivanov vd. 2009). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, Clostridium kümeleri IV ve XIVA ve Altered Schaedler Flora (ASF) gibi diğer bağırsak bakterilerinin Treglerin yeniden üretilmesini  
15 indükleyebileceğini, diğer taraftan *Bacteroides fragilis* ile mono- kolonizasyonun mikropsuz farelerde Th1 / Th2 dengesizliğini, Treglerin genişlemesini (Mazmanian ve ark. 2005, Geuking ve ark. 2011, Atarashi ve ark. 2011) destekleyerek düzeltebileceğini göstermiştir. Bu veriler,  
20 diğer yerleşik bağırsak bakterilerinin önemli bağışıklık düzenleyici etkilerini göstermektedir. Açıkçası, ortakçı bakterilerin T hücre farklılaşması yollarındaki etkileri değişkendir ve daha önce de belirtildiği gibi spesifik bakterilerle ilişkili olarak bulunan TLR ligand dizisinden  
25 etkilenebilir (Nutsch, Hsieh 2012). Örneğin, SFB'nin T hücre yanıtlarını etkilediği mekanizma şu an bilinmemektedir ancak, flagellin genlerinin varlığını teyit eden son genom çalışmaları, TLR5- flagellin etkileşimleri aracılığıyla doğal yanıtların önemli olabileceğini düşündürmektedir (Prakash ve  
30 ark. 2011, Sczesnak ve ark. 2011). Ayrıca, *B fragilis*'in Treg arttırıcı etkileri PSA ve TLR2 sinyal olaylarıyla arabuluculuk ile ilişkilendirilmiştir (Round ve ark. 2011).

Mikrobiyota bileşimdeki dramatik değişiklikler, enflamatuar barsak hastalığı (IBD) gibi gastrointestinal bozukluklarda  
35 belgelenmiştir. Örneğin, IBD hastalarında Clostridium küme

XIVa bakterilerinin seviyeleri azalırken, *E. coli* sayısı artar, bu da bağırsaktaki sembiyonların ve patobiyonların dengesinde bir kaymaya işaret eder (Frank ve ark. 2007, Scanlan ve ark. 2006, Kang ve ark. 2010, Machiels K. ve ark. 2013). İlginçtir ki, bu mikrobiyal disbiyoz, T efektör hücre popülasyonlarındaki dengesizliklerle de ilişkilidir.

*Roseburia*, Firmicutes filumun'un XIVa isimli filogenetik kümesine aittir. Şu anda, *Roseburia* cinsi içinde, beş tür tanımlanmış ve karakterize edilmiştir: *Roseburia cecicola*, *Roseburia faecis*, *Roseburia hominis*, *Roseburia intestinalis*, *Roseburia inulinivoranlar* (Stanton ve Savage 1983, Duncan vd 2006). Bakteriler flagellalı ortakçı anaeroblardır ve aynı zamanda büyük bütirat üreticileridir (Duncan ve ark. 2006). İnsan bağırsağını kolonize eden bu bakterilerin kesin sayıları doğru olarak tahmin edilmemiş olsa da, *Roseburia* spp. sağlıklı insan bağırsağında hakimdir ve IBD hastalarında yeterince temsil edilmemektedir (Machiels K. ve ark. 2013).

Kolonizasyona ve fare bağırsağına adaptasyona katılan bakteriyel genlerin, özellikle flagellinin rolü ve bunların yanı sıra *Roseburia* bakterileri ile kolonizasyona yanıt veren konak immün genleri açıklanmaktadır. Buluş sahipleri, *R. hominis* ve *R. intestinalis* gibi *Roseburia*'nın belirli flagellin yapılarının diğer flagellat enterik bakterilere nazaran hem epitel hücrelerde hem de dendritik hücrelerde belirgin sinyalleşme yanıtlarını uyurduğunu gösterirler. TLR5 - *Rhominis* gibi TLR5- *Roseburia*'nın önemi, konak adaptif yanıtın yönlendirilmesindeki etkileşimler, özellikle de Treg tepkileri gösterilmektedir. *R. hominis* için eksiksiz genom dizisi ve ek açıklaması GenBank'da erişim numarası CP003040 (sürüm 1) altında gösterilmektedir. Burada açıklanan *R. intestinalis* için (16S rRNA geni türü L1- 82 için GenBank Erişim Numarası: AJ312385) referans genom dizisi GenBank'da ABYJ02000000 erişim numarası (sürüm 2) altında gösterilir ve ABYJ02000001- ABYJ02000409 dizilerinden oluşur.

### **Buluşun Açıklamaları**

Şaşırtıcı bir şekilde, mevcut buluş sahipleri, *Roseburia* Flagellin proteinlerinin, immün yanıtı modüle etmekte önemli olduğunu bulmuştur.

5 İlaveten, mevcut mucitler şaşırtıcı bir şekilde, *Roseburia hominis* veya *Roseburia intestinalis*'den türetilmiş veya türetilabilir flagellin proteinlerinin bağışıklık yanıtını modüle etmekte önemli olduğunu bulmuşlardır. Mevcut buluş istemlerde tanımlanmıştır.

10 Bu buluş, bir denekte bir dokunun veya bir organın (bağırsak gibi) enflamasyonunu modüle etmekte kullanım için bir *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen  
15 vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ile ilgilidir.

Bir başka yönüyle, bu buluş, bir denekte T hücrelerinin  
20 üretimini modüle etmekte kullanım için *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre  
25 ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri) (ör. TLR5'i ifade edebilen regülatör T hücreleri gibi regülatör T hücreleri) ile ilgilidir.

Bu buluş, immünolojik toleransı yeniden kazandırmakta kullanım  
30 için bir *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya

*Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ile ilgilidir.

Diğer bir yönüyle bu buluş, bir deneğin bağışıklık sistemini düzenlemekte kullanım için bir *Roseburia* flagellin ve/ veya

5 adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya  
10 *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ile ilgilidir.

Diğer bir yönüyle bu buluş, bir denekte bir bozukluğu tedavi etmekte kullanım için bir *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör

15 ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ile ilgilidir, burada söz konusu bozukluk enflamatuvar bir bozukluk ve/ veya otoimmün bir  
20 bozukluktur.

Bu buluş, diğer bir yönüyle, bir denekte dendritik hücreleri (örneğin kemik iliği dendritik hücreleri) ve/ veya bir doku veya bir organdaki epitel hücreleri modüle etmekte kullanım için bir *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia*

25 flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ile ilgilidir.  
30

Diğer bir yönüyle bu buluş, bir deneğin bir hücresinde veya hücrelerinde IL- 10 ve/ veya TGF $\beta$ 'nın üretimini düzenlemekte kullanım için bir *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/

35 veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/



veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ile ilgilidir.

- 5 Diğer bir yönüyle bu buluş, bir deneğin bir hücrelerinde veya hücrelerinde CD40, I- A/I- E, CD317/BST- 2, CD103, CD80, CD86, CD83 ve / veya Siglec- H ve/ veya eşdeğer türler gibi bağışıklık yanıtları ve antijen tanımada yer alan hücre yüzey markörlerinin üretimini düzenlemekte kullanım için bir
- 10 *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya
- 15 *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ile ilgilidir.

- Diğer bir yönüyle bu buluş, bir deneğin bir hücrelerinde veya hücrelerinde Tip I IFN genlerinin (bunlarla sınırlı olmamakla birlikte örneğin IFN-  $\beta$ 1, IFN-  $\beta$ 3, *Ifi202b*, *Ifi203*, *IFI44*, *IFTI*, *MXI*, *OAS1*, *OAS2*, *OAS3*, *OASL*, *Irf3* ve *Irf4*'den meydana gelen gruptan seçilen bir veya daha fazla gen) bir veya daha fazlasını ifade edilmesini düzenlemekte (örneğin aşağı regülasyon) kullanım için bir *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi
- 20 ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ile ilgilidir.

- 30 Diğer bir yönüyle bu buluş, bir deneğin bir hücrelerinde veya hücrelerinde pro enflamatuar genlerin (bunlarla sınırlı olmamakla birlikte örneğin It 1-  $\beta$ , IL4, IL5, IL6, IL8, IL12, IL13, IL17, IL21, IL22, IL23, IL27, IFN $\gamma$ , CCL2, CCL3, CCL5, CCL20, CXCL5, CXCL10, CXCL12, CXCL13, ve TNF-  $\alpha$  meydana gelen
- 35 gruptan seçilen bir veya daha fazla gen) bir veya daha

fazlasını ifade edilmesini düzenlemekte (örneğin aşağı regülasyon) kullanım için bir *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör

5 ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ile ilgilidir.

Bu buluş, diğer bir yönüyle, bir denekte bağırsak

10 mikrobiyotasını iyileştirmekte kullanım için bir *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir

15 konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ile ilgilidir.

Diğer bir yönüyle bu buluş, bir deneğin iştahını düzenlemekte kullanım için bir *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen

20 *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia*

25 *intestinalis* bakteri türleri gibi) ile ilgilidir.

Diğer bir yönüyle bu buluş, bir deneğin bir hücresinde veya hücrelerinde kolesitokinini (Cck) kodlayan genin ifadesini ve/ veya glukagonu (Gcg) kodlayan genin ifadesini düzenlemekte (örneğin aşağı regülasoyu) kullanım için bir *Roseburia*

30 flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri

türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ile ilgilidir.

Bu buluş, diğer bir yönüyle, bir denekte sindirim kanalının sağlığını iyileştirmekte kullanım için bir *Roseburia* flagellin

5 ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ile ilgilidir.

Bu buluş, *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir eksipiyan, taşıyıcı veya seyreltici içeren farmasötik bir bileşimle ilgilidir.

Bu buluş, diğer bir yönüyle *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve besinsel olarak kabul edilebilir bir eksipiyan, taşıyıcı veya seyreltici içeren besinsel bir bileşimle ilgilidir.

Diğer bir yönüyle bu buluş, *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia*

*intestinalis* bakteri türleri gibi) içeren bir hayvan yemi, gıda ürünü, besin desteği veya gıda katkı maddesi ile ilgilidir.

Bu buluş, bir başka yönüyle mevcut buluşa göre bir farmasötik  
5 bileşim üretmek için bir işleme ilişkindir, sözü edilen işlem, bir *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektör içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen  
10 polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) farmasötik olarak kabul edilebilir bir eksipiyan, taşıyıcı veya seyreltici ile karıştırılmasını içerir; isteğe bağlı olarak *Roseburia*  
15 flagellin ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisi ve/ veya bahsedilen vektör ve/ veya bahsedilen vektörü içeren bahsedilen konak hücre ve/ veya bahsedilen polinükleotit dizisini içeren bahsedilen konak hücre ve/ veya *Roseburia* (bakteriyel türler *Roseburia hominis* , veya bakteri türleri  
20 *Roseburia intestinalis*), kapsüllenir.

Bu buluş, bir başka yönüyle mevcut buluşa göre bir besin desteği üretmek için bir işleme ilişkindir, sözü edilen işlem, bir *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı  
25 geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektör içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) besinsel olarak  
30 kabul edilebilir bir eksipiyan, taşıyıcı veya seyreltici ile karıştırılmasını içerir; isteğe bağlı olarak *Roseburia* flagellin ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisi ve/ veya bahsedilen vektör ve/ veya bahsedilen vektörü içeren bahsedilen konak hücre ve/ veya bahsedilen polinükleotit  
35 dizisini içeren bahsedilen konak hücre ve/ veya *Roseburia*

(bakteriyel türler *Roseburia hominis* , veya bakteri türleri *Roseburia intestinalis*), kapsüllenir.

Bu buluş, bir başka yönüyle bir denekte bir dokunun veya bir organın (bağırsak gibi) enflamasyonunun modülasyonu ile

5 ilgilidir ve bir deneğe bir *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya  
10 *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia*'nın *intestinalis* bakteri türleri gibi) uygulanmasını içerir ve burada denekte doku veya organın (bağırsak gibi) enflamasyonu modüle edilir.

Bir başka yönüyle, bu buluş, bir denekte T hücrelerinin (ör. ,  
15 TLR5'i ifade edebilen regülatör T hücreleri gibi regülatör T hücreleri) üretimini modüle etmekle ilgilidir ve bir *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen  
20 vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri) uygulanmasını içerir ve burada denekteki T hücrelerinin üretimi (ör. , TLR5'i ifade  
25 edebilen regülatör T hücreleri gibi regülatör T hücreleri) modüle edilir.

Diğer bir yönüyle bu buluş, bir deneğin bağışıklık sistemini düzenlemekle ilgilidir ve *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi  
30 ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) uygulanmasını  
35 içerir ve burada deneğin bağışıklık sistemi düzenlenir.

Diğer bir yönüyle bu buluş, bir denekte bir bozukluğu tedavi etmeye yönelik bir yöntemde kullanım için bir *Roseburia* flagellin ile ilgilidir, söz konusu yöntem *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ile ilgilidir, burada söz konusu bozukluk enflamatuar bir bozukluk ve/ veya otoimmün bir bozukluktur.

Bu buluş, diğer bir yönüyle, bir denekte dendritik hücreleri (örneğin kemik iliği dendritik hücreleri) ve/ veya bir doku veya bir organdaki epitel hücreleri modüle etmekle ilgilidir ve bir *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) uygulanmasını içerir ve burada bir denekteki dendritik hücreler (örneğin kemik iliği dendritik hücreleri) ve/ veya epitel hücreler modüle edilir.

Diğer bir yönüyle bu buluş, bir deneğin bir hücresinde veya hücrelerinde IL- 10 ve/ veya TGFβ'nın üretiminin düzenlemesi ile ilgilidir ve bir deneğe bir *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) uygulanmasını içerir ve burada deneğin bir hücresinde veya hücrelerinde IL- 10 ve/ veya TGFβ'nın üretimi düzenlenir.

Diğer bir yönüyle bu buluş, bir deneğin bir hücrelerinde veya hücrelerinde CD40, I- A/I- E, CD317/BST- 2, CD103, CD80, CD86, CD83 ve/ veya Siglec- H ve/ veya eşdeğer türler gibi bağışıklık yanıtları ve antijen tanımada yer alan hücre yüzey markörlerinin üretiminin düzenlenmesi ile ilgilidir ve deneğe bir *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) uygulanmasını içerir ve burada deneğin bir hücrelerinde veya hücrelerinde CD40, I- A/I- E, CD317/BST- 2, CD103, CD80, CD86, CD83 ve/ veya Siglec- H ve/ veya eşdeğer türler gibi bağışıklık yanıtları ve antijen tanımada yer alan hücre yüzey markörlerinin üretimi düzenlenir.

Diğer bir yönüyle bu buluş, bir deneğin bir hücrelerinde veya hücrelerinde Tip I IFN genlerinin (bunlarla sınırlı olmamakla birlikte örneğin IFN-  $\beta$ 1, IFN-  $\beta$ 3, *Ifi202b*, *Ifi203*, *IFI44*, *IFTI*, *MXI*, *OASI*, *OAS2*, *OAS3*, *OASL*, *Irf3* ve *Irf4*'den meydana gelen gruptan seçilen bir veya daha fazla gen) bir veya daha fazlasını ifade edilmesinin düzenlenmesi (örneğin aşağı regülasyon) ile ilgilidir ve bir *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) uygulanmasını içerir ve burada deneğin bir hücrelerinde veya hücrelerinde Tip I IFN genlerinin (bunlarla sınırlı olmamakla birlikte örneğin IFN-  $\beta$ 1, IFN-  $\beta$ 3, *Ifi202b*, *Ifi203*, *IFI44*, *IFTI*, *MXI*, *OASI*, *OAS2*, *OAS3*, *OASL*, *Irf3* ve *Irf4*'den meydana

gelen gruptan seçilen bir veya daha fazla gen) bir veya daha fazlasını ifade edilmesi düzenlenir.

Diğer bir yönüyle bu buluş, bir deneğin bir hücrelerinde veya hücrelerinde pro enflamatuar genlerin (bunlarla sınırlı  
5 olmamakla birlikte örneğin It 1-  $\beta$ , IL4, IL5, IL6, IL8, IL12, IL13, IL17, IL21, IL22, IL23, IL27, IFN $\gamma$ , CCL2, CCL3, CCL5, CCL20, CXCL5, CXCL10, CXCL12, CXCL13, ve TNF-  $\alpha$  meydana gelen gruptan seçilen bir veya daha fazla gen) bir veya daha fazlasının ifade edilmesinin düzenlenmesi (örneğin aşağı  
10 regülasyon) ile ilgilidir ve bir *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre  
15 ve/ veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) uygulanmasını içerir ve burada deneğin bir hücrelerinde veya hücrelerinde pro enflamatuar genlerin (bunlarla sınırlı olmamakla birlikte örneğin It 1-  $\beta$ , IL4, IL5, IL6, IL8, IL12,  
20 IL13, IL17, IL21, IL22, IL23, IL27, IFN $\gamma$ , CCL2, CCL3, CCL5, CCL20, CXCL5, CXCL10, CXCL12, CXCL13, ve TNF-  $\alpha$  meydana gelen gruptan seçilen bir veya daha fazla gen) bir veya daha fazlasının ifade edilmesi düzenlenir.

Diğer bir yönüyle bu buluş, bir deneğin bağırsak  
25 mikrobiyatasını düzenlemekle ilgilidir ve *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir  
30 konak hücre ve/ veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) uygulanmasını içerir ve burada deneğin bağırsak mikrobiyatası düzenlenir.

Diğer bir yönüyle bu buluş, *Roseburia* flagellinin bir deneğin  
35 iştahını düzenlemekte kullanılması ile ilgilidir ve bir



Roseburia flagellin ve/ veya adı geçen Roseburia flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya Roseburia'nın (Roseburia hominis , bakteri türleri veya Roseburia intestinalis bakteri türleri gibi) uygulanmasını içerir ve burada deneğin iştahı düzenlenir.

Diğer bir yönüyle bu buluş, bir deneğin bir hücresinde veya hücrelerinde kolesitokinini (Cck) kodlayan genin ifadesini ve/ veya glukagonu (Gcg) kodlayan genin ifadesini düzenlemekte (örneğin aşağı regülasoyun) Roseburia flagellinin kullanılması ile ilgilidir ve bir Roseburia flagellin ve/ veya adı geçen Roseburia flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya Roseburia'nın (Roseburia hominis , bakteri türleri veya Roseburia intestinalis bakteri türleri gibi) uygulanmasını içerir ve burada deneğin bir hücresinde veya hücrelerinde kolesitokinini (Cck) kodlayan genin ifadesini ve/ veya glukagonu (Gcg) kodlayan genin ifadesi düzenlenir.

Diğer bir yönüyle bu buluş, bir deneğin sindirim kanalı sağlığını iyileştirmekle ilgilidir ve Roseburia flagellin ve/ veya adı geçen Roseburia flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya Roseburia'nın (Roseburia hominis , bakteri türleri veya Roseburia intestinalis bakteri türleri gibi) uygulanmasını içerir ve burada deneğin sindirim kanalı sağlığı iyileştirilir.

Bu buluş, bir denekte bir dokunun veya bir organın (bağırsak gibi) enflamasyonunu modüle etmek üzere bir ilacın üretimi için bir denekte bir dokunun veya bir organın (bağırsak gibi)

enflamasyonunu modüle etmekte bir *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) kullanımı ile ilgilidir. Ayrıca, *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri) bir denekte T hücrelerinin (ör. , TLR5'i ifade edebilen regülatör T hücreleri gibi regülatör T hücreleri) üretimini modüle etmek üzere bir ilacın üretimi için kullanılması da açıklanmaktadır. Diğer bir yönüyle bu buluş, *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) bir deneğin bağışıklık sisteminin düzenlenmesi için bir ilacın üretiminde kullanılması açıklanmaktadır.

Mevcut patent bildirimi ayrıca, bir *Roseburia* flagellin ve / veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) bir denekte bir bozukluğu tedavi etmek üzere bir ilacın üretiminde kullanılması ile ilgilidir, burada söz konusu bozukluk

enflamatuar bir bozukluk ve/ veya otoimmün bir bozukluktur. Mevcut patent bildirimi, ayrıca bir *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) bir denekte dendritik hücreleri (örneğin kemik iliği dendritik hücreleri) ve/ veya bir doku veya bir organdaki epitel hücreleri modüle etmek üzere bir ilacın üretiminde kullanılması ile ilgilidir. Mevcut patent bildirimi ayrıca, bir *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) bir deneğin bir hücresinde veya hücrelerinde IL- 10 ve/ veya TGF $\beta$ 'nın üretimini düzenlemek üzere bir ilacın kullanılması ile ilgilidir. Mevcut patent bildirimi, ayrıca bir *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) bir deneğin bir hücresinde veya hücrelerinde CD40, I- A/I- E, CD317/BST- 2, CD103, CD80, CD86, CD83 ve /veya Siglec- H ve/ veya eşdeğer türler gibi bağışıklık yanıtları ve antijen tanımada yer alan hücre yüzey markörlerinin üretimini düzenlemek üzere kullanılması ile ilgilidir. Burada, ayrıca bir *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı

geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) bir deneğin bir

5 hücrelerinde veya hücrelerinde Tip I IFN genlerinin (bunlarla sınırlı olmamakla birlikte örneğin IFN-  $\beta$ 1, IFN-  $\beta$ 3, *Ifi202b*, *Ifi203*, *IFI44*, *IFTI*, *MXI*, *OASI*, *OAS2*, *OAS3*, *OASL*, *Irf3* ve *Irf4*'den meydana gelen gruptan seçilen bir veya daha fazla gen) bir veya daha fazlasının ifade edilmesini düzenlemek

10 (örneğin aşağı regülasyon) üzere bir ilacın üretiminde kullanılması açıklanmaktadır. Mevcut patent bildirimi, ayrıca bir *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı

15 geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) bir deneğin bir hücrelerinde veya hücrelerinde pro enflamatuvar genlerin

20 (bunlarla sınırlı olmamakla birlikte örneğin It 1-  $\beta$ , IL4, IL5, IL6, IL8, IL12, IL13, IL17, IL21, IL22, IL23, IL27, IFN $\gamma$ , CCL2, CCL3, CCL5, CCL20, CXCL5, CXCL10, CXCL12, CXCL13, ve TNF-  $\alpha$  meydana gelen gruptan seçilen bir veya daha fazla gen) bir veya daha fazlasının ifade edilmesinin düzenlemesi için

25 (örneğin aşağı regülasyon) bir ilacın üretiminde kullanılması ile ilgilidir. Mevcut patent bildirimi, aynı zamanda bir *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen

30 vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) bir denekte bağırsak mikrobiyotasının iyileştirilmesi için bir ilacın

35 üretiminde kullanılması ile ilgilidir. Burada, ayrıca

Roseburia flagellin ve/ veya adı geçen Roseburia flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya Roseburia'nın (Roseburia hominis , bakteri türleri veya Roseburia intestinalis bakteri türleri gibi) bir deneğin iştahının düzenlenmesi için bir ilacın üretiminde kullanılması açıklanmaktadır. Mevcut buluş, ayrıca bir Roseburia flagellin ve/ veya adı geçen Roseburia flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya Roseburia'nın (Roseburia hominis , bakteri türleri veya Roseburia intestinalis bakteri türleri gibi) bir deneğin bir hücresinde veya hücrelerinde kolesitokinini (Cck) kodlayan genin ifadesini ve/ veya glukagonu (Gcg) kodlayan genin ifadesini düzenlemek için (örneğin aşağı regülasoyu) bir ilacın üretiminde kullanılması ile ilgilidir. Mevcut patent bildirimi, aynı zamanda bir Roseburia flagellin ve/ veya adı geçen Roseburia flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya Roseburia'nın (Roseburia hominis , bakteri türleri veya Roseburia intestinalis bakteri türleri gibi) bir denekte sindirim kanalı sağlığının iyileştirilmesi için bir ilacın üretiminde kullanılması ile ilgilidir. Burada, ayrıca tıpta kullanım için Roseburia flagellin ve/ veya adı geçen Roseburia flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya Roseburia'nın (Roseburia hominis , bakteri türleri veya

*Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) kullanılması açıklanmaktadır.

Diğer bir yönüyle, mevcut patent bildirimi, immünolojik toleransı yeniden kazandırmakta kullanım için bir *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ile ilgilidir.

Diğer bir yönüyle, mevcut patent bildirimi, bir *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) immünolojik toleransı yeniden kazandırmak için bir ilacın üretiminde kullanılması ile ilgilidir.

Diğer bir yönüyle mevcut patent bildirimi, bir deneğe immünolojik toleransı yeniden kazandırma yöntemi ile ilgilidir ve söz konusu yöntem *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) uygulanmasını içerir ve burada deneğin immünolojik toleransı yeniden kazandırılır.

## **Şekiller**

**Şekil 1. R. hominis genomun dizisi ve açıklaması.** R. hominis A2- 183'ün Tam genom dizisi üretilmiştir. Dört ribozomal operon, 66 RNA ve 3.273 tahmini protein içeren tek bir 3, 592, 125 bç kromozomu ile temsil edilir. (A) PCR deneylerinin yeri (Tablo S1) ile birlikte primerler tarafından hedeflenen bölgelerde gösterilen, R. hominis dairesel genom haritası. Genom haritasında, 0 numaralı dış hatla başlayan yollar şunlardır: Yol 0 (mavi) - Gerçek zamanlı PCR deneyleri numaralı tik işaretleriyle gösterilir; yol 1 (soluk mavi) - İleri CDS; yol 2 (soluk mavi) - Geri CDS; iz 3 (gri) - rRNA; yol 4 (yeşil) - tRNA; yol 5 (kırmızı) - Gerçek zamanlı PCR ile hedeflenen STS işaretleme bölgeleri; grafik 1 - GC içeriği; grafik 2 - GC yanlı. (B) R. hominis genomun fonksiyonel açıklaması, en çok sayıda genin karbonhidratlara, protein metabolizmasına ve amino asitlere ve türevlerine ait olduğunu gösterir.

**Şekil 2. R. hominis motilite, mobilizasyon ve kemotaksis genlerini yukarı regüle ederek bağırsak ortamına tepki verir.**

Mikropsuz GF C3H / HeN erkek farelere R. hominis kültürü, 28 günlük sürede gavaajla verilmiş ve mikropsuz kontrol hayvanlarıyla karşılaştırılmıştır. 14. Gün ve 28. günde, R. hominis ile muamele edilen (N = 5) ve kontrol hayvanları (N = 4) feda edilmiş ve ileum, kolon ve çekumda toplanmıştır. (A) Konjugasyon / mobilizasyon transferinde yer alan genlerin gerçek zamanlı PCR validasyonu (B) Motilite ve kemotaksiste yer alan genlerin gerçek zamanlı PCR validasyonu. (C) afinite ile saflaştırılmış Fla1 antikoru, Fla2 spesifik antiserum ve anti- DNA giraz A antikoru ile immüno- boyanmış, UV ışınlanmış standart murin yiyeceği varlığında *in vitro* büyütülmüş R. hominis Western blot (şerit 1: diyet yok, şerit 2: 0.01 g diyet / 10 mL R. hominis kültürü, şerit 3: 0.02 g diyet / 10 mL, şerit 4: 0.05 g diyet / 10 mL, şerit 5: 0.1 g diyet / 10 mL, şerit 6: 0.2 g diyet / 10 mL, şerit 7: 0.5 g diyet / 10 mL, şerit 8: 1 g diyet / 10 mL). Flagella sergileyen R. hominis'un elektron mikroskopisi (EM) resmi (siyah oklar).

FlaA1 ve FlaA2 spesifik antiserumu kullanılarak kolonize farelerin lümen içeriği ve *in vitro* büyütülen *R. hominis*'den gelen bakteriler üzerinde gerçekleştirilen immünohistokimya. Orijinal büyütme x1000. (D) Butirat metabolizmasına karışan genlerin gerçek zamanlı PCR doğrulamaları. (E) İnsan bağırsak epitel hücrelerine *in vitro* maruz kalma sırasında *R. hominis* transkriptlerinin gerçek zamanlı PCR analizi. Gerçek zamanlı PCR sonuçları, kat değişimi olarak sunulur, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

10 **Şekil 3. *R. hominis* ile tek bağlantının ardından fare bağırsağında farklı olarak ifade edilen transkriptlerin tanımlanması.** (A) Diferansiyel olarak ifade edilen genlerin GF'ye (N = 4) göre *R. hominis* kolonize farelerde (N = 5) afimetriks mikrodizilim anazili. Çubuk grafikler, 14 ve 28 gün sonra daha yüksek ve daha düşük ifade edilen genlerin sayısını temsil eder. (B) 14. Gün ve 28. günde GF ve *R. hominis* - arasında fonksiyonel önemi olan farklı olarak ifade edilen genlerden üretilen ısı haritası. (C) Genlerin, *R. hominis* kolonize ve GF fareler arasında önemli ölçüde farklılık gösteren gerçek- zamanlı PCR validasyonu. Gerçek zamanlı PCR sonuçları, kat değişimi olarak sunulur, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

**Şekil 4. FoxP3 + Treg hücrelerinin *Roseburia hominis* tarafından indüklenmesi.** *R. hominis* ile 14 gün boyunca tedavi edilen geleneksel C3H / HeN'nin lamina propriadaki FoxP3 + Treg hücrelerinin ( $P = 0.0425$ , kontrol ve *R. hominis* tedavisi arasında) ve mezenterik lenf düğümlerinin ( $P = 0.0683$ ) akış sitometri analizi.

**Şekil 5. Kolonik T hücre markörleri, *R. hominis* mono-kolonizasyonu tarafından önemli ölçüde indüklenir.** (A) Mikropsuz ve *R. hominis* mono kolonize C3H / HeN (N = 8) ve C57Bl / 6 (N = 3) farelerinde çıkan kolon lamina propria hücrelerinin anti- CD3 ve anti- FoxP3 ile immünfloresan analizi. (B) (i) anti- Ly6G, (ii) anti- CD11b, (iii) anti- CD3 ve (iv) anti- CD3 ve anti- FoxP3 ile etiketli lamina propriyum



hücrelerinin GF'nin çıkan kolonunda ve *R. hominis* - ile tedavi edilen C3H / HeN farelerinde immünfloresan analizi Veriler, GF farelerinde (N = 7- 8) ve *R. hominis* ile tedavi edilen farelerde (N = 8- 10) görüş alanı başına pozitif hücre sayısı olarak ifade edilmiştir. \* $P < 0.05$ . Orijinal büyütme x630.

**Şekil 6. *R. hominis* flagellin RH1 bağırsak epitel hücreleri ve murin kemik iliği kaynaklı dendritik hücreler üzerinde spesifik etkilere sahiptir.** (A) Farklı bakteriyel flagellinler

10 *Salmonella enteritidis* (SE), *E. coli* K12 (EC), RH1 ve RH2 ile tedavi edilen Caco- 2 bağırsak epitel hücrelerinde (N = 1) farklı olarak ifade edilen genlerden üretilen ısı haritası.

(B) (i) CD40, (ii) IA / IE ve (iii) CD103'ün geleneksel C3H / HeN'den, kontrol (mavi), gelen CD11c + B220 + CD317 +

15 Flt3L'den türeyen dendritik hücreler tarafından ve rekombinant flagellin (SE, K12, RH1, RH2; yeşil) ile 24 saat inkübasyondan sonra ifadesi akış sitometresi ile belirlenmiştir. Histogram, üç denemeden elde edilen verileri göstermektedir. Sırasıyla CD11c + B220 + CD317 + hücreler ve CD11c + CD11b + B220

20 hücreleri üzerinde kapatılan geleneksel C3H / HeN'den gelen rekombinant flagellin (SE, K12, RH1, RH2) ile tedavi edilen Flt3L- ve GM-CSF- türevi dendritik hücre popülasyonlarının frekansları. Toplam, canlı ve tekli hücrelerin yüzdesi olarak verilen veriler, ortalama  $\pm$  SEM üç deneyden elde edilmiştir.

25 (D) Sitokin IL- 10 ve IL- 12'nin protein ifadesi, kontrolden (uyarılmayan DC'ler; N = 3) ve C3H / HeN ve C57Bl / 6'dan türetilen RH- 1 ile tedavi edilen DC'lerden (N=3) gelen üst fazlarda CBA ile ölçülmüştür. Veriler ortalama  $\pm$  SS olarak sunulmuştur. \*\*\* $P < 0.001$ . (E) Mikropsuz ve *R. hominis* mono

30 kolonize TLR5KO farelerinde (N = 2) farelerinde çıkan kolon lamina propria hücrelerinin anti- CD3 ve anti- FoxP3 ile immünfloresan etiketlemesinin kantitatif analizi.

**Şekil 7. *R. hominis* deneysel bir kolit modelinde iltihaplanmayı hafifletir.** Yirmi iki dişi C57BL / 6 faresi,

35 DSS kaynaklı kolit sırasında *R. hominis*'in terapötik etkisini

değerlendirmek için kullanılmıştır. Tedavi edilmiş farelere 14 gün boyunca günde  $10^9$  CFU dozluk *R. hominis* verilmiştir.8. Günden itibaren, farelere içme suyunda 6 gün DSS verilmiştir. Hayvanlara 14. günde ötenazi uygulanmış ve bağırsak dokusu 5 örnekleme yapılmıştır. (A) Tedavi edilmemiş DSS fareleri (N = 8), kontrol farelerine kıyasla tüm genlerin kuvvetli yükselmesine (N = 4) sahipken, *R. hominis* ile tedavi edilen farelerde (N = 10) diferansiyel gen ifadesi daha düşük olmuştur. Gerçek zamanlı PCR sonuçları, kat değişikliği, 10 olarak sunulmuştur, \*\*\*  $P < 0.001$ . (B) Histopatoloji doku skorlaması, belirli bir derecedeki görüş alanlarının ortalama yüzdesi olarak sunulmuştur. DSS tedavisi, 0, 2, 3 ve 4. derecelerdeki tüm görüş alanlarını önemli ölçüde değiştirmiştir. *R. hominis* 4. derece patoloji için görüş 15 alanları yüzdesini önemli ölçüde azaltmış ( $p = 0.02$ ) ve 0. derece için görüş alanları yüzdesini arttırmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  SS olarak sunulmuştur. (C) Kontrolün çıkan kolonu (hematoksilen / eozin boyalı), DSS ile tedavi edilen ve DSS /*R. hominis* ile tedavi edilen IL- 10KO hayvanları. Gösterilen 20 resimler, her tedavi grubundan temsili alanlardır. Orijinal büyütme x100.

### Yardımcı Şekiller

**Şekil S1. *R. hominis* tercihan mono- kolonize farelerin çıkan** 25 **kolonunu kolonileştirir.** (A) Fare bağırsağının çıkan kolonunu bakterilerin konak epiteline yakın ilişkisi ile kolonize eden *R. hominis* , A2- 183 ( *R. hominis* spesifik prob; FITC), Eub338 (evrensel 16S probu, Cy3) ve DAPI (çekirdekler; mavi) kullanılarak FISH ile tespit edilmiştir. A2- 183 + Eub338 ve 30 Eub338 + DAPI'nın örtüşmeleri de gösterilmiştir. Kırmızı kanal için olan gama, etiketlenmiş bakterileri göstermek için Eub338 + DAPI örtüşmesinde artmıştır. Orijinal büyütme x630. (B) *R. hominis*'e özgü primerler kullanılarak yapılan PCR, kolonizasyon sonrası fekal DNA'da güçlü bir pozitif sinyal 35 göstermiştir, diğer taraftan GF hayvanlarının dışkıları ise

herhangi bir bakteri varlığı açısından negatiftir. (C) *R. hominis* / g dışkılarının Kolonizasyon seviyelerini gösteren gerçek zamanlı PCR analizi. Dışkılardan izole edilen bakteriyel DNA, kültürde yetişen *R. hominis*'in bilinen standart konsantrasyonları ile karşılaştırılmıştır. Tüm monokolonize farelerde yaklaşık  $1 \times 10^{10}$  bakteri / g dışkı'ya yaklaşan benzer bakteri seviyeleri tespit edilmiştir. GF hayvanlarının dışkıları, herhangi bir bakteri varlığı açısından negatif olarak test edilmiştir.

10 **Şekil S2. Gen Ontolojisi analizi, çıkan kolondaki 28. günde yukarı regüle edilen genler üzerinde gerçekleştirilmiştir.** Verilerin Gen Ontolojisi (GO) tabanlı işlevsel yorumu, DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Anlamlı olarak farklı transkriptler ( $P < 0.05$ ), önemli ölçüde zenginleştirilmiş GO terimlerini bulmak için 'Biyolojik Süreç' GO kategorisi içinde tahsis edilmiştir. 'Aktin polimerizasyonu' için GO biyolojik işlemleri (GO: 0030041) ve 'I- kappaB kinaz / NF- kappaB kaskadının negatif düzenlenmesi' (GO: 0043124) etki hale getirilmiştir.

20 **Şekil S3. *E. coli* ile tek bağlantının ardından fare bağırsağında farklı olarak ifade edilen transkriptlerin tanımlanması.** (A) Diferansiyel olarak ifade edilen genlerin *E. coli* ve *R. hominis* kolonize farelerde afimetriks mikrodizilim anazili. Çubuk grafikler, sırasıyla, 22 ve 28 gün sonra daha yüksek ve daha düşük ifade edilen genlerin sayısını temsil eder. (B) 10. Güne karşı 22. günde *E. coli* kolonize farelerde fonksiyonel önemi olan farklı olarak ifade edilen genlerden üretilen ısı haritası.

30 **Şekil S4. *R. hominis* ile tek bağlantının ardından TLR5KO fare bağırsağında farklı olarak ifade edilen transkriptlerin tanımlanması.** (A) 28. Günde *R. hominis* kolonize TLR5KO ( $N = 3$ ) ve vahşi tip farelerin ( $N = 3$ ) çıkan kolonunda farklı olarak ifade edilen genlerden üretilen ısı haritası. (B) 28. Günde *R. hominis* kolonize TLR5KO ve vahşi tip farelerin çıkan kolonunda farklı olarak ifade edilen immün ilişkili genlerden üretilen

ısı haritası. (C) 28. Günde R. hominis kolonize TLR5KO ve vahşi tip farelerin ileumunda farklı olarak ifade edilen genlerden üretilen ısı haritası. (D) 28. Günde R. hominis kolonize TLR5KO ve vahşi tip farelerin ileumunda farklı olarak ifade edilen immün ilişkili genlerden üretilen ısı haritası.

**Şekil S5. Gen Ontolojisi analizi, çıkan kolondaki 28. günde aşağı regüle edilen genler üzerinde gerçekleştirilmiştir.**

'gıdaya karşı yanıtın negatif düzenlenmesi' (GO: 0032096), 'iştahın negatif düzenlenmesi' (GO: 0032099) ve 'katekolamin salınımının düzenlenmesi' (GO: 0050433) gibi iştah düzenlemesinde yer alan GO biyolojik süreçler çoğunlukla etkilenmiştir.

**Şekil S6. R. hominis kolonizasyonu tokluk genlerini ve vücut ağırlığını etkiler.** Kuru vücut ağırlığı ve lipid karkas

analizi yapılmıştır. (A) R. hominis ilişkili farelerin kuru karkas ağırlıkları GF hayvanlarına kıyasla belirgin şekilde fazladır. (B) 14. Günde karkas lipid analizi, toplam adipozitenin aynı zamanda R. hominis ile tedavi edilen hayvanlarda önemli ölçüde yüksek olduğunu göstermiştir.

Veriler ortalama  $\pm$  SS olarak sunulmuştur.

Şekil 1A, Hücre lizisinden sonra çözünmeyen rekombinant flagellinlerin klonlanması için kullanılan klonlama vektörü pCR- Blunt II- TOPO'nun temsili. Bu, kör uçlu PCR ürünlerinin yüksek verimli DNA klonlamasına izin verir. E. coli'de seçim için Kanamisin ve Zeosin direnç genlerini kodlar ve ek eksizyon için çoklu kısıtlama bölgeleri ile çevrelenir.

Şekil 2A, Hücre lizisinden sonra çözünmeyen rekombinant flagellinlerin klonlanması için kullanılan ifade vektörü T7-MAT- Tag- FLAG'ın temsili. Çoklu klonlama sahası (MCS), daha sonra afinite kolonu saflaştırması ile de saflaştırılabilecek çift etiketli flagellinin üretilmesi ile sonuçlanan MAT (Metal Affinite Etiketli) dizisi ve FLAG peptidi (Asp- Tyr- Lys- Asp- Asy- Asy- Asy- Asy- Lys) dizisi tarafından çevrelenir. Bu ifade vektörü ayrıca, herhangi bir E. coli konağında bazal halde transkripsiyonu baskılayan bir dahili lacI geni olan

MAT- ORF- FLAG rekombinant flagellinlerin IPTG ile indüklenebilir, yüksek seviyede ifadesi için bir pT7 / lac (faj T7 lac operon) promotörünü, ve ampisilin seçimi için bir AmpR genini kodlar.

5 Şekil 3A, pCR- Blunt II- TOPO klonlama vektörü ile klonlanmış ve pT7- MAT- Tag- FLAG- 2 ifade vektörü ile ifade edilen rekombinant flagellinin bir SDS- PAGE'sinde görselleştirilmesi. Şeritlerin tanımı: **1**, protein standardı (kDa); **2**, RH1.

10 Şekil B1A ve B1 B rekombinant flagellinlerin bir SDS- Analizini göstermektedir.

(A) K12 (*Escherichia coli* K12); *EREupacterium rectale* 33.656); RI1 (*Roseburia intestinalis* Fla 1); RI2 (*Roseburia intestinalis* Fla 2);

15 (B) RH1 (*Roseburia hominis* Fla 1); RH2 (*Roseburia hominis* Fla 2); RI3 (*Roseburia intestinalis* Fla 3); RI4 (*Roseburia intestinalis* Fla 4).

Şekil C1- C4. Flagellin nükleotit dizisi ve erişim numarasını teyit eden çoklu dizi hizalaması.

20 Şekil D.2, Farklı flagellinlerle CCL20 gen indüksiyonunun karşılaştırmalı analizi. HT- 29 ve Caco- 2 hücreleri, 100 ng / mL'lik bir konsantrasyonda tek bir rekombinant flagellin ile 2 saat boyunca uyarılmıştır. Toplam RNA ekstrakte edilmiş ve gen CCL20 ve  $\beta$ - aktin için gerçek zamanlı kantitatif PCR analizine  
25 tabi tutulmuştur. Denemeler, üç ayrı olayda üçer defa yapılmıştır. Tablo D2, HT- 29'da bağımlı t testi ile hesaplanan her bir tedavi arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir.

Şekil D.3, HT- 29 ve Caco- 2 hücrelerinde bulunan flagellin aracılı kemokin salgılaması. Tablolar D3a, D3b, D3c ve D3d, bağımsız t testiyle hesaplanan her bir muamele arasında önemli farklılıkları gösterir.

Şekil D4, TLR5'in bir anti- TLR5 spesifik antikor ile nötrleştirilmesi.

Şekil D5A: Rekombinant flagellinler ile uyarılan GM- CSF / IL- 4 türevi dendritik hücrelerin frekansı, veriler, uyarılmamış GM- CSF / IL- 4 türevi dendritik hücrelere kıyasla kat değişikliği olarak gösterilmektedir.

5 Şekil D5B: Flt3L'den türetilen, rekombinant flagellinler ile uyarılmış dendritik hücrelerin frekansı, veriler, uyarılmamış Flt3L'den türetilen dendritik hücrelere kıyasla katlı değişim olarak gösterilmektedir.

Şekil D 6 A ve B, R. hominis ile tedavi edilen BOY / J WT ve  
10 TLR5KO farelerinin lamina propriasındaki FoxP3 + Treg'lerin Flow sitometri analizi

### **Detaylı Açıklama**

#### **Flagellin**

15

Flagellin, bakteri flagellumunun başlıca ikamesidir ve neredeyse tüm flagellatlı bakterilerde büyük miktarda bulunur. Tipik olarak, flagellinler, bakteri flagellumunda filaman oluşturmak için içi boş bir silindire yerleştirilen globüler  
20 proteinlerdir.

Flagellin yapısal proteinleri ve gen dizilerinin çeşitliliği iyi bilinir ve bakteriyel türe, coğrafi ve klinik ve çevresel kökene göre değişir. Binlerce flagellin ve ilgili flagellin geni vardır. Bağırsak bakterilerindeki önemli bazıları  
25 arasında FLA, FliC, FlgC, FLiE, FlaB, MoA ve FliG flagellinleri bulunur.

Birkaç çeşit FLA (Fla) polipeptidi vardır. FlaA1, FlaA2, FlaA3, FlaA4 ve FlaB, FLA polipeptitlerine örnektir.

#### **30 Polipeptit FlaA1**

Burada kullanıldığı şekliyle "polipeptit FlaA1" terimi, flagellin proteini FlaA1'e karşılık gelir. Bu tür polipeptitlerin örnekleri, FlaA1 polipeptidi *Roseburia hominis*,  
35 *Roseburia cecicola*, *Roseburia faecis*, *Roseburia intestinalis*, ve *Roseburia inulinivorans*; SEQ ID NO: 2 veya

SEQ ID NO: 6 olarak gösterilen polipeptit dizisi; SEQ ID NO: 2 veya SEQ ID NO: 6 veya bunların varyantları, homologları, fragmanları veya türevleri ile en az % 75, % 80, % 85, % 90, % 95, % 97, % 98 veya % 99 özdeşliğe sahip polipeptitleri içerir.

SEQ ID NO: 2 aşağıdaki diziye sahiptir:

```
MVVQHNLTA MNANRQLGIT TGAQAKSSEKLSSGYKINRAADDAAGLTISEKMRSQV
RGLNKASDNAQDGVSLIQVAEGALSETHSILQRMNELATQAANDTNTTSDRTAVQQ
EINQLASEITRIASTTQFNTMNLIDGNFTSKKLQVGS LCGQAITIDISDMSATGLGVSG
LVVSSFSAA GKAMSA AQDAISYVSSMR SKLGALQNRLEHTISHLDNISEHTSSAESRI
RDTDMAEEMVEYSKNNILAQA GQSM LAQANQSTQGVLSLLQ
```

SEQ ID NO: 2, ABI8297.1 erişim numarası altında NCBI ile saklanır.

Burada kullanılan "polipeptit FlaA1" ve "FlaA1 polipeptidi" terimleri birbirinin yerine kullanılabilir.

Burada "FlaA1", "Fla1" ve "RH1" terimleri birbirlerinin yerine kullanılabilir.

Bir düzenlemede FlaA1 polipeptidi, SEQ ID NO: 2 veya bunun varyantları, homologları, fragmanları veya türevleri ile en az % 75, % 80, % 85, % 90, % 95, % 97, % 98 veya % 99 özdeşliğe sahiptir. Bir yönde, SEQ ID NO: 2'nin (veya bunun eşdeğeri) 79 ila 117 pozisyonlarındaki amino asitler ile 408 ila 439 pozisyonlarının yanı sıra 411, 412, 420 amino asitleri önemlidir. Bir yönde, SEQ ID NO: 2'nin (veya bunun eşdeğeri) 411, 412, 420 pozisyonlarındaki amino asitler sırasıyla alanin (A), glutamin (Q) ve serin (S) 'dir.

Bir düzenlemede polipeptit FlaA1, SEQ ID NO: 2 veya SEQ ID NO: 6 olarak gösterilen polipeptittir.

FlaA1 polipeptitleri bazı mikroorganizmalardan türetilebilir. Bir yönde, FlaA1 polipeptidi bir Firmicute gibi bir bakteriden türetilir. Bir başka yönde, FlaA1 polipeptidi, *Roseburia hominis*, *Roseburia cecicola*, *Roseburia faecis*, *Roseburia intestinalis*, veya *Roseburia inulinivorans* gibi bir *Roseburia spp*'den türetilir.

*Roseburia hominis* ve *Roseburia intestinalis* yakın tarihte Firmicutes filumundaki XIVA filogenetik kümesinin komünal bağırsak anaerobları olarak açıklanmıştır, insan bağırsağındaki baskın bir bakteri grubuna aittir ve ayrıca önemli bütirat üreticileridir. *Roseburia hominis*'in bir örneği 21 Ekim 2004 tarihinde NCIMB Ltd, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, UK, AB21 9YA'da bulunan Ulusal Endüstriyel, Gıda ve Deniz Bakterileri Koleksiyonunda (NCIMB) Budapeşte Anlaşması koşulları altında Rowett Araştırma Enstitüsü tarafından NCIMB 14029 <sup>T</sup>*Roseburia hominis* A2- 183<sup>T</sup> (DSM = 16839<sup>T</sup>) kayıt numarası altında saklanan suştur. Başka bir örnek bakteri türü *Roseburia hominis*'dir, Duncan, S. H. , Aminov, R. , Scott, K. P. , Louis, P. , Stanton, T. B, & Flint, H. J. (2006) Int. J. Syst. Evol Microbiol 56: 2437- 2441. *Roseburia intestinalis*'in bir örneği erişim numarası NCIMB 13810 *Rosburia intestinalis* L1- 82<sup>T</sup> (DSM = 14610 <sup>T</sup>) altında saklanan suştur. Başka bir örnek bakteri türü *Roseburia hominis*'tir Duncan, S. H. , Aminov, R. , Scott, K. P. , Louis, P. , Stanton, T. B, & Flint, H. J. (2006) Int. J. Syst. Evol Microbiol 56: 2437- 2441.

Burada kullanıldığı şekliyle "FlaA1 polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi" terimi, flagellin proteini FlaA1'i kodlayan bir polinükleotit dizisine karşılık gelir. Bu tür polinükleotit dizilerinin örnekleri *R. hominis* , *Roseburia cecicola*, *Roseburia faecis*, *Roseburia intestinalis*, veya *Roseburia inulinivorans*'ın FlaA1 genini; SEQ ID NO: 1 veya SEQ ID NO: 5 olarak gösterilen polinükleotit dizisini; SEQ ID NO: 2 veya SEQ ID NO: 6 olarak gösterilen polipeptidi kodlayan polinükleotit dizilerini; SEQ ID NO: 1 veya SEQ ID NO: 5 veya bunların homologları, varyantları, fragmanları veya türevleri ile en az % 75, % 80, % 85, % 90, % 95, % 97, % 98 veya % 99 dizi özdeşliğine sahip polinükleotit dizilerini; ve SEQ ID NO: 2 veya SEQ ID NO: 6 olarak gösterilen polipeptit dizilerini kodlayan veya SEQ ID NO: 2 veya SEQ ID NO: 6 olarak gösterilen polipeptit veya bunun homologları, varyantları, fragmanları





bölgesi, SEQ ID NO: 2'nin (N- D1 bölgesi) 79- 117 amino asitleri ve SEQ ID NO: 2'nin (C- D1 bölgesi) 408- 439 amino asitleridir. Teori ile sınırlanmak istememekle birlikte amino asit: A411, Q412, S420 önemli amino asitlerdir.

- 5 Kesilmiş FlaA1 polipeptitlerinin örnekleri şunları içerir: SEQ ID NO: 2'nin 79- 117 amino asitleri ve 408- 439 amino asitlerini içeren polipeptitler; SEQ ID NO: 2'nin 79- 117 amino asitleri ve 408- 439 amino asitleri ile en az % 75, % 80, % 85, % 90, % 95, % 97, % 98 veya % 99 özdeşliğe sahip
- 10 polipeptitler; SEQ ID NO: 2'nin 79- 117 amino asitleri ve 408- 439 amino asitleri ile en az % 75, % 80, % 85, % 90, % 95, % 97, % 98 veya % 99 özdeşliğe sahip polipeptitler, burada 411 konumundaki amino asit (veya bunun eşdeğeri) alanindir (A) ve/ veya 214 konumundaki amino asit glutamindir (Q) ve/ veya 420
- 15 konumundaki amino asit serindir (S); SEQ ID NO: 2'nin 79- 439 amino asitlerini içeren polipeptitler; SEQ ID NO: 2'nin 79- 439 amino asitlerini içeren polipeptitler, burada burada 411 konumundaki amino asit (veya bunun eşdeğeri) alanindir (A); SEQ ID NO: 2'nin 79- 439 amino asitleri ile en az % 75, % 80, %
- 20 85, % 90, % 95, % 97, % 98 veya % 99 özdeşliğe sahip polipeptitler ve SEQ ID NO: 2'nin 79- 439 amino asitleri ile en az % 75, % 80, % 85, % 90, % 95, % 97, % 98 veya % 99 özdeşliğe sahip polipeptitler, burada 411 konumundaki amino asit (veya bunun eşdeğeri) alanindir (A) ve/ veya 214
- 25 konumundaki amino asit glutamindir (Q) ve/ veya 420 konumundaki amion asit serindir (S).

Bir yönde, kesik bir FlaA1 polipeptidinde SEQ ID NO: 2'nin (veya bunun eşdeğeri) 411, 412, 420 pozisyonlarındaki amino asitler sırasıyla alanin (A), glutamin (Q) ve serin (S) 'dir.

- 30 Bir düzenlemede FlaA1 polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi kesilmiş bir FlaA1 polipeptidini kodlar.

Bir düzenlemede FlaA1 polipeptidi kesilmiş bir füzyon polipeptididir. Örneğin polipeptit glutatyon S- transferaz (GST) ile kaynaştırılır.

### **Roseburia cinsi**

*Roseburia* bakterileri, hafifçe kavisli çubuk şeklindeki hücreler olup, bunlar anaerobik ve memeli bağırsağına özgüdür. Bakteriler, bütirat üretirler ve içbükey kenar boyunca bulunan çok sayıda flagella boyunca ve bir uçta bir kümede aktif olarak hareketlidirler (Stanton ve Savage 1983). Şu anda, *Roseburia cinsi* içinde, beş tür tanımlanmış ve karakterize edilmiştir: *Roseburia cecicola*, *Roseburia faecis*, *Roseburia hominis*, *Roseburia intestinalis* ve *Roseburia inulinivorans* (Stanton ve Savage 1983, Duncan vd 2006).

Stanton ve Savage (1983 - *Roseburia cecicola* gen. nov. , sp. nov. , a motile, obligately anaerobic bacterium from a mouse cecum. Int. J. Syst. Bacteriol, 1983, 33, 618- 627. ) tanımlamak *Roseburia cecicola*.

Duncan ve diğerleri (2006 - *Roseburia faecis* sp. nov. , *Roseburia hominis* sp. nov. and *Roseburia inulinivorans* sp. nov. , based on isolates from human faeces. Int. J. Syst. Evol Microbiol, 2006, 56, 2437- 2441) *Roseburia* dışkısını tanımlar.

Duncan ve diğerleri (2006 - *Roseburia faecis* sp. nov. , *Roseburia hominis* sp. nov. and *Roseburia inulinivorans* sp. nov. , based on isolates from human faeces. Int. J. Syst. Evol Microbiol, 2006, 56, 2437- 2441) *Roseburia hominis*'i tanımlar.

Duncan ve diğerleri (2002 - *Roseburia intestinalis* sp. Nov. , a novel saccharolytic, butyrate- producing bacterium from human faeces. Int. J. Syst. Evol Microbiol, 2002, 52, 1615- 1620) *Roseburia intestinalis*'i tanımlar.

Duncan ve diğerleri (2006 - *Roseburia faecis* sp. nov. , *Roseburia hominis* sp. nov. and *Roseburia inulinivorans* sp. nov. , based on isolates from human faeces. Int. J. Syst. Evol Microbiol, 2006, 56, 2437- 2441) *Roseburia inulinivorans*'i tanımlar.

### **Roseburia flagellin**

Burada kullanıldığı üzere "*Roseburia flagellin*" terimi, *Roseburia. hominis* , *Roseburia cecicola*, *Roseburia faecis*,

*Roseburia intestinalis*, ve *Roseburia inulinivorans* gibi bir *Roseburia* bacterisinden türetilmiş olan veya türetilbilecek bir flagellin proteinini ifade eder.

*Roseburia* flagellin, flaA1, flaA2, flaA3, flaA4 veya bunların

5 kombinasyonları olabilir.

Burada "FlaA1", "FlaB1", "flaA1" ve "fla1" terimleri birbirinin yerine kullanılabilir.

Burada "FlaA2", "Fla2", "flaA2" ve "fla2" terimleri birbirinin yerine kullanılabilir.

10 Burada Fla terimi, flaA1, flaA2, flaA3, flaA4 veya fliC olabilen polipeptitleri kapsamak için kullanılır.

Bir düzenlemede mevcut buluş, en az bir *Roseburia* flagellin kullanılmasını içerir. Örneğin mevcut buluş, en az iki, en az üç, en az dört veya en az beş *Roseburia* flagellin

15 kombinasyonunun kullanılmasını kapsar.

Bazı düzenlemelerde, *Roseburia* flagellinler en azından iki, üç, dört ya da beş farklıdan *Roseburia* türünden türetilmiş ya da türetilbilir flagellinler içerir.

*Roseburia* flagellinlerin örnekleri *Roseburia hominis* ,

20 *Roseburia cecicola*, *Roseburia faecis*, *Roseburia intestinalis*, ve *Roseburia inulinivorans* gibi *Roseburia* bakterilerini içerir. Bir düzenlemede flagellin, *Roseburia hominis*'den türetilmiştir veya türetilbilir. Başka bir düzenlemede flagellin, *Roseburia intestinalis*'den türetilmiştir veya  
25 türetilbilir.

*Roseburia* flagellinlerin örnekleri SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 veya SEQ ID NO: 12 veya bunların varyantları, homologları, fragmanları veya türevleri ile en az % 75, % 80, % 85, % 90, % 95, % 97, % 98

30 veya % 99 özdeşliğe sahip olan polipeptit dizilerini içerir.

Bir düzenlemede, *Roseburia* flagellin, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 veya SEQ ID NO: 12 olarak gösterilen polipeptit dizisine sahiptir.

*Roseburia hominis* flagellinlerin örnekleri *Roseburia hominis*

35 Fla1 ve Fla2'dir.

*Roseburia hominis* Fla1'in bir örneği SEQ ID NO: 2 olarak gösterilir. *Roseburia hominis* Fla1 ayrıca burada, RhFlaA1, RHFlaA1, RhFla1, RHFla1, RH1 veya Rh1 olarak da anılacaktır.

SEQ ID NO: 2 aşağıdaki diziye sahiptir:

```
MVVQHNLTAMNANRQLGITTGAQAKSSEKLSSGYKINRAADDAAGLTISEKMRSQVRGLNK
ASDNAQDGVSLIQVAEGALSETHSILQRMNELATQAANDTNTTSDRTAVQQEINQLASEITRI
ASTTQFNTMNLIDGNFTSKKLQVGSLSGQAITIDISMSATGLGVSGLVVSSFSAAGKAMSA
AQDAISYVSSMRSKLGALQNRLEHTISHLDNISEHTSSAESRIRDTDMAEEMVEYSKNNILAQ
AGQSMLAQANQSTQGVLSLLQ
```

SEQ ID NO: 2, ABI48297.1 erişim numarası altında NCBI ile saklanır.

*Roseburia hominis* Fla2'in bir örneği SEQ ID NO: 4 olarak gösterilir. *Roseburia hominis* Fla2'ye ayrıca burada RhFla22, RHFlaA2, RhFla2, RHFla2, Rh2 veya RH2 adı verilir.

SEQ ID NO: 4 aşağıdaki diziye sahiptir:

```
MVVNHNMAAICESRQLRYNVKKMEKSSKKLATGYKLNTANDDAAGLQISETMRHHVKGLNK
ASRNSQDGSMLQTADAALQETQDVLDRMVELTTQAANDINTDSDRRAIQDELDQLNKEVD
RIAYTTHFNQQYMLAEGTPQAAPGYRIQSGALNGQAIDHFVNASKESLGTKVNVSSHAK
ASESITMVQDAIEQAALWRDEFGSQQERLEHA VRNTDNTSQNTQSAESGIRDTNMNMEMV
LYSTNRILVHASQSILAQYNDDAKSVLEILK
```

*Roseburia intestinalis* flagellinlerin örnekleri *Roseburia intestinalis* Fla1, Fla2, Fla3 ve Fla4'ü içerir.

*Roseburia intestinalis* Fla1'in bir örneği, SEQ ID NO: 6 olarak gösterilir. *Roseburia intestinalis* burada ayrıca RiFlaA1, RIFlaA1, RiFla1, RIFla1, Ri1 veya Ri1 olarak adlandırılır.

SEQ ID NO: 6 aşağıdaki diziye sahiptir:

```
MMNHNMAAICESRQLRYNVKKMEKSSKKLATGYKLNTANDDAAGLQISETMRHHVKGLNK
ASRNSQDGSMLQTADAALQETQDVLDRMVELTTQAANDINTDSDRRAIQDELDQLNKEVD
RIAYTTHFNQQYMLAEGTPQAAPGYRIQSGALNGQAIDHFVNASKESLGTKVNVSSHAK
ASESITMVQDAIEQAALWRDEFGSQQERLEHA VRNTDNTSQNTQSAESGIRDTNMNMEMV
LYSTNRILVHASQSILAQYNDDAKSVLEILK
```

*Roseburia infestinalis* Fla2'nin bir örneği, SEQ ID NO: 8 olarak gösterilir. *Roseburia intestinalis* Fla2'ye burada ayrıca RiFlaA2 veya RIFlaA2 veya Ri2 veya RI2 adı verilir.

SEQ ID NO: 8 aşağıdaki diziye sahiptir:

MVVNHNMALICESRQLRCNVKNMEKSSKKLATGYKLLGANDDAAGLQISETMRHQTRGLN  
 KASRNSQDGISMLQTADAALQETQEVLDGMTDLTTQAANDINTDADRRAIQDEIDQLNQEVD  
 RIAYTTNFNQQYILADGTPQARPGYYMIQTGSLAGQGIEIKFVNASKESLGVDKVDVSSHAK  
 ATESIAVVQNAIEKAASFRTFGAQQERLEHALRGTDNTSESTQRAESSRRDTNMNMMEV  
 QYSTNRILVQASQSILAQYNDDAKYVLEMLKQVLQILQ

*Roseburia intestinalis* Fla3'in bir örneği, SEQ ID NO: 10 olarak gösterilir. *Roseburia intestinalis* Fla3 ayrıca burada RiFla3 veya RIFla3 veya Ri3 veya RI3 olarak anılacaktır.

SEQ ID NO: 10 aşağıdaki diziye sahiptir:

MVVQHNMTAMNANRMLGVTTSAQAKSSEKLSSGYRINRAGDDAAGLTISEKMRSQIRGLN  
 KASDNAQDGLISLIQVAEGALSETHSILQRMNELATQAANDTNTTADRGAIQDEINQLTSEINRI  
 SSTTQFNTQNLIDGTGFANKNLQVGSICGQRITVSIDSMSAGSLNVSANLVKVNTFSAAGEAM  
 SNIQGAISAISTQRSYLGALQNRLEHTISNLDNISENTQSAESRIRDTDMAEEMVTYSKNNILA  
 QAGQSM LAQANQSTQGVLSLLQ

*Roseburia intestinalis* Fla4'in bir örneği, SEQ ID NO: 12 olarak gösterilir. *Roseburia intestinalis* Fla4 ayrıca burada RiFla4 veya RIFla4 veya Ri4 veya RI4 olarak da anılır.

SEQ ID NO: 12 aşağıdaki diziye sahiptir:

[illegible]

"Polipeptit FlaA1", "FlaA1 polipeptidi", "polipeptit Fla1" ve "Fla1 polipeptidi" terimleri burada birbirinin yerine kullanılır. "Polipeptit Fla2" ve "Fla2 polipeptidi" terimleri burada birbirinin yerine kullanılmaktadır. "Polipeptit Fla3" ve "Fla3 polipeptit" terimleri burada birbirinin yerine kullanılır. "Polipeptit Fla4" ve "Fla4 polipeptit" terimleri burada birbirinin yerine kullanılır.

Bir açıdan, *Roseburia* flagellin, Fla1, Fla2, Fla3 ve Fla4'ten oluşan gruptan seçilir. Bir düzenlemede, *Roseburia* flagellin, Fla2, Fla1, Fla4 ve bunların kombinasyonlarından oluşan

gruptan seçilir. Bir başka düzenlemede, *Roseburia* flagellin Fla2'dir.

Bir açıdan, *Roseburia* flagellin, aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilir: *Roseburia hominis* Fla1, *Roseburia hominis*

5 Fla2, *Roseburia intestinalis* Fla1, *Roseburia intestinalis* Fla2, *Roseburia intestinalis* Fla3 ve *Roseburia intestinalis* Fla4. Bir düzenlemede, *Roseburia* flagellin, aşağıdakilerden

oluşan gruptan seçilir: *Roseburia hominis* Fla2, *Roseburia intestinalis* Fla2, *Roseburia intestinalis* Fla1, *Roseburia*

10 *intestinalis* Fla4 ve bunların kombinasyonları. Bir başka düzenlemede, *Roseburia* flagellin, aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilir: *Roseburia hominis* Fla2, *Roseburia intestinalis* Fla2 ve bunların kombinasyonları. Başka bir düzenlemede *Roseburia* flagellin *Roseburia intestinalis*

15 Fla2'dir.

Bir düzenlemede mevcut buluş, en az bir *Roseburia* flagellini kodlayan en az bir polinükleotidin kullanılmasını içerir. Örneğin mevcut buluş, *Roseburia* flagellini kodlayan en az iki, en az üç, en az dört veya en az beş polinükleotit dizisinin

20 bir kombinasyonunun kullanılmasını kapsar.

Bir düzenlemede mevcut buluş, en az bir *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisinin kullanılmasını içerir.

Örneğin mevcut buluş, *Roseburia* flagellinleri kodlayan en az iki, en az üç, en az dört veya en az beş polipeptit dizisinin

25 bir kombinasyonunu kodlayan bir polinükleotit dizisinin kullanılmasını kapsar.

*Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi, flaA1, flaA2, fla3, fla4'ü veya bunların kombinasyonlarını kodlayabilir.

30 Bazı düzenlemelerde, *Roseburia* flagellinleri kodlayan polinükleotit dizilerinin kombinasyonu, en azından iki, üç, dört ya da beş farklı *Roseburia* türünden türetilmiş ya da türetilabilir flagellinleri kodlayan polinükleotit dizilerini içerir.

Bazı düzenlemelerde, polinükleotit dizisi en azından iki, üç, dört ya da beş farklı *Roseburia* türünden türetilmiş ya da türetilebilir *Roseburia* flagellinlerin bir kombinasyonunu kodlar.

- 5 Başka bir düzenlemede mevcut buluş, bir *Roseburia* flagellini kodlayan, az bir *Roseburia* flagellin ile en az bir polinükleotit dizisinin bir kombisansyonunun kullanılmasını içerir.

*Roseburia* flagellinleri kodlayan polinükleotit dizisinin örnekleri *Roseburia hominis* , *Roseburia cecicola*, *Roseburia faecis*, *Roseburia intestinalis*, ve *Roseburia inulinivorans* gibi *Roseburia* bakterilerinden türetilen ya da türetilebilir flagellinleri içerir. Bir düzenlemede polinükleotit dizisi, *Roseburia hominis*'den türetilmiş veya türetilebilir bir *Roseburia* flagellini kodlar. Bir düzenlemede polinükleotit dizisi, *Roseburia intestinalis*'den türetilmiş veya türetilebilir bir *Roseburia* flagellini kodlar.

*Roseburia* flagellinleri kodlayan polinükleotit dizilerinin örnekleri SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 veya SEQ ID NO: 12 veya bunların varyantları, homologları, fragmanları veya türevleri ile en az % 75 özdeşliğe sahip olan bir polipeptit dizisini kodlayan polinükleotit dizilerini ve SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 veya SEQ ID NO: 11 veya bunların varyantları, homologları, fragmanları veya türevleri ile en az % 75 özdeşliğe sahip olan bir polipeptit dizisini kodlayan polinükleotit dizilerini içerir.

Bir düzenlemede, *Roseburia* flagellini kodlayan polinükleotit dizisi, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 veya SEQ ID NO: 12 olarak gösterilen diziye sahip bir polipeptidi kodlayan polinükleotit dizisine sahiptir.

Bir düzenlemede, *Roseburia* flagellini kodlayan polinükleotit dizisi, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 veya SEQ ID NO: 11 olarak gösterilen diziye



sahip bir polipeptidi kodlayan polinükleotit dizisine sahiptir.

*Roseburia hominis* flagellinleri kodlayan polinükleotit dizilerinin örnekleri *Roseburia hominis* Fla1 ve Fla2'yi kodlayan polinükleotit dizileridir.

*Roseburia hominis* Fla1'i kodlayan bir polinükleotit dizisinin bir örneği SEQ ID NO: 1 olarak gösterilir.

SEQ ID NO: 1 aşağıdaki diziye sahiptir:

[illegible]

10 *Roseburia hominis* Fla2'i kodlayan bir polinükleotit dizisinin  
bir örneği SEQ ID NO: 3 olarak gösterilir.

SEQ ID NO: 3 aşağıdaki diziye sahiptir:

[illegible]



*Roseburia intestinalis* Fla3'ü kodlayan bir polinükleotit dizisinin bir örneği SEQ ID NO: 9 olarak gösterilir.

TGCTTGGACATTTGAGCAGGTGAAGCAATGTCCAATATTCAGGGTGCTATTTCTGCAATTTCTACAC  
AGCGTTCTTA CT TAGGAGCTCTTCAGAATCGTCTGGAGCATACAATCTCCAACTTGGACA  
ACATTTCTGAGAATACTCAGTCTGCTGAATCTCGTATCCGTGATACAGATATGGCTGAAG  
AGATGGTTACTTACAGCAAGAACAATATTCTTGCTCAGGCAGGACAGTCTATGCTTGCTC  
AGGCTAACCAGTCTACTCAGGGTGTACTTTCTCTGTTACAGTAA

SEQ ID NO: 11 aşağıdaki diziye sahiptir:



polinükleotit dizisi ve *Roseburia intestinalis* Fla4'ü kodlayan bir polinükleotit dizisi. Bir düzenlemede, *Roseburia* flagellini kodlayan polinükleotit dizisi aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilir: *Roseburia hominis* Fla2'i kodlayan bir polinükleotit dizisi, *Roseburia intestinalis* Fla2'yi kodlayan bir polinükleotit dizisi, *Roseburia intestinalis* Fla1'i kodlayan bir polinükleotit dizisi, *Roseburia intestinalis* Fla4'ü kodlayan bir polinükleotit dizisi ve bunların kombinasyonları. Bir başka düzenlemede, *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilir: *Roseburia hominis* Fla2'yi kodlayan bir polinükleotit dizisi, *Roseburia intestinalis* Fla2'li kodlayan bir polinükleotit dizisi ve bunların kombinasyonları. Başka bir düzenlemede, *Roseburia* flagellini kodlayan polinükleotit dizisi, *Roseburia intestinalis* Fla2'i kodlayan bir polinükleotit dizisidir.

Flagellinlerin terapötik etkisi, buluş sahipleri tarafından fonksiyonel deneylerle değerlendirilmiştir.

Bir düzenlemede, *Roseburia* flagellin kesilmiş bir *Roseburia* flagellindir. Örneğin, kesilmiş *Roseburia* flagellin, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 veya SEQ ID NO: 12 olarak gösterilen polipeptidin en az 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175 veya 200 amino asidini içerir.

Bir düzenlemede kesilmiş *Roseburia* flagellin kesilmiş *Roseburia hominis* flagellin veya kesilmiş *Roseburia intestinalis* flagellindir.

Bir düzenlemede, *Roseburia* flagellini kodlayan polinükleotit dizisi, kesilmiş bir FlaA1, Fla2, Fla3 veya Fla4'ü kodlar. Örneğin, polinükleotit dizisi, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 veya SEQ ID NO: 12 olarak gösterilen polipeptidin en az 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175 veya 200 amino asidini içeren kesilmiş bir *Roseburia* flagellini kodlar.





|                                                        |                                                  |             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                        |                                                  |             | <p>TGCAACAATGACACCGGCGGATAAAGA<br/> AGCAATCCAGAAAGAAATCACTTCATTA<br/> AAAGATGAAGTTGACCGTATTTCTACAG<br/> ATACAGAGTATAACAGCAAAACACTTTT<br/> AGATGGTTTCATTAGATACCAGGGTTTAC<br/> ACCAAAAATGCAACAAGAGTGGACATTT<br/> CTGATCATGTGAAAGCAGGACAGTATCA<br/> GCTTTCCATTGATACTGCAGCTACACAG<br/> GCCGGACCGGTAACAGCAAATCAGAAT<br/> TATAATTCCACAGCACCGGTCGGTGCG<br/> TCCGGAACAATGAGTATTAATGGTTCTA<br/> AAGTAGAGATAGAGGCAGCCGACACCT<br/> ATGCGGAGGCTTTTGAGAAGATCAGAA<br/> ATGCAGCAGAGACTGGTGAAACAACCG<br/> TTAAGATTGAAAAGAATGGAGCACTTTC<br/> ATTTACCGCAGAACAGTACGGAATGTCA<br/> AGCATCTTAGAGATCGCATTNNTGATGA<br/> TAAGCAGCTTGCTAATGCACTTGGATTT<br/> ACAGCAGACGGAGGAACAGTGTTGTA<br/> GAAGATCCAGAGAATAAAGGCAGCTAT<br/> GTATACGGACAGATTCAGAATGGCAAA<br/> GTGATCGTACCTTCCGGTACAGATGCC<br/> GAAGTAACGCTCACAAAACCGAGTGAT<br/> GGAACCGGATTTGGTGATACAGCTACG<br/> GTAAAAACAGATGGAATAAGATTACGG<br/> TTACAGACAGAGCCGGATTTGAGATGTC<br/> ATTTCTTGCTGATGCAGGTTATACGGGT<br/> AAGCTGGATTTTGATGTCACGGATATCG<br/> GAACGATGGCACTTCATATTGGAGCAAA<br/> TGAGGATCAGGAAACAAGAGTGCGTAT<br/> TCCGGAGGTTTCCTGCAAGAGCCTTTAC<br/> ATTGATGATGCAGACGTGACGACTGTAA<br/> ATGGAGCAGGCAGAGGTATCACACAGT<br/> TTGACGATGCCATTTCAAAGGTCAGTGA<br/> AGTGCGTTCAAGACTTGGTGCATACCA<br/> GAATCGTCTTGAGAGTACGGTATCAAGC<br/> CTGGATACGTTTGAAGAAAATATGACAG<br/> GAGCCCAGTCACGACTGACAGATGCGG<br/> ATATGGCATCGGAAATGACAGATTATAC</p> |          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                                        |                                                  |             | <p>ACATCAGAATGTATTAATCAGGCAGCA<br/> ATCTCTGTTTTGACACAGGCAAACGATC<br/> TGCCACAGCAGGTATTGCAGATTCTGCA<br/> GTAA</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Roseburi<br>a<br>intestini<br>alis L1-<br>82<br>(fla2) | RiFla2<br>veya<br>RiFla2<br>veya Ri2<br>veya Ri2 | SEQ<br>ID 7 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | SEQ ID 8 | <p>MVVNHNMALICESRQLRCNVKN<br/> MEKSSKKLATGYKLLGANDDAA<br/> GLQISETMRHQTRGLNKASRNS<br/> QDGISMLQTADAALQETQEVL<br/> RMTDLTTQAANDINTDADRRAIQ<br/> DEIDQLNQEVDRIAYTTNFNQY<br/> ILADGTPQARPGYYMIQTGSLAG<br/> QGIEIKFVNASKESLGVDKVDVS<br/> SHAKATESIAVVQNAIEKAASFR<br/> DTFGAQQERLEHALRGTDNTSE<br/> STQRAESSRRDTNMNMEMVQY<br/> STNRILVQASQSILAQYNDDAKY<br/> VLEMLKQVLQILQ</p> |



|                                                       |                                                  |              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |              |                                                                                                                                                                                                                               |
|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                       |                                                  |              | <p>             The first of the two genes, <i>flaA</i>, is a member of the <i>fla</i> gene family, which is known to be involved in the synthesis of flagellin, the major component of the bacterial flagellum. The <i>flaA</i> gene is located on the chromosome, and its expression is regulated by the <i>fla</i> operon. The <i>flaA</i> gene is transcribed from the <i>fla</i> promoter, and the resulting mRNA is translated into flagellin. The flagellin protein is then assembled into the flagellum, which is the main motility organelle of the bacterium.           </p> <p>             The second gene, <i>flaB</i>, is also a member of the <i>fla</i> gene family. It is located on the chromosome, and its expression is regulated by the <i>fla</i> operon. The <i>flaB</i> gene is transcribed from the <i>fla</i> promoter, and the resulting mRNA is translated into flagellin. The flagellin protein is then assembled into the flagellum, which is the main motility organelle of the bacterium.           </p> <p>             The <i>flaA</i> and <i>flaB</i> genes are both essential for the synthesis of flagellin, and therefore for the formation of the flagellum. Mutations in either of these genes can lead to a loss of motility in the bacterium.           </p> |              |                                                                                                                                                                                                                               |
| Roseburi<br>a<br>intestin<br>alis L1-<br>82<br>(fla3) | RiFla3<br>veya<br>RiFla3<br>veya Ri3<br>veya RI3 | SEQ<br>ID 9  | <p>             ATGGTAGTACAGCACAAATATGACCGCAA<br/>TGAATGCGAACAGAAATGTTAGGCGTTAC<br/>ACAAGCGCACAGGCCAAATCTTCAGA<br/>GAAATTATCTTCTGTTACAGAAATCAAC<br/>CGTGCAGGTGATGACGCTGCTGGTTTA           </p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | SEQ ID<br>10 | <p>             MVVQHNMTAMNANRMLGVTTS<br/>AQAKSSEKLSSGYRINRAGDDA<br/>AGLTISEKMRSQIRGLNKASDNA<br/>QDGLISLIQVAEGALSETHSILQRM<br/>NELATQAANDTNTTADRGAIQDE           </p>                                                         |
|                                                       |                                                  |              | <p>             The first of the two genes, <i>flaA</i>, is a member of the <i>fla</i> gene family, which is known to be involved in the synthesis of flagellin, the major component of the bacterial flagellum. The <i>flaA</i> gene is located on the chromosome, and its expression is regulated by the <i>fla</i> operon. The <i>flaA</i> gene is transcribed from the <i>fla</i> promoter, and the resulting mRNA is translated into flagellin. The flagellin protein is then assembled into the flagellum, which is the main motility organelle of the bacterium.           </p> <p>             The second gene, <i>flaB</i>, is also a member of the <i>fla</i> gene family. It is located on the chromosome, and its expression is regulated by the <i>fla</i> operon. The <i>flaB</i> gene is transcribed from the <i>fla</i> promoter, and the resulting mRNA is translated into flagellin. The flagellin protein is then assembled into the flagellum, which is the main motility organelle of the bacterium.           </p> <p>             The <i>flaA</i> and <i>flaB</i> genes are both essential for the synthesis of flagellin, and therefore for the formation of the flagellum. Mutations in either of these genes can lead to a loss of motility in the bacterium.           </p> |              | <p>             INQLTSEINRISSTTQFNTQNLID<br/>GTFANKNLQVGSICGQRITVSID<br/>SMSAGSLNVSANLVKVNTFSAA<br/>GEAMSNIQGAISAISTQRSYLGA<br/>LQNRLEHTISNLDNISENTQSAE<br/>SRIRDTDMAEEMVTYSKNNILAQ<br/>AGQSMILAQANQSTQGVLSLLQ           </p> |
| Roseburi<br>a                                         | RiFla4<br>veya                                   | SEQ<br>ID 11 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | SEQ ID<br>12 |                                                                                                                                                                                                                               |

|                                      |                                |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|--------------------------------------|--------------------------------|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| intestin<br>alis L1-<br>82<br>(fla4) | RIFla4<br>veya Ri4<br>veya RI4 |  | ATGGCAATGGTAGTACAGCACAACATGT<br>CCGCAATGAATGCCAACAGAAATTTAGG<br>TGTTACAACAGGAATGCAGGCCAAAATCA<br>TCAGAGAAGTTATCTTCCGGTTACAAGA<br>TCAACCGTGCAGCAGATGATGCAGCAG<br>GACTTTCTATTTCTGAGAAGATGAGAAG<br>CCAGATCCGCGGTTTAAATAAAGCATCT<br>GACAATGCACAGGATGGTATCTCTTTAA<br>TCCAGACCGCTGAGGGAGCATTAAATG<br>AGTCCCACTCTATTTTACAGAGAATGAG<br>AGAGTTATCCGTACAGGCAGCCAACGG<br>TACAGAGACAGATGACGACCGCGAGGG<br>AGTACAGAACGAGGTTTCCAGTTACAG<br>GAAGAGCTGACAAGAATTTCTGAGACAA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |  | MAMVVQHNMSAMNANRNLGVT<br>TGMQAKSSEKLSSGYKINRAAD<br>DAAGLSISEKMRSQIRGLNKASD<br>NAQDGLSLIQTAEAGLNESHSLQ<br>RMRELSVQAANGTETDDDDREAV<br>QNEVSQQLQEELTRISETTEFNTM<br>KLLDGSQSGSTSSTGSGPKFGV<br>VDATLDGALVTSNVKGIKVATAA<br>ATTTKAGQETAWAADGKTLTLN<br>LSKNKVYTTQDEIDDLIANAKQED<br>SSATGAPAEVKVSLKNGIFNADA<br>DTTAGTVTAGGVKAVSDEGTVT<br>GFVGADTISFTANKYGAEFNDTV<br>FKFKFDKAAGKEEVETNTAIEDG |
|                                      |                                |  | CAGAGTTCAACACGATGAAGCTGCTGG<br>ATGGTTCTCAGAGTGGAAAGTACATCTTC<br>AACCGGGTCAGGTCCGAAGTTTGGTGT<br>TGTAGATGCAACATTAGACGGTGCACTT<br>GTAACATCTAACGTGAAAGGTATTTAAAG<br>TAGCAACAGCAGCTGCCACAACAACAA<br>AGGCAGGTCAGGAGACTGCTATCTGGG<br>CTGCTGATGGAAAGACATTAACITIAAA<br>TCTTTGAAAAATAAGGTATATACACAG<br>GACGAAATTGATGACTTGATCGCAATG<br>CAAAACAGGAAGACAGTTCTGCAACGG<br>GTGCACCGGCTGAAGTGAAAGTATCTTT<br>AAAGAATGGTATTTTTAATGCAGATGCA<br>GACACAACCTGCCGGAACGTAAACAGCC<br>GGTGGTGTGAAGGCAGTATCTGATGAA<br>GGAACAGTAACTGGATTTGTTGGTGCA<br>GATACAATTTTCAATTTACGGCAAATAAGT<br>ATGGAGCAGAGTTCAATGATACTGTATT<br>TAAATTCAAATTTGATAAGGCAGCAGGC<br>AAAGAAGAAGTAGAGACAAATACAGCAA<br>TTGAAATTGATGGAGCAAATGCGGTAAC<br>AGCAGGTGAATATACAATTCATCTTGCA<br>GCAGGCAAAGAATATACGGCAGAAGAT<br>TTAGAAGATGTTCTTAAAACGGCAGGAT<br>TCGACTTTGATGTTAAATTAAGTGGAAA<br>TACACCAGATGAGCCAAATCTTTATTT<br>GCAACCACTGGCGCATCAACTGTGACT<br>GATATTACAATGGGTGCTGGCACCGCC<br>GGAGCTGCTCTTGAAGTACAGATGCT<br>ATGTGGGGGCAAGCTGTTATGACAGT<br>TATCTTCTGGTGCTGGCATTACCTTGCA<br>GATTGGTGCAAATGAAGGTCAGACCAT<br>GAGTTTCTCTATCGATGACATGAGTGCA<br>AGAGCACTTGGCGTAGATGGCAACAAA<br>GTTGATTTAAGCACACAGGCTGGCGCA<br>CAGAAAGCAACTGATACCATGATGCA<br>CAATCAAGAAAGTATCTGCACAGCGTG<br>GTAGAATGGGTGCGATCCAGAACCGTC<br>TGGAGCACACCATCAGCAACCTTGATAC |  | ANAVTAGEYTIHLAAGKEYTAED<br>LEDVLKTAGFDFDKLSGNTPOE<br>PNTLFATSGASTVTDITMGAGTA<br>GAGLGSTDAMWQAGYDSVSS<br>GAGITLQIGANEGQIMSFISIDUM<br>SARALGVDGNKVDLSTQAGAK<br>ATDTIDAAIKKVSQQRGRMGAIQ<br>NRLEHTISNLDTAENTQTAESRI<br>RDTDMAEEMVEYSKNNILAQAG<br>QSMLAQANQSTQGVLSLLQ                                                                                                                   |
|                                      |                                |  | AGCAGCAGAGAATACCCAGACTGCAGA<br>GTCCCGTATCCGTGATACAGATATGGCA<br>GAAGAGATGGTTGAGTACTCCAAGAAC<br>AACATTCTTGACAGGCAGGTCAGTCTA<br>TGCTTGACAGGCGAACCAGTCTACAC<br>AGGGTGTACTCTCCTTATTACAGTAA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

Tablo B - Burada tarif edilen *Roseburia* flagellinlerin erişim numaralarının özeti.

| Bakteri ve suş                              | Kısaltma                                                                               | Genom veya Gen Erişim Numarası | Protein Erişim Numarası (GenBank) | Protein Erişim Numarası (NCBI Referans Dizisi) |
|---------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------|
| <i>Roseburia hominis</i> A2-183 (fla 1)     | RhFlaA1<br>veya<br>RhFlaA1<br>veya<br>RhFla1<br>veya<br>RhFla1<br>veya Rh1<br>veya RH1 | DQ789140.1                     | ABI48297.1                        | ABI48297.1                                     |
| <i>Roseburia hominis</i> A2-183 (fla 2)     | RhFlaA2<br>veya<br>RHFiaA2<br>veya<br>RhFla2<br>veya<br>RhFla2<br>veya Rh2<br>veya RH2 | DQ789141.1                     | ABI48298.1                        | ABI48298.1                                     |
| <i>Roseburia intestinalis</i> L1- 82 (fla1) | RiFlaA1<br>veya<br>RIFlaA1<br>RiFla1<br>veya<br>RIFia1<br>or Ri1<br>veya RI1           | ABYJ02000009.1                 | EEV02820                          | WP_006855378                                   |

|                                               |                                                  |                |          |              |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------|----------------|----------|--------------|
| Roseburia<br>intestinalis<br>L1- 82<br>(fla2) | RiFla2<br>veya<br>RiFla2<br>veya Ri2<br>veya RI2 | ABYJ02000032.1 | EEV02466 | WP_006855745 |
| Roseburia<br>intestinalis<br>L1- 82<br>(fla3) | RiFla3<br>veya<br>RiFla3<br>veya Ri3<br>veya RI3 | ABYJ02000104.1 | EEV00779 | WP_006857364 |
| Roseburia<br>intestinalis<br>L1- 82<br>(fla4) | RiFla4<br>veya<br>RiFla4<br>veya Ri4<br>veya RI4 | ABYJ02000202.1 | EEU99488 | WP_006858703 |

### **Modülasyon/düzenleme**

Burada "modülasyon" ve "düzenleme" terimleri birbirlerinin yerine kullanılabilir.

- 5 Bir düzenlemede "modülasyon" terimi, bir artış ve/ veya indüksiyonu ve/ veya yükseliş ve/ veya aktivasyonu ifade eder. Alternatif bir düzenlemede, "modülasyon" terimi, bir azalma ve/ veya düşüş ve/ veya inhibisyon anlamına gelmektedir.

- 10 Bir düzenlemede, "düzenleme" terimi, bir yukarı regülasyonu belirtir. Alternatif bir düzenlemede, "düzenleme" terimi, bir aşağı regülasyonu ifade eder.

- 15 Bir düzenlemede, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri

türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) bir dokunun veya bir organın enflamasyonunu azaltır.

Örneğin, sindirim kanalının veya bunun bir kısmının (bağırsak gibi) iltihabı azaltılır.

5 Burada kullanıldığı haliyle "enflamasyon" terimi, aşağıdakilerden bir veya daha fazlasına karşılık gelir: bağışıklık sisteminin aşırı tepki vermesiyle tetiklenen bir enflamatuar sürece bağlı olarak bir doku veya organın kızarıklık, şişme, ağrı, hassasiyet, ateş ve bozulan  
10 işlevleri.

Bir denekte enflamasyondaki bir azalma, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen  
15 polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önce  
20 veya uygulandıktan sonra denekten alınan doku, serum ve/ veya dışkı örneklerinde pro- enflamatuar sitokinlerin ve kemokinlerin seviyelerinin belirlenmesi yoluyla tespit edilebilir. Örneğin, aşağıdakilerden bir veya daha fazlasının seviyeleri izlenebilir: IL- 1, IL- 4, IL5, IL6, IL- 8, IL- 12,  
25 IL- 13, IL- 17, IL- 21, IL- 22, IL23, TNFa, IFNy, CXCL1, CXCL10, CCL2, CCL20 serum ve fekal kalprotektin, SA1009 / SA1008 kalsiyum bağlayıcı proteinler ve Tip 1 interferonlar, CD163, CD14 gibi CD markörleri, NF- kB, STAT ve MAPkinazlar gibi enflamatuar transkripsiyon faktörleri, c- reaktif protein  
30 (CRP), eritrosit sedimantasyon hızı (ESR), kompleman proteinler, serum albümin, hedef dokuların ve organların histolojik değerlendirmesi, hastalık aktivite indeksleri. Ayrıca, insan çalışmalarında yaşam kalitesi (QoL) anketleri, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2)  
35 polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla

(örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önce veya uygulandıktan sonra gerçekleştirilebilir.

Bir denekteki bir doku veya organın enflamasyon miktarı, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önce gerçekleşen bir doku veya organın enflamasyon miktarına göre en az % 10, % 20, % 30, % 40 veya % 50 daha düşüktür.

Bir düzenlemede, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) bir dokunun veya bir organın epitel hücrelerinin enflamasyonunu azaltır.

Örneğin, epitel hücreler sindirim kanalının veya bunun bir kısmının (bağırsak gibi) epitel hücreleridir.

Bir düzenlemede, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan

polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) bir denekte T hücrelerinin üretimini artırır.

Bir düzenlemede T hücreleri, TLR5'i (Toll benzeri reseptör 5) ifade edebilen düzenleyici T hücreleri gibi düzenleyici T hücreleridir (Treg olarak da ifade edilir).

10 Teori ile sınırlanmak istememekle birlikte Treg sayılarında artış, enflamasyon, otoimmünite ve alerjik / atopik koşulları tetikleyen Th1, Th17 ve Th2 gibi diğer efektör T hücrelerinin (Teff'ler olarak da adlandırılır) etkileri ile mücadele edecektir. Bu nedenle, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) bu özelliğinden Teff / Treg hücresi dengesinin kaybolduğu pek çok hastalığın, örneğin Crohn hastalığı ve ülseratif kolitin üstesinden gelmek için yararlanılabilir.

Bir düzenlemede, bir denekteki T hücresi üretimi artar, öyle ki *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki T hücre sayısı ile

karşılaştırıldığında en az % 10, % 20, % 30, % 40 veya % 50 daha fazla veya % 100'den daha fazla T hücresi bulunur.

Burada kullanılan "bağışıklık sistemi" terimi, adaptif bağışıklık sistemi ve/ veya doğuştan bağışıklık sistemi

5 anlamına gelebilir.

Bir yönde, buluş *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini

10 içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) bir denekte adaptif bağışıklık sistemini düzenlemekte  
15 kullanılması ile ilgilidir.

Burada kullanılan "adaptif bağışıklık sistemi" terimi, "spesifik bağışıklık sistemi" olarak da bilinir; patojenik büyümeyi ortadan kaldıran veya önleyen, oldukça uzmanlaşmış, sistemik hücreler ve süreçleri belirtir. Adaptif bağışıklık  
20 yanıtı omurgalı bağışıklık sisteminin spesifik patojenleri tanınması ve hatırlaması (bağışıklık üretmek için) ve patojenle her karşılaşıldığında daha güçlü ataklar başlatması olanağı sağlar.

Burada kullanıldığı şekliyle "adaptif bağışıklık sisteminin  
25 düzenlenmesi" terimi, adaptif bağışıklık sisteminin aktivitesinin uyarılması ve/ veya aktivitenin taban seviyesine göre etkinlik seviyesinin arttırılması yoluyla immün homeostatik mekanizmaların teşvik edilmesi anlamına gelmektedir. Tercihen, adaptif bağışıklık sistemi, bağışıklık  
30 düzenlenmesine yönelik olarak (ve bağışıklık aktivasyonuna yönelik değildir, dolayısıyla iltihaplanmayı azaltır) modüle edilir.

Adaptif bağışıklık sistemi ile ilişkili kusurlar ve bozukluklar, özellikle T hücrelerinin fonksiyonu ile ilişkili  
35 olarak, birçok enflamatuar ve otoimmün hastalıkla ilişkilidir.



Th1, Th2 ve Th17 ile ilişkili T hücre yanıtları, atopik, enflamatuvar ve otoimmün hastalıklarla ilişkilidir. T düzenleyici (Treg) hücre popülasyonunlarını iyileştiren veya artıran tedaviler, aşırı Th1, Th2 ve Th17 hücre yanıtları tarafından yönlendirilen hastalıkların kontrolünde önemlidir.

Buluşun bir diğer yönü *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) bir denekte doğuştan gelen bağışıklık sistemini düzenlemekte kullanılması ile ilgilidir.

Burada kullanıldığı şekliyle, aynı zamanda spesifik olmayan bağışıklık sistemi olarak da bilinen "doğuştan gelen bağışıklık sistemi" terimi, spesifik olmayan bir şekilde diğer organizmaların yol açtığı enfeksiyona karşı konağa derhal savunma sağlayan hücreleri ve mekanizmaları içerir. Bu, doğuştan gelen sistemin hücrelerinin patojenleri genel bir şekilde tanıyıp yanıtladığı; ancak adaptif bağışıklık sisteminin aksine, konağa uzun süreli veya koruyucu bağışıklık kazandırmadığı anlamına gelir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "doğuştan gelen bağışıklık sisteminin düzenlenmesi" terimi, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin aktivitesini indüklemek ve/ veya bağışıklık homeostazını teşvik etmek için temel faaliyet seviyesine göre etkinlik seviyesinin arttırılması anlamına gelmektedir.

Epitelyal bariyer kaybı, doğuştan bağışıklık peptitleri, örneğin defensinler, kemokinler ve sitokinler ya da kusurlu TLR sinyalleşmesinden dolayı doğuştan bağışıklık fonksiyonunun kaybedilmesi ya da düzensizliği bağırsak dahil birçok vücut

organında artan iltihaplanma riski ile ilişkilidir. Bu gibi hastalıklar, enflamatuvar bağırsak hastalığını içerir.

Bir düzenlemede, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) immünolojik toleransı yeniden sağlar.

Burada kullanıldığı şekliyle "immünolojik tolerans" terimi, bağışıklık sisteminin kendi antijeni gibi bir antijene saldırmadığı sürece atıfta bulunmaktadır.

Burada kullanıldığı haliyle "immünolojik toleransı yeniden sağlama" terimi, bir denekte bir veya daha fazla antijene (örneğin bir kendi antijenine) immünolojik toleransın yeniden sağlanmasını ifade eder, öyle ki antijene immünolojik toleransın seviyesi *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki denekteki seviyelerle karşılaştırıldığında, daha yüksektir.

Bir düzenlemede, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri

türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) dendritik hücreleri ve/ veya epitel hücreleri aktive eder. Burada kullanıldığı haliyle "dendritik hücreleri aktive eder" terimi, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki denekteki seviyelerle karşılaştırıldığında, bir denekte bir veya daha fazla hücre markörünün (I- A/I- E hücre markörleri, CD80 ve CD86 ve CD40 gibi) bir yukarı regülasyonunu ve/ veya hücreler (dendritik hücreler gibi) tarafından bir veya daha fazla sitokin (IL-10 ve TGF $\beta$  gibi) üretiminde bir artışı ifade eder. Burada kullanıldığı haliyle, "IA / IE" terimi, MHC sınıf II'nin hücre markörlerini ifade eder.

CD40, bağışıklıkta önemli bir role sahiptir ve kostimülatör moleküllerinin en iyi karakterize edilenlerinden biridir. Tümör nekroz faktörü reseptör ailesinin bir üyesi olan bu reseptör, dendritik hücreler gibi profesyonel antijen sunan hücreler tarafından ifade edilir. CD40, enflamatuar koşullar altında T hücreleri ve diğer bağışık olmayan hücrelerde geçici olarak ifade edilen, ligandı CD40L'yi bağlar. CD40L, bir T hücresi markörlerine bir örnektir. CD3, CD4, CD25, FoxP3, CTLA- 4, Ly6g ve CD11b T hücresi markörlerinin başka örnekleridir.

CD80 ve CD86, antijen sunan hücrelerde (dendritik hücreler gibi) ifade edilir ve T hücre yanıtlarının gelişimi ve birlikte uyarılması için gereklidir. T hücrelerindeki CD28 ve CTLA- 4 molekülleri, CD80 ve CD86 yardımcı uyarıcı antijenler için reseptör görevi görür.

CD3, CD4, CD25, FoxP3, CTLA- 4, Ly6g ve CD11b kolonik T düzenleyici hücreleri markörlerinin örnekleridir.

Teori ile bağlı kalmak istememekle birlikte, Ly6g'nin tükenmesi (ör. Ly6g6c ve ly6g6e) bağırsak ve solunum yolları enfeksiyon riskini arttırır ve nötropeni gibi hastalıklarla ilişkilidir. Bu nedenle, bir düzenlemede, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) nötropeninin iyileştirilmesinde kullanım içindir.

Buluşun bir diğer yönü *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) bir denekte bağışıklık homeostazının korunmasında kullanılması ile ilgilidir. Burada kullanıldığı şekliyle "immün homeostazı korumak", vücudun bağışıklık sisteminin, değişen koşullara yanıt olarak oral tolerans veya bağışıklık stabilitesini korumak için kendi kendini düzenlemesi anlamına gelir. Oral tolerans, sağlıklı bir bağırsaktaki gıda ve ortakçı bakterilere karşı normal bağışıklık tepkilerini ifade eder. Bunlar çölyak hastalığında ve Crohn hastalığı ve ülseratif kolit gibi enflamatuar bağırsak hastalıklarında kaybolur. Dolayısıyla, bir yönde, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia*

flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) çölyak hastalığının ve Crohn hastalığı ve ülseratif kolit gibi enflamatuvar bağırsak hastalıklarının tedavisinde kullanım içindir.

10 Bir düzenlemede, bir deneğin hücre(ler)i üzerinde bir hücre markörünün sayısı yukarı regüle edilir, öyle ki *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya

15 adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki

20 deneğin hücre(ler)i üzerinde hücre markörünün sayısı ile karşılaştırıldığında, hücre(ler) üzerinde en az % 10, % 20, % 30, % 40 veya % 50 daha fazla hücre markörü veya hücre(ler) üzerinde % 100'den daha fazla hücre markörü bulunur. Ek olarak veya alternatif olarak, bir denekte hücre markörüne sahip bir

25 deneğin hücrelerinin sayısı artırılır, öyle ki *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya

30 adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki denekteki hücre markörüne sahip hücrelerin sayısı ile

35 karşılaştırıldığında, hücre markörüne sahip en az % 10, % 20,

% 30, % 40 veya % 50 daha fazla hücre veya hücre markörüne sahip % 100'den daha fazla hücre bulunur.

Bir yönde, hücreler T hücreleridir.

5 Bir başka yönde, hücreler sindirim kanalı hücreleridir (bağırsak hücreleri gibi).

Bir başka yönde, hücreler kolonik ve/ veya ince bağırsak T düzenleyici hücreleri olup, CD4 veya CD8 pozitif olabilir.

Bir özellikte hücre markörü bir T hücresi markörüdür. Başka bir yönde, hücre markörü bir kolonik T hücresi markörüdür.

10 Tip IA / IE olan markörler, bir hücre markörü örneğindir. CD40, dendritik hücrelerde bulunan bir başka hücre markörü örneğidir.

Bir düzenlemede, bir denekteki bir sitokin seviyesi artar, öyle ki *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya

15 FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan

polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir

20 konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki sitokin seviyesi ile karşılaştırıldığında sitokin seviyesi en az % 10, % 20, % 30, % 40 veya % 50 daha fazla veya % 100'den daha fazla olur.

25 Dendritik hücrelerin örnekleri, kemik iliği dendritik hücrelerini ve bağırsak mukozal dendritik hücrelerini içerir.

Burada kullanıldığı haliyle "epitel hücreleri aktive eder" terimi, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya

30 FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan

polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir

35 konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi)

deneğe uygulanmadan önceki denekteki ifade seviyeleri ile karşılaştırıldığında, bir denekte epitel hücreler tarafından pro enflamatuar genlerin bir veya daha fazlasının ifadesinde bir artışı belirtir.

- 5 Burada kullanıldığı haliyle "pro- enflamatuar gen" terimi, ifade edildiğinde enflamasyonu teşvik eden bir geni belirtir. Pro- enflamatuar genlerin örnekleri arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere IL1- p, IL4, IL5, IL6, IL8, IL12, IL13, IL17, IL21, IL22, IL23, IL27, IFN $\gamma$ , CCL2, CCL3, CCL5, CCL20, CXCL5, 10 CXCL10, CXCL12, CXCL13 ve TNF- a vardır.

Bir düzenlemede, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini 15 içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) bir sitokinin üretimini yukarı regüle eder.

- 20 Burada kullanıldığı haliyle "bir sitokinin üretimini yukarı regüle eder" terimi, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini 25 içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki denekteki sitokin seviyesi ile 30 karşılaştırıldığında, bir denekte bir sitokin seviyesinde bir artışı belirtir.

Bir düzenlemede, bir denekteki bir sitokin seviyesi artırılır, öyle ki *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla 35 (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan

polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki sitokin seviyesi ile karşılaştırıldığında sitokin seviyesi en az % 10, % 20, % 30, % 40 veya % 50 daha fazla veya % 100'den daha fazla olur.

Bir düzenlemede, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) IL-10 ve/ veya TGF $\beta$ . üretimini yukarı regüle eder.

Burada kullanıldığı haliyle "IL- 10 üretimini yukarı regüle eder" terimi, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki denekteki IL- 10 seviyesi ile karşılaştırıldığında, bir denekte IL- 10 seviyesinde bir artışı belirtir.

Bir düzenlemede, bir denekteki bir IL- 10 seviyesi artırılır, öyle ki *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak



- hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki IL- 10 seviyesi ile
- 5 karşılaştırıldığında, IL- 10 seviyesi en az % 10, % 20, % 30, % 40 veya % 50 daha fazla veya % 100'den daha fazla olur.
- Bazı yönlerde IL- 10, dendritik hücreler, örneğin kemik iliği kaynaklı dendritik hücreler ve bağırsak mukozal dendritik hücreleri, özellikle CD103 + alt grupları tarafından üretilir.
- 10 Bir düzenlemede, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak
- 15 hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) bir deneğin bir hücresinde veya hücrelerinde bağışıklık yanıtları ve antijen tanımada yer alan hücre yüzeyi markörlerinin
- 20 üretimini yukarı regüle eder.
- Bağışıklık yanıtlarında ve antijen tanımada yer alan hücre yüzeyi markörlerinin örnekleri arasında CD40, IA / IE, CD317 / BST- 2, CD103, CD80, CD86, CD83 ve/ veya Siglec- H ve/ veya tür eşdeğerleri bulunur.
- 25 Hücre yüzeyi markörleri (ör. CD317 / BST- 2), farklı türlerde farklı isimler ile ifade edilebilir veya hücre yüzeyi markörü belirli bir türün hücreleri üzerinde henüz tanımlanmamış olabilir. Burada kullanılan "tür eşdeğerliliği" terimi, bu hücre yüzeyi markörlerini kapsar.
- 30 Burada kullanıldığı haliyle "CD40'ın üretimini yukarı regüle eder" terimi, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini
- 35 içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak

hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki denekteki CD40 seviyesi ile karşılaştırıldığında, bir denekte CD40 seviyesinde bir artışı belirtir. Örneğin, CD40 hücre markörünü taşıyan hücrelerin sayısı artar ve/ veya bir hücre üzerindeki CD40 markörlerinin sayısı artar.

Bir düzenlemede, bir deneğin hücre(ler)i üzerinde CD40 hücre markörünün sayısı yukarı regüle edilir, öyle ki *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki deneğin hücre(ler)i üzerinde hücre markörünün sayısı ile karşılaştırıldığında, hücre(ler) üzerinde en az % 10, % 20, % 30, % 40 veya % 50 daha fazla hücre markörü veya hücre(ler) üzerinde % 100'den daha fazla hücre markörü bulunur. Ek olarak veya alternatif olarak, bir denekte hücre markörü CD40'a sahip bir deneğin hücrelerinin sayısı artırılır, öyle ki *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki denekteki hücre markörüne sahip hücrelerin sayısı ile karşılaştırıldığında, hücre markörüne sahip en az % 10, % 20,

% 30, % 40 veya % 50 daha fazla hücre veya hücre markörüne sahip % 100'den daha fazla hücre bulunur.

Burada kullanıldığı haliyle "I- A/I- E üretimini yukarı regüle eder" terimi, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki denekteki I- A/I- E seviyesi ile karşılaştırıldığında, bir denekte I- A/I- E seviyesinde bir artışı belirtir. Örneğin, bir veya daha fazla I- A/I- E hücre markörü taşıyan hücre sayısı artar ve/ veya bir hücre üzerindeki I- A/I- E hücre markörlerinin sayısı artar.

Bir düzenlemede, bir deneğin hücre(ler)i üzerinde I- A/I- E hücre markörünün sayısı yukarı regüle edilir, öyle ki *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki deneğin hücre(ler)i üzerinde I- A/I- E hücre markörünün sayısı ile karşılaştırıldığında, hücre(ler) üzerinde en az % 10, % 20, % 30, % 40 veya % 50 daha fazla I- A/I- E hücre markörü veya hücre(ler) üzerinde % 100'den daha fazla I- A/I- E hücre markörü bulunur. Ek olarak veya alternatif olarak, bir denekte hücre markörü I- A/I- E'ye sahip bir deneğin hücrelerinin sayısı artırılır, öyle ki *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla

(örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki denekteki I- A/I- E hücre markörüne sahip hücrelerin sayısı ile karşılaştırıldığında, I- A/I- E hücre markörüne sahip en az % 10, % 20, % 30, % 40 veya % 50 daha fazla hücre veya I- A/I- E hücre markörüne sahip % 100'den daha fazla hücre bulunur.

Burada kullanıldığı haliyle "CD317/BST- 2 üretimini yukarı regüle eder" terimi, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki denekteki CD317/BST- 2 seviyesi ile karşılaştırıldığında, bir denekte CD317/BST- 2 seviyesinde bir artışı belirtir. Örneğin, bir veya daha fazla CD317 / BST- 2 hücre markörü taşıyan hücre sayısı artar ve/ veya bir hücre üzerindeki CD317 / BST- 2 hücre markörlerinin sayısı artar.

Bir düzenlemede, bir deneğin hücre(ler)i üzerinde CD317/BST- 2 hücre markörünün sayısı yukarı regüle edilir, öyle ki *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi)

deneğe uygulanmadan önceki deneğin hücre(ler)i üzerinde CD317/BST- 2 hücre markörünün sayısı ile karşılaştırıldığında, hücre(ler) üzerinde en az % 10, % 20, % 30, % 40 veya % 50 daha fazla CD317/BST- 2 hücre markörü veya hücre(ler) üzerinde % 100'den daha fazla CD317/BST- 2 markörü bulunur. Ek olarak veya alternatif olarak, bir denekte hücre markörü CD317/BST- 2'ye sahip bir deneğin hücrelerinin sayısı artırılır, öyle ki *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki denekteki CD317/BST- 2 hücre markörüne sahip hücrelerin sayısı ile karşılaştırıldığında, CD317/BST- 2 hücre markörüne sahip en az % 10, % 20, % 30, % 40 veya % 50 daha fazla hücre veya CD317/BST- 2 hücre markörüne sahip % 100'den daha fazla hücre bulunur.

Burada kullanıldığı haliyle "CD103'ün üretimini yukarı regüle eder" terimi, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki denekteki CD103 seviyesi ile karşılaştırıldığında, bir denekte CD103 seviyesinde bir artışı belirtir. Örneğin, bir veya daha fazla CD103 hücre markörü taşıyan hücre sayısı artar ve/ veya bir hücre üzerindeki CD103 hücre markörlerinin sayısı artar.

Bir düzenlemede, bir deneğin hücre(ler)i üzerinde CD103 hücre markörünün sayısı yukarı regüle edilir, öyle ki *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki deneğin hücre(ler)i üzerinde CD103 hücre markörünün sayısı ile karşılaştırıldığında, hücre(ler) üzerinde en az % 10, % 20, % 30, % 40 veya % 50 daha fazla CD103 hücre markörü veya hücre(ler) üzerinde % 100'den daha fazla CD103 markörü bulunur. Ek olarak veya alternatif olarak, bir denekte hücre markörü CD103'e sahip bir deneğin hücrelerinin sayısı artırılır, öyle ki *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki denekteki CD103 hücre markörüne sahip hücrelerin sayısı ile karşılaştırıldığında, CD103 hücre markörüne sahip en az % 10, % 20, % 30, % 40 veya % 50 daha fazla hücre veya CD103 hücre markörüne sahip % 100'den daha fazla hücre bulunur.

Burada kullanıldığı haliyle "CD80'in üretimini yukarı regüle eder" terimi, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak

hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki denekteki CD80 seviyesi ile

5 karşılaştırıldığında, bir denekte CD80 seviyesinde bir artışı belirtir. Örneğin, bir veya daha fazla CD80 hücre markörü taşıyan hücre sayısı artar ve/ veya bir hücre üzerindeki CD80 hücre markörlerinin sayısı artar.

Bir düzenlemede, bir deneğin hücre(ler)i üzerinde CD80 hücre

10 markörünün sayısı yukarı regüle edilir, öyle ki *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/

15 veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki deneğin hücre(ler)i üzerinde CD80 hücre markörünün sayısı ile karşılaştırıldığında, hücre(ler)

20 üzerinde en az % 10, % 20, % 30, % 40 veya % 50 daha fazla CD80 hücre markörü veya hücre(ler) üzerinde % 100'den daha fazla CD80 markörü bulunur. Ek olarak veya alternatif olarak, bir denekte hücre markörü CD80'e sahip bir deneğin hücrelerinin sayısı artırılır, öyle ki *Roseburia* flagellin ve/

25 veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen

30 polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki denekteki CD80 hücre markörüne sahip hücrelerin sayısı ile karşılaştırıldığında, CD80 hücre markörüne sahip en az % 10, %

20, % 30, % 40 veya % 50 daha fazla hücre veya CD80 hücre markörüne sahip % 100'den daha fazla hücre bulunur.

Burada kullanıldığı haliyle "CD86'nın üretimini yukarı regüle eder" terimi, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla polipeptidi ve/

5 veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki denekteki CD86 seviyesi ile karşılaştırıldığında, bir denekte CD86 seviyesinde bir artışı belirtir. Örneğin, bir veya daha fazla CD86 hücre markörü taşıyan hücre sayısı artar ve/ veya bir hücre üzerindeki CD86  
15 hücre markörlerinin sayısı artar.

Bir düzenlemede, bir deneğin hücre(ler)i üzerinde CD86 hücre markörünün sayısı yukarı regüle edilir, öyle ki *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe

25 uygulanmadan önceki deneğin hücre(ler)i üzerinde CD86 hücre markörünün sayısı ile karşılaştırıldığında, hücre(ler) üzerinde en az % 10, % 20, % 30, % 40 veya % 50 daha fazla CD86 hücre markörü veya hücre(ler) üzerinde % 100'den daha fazla CD86 markörü bulunur. Ek olarak veya alternatif olarak, bir denekte hücre markörü CD86'ya sahip bir deneğin hücrelerinin sayısı artırılır, öyle ki *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen  
35



polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki denekteki CD86 hücre markörüne sahip hücrelerin sayısı ile

5 karşılaştırıldığında, CD86 hücre markörüne sahip en az % 10, % 20, % 30, % 40 veya % 50 daha fazla hücre veya CD86 hücre markörüne sahip % 100'den daha fazla hücre bulunur.

Burada kullanıldığı haliyle "CD83'ün üretimini yukarı regüle eder" terimi, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla polipeptidi ve/

10 veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri

15 türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki denekteki CD83 seviyesi ile karşılaştırıldığında, bir denekte CD83 seviyesinde bir artışı belirtir. Örneğin, bir veya daha fazla CD83 hücre markörü taşıyan hücre sayısı artar ve/ veya bir hücre üzerindeki CD83

20 hücre markörlerinin sayısı artar.

Bir düzenlemede, bir deneğin hücre(ler)i üzerinde CD83 hücre markörünün sayısı yukarı regüle edilir, öyle ki *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla polipeptidini kodlayan polinükleotit

25 dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe

30 uygulanmadan önceki deneğin hücre(ler)i üzerinde CD83 hücre markörünün sayısı ile karşılaştırıldığında, hücre(ler) üzerinde en az % 10, % 20, % 30, % 40 veya % 50 daha fazla CD83 hücre markörü veya hücre(ler) üzerinde % 100'den daha fazla CD83 markörü bulunur. Ek olarak veya alternatif olarak,

35 bir denekte hücre markörü CD83'e sahip bir deneğin

hücrelerinin sayısı artırılır, öyle ki *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki denekteki CD83 hücre markörüne sahip hücrelerin sayısı ile karşılaştırıldığında, CD83 hücre markörüne sahip en az % 10, % 20, % 30, % 40 veya % 50 daha fazla hücre veya CD83 hücre markörüne sahip % 100'den daha fazla hücre bulunur.

Burada kullanıldığı haliyle "Siglec- H üretimini yukarı regüle eder" terimi, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki denekteki Siglec- H seviyesi ile karşılaştırıldığında, bir denekte Siglec- H seviyesinde bir artışı belirtir. Örneğin, bir veya daha fazla Siglec- H hücre markörü taşıyan hücre sayısı artar ve/ veya bir hücre üzerindeki Siglec- H hücre markörlerinin sayısı artar.

Bir düzenlemede, bir deneğin hücre(ler)i üzerinde Siglec- H hücre markörünün sayısı yukarı regüle edilir, öyle ki *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki deneğin hücre(ler)i üzerinde

Siglec- H hücre markörünün sayısı ile karşılaştırıldığında, hücre(ler) üzerinde en az % 10, % 20, % 30, % 40 veya % 50 daha fazla Siglec- H hücre markörü veya hücre(ler) üzerinde % 100'den daha fazla Siglec- H markörü bulunur. Ek olarak veya alternatif olarak, bir denekte hücre markörü Siglec- H'ye sahip bir deneğin hücrelerinin sayısı artırılır, öyle ki *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki denekteki Siglec- H hücre markörüne sahip hücrelerin sayısı ile karşılaştırıldığında, Siglec- H hücre markörüne sahip en az % 10, % 20, % 30, % 40 veya % 50 daha fazla hücre veya Siglec- H hücre markörüne sahip % 100'den daha fazla hücre bulunur.

Bazı yönlerde CD40 IA / IE, CD317 / BST- 2, CD80, CD86, CD83 ve/ veya Siglec- H üretimi dendritik hücreler (FLT3L ile genleşen, tolerogenik CD103<sup>+</sup> dendritik hücreler) tarafından yapılır.

Bir düzenlemede bir deneğin bir hücresindeki veya hücrelerindeki bir veya daha fazla Tip I IFN geninin ifadesi aşağı regüle edilir.

Bir düzenlemede, bir denekteki bir veya daha fazla Tip I IFN geni ifade seviyesi artırılır, öyle ki *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki

seviye ile karşılaştırıldığında, denekteki seviye en az % 10, % 20, % 30, % 40 veya % 50 daha az olur.

Tip I IFN genlerinin örnekleri, bunlarla sınırlı olmamak üzere IFN-  $\beta$ 1, IFN-  $\beta$ 3, *Ifi202b*, *Ifi203*, *IFI44*, *IFTI*, *MXI*, *OASI*,

5 *OAS2*, *OAS3*, *OASL*, *Irf3* ve *Irf4*'ü içeren,

Bir düzenlemede bir deneğin bir hücresindeki veya hücrelerindeki bir veya daha fazla proenflamatuar genin ifadesi aşağı regüle edilir.

Bir düzenlemede, bir denekteki bir veya daha fazla  
10 proenflamatuar genin ifade seviyesi artırılır, öyle ki *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini  
15 içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki seviye ile karşılaştırıldığında,  
20 denekteki seviye en az % 10, % 20, % 30, % 40 veya % 50 daha az olur.

Bu tarifnamede kullanıldığı haliyle, "bağırsak mikrobiyotası" terimi, konak hayvanların sindirim sisteminde yaşayan mikroorganizmaları belirtir. Bu mikroorganizmalar çok çeşitli  
25 metabolik, yapısal, koruyucu ve diğer faydalı işlevleri yerine getirirler.

Burada kullanıldığı şekliyle "bağırsak mikrobiyotasının iyileştirilmesi" terimi, bir deneğin (örneğin konak) bağırsağında bulunan mikroorganizmaların sayısını ve/ veya  
30 türünü arttırmayı ve/ veya metabolik, yapısal, koruyucu ve diğer yararlı işlevleri açısından söz konusu mikroorganizmaların aktivitesini arttırmayı ifade eder. Örneğin, *Clostridium* kümesi XIVA bakterilerinin sayısı (yani seviyesi) artar ve *E. coli* sayısı azalır, enflamatuar bağırsak  
35 hastalığına (IBD) sahip deneklerde intestinal mikrobiyotada

böyle bir iyileşme *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini

5 içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulandığında ortaya çıkabilir.

10 Bir düzenlemede, bir deneğin (örneğin konak) bağırsağında bulunan mikroorganizmaların sayısı artırılır, öyle ki *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya

15 adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki

20 seviye ile karşılaştırıldığında mikroorganizmaların sayısı en az % 10, % 20, % 30, % 40 veya % 50 daha fazla veya % 100'den daha fazla olur. Ek olarak veya alternatif olarak, bir deneğin (örneğin konak) bağırsağında bulunan mikroorganizmaların türü artırılır, öyle ki *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin

25 FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir

30 konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önce denekteki türler ile karşılaştırıldığında, en az % 5, % 10 veya % 15 daha fazla mikroorganizma türü bulunur.

Burada kullanıldığı şekliyle, "iştah düzenleme" terimi, bir deneğin yemek yeme arzusunu modüle edebilme (yani artması veya azalması) anlamına gelir.

Bir düzenlemede öznde iştah uyarılır (yani artar).

- 5 Teori ile bağlı kalmayı istememekle birlikte, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya
- 10 adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) iştahın baskılanması (tokluk hormonlarını kodlayan genler gibi) ile ilişkili
- 15 genlerin ifadesinin aşağı regüle edilmesi yoluyla bir deneğin iştahı üzerinde uyarıcı bir etki ortaya koyar. *Agt*, *Cartpt*, *Cck*, *Cxcl12* ve *GCG* iştahı düzenlemekle ilişkili genlerin örnekleridir ve bu genlerden birinin veya daha fazlasının aşağı regüle edilmesi, iştahın bastırılması ile ilişkilidir.

- 20 *Cck* ve *Gcg* tokluk hormonlarına örnektir.

- Bir yönde *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini
- 25 içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) denekte iştahı uyarır, öyle ki denek, *Roseburia* flagellin ve/
- 30 veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen
- 35 polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya

*Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) uygulanmadan önceki denekle karşılaştırıldığında, en az % 5, % 10 veya % 15 daha fazla yemek tüketir. Ek olarak veya alternatif olarak, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) denekte iştahı uyarır, öyle ki 1 ay sonra deneğin ağırlığı, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) uygulanmadan önceki denekle karşılaştırıldığında, en az %2, % 5, veya % 10 veya % 15 daha yüksek olur.

Bir düzenlemede, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) bir deneğin kanında kolesitokinin (Cck) ve/ veya glukagon (Gcg) seviyesini azaltır.

Bir yönde *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla

(örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) bir deneğin kanında kolesitokinin (Cck) ve/ veya glukagon (Gcg) seviyesini *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) uygulanmadan önceki denekle karşılaştırıldığında, en az % 5, % 10, % 15 veya % 20 oranında azaltır.

Bir düzenlemede, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) bir deneğin bir hücrelerinde veya hücrelerinde kolesitokinini (Cck) kodlayan genin ifadesini ve/ veya glukagonu (Gcg) kodlayan genin ifadesini aşağı regüle eder.

Bir yönde *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri



türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) kolesitokinini (Cck) kodlayan genin ifadesi azaltılır, öyle ki ifade seviyesi *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) uygulanmadan önceki deneğin ifade seviyesi ile karşılaştırıldığında, en az % 5, % 10, % 15 veya % 20 daha düşük olur.

Bir yönde *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) glukagonu (Gcg) kodlayan genin ifadesi azaltılır, öyle ki ifade seviyesi *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) uygulanmadan önceki deneğin ifade seviyesi ile karşılaştırıldığında, en az % 5, % 10, % 15 veya % 20 daha düşük olur.

"Burada kullanıldığı şekliyle "sindirim kanalı sağlığının iyileştirilmesi" terimi sindirim kanalı veya bunun bir

kısmında enflamasyon seviyesinin azaltılmasını ve/ veya bağırsak mikrobiyotasının iyileştirilmesini ifade eder.

Bir düzenlemede, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki bir deneğin sindirim kanalındaki enflamasyon seviyesi ile karşılaştırıldığında, sindirim kanalındaki enflamasyon seviye en az % 10, % 20, % 30, % 40 veya % 50 daha az olur.

Bir düzenlemede, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) *Tlr5*, *Tlr1*, *Vnn1*, *Defb37*, *Pla2g*, *Muc16*, *Itln*, *Sprrla*, *Cldn4*, *Pmp22*, *Crb3*, *Magi3*, *Marveld3*, *Mpp7*, *Defcr20*, *Pcgf2*, *Ltbp4*, *Igsf8* ve *Tcfe2a*'dan seçilen en az bir genin ifadesini düzenler. Bu genlerin birçoğu bağırsak bariyer genleri ve antimikrobik maddelerdir ve dolayısıyla bağırsak patojenlerinin yayılmasını ve canlı patojen sayısını azaltmak için çalışırlar.

Bir düzenlemede, bir deneğin hücrelerinde veya hücrelerinde TLR'ye bağlı genler (ör. *Tlr5*, *Tlr1*, ve *Vnn1*), anti-mikrobiyal peptitleri kodlayan genler (ör. *Defb37*, *Pla2g*, *Muc16*, ve *Itln*), bağırsak bariyer fonksiyon genleri (ör. *Sprrla*, *Cldn4*, *Pmp22*, *Crb3*, ve *Magi3*), doğuştan gelen bağışıklık genlerinden (ör. *Defcr20*, *Pcgf2*, *Ltbp4*, *Igsf8* ve

*Tcfe2a*) meydana gelen gruptan seçilen bir veya daha fazla genin ifadesi yukarı regüle edilir.

Bir düzenlemede TLR'ye bağlı genler (ör. *Tlr5*, *Tlr1*, ve *Vnn1*), anti- mikrobiyal peptitleri kodlayan genler (ör. *Defb37*,  
5 *Pla2g*, *Muc16*, ve *Itln*), bağırsak bariyer fonksiyon genleri (ör. *Sprr1a*, *Cldn4*, *Pmp22*, *Crb3*, ve *Magi3*), doğuştan gelen bağışıklık genlerinden (ör. *Defcr20*, *Pcgf2*, *Ltbp4*, *Igsf8* ve *Tcfe2a*) meydana gelen gruptan seçilen bir veya daha fazla genin ifadesi artırılır, öyle ki *Roseburia* flagellin ve/ veya  
10 Fla polipeptidi (FlaA1 veya FlaA2 gibi) ve/ veya bahsedilen *Roseburia* flagellini ve/ veya adı geçen Fla polipeptidini (FlaA1 veya FlaA2 gibi) kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren konak hücre ve/ veya adı geçen  
15 polinükleotit dizisini içeren konak hücre ve/ veya *Roseburia* (bakteriyel türler *Roseburia hominis* , veya bakteri türleri *Roseburia intestinalis*) deneğe uygulanmadan önce denekteki seviyeyle karşılaştırıldığında seviye en az% 10, % 20, % 30, % 40 veya% 50 daha yüksek veya % 100 daha yüksek olur.

20 Bir düzenlemede, bir deneğin bir hücresinde veya hücrelerinde *Tlr5*, *Tlr1*, *Vnn1*, *Defb37*, *Pla2g*, *Muc16*, *Itln*, *Sprr1a*, *Cldn4*, *Pmp22*, *Crb3*, *Magi3*, *Marveld3*, *Mpp7*, *Defcr20*, *Pcgf2*, *Ltbp4*, *Igsf8* ve *Tcfe2a*'dan meydana gelen gruptan seçilen bir veya daha fazla genin ifadesi yukarı doğru düzenlenir.

25 Bir düzenlemede, *Tlr5*, *Tlr1*, *Vnn1*, *Defb37*, *Pla2g*, *Muc16*, *Itln*, *Sprr1a*, *Cldn4*, *Pmp22*, *Crb3*, *Magi3*, *Marveld3*, *Mpp7*, *Defcr20*, *Pcgf2*, *Ltbp4*, *Igsf8* ve *Tcfe2a*'dan meydana gelen gruptan seçilen bir veya daha fazla genin ifade seviyesi artırılır, öyle ki seviye *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1  
30 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir  
35 konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri

türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önce denekteki seviye ile karşılaştırıldığında, en az % 10, % 20, % 30, % 40 veya % 50 daha fazla veya % 100'den daha fazla olur.

- 5 Bir düzenlemede bir deneğin bir hücredeki veya hücrelerinde asetil- CoA asetiltransferaz, 3- hidroksiaçil- CoA dehidrojenaz, butiril- CoA dehidrojenaz ve fosfoenolpiruvat karboksi kinazı kodlayan genlerden oluşan gruptan seçilen bir veya daha fazla genin ifadesi modüle edilir.
- 10 Bir düzenlemede, asetil- CoA asetiltransferaz, 3- hidroksiaçil- CoA dehidrojenaz, butiril- CoA dehidrojenaz ve fosfoenolpiruvat karboksi kinazı [ATP] kodlayan genlerden oluşan gruptan seçilen bir veya daha fazla genin ifade seviyesi modüle edilir, öyle ki *Roseburia* flagellin ve/ veya
- 15 Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen
- 20 polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) deneğe uygulanmadan önceki seviye ile karşılaştırıldığında, seviye en az % 10, % 20, % 30, % 40 veya % 50 daha az veya daha fazla olur.
- 25 Bir başka yönde, bu buluş, dönüştürülmüş bir mikroorganizmayla ilgilidir (örneğin, bir Firmicutes örneğin *R. hominis* veya *R. intestinalis* gibi bir *Roseburia* spp), burada FlaA1 veya FlaA2 gibi bir flagellinin ifadesi (ör. *Roseburia* flagellin), dönüşümden ve tarif edildiği gibi çeşitli terapötik ve
- 30 besleyici kullanımlarından önce eşdeğer mikroorganizma ile karşılaştırıldığında güçlenmiştir. Örneğin, dönüştürülmüş mikroorganizma bir nükleotit dizisi (bir promotör gibi) ile dönüştürülmüş olabilir, öyle ki bir mikroorganizma FlaA1 veya FlaA2 gibi bir flagellini (ör. *Roseburia* flagellin) kodlayan
- 35 genin ifadesini yukarı düzenleme yeteneğine sahip olur. Başka

bir örnekte, dönüştürülmüş mikroorganizma işlevsel olarak düzenleyici bir diziye (bir promotör gibi) bağlı bir FlaA1 veya FlaA2 gibi bir flagellini (ör. *Roseburia* flagellin) kodlayan bir nükleotit dizisini içeren bir ifade vektörü ile dönüştürülmüş olabilir, öyle ki mikroorganizma, flagellini (ör. *Roseburia* flagellin) kodlayan geni aşırı ifade etme yeteneğine sahip olur.

Burada kullanıldığı haliyle, "ifade vektörü" terimi, bir konakta kodlayıcı dizinin ifadesini etkileyebilen bir veya daha fazla uygun kontrol dizisine(lerine) işlevsel olarak bağlı bir DNA kodlama dizisi (örneğin, gen dizisi) içeren bir DNA yapısını ifade eder. Bu tür kontrol dizileri, transkripsiyonu gerçekleştirmek için bir promotör, bu tür transkripsiyonu kontrol etmek için isteğe bağlı bir operatör dizisi, uygun mRNA ribozom bağlama yerlerini kodlayan bir dizi ve transkripsiyonun ve translasyonun sonlandırılmasını kontrol eden dizileri içerir. Vektör, bir plazmid, bir faj parçacığı veya sadece potansiyel bir genomik eklenti olabilir. Uygun bir konağa dönüştürüldükten sonra vektör konak genomundan bağımsız olarak çoğalabilir ve işlev görebilir, bazı durumlarda genoma entegre olabilir. Plazmid, ifade vektörünün en çok kullanılan biçimidir. Ancak, tarifnamenin, eşdeğer işlevleri yerine getiren ve teknikte bilinen veya bilinen hale gelen bu gibi diğer ifade vektör formlarını içermesi amaçlanmaktadır.

"İşlevsel şekilde bağlanmış" terimi, elemanların işlevsel olarak ilişkili olmasına izin veren bir düzenlemede olduğu yanı sıra durmayı ifade eder. Örneğin, bir promotör, kodlayıcı dizinin transkripsiyonunu kontrol ederse, bir kodlama dizisine işlevsel olarak bağlıdır.

## **Dokular**

Bir düzenlemede doku veya organ, sindirim kanalı veya bunun bir bölümü (örneğin özofagus, midey veya ince bağırsak veya kalın bağırsak ve kolon gibi bağırsak) veya başka bir mukozal bölgedir (burun geçitleri ve akciğerler).

Bir düzenlemede doku veya organ sindirim kanalı veya bunun bir parçasıdır.

- 5 Sindirim kanalı parçalarının örnekleri arasında, özofagus, mide ve bağırsacı (ince bağırsak (örneğin, duodenum, jejunum ve ileum) ve/ veya kalın bağırsak (örneğin, çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon ve sigmoid kolon) gibi) içerir.

### **Denek**

- 10 Bir düzenlemede denek bir monogastrik hayvandır.  
Monogastrik hayvan örnekleri arasında kümes hayvanları, insanlar, sıçanlar, domuzlar, köpekler, kediler, atlar ve tavşanlar bulunur.  
Başka bir düzenlemede denek bir monogastrik memeli gibi bir  
15 memelidir.  
Monogastrik memelilerin örnekleri hepçiller (insanlar, sıçanlar ve domuzlar gibi), etoburlar (köpekler ve kediler gibi) ve otoburları (atlar ve tavşanlar gibi) içerir.  
Bir düzenlemede denek bir insandır.  
20 Tipik olarak, TLR5, söz konusu kişinin hücrelerinde ifade edilebilir.

### **Bozukluklar**

- 25 *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir  
30 konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) bir denekte bir bozukluğun tedavisi için kullanılabilir, burada söz konusu bozukluk enflamatuar bir bozukluk ve/ veya otoimmün bir bozukluktur.

Bir düzenlemede enflamatuar bozukluk ve/ veya bir otoimmün bozukluk, bahsedilen kişinin sindirim kanalı veya bir bölümünü etkiler.

5 Bir düzenlemede enflamatuar bozukluk ve/ veya bir otoimmün bozukluk, bahsedilen kişinin bir mukozal bölgesini etkiler. Mukozal yerlerin örnekleri, sindirim kanalı veya bunun bir bölümü (örneğin özofagus, mide veya ince bağırsak veya kalın bağırsak ve kolon gibi bağırsak), burun geçitleri ve akciğerlerdir.

10 Bir düzenlemede enflamatuar bozukluk ve/ veya bir otoimmün bozukluk, romatoid artirit, sedef hastalığı, multipl skleroz, tip I diyabet, çölyak hastalığı, atopik dermatit, rinit, irritabl bağırsak sendromu (IBS), kolit, enflamatuar barsak hastalığı (IBD), ülseratif kolit, kese iltihabı, Crohn  
15 hastalığı, fonksiyonel dispepsi, atopik hastalıklar, nekrotizan enterokolit ve bunların kombinasyonlarından meydana gelen gruptan seçilir.

Bir yönüyle, enflamatuar bozukluk kolittir. İlave bir açıdan, enflamatuar hastalık Crohn hastalığı, ülseratif kolit veya  
20 kese iltihabıdır.

Bir yönde, enflamatuar bozukluk ve/ veya bir otoimmün bozukluk bağırsağı etkiler.

Bir yönde, bağırsak bozukluğu IBS'dir. IBS'nin kesin patofizyolojisi açıklığa kavuşturulmamıştır. Son yıllarda  
25 yapılan çalışmalar, IBS hastalarında mukozal enflamasyon ve bağırsak mikrobiyotasında değişiklikler ve bağırsak enfeksiyonları ile bir hastalık korelasyonu tanımlamıştır.

Başka bir yönde, bağırsak bozukluğu Crohn hastalığıdır.

Bir yönde, bozukluk otoimmün bir bozukluktur.

30 Bir yönde, otoimmün bozukluk ülseratif kolit, kese iltihabı, romatoid artirit, sedef hastalığı, multipl skleroz, tip I diyabet, alerjiler (çölyak hastalığı dahil), atopik dermatit ve rinitten oluşan gruptan seçilir.

Özellikle bağıışıklık toleransının düzeltilmesindeki işlevi  
35 nedeniyle, otoimmün hastalıklar, romatoid artirit, sedef

hastalığı, multipl skleroz, tip I diyabet özellikle önem taşımaktadır.

Burada kullanılan şekliyle "ilaç" terimi, insan ve hayvan tıbbında hem insan hem de hayvan kullanımı için olan ilaçları kapsar. Ek olarak burada kullanılan "ilaç" terimi, terapötik ve/ veya faydalı etki sağlayan herhangi bir madde anlamına gelir. Burada kullanılan "ilaç" terimi mutlaka Pazarlama Onayına ihtiyaç duyan maddelerle sınırlı değildir, ancak kozmetikler, nutrasötikler, gıda (örneğin yemler ve içecekler dahil), probiyotik kültürler, besin takviyeleri ve doğal ilaçları da içerebilir. Buna ek olarak, burada kullanılan "ilaç" terimi, hayvan yemine katılmak üzere tasarlanmış bir ürün, örneğin hayvancılık yemi ve/ veya evcil hayvan gıda maddelerini kapsar.

15

#### **Profilaktik uygulamalar**

*Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) buluşa göre aynı zamanda profilaktik uygulamalar için kullanılabilir. Profilaktik uygulamalarda, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla polipeptidi (FlaA1 veya FlaA2 gibi) ve/ veya bahsedilen polipeptidi kodlayan polinükleotid dizisi *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla polipeptidi (FlaA1 veya FlaA2 gibi) ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren konakçı hücre ve/ veya adı geçen polinükleotid dizisini içeren konakçı hücre ve/ veya *Roseburia* (bakteriyel türler *Roseburia hominis* , veya bakteri türleri *Roseburia intestinalis*), buluşa göre bir hastalığa yakalanma riskini en azından kısmen azaltmak için yeterli olan bir

35



miktarda belirli bir hastalığa yakalanmaya yatkın veya başka şekilde risk altındaki bir hastaya verilir. Böyle bir miktar "profilaktik etkili doz" olarak tanımlanır. Kesin miktarlar, kişinin sağlık durumu ve kilo durumu gibi belirli faktörlere 5 bağlıdır.

### **Kapsülleme**

Bir düzenlemede, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini 10 ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri 15 türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) kapsülленir.

Diğer bir düzenlemede, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) 20 polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia*'yı (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya 25 *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) içeren farmasötik bileşim kapsülленir.

Diğer bir düzenlemede, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) 30 polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia*'yı (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya

*Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) içeren besin takviyesi kapsülленir.

Bir başka düzenlemede, yem, gıda ürünü, diyet takviyesi veya gıda katkı maddesi kapsülленir.

- 5 Burada kullanıldığı şekliyle "kapsülленmiş" terimi, polipeptiti ve/ veya polinükleotit dizisini ve/ veya vektörü ve/ veya konak hücrelerini ve/ veya *Roseburia*'yı ( *Roseburia hominis* bakteriyel türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteriyel türleri gibi) fiziksel yolla ayırarak uygun olmayan
- 10 bir çevreden korumak için bir aracı ifade eder, böylece polipeptidin ve/ veya polinükleotit dizisinin ve/ veya vektörün ve/ veya konak hücrenin ve / veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteriyel türleri gibi) (örneğin, bağırsak gibi) hedef
- 15 bölgede bir etkiye sahip olabilmesi için degradasyona uğramadan veya önemli derecede degradasyona uğramadan hedef bölgeye (örneğin bağırsak) verilebilir. Buna verilebilecek bir örnek enterik kaplı bir kapsüldür.

- Kapsülленmenin amacı, polipeptidin ve/ veya polinükleotit
- 20 dizisinin ve/ veya vektörün ve/ veya konak hücrenin ve/ veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) çevreden izolasyonudur, koruyucu kaplama veya kabuk, arzulanan eylem anında parçalanmalıdır. Koruyucu kaplamanın veya kabuğun
- 25 parçalanması tipik olarak basınç, enzim saldırısı, kimyasal reaksiyon ve fiziksel parçalanma gibi kimyasal ve fiziksel uyarıların uygulanması yoluyla sağlanır.

- Örneğin, kapsülleme, polipeptidin ve/ veya polinükleotit dizisinin ve/ veya vektörün ve/ veya konak hücrenin ve/ veya
- 30 *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* bakteri türleri *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) yutulmasını sağlar, böylece polipeptit ve/ veya polinükleotit dizisi ve/ veya vektör ve/ veya konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* bakteri türleri *Roseburia intestinalis* bakteriyel türleri gibi)

bağırsakta bir etki meydana getirmek için etkili olan bir miktarda bağırsağa (yani hedef bölge) verilebilir.

### **Farmasötik bileşim**

- 5 Farmasötik bileşim herhangi bir farmasötik bileşim olabilir. Bir yönde, farmasötik bileşim oral, enteral veya rektal olarak uygulanmak içindir. Örneğin, bileşim yenilebilir bir bileşim olabilir. "Yenilebilir" insan veya hayvan tüketimi için onaylanmış bir malzeme anlamına gelir.
- 10 Farmasötik bileşimler, insan ve veterinerlik tıbbında insan veya hayvan kullanımı için olabilir. Burada tarif edilen çeşitli farmasötik bileşim formları için uygun eksipiyanalara örnekler "Handbook for Pharmaceutical Excipients, 2. Baskı, (1994), A Wade ve PJ Welle tarafından
- 15 açıklanmıştır. Terapötik kullanım için kabul edilebilir taşıyıcılar veya seyrelticiler farmasötik alanında iyi bilinmektedir ve örneğin Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R Gennaro edit.1985) kitabında açıklanmaktadır.
- 20 Uygun taşıyıcılara örnek olarak laktoz, nişasta, glikoz, metil selüloz, magnezyum stearat, manitol, sorbitol ve benzerleri verilebilir. Uygun seyrelticilere örnek olarak etanol, gliserol ve su verilebilir. Farmasötik taşıyıcı, eksipiyen veya seyrelticinin seçimi,
- 25 planlanan uygulama yolu ve standart farmasötik uygulamaya göre seçilebilir. Farmasötik bileşimler taşıyıcı, eksipiyen veya seyrelticiden oluşabilir veya ek olarak uygun bağlayıcı(lar), kayganlaştırıcı(lar), süspansiyonlaştırma ajan(lar)ı, kaplama ajan(lar)ı, çözündürücü ajan(lar) içerebilir.
- 30 Uygun bağlayıcıların örnekleri nişasta; jelatin; glikoz, susuz laktoz, serbest akışlı laktoz, beta- laktoz, mısır tatlandırıcıları gibi doğal şekerleri; akasya, kitre veya sodyum alginat gibi doğal ve sentetik gamları; karboksimetil selüloz ve polietilen glikolü içerir.

Uygun kaydırıcı maddelerinin örnekleri arasında sodyum oleat, sodyum stearat, magnezyum stearat, sodyum benzoat, sodyum asetat, sodyum klorür ve benzerleri yer alır.

5 Farmasötik bileşimde koruyucular, stabilizatörler, boyalar ve hatta aroma maddeleri bulunabilir. Koruyucuların örnekleri arasında, sodyum benzoat, sorbik asit ve p- hidroksibenzoik asit esterleri bulunmaktadır. Antioksidanlar ve süspansiyonlaştırma ajanları da kullanılabilir.

#### 10 **Besin takviyeleri**

Beslenme açısından kabul edilebilir taşıyıcılar, seyrelticiler ve ekşi piyanlar, insan veya hayvan tüketimi için uygun olanları ve gıda endüstrisinde standart olarak kullanılanları içerir. Alanında uzman kimse, tipik beslenme bakımından kabul  
15 edilebilir taşıyıcılar, seyrelticiler ve ekşi piyanlara aşinadır.

#### **Yemler / ürünler**

Buluşun bir diğer yönü *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla  
20 (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen  
25 polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) içeren yemler, gıda ürünleri, diyet takviyeleri ve gıda katkı maddeleri ile ilgilidir.

30 Burada kullanılan "besin maddesi", "gıda ürünü", "gıda katkı maddesi" ve "besin takviyesi" terimlerinin katı, jöle veya sıvı olabilen tüm tüketilebilir ürünleri kapsaması amaçlanmaktadır.

Uygun gıda ürünleri, örneğin fonksiyonel gıda ürünleri, gıda  
35 bileşimleri, evcil hayvan gıda maddeleri, hayvancılık yemi,

sağlıklı besinler, yemler ve benzerini içerebilir. Bir yönde, gıda ürünü sağlıklı bir besindir.

Burada kullanıldığı şekliyle "fonksiyonel gıda ürünü" terimi, sadece besleyici bir etki değil, fakat aynı zamanda tüketicie bir başka yararlı etki de sağlayabilen gıda anlamına gelir. Buna göre fonksiyonel gıdalar, gıdaya yalnızca besleyici olan etkiden başka spesifik bir fonksiyon (ör. , tıbbi veya fizyolojik yararlar) kazandıran bileşenlere veya malzemelere (burada açıklananlar gibi) sahip normal gıdalardır.

10 Bu buluşa uygulanabilir spesifik gıda ürünlerinin örnekleri, süt esaslı ürünler, yemeye hazır tatlılar, örneğin süt veya su ile yeniden yapılandırılan tozlar, çikolatalı süt içecekleri, malt içecekleri, hazır yemekler, insanlar için hemen hazırlanan yemekler veya içecekler veya evcil hayvanlar veya hayvancılık için tasarlanmış eksiksiz veya kısmi bir diyeti temsil eden gıda bileşimlerini içerir.

Bir yönde, mevcut buluşa göre yem, gıda ürünü, diyet takviyesi veya gıda katkı maddesi, insanlar, evcil hayvanlar veya monogastrik hayvanlar gibi hayvanlar için düşünülmüştür. Yem, 20 gıda ürünü, diyet ilave maddesi veya gıda katkı maddesi köpekler, kediler, domuzlar, atlar veya kanatlılardan oluşan gruptan seçilen hayvanlara yönelik olabilir. Bir başka düzenlemede, gıda ürünü, diyet takviyesi veya gıda katkı maddesi, yetişkin türler, özellikle de yetişkin insanlara 25 yönelik olabilir.

Burada kullanılan şekliyle "süt bazlı ürün" terimi, değişen bir yağ içeriğine sahip herhangi bir sıvı veya yarı katı süt veya peynir altı suyu esaslı ürünü ifade eder. Süt bazlı ürün; örneğin, inek sütü, keçi sütü, koyun sütü, yağsız süt, tam 30 yağlı süt, herhangi bir işleme tabi tutulmadan süt tozundan ve peynir altı suyundan tekrar bir araya getirilen süt, veya yoğurt, süt kesiği, lor, ekşi süt, ekşi tam yağlı süt, kreması alınmış süt ve diğer ekşi süt ürünleri gibi işlenmiş bir ürün olabilir. Bir başka önemli grup, peynir altı suyu içecekleri, 35 fermente sütler, yoğunlaştırılmış sütler, bebek veya bebek

sütleri gibi sütlü içecekleri; aromalı sütler, dondurma; şekerleme gibi süt içeren yiyecekleri içerir.

Mevcut buluşa ait yemler, gıda ürünleri, diyet takviyeleri veya gıda katkı maddeleri, burada diyet veya beslenme 5 takviyeleri veya gıda katkı maddeleri olarak da anılacak olan gıda takviyeleri olabilir veya bunlara eklenebilir.

Buluşa göre yemler, gıda ürünleri, besin takviyeleri veya gıda katkı maddeleri, özellikle erken yetiştirme döneminde ve büyüyen besi periyodunda hayvan beslemede (örneğin domuz 10 besiciliğinde) kullanılabilir. Besin maddeleri, gıda ürünleri, besin takviyeleri veya gıda katkı maddelerinin, bağışıklık fonksiyonunu arttırması, bulaşıcı hastalıkları azaltması ve önlemesi, mikrobiyota bileşimini faydalı bir şekilde değiştirmesi ve örneğin artan yem dönüştürme etkinliği ile 15 hayvanların büyümesini ve performansını artırması beklenmektedir.

#### **Probiyotikler veya canlı biyoterapötik ürün**

*Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) 20 polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir 25 konak hücre ve/ veya *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) probiyotik ve canlı biyoterapötik üründe kullanılabilir.

Buluşun bir diğer yönü *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* 30 flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya 35 *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya

*Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) içeren bir probiyotik bileşimle ilgilidir.

Burada kullanıldığı şekliyle "probiyotik" terimi, konağın sağlığı veya esenliği üzerinde yararlı bir etkiye sahip olan mikrobik hücre preparatları veya mikrobik hücrelerin bileşenleri anlamına gelir. (Salminen S, Ouwehand A. Benno Y. vd "Probiotics: how should they be defined" Trends Food Sci. Technol 1999: 10 107- 10).

Bir yönüyle, probiyotik bileşim, metabolik olarak aktif, yani canlı ve/ veya liyofilize edilmiş veya canlı olmayan ısı ile öldürülmüş, ısıtılmış veya lize edilmiş probiyotik bakterilerin oral olarak uygulanabilir bir bileşimidir. Probiyotik bileşim, başka maddeleri de içerebilir. Probiyotik bileşim oral olarak, yani bir tablet, kapsül veya toz şeklinde verilebilir. Probiyotik bileşim, bakteri türleri *R. hominis* veya *R. intestinalis*'i içerebilir. Anaerob oldukları için *R. hominis* ve *R. intestinalis* için kapsüllenmiş ürünler tercih edilir. Diğer bileşenler (örneğin, C vitamini gibi), oksijen temizleyiciler ve prebiyotik substratlar (bunlar kolonizasyon ve sağkalımı *in vivo* olarak iyileştirebilir) olarak dahil edilebilir Alternatif olarak, buluşa ait probiyotik bileşim, süt veya peynir altı suyuna dayanan fermente süt ürünleri veya farmasötik bir ürün gibi bir gıda veya besleyici ürün olarak oral yolla verilebilir.

Probiyotik bakterilerin uygun bir günlük dozu yaklaşık  $1 \times 10^3$  ila yaklaşık  $1 \times 10^{11}$  koloni oluşturun birim (CFU); örneğin yaklaşık  $1 \times 10^7$  ila yaklaşık  $1 \times 10^{10}$  CFU; başka bir örnekte yaklaşık  $1 \times 10^6$  yaklaşık  $1 \times 10^{10}$  CFU'dur.

Bir yönüyle, probiyotik bileşim, aktif terkip maddeleri olarak bakteriyel türleri ve/ veya bunların hücresel bileşenlerini bileşimin ağırlığına göre yaklaşık  $1 \times 10^6$  ila yaklaşık  $1 \times 10^{11}$  CFU / g; örneğin yaklaşık  $1 \times 10^8$  ila yaklaşık  $1 \times 10^{10}$  CFU / g arasında bir miktarda içerir. Doz 1 g, 3 g, 5 g ve 10 g olabilir.

Tipik olarak, bir probiyotik isteğe bağlı olarak en az bir uygun prebiyotik bileşik ile birleştirilir. Prebiyotik genellikle, oligosakkarit veya polisakkarit gibi sindirilmeyen bir karbonhidrat veya üst sindirim sisteminde parçalanmayan veya emilen şeker alkolüdür. Bilinen prebiyotikler, inülin ve transgalakto- oligosakkaritler gibi ticari ürünlerdir.

Bir yönde, bu buluşun probiyotik bileşimi, toplam bileşimin ağırlığına göre ağırlıkça yaklaşık % 1 ila yaklaşık % 30 (örneğin ağırlıkça % 5 ila % 20) miktarında bir prebiyotik içerir. Karbonhidratlar aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilebilir: frükto- oligosakaritler (veya FOS), kısa zincirli frükto- oligosakaritler, inülin, izomalt- oligosakaritler, pektinler, ksilo- oligosakaritler (veya XOS), kitosan- oligosakaritler (veya COS), beta- gluklanlar, modifiye tarıma uygun gam ve dirençli nişastalar, polidekstroz, D- tagatoz, akasya lifleri, keçiboynuzu, yulaf ve turuncgil lifleri. Bir yönde, prebiyotikler kısa zincirli frükto- oligosakaritlerdir (basitlik için burada aşağıda FOSlar- cc olarak gösterilmektedir); söz konusu FOS- cc, genellikle pancar şekerinin dönüştürülmesiyle elde edilen sindirilebilir karbonhidrat değildir ve üç glikoz molekülünün bağlandığı bir sakkaroz molekülü içerir.

### **Uygulama**

Bu buluşun farmasötik bileşimleri, besleyici takviyeleri, yem maddeleri, gıda ürünleri, diyet takviyeleri veya gıda katkı maddeleri, oral, rektal, vajinal, parenteral, intramüsküler, intraperitoneal, intraarteriyel, intratekal, intrabronşiyal, subkütan, intradermal, intravenöz, nazal, bukkal veya dil altı uygulama yolları için adapte edilebilir.

Bir yönde, bu buluşun farmasötik bileşimleri, besleyici takviyeleri, yem maddeleri, gıda ürünleri, diyet takviyeleri veya gıda katkı maddeleri, oral, rektal, vajinal, parenteral, nazal, bukkal veya dil altı için adapte edilir.



Bir başka yönde, bu buluşun farmasötik bileşimleri, besleyici takviyeleri, yem maddeleri, gıda ürünleri, diyet takviyeleri veya gıda katkı maddeleri, oral uygulama için adapte edilir.

Oral uygulama için özel kullanım sıkıştırılmış tabletler,

5 haplar, tabletler, jelüller, damlalar ve kapsüllerden oluşur.

Diğer uygulama şekilleri intravenöz, intraarteriyal, intratekal, subkütan, intradermal, intraperitoneal veya intramüsküler olarak enjekte edilebilir ve steril veya sterilize edilebilir çözeltilerden hazırlanan çözeltileri veya emülsiyonları içerir. Bu buluşun farmasötik bileşimleri fitiller, ovüller, süspansiyonlar, emülsiyonlar, losyonlar, merhemler, kremler, jeller, spreyler, çözeltiler ya da toz biçiminde de olabilir.

Transdermal uygulamaya alternatif bir yol, bir cilt yaması kullanılarak yapılır. Örneğin aktif bileşen, bir polietilen glikol veya sıvı parafin emülsiyonundan oluşan bir kreme dahil edilebilir. Başka bir örnekte, aktif bileşen, beyaz mumdan veya beyaz yumuşak parafin bazından ve gerekli olabilecek stabilizatörler ve koruyucu maddelerden oluşan bir merhem içine de eklenebilir.

Farmasötik bileşimler, besin takviyeleri, yemler, gıda ürünleri, diyet takviyeleri veya gıda katkı maddeleri birim dozaj formunda, yani bir birim doz içeren ayrı bölümler şeklinde veya bir birim dozun çoklu veya alt birimi şeklinde formüle edilebilir.

### **Dozaj**

Alanında uzman bir kimse, *Roseburia* flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya *Roseburia* flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya *Roseburia*'nın (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya

Roseburia intestinalis bakteri türleri gibi) çok sayıda deneye gerek kalmadan bir deneğe uygulanması için kolayca uygun bir dozu belirleyebilir. Genellikle, bir hekim, bireysel bir hasta için en uygun olan gerçek dozaı belirleyecektir ve bu, 5 kullanılan spesifik bakteri suşunun aktivitesi, metabolik stabilite ve bu suşun etkisinin uzunluğu, yaş, vücut ağırlığı, genel sağlık, cinsiyet, diyet, uygulama şekli ve zamanı, boşaltım hızı, ilaç kombinasyonu, özel durumun şiddeti ve 10 terapiye maruz kalan bireye bağılı olacaktır. Burada açıklanan dozajlar, ortalama vaka örneğidir. Tabii ki, daha yüksek ya da daha düşük dozaj aralıklarının uygun olduğı ve bu buluşun kapsamı içinde yer alan bireysel örnekler olabilir.

### **Kombinasyonlar**

15 Bir yönde Roseburia flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya Roseburia flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak 20 hücre ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya Roseburia (Roseburia hominis, bakteri türleri veya Roseburia intestinalis bakteri türleri gibi) en az bir veya iki veya üç veya dört veya beş diğerk aktif ajanın kombinasyonu ile uygulanır. Bu gibi durumlarda, Roseburia 25 flagellin ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidi ve/ veya Roseburia flagellini ve/ veya Fla (örneğin FlaA1 veya FlaA2) polipeptidini kodlayan polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya adı geçen 30 polinükleotit dizisini içeren bir konak hücre ve/ veya Roseburia (Roseburia hominis , bakteri türleri veya Roseburia intestinalis bakteri türleri gibi) deneğe bir veya daha fazla diğerk aktif ajanla birlikte peş peşe, eş zamanlı olarak veya ayrı ayrı uygulanabilir.

En az bir veya iki veya üç veya dört veya beş diğer aktif ajan aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilebilir: *Roseburia* flagellinler, Fla polipeptidi (FlaA1 veya FlaA2 gibi), söz konusu *Roseburia* flagellini kodlayan polinükleotit dizi(ler)i, söz konusu Fla polipeptidini (FlaA1 veya FlaA2 gibi) kodlayan polinükleotit dizi(ler)i, söz konusu polinükleotit dizi(ler)ini içeren vektör(ler), söz konusu vektör(ler)i içeren konak hücre(ler), söz konusu polinükleotit dizi(ler)ini içeren konak hücre(ler) ve mikroorganizmalar (ör. *R. hominis* ve/ veya *R. intestinalis* gibi *Roseburia*). En az bir veya iki veya üç veya dört veya beş diğer aktif madde bir mikroorganizma olabilir (ör. *R. hominis* ve/ veya *R. intestinalis* gibi *Roseburia*). Uygun mikroorganizmalara örnekler şunları içerir: *Roseburia hominis* A2- 183 ve *Roseburia intestinalis* L1- 82.

#### **Dizi Kimliği veya Dizi Homolojisi**

Burada "polipeptit", "polipeptit dizisi", "protein" ve "amino asit dizisi" terimleri birbirinin yerine kullanılabilir. Burada "polinükleotit dizisi" ve "nükleotit dizisi" terimleri birbirlerinin yerine kullanılabilir. Mevcut buluş aynı zamanda, burada açıklanan bir polipeptidin amino asit dizi(ler)i ile (ör. varyantlar, homologlar ve türevler) veya böyle bir polipeptidi kodlayan herhangi bir nükleotit dizisi (bundan böyle "homolog" diziler olarak anılacaktır) ile dizi benzerliği derecesi veya dizi homolojisine sahip dizilerin kullanımını da kapsar. Burada, "homolog" terimi, söz konusu amino asit dizileri ve söz konusu nükleotit dizileri ile belirli bir homolojiye sahip olan bir varlık anlamına gelir. Burada "homoloji" terimi "kimlik" ile eşleştirilebilir.

Mevcut bağlamda, homolog bir dizi, bazı düzenlemelerde söz konusu dizi ile en az % 50, % 60, % 70, % 75, % 80, % 85 veya % 90 özdeş olabilen, bazı düzenlemelerde en az % 5, % 96, % 97, % 98 veya % 99 özdeş olabilen bir amino asit veya bir

- nükleotit dizisi içerecek şekilde alınır. Her ne kadar homoloji benzerlik (yani, benzer kimyasal özelliklere / işlevlere sahip olan amino asit kalıntıları) olarak düşünülebilirse de, mevcut buluş bağlamında, homologluğun dizi kimliği cinsinden ifade edilmesi tercih edilir.
- Bazı düzenlemelerde homolog bir dizi, söz konusu diziyle karşılaştırıldığında bir veya daha fazla ekleme, silme ve/veya süstitüsyona sahip olan bir amino asit dizisi veya nükleotit dizisi içerecek şekilde alınır.
- 10 Bazı düzenlemelerde mevcut buluş, amino asit dizisi burada gösterilen bir proteinin veya ana proteinin amino asit dizisinde ör. , 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 amino asit veya daha fazla amino asit gibi, örneğin 10 veya 10'dan fazla amino asit gibi bir veya birkaç amino asidin süstitüsyonu, silinmesi
- 15 veya eklenmesiyle bu (ana) proteinden türetilen bir proteinin kullanılması ile ilgilidir.
- Bazı düzenlemelerde mevcut buluş, amino asit dizisi burada gösterilen bir proteini kodlayan veya ana proteinin amino asit dizisinde ör. , 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 amino asit veya daha
- 20 fazla amino asit gibi, örneğin 10 veya 10'dan fazla amino asit gibi bir veya birkaç amino asidin süstitüsyonu, silinmesi veya eklenmesiyle bu (ana) proteinden türetilen bir proteini kodlayan bir nükleik asit dizisinin (veya geninin) kullanılması ile ilgilidir.
- 25 Mevcut bağlamda, homolog bir dizi, bazı düzenlemelerde burada açıklanan bir polipeptidi (söz konusu dizi) kodlayan bir nükleotit dizisi ile en az % 50, % 60, % 70, % 75, % 80, % 85 veya % 90 özdeş olabilen, bazı düzenlemelerde en az % 5, % 96, % 97, % 98 veya % 99 özdeş olabilen bir nükleotit dizisi
- 30 içerecek şekilde alınır. Tipik olarak, homologlar, söz konusu dizi gibi bölge(ler) vs. için kodlayan aynı veya eşdeğer dizileri içerecektir. Her ne kadar homoloji benzerlik (yani, benzer kimyasal özelliklere / işlevlere sahip olan amino asit kalıntıları) olarak düşünülebilirse de, mevcut buluş

bağlamında, homologluğun dizi kimliği cinsinden ifade edilmesi tercih edilir.

Homolog amino asit dizisi ve/ veya nükleotit dizisi, fonksiyonel aktiviteyi muhafaza eden ve/ veya polipeptidin aktivitesini arttıran bir polipeptit sağlayabilir ve/ veya kodlayabilir.

Bazı yönlerde, burada açıklanan bir amino asit dizisi, söz konusu dizi ile en az % 50, % 60, % 70, % 75, % 80, % 85 veya % 90 özdeşliğe, bazı düzenlemelerde en az % 95, % 96, % 97, % 98 veya % 99 özdeşliğe sahiptir.

Bazı yönlerde, burada açıklanan bir amino asit dizisi, söz konusu dizi ile en az % 50, % 60, % 70, % 75, % 80, % 85 veya % 90 özdeşliğe, bazı düzenlemelerde en az % 95, % 96, % 97, % 98 veya % 99 özdeşliğe sahiptir.

Homoloji karşılaştırmaları, gözle veya daha genelde kolaylıkla elde edilebilen dizi karşılaştırma programlarıyla gerçekleştirilebilir. Bu, piyasada bulunan bilgisayar programları, iki veya daha fazla dizi arasındaki % homolojiyi hesaplayabilir.

% Homoloji, bitişik diziler üzerinde hesaplanabilir, yani bir dizi diğer dizi ile hizalanır ve bir dizi içindeki her amino asit, bir seferde bir kalıntı olmak üzere diğer dizi içindeki mukabil amino asit ile doğrudan karşılaştırılır. Buna "boşluksuz" hizalama denir. Tipik olarak, bu gibi boşluksuz hizalamalar yalnızca nispeten kısa sayıdaki kalıntılar üzerinde gerçekleştirilir.

Bu çok basit ve tutarlı bir yöntem olmasına rağmen, örneğin başka türlü özdeş olan dizi çiftinde bir ekleme veya silmenin aşağıdaki amino asit kalıntılarının hizalamadan çıkarılmasına neden olacağını dikkate almaz; böylece küresel bir hizalama yapıldığında, potansiyel olarak homolojide büyük bir % azalmayla sonuçlanır. Sonuç olarak, çoğu dizi karşılaştırma yöntemi, genel homoloji skorunu gereğinden fazla cezalandırmaksızın olası ekleme ve silmeleri göz önüne alan en iyi hizalamaları üretmek üzere tasarlanmıştır. Bu, lokal

homolojiyi maksimize etmeye çalışmak için dizi hizalamasına "boşluklar" ekleyerek başarılır.

Bununla birlikte, bu daha karmaşık yöntemler, hizalamada ortaya çıkan her aralığa "boşluk cezaları" verir; böylece,

5 aynı sayıda özdeş amino asitler için, mümkün olduğunca az boşluğa sahip bir dizi hizalaması - karşılaştırılan iki dizi arasında daha yüksek ilişkiyi yansıtır- boşlukları çok olanlardan daha yüksek bir puan alacaktır. "Afin boşluk bedelleri" tipik olarak, bir boşluğun varlığı için nispeten  
10 yüksek bir bedel ve boşluğun her bir sonraki kalıntısı için daha az ceza kesmek için kullanılır. Bu, en sık kullanılan boşluk skorlama sistemidir. Yüksek boşluk cezaları, tabii ki daha az aralıkla optimize edilmiş hizalama üretir. Pek çok hizalama programı boşluk cezalarının değiştirilmesine izin  
15 verir. Genellikle, dizilim karşılaştırmaları için böyle bir yazılımı kullanırken varsayılan değerler kullanılır.

Dolayısıyla, maksimum homoloji oranının hesaplanması, öncelikle boşluk cezaları göz önüne alınarak optimum hizalama üretilmesini gerektirir. Böyle bir uyumu gerçekleştirmek için

20 uygun bir bilgisayar programı Vector NTI'dir (Invitrogen Corp.). Dizi karşılaştırmalarını gerçekleştirebilen yazılım örnekleri, bunlarla sınırlı olmamak üzere örneğin BLAST paketi (bkz. Ausubel vd. 1999 Short Protocols in Molecular Biology, 4. Baskı - Bölüm 18), BLAST 2 (bkz. FEMS Microbiol Lett 1999  
25 174 (2): 247- 50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187- 8 [vetatiana@ncbi.nlm.nih.gov](mailto:vetatiana@ncbi.nlm.nih.gov)), FASTA (Altschul vd. 1990 J. MoL BioL 403- 410) ve AlignX'i içerir. En azından BLAST, BLAST 2 ve FASTA, çevrimdışı ve çevrimiçi arama için kullanılabilir (bkz. Ausubel vd. 1999, sayfa 7- 58 ila 7- 60).

30 Son % homoloji, kimlik bakımından ölçülebilmesine rağmen, hizalama süreci tipik olarak hepsi veya hiç biri çift karşılaştırmaya dayanmaz. Bunun yerine, kimyasal benzerliğe veya evrimsel uzaklığa dayalı olarak her çift karşılaştırmaya puan atayan ölçekli bir benzerlik skor matrisi kullanılır. Bu  
35 tür bir matrisin yaygın olarak kullanılan bir örneği BLASTUM62

matrisidir - BLAST program paketleri için varsayılan matris. Vektör NTI programları genel olarak ortak varsayılan değerleri veya sağlandıysa özel bir simge karşılaştırma tablosunu kullanır (daha ayrıntılı bilgi için kullanım kılavuzuna bakınız). Bazı uygulamalar için, Vector NTI paketi için varsayılan değerleri kullanmak tercih edilir.

Alternatif olarak, yüzde homolojileri, CLUSTAL'e benzer bir algoritmaya dayanan Vector NTI'deki (Invitrogen Corp. ) çoklu hizalama özelliğini kullanarak hesaplanabilirHiggins DG & Sharp PM (1988), Gene 73 (1), 237- 244).

Yazılım optimal bir hizalama oluşturduktan sonra, % homoloji, örneğin % dizi kimliği hesaplamak mümkündür. Yazılım genellikle bunu dizilim karşılaştırmasının parçası olarak yapar ve sayısal bir sonuç üretir.

Dizi kimliği belirlenirken Boşluk Cezaları kullanılırsa, örneğin aşağıdaki parametreler çiftli hizalama için kullanılabilir:

|                 |      |         |        |
|-----------------|------|---------|--------|
| BLAST İÇİN      |      |         |        |
| BOŞLUK AÇIK     |      |         | 0      |
| BOŞLUK UZANTISI |      |         | 0      |
| CLUSTAL İÇİN    | DNA  | PROTEİN |        |
| KELİME BOYUTU   | 2    | 1       | K üçlü |
| BOŞLUK CEZASI   | 15   | 10      |        |
| BOŞLUK UZANTISI | 6.66 | 0.1     |        |

Bir düzenlemede CLUSTAL, yukarıda tanımlandığı gibi ayarlanmış boşluk cezası ve boşluk uzantısıyla kullanılabilir.

Bir düzenlemede bir nükleotit dizisi ile ilgili kimlik derecesi, en azından 20 bitişik nükleotit üzerinden, örneğin en az 30 bitişik nükleotit, örneğin en az 40 bitişik nükleotit üzerinden, örneğin en az 50 bitişik nükleotit üzerinden, örneğin en azından 100 bitişik nükleotit üzerinden, örneğin en az 200 bitişik nükleotit üzerinden, örneğin en az 300 bitişik

nükleotit üzerinden, en azından 60 bitişik nükleotit üzerinden belirlenir.

Bir düzenlemede bir nükleotit dizisine ilişkin kimlik derecesi, tüm diziler üzerinden belirlenebilir.

5

### **Rekombinant**

Bir yönde, mevcut buluşta kullanılmak üzere *Roseburia* flagellin polipeptit ve /veya polinükleotit dizisi bir rekombinant dizi, yani rekombinant DNA teknikleri kullanılarak

10 hazırlanmış bir dizidir.

Bu rekombinant DNA teknikleri alanında uzman kişilerin yetenekleri dahilindedir. Bu teknikler literatürde, örneğin J. Sambrook, E. F. Fritsch ve T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, İkinci Baskı, Kitaplar 1- 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press belgesinde

15 açıklanmaktadır.

### **Sentetik**

Bir yönde, mevcut buluşta kullanılmak üzere *Roseburia* flagellin polipeptit ve /veya polinükleotit dizisi bir sentetik dizi, yani *in vitro* kimyasal veya enzimatik teknikler kullanılarak hazırlanmış bir dizidir. Bunlar, bunlarla sınırlı olmamak üzere, konak organizmalar için en uygun kodon kullanımı ile yapılan dizileri - örneğin metilotropik mayalar

25 *Pichia* ve *Hansenula*- içerir.

### **Enzimlerin ifadesi**

Bu buluşta kullanılmak üzere nükleotit dizisi, rekombinant kopyalanabilir bir vektöre dahil edilebilir. Vektör, nükleotit

30 dizisini, protein formunda, uyumlu bir konak hücrede ve/ veya hücreden çoğaltmak ve ifade etmek için kullanılabilir.

İfade, kontrol dizileri, örneğin düzenleyici diziler kullanılarak kontrol edilebilir.

Bir konak rekombinant hücre tarafından nükleotit dizisinin

35 ifadesi ile üretilen protein salınabilir veya kullanılan



diziye ve/ veya vektöre bağılı olarak hücre içinde tutulabilir. Kodlama dizileri, belirli kodlama dizilerinin belirli bir prokaryotik veya ökaryotik hücre zarından salınmasını yönlendiren sinyal dizileri ile dizayn edilebilir.

5

### **İfade vektörü**

Bir yönüyle, bu buluş, en az bir *Roseburia* flagellini kodlayan en az bir polinükleotit dizisini içeren bir vektörle (örneğin bir ifade vektörü gibi) ilgilidir.

- 10 "İfade vektörü" terimi, *in vivo* veya *in vitro* ifade yeteneğine sahip bir yapı anlamına gelir.

Bir düzenlemede ifade vektörü uygun bir konakçı organizmanın genomuna dahil edilir. Bir yönde "dahil edilen" terimi, genomun içine stabil bir şekilde katılmayı kapsar.

- 15 Mevcut tarifnamenin nükleotit dizisi, nükleotit dizisinin uygun bir konak hücre veya konak organizma tarafından nükleotit dizisinin ifadesini sağlayabilen düzenleyici dizilere işlevsel olarak bağılı olduğu bir vektörde mevcut olabilir.

- 20 Mevcut buluşta kullanılmak üzere vektörler, mevcut tarifnamenin bir polipeptidinin ifadesini sağlamak için burada tarif edildiği gibi uygun bir konak hücreye veya konak organizmaya dönüştürülebilir.

Vektör seçimi ör. Bir plazmid, kozmid veya faj vektörü,

- 25 çoğunlukla içine sokulduğu konak hücreye bağımlı olacaktır.

Bu buluşta kullanılmak üzere vektörler, antibiyotik direnci örneğin ampisilin, kanamisin, kloramfenikol veya tetrasiklin direnci kazandıran bir gen gibi bir veya daha fazla seçilebilir markör geni içerebilir. Alternatif olarak, seçim,

- 30 (W091 / 17243 belgesinde açıklandığı gibi) birlikte dönüştürme ile gerçekleştirilebilir.

Vektörler *in vitro* olarak, örneğin RNA üretimi için veya bir konak hücreyi transfekte etmek, dönüştürmek, buna kalıt aktarmak veya enfekte etmek için kullanılabilir.

Bu nedenle, bir başka düzenlemede, tarifname, mevcut tarifnamenin bir nükleotit dizisinin kopyalanabilir bir vektöre dahil edilmesiyle, vektörün uyumlu bir konak hücreye sokulması ve konak hücrenin vektörün replikasyonu meydana getiren koşullar altında büyütülmesi suretiyle mevcut tarifnamenin nükleotit dizilerinin yapılması için bir yöntem temin etmektedir.

Vektör ayrıca, vektörün söz konusu konak hücrede replikasyon yapmasını sağlayan bir nükleotit dizisi içerebilir. Bu dizilerin örnekleri plazmid pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMBl ve pIJ702'nin replikasyonunun kökenidir.

Bir ifade vektörü, *Roseburia* flagellinleri kodlayan en az iki, üç, dört veya beş polinükleotit dizisini içerebilir.

İfade vektörlerinin örnekleri arasında pGEX- 6P- 1, pCR- Blunt II- TOPO ve T7- MAT- Tag- FLAG- bulunur.

Rekombinant flagellinlerin klonlanması için ifade vektörü pGEX- 6P- 1 kullanılabilir. İfade vektörü pGEX- 6P- 1, GST-etiketli rekombinant proteinlerin kimyasal olarak uyarılabilir, yüksek seviyede ifadesi için bir tac promotörü, herhangi bir *E. coli* konağında kullanılmak üzere bir dahili lacIq geni, ampisilin seçimi için bir AmpR geni ve arzulandığında füzyon ürününden protein kesmek için bir PreScission Proteaz bölgesi içerir.

Rekombinant flagellin klonlama vektörü pCR- Blunt II- TOPO, özellikle hücre lizisinden sonra çözülmeyenleri bloke etmek için kullanılabilir. Tipik olarak bu vektör, kör uçlu PCR ürünlerinin yüksek etkili DNA klonlamasına izin verir. Vektör, *E. coli*'de seçim için Kanamisin ve Zeosin direnç genlerini içerir ve eklenti, eksizyon için çoklu kısıtlama bölgeleri ile çevrelenir.

Rekombinant flagellinlerin, özellikle de hücre lizisinden sonra çözülmeyenlerin klonlanması için, ifade vektörü T7- MAT- Tag- FLAG- kullanılabilir. Çoklu klonlama sahası (MCS), daha sonra afinite kolonu saflaştırması ile de saflaştırılabilecek çift etiketli flagellinin üretilmesi ile sonuçlanan MAT (Metal

Affinite Etiketi) dizisi ve FLAG peptidi (Asp- Tyr- Lys- Asp- Asy- Asy- Asy- Asy- Lys) dizisi tarafından çevrelenir. Bu ifade vektörü ayrıca, herhangi bir *E. coli* konağında bazal halde transkripsiyonu baskılayan bir dahili lacI geni olan

5 MAT- ORF- FLAG rekombinant flagellinlerin IPTG ile indüklenebilir, yüksek seviyede ifadesi için bir pT7 / lac (faj T7 lac operon) promotörünü, ve ampisilin seçimi için bir AmpR genini içerir.

## 10 Düzenleyici diziler

Bazı düzenlemelerde, bu buluşta kullanılmak üzere nükleotit dizisi, seçilen konak hücre gibi, nükleotit dizisinin ifadesini sağlayabilen bir düzenleyici diziye işlevsel olarak bağlıdır. Örnek olarak, mevcut buluş bu tür bir düzenleyici

15 diziye işlevsel olarak bağlanmış mevcut buluşun nükleotit dizisini içeren bir vektörü kapsar, yani vektör bir ifade vektörüdür.

"İşlevsel şekilde bağlanmış" terimi, bir yan yana durma noktasını belirtir, burada tarif edilen bileşenler, amaçlanan

20 şekilde işlev görmelerine izin veren bir ilişki içerisinde bulunurlar. Bir kodlama dizisine "işlevsel olarak bağlı" bir düzenleyici dizi, kodlayıcı dizinin ifadesinin kontrol dizileri ile uyumlu koşullar altında gerçekleştirileceği şekilde bağlanır.

25 "Düzenleyici diziler" terimi, promotörler ve hızlandırıcılar ve diğer ifade düzenleme sinyallerini içerir.

"Promotör" terimi, teknikteki normal anlamda, örneğin bir RNA polimeraz bağlama yeri olarak kullanılır.

Mevcut açıklamanın bir flagellini kodlayan nükleotit dizisinin

30 artan ifadesi, heterolog düzenleyici bölgelerin, örneğin promotör, sekresyon lideri ve terminatör bölgelerinin seçimi ile de elde edilebilir.

Bir düzenlemede mevcut tarifnameye uygun nükleotit dizisi, en azından bir promotöre işlevsel olarak bağlıdır.

Mevcut tarifnamenin polipeptidinin doğrudan ifadesi için başka promotörler kullanılabilir.

Nükleotit dizisinin bir bakteriyel, fungal veya maya konağı içinde transkripsiyonunu yönlendirmek için uygun promotörlerin

5 örnekleri teknikte iyi bilinmektedir.

Promotör ek olarak uygun bir konakda ifadeyi sağlamak veya arttırmak için özellikleri de içerebilir. Örneğin, özellikler bir Pribnow Kutusu veya bir TATA kutusu gibi korunan bölgeler olabilir.

10

### **Yapılar**

"Konjugat", "kaset" ve "hibrid" gibi terimlerle eşanlamli olan "yapı" terimi, bu buluşa göre doğrudan veya dolaylı olarak bir promotöre bağlanan bir nükleotit dizisini içerir.

15 Dolaylı bir bağlanma örneği, bu tarifnamenin promotörünün ve nükleotit dizisinin arasında, Sh1- intron veya ADH intronu gibi bir intron dizisi gibi uygun bir ayırıcı grubun sağlanmasıdır. Aynı şey doğrudan veya dolaylı bağlanma içeren mevcut açıklamayla ilişkili olarak "kaynaşmış" terimi için de

20 geçerlidir. Bazı durumlarda, terimler, her ikisi de doğal ortamlarında olduklarında, normalde doğal tip gen promotörü ile ilişkili protein kodlayan nükleotit dizisinin doğal kombinasyonunu kapsamaz.

Yapı, genetik yapının seçilmesini sağlayan bir markör

25 içerebilir veya ifade edebilir.

Bazı uygulamalar için, mevcut tarifnamenin yapısı, en azından bu tarifnamenin bir promotöre işlevsel olarak bağlı olan nükleotit dizisini içermektedir.

### **30 Konak Hücreler**

Mevcut tarifle ilişkili olarak "konak hücre" terimi, burada açıklanan nükleotit dizisini ve/ veya bir ifade vektörünü içeren herhangi bir hücreyi içerir. Tipik olarak konak hücre, burada tanımlanan spesifik özelliklere sahip olan bir

35 proteinin rekombinant üretimi yeteneğine sahiptir.

Konak hücrelerin örnekleri arasında, *Roseburia* spp. ve kompetent hücreler vardır. *Roseburia* spp örnekleri *Roseburia hominis* , *Roseburia cecicola*, *Roseburia faecis*, *Roseburia intestinalis*, ve *Roseburia inulinivorans*'dır. Kompetent

5 hücrelerin örnekleri arasında kompetent *E. coli* hücreleri (örneğin *E. coli* BL21 (DE3) pLysS ve/ veya *E. coli* B21 Rosetta) vardır.

Dolayısıyla, mevcut tarifnamenin başka bir düzenlemesin, mevcut tarifnamenin bir nükleotit dizisi ile transforme

10 edilmiş veya transfekte edilmiş konak hücreler sağlar. Buna ek olarak veya alternatif olarak, bu tarifnamenin başka bir düzenlemesi, dönüştürme öncesi eşdeğer mikroorganizma ile karşılaştırıldığında mevcut açıklamanın bir flagellini kodlayan bir nükleotit dizisinin (ör. , bir homolog gen veya

15 endojen bir gen) ifadesini yukarı regüle edebilen (aşırı ifade eden) bir nükleotit dizisi (ör. , bir heterolog promotör veya bir eksojen gibi bir promotör) ile transforme edilmiş veya transfekte edilmiş konak hücreleri temin eder. Hücreler sözü edilen vektörle uyumlu olacak şekilde seçilecek ve örneğin

20 bakteri (örneğin prokaryotik), fungal veya maya hücreleri olabilecektir.

Mevcut tarifnamenin flagellinini kodlayan nükleotit dizisi, konak hücrelerine karşı heterolog veya homolog olabilir. Genellikle, flagellini kodlayan nükleotit dizisi, konak

25 hücreye homolog olduğunda, konak hücre nükleotit dizisinin çoklu kopyalarını içerir. İlaveten veya alternatif olarak, flagellini kodlayan nükleotit dizisi, bir heterolog promotöre işlevsel olarak bağlıdır; tipik olarak adı geçen promotör, flagellini kodlayan homolog nükleotit dizisini yukarı regüle

30 etme (aşırı ifade etme) yeteneğine sahiptir.

Bir örnekte konak hücre, heterolog veya eksojen promotörün kontrolü altındaki mevcut tarifnamenin (homolog veya endojen bir nükleotit dizisi gibi) flagellin polipeptidini kodlayan nükleotit dizisini içerir.

Bir düzenlemede konak hücre Fla1, Fla2, Fla3 ve Fla4'ten oluşan gruptan seçilen en az bir flagellini (ör. *Roseburia* flagellin) kodlayan bir veya daha fazla nükleotit dizisi ile transforme edilir veya transfekte edilir. Başka bir

5 düzenlemede konak hücre Fla2, Fla1 ve Fla4'ten oluşan gruptan seçilen en az bir flagellini (ör. *Roseburia* flagellin) kodlayan bir veya daha fazla nükleotit dizisi ile transforme edilir veya transfekte edilir. Başka bir düzenlemede konak hücre flagellin Fla2'yi (ör. *Roseburia* flagellin) kodlayan bir

10 nükleotit dizisi ile transforme edilir veya transfekte edilir. Konak hücre, *Roseburia* flagellinleri kodlayan polinükleotit dizilerinin çoklu kopyalarını içerebilir.

Bir konak hücre, en az 1, 2, 3, 4 veya 5 *Roseburia* flagellini kodlayan en az 1, 2, 3, 4 veya 5 polinükleotit dizisini

15 içerebilir.

Bir düzenlemede konak hücre, *Roseburia* türlerinden türetilmiş olan veya türetilabilir en az bir *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisini ve farklı bir *Roseburia* türünden türetilmiş olan veya türetilabilir en az bir *Roseburia*

20 flagellini kodlayan en az bir diğer polinükleotit dizisini içerir. Örneğin, konak hücre bir *R. hominis* flagellini (örneğin Fla1 veya Fla2) kodlayan en az bir polinükleotit dizisini ve bir *R. intestinalis* flagellini (örneğin Fla1 veya Fla 2) kodlayan en az bir polinükleotit dizisini içerir.

25 Bir konak hücre, *Roseburia* flagellini kodlayan en az 1, 2, 3, 4 veya 5 polinükleotit dizisini içeren en az 1, 2, 3, 4 veya 5 ifade vektörünü içerebilir.

Bir düzenlemede konak hücre, *Roseburia* türlerinden türetilmiş olan veya türetilabilir *Roseburia* flagellinleri kodlayan bir

30 polinükleotit dizisini ve farklı bir *Roseburia* türünden türetilmiş olan veya türetilabilir *Roseburia* flagellinleri kodlayan en az bir diğer polinükleotit dizisini içerir. Örneğin, konak hücre bir *R. hominis* flagellini (örneğin Fla1 veya Fla2) kodlayan bir polinükleotit dizisini içeren en az

35 bir ifade vektörünü ve bir *R. intestinalis* flagellini

(örneğin Fla1 veya Fla 2) kodlayan bir polinükleotit dizisini içeren en az bir ifade vektörünü içerir.

Flagellini kodlayan nükleotit dizisi, konak hücrelerine karşı endojen veya eksojen olabilir. Genellikle, flagellini kodlayan nükleotit dizisi, konak hücreye endojen olduğunda, konak hücre nükleotit dizisinin çoklu kopyalarını içerir. İlaveten veya alternatif olarak, flagellini kodlayan nükleotit dizisi, bir eksojen promotöre işlevsel olarak bağlıdır; tipik olarak adı geçen promotör, flagellini kodlayan endojen nükleotit dizisini yukarı regüle etme (aşırı ifade etme) yeteneğine sahiptir.

Uygun bakteri konak organizmalarının örnekleri gram pozitif veya gram negatif bakteri türleridir.

Bir düzenlemede konak hücre, bir mikroorganizmadır.

Bir düzenlemede konak hücre, bir laktik asit bakteri türü, *Lactococcus* türleri, bir *Bifidobacterium* türü, bir *Lactobacillus* türü veya bir *Propionibacterium* türüdür.

Laktik asit bakterilerinin örnekleri, bunlarla sınırlı olmamak üzere, *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Aerococcus* spp., *Carnobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Oenococcus* spp., *Sporolactobacillus* spp., *Tetragenococcus* spp., *Vagococcus* spp. ve *Weissella* spp. 'dir.

*Lactobacillus* spp örnekleri *Lactobacillus paracasei*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. reuteri*, *L. casei*, *L. jensenii*, *L. rhamnosus*, *L. crispatus*, *L. johnsonii*, *L. salivarius*, *L. acetotolerans*, *L. acidifarinae*, *L. acidipiscis*, *L. agilis*, *L. algidus*, *L. alimentarius*, *L. amylolyticus*, *L. amylophilus*, *L. amylophobicus*, *L. amylovorus*, *L. animalis*, *L. antri*, *L. apodemi*, *L. aviarius*, *L. bifementans*, *L. buchneri*, *L. camelliae*, *L. cateniformis*, *L. ceti*, *L. coleohominis*, *L. collinoides*, *L. composti*, *L. concavus*, *L. coryniformis*, *L. crustorum*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. dextrinicus*, *L. diolivorans*, *L. equi*, *L. equigenerosi*, *L. farraginis*, *L.*

5 *farciminis*, *L. fornicalis*, *L. fructivorans*, *L. frumenti*, *L. fuchuensis*, *L. galUnarum*, *L. gastricus*, *L. ghanensis*, *L. graminis*,  
*L. hammesii*, *L. hamsteri*, *L. harbinensis*, *L. hayakitensis*, *L. hilgardii*,  
10 *L. homohiochii*, *L. iners*, *L. ingluviei*, *L. intestinalis*, *L. kalixensis*, *L. kefiranofaciens*, *L. kefiri*, *L. kimchii*, *L. kitasafonis*, *L. kunkeei*, *L. leichmannii*, *L. lindneri*,  
*L. malefermentans*, *L. mail*, *L. manihotivorans*, *L. mindensis*, *L. mucosae*,  
15 *L. murinus*, *L. nagelii*, *L. namurensis*, *L. nantensis*, *L. oligofermentans*,  
*L. oris*, *L. panis*, *L. pantheris*, *L. parabrevis*, *L. parabuchneri*,  
*L. paracollinoides*, *L. parafarraginis*, *L. parakefiri*, *L. paralimentarius*,  
*L. paraplantarum*, *L. pentosus*, *L. perolens*, *L. pontis*, *L. psittaci*,  
20 *L. rennini*, *L. rimae*, *L. rogosae*, *L. rossiae*, *L. ruminis*, *L. saerimneri*,  
*L. sakei*, *L. sanfranciscensis*, *L. satsumensis*, *L. secaliphilus*, *L. sharpeae*,  
15 *L. siliginis*, *L. spicheri*, *L. suebicus*, *L. fhailandensis*, *L. ultunensis*,  
*L. vaccinostercus*, *L. vaginalis*, *L. versmoldensis*, *L. vini*, *L. vitulinus*,  
*L. zaeae*, ve *L. zymae*'yi içerir.

*Propionibacterium* örnekleri bunlarla sınırlı olmamak üzere  
aşağıdakileri içermektedir: *Propionibacterium freudenrechli*  
20 *subsp. shermanii* (PAB), *Propionibacterium acidifaciens*,  
*Propionibacterium acidipropionici*, *Propionibacterium acnes*,  
*Propionibacterium australiense*, *Propionibacterium avidum*,  
*Propionibacterium cyclohexanicum*, *Propionibacterium*  
*freudenrelchli subsp. freudenrelchli*, *Propionibacterium*  
25 *granulosum*, *Propionibacterium jensenii*, *Propionibacterium*  
*microaerophilum*, *Propionibacterium propionicum*, and  
*Propionibacterium thoenii*.

Bir düzenlemede, *Propionibacterium*, *Propionibacterium*  
*freudenrechli subsp. shermanii*'dir (PAB).

30 *Bifidobacterium* örnekleri bunlarla sınırlı olmamak üzere,  
*Bifidobacterium adolescentis*, *B. breve*, *B. longum*, *B. animalis*,  
*B. infantis*, *B. thermophilum*, *B. bifidum*,  
*Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium*  
*pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium angulatum* ve *B. lactis*'dir.



Başka bir düzenlemede konak hücre, bir Firmikute - örneğin bir *Roseburia hominis* , *Roseburia cecicola*, *Roseburia faecis*, *Roseburia intestinalis*, veya *Roseburia inulinivorans* gibi bir *Roseburia* türüdür. Bir düzenlemede konak hücre *Roseburia*

5 flagellini kodlayan en az bir heterolog polinükleotit dizisi içerir. İlaveten veya alternatif olarak, konak hücre *Roseburia* flagellini kodlayan bir homolog polinükleotit dizisinin en az iki kopyasını içerir; örneğin, konak hücre *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisinin en az 3, 4  
10 veya 5 homolog kopyasını içerir.

Mevcut tarifnamenin polipeptidini kodlayan nükleotit dizisinin doğasına ve/ veya ifade edilen proteinin daha fazla işlenmesinin istenmesine bağlı olarak, mayalar veya diğer mantarlar gibi ökaryotik konakçılar kullanılabilir. Genel  
15 olarak, maya hücreleri mantar hücreleri üzerinde kullanılır çünkü manipüle edilmesi daha kolaydır. Bununla birlikte, bazı proteinler ya maya hücresinden zayıf salgılanırlar ya da bazı durumlarda düzgün şekilde işlenmezler (örneğin, mayada hiperglikozilasyon). Bu durumlarda, farklı bir mantar konak  
20 organizması seçilmelidir.

Maya, mantar ve bitki konak hücreleri gibi uygun konak hücrelerinin kullanımı, mevcut tarifnamenin rekombinant ifade ürünleri üzerinde optimal biyolojik aktiviteyi kazandırmak için gerekli olabileceği gibi translasyon sonrası  
25 modifikasyonlar (örneğin miristilasyon, glikozilasyon, kesme (truncation), lipidasyon ve tirozin, serin veya treonin fosforilasyonu) sağlayabilir.

Konak hücre bir proteaz yetersizliği olan veya proteaz içermeyen suş olabilir. Bu, örneğin "alp" olarak adlandırılan  
30 alkali proteaz geninin silindiği proteaz yetersizliği olan *Aspergillus oryzae* JaL 125 suşu olabilir. Bu suş, WO97 / 35956 belgesinde açıklanır.

"Konak hücre" terimi, aynı zamanda doğal ortamında bulunan doğal promotörün kontrolü altındayken, doğal nükleotit  
35 kodlayıcı dizilerini doğal ortamlarında kapsamamaktadır.

## **Organizma**

Mevcut tarifname ilişkili olarak "organizma" terimi, mevcut tarifnameye ve/ veya bunlardan elde edilen ürünlere göre polipeptidi kodlayan nükleotit dizisini içerebilen herhangi bir organizmayı içermektedir ve/ veya burada bir organizmada bulunduğu, bir promotör mevcut tarifnameye göre nükleotit dizisinin ifadesine izin verebilir.

Uygun organizmalar, bir bakteri (bir prokaryot gibi), bir mantar, bir maya veya bir bitki içerebilir.

Mevcut tarifname ile ilişkili olarak "transgenik organizma" terimi, mevcut tarifnameye uygun polipeptidi kodlayan nükleotit dizisini ve/ veya bunlardan elde edilen ürünleri içeren herhangi bir organizmayı kapsar ve/ veya bir promotör, mevcut tarifnameye göre organizma içinde nükleotit dizisinin ifadesine izin verebilir. Bir düzenlemede nükleotit dizisi organizmanın genomuna dahil edilir.

"Transgenik organizma" terimi, aynı zamanda doğal ortamında bulunan doğal promotörün kontrolü altındayken, doğal nükleotit kodlayıcı dizilerini doğal ortamlarında kapsamamaktadır.

Dolayısıyla, bu tarifnamenin transgenik organizması, mevcut tarifnameye göre polipeptidi kodlayan nükleotit dizisi, mevcut tarifnameye göre yapılar, mevcut tarifnameye göre vektörler, mevcut tarifnameye göre plazmidler, mevcut tarifnameye göre hücreler veya bunların ürünlerinden herhangi birini veya bunların kombinasyonlarını ihtiva eden bir organizmayı içerir.

Örneğin, transgenik organizma, heterolog bir promotörün kontrolü altındaki mevcut tarifnamenin polipeptidini kodlayan nükleotit dizisini (homolog bir nükleotit dizisi gibi) içerebilir.

## **Konak hücrelerin / organizmanın dönüşümü**

Daha önce belirtildiği gibi, konak organizma bir prokaryotik veya bir ökaryotik organizma olabilir. Uygun prokaryotik konak örnekleri *Roseburia hominis* , *Roseburia cecicola* , *Roseburia*

*faecis*, *Roseburia intestinalis*, *Roseburia inulinivoranlar*, *E. coli* ve *Bacillus subtilis*'i içerir.

Prokaryotik konakların dönüşümü ile ilgili öğretimler iyi belgelenmiştir, örneğin bkz. Sambrook vd. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. baskı, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Bir prokaryotik konak kullanılıyorsa, nükleotit dizisinin, dönüşümden önce, örneğin intronların çıkarılması gibi, uygun bir şekilde modifiye edilmesi gerekebilir.

- 10 Filamentli mantar hücreleri, protoplast oluşumunu ve protoplastların transformasyonunu takiben bilinen bir şekilde hücre duvarının rejenerasyonunu içeren bir işlem gibi teknikte bilinen çeşitli yöntemler kullanılarak dönüştürülebilir. Bir konak mikroorganizma olarak *Aspergillus*'un kullanımı EP 0 238 023 belgesinde açıklanmıştır.

Başka bir konak organizma bir bitki olabilir. Bitkileri dönüştürmek için kullanılan genel tekniklerin bir incelemesi, Potrykus (Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol [1991] 42: 205- 225) ve Christou (Agro- Food- Industry Hi- Tech March/April 1994 17- 27) tarafından yazılan makalelerde bulunabilir. Bitki dönüşümü ile ilgili daha başka öğretimler EP- A- 0449375 belgesinde bulunabilir.

Mantarların, mayaların ve bitkilerin dönüşümü ile ilgili genel öğretimler, aşağıdaki bölümlerde sunulmaktadır.

25

### **Dönüştürülmüş mantarlar**

Bir konak organizma bir küf gibi bir mantar olabilir. Bu tip uygun konakların örnekleri, *Thermomyces*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mukor*, *Neurospora*, *Trichoderma* cinslerine ait herhangi bir üyeyi ve benzerlerini içerir.

30

Bir düzenlemede konak organizma ipliksi bir mantar olabilir.

İpliksi mantarların dönüştürülmesi, ABD- A- 5741665 belgesinde açıklanmaktadır, burada ipliksi mantarların dönüşümü ve mantarların kültürlenmesi için standart tekniklerin teknikte

- 35 iyi belirtilir. *N. crassa*'ya uygulandığı gibi teknikler için

kapsamlı bir inceleme örneğın Davis ve de Serres, Methods Enzymol (1971) 17A: 79- 143 belgesinde bulunabilir.

İpliksi mantarların dönüştürölmesinde de kullanılabilen diğér öğretimler, ABD- A- 5674707 belgesinde incelenmektedir.

- 5 Ek olarak, ipliksi mantarlarda gen ifadesi, Punt vd. (2002) Trends Biotechnol 2002 Mayıs; 20 (5): 200- 6, Archer ve Peberdy Crit Rev Biotechnol (1997) 17 (4): 273- 306 belgelerinde verilmektedir.

Mevcut tarifname, bu standart teknikler kullanılarak  
10 hazırlanan, tarifnameye göre transgenik ipliksi mantarların üretimini kapsar.

Bir yönüyle, konak organizma *Aspergillus niger* gibi *Aspergillus* cinsi olabilir.

- Mevcut tarifnameye göre bir transgenik *Aspergillus*, örneğın,  
15 aşağıdaki öğretimler takip edilerek hazırlanabilir: Turner G.1994 (Vectors for genetic manipulation. : Martinelli S. D. , Kinghorn J. R(Editors) *Aspergillus: 50 years on. Progress in industrial microbiology* cilt 29. Elsevier Amsterdam 1994. s. 641- 666).

20

### **Dönüştürölmüş maya**

Başka bir düzenlemede transgenik organizma bir mayadır.

- Mayadaki heterolog gen ifadesinin prensiplerinin bir incelemeı, örneğın, Methods Mol Biol (1995), 49: 341- 54, and  
25 Curr Opin Biotechnol (1997) Oct; 8(5): 554- 60 belgelerinde sağlanır.

- Bu bakımdan *Saccharomyces cerevisi* veya *Pichia pastoris* (bakınız FEMS Microbiol Rev (2000 24(1): 45- 66) türleri gibi mayalar heterolog gen ifadesi için bir araç olarak  
30 kullanılabilir.

*Saccharomyces cerevisiae* içinde heterolog gen ifadesi prensiplerinin ve gen ürünlerinin salgılanmasının bir incelemeı E Hinchcliffe E Kenny (1993, "Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes", Yeasts, Vol 5,

Anthony H Rose and J Stuart Harrison, eds, 2nd edition, Academic Press Ltd.) tarafından yapılmıştır.

Mayanın dönüşümü için birkaç dönüştürme protokolü geliştirilmiştir. Mevcut tarifnameye göre bir transgenik

- 5 Saccharomyces, örneğin aşağıdaki öğretimler ile hazırlanabilir: Hinnen vd. , (1978, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 75, 1929); Beggs, J D (1978, Nature, London, 275, 104); ve Ito, H vd. (1983, J Bacteriology 153, 163- 168).
- 10 Dönüştürülmüş maya hücreleri, oksotrofik markörler, baskın antibiyotik dirençli markörler gibi çeşitli seçici markörler kullanılarak seçilebilir.

#### **Dönüştürülmüş bitkiler / bitki hücreleri**

- 15 Mevcut tarifnameye uygun bir konak organizma bir bitki olabilir. Bu bağlamda, genetiği değiştirilmiş bitkilerin yapılandırılmasında temel ilke, eklenen genetik materyalin stabil bir şekilde bakımı için bitki genomuna genetik bilgi eklemektir. Genel teknikler üzerine bir inceleme, Potrykus
- 20 (Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol [1991] 42: 205- 225) ve Christou (Agro- Food- Industry Hi- Tech March/April 1994 17- 27) tarafından yazılan makalelerde bulunabilir.

Bitki dokularının *Agrobacterium* ile doğrudan enfeksiyonu yaygın olarak kullanılan ve aşağıda tanımlanan basit bir

- 25 tekniktir: Butcher D. N. et al, (1980), Tissue Culture Methods for Plant Pathologists, eds. : D. S. Ingrams ve J. P. Helgeson, 203- 208.

Bitkileri dönüştürmek için diğer teknikler balistik dönüşüm, silikon kılı karbür tekniği (bkz. Frame BR, Drayton PR,

- 30 Bagnaall SV, Lewnau CJ, Bullock WP, Wilson HM, Dunwell JM, Thompson JA & Wang K (1994) Production of fertile transgenic maize plants by silicon carbide whisker- mediated transformation, The Plant Journal 6: 941- 948) ve viral transformasyon tekniklerini (ör. , bakınız Meyer P, Heidmann I

& Niedenhof I (1992) The use of cassava mosaic virus as a vector system for plants, Gene 110: 213- 217) içerir.

Bitki dönüşümü ile ilgili daha başka öğretimler EP- A- 0449375 belgesinde bulunabilir.

- 5 Bitki hücreleri, hücrelerin amino asitler, bitki hormonları, vitaminler vb. gibi gerekli büyüme faktörleri ile birlikte tedarik edilen uygun bir kültür ortamında kültürlenmesi gibi iyi bilinen doku kültürü yöntemlerine uygun olarak yetiştirilebilir ve muhafaza edilebilir.
- 10 Bir başka yönüyle mevcut tarif, mevcut tarifnameye uygun olarak bir nükleotit dizisini veya yapısını taşıyan ve bir bitki gibi bir organizmanın genomuna nükleotit dizisini veya yapısını dahil edebilen bir vektör sistemi ile ilgilidir. Vektör sistemi bir vektör içerebilir, ancak iki vektör de
- 15 içerebilir. İki vektör durumunda, vektör sistemi normal olarak bir ikili vektör sistemi olarak adlandırılır. İkili vektör sistemleri, daha ayrıntılı olarak Gynheung An et al, (1980), Binary Vectors, Plant Molecular Biology Manual A3, 1- 19 belgesinde açıklanır.
- 20 Bitki hücrelerinin transformasyonu için yaygın olarak kullanılan bir sistem, *Agrobacterium tumefaciens*'dan gelen Ti plazmidini veya *Agrobacterium rhizogenes*'den gelen bir Ri plazmidini kullanır. An vd. , (1986), Plant Physiol 81, 301- 305 and Butcher D. N. et al, (1980), Tissue Culture Methods
- 25 for Plant Pathologists, eds. : D. S. Ingrams ve J. P. Helgeson, 203- 208. Mevcut tarifnameye göre bitkilerde arzu edilen promotör veya yapı veya nükleotit dizisinin her giriş yönteminden sonra, başka DNA dizilerinin varlığı ve/ veya eklenmesi gerekli olabilir. Örneğin transformasyon için bitki
- 30 hücrelerinin Ti- veya Ri- plazmidi kullanılırsa, en azından Ti- ve Ri- plazmid T- DNA'nın sağ sınırı ve çoğunlukla sağ ve sol sınırları, getirilen genlerin yan alanları olarak bağlanabilir. Bitki hücrelerinin transformasyonu için T- DNA kullanımı yoğun olarak incelenmiş ve EP- A- 120516; Hoekema,
- 35 in: The Binary Plant Vector System Offset- drukkerij Kanters

BB, Alblasterdam, 1985, Chapter V; Fraley, vd. , Crit. Rev. Plant Sci. , 4: 1- 46; veAn vd, EMBO J. (1985) 4: 277- 284 belgelerinde incelenmiştir.

### **Kültür ve üretim**

- 5 Mevcut tarifnamenin nükleotit dizisi ve/ veya mevcut tarifnamenin bir ifade vektörü ile dönüştürülen konak hücreler, kodlanmış polipeptit üretimine elverişli koşullar altında kültürlenebilir ve polipeptidin hücrelerden ve/ veya kültür ortamından geri kazanılmasını kolaylaştırabilir.
- 10 Hücrelerin yetiştirilmesi için kullanılan ortam, söz konusu konak hücrenin büyütülmesi ve polipeptidin ifadesinin elde edilmesi için uygun herhangi bir geleneksel ortam olabilir. Bir rekombinant hücre tarafından üretilen protein hücre yüzeyinde sergilenebilir.
- 15 Protein, konak hücrelerden salınabilir ve iyi bilinen prosedürler kullanılarak uygun bir şekilde kültür ortamından geri kazanılabilir.

### **Salgılama**

- 20 Bazı düzenlemelerde protein, ifade konağından, proteinin geri kazanılacağı kültür ortamına salgılanır. Mevcut tarifi nameye göre, salgı lideri dizisi istenen ifade konağı temelinde seçilebilir. Hibrid sinyal dizileri, mevcut tarifi name bağlamında da kullanılabilir.
- 25 Heterolog salgı lider dizilerinin tipik örnekleri, fungal amiloglukosidaz (AG) geni (*glaA* - örneğin *Aspergillus*'dan gelen hem 18 hem de 24 amino asit versiyonları), bir  $\alpha$ - faktör geni (mayalar örneğin *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* ve *Hansenula*) veya  $\alpha$ - amilaz geninden (*Bacillus*)
- 30 kaynaklananlardır.
- Örnek olarak, *E. coli* içinde heterolog proteinlerin salgılanması Metodlar Enzymol (1990) 182: 132- 43 belgesinde incelenmiştir.

### **35 Algılama**

Amino asit dizisinin ifadesini saptamak ve ölçmek için çeşitli protokoller teknikte bilinmektedir. Örnekler, enzim bağlı immünosorbent analiz (ELISA), radyoimmünoanaliz (RIA) ve floresanla aktive hücre ayırmadır (FACS).

- 5 Çok çeşitli etiketler ve konjugasyon teknikleri teknolojiye tecrübeli kişilerce bilinmektedir ve çeşitli nükleik asit ve amino asit analizlerinde kullanılabilir.

Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI) ve US Biochemical Corp (Cleveland, OH) gibi bir dizi şirket bu  
10 prosedürler için ticari kitler ve protokoller tedarik etmektedir.

Uygun haberci moleküller veya etiketler, radyonüklidleri, enzimleri, flüoresan, kemilüminesan veya kromojenik ajanları ve substratları, kofaktörleri, inhibitörleri, manyetik  
15 partikülleri ve benzerlerini içerir. Bu gibi etiketlerin kullanımını öğreten patentler arasında ABD- A- 3817837; ABD- A- 3850752; ABD- A- 3939350; ABD- A- 3996345; ABD- A- 4277437; ABD- A- 4275149 ve ABD- A- 4366241 bulunur.

Ayrıca, rekombinant immünoglobülinler, ABD- A- 4816567  
20 belgesinde gösterildiği gibi üretilebilir.

### **Füzyon proteinleri**

Mevcut açıklamaya göre kullanılmak üzere amino asit dizisi, örneğin ekstraksiyon ve saflaştırmaya yardımcı olmak için bir  
25 füzyon proteini olarak üretilebilir. Füzyon protein partnerlerinin örnekleri arasında glutatyon- S- transferaz (GST), 6xHis, GAL4 (DNA bağlama ve/ veya transkripsiyonel aktivasyon alanları) ve ( $\beta$ - galaktosidaz) yer alır. Füzyon proteini dizilerinin çıkarılmasına izin vermek için, füzyon  
30 proteini partneri ile ilgi konusu protein dizisi arasında bir proteolitik bölünme bölgesi eklemek de uygun olabilir.

Tipik olarak, füzyon proteini, protein dizisinin aktivitesini engellemeyecektir.

*E. coli* içindeki gen füzyon ifade sistemleri Curr Opin  
35 Biotechnol (1995) 6 (5): 501- 6 belgesinde incelenmiştir.



Başka bir düzenlemede amino asit dizisi, bir füzyon proteini kodlamak için heterolog bir diziye bağlanabilir. Örneğin, madde aktivitesini etkileyebilen maddeler için peptit kütüphanelerinin taramak üzere, piyasada bulunan bir antikör tarafından tanınan heterolog bir epitopu ifade eden kimerik bir maddeyi kodlamak da yararlı olabilir. Mevcut buluş, sınırlayıcı olmayan aşağıdaki örnekler vasıtasıyla daha ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

## 10 ÖRNEKLER

Mevcut buluşun uygulanması, aksi belirtilmediği takdirde, alanında uzman kimsenin yetenekleri dahilindeki geleneksel kimya, moleküler biyoloji, mikrobiyoloji, rekombinant DNA ve immünoloji tekniklerinden faydalanacaktır. Bu teknikler literatürde açıklanmıştır. Bakınız, örneğin, J. Sambrook, E. F. Fritsch, ve T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, İkinci Baskı, Kitap 1- 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. vd. (1995 ve periyodik takviyeler; Current Protocols in Molecular Biology, ch. 9, 13, ve 16, John Wiley & Sons, New York, N. Y. ); B. Roe, J. Crabtree ve A. Kahn, 1996, DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques, John Wiley & Sons; J. M. Polak ve James O'D. McGee, 1990, In Situ Hybridization: Principles and Practice; Oxford University Press; M. J. Gait (Editor), 1984, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, Irl Press; D. M. J. Lilley ve J. E. Dahlberg, 1992, Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology, Academic Press; ve E. M. Shevach ve W. Strober, 1992 and periodic supplements, Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York, NY.

## Malzemeler ve Yöntem

### ROSEBURIA CİNSİ FLAGELLİNLER

### Flagellin çeşitliliği

*Roseburia* cins bakterilerden, özellikle, *Roseburia hominis* ve *Roseburia intestinalis*'den gelen flagellinler klonlanmış, ifade edilmiş, saflaştırılmış ve analiz edilmiştir.

Şekil B1A ve B1B rekombinant flagellinlerin bir SDS- Analizini

5 göstermektedir.

Flagellin protein terminolojisi:

### ***Roseburia* cinsi**

#### ***Roseburia* türleri**

10 *Roseburia hominis*

*Roseburia hominis* FlaA1 (bu aynı zamanda burada RhFlaA1 veya Rh1 olarak anılacaktır)

*Roseburia hominis* Fla A2 (Bu aynı zamanda burada RhFla A2 veya Rh2 olarak anılacaktır)

15 *Roseburia intestinalis*

*Roseburia intestinalis* FlaA1 (Bu aynı zamanda RiFlaA2 veya Ri1 veya Ri11 olarak da anılacaktır)

*Roseburia intestinalis* Fla A2 (Bu aynı zamanda RiFlaA2 veya Ri2 veya Ri21 olarak da anılacaktır)

20 *Roseburia intestinalis* FlaA3 (Bu aynı zamanda RiFlaA3 veya Ri3 veya Ri31 olarak da anılacaktır)

*Roseburia intestinalis* FlaA4 (Bu aynı zamanda RiFlaA1 veya Ri4 veya Ri41 olarak da anılacaktır)

Bkz. :

25 ELY, B, ELY, T. W. , CRYMES, W. B, JR ve MINNICH, S. A. , 2000. Altı flagellin geninden oluşan bir aile, *Caulobacter crescentus* flagellar filamanına katkıda bulunur. *Journal of Bacteriology*, 182 (17), s.5001- 5004.

IBRAHİM, G. F. , FLEET, G. H. , LYONS, M. J. ve WALKER, RA. , 30 1985. Yüksek derecede saflaştırılmış *Salmonella* flagellinlerinin izolasyonu için yöntem. *Journal of clinical microbiology*, 22 (6), s.1040- 1044.

NEVILLE, BA. , FORDE, BM. , CLAESSEON, M. J. , DARBY, T. , COGHLAN, A. , NALLY, K. , ROSS, RP. ve O'TOOLE, P. W. , 2012.

35 *Lactobacillus ruminis* ve ilgili hareketli Laktobasiller

tarafından üretilen proenflamatuar flagellin proteinlerinin karakterizasyonu. PloS one, 7(7), s. e40592.

NG, S. Y. , CHABAN, B ve JARRELL, K. F. , 2006. Archaeal flagella, bakteriyel flagella ve tip IV pili: genlerin ve posttranslasyonel modifikasyonların karşılaştırılması. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 11(3- 5), s.167-191.

WATSON, RO. ve GALAN, J. E. , 2005. Campylobacter jejuni'nin indüklediği sitokin üretiminde sinyal transdüksiyonu. Hücresel mikrobiyoloji, 7 (5), s.655- 665.

### **Bakteriyel büyüme koşulları**

*R. hominis* A2- 183<sup>T</sup> (= DSM 16839<sup>T</sup>= NCIMB 14029<sup>T</sup>), anaerobik olarak 37 °C'de YCFA ortamında yetiştirilmiştir. Kültür santrifüjlenmiş ve pelet, % 2 sistein (w / v, Sigma- Aldrich) ve % 3 askorbik asit (w / v, Sigma- Aldrich) takviyeli 1 mL YCFA ortamı içinde yeniden süspanse edilmiştir.

*R. intestinalis* L1- 82<sup>T</sup> (= DSM 14610<sup>T</sup>= NCIMB 13810<sup>T</sup>), anaerobik olarak 37 °C'de YCFA ortamında yetiştirilmiştir. Kültür santrifüjlenmiş ve pelet, % 2 sistein (w / v, Sigma- Aldrich) ve % 3 askorbik asit (w / v, Sigma- Aldrich) takviyeli 1 mL YCFA ortamı içinde yeniden süspanse edilmiştir.

### **Fareler**

C3H / HeN ve C57Bl / 6, Harlan Laboratories'den satın alınmıştır. GF C3H / HeN, Jouy- en- Josas'daki INRA gnotobiyotik kemirgen yetiştirme tesisinden sağlanmış ve burada tutulmuştur (ANAXEM platform, Institut Micalis, INRA, Jouy- en- Josas, Fransa). GF TLR5KO ve doğal tip C57Bl / 6, Andrew Gewirtz tarafından sağlanmış ve Jouy- en Josas'da INRA gnotobiyotik kemirgen yetiştirme tesisinde tutulmuştur. Geleneksel TLR5KO ve doğal tip BOY / J, Adam Cunningham tarafından sağlanmıştır (MRC Immune Regulation, Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Enstitüsü, Bağışıklık ve Enfeksiyon Üniversitesi

Birmingham Üniversitesi Merkezi). Yönetim ve deneysel prosedürler ilgili Yerel Etik İnceleme Komiteleri tarafından onaylanmıştır.

## 5 Hayvan deneyleri

Mikropsuz hayvan deneyleri, Jouy- en- Josas'daki INRA gnotobiyotik kemirgen yetiştirme tesisinde gerçekleştirilmiştir (ANAXEM platform, Institut Micalis, INRA, Jouy- en- Josas, Fransa). GF C3H / HeN erkek fareler kontrol (N- = 8) ve tedavi (N- = 10) gruplarına ayrılmış ve plastik izolatörler içinde ayrı olarak kafeslenmiştir. 0, 1 ve 2. günde, tedavi grubundaki hayvanlara 100 µL *R. hominis* gavaaj yoluyla verilmiştir, diğer taraftan kontrol hayvanlarına 100 µL YCFA ortamı verilmiştir. Ileum, çıkan kolon ve çekum örnekleri 14. ve 28. günde toplanmıştır. Altı GF C3H / HeN erkek faresi, yukarıda açıklandığı gibi *E. coli* MG1655 (K12) ile tedavi edilmiş ve üç hayvan 10. ve 22. günde N = 3 olmak üzere kurban edilmiştir. Üç GF TLR5KO faresi ve üç C57Bl / 6 WT faresi *R. hominis* flagellinlerin fonksiyonel önemini değerlendirmek için yukarıda tarif edildiği gibi, *R. hominis* kültürü ile aşılanmıştır. 28 Gün sonra bu hayvanlar GF muadilleriyle birlikte kurban edilmiştir. Yirmi iki dişi C57BL / 6 faresine 14 gün boyunca günde 50 µL 10<sup>9</sup> CFU dozluk *R. hominis* verilmiştir. Kontrol hayvanları tek başına kültür ortamı ile dozlanmıştır. 8. Günden itibaren, farelere 6 gün boyunca içme suyunda DSS (MW 50kDa, 30g / l) verilmiştir. Hayvanlara 14. günde ötenazi uygulanmış ve doku örnekleme yukarıda tarif edildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

## 30 Doku kültürü deneyleri

Caco- 2 (*Homo sapiens* epitelyal kolorektal adenokarsinoma hücreleri) ve HT29 (*Homo sapiens* kolorektal adenokarsinoma) hücreleri bir anaerobik çalışma yerinde içinde transwell plakalarında yetiştirilmiştir. *R. hominis* A2- 183 kültürü veya *R. intestinalis* L1- 82<sup>T</sup> üstel fazda hasat edilmiş ve 100 µL

bakteri süspansiyonu ( $10^8$  CFU / mL) deney kuyucuklarına ilave edilmiştir. Bakteriyel (yapışkan olmayan ve yapışık) ve ökaryotik hücreler (Caco- 2 ve HT- 29), 2 saat ve 4 saat inkübasyondan sonra hasat edilmiş ve RNAlater'da saklanmıştır.

- 5 Rekombinant flagellinler ile doku kültürü deneyleri için  $5 \times 10^4$  Caco- 2 hücreleri 24 kuyucuklu plakalarda % 5 CO<sub>2</sub>'lik % 75 nemlendirilmiş atmosferde 37 °C'de yetiştirilmiştir. Hücreler, 5- 6. günde konflüansa ulaşmış ve konflüansdan üç gün sonra kullanılmıştır. Hücreler, % 5 CO<sub>2</sub>'lik % 75 nemlendirilmiş
- 10 atmosferde 37 °C'de 2 saat boyunca 100 ng /  $\mu$ l'lik nihai konsantrasyonda rekombinant flagellinler ile inkübe edilmiştir.

### **FISH Analizi**

- 15 FISH analizi, nötr tamponlanmış formalin- sabit bağırsak doku kesitleri üzerinde bir Eub338 genel bakteri probu ve yeni tasarlanmış *R. hominis* A2- 183 spesifik prob ve bir *R. intestinalis* L1- 82<sup>T</sup> özel probu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

20

### ***R. hominis* kütüphane yapımı**

- Küçük boyutlu kütüphane yapımı ve piro sekanslama için *R. hominis* kromozomal DNA, bir UltraClean <sup>TM</sup> Mikrobiyal DNA İzolasyon Kiti (Mo Bio Laboratories Inc) kullanılarak izole
- 25 edilmiş ve fosmid kütüphaneleri için yüksek moleküler ağırlıklı DNA, bir Wizard Genomik DNA Arıtma kiti (Promega) kullanılarak izole edilmiştir.

### **Mikrodizilim analizleri**

- 30 **Bakteri mikrodizilimi**

Bakteriyel RNA fare çekum içeriklerinden izole edilmiş ve imalatçının tavsiyelerine göre ticari kitler kullanılarak daha fazla işlenmiştir. < *R. hominis*'in *E. coli* plazmid kütüphanesinde 6000 klondan amplifiye edilen PCR ürünleri, bir

MicroGrid II TAS (BioRobotics) kullanılarak aminosilan kaplı mikroskop lamaları (Corning) üzerinde çift olarak dizilmiştir.

### ***Fare mikrodizilim analizi***

5 Toplam RNA, ileum ve çıkan kolon dokusundan ekstrakte edilmiş, biyotin etiketli cRNA / aRNA (kullanılan Affymetrix kitine bağlı olarak) haline getirilmiş ve standart teknikler kullanılarak GeneChip NuGO Fare Dizilimi ve GeneChip Fare Genom Dizilimi'ne (Affymetrix) hibridlenmiştir. Veri analizi, 10 R (<http://www.r-project.org>) ve Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>) yazılım paketleri ile gerçekleştirilmiştir.

### **RT- PCR analizi**

R. hominis spesifik primerleri 5'- CCCACTGACAGAGTATGTAATGTAC- 3 've 5'- GCACCACCTGTCACCAC- 3' bağırsak kolonizasyon seviyelerini doğrulamak için fekal numunelerin PCR analizi için kullanılmıştır. Gerçek zamanlı PCR analizi, Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) ile 7500 Hızlı Gerçek Zamanlı PCR Sistemi (Applied Biosystems) kullanılarak 20 gerçekleştirilmiştir. Tüm numuneler üç tekrarlı olarak çalışılmıştır. GyrA normalleştirme için bir referans geni olarak kullanılmıştır. Konak gen ifadesi için, ileumdan ve çıkan kolondan izole edilen toplam ökaryotik RNA, Yüksek Kapasiteli cDNA Ters Transkripsiyon Kiti (Applied Biosystems) 25 kullanılarak cDNA'ya ters- transkribe edilmiştir. Gerçek zamanlı PCR analizi QuantiFast SYBR Green PCR Kiti (Qiagen) ve QuantiTect Primer Testleri (Qiagen) ile 7500 Hızlı Gerçek Zamanlı PCR Sistemi (Applied Biosystems) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm numuneler üç tekrarlı olarak 30 çalışılmıştır. HPRT normalleştirme için bir referans geni olarak seçilmiştir. Tüm RT- PCR verileri, taban 2 ile logaritmik ölçekte, bir P <0.05 anlamlılık sınırı ile tek yönlü ANOVA ile analiz edilmiştir. Kat değişikliklerini hesaplamak için farklılıklar geri dönüştürülmüştür.

## Western Blot

*Roseburia hominis* FlaA1 ve FlaA2'ye karşı immün saflaştırılmış tavşan poliklonal antikorları, Duck vd. (Duck vd. 2007) belgesinde tarif edildiği gibi üretilmiştir. Western blot için, *R. hominis*, UV ışınlanmış standart fare yeminin değişik miktarlarda (0.01 g ila 1 g diyet / 10 mL kültür) varlığında 3 saat boyunca yetiştirilmiş, diyet bileşenlerini çıkarmak için filtrelenmiş ve 8M üre ihtiva eden laemmlı tamponda seyreltilmiştir. Numuneler bir NuPAGE® Novex® % 4- 12 Bis-Tris jeline (Invitrogen) yüklenmiş ve elektroforezlenmiş, ardından WesternBreeze Chromogenic Immunodetection System (Invitrogen) kullanılarak daha ileri işlem yapılmıştır. FlaA1 ve FlaA2 antikorları 1: 1000'de ve yükleme kontrolü anti- DNA giraz A (Abcam) 1: 300'de kullanılmış ve bunu alkalın fosfataz konjüge anti- tavşan izlemiştir. Algılama, yükleme renk kontrolünün geliştirilmesine göre substrat renginin gelişimi ile yapılmıştır.

## İmmünofloresan

*R. hominis*'in immüno lokalizasyonu FlaA1 ve FlaA2 flagellin proteinlerinden tanımlanan peptit dizilerine karşı geliştirilen spesifik antiserumları kullanarak farelerin kolon içeriğinde incelenmiştir. Bağırsak içeriği sürüntüleri (smear), önceden soğutulmuş metanolde sabitlenmiş, anti- FlaA1 veya anti- FlaA2 tavşan antiserumuyla (CovaLabs) gece boyunca 4 °C'de inkübe edilmiş ve Alexa eşek anti tavşan 488 (Molecular Probes) kullanılarak görselleştirilmiştir. T hücre markörleri sıralı 8 µm donuk kesit üzerinde incelenmiştir. Sabit doku kesitleri, FoxP3 (Abcam) ve CD3-FITC (BD Biosciences) primer antikör veya izospesifik IgG ile çift- etiketli Ly6G- FITC, CD3- FITC, CD11b- FITC (BD Biosciences) ile inkübe edilmiştir. Kesitler DAPI ile karşıt lekelenmiş ve Vectashield (Vector Laboratories) ile yerleştirilmiştir. Pozitif hücrelerin miktarının tespiti için, her fare bölümünden en az beş görüş alanı incelenmiştir.

### **Rekombinant flagellinlerin klonlanması ve saflaştırılması**

Flagellin genleri, *R. hominis* , *R. intestinalis*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *Eubacterium rectale* 33656 ve *E. coli* K12'nin sıvı bakteri kültürlerinden PCR amplifikasyonu ve saflaştırması ile izole edilmiştir. Caco- 2 hücreleri, % 5 CO<sub>2</sub>'lik % 75 nemlendirilmiş atmosferde 37 °C'de 2 saat boyunca 100 ng / µl'lik nihai konsantrasyonda rekombinant flagellinler ile inkübe edilmiştir.

10

### **Bağırsak ve MLN hücrelerinin izolasyonu**

Hücreler daha önce açıklandığı gibi küçük modifikasyonlarla ince bağırsak ve mezenterik lenf nodundan izole edilmiştir (Monteleone vd. 2008). Kısaca, hücresel süspansiyonlar % 20 FBS ile takviye edilen RPMI içinde 100U / mL kollajenaz VIII (Sigma- Aldrich) ile 37 °C'de 20 dakika (mezenterik lenf düğümleri) veya 1 saat (bağırsak parçaları) inkübe edilmiştir. Tek hücre süspansiyonları daha sonra akış sitometrisi (tarif edildiği gibi) ile analiz edilmiştir.

20

### **Kemik iliği kaynaklı dendritik hücrelerin ve kültürlerin üretilmesi**

Kemik iliği, C3H / HeN ve C57Bl6 farelerinin femur ve tibialardan hasat edilmiştir. GM-CSF'den türetilen dendritik hücreler için, kemik iliği hücreleri 1x10<sup>6</sup>/ mL % 10 FCS ve 20ng / mL rmGM- CSF ile takviye edilmiş RPMI içinde tekrar süspansiyon haline getirilmiş ve 10 mL / plakada 100 mm<sup>2</sup> doku kültürü plakalarında tohumlanmıştır. Üç gün kültürden sonra, gevşek yapışık hücreler toplanmış ve 12 kuyucuklu doku kültürü plakalarında 1x10<sup>6</sup>/ mL'de GM- CSF ile takviye edilmiş ortamla tekrar plakalanmıştır.

5. Günde, hücreler 6. günde hasat edilmeden önce 100 ng / mL flagellinler ile uyarılmıştır. Flt3L'den türetilmiş dendritik hücreler için kemik iliği hücreleri % 10 FCS ve 200ng / mL rmFlt3 ile takviye edilmiş RPMI içinde 2x10<sup>6</sup>/ mL'de tekrar



süspansiyon haline getirilmiş ve 12- kuyucuklu doku kültürü plakalarında 2 mL / kuyucukta tohumlanmıştır. Hücreler, 4. günde her kuyuya ilave edilen Flt3 ile takviye edilmiş ortam ile 10 gün boyunca kültürlenmiştir. 9. Günde, hücreler, 10. günde hasat edilmeden önce 100 ng / mL flagellin ile uyarılmış ve akış sitometrisi ile analiz edilmiştir.

### **Akış sitometrisi**

Lamina propriyum hücrelerinin ve dendritik hücrelerin tek hücreli süspansiyonları, spesifik florokrom konjuge antikorlarla boyanmadan önce bloklama tamponu (serum ve CD16 / CD32 antikorlu içeren) içinde 4 °C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Lamina propriyum hücreleri, fare CD4- FITC ve CD25- APC (eBioscience), CD8- APC- Cy7 ve CD3- PerCP (Biolegend) ve B220- BV570'e (BD Biosciences) karşı antikorlar ile etiketlenmiştir. Hücre içi FoxP3 etiketlemesi, üreticinin talimatlarına (eBioscience) göre hücre dışı boyama ve hücre fiksasyonu / geçirgenleştirme işleminden sonra gerçekleştirilmiştir. GMCSF'den türeyen dendritik hücreler, CD11c- PE- Cy7, CD11- PerCP Cy5 antikorları ile etiketlenmiştir. IA / IE- APC- Cy7, CD80- PE, CD86- APC, CD8- FITC, B220- BV570. Flt3 türevi dendritik hücreler CD11c- PE- Cy7- , CD11b- veya Siglec- H- PerCP Cy5- , IA / IE- APC- Cy7, CD317- PE, CD40- APC, CD103- FITC, B220- BV570 ile etiketlenmiştir. Hücreler bir FACSAria (BD Biosciences) ve FlowJo yazılımı 7.2.5 sürümü kullanılarak analiz edilmiştir.

### **Sitometrik Boncuk Dizilimi (CBA)**

Kemik iliği hücreleri femur ve tibiadan C3H / HeN ve C57Bl / 6 farelerinin RPMI ortamı ile izole edilmiş ve daha önce açıklandığı gibi Flt3L ile genişletilmiştir. Hücreler, 9 günlük kültürden sonra 100 ng / mL flagellin (ör. *Roseburia*flagellin) ile uyarılmış ve üst faz 10. günde toplanmıştır. Deney, N = 3 oluşturmak üzere üç ayrı sefer gerçekleştirilmiştir.

CBA analizi, Sitometrik Bead Array Fare Geliştirilmiş Hassasiyet Ana Tampon Kiti (BD Biosciences) kullanılarak hücre üst fazları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Standartlar ve numuneler bir FACSArray'de (BD Biosciences) ölçüm için 96 kuyucuklu bir plaka üzerine yüklenmiştir. Sonuçlar, BD FCAP yazılımı (BD Biosciences) kullanılarak analiz edilmiştir.

### **Histoloji**

Çıkan kolon dokusu numuneleri nötr tamponlu formalinde (Sigma) sabitlenmiş, soğuk kür reçinesine gömülmüş ve 4 µm doku kesitleri standart hemotoksilen / eozin yöntemleri kullanılarak boyanmıştır. Her bir hayvandan alınan kolonun tam enine kesitsel alanı, Image Pro Plus yazılımı tarafından kontrol edilen bir QImaging kamera kullanılarak bir Zeiss Axioskop mikroskop üzerinde x200 büyütme ile görüntülenmiştir. Daha sonra, her görüş alanı, Bergvd. dayanan bir yönteme göre 0- 4 arasında skorlanmıştır (Berg vd. 1996). Belli bir derece içindeki ortalama görüş alanı yüzdesi hesaplanmış ve tedavi grupları, student t- testi analizi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Daha ayrıntılı protokoller, tamamlayıcı Malzemeler ve Yöntemler'de açıklanmaktadır.

### **Ek Bilgi (SI) Malzemeler ve Yöntemler**

#### **25 Bakteriyel büyüme koşulları**

*R. hominis* A2- 183<sup>T</sup> (= DSM 16839<sup>T</sup>= NCIMB 14029<sup>T</sup>) sentetik YCFA veya kompleks M2GSC ortamı üzerinde anaerobik olarak yetiştirilmiştir. Kültür, dondurulmuş stoktan Hungate tüplerine inoküle edilmiş ve gece boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Bakteriler daha sonra M2GSC agar plakalarında 48 saat süreyle % 80 N<sub>2</sub>, % 10 CO<sub>2</sub>, ve % 10 H<sub>2</sub> 37 °C'de, bir MACS-MG- 1000 anaerobik çalışma yerinde (Don Whitley Scientific) yetiştirilmiştir. Müsinin etkisi, domuz mide türü III'den (Sigma- Aldrich) YCFA ortamına % 0.5 (w / v) müsin eklenerek araştırılmıştır.

Mikropsuz (GF) farelerin kolonileştirilmesi için, *R. hominis* gece boyunca 37 °C'de YCFA ortamında yetiştirilmiştir. Kültür santrifüjlenmiş ve pelet, % 2 sistein (w / v, Sigma- Aldrich) ve % 3 askorbik asit (w / v, Sigma- Aldrich) takviyeli 1 mL YCFA ortamı içinde yeniden süspanse edilmiştir.

### **Fareler**

C3H / HeN ve C57Bl / 6, Harlan Laboratories'den satın alınmıştır. Fareler, Aberdeen Üniversitesi'ndeki HEPA filtrelenmiş flexi- film yalıtıcıları (Bell İzolasyon Sistemleri) içinde barındırılmıştır. GF C3H / HeN, Jouy- en- Josas'daki INRA gnotobiyotik kemirgen yetiştirme tesisinden sağlanmış ve burada tutulmuştur (ANAXEM platform, Institut Micalis, INRA, Jouy- en- Josas, Fransa). Mikropsuz GF TLR5KO ve doğal tip C57Bl / 6, Andrew Gewirtz tarafından sağlanmış ve Jouy- en Josas'da INRA gnotobiyotik kemirgen yetiştirme tesisinde tutulmuştur. Yönetim ve deneysel prosedürler ilgili Yerel Etik Değerlendirme Komiteleri tarafından onaylanmıştır.

### **Fare deneyleri**

On sekiz GF C3H / HeN erkek fare kontrol ( $N = 8$ ) ve tedavi ( $N = 10$ ) gruplarına ayrılmış ve plastik izolatörler içinde ayrı olarak kafeslenmiştir. Fareler sterilize edilmiş bir ticari diyetle serbest yemleme ile beslenmiştir (R03- 40; UAR). 0, 1 ve 2. günde, tedavi grubundaki hayvanlara 100 µL *R. hominis* gavaaj yoluyla verilmiştir, diğer taraftan kontrol hayvanlarına 100 µL YCFA ortamı verilmiştir. 14. Ve 28. günde, dört kontrol hayvanı ve beş *R. hominis* - ile tedavi edilen hayvan feda edilmiştir. Ileum ve çıkan kolon dört eşit parçaya bölünmüş ve RNAlater (Ambion), nötr tamponlu formalin (NBF; Sigma- Aldrich) veya sıvı azota aktarılmıştır. Tüm çekum RNAlater'a aktarılmıştır

*R. hominis*'e yanıtın özgüllüğünü göstermek için altı GF C3H / HeN erkek fare *E. coli* MG1655 (K12) ile tedavi edilmiş ve üç

hayvan yukarıda tarif edildiği gibi 10. gün ve 22. günde N = 3 elde etmek üzere feda edilmiştir.

Üç GF TLR5KO faresi ve üç C57Bl / 6 WT faresi *R. hominis* flagellinlerin fonksiyonel önemini değerlendirmek için yukarıda tarif edildiği gibi, *R. hominis* kültürü ile aşılantmıştır.28 Gün sonra bu hayvanlar GF muadilleriyle birlikte kurban edilmiştir.

Yirmi dişi C57BL / 6 faresi (6 haftalık), DSS kaynaklı kolit sırasında *R. hominis*'in terapötik etkisini değerlendirmek için kullanılmıştır. 7- 10 günlük bir iklimlendirme periyodundan sonra, fareler 14 gün boyunca günde 50 µL 10<sup>9</sup> CFU *R. hominis* ile dozlanmıştır. Kontrol hayvanları tek başına kültür ortamı ile dozlanmıştır.8. Günden itibaren, farelere 6 gün boyunca içme suyunda DSS (MW 50kDa, 30g / l) verilmiştir. Hayvanlara 14. günde ötenazi uygulanmış ve doku örnekleme yukarıda tarif edildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

### **Doku kültürü deneyleri**

Aksi belirtilmediği sürece tüm hücre kültür reaktantları, Sigma- Aldrich tarafından tedarik edilmiştir. Anaerobik koşullardaki doku kültürü deneyleri için, ısıyla inaktive edilmiş fetus sığır serumu (Gibco), penisilin, streptomisin, amfoterisin B ve L- glutamin ile takviye edilmiş 1.5 mL DMEM (yüksek glikoz, HEPES) ortamında 2x10<sup>5</sup> Caco- 2 veya HT29 hücre, altı kuyucuklu bir transwell plakanın (Corning) üst bölümlerinde tohumlanmıştır. Alt bölmeler, aynı ortamdan 3.0 mL içerir. Konflüansdan sonra 3. güne kadar hücreler 37 °C'de % 5 CO<sub>2</sub> atmosferi altında inkübe edilmiş, antibiyotikleri ve FCS'yi uzaklaştırmak için Hanks'in çözeltisi ile yıkanmış ve antibiyotikler olmadan 24 saat boyunca L- glutamin, sodyum selenit ve transferrin takviyeli DMEM'de azaltılmıştır. Transwell eklentileri daha sonra anaerobik çalışma yeri içerisinde 37 °C'de bir anaerobik kültür kutusuna aktarılmıştır. Her eklentinin üst bölümü anaerobik DMEM hücre

ortamı ile doldurulurken, alt bölme oksijenlenmiş DMEM ile doldurulmuştur.

5 *R. hominis* A2- 183 kültürü, üstel fazda, 3, 500 x g'da 5 dakika süreyle santrifüjlenerek hasat edilmiştir. Pelet yıkanmış ve 0.8 mL anaerobik DMEM içinde yeniden süspansiyon haline getirilmiştir. Yüz mikrolitre bakteri süspansiyonu ( $10^8$  CFU / mL) deney kuyucuklarına ilave edilmiştir. Kontrol kuyucukları, bakteri hücreleri olmaksızın aynı miktarda ortam almıştır. Ek kontroller, Caco- 2 veya HT29 hücreleri olmadan

10 kuluçkaya yatırılan bakteri hücreleri içerir. Bakteriyel ve ökaryotik hücreler, 2 saat ve 4 saat inkübasyondan sonra hasat edilmiştir. Yapışkan olmayan ve yapışan bakteriler aspire edilmiş ve RNAlater (Ambion) içinde saklanmıştır. *R. hominis* hücrelerinin canlılığı, YCFA plakalarına kaplama ile test

15 edilmiştir. Caco- 2 hücreleri veya HT- 29 hücreleri kuyucuklardan hasat edilmiş ve ayrıca RNAlater'de saklanmıştır.

*R. intestinalis* L1- 82<sup>T</sup> (= DSM 14610<sup>T</sup>= NCIMB 13810<sup>T</sup>) kültürü, üstel fazda, 3, 500 xg'de 5 dakika boyunca santrifüjlenerek

20 hasat edilmiştir. Pelet yıkanmış ve 0.8 mL anaerobik DMEM içinde yeniden süspansiyon haline getirilmiştir. Yüz mikrolitre bakteri süspansiyonu ( $10^8$  CFU / mL) deney kuyucuklarına ilave edilmiştir. Kontrol kuyucukları, bakteri hücreleri olmaksızın aynı miktarda ortam almıştır. Ek

25 kontroller, Caco- 2 veya HT29 hücreleri olmadan kuluçkaya yatırılan bakteri hücreleri içerir. Bakteriyel ve ökaryotik hücreler, 2 saat ve 4 saat inkübasyondan sonra hasat edilmiştir. Yapışkan olmayan ve yapışan bakteriler aspire edilmiş ve RNAlater (Ambion) içinde saklanmıştır. *R.*

30 *intestinalis* hücrelerinin canlılığı, YCFA plakalarına kaplama ile test edilmiştir. Caco- 2 hücreleri veya HT- 29 hücreleri kuyucuklardan hasat edilmiş ve ayrıca RNAlater'de saklanmıştır.

Rekombinant flagellinler ile doku kültürü deneyleri için,  $5 \times 10^4$

35 Caco- 2 hücreleri, ısı ile inaktive edilen fetal sığır serumu

(Gibco), penisilin, streptomisin, amfoterisin B ve L- glutamin ile takviye edilmiş DMEM (yüksek glikoz, HEPES) ortamında 24 kuyucuklu plakalara 37 °C'de % 75 nemlendirilmiş % 5 CO<sub>2</sub> atmosferinde tohumlanmıştır. Hücreler 5- 6. günde konflüansa ulaşmış ve konflüentten 3 gün sonra kullanılmıştır. Herhangi bir tedaviden önce, hücreler iki kez Hanks 'Dengeli Tuz Çözeltilisi ile yıkanmış ve 24 saat süreyle L- Glutamin, selenyum ve transferrin ile takviye edilmiş DMEM'de tutulmuştur.

10

### ***R. hominis* kütüphane yapımı**

Küçük boyutlu kütüphane yapımı ve piro sekanslama için *R. hominis* kromozomal DNA, bir UltraClean™ Mikrobiyal DNA İzolasyon Kiti (Mo Bio Laboratories Inc) kullanılarak izole edilmiş ve fosmid kütüphaneleri için yüksek moleküler ağırlıklı DNA, bir Wizard Genomik DNA Arıtma Kiti (Promega) kullanılarak izole edilmiştir. DNA bütünlüğü jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir.

15

DNA, bir Nebulizer Kiti (Invitrogen) kullanılarak mekanik olarak kesilmiş ve jel elektroforezi ile fraksiyon haline getirilmiştir. İstenilen boyuttaki DNA parçaları, jelden çıkarılmış ve bir Wizard® SV Gel ve PCR Temizleme Sistemi (Promega) kullanılarak saflaştırılmıştır. Son onarım, bir DNA Terminatör Son Onarım Kiti (Lucigen) ile yapılmıştır. 1.5- 3.5

20

kb fragmanları CloneSmart® LCamp Kit (Lucigen) kullanılarak klonlanmış ve pJAZZ®- OC Vector (Lucigen) kullanılarak bir 4- 8 kb kütüphane oluşturulmuştur. Fosmid kütüphaneleri CopyControl™ Fosmid Kütüphane Üretim Kiti (Epicenter Biotechnologies) kullanılarak oluşturulmuştur. Koloniler,

25

otomatik bir koloni toplayıcı (BioRobotics BioPick, Genomic Solutions) kullanılarak toplanmış ve % 10 gliserol ve buna tekabül eden antibiyotik ile takviye edilmiş 70 µL 2xLB ortamı içeren 384 kuyucuklu mikrotiter plakalarda arşivlenmiştir. Hücreler çalkalanarak 37 °C'de gece boyunca yetiştirilmiş ve -

30

80 °C'de saklanmıştır.

35

## **Dizileme, birleşme ve açıklama**

Küçük boyutlu kütüphanelerin dizilimi için şablonlar, pSMART-LCamp'in klonlama alanını çevreleyen 1 µL klon biyokütle ve primer SL1 ve SR2 kullanılarak PCR ile oluşturulmuştur. PCR ürünleri Multiscreen PCR Clean-up filtre plakaları (Millipore) kullanılarak saflaştırılmıştır. PJAZZ®-OC klonlarından rekombinant DNA, Wizard® SV 96 Plasmid DNA Arıtma Sistemi (Promega) kullanılarak izole edilmiştir. Fosmid DNA, FosmidMAX™ DNA Saflaştırma Kiti (Epicenter) kullanılarak izole edilmiştir. DNA parçalarının *R. hominis* WGS kütüphanelerinden farklı eklenti boyutlarıyla birlikte son okunması, CEQ8000 (Beckman Coulter) ve ABI 3770 (Applied Biosystems) DNA dizileyicileri kullanılarak elde edilmiştir.

15 *R. hominis*'den elde edilen genomik DNA ayrıca 454 GS20 (454 Life Sciences) ve 454 FLX dizileyicileri (Roche) kullanılarak dizilenmiştir. Sanger ve 454 verileri MIRA sürüm 3 ile bir araya getirilmiştir ([http://chevreux.org/projects\\_mira.html](http://chevreux.org/projects_mira.html); (1). RAST ek açıklama hattı (<http://rast.nmpdr.org>; (2)), genomun otomatik ve elle açıklaması ve karşılaştırmalı genomik analizler için kullanılmıştır. Ek açıklama yapılmış genomik dizilim *R. hominis* A2-183, GenBank'a CP003040 erişim numarası ile gönderilmiştir.

## **25 Mikrodizilim analizleri**

### ***Bakteri mikrodizilimi***

Bakteriyel RNA, RNeasy Mini Kit (Qiagen) kullanılarak fare çekum içeriğinden izole edilmiş ve daha sonra MICROBZenginleştirme™ Kiti (Ambion), MICROBİfade™ Bakteriyel mRNA Zenginleştirme Kiti (Ambion) ve MessageAmp™ II- Bacteria RNA Amplifikasyon Kiti (Applied Biosystems) ile işlem görmüştür. RNA, cDNA sentezi sırasında dCTP- Cy3 veya dCTP- Cy5 ile etiketlenmiştir (CyScribe Birinci Sarmal cDNA Etiketleme Kiti; Amersham). Etiketli ürünler CyScribe GFX

Saflaştırma Kiti (Amersham) kullanılarak saflaştırılmıştır. < *R. hominis*'in *E. coli* plazmid RA8 kütüphanesinde 6000 klondan amplifiye edilen PCR ürünleri, bir MicroGrid II TAS (BioRobotics) kullanılarak aminosilan kaplı mikroskop lamaları (Corning) üzerinde çift olarak dizilmiştir. *rpoD* ve *gyrA* referans genlerinin amplifiye edilen parçaları dizi üzerinde rastgele kontroller olarak dağıtılmıştır. Mikrodizilim hibridizasyonu, GeneTAC hibridizasyon istasyonunda (Genomic Solutions) gerçekleştirilmiştir. Boya etiketlemesi ikinci bir hibridizasyon için değiştirilmiş ve tekrarlanabilirlik sağlamak ve istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde etmek için ayrı bir RNA saflaştırması da etiketlenmiş ve iki kez hibridlenmiştir. Toplam olarak, her karşılaştırma için dört slayt hibridize edilmiş, amplifiye edilmiş klon başına toplam 12 hibridize nokta üretilmiştir. Floresans, GeneTac Integrator sürüm 3.0.1 yazılımı ile bir GeneTAC LS IV (Genomik Çözümler) kullanılarak iki kanalda ölçülmüştür. Nokta yoğunlukları log dönüşümlüdür ve prob etiketleme ve hibridizasyon verimliliklerinde farklılıkları gidermek için Loess normalleştirme uygulanmıştır. Farklı ifade testi için log-oran değerleri üzerinde tek örneklemli t- testi kullanılmıştır. Katlama değişimi > 2 ve P <0.05 olduğunda veriler anlamlı kabul edilmiştir.

## 25 ***Fare mikrodizilim analizi***

Ileum ve çıkan kolon dokusu RNeasy'nden uzaklaştırılmış ve Trizol'de (Invitrogen) lizlenmiştir. RNA, standart kloroform / izopropanol adımları kullanılarak izole edilmiştir. Toplam RNA, RNase Kit (Qiagen) ile daha da arıtılmış ve bir RNase içermeyen DNase I (Qiagen) sindirim basamağı dahil edilmiştir. RNA bütünlüğü, Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) kullanılarak belirlenmiştir. Toplam RNA, 3 'IVT İfade Kiti (Affymetrix) kullanılarak Tek Döngülü Hedef Etiketleme Kiti (Affymetrix) veya biyotin etiketli aRNA kullanılarak biyotinle 35 etiketlenmiş cRNA'ya işlenmiştir. Bir GeneChip Fluidics



Station 450 (Affymetrix) üzerindeki GeneChip NuGO Fare Dizisi ve GeneChip Fare Genom Dizisi (Affymetrix) ile hibritleşme, Tıp Bilimleri Enstitüsü Mikrodizilim Merkez Tesisleri'nde (University of Aberdeen, İngiltere) gerçekleştirilmiştir.

5 Çipler, bir Affymetrix GeneChip Tarayıcı 3000 (Affymetrix) ile taranmıştır. Görüntü kalitesi analizi, Gene Chip Operating Software (GCOS) (Affymetrix) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veri analizi, ücretsiz olarak temin edilebilen R (<http://www.r-project.org>) ve Bioconductor  
10 (<http://www.bioconductor.org>) yazılım paketleri ile gerçekleştirilmiştir. Farklı ifadeyi test etmek için Bioconductor paketi limma tarafından sağlanan ılımlı F- testi kullanılmıştır. Veri, Benjamini ve Hochberg yanlış keşif yöntemini kullanılarak  $P < 0.05$  olduğunda anlamlı kabul  
15 edilmiştir: İstatistiksel analiz iki zaman noktasının her biri için ayrı ayrı yapılmıştır. Tüm farklı olarak ifade edilen genler ( $P < 0.05$ ), yol haritaları oluşturmak için MetaCore analitik yazılımına (GeneGo, St Joseph, MI) aktarılmıştır. Entegre yol zenginleştirme analizi, bilgiye dayalı kanonik  
20 yolları ve endojen metabolik yolları kullanarak gerçekleştirilmiştir. İlgili entegre yolların sıralaması, hipergeometrik dağılım kullanılarak hesaplanan P değerlerine dayanmaktadır. Haritadaki tüm genlerin tam takımı içinden haritadaki genlerin sayısı ile karşılaştırıldığı  
25 düşünüldüğünde, Pdeğerleri, giriş listesinden gelen belirli sayıda genin, haritadaki belirli sayıda genle şans eseri eşleşmesi olasılığını temsil eder.

Verilerin Gen Ontolojisi (GO) tabanlı işlevsel yorumu, orijinal web erişilebilir programının genişletilmiş bir  
30 versiyonu olan DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) kullanılarak yapılmıştır (3). Anlamlı olarak farklı transkriptler ( $P < 0.05$ ), spesifik GO koşulları için anlamlı ölçüde zenginleştirilmiş gen ifadesinin şablonlarını ortaya çıkarmak için 'Biyolojik Süreç' GO kategorisi içinde tahsis  
35 edilmiştir.

Mikrodizilim verileri National Biotechnology Information Center (NCBI) Gen İfadesi Omnibus'a (erişim numarası GSE25544; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) gönderilmiştir.

## 5 RT- PCR analizi

*R. hominis* spesifik primerleri 5'- CCCACTGACAGAGTATGTAATGTAC-3 've 5'- GCACCACCTGTCACCAC- 3', bağırsak kolonizasyon seviyelerini doğrulamak için fekal numunelerin yarı kantitatif ve gerçek zamanlı PCR analizi için kullanılmıştır. Diğer bakteriyel PCR primerleri, on- line araç Primer3Plus (4) kullanılarak tasarlanmış ve Sigma- Aldrich'den satın alınmıştır. Gerçek zamanlı PCR analizi, Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) ile 7500 Hızlı Gerçek Zamanlı PCR Sistemi (Applied Biosystems) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir: 95 °C'de 10 dakika süreyle bir döngü, bunu takiben 95 °C'de 15 saniye ve 60 °C'de 1 dakika süreyle 40 döngü yapılmış, ardından bir ayrışma aşamasıyla sona ermiştir. Tüm numuneler üç tekrarlı olarak çalışılmıştır. *GyrA*, örnekler arasındaki düşük varyasyon nedeniyle normalizasyon için bir referans geni olarak kullanılmıştır. Konak gen ifadesi için, ileumdan ve çıkan kolondan izole edilen 2µg toplam ökaryotik RNA, rastgele primerlerle Yüksek Kapasiteli cDNA Ters Transkripsiyon Kiti (Applied Biosystems) kullanılarak cDNA'ya ters- transkribe edilmiştir. Gerçek zamanlı PCR analizi QuantiFast SYBR Green PCR Kiti (Qiagen) ve QuantiTect Primer Testleri (Qiagen) ile 7500 Hızlı Gerçek Zamanlı PCR Sistemi (Applied Biosystems) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR döngüsü koşulları aşağıdaki gibidir: 95 °C'de 5 dakika süreyle bir döngü, bunu takiben 95 °C'de 10 saniye ve 60 °C'de 30 saniye boyunca 40 döngü yapılmış, ardından bir ayrışma basamağı ile sona ermiştir. Tüm numuneler üç tekrarlı olarak çalışılmıştır. *HPRT*, örnekler arasındaki düşük varyasyon nedeniyle normalizasyon için bir referans geni olarak seçilmiştir.

Tüm RT- PCR verileri, taban 2 ile logaritmik ölçekte, bir  $P < 0.05$  anlamlılık sınırı ile tek yönlü ANOVA ile analiz edilmiştir. Kat değışikliklerini hesaplamak için farklılıklar geri dönüştürülmüştür.

5

### Western Blot

İmmün saflaştırılmış tavşan poliklonal antikorları, *Roseburia hominis* Fla1 ve Fla2, Duck vd (5) belgesinde tarif edildiği gibi üretilmiştir. Kısacası, Yeni Zelanda beyaz dişi  
10 tavşanları, tam Freund adjuvanında sentetik peptit ile aşılannmış ve birkaç kez tekrarlanmıştır. R. hominis Fla1 için, peptit NH<sub>2</sub>- CRSQVRGLNKASDNA- CONH<sub>2</sub> ve peptit NH<sub>2</sub>- IDGNFTSKKLQVGSCL- COOH kullanılmışken, R. hominis Fla2 için, peptit C- AQYNDDAKSVLEILK- COOH ve peptit C- GLNKASRNSQDGIS-  
15 CONH<sub>2</sub> kullanılmıştır. Bağışıklamayı takiben, antikorlar, peptitlerin 1 mL aktifleştirilmiş sefaroze boncuklara bağlanmasıyla hazırlanan bir immünoafinite kolonundan saflaştırılmıştır.

Western blot için, R. hominis , UV ışınlanmış standart fare  
20 yeminin değışik miktarlardaki (0.01 g ila 1 g diyet / 10 mL kültür) varlığında 3 saat boyunca yetiştirilmiş, diyet bileşenlerini çıkarmak için filtrelenmiş ve 8M üre ihtiva eden laemmlı tamponda seyreltilmiştir. Her numuneden otuz µL bir NuPAGE® Novex® 4- 12 Bis- Tris jelinin (Invitrogen)  
25 kuyucuklarına yüklenmiş ve ardından WesternBreeze Chromogenic Immunodetection System (Invitrogen) kullanılarak daha ileri işlemlere tabi tutulmuştur. Antikor seyrelticide, Fla1 ve Fla2 antikorları 1: 1000 oranında seyreltilmiş ve yükleme kontrol anti- DNA giraz A (Abcam) 1: 300 oranında seyreltilmiş ve gece  
30 boyunca 4 °C'de inkübe edilmiş, bunu oda sıcaklığında alkalın fosfataz konjüge anti- tavşan ile 1 saat süreyle inkübasyon takip etmiştir. Algılama, yükleme renk kontrolünün geliştirilmesine göre substrat renginin gelişimi ile yapılmıştır.

35

## **FISH Analizi**

Nötr tamponlu formalinde sabitlenen dokular, Technovit 8100 (Heraeus Kulzer) içine yerleştirilmiştir. İki mikron kesitler bir döner mikrotom (Leica / Reichert Autocut) kullanılarak kesilmiştir. Slayt başına dokuya, 100 µm, 200 µm ve 300 µm'de üç bölüm alınmış ve her bir hayvan için dokuz bölüm elde edilmiştir.

Slaytlar, % 50 (v / v), % 80 ve % 96 etanol içinde art arda inkübasyon yoluyla dehidrasyona uğratılmış ve oda sıcaklığında (RT) kurutulmuştur. Kullanılan 16S rRNA FISH problemleri genel bir bakteri probu Eub338 (GCTGCCTCCCGTAGGAGT; Cy3) ve yeni tasarlanmış *R. hominis* A2- 183 spesifik probudur, bunlar bağırsak bakteri izolatlarının bir paneline karşı spesifiklik açısından kapsamlı bir şekilde test edilmiştir

(GTACATTACATACTCTGTCTAGTG; FITC). Kurutulmuş numuneye 100 µL hibridizasyon tamponu içinde 10 mikrolitrelik prob (30 ng / µL) uygulanmış ve proba özgü sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Slaytlar yıkama tamponunda 50 °C'de 30 dakika yıkanmış, artık yıkama tamponunu uzaklaştırmak için buz gibi suya batırılmış ve sıkıştırılmış hava akımı altında kurutulmuştur. Karşıt boyama, 4 ', 6- diamidino- 2- fenilindol (DAPI; Vector Laboratories Inc) ile yapılmış ve slaytlar solmayı önlemek üzere floresan için Vectashield Bağlama Ortamı (Vector Laboratories Inc) ile yerleştirilmiştir. Bakteriler bir Leica DM RBE floresan mikroskopu (Leitz GMBH) kullanılarak görselleştirilmiş ve bir Penguin 600CL kamera (Pixera) ve Vizör 3.0 yazılımı (Studio Lite) ile fotoğraflanmıştır. Yüksek büyütme görüntüleri (x630) Apokromatics sistemi (Leica) kullanılarak alınmıştır.

## **İmmünofloresan**

*R. hominis* flagellinin immüno lokalizasyonu FlaA1 ve FlaA2 flagellin proteinlerinden tanımlanan peptit dizilerine karşı geliştirilen spesifik antiserumları kullanarak, *R. hominis* ile kolonize farelerin kolon içeriğinde incelenmiştir. Bağırsak içerikleri PBS'de seyreltilmiş, cam slaytlara sürülmüş ve

havayla kurutuldu. Sürüntüler önceden soğutulmuş metanolde - 20 °C'de 5 dakika sabitlenmiş, gece boyunca 4 °C'de anti- Fla1 veya anti- Fla2 tavşan antiserumu (1: 125, CovaLabs) ile inkübe edilmiş ve Alexa eşek tavşanı 488 (1: 1000, Moleküler Problar) kullanılarak görselleştirilmiştir.

Kesitler önceden soğutulmuş metanolde -20 °C'de 30 dakika sabitlenmiştir. T hücre belirteçlerinin immüno- lokalizasyonu ardışık donuk kesitler (8µm) üzerinde incelenmiştir. Kesitler ya önceden soğutulmuş metanolde 30 dk, - 20 °C'de (Ly6G FITC, CD3 FITC, CD11b FITC, hepsi 1: 50'de (BD Biosciences)) sabitlenmiş ya da çift etiketli FoxP3 (1: 500 , Abcam) için CD3 FITC (1: 100, BD Biosciences) ile oda sıcaklığında 2 dakika boyunca % 1 paraformaldehit (PFA) içinde sabitlenmiş, bunu PBS içinde % 0.01 Triton X içinde 3 dakika sabitleme takip etmiştir. Tüm kesitler, PBS içinde% 10 bağışıklık öncesi serum içeren (pH 7.4)% 10 BSA (Sigma) ile bloke edilmiştir. Metanol ile sabitlenmiş dokular oda sıcaklığında 1 saat boyunca primer antikörler ile inkübe edilmiştir. PFA ile sabitlenmiş kesitler antikörlerle gece boyunca 4 °C'de inkübe edilmiştir. FoxP3, Alexa keçi anti tavşan 594 (1: 1000, Moleküler Problar) kullanılarak görselleştirilmiştir. Kesitler, DAPI ile karşıt etiketlenmiş ve Vectashield (Vector Laboratories) ile yerleştirilmiştir. Pozitif hücrelerin miktar tayini için, her fare bölümünden en az beş görüş alanı, yukarıda tarif edilen görüntüleme yazılımı ve mikroskop ayarları kullanılarak incelenmiştir.

## **Histology**

Çıkan kolon dokusu numuneleri oda sıcaklığında sabit ajitasyonla nötr tamponlu formalinde (Sigma) üç saat sabitlenmiştir. Numuneler, PBS içerisinde durulanmış ve daha sonra % 70 etanole aktarılmış ve enine kesitleme için yönlendirilene kadar oda sıcaklığında saklanmış ve üreticinin talimatlarına göre Technovit 8100 (Heraeus Kulzer) kullanılarak soğuk kürleme reçinesine gömülmüştür. Gömülü

doku, Technovit 3040 (Heraeus Kulzer) kullanılarak Histoblocs üzerine yerleştirilmiştir. Dört mikron kesit, bir cam bıçağı (TAAB Laboratories Equipment Ltd.) ile donatılmış bir döner mikrotom (Leica Autocut) kullanılarak kesilmiştir. Doku

5 bölgeleri, standart hemotoksilen / eozin yöntemleri kullanılarak boyanmıştır. Her bir hayvandan alınan çıkan kolonun tam enine kesitsel alanı, Image Pro Plus yazılımı tarafından kontrol edilen bir Qlmaging kamera kullanılarak bir Zeiss Axioskop mikroskop üzerinde x200 büyütme ile

10 görüntülenmiştir. Daha sonra, her görüş alanı, Bergvd. (6) dayanan bir yöntemle göre 0- 4 arasında skorlanmıştır. Histopatoloji skorları şu şekildedir: 0 = Sığ kriptler, infiltrasyon yapan enflamatuar hücre yok veya az, bozulmamış epitel, goblet hücreleri müsinle dolu gibi görünür (patoloji

15 yok); 1 = Kriptler hafif epitel hücre hiperplazisi gösterebilir, kriptler arasında bazı yaygın bulaşıcı eflamatuar hücreler görülebilir, luminal epitel bozulmadan görünür, goblet hücreleri hafifçe müsini tükenmiş olarak görünebilir; 2 = Kriptler, farklı epitel hiperplazisi

20 bulguları ile daha derin görünür, goblet hücrelerinde müsini tükenmesi, infiltrasyon yapan enflamatuar hücreler barizdir ve doğada çok odaklı olabilirler, ancak infiltratlar submukozada görülmezler; 3 = Lezyonlar, mukozanın daha geniş bir alanını içerir ve/ veya 2. sınıfta görülenden daha sıktır. Lezyonlar

25 submukozayı içermez. Luminal epitel hücreler küçük erozyonlar sergiler. Lezyonlar transmural değildir. 4 = Kript epiteli erozyona uğramış gibi görünür. Apseler olabilir. Luminal epitel hücreleri düzensiz görülür, bazen de tamamen kaybedilir. Transmural infiltrat gözlenir - genellikle

30 lümende epitel hücrelerinin tamamen kaybedilmesi ile ilişkilidir.

Belli bir derece içindeki ortalama görüş alanı yüzdesi hesaplanmış ve tedavi grupları, student t- testi analizi kullanılarak karşılaştırılmıştır.

### **Rekombinant flagellinlerin klonlanması ve saflaştırılması**

Flagellin genleri, *R. hominis*, *R. intestinalis*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *Eubacterium rectale* 33656 ve *E. coli* K12'nin sıvı bakteri kültürlerinden PCR amplifikasyonu ve saflaştırması ile izole edilmiştir. *R. hominis*'den gelen saflaştırılmış flagellin fragmanı ifade vektörü pT7- MAT- Tag- FLAG (Sigma) içine sokulmuş ve *S. enteritidis* ve *E. coli* K12'den gelen flagellin fragmanları ifade vektörü pGEX- 6P- 1'e (GE Healthcare) sokulmuştur. Rekombinant flagellin, plazmid DNA'sının sırasıyla *E. coli* BL21 Rosetta ve *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine dönüştürülmesi ve 1mM IPTG ile indüksiyona (izopropil DB- galaktosidaz) tabi tutulması yoluyla ifade edilmiştir. Flagellinler üreticinin talimatlarına göre FLAG boncukları (Sigma) ve Ni- NTA (nikel- nitrioloasetik) boncukları (Clontech, Takara) içeren hücre lizatlarından toplanmıştır. Preparatın saflığı, coomassie mavisi çözeltisi ile boyanan SDS- PAGE ile değerlendirilmiştir. Flagellin fragmanlarının aktivitesi, üretici talimatlarına göre NF-  $\kappa$ B ile dönüştürülmüş Caco- 2 hücre hattı kullanılarak Lusiferaz Analizil (Promega) ile belirlenmiştir.

Caco- 2 hücreleri, % 5 CO<sub>2</sub>'lik % 75 nemlendirilmiş atmosferde 37 °C'de 2 saat boyunca 100 ng /  $\mu$ l'lik nihai konsantrasyonda rekombinant flagellinler ile inkübe edilmiştir. İşlemden sonra hücreler iki kez PBS çözeltisi ile yıkanmış ve toplam RNA izolasyonu için hasat edilmiştir.

### **Bağırsak ve MLN hücrelerinin izolasyonu**

Hücreler daha önce açıklandığı gibi küçük modifikasyonlarla ince bağırsak ve mezenterik lenf nodundan izole edilmiştir (7). Kısaca, hücresel süspansiyonlar % 20 FBS ile takviye edilen RPMI içinde 100U / mL kollajenaz VIII (Sigma- Aldrich) ile 37 °C'de 20 dakika (mezenterik lenf düğümleri) veya 1 saat (bağırsak parçaları) inkübe edilmiştir. Tek hücre

süspansiyonları daha sonra akış sitometrisi ile analiz edilmiştir.

### **Kemik iliği kaynaklı dendritik hücrelerin ve kültürlerin**

#### **5 üretilmesi**

Kemik iliği, daha önce tarif edildiği gibi (8- 11) C3H / HeN ve C57Bl6 farelerinin femur ve tibiasından hasat edilmiştir. GMCSF'den türetilen dendritik hücreler için, kemik iliği hücreleri  $1 \times 10^6$ / mL % 10 FCS ve 20ng / mL rmGM- CSF ile takviye edilmiş RPMI içinde tekrar süspansiyon haline getirilmiş ve 10 mL / plakada 100 mm<sup>2</sup> doku kültürü plakalarında tohumlanmıştır. Üç gün kültürden sonra, gevşek yapışık hücreler toplanmış ve 12 kuyucuklu doku kültürü plakalarında  $1 \times 10^6$ / mL'de GM- CSF ile takviye edilmiş ortamla tekrar plakalanmıştır.5. Günde, hücreler 6. günde hasat edilmeden önce 100 ng / mL flagellinler ile uyarılmıştır. Flt3L'den türetilmiş dendritik hücreler için kemik iliği hücreleri % 10 FCS ve 200ng / mL rmFlt3 ile takviye edilmiş RPMI içinde  $2 \times 10^6$ / mL'de tekrar süspansiyon haline getirilmiş ve 12- kuyucuklu doku kültürü plakalarında 2 mL / kuyucukta tohumlanmıştır. Hücreler, 4. günde her kuyuya ilave edilen Flt3 ile takviye edilmiş ortam ile 10 gün boyunca kültürlenmiştir.9. Günde, hücreler 10. günde hasat edilmeden önce 100 ng / mL flagellinler ile uyarılmıştır. Hücreler, hassas pipetleme ile plakalardan hasat edilmiş ve akış sitometrisi ile analiz edilmiştir.

### **Akış sitometrisi**

Lamina propriyum hücreleri, mezenterik lenf nodu hücreleri ve dendritik hücrelerin tek hücreli süspansiyonları, spesifik florokrom konjuge antikörlerle boyanmadan önce bloklama tamponu (serum ve CD16 / CD32 antikoru içeren) içinde 4 °C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Lamina propriyum hücreleri, fare CD4- FITC ve CD25- APC (eBioscience), CD8- APC- Cy7 ve CD3- PerCP Cy5.5 ve B220- BV570'e (Biolegend) karşı antikörler ile etiketlenmiştir. Hücre içi FoxP3 (eBioscience) etiketlemesi,



5 üreticinin talimatlarına (eBioscience) göre hücre dışı boyama ve hücre fiksasyonu / geçirgenleştirme işleminden sonra gerçekleştirilmiştir. GM- CSF'den türetilen dendritik hücreler, CD11b- PerCP Cy5.5 (BD Biosciences), CD11c- PE- Cy7, IA / IE- APC- Cy7, CD80- PE, CD86- APC, CDB- FITC, B220- BV570 (BioLegend) antikorları ile etiketlenmiştir. Flt3L'den türetilen dendritik hücreler CD11c- PE- Cy7- , CD11b- ya da Siglec- H- PerCP Cy5.5 (Bioegend), IA / IE- APC- Cy7, CD317- PE, CD40- Alexa Fluor 647, CD103- FITC, B220- BV570 ile etiketlenmiştir. Hücreler bir FACSArray (BD Biosciences) ve FlowJo yazılımı 7.2.5 sürümü kullanılarak analiz edilmiştir.

#### **Sitometrik Boncuk Dizilimi (CBA)**

15 Kemik iliği hücreleri femur ve tibiaadan C3H / HeN ve C57Bl / 6 farelerinin RPMI ortamı ile izole edilmiş ve daha önce açıklandığı gibi Flt3L ile genişletilmiştir. Hücreler, 9 günlük kültürden sonra 100 ng / mL flagellin (ör. *Roseburia* flagellin) ile uyarılmış ve üst faz 10. günde toplanmıştır. Deney, N = 3 oluşturmak üzere üç ayrı sefer gerçekleştirilmiştir.

20 CBA analizi, üreticinin talimatlarına göre Sitometrik Bead Array Fare Geliştirilmiş Hassasiyet Ana Tampon Kiti (BD Biosciences) kullanılarak hücre üst fazları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Standartlar ve numuneler bir FACSArray'de (BD Biosciences) ölçüm için 96 kuyucuklu bir plaka üzerine yüklenmiştir. Sonuçlar, BD FACSArray yazılımı (BD Biosciences) kullanılarak analiz edilmiştir.

#### **Kuru vücut ağırlığı ve lipid karkas analizi**

30 İçi boşaltılmış fare gövdesi tartılmış, sabit ağırlığa kadar liyofilize edilmiş ve daha sonra analiz için öğütülmüştür. Lipid içeriği, daha önce tarif edildiği gibi kloroform / metanol (2: 1 v / v) ile ekstraksiyonla (1: 100 w / v) belirlenmiştir (12).

#### **35 *Roseburia flagellin*'lerin klonlanması.**

**Sıvı bakteri kültüründen flagellin geninin PCR ile amplifikasyonu.**

*Roseburia hominis* A2- 183 flagellin serileri Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) web sitesinden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) alınmıştır.

*Roseburia intestinalis* L1- 82<sup>T</sup> (NCIMB = 13810; DSM = 14610<sup>T</sup>) flagellin sekansları, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) web sitesinden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) alınmıştır. Flagellin genleri ve proteinleri için erişim numaraları Tablo B'de verilmektedir (Tablo B - burada açıklanan *Roseburia* flagellinler için erişim numaralarının özeti) \*\*\*

**Bakterilerden toplam RNA izolasyonu**

Toplam RNA, RNeasy minikit (Qiagen, Sussex, UK) kullanılarak RNaz içermeyen DNaz I (Qiagen) sindirimiyle birleştirilen ve imalatçının protokolüne dayalı olarak 1 mL log faz bakteri sıvı kültüründen izole edilmiştir. Kısaca, sıvı kültürden bir mililitre 1.5 mL'lik bir tüp içine yerleştirilmiş, 5.000 xg'de 5 dakika süreyle 4 °C'de santrifüje tabi tutulmuş ve üst faz atılmıştır. Bakteriyel pelet, 100 µL lizozim içeren TE tamponu (10 mM Tris- HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) içinde yeniden süspansiyon haline getirilmiş ve oda sıcaklığında (oda sıcaklığında) inkübe edilmiştir. Gram- pozitif bakteriler RH (*Roseburia hominis*), 3 mg / mL'lik bir lizozim konsantrasyonu ile 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra, % 1 β-merkapto- etanol içeren üç yüz elli mikrolitre liziz tampon maddesi, vorteksleme yoluyla hücrelerin parçalanması için tüp içine ilave edilmiş ve 250 µL % 100 etanol (Molecular grade, Merck) eklenmiştir. Meydana gelen süspansiyonun yedi yüz mikrolitresi bir yakalama tüpü ile donatılmış RNeasy mini kolona uygulanmış, 15 saniye boyunca 8.000 x g'de santrifüj edilmiş ve tüp boşaltılmıştır. Yine, 350 µL yıkama tamponu kolona uygulanmış, bu 8.000 xg'de 15 saniye boyunca santrifüje tabi tutulmuş ve akan sıvı atılmıştır. DNA sindirimi, her bir

kolona, 30 ünite DNaz I'in 70 µL RDD tamponu ile karıştırılarak eklenmesi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Kolon daha önce anlatıldığı gibi 350 µL yıkama tamponu ile, daha sonra iki kez 500 µL RPE 5 tamponu ile yıkanmıştır. Boş kolonun 8.000 xg'de 1 dakika boyunca santrifüjlenerek kurutulmasından sonra 40 µL RNaz içermeyen su doğrudan kolona ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiş ve 1 dakika süreyle 8.000 x g'de santrifüj edilmiştir. Toplam RNA'yı içeren elüat, 10 konsantrasyonu belirlemek için Nanodrop tekniği kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. RNA bütünlüğü, Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) ile RINH genomik bölümü (Aberdeen Üniversitesi, İngiltere) tarafından kontrol edilmiştir. Bütünlük sayısı ile RNA (RIN) 9.5 ve 10 arasında 15 olmuş ve mükemmel kalitede kabul edilmiştir. Toplam RNA daha sonra kullanılıncaya kadar - 80 °C'de saklanmıştır.

### ***Ters transkripsiyon***

Toplam RNA, Quantitect ters Transkripsiyon kiti (Qiagen) 20 kullanılarak üretici talimatlarına göre ters transkribe edilmiştir. Kısaca, toplam 12 µL'lik bir hacimdeki bir mikrogram toplam RNA 1 dakika boyunca 42 °C'de 1 X gDNA silme tamponu ile inkübe edilmiş ve daha sonra 1X Quantiscript RT tamponu (3 uL), RT primer karışımı (2 uL) ve 20 µL'lik bir 25 nihai hacimde Quantiscript ters transkriptaz (1 µL) ile karıştırılmıştır. Ters transkripsiyon programı enzimi inaktive etmek için 42 °C'de 15 dakika, ardından 95 °C'de 3 dakika sürmüştür. Ortaya çıkan komplementer DNA (cDNA) konsantrasyonu 50 ng / µL olmuş ve cDNA, daha sonra kullanılıncaya kadar - 20 30 °C'de saklanmıştır.

### ***Flagellin genlerinin PCR amplifikasyonu***

Genetik DNA'dan flagellini amplifiye etmek için ileri ve geri primerler elle tasarlanmış ve Sigma- Aldrich'den (Poole, 35 İngiltere) alınmıştır. Flagellin fragmanlarının PCR ile

*Roseburia hominis* (fla1)

Ters primer (5'- 3'): CTTAGATCTCTGTAATAAGGATAATA

İleri primer (5'- 3'): CTCGAGATATGGTGGTTAATCATAA

10 *Roseburia intestinalis* (Fla1)

Ters primer (5'- 3'): AATGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTGCAGAATCTGCAA

İleri primer (5'- 3'): CTCGAGATATGGTAGTTAATCATAA

*Roseburia intestinalis* (Fla3)

Ters primer (5'- 3'): CTTAGATCTCTGTAACAGAGAAAGTA

20 İleri primer (5'- 3'): CCGGGATCCATGGTAGTACAGCACAAT

Bir şablon olarak 1 µL bakteri kültürünü kullanarak, flagellin genleri PCR ile çoğaltılmıştır. Amplifikasyon için termal program, optimum KOD polimeraz (Novagen, Madison, WI)

Şekil 1A ve Tablo 1'de tarif edildiği gibi karıştırılarak klonlama vektörü pCR™ - Blunt II- TOPO'ya klonlanmıştır.

Tablo 1 PCR ürününün pCR- Blunt II- TOPO klonlama vektörüne eklenmesi için karışımın bileşeni. Tuz çözeltisi ve vektör-

5 enzim karışımı kullanıma hazır çözeltilerdir.

| Bileşenler            | Hacim (µL) |
|-----------------------|------------|
| PCR ürünü             | 2          |
| Tuz çözeltisi         | 1          |
| H <sub>2</sub> O      | 2          |
| Vektör enzim karışımı | 1          |
| Toplam                | 6          |

#### **Elektroforetik ayırma ve PCR ürünlerinin saflaştırılması.**

PCR ile çoğaltılan izole edilmiş flagellin ürününü görüntülemek için, PCR reaksiyonu, 1X Mavi- turuncu yükleme boyası (Promega) ile karıştırılmış ve nükleik asitleri boyamak için 0.5 µg / mL Etidyum bromür içeren % 1 agaroz jeline (TAE tamponu (40 mM Tris baz, % 0.1 (v / v) asetik asit, 1 mM EDTA) içinde seyreltilmiş % 1 agarozdan yapılmış, kaynatılmış ve bir jel tepsiye dökülmüş) yüklenmiştir. Örnekler, TAE'nin çalıştırma tamponu olarak kullanılmasıyla 120 V altında 30 dakika boyunca göç ettirilmiştir. Göç tamamlandığında, jel ultraviyole (UV) altında görselleştirilmiş ve ürün, bir referans standart kullanılarak tanımlanmış ve temiz bir neşter kullanılarak kesilip çıkarılmıştır. Jel dilimi daha sonra, önceden tartılmış bir eppendorf tüpüne aktarılmış ve ağırlığı boş tüpün ağırlığı çıkarılarak kaydedilmiştir. PCR ürünü saflaştırılmıştır. Membran bağlama çözeltisi jel dilimine, 10 mg agaroz jel dilim başına 10 µL çözelti oranında eklenmiştir. Karışım daha sonra jel dilim tamamen eriyene kadar sık sık vorteksleme ile 65 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Tüp, DNA saflaştırmasına geçmeden önce tüm içeriğin tüpün tabanında olmasını sağlamak için kısa bir süre oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir. Bu noktadan itibaren saflaştırma PCR'si,

5 üretici talimatlarına göre Wizard® SV Gel ve PCR Temizleme sistemi (Promega, Southampton, İngiltere) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR ürünü başına bir SV minikolumn, bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir. PCR ürünü SV minikolon grubuna ilave edilmiş ve 1 dakika oda sıcaklığında (RT) inkübe edilmiştir. Kolon, 1 dakika süreyle 16.000 xg'de santrifüje tabi tutulmuş ve akan sıvı atılmıştır. Kolon daha sonra 700 µL zar yıkama çözeltisi ilave edilerek yıkanmış ve oda sıcaklığında 5 dakika santrifüje tabi tutulmuştur. Akan sıvı 10 boşaltılmış ve tertibat 1 dakika tekrar santrifüjlenmiş ve kalan etanolün buharlaştırılması için oda sıcaklığında 2 dakika kurutulmuştur. Kolon daha sonra taze bir 1.5 mL'lik nükleaz içermeyen tüp içine aktarılmıştır. PCR ürününü geri kazanmak için, kolonun merkezine 25 µL'lik nükleaz içermeyen 15 su uygulanmıştır ve DNA, oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilerek ve 16.000 x g'de 1 dakika döndürülerek elüsyona tabi tutulmuştur. Elüatın konsantrasyonu Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve - 20 °C'de saklanmıştır.

20

### ***Flagellinin sindirimi ve ifade vektörü***

200 Mikrolitre taze çözölmüş DH5α kompetent hücreleri buz ve 4 µL PCR ürünü karışımı üzerinde tutulmuş ve buz üzerinde 5 dakika bırakılmıştır. Isı şoku 42 °C'de 1 dakika boyunca uygulanmış ve hücreler, 400 µL SOC ortamı ilave edilmeden önce buz üzerine geri döndürölmüştür. SOC Medium (Sigma), öncelikli *Escherichia coli* kompetent hücre dönüşömlerinin geri kazanılması adımımda kullanılan zengin bir ortamdır. SOC kullanımı, kompetent hücrelerin dönüşüm etkinliğini en üst 25 düzeye çıkarır.

30

Hücreler 1 saat boyunca 37 °C'de büyütmöş ve karışımın 200 µL'si Kanamisin 50 µL / mL ile takviye edilmiş LB agar plakası üzerine kaplanmıştır. Pozitif klonlar mini preparatlar olarak hazırlanmış, nanodroplanmış ve flagellini kesip çıkarmak için 35 2 saat boyunca BamH1 ve Xho1 ile sindirilmiştir. Şekil 2A'da

gösterilen ifade vektörü pT7- MAT- Tag- FLAG- 2 (Sigma) ayrıca BamHI ve XhoI ile sindirilmiştir. Ürünün % 1 agaroz jeli üzerinde ayrılmasından ve sindirilmiş vektörün ve fragmanın saflaştırılmasından sonra, vektör ve eklenti, gece boyunca 4 °C'de bağlanmış ve *E. coli* DH5a'ya dönüştürülmüştür. Ligasyon ürünleri, 100 ug / mL ampisilin ile desteklenmiş LB agar üzerine kaplanmıştır. Pozitif klonlar minipreparatlar olarak hazırlanmış ve *E. coli* BL21 (DE3) kompetent hücrelerine dönüştürülmüştür. Pozitif koloniler, eklentinin mevcudiyetini kontrol etmek için uygun primerler ile dizilmiştir. Pozitif klonlardan gliserol sıvı bölüntüleri yapılmıştır. Vektör kodlayan kodlama vektörleri *Roseburia* flagellinleri kodlayan ifade vektörleri ayrıca minipreparatlar olarak hazırlanmış ve saflaştırma verimi arttırmak için *E. coli* kompetent hücrelerine dönüştürülmüştür; Rh1, Rh2 ve Ri2 için *E. coli* kompetent hücreler *E. coli* BL21 Rosetta ve RI3, Ri1, Ri4, Se, St, K12 ve Er *E. coli* kompetent hücreleri için *E. coli* BL21'dir (DE3).

#### 20 ***Roseburia* flagellinlerin ifadesi ve saflaştırılması**

Flagellin genini (RH1 veya FLA1) kodlayan dönüştürülmüş *E. coli* (ör. BL21 Rosetta), ampisilin (100 µg/ mL) ile 1 litrelik LB ortamında büyütülmüş ve Rosetta hücreleri için 37 °C'de 180 rpm'de log fazına kadar çalkalanarak kloramfenikol (50 µg/ mL) ile takviye edilmiştir. Kültür, flagellin proteinin spesifik ifadesine izin vermek için aynı koşullar altında 1 mM IPTG ile 3 saat süreyle uyarılmıştır. Bakteriler, 4.000 xg, 4 °C'de 10 dakika süreyle santrifüje tabi tutmak suretiyle pelet haline getirilmiş ve 60 mL tampon 1 (50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl) içinde yeniden süspansiyon haline getirilmiş ve bir Soniprep 150 (Sanyo, Japonya) ile BL21 (DE3) kullanılırken 1 dakika süreyle, ya da Rosetta kullanıldığında her bir dakikadan sonra 1 dk dinlenme ile 3 dk ultrasonik banyoda tutulmuştur. Hücre lizati 4 °C'de 10 dakika süreyle 9.000 xg'de santrifüje tabi tutulmuş ve üst faz atılmıştır.

Çözünmeyen proteinleri ihtiva eden pelet, 60 mL tampon 2 (50 mM Tris (pH 8.0), 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, % 0.5 Triton- X100, 1 mM DTT) içinde yeniden süspansiyon haline getirilmiş, yeniden ultrasonik banyoda tutulmuş ve 5, 000 xg'de 15 dakika boyunca 4 °C'de santrifüjlenmiştir. Çözünmeyen fraksiyon ikinci ve üçüncü kez tampon 2 ile yıkanmıştır. Yukarıda tarif edildiği gibi, Tx- 100 ve DTT olmadan tampon 2 kullanılarak son bir yıkama gerçekleştirilmiştir. Proteinleri çözündürmek için çözünmeyen fraksiyon 4 mL üre tamponunda (2 M üre, 50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl) sonikasyon kullanılarak yeniden süspansiyon haline getirilmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika süreyle 5.000 x g'de santrifüj edilmiştir. Üst faz, dekante edilerek atılmış ve pelet, sonikasyon ile 2 mL 4M üre, 50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl içinde yeniden süspansiyon haline getirilmiş ve 5.000 x g'de, oda sıcaklığında 5 dakika santrifüje tabi tutulmuştur. Üst faz, dekante edilerek toplanmış ve pelet, sonikasyon ile 2 mL 8M üre, 50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl çözeltisi içinde yeniden süspansiyon haline getirilmiş ve 5.000 x g'de, oda sıcaklığında 5 dakika santrifüje tabi tutulmuştur. Üst faz dekante edilerek toplanmış ve çözündürülmüş flagellinler içeren 6 M üre çözeltisi yapmak için 4 M üre fraksiyonuna karıştırılmıştır. Bir mililitre Talon reçinesi (Clontech, Takara, İngiltere), 2 mL tampon 1 (50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl) ile iki kez yıkanmış ve oda sıcaklığında 1.000 x g'de, 2 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz atılmış ve flagellin içeren 6 M üre fraksiyonu ilave edilmiş ve 1 saat boyunca 4 °C'de rotasyon için bırakılmıştır. Oda sıcaklığında, 2 dakika 1.000 x g'de santrifüj edildikten sonra reçine, 2 M üre, 50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 15 mM imidazol içeren tamponla iki kez yıkanmıştır. Santrifüj işleminden sonra reçine, 300 µL elüsyon tamponu (360 mM Tris- HCl, 680 mM imidazol, 360 mM NaCl, 0.35 N HCl, 1.43 M üre) ile 10 dakika inkübe edilmiş, hafifçe karıştırılmış ve oda sıcaklığında 2 dakika süreyle 2.000 x g'de santrifüj edildikten sonra elüat toplanmıştır. Elüsyon



bir kez tekrarlanmış ve iki elüat karıştırılmıştır. Anti- FLAG M2 manyetik boncukları (Sigma) kullanan ikinci bir saflaştırma aşaması, protein preparatının saflığını geliştirmek için gerçekleştirilmiştir. FLAG boncukları için uygun, 0.9 M üre

5 nihai konsantrasyonunu elde etmek için, Talon reçinesinin elüatına 400 mikrolitre ultra saf su yavaş yavaş ilave edilmiştir. 250 mikrolitre FLAG manyetik boncukları, üst fazı uzaklaştırmak için manyetik bir stand (Ambion) üzerinde karıştırılarak ve bırakılarak 750 µL tampon 1 ile iki kez

10 yıkanmıştır. Talon elüatı boncuklara ilave edilmiş ve 4 °C'de 30 dakika döndürülmüştür. Boncuklar, 1 mL 0.9 M üre, 50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl ile beş kez yıkanmıştır. Elüsyon, boncuklara 250 µL , 0.9 M üre, 50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl ihtiva eden 200 µL / mL FLAG peptit çözeltisi ilave

15 edilmesini, iyice karıştırmayı ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe etmeyi içerir. Tüpler manyetik standın üzerine yerleştirilmiş ve nihai ürün toplanmıştır. Bu elüsyon aşaması bir kez tekrarlanmış ve 500 µL nihai ürün tekrar 0.9 M üre ile PBS içerisinde 4 °C'de 1 saat boyunca diyaliz edilmiş, sıvı

20 bölüntüler olarak hazırlanmış ve -80 °C'de saklanmıştır. Preparatların saflığı, coomassie mavisi çözeltisi ile boyanmış SDS- PAGE ile değerlendirilmiştir (Şekil 3A). Kullanımdan hemen önce, protein sıvı bölüntüsü, 20 kDa moleküler ağırlıkta kesilmiş slide- a- lyser (Pierce, UK) içinde iki kez tamponu

25 değiştirerek PBS'ye karşı 1 saat diyaliz edilmiş ve protein konsantrasyonu Bradford yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Endotoksin ölçümünde doğrulanmış değerler <0.25 EU / mL'dir. Flal'i kodlayan nükleotit dizisi, SEQ ID NO: 1'de gösterilmiş ve Flal'in amino asit dizisi, SEQ ID NO: 2'de gösterilmiştir.



**D2 alanı** iki segmentten oluşur: Lys 177'den Gly 189'a N- ucu segmenti ve Ala 284'den Glu 405'e kadar C- ucu segmenti. Çoğunlukla iki sarmal 285- 289 ve 288- 298 hariç  $\beta$  iplikçiklerinden oluşur.

- 5 **D3 alanı** Tyr 190'dan Val 283'e kadar olan merkezi bir segmenti içermektedir. Çoğunlukla kısa bir sarmal kıvrımı (199- 209) ile  $\beta$  iplikçiklerinden yapılmıştır.

Teori ile sınırlanmak istememekle birlikte, TLR5'in tanınması ve aktivasyonuna katılan flagellin proteininin iki önemli  
10 bölgesinin SEQ ID NO: 2'nin (N- D1 alanı) 79- 117 konumlarındaki amino asitler ve SEQ ID NO: 2'nin (C- D1 alanı) 408- 439 konumlarındaki amino asitler ve bunların yanı sıra yanı sıra SEQ ID NO: 2'nin 411 konumundaki amino asit alanin (A), SEQ ID NO: 2'nin 412 konumundaki amino asit glutamin (Q)  
15 ve SEQ ID NO: 2'nin 420 konumundaki amino asit serin (S) olduğu düşünülür.

## ÖRNEKLER

### ***R. hominis* tercihen kolonu kolonileştirir**

- 20 C3H / HeN mikropsuz (GF) fareler peş peşe günlerde üç gavaaj *R. hominis* ile aşılanmıştır. Buluş sahipleri, Firmicutes filum'dan tek bir bakteri türü ile mikropsuz farelerin ilk başarılı mono- kolonizasyonunu bildirmişlerdir. Başarılı kolonizasyon, bu oksijene duyarlı bakteriyi korumak için % 3  
25 askorbik asit ve % 2 sistein içeren bir aşılama ortamı kullanılarak başarılmıştır. Bağırsak dokusunun flüoresan *in situ* hibridizasyon ile analizi, (FISH) bunu ortaya koymuştur *R. hominis*'in hem ileum hem de kolonu kolonize ettiğini ancak kolonda çok daha yüksek sayılarda bulunduğunu ortaya  
30 koymuştur. Bakterilerin aynı zamanda kolonik mukozayla yakından ilişkili olduğu bulunmuştur (Şek. S1A). Kolonizasyon daha sonra PCR ile doğrulanmış ve yaklaşık  $1 \times 10^{10}$  bakteri / g dışkı sayısına sahip *R. hominis*'e özgü primerler kullanılarak miktar tayini yapılmıştır (Şek. S1 BC). GF hayvanlarının

dışkıları, herhangi bir bakteri varlığı açısından negatif olarak test edilmiştir.

**R. hominis genom, konak etkileşimlerini destekleyen benzersiz genleri açığa çıkarır.**

*R. hominis* A2- 183'in tam genom dizisi üretilmiş ve tek bir 3, 592, 125 bç kromozomu tarafından temsil edilmiştir (Şek. 1A). RAST platformunu kullanarak genomun otomatik ve elle açıklaması, dört ribozomal operon, 66 RNA ve 3, 273 öngörülen protein bulunduğunu ortaya koymuştur. En büyük gen grubu, karbonhidrat metabolizmasına karışan proteinleri kodlayan Subsystem Category Carbohydrates (271 gen) ve ardından Protein Metabolizması (197) ve Amino asitler ve Türevleri (175)' e aitti (Şek. 1B). Diğer önemli fonksiyonel kategoriler Motilite ve Kemotaksi (49) ve Dormansi ve Sporülasyon'u (12) içerir. Karşılaştırmalı genomik analiz, tam bakteriyel genomlar arasında genomik yapı ve işlev bakımından en yakın akrabanın *Eupacterium rectale* (Mahowald vd. 2009) olduğunu ortaya koymuştur, bu organizmaların taksonomik ilişkisine bağlı olarak şaşırtıcı değildir (Duncan vd. 2006, Aminov vd. 2006). İki genomun 1.095 gen ile karşılaştırmalı yeniden yapılanması, genlerin yaklaşık % 25'inde farklı olduklarını ortaya koymuştur. Özellikle, bu farklılıklar, konak ile etkileşim için önemli fonksiyonları kodlayan genleri kapsamaktadır. Örneğin, tip IV fimbriyel birleşme (assembly) proteinleri PilB ve PilC'yi kodlayan Motility ve Chemotaxis genleri *E. rectale* içinde bulunur, ancak *R. hominis* içinde bulunmaz, oysa ki flagellar bazal vücut çubuk proteini FlgC, flagellar kanca-bazal vücut kompleks proteini FliE, flagellin proteini FlaB ve flagellar motor geçiş proteini FliG *R. hominis* için benzersizdir (Tablo S1). İki bakteri genomu aynı zamanda 42 farklı karbonhidrat genine göre farklılık göstererek farklı beslenme gereksinimlerini yansıtır. İlginçtir ki *R. hominis*, *Salmonella* ve *E. coli* bakterileri türleri tarafından ifade edilen

FliC'ye homolog olan flagellinlerin aksine her ikisi de FLA tipi iki flagellin genini ifade etmesi açısından benzersizdir.

**Tablo S1. R. hominis ve E. rectale genomlarının karşılaştırmalı analizi**

Karşılaştırmalı genomik analiz, genomik yapı ve fonksiyon bakımından *Eupacterium rectale*'nin R. hominis'in bilinen en yakın akrabasıdır olduğunu ve iki genom arasında yaklaşık % 25 farklılık olduğunu göstermiştir. (A) R. hominis içinde mevcut olan, ancak E. rectale içinde bulunmayan genler ve (B) E. rectale içinde mevcut olan, ancak R. hominis içinde bulunmayan genler.

Tablo S1A. R. hominis içinde mevcut olan, ancak E. rectale içinde bulunmayan genler.

| Alt Kategori                      | Rol                                                          |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| <b>Amino Asitler ve Türevleri</b> |                                                              |
| Alanin, serin, ve glisin          | L- serin dehidrataz, alfa alt birimi                         |
| Alanin, serin, ve glisin          | L- serin dehidrataz, beta alt birimi                         |
| Arginin; üre döngüsü, poliaminler | Arginin yolağı regulatör proteini ArgR, arg'in baskılayıcısı |
| Arginin; üre döngüsü, poliaminler | NADP- spesifik glutamat dehidrojenaz                         |
| Arginin; üre döngüsü, poliaminler | Ornitin dekarboksilaz                                        |
| Arginin; üre döngüsü, poliaminler | Spermidin Putresin ABC taşıyıcı permeaz                      |
| Aromatik amino asitler ve         | Biyosentetik Aromatik amino asit aminotransferaz alfa        |

|                                            |                                                   |
|--------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| türevleri                                  |                                                   |
| Dallı- çinkoir amino asitleri              | Treonin dehidrataz                                |
| Glutamin, glutamat, aspartat, asparaginler | Aspartat aminotransferaz                          |
| Glutamin, glutamat, aspartat, asparagin    | L- asparaginaz                                    |
| Lizin, treonin, metiyonin, ve sistein      | Sülfat permeaz                                    |
| Lizin, treonin, metiyonin, ve sistein      | Lizin dekarboksilaz                               |
| Lizin, treonin, metiyonin, ve sistein      | Adenozilhomosisteinaz                             |
| Lizin, treonin, metiyonin, ve sistein      | Metiyonin ABC taşıyıcı ATP- bağlayan protein      |
| Lizin, treonin, metiyonin, ve sistein      | Metiyonin ABC taşıyıcı permeaz protein            |
| Lizin, treonin, metiyonin, ve sistein      | Metiyonin ABC taşıyıcı substrat- bağlayan protein |
| Lizin, treonin, metiyonin, and sistein     | S- ribozilhomosistein liyaz                       |
| Lizin, treonin, metiyonin, ve sistein      | Homoserin kinazın öngörülen fonksiyonel analoğu   |
| <b>Karbonhidratlar</b>                     |                                                   |
| Aminoşekerler                              | Beta- heksosaminidaz                              |

|                                    |                                                                      |
|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| Merkezi karbonhidrat metabolizması | 6- fosfoglukonolaktonaz                                              |
| Merkezi karbonhidrat metabolizması | Aldoz 1- epimeraz                                                    |
| Merkezi karbonhidrat metabolizması | 4- Hidroksi- 2- oksoglutarat aldolaz                                 |
| Merkezi karbonhidrat metabolizması | Pirüvat:ferredoksin oksidoredüktaz, alfa alt birimi                  |
| Merkezi karbonhidrat metabolizması | Pirüvat:ferredoksin oksidoredüktaz, beta alt birimi                  |
| Merkezi karbonhidrat metabolizması | Pirüvat:ferredoksin oksidoredüktaz, delta alt birimi                 |
| Merkezi karbonhidrat metabolizması | Pirüvat:ferredoksin oksidoredüktaz, gama alt birimi                  |
| Merkezi karbonhidrat metabolizması | Malat permeaz                                                        |
| Di- ve oligosakkaritler            | Beta- glukozit bgl operon antiterminatör, BglG ailesi                |
| Di- ve oligosakkaritler            | Galaktoz operon baskılayıcı, GalR- LacI ailesi                       |
| Di- ve oligosakkaritler            | Galaktoz/metil galaktozit ABC taşıyıcı sistemi, permeaz protein MglC |
| Di- ve oligosakkaritler            | Çoklu şeker ABC taşıyıcıları, ATP- bağlayan protein                  |
| Fermentasyon                       | Enoyl- CoA hidrataz                                                  |

|                 |                                                           |
|-----------------|-----------------------------------------------------------|
| Fermentasyon    | D- laktat dehidrojenaz                                    |
| Monosakkaritler | 2- dehidro- 3- deoksiglukonat kinaz                       |
| Monosakkaritler | 2- dehidro- 3- deoksifosfoglukonat aldolaz                |
| Monosakkaritler | 2- deoksi- D- glukonat 3- dehidrojenaz                    |
| Monosakkaritler | Alfa- glukosidaz                                          |
| Monosakkaritler | Altronat hidrolazlar                                      |
| Monosakkaritler | Altronat oksidoredüktaz                                   |
| Monosakkaritler | Beta- glukuronidaz                                        |
| Monosakkaritler | D- mannonat oksidoredüktaz                                |
| Monosakkaritler | Mannonat dehidrataz                                       |
| Monosakkaritler | Ramnogalakturonid degradasyon proteini RhiN               |
| Monosakkaritler | Uronat izomeraz                                           |
| Monosakkaritler | Şeker diasit kullanma regülatörü SdaR                     |
| Monosakkaritler | Riboz ABC taşıyıcı sistemi, ATP- bağlayan protein RbsA    |
| Monosakkaritler | Riboz ABC taşıyıcı sistemi, permeaz protein RbsC          |
| Monosakkaritler | Pirimidin- nükleosit fosforilase                          |
| Monosakkaritler | Früktokinaz                                               |
| Monosakkaritler | Früktoz operonun transkripsiyonel baskılayıcısı, DeoR     |
| Monosakkaritler | Mannoz- 1- fosfat guanililtransferaz                      |
| Monosakkaritler | Mannoz- 6- fosfat izomeraz                                |
| Monosakkaritler | Olası alfa- ksilosit ABC taşıyıcıları, substrat- bağlayan |



|                                        |                                                                                     |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| One- karbon Metabolizması              | Serin- - pirüvat aminotransferaz                                                    |
| Şeker alkolleri                        | Gliserol alımını kolaylaştırıcı protein                                             |
| Şeker alkolleri                        | Gliserol- 3- fosfat ABC taşıyıcı, periplazmik gliserol- 3- fosfat- bağlayan protein |
| Alt kategori yok                       | Karbon depolama regülatörü                                                          |
| <b>Hücre Duvarı ve Kapsül</b>          |                                                                                     |
| Kapsüllü ve hücre dışı polisakkaritler | D,D- heptoz 7- fosfat kinaz                                                         |
| Kapsüllü ve hücre dışı polisakkaritler | GDP- L- fucose sentetaz                                                             |
| Kapsüllü ve hücre dışı polisakkaritler | dTDP- 4- dehidrorhamnose 3,5- epimeraz                                              |
| Kapsüllü ve hücre dışı polisakkaritler | Peptidoglycan N- asetilglucosamine deasetilase                                      |
| Kapsüllü ve hücre dışı polisakkaritler | Polysaccharide deasetilase                                                          |
| Kapsüllü ve hücre dışı polisakkaritler | Glikoz- 1- fosfat timidililtransferaz                                               |
| Kapsüllü ve hücre dışı polisakkaritler | Teikoik asit translokasyon permeaz protein TagG                                     |
| Kapsüllü ve hücre dışı polisakkaritler | dTDP- 4- dehidroramnoz redüktaz                                                     |
| Kapsüllü ve hücre dışı polisakkaritler | dTDP- glikoz 4,6- dehidrataz                                                        |

|                                                                   |                                                                                                      |
|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| dış<br>polisakkaritler                                            |                                                                                                      |
| Kapsüllü ve hücre<br>dış<br>polisakkaritler                       | TRAP- tipi taşıyıcı sistemi,<br>küçük permeaz bileşeni,<br>öngörülen N- asaetilmuraminat<br>taşıyıcı |
| Kapsüllü ve hücre<br>dış<br>polisakkaritler                       | Glikoz- 1- fosfat<br>sitidililtransferaz                                                             |
| Alt kategori yok                                                  | N- asetilmuramoyl- L- alanin<br>amidaz                                                               |
| <b>Kümelenme tabanlı alt sistemler</b>                            |                                                                                                      |
| Kemotaksis, yanıt<br>regülatörleri                                | PAS/PAC ile birlikte diguanilat<br>siklaze (GGDEF alanı)                                             |
| Kümelenme tabanlı<br>alt sistemler                                | Metaloproteazlarla ilişkili<br>Stage II sporülasyon proteini                                         |
| Sitokrom biogenesis                                               | Glutamat- 1- semialdehit<br>aminotransferaz                                                          |
| Proteninin dışarı<br>aktarımı?                                    | Metalloendopeptidazlarla<br>ilişkili membrane proteinleri                                            |
| Proteninin dışarı<br>aktarımı?                                    | NLP/P60 ailesi proteini                                                                              |
| Proteninin dışarı<br>aktarımı?                                    | Peptid çinkoiri serbest bırakma<br>faktörü 2                                                         |
| Proteninin dışarı<br>aktarımı?                                    | Varsayımsal protein BH3604                                                                           |
| Alt kategori yok                                                  | Hücre bölünmesi proteini FtsW                                                                        |
| Alt kategori yok                                                  | FIG003307: varsayımsal protein                                                                       |
| Alt kategori yok                                                  | SSU ribozomal protein S1 p                                                                           |
| <b>Kofaktörler, Vitaminler, Prostetik<br/>Gruplar, Pigmentler</b> |                                                                                                      |
| Koenzim A                                                         | 2- dehidropantoat 2- redüktaz                                                                        |
| Koenzim A                                                         | Pantotenat:Na+ simporter                                                                             |
| Fe- S kümeleri                                                    | Demir- kükürt kümeleri birleşme                                                                      |

|                                                |                                                                         |
|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
|                                                | proteini SufD                                                           |
| NAD ve NADP                                    | L- Aspartat dehidrojenaz                                                |
| Piridoksin                                     | Piridoksin metabolizmasının<br>öngörülen transkripsiyonel<br>regülatörü |
| Tetrapiroller                                  | Alfa- ribazol- 5'- fosfat fosfataz                                      |
| Alt kategori yok                               | Öngörülen hidroksimetilpirimidin taşıyıcı CvtX                          |
| <b>DNA Metabolizması</b>                       |                                                                         |
| CRISP'ler                                      | CRISPR- ilişkili protein Cas2                                           |
| DNA onarımı                                    | Uracil- DNA glikozilaz, aile 1                                          |
| DNA onarımı                                    | Bilinmeyen fonksiyonun eksinükleaz ABC alt birim A paraloğu             |
| DNA onarımı                                    | A/G- spesifik adenin glikozilaz                                         |
| DNA onarımı                                    | Eksodeoksiribonükleaz VII küçük alt birimi                              |
| DNA onarımı                                    | Eksonükleaz SbcC                                                        |
| DNA onarımı                                    | Eksnükleaz SbcD                                                         |
| DNA onarımı                                    | putatif ATP- bağımlı DNA helikaz YjcD                                   |
| DNA replikasyonu                               | DNA polimeraz III alt birimleri gama ve tau                             |
| DNA replikasyonu                               | DNA replikasyon proteini DnaC                                           |
| Alt kategori yok                               | DNA- bağlayan protein HBSu                                              |
| <b>Dormansi ve Sporülasyon</b>                 |                                                                         |
| Spor DNA koruması                              | Küçük asitte çözünen spor proteini, beta- tip SASP                      |
| Alt kategori yok                               | Spor maturasyon proteini A                                              |
| Alt kategori yok                               | Spor maturasyon proteini B                                              |
| <b>Yağ asitleri, Lipidler ve İzoprenoidler</b> |                                                                         |
| Yağ asitleri                                   | 4'- fosfopanteteinil transferaz                                         |
| Triaçilgliseroller                             | Lizofosfolipaz                                                          |

|                       |                                                                                              |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Triaçilgliseroller    | Lizofosfolipaz L2                                                                            |
| Triaçilgliseroller    | Monogliserit lipaz                                                                           |
| <b>Membran Taşıma</b> |                                                                                              |
| ABC taşıyıcıları      | Fosfonat ABC taşıyıcısı ATP-bağlayan protein                                                 |
| ABC taşıyıcıları      | Fosfonat ABC taşıyıcısı permeaz protein phnE1                                                |
| ABC taşıyıcıları      | Fosfonat ABC taşıyıcısı permeaz protein phnE2                                                |
| ABC taşıyıcıları      | Dipeptid taşıyıcı ATP- bağlayan protein DppD                                                 |
| ABC taşıyıcıları      | Dipeptid taşıyıcı ATP- bağlayan protein DppF                                                 |
| ABC taşıyıcıları      | Dipeptid taşıyıcı sistemi permeaz protein DppB                                               |
| ABC taşıyıcıları      | Dipeptid taşıyıcı sistemi permeaz protein DppC                                               |
| ABC taşıyıcıları      | Dipeptid- bağlayan ABC taşıyıcı, periplazmik substrat-                                       |
| Alt kategori yok      | Enerji veren çiftlenmiş ATPaz bileşeni BL0693                                                |
| Alt kategori yok      | Metiyoninle düzenlenen ECF taşıyıcının enerji veren modülünün çiftlenmiş ATPaz bileşeni MtsB |
| Alt kategori yok      | Öngörülen ECF'nin substrat- spesifik bileşeni BL0695                                         |
| Alt kategori yok      | Metiyoninle düzenlenmiş substrat spesifik bileşen MtsA                                       |
| Alt kategori yok      | Öngörülen piridoksinin substrat spesifik bileşeni PdxU2                                      |
| Alt kategori yok      | ThiT of Tiyamin ECF'nin substrat spesifik bileşeni ThiT                                      |
| Alt kategori yok      | Enerji veren modülün transmembran bileşeni BL0694                                            |

|                                    |                                                     |
|------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Alt kategori<br>yok                | Enerji veren modülün transmembran<br>bileşeni MtsC  |
| <b>Muhtelif</b>                    |                                                     |
| Bitki-<br>Prokaryot DOE<br>projesi | Aspartil- tRNA(Asn) amidotransferaz<br>alt birimi A |
| Bitki-<br>Prokaryot DOE<br>projesi | Aspartil- tRNA(Asn) amidotransferaz<br>alt birimi B |
| Bitki-<br>Prokaryot DOE<br>projesi | Glutamil- tRNA(Gln) amidotransferaz<br>alt birimi A |
| Bitki-<br>Prokaryot DOE<br>projesi | Glutamil- tRNA(Gln) amidotransferaz<br>alt birimi B |
| Bitki-<br>Prokaryot DOE<br>projesi | Fosfoglikozamin mutaz                               |
| Bitki-<br>Prokaryot DOE<br>projesi | Fosfomannomutaz                                     |
| Bitki-<br>Prokaryot DOE<br>projesi | ABC taşıyıcı sistemi, şeker-<br>bağlayan protein    |
| Bitki-<br>Prokaryot DOE<br>projesi | Alfa- L- arabinofuranosidaz II<br>öncülü            |
| Bitki-<br>Prokaryot DOE<br>projesi | Alfa- N- arabinofuranosidaz                         |
| Bitki-<br>Prokaryot DOE<br>projesi | Alfa- N- arabinofuranosidaz 2                       |
| Bitki-                             | COG3533 salgılanan protein                          |

|                                     |                                                            |
|-------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Prokaryot DOE<br>projesi            |                                                            |
| Bitki-<br>Prokaryot DOE<br>projesi  | L- arabinoz izomeraz                                       |
| Bitki-<br>Prokaryot DOE<br>projesi  | Arabinoz operonun transkripsiyonel baskılayıcısı           |
| Bitki-<br>Prokaryot DOE<br>projesi  | ramnogalakturonan asetilesteraz                            |
| Alt kategori yok                    | Membran proteaz YbbK'nın varsayılan aktivite düzenleyicisi |
| <b>Motilite ve Kemotaksis</b>       |                                                            |
| Prokaryotada<br>flagellar motilite  | Flagellar bazal gövde çubuk proteini FlgC                  |
| Prokaryotada<br>flagellar motilite  | Flagellar kanca bazal gövde kompleks proteini FliE         |
| Prokaryotada<br>flagellar motilite  | Flagellin protein FlaB                                     |
| Alt kategori yok                    | Flagellar motor anahtar proteini FliG                      |
| <b>Azot Metabolizması</b>           |                                                            |
| Alt kategori yok                    | Azot düzenleyici protein P- II                             |
| Alt kategori yok                    | Hcp transkripsiyonel düzenleyici HcpR (Crp/Fnr ailesi)     |
| <b>Nükleozitler ve Nükleotitler</b> |                                                            |
| Pürinler                            | Adenin deaminaz                                            |
| Pirimidinler                        | Üridin kinaz                                               |
| Alt kategori yok                    | Sınıf III'ün (anaerobic) ribonükleotit redüktazı, büyük    |
| <b>Fosfor Metabolizması</b>         |                                                            |
| Alt kategori                        | Eksopolifosfataz                                           |

|                                |                                                           |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| yok                            |                                                           |
| Alt kategori yok               | Fosfat taşıyıcı sistemi permeaz protein PstA              |
| Alt kategori yok               | Fosfat taşıyıcı sistemi permeaz protein PstC              |
| Alt kategori yok               | Sodyuma bağımlı fosfat taşıyıcı                           |
| <b>Potasyum metabolizması</b>  |                                                           |
| Alt kategori yok               | Potasyum voltaj kapılı kanal alt aile KQT                 |
| <b>Protein Metabolizması</b>   |                                                           |
| Protein biyosentezi            | EnqC ile ilişkili olası GTPaz                             |
| Protein biyosentezi            | Aspartil- tRNA(Asn) sentetaz                              |
| Protein biyosentezi            | tRNA- Ala- CGC                                            |
| Protein biyosentezi            | tRNA- Gly- CCC                                            |
| Protein biyosentezi            | tRNA- Pro- GGG                                            |
| Protein biyosentezi            | tRNA- Ser- CGA                                            |
| Protein biyosentezi            | tRNA- Ser- GGA                                            |
| Protein biyosentezi            | tRNA- Val- CAC                                            |
| Protein katlama                | Foldaz proteini PrsA öncülü                               |
| Protein işleme ve modifikasyon | [NiFe] hidrojenaz nikel katılma proteini HypA             |
| Protein işleme ve modifikasyon | [NiFe] hidrojenaz nikel katılma ile ilişkili protein      |
| <b>RNA Metabolizması</b>       |                                                           |
| RNA işleme ve modifikasyon     | Peptidil- prolil cis-trans izomeraz                       |
| RNA işleme ve modifikasyon     | Ribonükleaz P protein bileşeni                            |
| Transkripsiyon                 | Sistein sentazın öngörülen transkripsiyonel düzenleyicisi |
| Transkripsiyon                 | RNA polimeraz sigma faktörü SigV                          |

| <b>Regülasyon ve hücre sinyalleşmesi</b>                  |                                                               |
|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| Programlanmış hücre ölümü ve Toksin-antitoksin sistemleri | YafQ toksin proteini                                          |
| Alt kategori yok                                          | Bifonksiyonel otolisin Atl                                    |
| Alt kategori yok                                          | Hücre zarfı ilişkili transkripsiyonel zayıflatıcı LytR-       |
| Alt kategori yok                                          | Aromatic hidrokarbon kullanımı transkripsiyonel düzenleyicisi |
| Alt kategori yok                                          | katabolit kontrol proteini A                                  |
| Alt kategori yok                                          | Katabolit baskılama HPr-benzeri protein Crh                   |
| <b>Solunum</b>                                            |                                                               |
| Alt kategori yok                                          | Ferredoksin                                                   |
| Stres yanıtı                                              |                                                               |
| Soğuk şok                                                 | Soğuk şok proteini CspG                                       |
| <b>Virülans, hastalık ve savunma</b>                      |                                                               |
| Antibiyotiğe dirençli ve toksik                           | Olası Co/Zn/Cd eflüks sistemi membran füzyon proteini         |
| Antibiyotiğe dirençli ve toksik                           | Transkripsiyonel düzenleyici, MerR ailesi                     |
| Antibiyotiğe dirençli ve toksik                           | Ağır metal- (Cd/Co/Hg/Pb/Zn)-translokasyon P- tip             |
| Antibiyotiğe dirençli ve toksik                           | Vankomisin B- tipi dirençli protein VanW                      |
| Antibiyotiğe dirençli ve toksik                           | Tetrasiklin dirençli protein TetW                             |



**Tablo S1B** *E. rectale* içinde mevcut olan, ancak *R. hominis* içinde bulunmayan genler.

| <b>Hücre duvarı ve kapsülü</b>                                |                                                                      |
|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| Gram- Pozitif hücre duvarı bileşenleri                        | Hücre duvarı yüzeyi çapa ailesi proteini                             |
| <b>Kümelenme esaslı alt sistemler</b>                         |                                                                      |
| Hücre Bölünmesi                                               | Hücre bölünmesiyle ilişkili<br>FIG001960: FtsZ ile etkileşen protein |
| Izoprenoid/ hücre duvarı biyosentezi: öngörülen               | penisilin- bağlayan protein, varsayılan                              |
| undecaprenyl difosfat fosfataz                                |                                                                      |
| Muhtemelen organik hidroperoksit direnci                      | Homoserin kinaz                                                      |
| ilişkili varsayımsal protein                                  |                                                                      |
| Alt kategori yok                                              | Hücre bölünmesi topolojik spesifite faktörü MinE                     |
| Alt kategori yok                                              | Düşük molekül ağırlıklı protein tirozin fosfataz                     |
| <b>Kofaktörler, Vitaminler, Prostetik gruplar, Pigmentler</b> |                                                                      |
| Biyotin                                                       | 3- ketoaçıl- CoA tiyolaz                                             |
| Biyotin                                                       | Biyotin sentaz                                                       |
| Piridoksin                                                    | 4- hidroksitreonin- 4- fosfat dehidrojenaz                           |
| Piridoksin                                                    | Piridoksal kinaz                                                     |
| Piridoksin                                                    | Piridoksin biyosentez glutamin amidotransferaz,                      |
| Piridoksin                                                    | Piridoksin biyosentez glutamin amidotransferaz,                      |
| Tetrapiroller                                                 | Cob(I)alamin adenoziltransferaz                                      |

|                                                                   |                                                          |
|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Tetrapiroller                                                     | Uroporfirinojen- III metiltransferaz                     |
| Tetrapiroller                                                     | Vitamin B12 ABC taşıyıcı, B12-bağlayan bileşen           |
| Alt kategori yok                                                  | Kükürt taşıyıcı protein adenililtransferaz ThiF          |
| Alt kategori yok                                                  | Tiyazol biyosentez proteini ThiG                         |
| Alt kategori yok                                                  | Tiyazol biyosentez proteini ThiH                         |
| <b>DNA Metabolizması</b>                                          |                                                          |
| CRISP'ler                                                         | CRISPR- ilişkili protein Cas7                            |
| DNA onarımı                                                       | Rekombinasyonel DNA onarımı proteini RecT (prophage      |
| DNA replikasyonu                                                  | ATP- bağımlı DNA helikaz RecQ                            |
| <b>Yağ Asitleri, Lipitler ve İzoprenoidler</b>                    |                                                          |
| Fosfolipitler                                                     | CDP- diaçilgliserol- - serin O-fosfatidiltransferaz      |
| Fosfolipitler                                                     | Diaçilgliserol kinaz                                     |
| <b>Demir kazanımı ve metabolizması</b>                            |                                                          |
| Alt kategori yok                                                  | Sortaz A, LPXTG spesifik                                 |
| <b>Membrane Transport</b>                                         |                                                          |
| Alt kategori yok                                                  | Folat ECF taşıyıcısının Substrat- spesifik bileşeni Folt |
| <b>Motilite ve Kemotaksis</b>                                     |                                                          |
| Bakterilerde sosyal motilite ve bakterilerde flagellar dışı yüzme | Tip IV fimbriyal birleşme proteini PilC                  |
| Bakterilerde sosyal motilite ve bakterilerde flagellar dışı yüzme | Tip IV fimbriyal birleşme, ATPaz PilB                    |
| <b>Nükleositler ve Nükleotitler</b>                               |                                                          |

|                                                           |                                                                                      |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Detoksifikasyon                                           | Mutatör mutT proteini (7,8-dihidro- 8- oksoguanin                                    |
| Purinler                                                  | Urasil- ksantin permeaz                                                              |
| Purinler                                                  | Adenin fosforibosiltransferaz                                                        |
| Purinler                                                  | Adenozin deaminaz                                                                    |
| Pirimidinler                                              | Üridin fosforilaz                                                                    |
| Fajlar, Profajlar, Dönüştürülebilir elemanlar, Plazmidler |                                                                                      |
| Fajlar, Profajlar                                         | Faj kuyruk uzunluğu bant ölçüsü proteini                                             |
| <b>Protein Metabolizması</b>                              |                                                                                      |
| Protein biyosentezi                                       | Ribozomal büyük alt birim psödoüridin sentaz D'ye benzer, Bacillus subtilis Yjb0 tip |
| Protein biyosentezi                                       | tRNA (Guanin37- N1) - metiltransferaz                                                |
| Protein biyosentezi                                       | Alanil- tRNA sentetaz ailesi proteini                                                |
| Protein degradasyonu                                      | Aminopeptidaz C                                                                      |
| Protein degradasyonu                                      | Blokajı kaldıran aminopeptidaz                                                       |
| <b>RNA Metabolizması</b>                                  |                                                                                      |
| RNA işleme ve modifikasyon                                | COG1720: Karakterize edilmeyen korunan protein                                       |
| RNA işleme ve modifikasyon                                | tRNA(Ile)- lisidin sentetaz                                                          |
| <b>Respiration</b>                                        |                                                                                      |
| Elektron kabul eden reaksiyonlar                          | Adenililsülfat redüktaz alfa-alt birimi                                              |
| Elektron kabul eden reaksiyonlar                          | Adenililsülfat redüktaz beta-alt birimi                                              |
| Elektron kabul eden reaksiyonlar                          | Farklılaştıran sülfat redüktaz (desulfovirdin), alfa                                 |

| <b>Stres Yanıtı</b>                  |                                           |
|--------------------------------------|-------------------------------------------|
| Ozmotik stres                        | Kolin bağlayan protein A                  |
| Ozmotik stres                        | Sarkozin oksidaz alfa alt birimi          |
| Alt kategori yok                     | Karbon açlığı protein A                   |
| Alt kategori yok                     | Transkripsiyonel düzenleyici, PemK ailesi |
| <b>Kükürt Metabolizması</b>          |                                           |
| Alt kategori yok                     | Beta- galaktosidaz büyük alt birimi       |
| Alt kategori yok                     | Beta- galaktosidaz küçük alt birimi       |
| <b>Virülans, Hastalık ve Savunma</b> |                                           |
| Antibiyotiklere dirençli ve toksik   | Aminoglikosid N6'-asetiltransferaz        |
| Antibiyotiklere dirençli ve toksik   | Sitoplazmik bakır homeostaz proteini cutC |

#### ***R. hominis* motilite, hareketlilik ve kemotaksis genlerini**

##### **5 yukarı regüle ederek bağırsak ortamına tepki verir**

Konak ve diyetle bağlantıya yanıt olarak, *R. hominis* tarafından farklı bir şekilde ifade edilen genleri belirlemek için, küçük eklenti boyutu sekans kitaplığından 6, 000 PCR fragmanı kullanılarak bir mikro- dizi oluşturulmuştur.

- 10 Ardından Gerçek zamanlı PCR doğrulaması, Şekil 2A'da gösterildiği gibi *R. hominis*'in spesifik bölgelerinde kümelenen, 42 farklı şekilde ifade edilen gen üzerinde gerçekleştirilmiştir (Tablolar S2 ve S3). Bağırsak ortamının ve diyet bileşenlerinin etkilerini ayırt etmek için bakteriyel
- 15 RNA, dört farklı deneysel koşuldan izole edilmiştir: (i) *in vivo*, mono- ilişkili farelerin çekumundan; (ii) *in vitro*, kültür ortamında yetiştirilen bakterilerden; (Iii) *in vitro*, diyet bileşenleri varlığında yetiştirilen bakterilerden; ve

(iv) konflüent Caco- 2 ve HT- 29 hücrelerinin yüzeyi üzerinde inkübe edilen bakterilerden.

**Tablo S2. R. hominis spesifik primerler kullanılarak  
5 bakteriyel RNA üzerinde gerçek zamanlı PCR analizi.**

Bakteriyel PCR primerleri, Primer3Plus kullanılarak farklı olarak ifade edilen genler için tasarlanmıştır. Tüm numuneler üç tekrarlı olarak çalışılmıştır. GyrA normalleştirme için bir referans geni olarak kullanılmıştır.

| Gen adı                                          | Rh14d - Kontrol |           | Rh28d - Kontrol |           | Rh14d - In Vitro+diyet |           | Rh28d - In Vitro+diyet |           | In Vitro + diyet - In Vitro |           |
|--------------------------------------------------|-----------------|-----------|-----------------|-----------|------------------------|-----------|------------------------|-----------|-----------------------------|-----------|
|                                                  | FC              | P- değeri | FC              | P- değeri | FC                     | P- değeri | FC                     | P- değeri | FC                          | P- değeri |
| 3- hidroksiasıl-CoA dehidrojenz                  | 5.62            | 0.00393   | 8.62            | 0.00000   | - 0.85                 | 0.69927   | 1.30                   | 0.38670   | 6.62                        | 0.00124   |
| Asetil- CoA asetiltransferaz                     | 10.25           | 0.00304   | 18.27           | 0.00000   | 1.38                   | 0.51556   | 2.46                   | 0.01882   | 7.44                        | 0.00048   |
| Aldoz epimeraz ailesi proteini                   | 7.20            | 0.00002   | 11.09           | 0.00001   | 22.65                  | 0.03173   | 34.89                  | 0.02105   | - 0.32                      | 0.30489   |
| ATP sentaz alfa çinkoiri                         | 1.62            | 0.12713   | 2.50            | 0.00003   | 3.25                   | 0.00645   | 5.00                   | 0.00000   | - 2.00                      | 0.00147   |
| ATP sentaz alfa çinkoiri2                        | 11.94           | 0.00122   | 5.50            | 0.00001   | 2.71                   | 0.18580   | 1.25                   | 0.72876   | 4.41                        | 0.06479   |
| ATP sentaz beta çinkoiri                         | 1.85            | 0.08341   | 3.14            | 0.00056   | 4.00                   | 0.00397   | 6.80                   | 0.00001   | - 2.16                      | 0.00241   |
| ATP sentaz beta çinkoiri2                        | 8.27            | 0.00058   | 6.13            | 0.00025   | 1.64                   | 0.33264   | 1.21                   | 0.67923   | - 5.05                      | 0.01400   |
| ATP sentaz gama çinkoiri                         | 2.31            | 0.02994   | 3.58            | 0.00027   | 4.22                   | 0.00238   | 6.52                   | 0.00001   | - 1.82                      | 0.01276   |
| ATP sentaz gama çinkoiri2                        | - 9.59          | 0.00081   | - 10.55         | 0.00013   | - 1.59                 | 0.40064   | - 1.75                 | 0.29398   | - 6.02                      | 0.01363   |
| Butiril-CoA dehidrojenz                          | 13.31           | 0.00166   | 19.32           | 0.00000   | 1.48                   | 0.39908   | 2.14                   | 0.02840   | 9.03                        | 0.00039   |
| Elektron transfer flavoproteini, alfa alt birimi | 6.32            | 0.00729   | 15.55           | 0.00000   | - 0.80                 | 0.61916   | 1.96                   | 0.03441   | 7.94                        | 0.00030   |
| Elektron                                         | 7.94            | 0.00414   | 12.31           | 0.00000   | 1.13                   | 0.78504   | 1.76                   | 0.08347   | 7.00                        | 0.00078   |

|                                                    |            |         |            |         |         |         |                |         |           |         |
|----------------------------------------------------|------------|---------|------------|---------|---------|---------|----------------|---------|-----------|---------|
| transfer<br>flavoprotei<br>ni, beta<br>alt birimi  |            |         |            |         |         |         |                |         |           |         |
| Flagellar<br>motor<br>rotasyon<br>proteini<br>MotA | -<br>0.94  | 0.71937 | 2.37       | 0.00023 | 1.69    | 0.02442 | 4.25           | 0.00001 | -<br>0.56 | 1.00000 |
| Flagellar<br>motor<br>rotasyon<br>proteini<br>MotB | -<br>0.57  | 0.01030 | 1.19       | 0.00938 | - 0.75  | 0.14601 | 1.58           | 0.01676 | -<br>0.76 | 0.08011 |
| Flagellin<br>protein<br>FlaA1                      | -<br>3.05  | 0.00125 | -<br>1.93  | 0.01193 | 3.13    | 0.01261 | 4.95           | 0.00249 | -<br>9.57 | 0.00079 |
| Flagellin<br>protein<br>FlaA2                      | 1.04       | 0.84732 | -<br>1.28  | 0.05814 | 1.45    | 0.29909 | 1.09           | 0.77089 | -<br>1.39 | 0.28105 |
| Flagellin<br>protein<br>FlaA3                      | 1.14       | 0.41467 | 1.94       | 0.00312 | 1.63    | 0.08606 | 2.77           | 0.00477 | -<br>1.43 | 0.17174 |
| Flagellin<br>protein<br>flaB                       | 1.02       | 0.97319 | -<br>4.99  | 0.00568 | 1.96    | 0.40946 | -<br>2.60      | 0.14359 | -<br>1.92 | 0.25258 |
| Glukuronid<br>permeaz                              | -<br>9.34  | 0.00001 | -<br>13.81 | 0.00022 | - 13.97 | 0.00001 | -<br>20.6<br>5 | 0.00003 | -<br>1.50 | 0.13959 |
| L- treonin<br>3- O-<br>fosfat<br>dekarboksil<br>az | 1.62       | 0.00963 | 3.70       | 0.00002 | 1.66    | 0.07350 | 3.78           | 0.00186 | -<br>0.98 | 0.92518 |
| Magnezyum<br>taşıyıcı                              | 372.0<br>0 | 0.00123 | 11.20      | 0.03391 | 4.42    | 0.32048 | -<br>0.13      | 0.18758 | 84.10     | 0.01672 |
| Metil kabul<br>eden<br>kemotaksis<br>protein1      | -<br>1.18  | 0.54522 | -<br>1.83  | 0.02731 | - 2.90  | 0.01211 | -<br>1.87      | 0.05778 | -<br>0.29 | 0.00389 |
| Metil kabul<br>eden<br>kemotaksis<br>protein2      | -<br>2.46  | 0.00400 | -<br>2.95  | 0.00154 | 1.48    | 0.10070 | 1.24           | 0.33586 | -<br>3.65 | 0.00043 |
| Metil kabul                                        | 1.13       | 0.54189 | 1.86       | 0.04504 | 3.17    | 0.00033 | 5.25           | 0.00055 | -         | 0.00020 |

|                                                                                                |            |         |       |         |        |         |           |         |           |         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|---------|-------|---------|--------|---------|-----------|---------|-----------|---------|
| eden<br>kemotaksis<br>protein3                                                                 |            |         |       |         |        |         |           |         | 2.81      |         |
| Metil kabul<br>eden<br>kemotaksis<br>sensör<br>transdüseri<br>1                                | 1.33       | 0.01743 | 2.15  | 0.00001 | 1.58   | 0.05704 | 2.56      | 0.00396 | -<br>1.19 | 0.38997 |
| Metil kabul<br>eden<br>kemotaksis<br>sensör<br>transdüseri<br>2                                | 2.03       | 0.00671 | 2.34  | 0.00017 | 4.94   | 0.00007 | 5.71      | 0.00003 | -<br>2.44 | 0.00163 |
| MobA/MobL<br>ailesi<br>proteini4/v<br>arsayılan<br>konjugal<br>transfer<br>proteini            | 84.83      | 0.00177 | 5.77  | 0.01561 | 3.67   | 0.34227 | -<br>4.00 | 0.29305 | 23.10     | 0.04583 |
| MobA/MobL<br>protein1                                                                          | 257.9<br>3 | 0.00472 | 9.27  | 0.04437 | 8.72   | 0.25455 | -<br>3.19 | 0.50297 | 29.57     | 0.07733 |
| MobA/MobL<br>protein2                                                                          | 714.1<br>1 | 0.00172 | 11.64 | 0.08286 | 8.17   | 0.29225 | -<br>7.51 | 0.31871 | 87.43     | 0.04300 |
| MobA/MobL<br>protein3                                                                          | 362.2<br>6 | 0.00144 | 11.10 | 0.03880 | 7.77   | 0.27426 | -<br>4.20 | 0.43208 | 46.62     | 0.06260 |
| MobA/MobL<br>protein4                                                                          | 219.7<br>5 | 0.00147 | 6.52  | 0.08511 | 7.99   | 0.17452 | -<br>4.22 | 0.34388 | 27.49     | 0.04519 |
| Oligopeptit<br>ABC<br>taşıyıcı,<br>periplazmik<br>oligopeptit<br>- bağlayan<br>protein<br>oppA | 1.26       | 0.49437 | 1.11  | 0.45125 | 1.28   | 0.49171 | 1.13      | 0.53525 | -<br>1.02 | 0.92102 |
| Oligopeptit<br>transport<br>ATP-<br>bağlayan<br>protein<br>oppD                                | -<br>1.29  | 0.05256 | 1.08  | 0.40875 | - 1.40 | 0.07422 | -<br>1.00 | 0.98737 | 1.09      | 0.60319 |
| Osmoduyarlı                                                                                    | 3.98       | 0.00004 | 7.07  | 0.00000 | 5.58   | 0.00005 | 9.91      | 0.00001 | -         | 0.12049 |



|                                                                       |            |         |           |         |        |         |           |         |           |         |
|-----------------------------------------------------------------------|------------|---------|-----------|---------|--------|---------|-----------|---------|-----------|---------|
| K <sup>+</sup> kanal<br>histidin<br>kinazı KdpD                       |            |         |           |         |        |         |           |         | 0.71      |         |
| Fosfat<br>regülon<br>sensör<br>proteini<br>PhoR                       | 2.73       | 0.00211 | 1.54      | 0.04166 | 3.80   | 0.00919 | 2.14      | 0.07191 | -<br>1.39 | 0.34941 |
| Fosfoenolpi<br>ruvat<br>karboksikin<br>az [ATP]                       | 2.30       | 0.05000 | 3.22      | 0.00004 | 1.15   | 0.70105 | 1.61      | 0.04623 | 2.00      | 0.00988 |
| Potasyum<br>alım<br>proteini,<br>integral<br>zar<br>bileşeni,<br>KtrB | 7.74       | 0.00006 | 10.81     | 0.00002 | 50.92  | 0.02191 | 71.1<br>5 | 0.01638 | -<br>0.15 | 0.15959 |
| Varsayılan<br>konjugal<br>transfer<br>proteini<br>MobA/MobL           | 183.0<br>2 | 0.00023 | 9.49      | 0.01454 | 8.09   | 0.08695 | -<br>2.39 | 0.44355 | 22.63     | 0.02615 |
| Piruvat-<br>flavodoksin<br>oksidoredük<br>taz                         | -<br>0.52  | 0.05848 | -<br>0.92 | 0.52386 | - 0.36 | 0.01504 | -<br>0.65 | 0.09510 | 1.42      | 0.16352 |
| flagellar<br>operon için<br>RNA<br>polimeraz<br>sigma<br>faktörü      | -<br>0.76  | 0.02253 | 1.93      | 0.00032 | - 0.82 | 0.08962 | 2.08      | 0.00013 | -<br>0.93 | 0.40060 |

**Tablo S3. R. hominis PCR deneyleri indeksi dairesel genom haritasında çizilmiştir. R. hominis PCR deneylerinin listesi**  
5 dairesel genom haritasında gösterildiği gibidir.

| Deney | Primer        | Başlangıç | Son  | Uzunluk | Gen  |
|-------|---------------|-----------|------|---------|------|
| 1     | gyrA-<br>N- F | 7803      | 7889 | 87 bp   | gyrA |

|    |                     |        |        |        |                                                                           |
|----|---------------------|--------|--------|--------|---------------------------------------------------------------------------|
| 2  | 1602-<br>F          | 95664  | 95740  | 77 bp  | Fosfat regülon<br>sensör protein PhoR                                     |
| 3  | 1653-<br>F          | 153403 | 153483 | 81 bp  | Flagellin protein<br>FlaA1                                                |
| 4  | 1686-<br>F          | 189295 | 189382 | 88 bp  | Flagellin protein<br>FlaA2                                                |
| 5  | 1718-<br>F          | 221205 | 221279 | 75 bp  | Flagellin protein<br>FlaA3                                                |
| 6  | 1735-<br>F          | 250582 | 250674 | 93 bp  | Metil kabul eden<br>kemotaksis protein1                                   |
| 7  | 1769-<br>F          | 290546 | 290628 | 83 bp  | Metil kabul eden<br>kemotaksis sensör<br>transdüseril                     |
| 8  | 1770-<br>F          | 291722 | 291808 | 87 bp  | Metil kabul eden<br>kemotaksis protein2                                   |
| 9  | 1831-<br>N- F       | 348711 | 348810 | 100 bp | MobA/MobL protein4                                                        |
| 10 | 1842-<br>F          | 364775 | 364851 | 77 bp  | MobA/MobL protein2                                                        |
| 11 | 1867-<br>2652-<br>F | 391044 | 391120 | 77 bp  | MobA/MobL ailesi<br>proteini4/varsayılan<br>konjugal transfer<br>proteini |
| 12 | 2055-<br>F          | 600837 | 600928 | 92 bp  | Asetil- CoA<br>asetiltransferaz                                           |
| 13 | 2056-<br>F          | 602279 | 602363 | 85 bp  | 3- hidroksiaçıl- CoA<br>dehidrojenaz                                      |
| 14 | 2057-<br>F          | 602961 | 603037 | 77 bp  | Butiril- CoA<br>dehidrojenaz                                              |
| 15 | 2058-<br>F          | 604411 | 604504 | 94 bp  | Elektron transfer<br>flavoproteini, beta<br>alt birimi                    |
| 16 | 2059-<br>F          | 605434 | 605516 | 83 bp  | Elektron transfer<br>flavoproteini, alfa                                  |

|    |         |         |         |       |                                                                         |
|----|---------|---------|---------|-------|-------------------------------------------------------------------------|
|    |         |         |         |       | alt birimi                                                              |
| 17 | 129- F  | 653987  | 654066  | 80 bp | Oligopeptit ABC taşıyıcı, periplazmik oligopeptit-bağlayan protein oppA |
| 18 | 132- F  | 658435  | 658516  | 82 bp | Oligopeptit transport ATP-bağlayan protein oppD                         |
| 19 | 805- R  | 934310  | 934406  | 97 bp | Osmoduyarlı K <sup>+</sup> kanal histidin kinaz KdpD                    |
| 20 | 807- R  | 935306  | 935394  | 89 bp | Aldoz epimeraz ailesi proteini                                          |
| 21 | 808- R  | 936111  | 936190  | 80 bp | Potasyum alım protein, integral membrane component, KtrB                |
| 22 | 909- F  | 1053529 | 1053604 | 76 bp | Pirüvat- flavodoksin oksidoredüktaz                                     |
| 23 | 1235- F | 1434705 | 1434785 | 81 bp | MobA/MobL protein3                                                      |
| 24 | 1296- F | 1495460 | 1495544 | 85 bp | Metil kabul eden kemotaksis protein3                                    |
| 25 | 1297- R | 1497854 | 1497931 | 78 bp | L- treonin 3- O-fosfat dekarboksilaz                                    |
| 26 | 1335- F | 1540579 | 1540671 | 93 bp | Flagellar motor rotasyon proteini MotA                                  |
| 27 | 1336- F | 1541416 | 1541511 | 96 bp | Flagellar motor rotasyon proteini MotB                                  |
| 28 | 1356-   | 1559143 | 1559227 | 85 bp | Flagellar operon                                                        |

|    |                     |         |         |        |                                                                           |
|----|---------------------|---------|---------|--------|---------------------------------------------------------------------------|
|    | F                   |         |         |        | için RNA polimeraz<br>sigma faktörü                                       |
| 29 | 3119-<br>F          | 2211612 | 2211705 | 94 bp  | Fosfoenolpirüvat<br>karboksikinas [ATP]                                   |
| 30 | 3117-<br>R          | 2213046 | 2213139 | 94 bp  | Metil kabul eden<br>kemotaksis sensör<br>transdüseri2                     |
| 31 | 1867-<br>2652-<br>R | 2736100 | 2736176 | 77 bp  | MobA/MobL ailesi<br>proteini4/varsayılan<br>konjugal transfer<br>proteini |
| 32 | 1552M-<br>R         | 2984489 | 2984566 | 78 bp  | Magnezyum taşıyıcı                                                        |
| 33 | 397- R              | 3153341 | 3153427 | 87 bp  | ATP sentaz beta<br>çinkoiri2                                              |
| 34 | 398- R              | 3153616 | 3153699 | 84 bp  | ATP sentaz gama<br>çinkoiri2                                              |
| 35 | 399- R              | 3155799 | 3155898 | 100 bp | ATP sentaz alfa<br>çinkoiri2                                              |
| 36 | 404- R              | 3159387 | 3159467 | 81 bp  | Glukuronid permeaz                                                        |
| 37 | 2399-<br>R          | 3308172 | 3308265 | 94 bp  | Varsayılan konjugal<br>transfer proteini<br>MobA/MobL                     |
| 38 | 2323-<br>R          | 3366526 | 3366615 | 90 bp  | Flagellin protein<br>flaB                                                 |
| 39 | 2281-<br>R          | 3416947 | 3417042 | 96 bp  | ATP sentaz beta<br>çinkoiri                                               |
| 40 | 2280-<br>R          | 3418736 | 3418824 | 89 bp  | ATP sentaz gama<br>çinkoiri                                               |
| 41 | 2279-<br>R          | 3418857 | 3418942 | 86 bp  | ATP sentaz alfa<br>çinkoiri                                               |
| 42 | 641- R              | 3467164 | 3467255 | 92 bp  | MobA/MobL protein1                                                        |

Elli farklı şekilde ifade edilen gen tanımlanmıştır (*in vivo* vs. *in vitro*). En şaşırtıcı keşif, konjugasyon / mobilizasyon transferine katılan genlerin *in vivo* yüksek yukarı-regülasyonudur, bu genler *mobA*- ve *mobL*- benzeri genlerdir (Şek. 2A). Transkripsiyonel araştırmalarda böyle genlerin bulunması şaşırtıcıdır, çünkü Alt Sistem Kategorisi özelliğinde Fajlar, Profajlar, Değiştirilebilir Elemanlar ve Plazmidlere tanımlanabilir herhangi bir gen atanmamıştır. Gen algılama ve tahsis etme arasındaki bu fark, büyük olasılıkla, Alt Sistem Kategorisi açıklamalarının tanınmış kısıtlamaları nedeniyle mümkündür. Diyet bileşiklerinin uyarıcı etkisi daha az telaffuz edilmiştir, bu da bağırsak ortamının tek başına yatay gen transferinde yer alan genlerin önemli bir indükleyicisi olduğunu gösterir.

Diğer bağırsak ortamı tarafından indüklenen alt sistemler arasında, Membran Taşınması, özellikle magnezyum taşınması ve Motilite ve Kemotaksis, birden fazla metil kabul eden kemotaksis proteini ve flagelar operon genleri bulunmaktadır (Şek. 2B). *R. hominis* birden fazla flagellin genine *flaA1*, *flaA2*, *flaA3*, ve *flab*, sahiptir. Fare bağırsak ortamında, flagellin ifadesi, rekombinant flagellin proteinleri FlaA1 ve FlaA2'ye (RH1 ve RH2) karşı yetiştirilen spesifik antikorlarla birlikte hem *in vivo* kolonize fareler hem de diyet varlığında yetiştirilen *in vitro* kültürlerden izole edilen bakteriler kullanılarak Western blot ve immünohistokimya ile doğrulanmıştır (Şek. 2C). Flagellin ifadesinin bu olumlu *in vivo* doğrulanması, bakteri proteininin ifadesini aşağı-regüle eden diğer bakteri türlerinden farklı olara Firmicutes'in yalnızca belirli alt gruplarının *in vivo* olarak flagella ürettiğini gösteren önceki raporlarla tutarlıdır (Turnbaugh vd. /2008). *R. hominis* içinde katabolik metabolizma genlerinin ifadesi bağırsak ortamında da bağırsak ortamından etkilenmiştir (Şek. 2D). Söz konusu genler, asetil-CoA asetiltransferaz, 3- hidroksiasil-CoA dehidrojenaz, bütiril-

CoA dehidrojenaz ve fosfoenolpiruvat karboksi kinazı [ATP] içermektedir.

Konak uyarılamanın *R. hominis* transkriptom üzerinde etkilerini daha fazla araştırmak için *in vitro* insan bağırsak epitel hücrelerinin uyarılması (Caco- 2 ve HT- 29) gerçekleştirilmiştir. Bu, fare bağırsağına adaptasyon ile indüklenen, transfer geninin, *mobA/mobL protein1*, konjugasyonu / mobilizasyonunun her iki hücre hattında da artmış olduğunu göstermiştir (Şek. 2E). *in vivo* veriler ile uyumlu bir şekilde flagellin geni *Mota*, Caco- 2 hücrelerinde yukarı regüle edilmiştir. Butirat metabolizmasına karışan genler, Caco- 2 hücrelerinde aşağı regülasyon ve HT- 29 hücrelerinde yukarı regülasyon olmak üzere iki hücre hattı arasında farklılıklar göstermiştir.

15

#### ***R. hominis* çoğunlukla kolonda doğuştan gelen sinyal yollarını etkiler**

GF farelerinin *R. hominis* ile kolonizasyonu kolonda en yüksek olan, artan konak gen ifadesi ile korele edilmiştir (Şek. 3A ve Tablo S4). Kolonizasyon sonrasında 28. gün, 159 genin yukarı regüle edilmesi ve 143 genin aşağı regüle edilmesiyle birlikte diferansiyel ifadenin en etkili olduğu zamandır. 14. Günde ileumda diferansiyel olarak ifade edilen gen sayısı 79 genin yukarı regüle edilmesi ve 119 genin aşağı regüle edilmesiyle birlikte çıkan kolondaki ile benzerdir. İleumdaki diferansiyel ifade, 28. günde düşük kolonizasyon seviyeleri ile uyumlu olarak çok düşük olmuştur. Şek. 3B). Afimetriks verisinin pozitif gerçek zamanlı PCR doğrulaması Şekil 3C'de gösterilmektedir.

#### **Tablo S4. *R. hominis* ile aşılanmış hayvanlar ile GF hayvanları arasındaki afimetriks veriler**

Afimetriks mikrodizilim analizi, çıkan kolon ve ileum dokusundan izole edilen RNA üzerinde yapılmıştır. Veri,

35

Benjamini ve Hochberg yanlış keşif yöntemini kullanılarak  $P < 0.05$  olduğunda anlamlı kabul edilmiştir. (A) 14. Günde çıkan kolonda farklı olarak ifade edilen transkriptler. (B) 28. Günde çıkan kalın bağırsakta farklı şekilde ifade edilen transkriptler. (C) 14. Günde ileumda diferansiyel olarak ifade edilen transkriptler. (D) 28. Günde ileumda diferansiyel olarak ifade edilen transkriptler.

Tablo S4A.14. Günde R. hominis aşılınmış hayvanlar ile mikropsuz hayvanlar arasında çıkan kolonda farklı şekilde ifade edilen transkriptler.

| ID                 | Symbol        | Name                                                                    | FC    | P-value  | B     |
|--------------------|---------------|-------------------------------------------------------------------------|-------|----------|-------|
| 1424973_at         | Cyp3a25       | Sitokrom P450, aile 3, alt aile a, polipeptit 25                        | 26.35 | 4.09E-05 | 8.91  |
| 1449375_at         | Ces6          | Karboksilesteraz 6                                                      | 22.80 | 5.71E-16 | 29.28 |
| 1428400_at         | 2200002K05Rik | RIKEN cDNA 2200002K05 gene                                              | 6.22  | 6.65E-09 | 17.20 |
| 1419393_at         | Abcg5         | ATP- bağlayan kaset, alt aile G (WHITE), üye 5                          | 5.81  | 0.002156 | 4.51  |
| 1429726_at         | Slc16a9       | Çözünürlük taşıyıcı ailesi 16 (monokarboksilik asit taşıyıcılar), üye 9 | 4.38  | 0.001103 | 5.26  |
| 1430641_at         | 9030605I04Rik | RIKEN cDNA 9030605I04 gene                                              | 4.36  | 0.000358 | 6.52  |
| 1436575_at         | Grin3a        | Glutamat reseptör iyonotropik, NMDA3A                                   | 3.91  | 0.018503 | 1.71  |
| 1422749_at         | Ly6g6c        | Lenfosit antijen 6 kompleksi, konum G6C                                 | 3.71  | 0.004044 | 3.79  |
| NuGO_empt070648_at | Abca12        | ATP- bağlayan kaset, alt aile A (ABC1), üye 12                          | 3.69  | 0.000333 | 6.62  |
| 1428682_at         | Zc3h6         | 6'yı içeren çinko parmak CCCH tipi                                      | 3.28  | 0.002747 | 4.26  |
| 1431554_a_at       | Anxa9         | Annexin A9                                                              | 3.00  | 3.25E-05 | 9.18  |
| 1423556_at         | Akr1b7        | Aldo-keto reduktaz ailesi 1, üye B7                                     | 2.87  | 0.018503 | 1.70  |

|              |                |                                                                                  |      |          |       |
|--------------|----------------|----------------------------------------------------------------------------------|------|----------|-------|
| 1424451_at   | Acaalb         | Asetil-Koenzim A asiltransferaz 1B                                               | 2.70 | 0.000404 | 6.33  |
| 1418486_at   | Vnn1           | Vanin 1                                                                          | 2.66 | 0.001531 | 4.93  |
| 1418606_at   | Hoxd10         | Homeo box D10                                                                    | 2.60 | 0.000102 | 7.97  |
| 1435207_at   | Dixdc1         | 1 içeren DIX bölgesi                                                             | 2.55 | 0.014337 | 2.11  |
| 1427072_at   | Stard8         | 8 içeren START bölgesi                                                           | 2.48 | 0.027058 | 1.15  |
| 1442560_at   | NA             | NA                                                                               | 2.42 | 0.006928 | 3.17  |
| 1420998_at   | Etv5           | Ets varyant gen 5                                                                | 2.33 | 0.017697 | 1.81  |
| 1440925_at   | Rhoq           | Ras homolog gen ailesi üye Q                                                     | 2.32 | 0.013564 | 2.22  |
| 1428902_at   | Chst11         | Karbohidrat sülfotransferaz 11                                                   | 2.30 | 0.000154 | 7.46  |
| 1416607_at   | 4931406C07Rik  | RIKEN cDNA 4931406C07 geni                                                       | 2.28 | 7.26E-11 | 21.08 |
| 1435673_at   | Hoxd3          | Homeo box D3                                                                     | 2.26 | 0.019944 | 1.60  |
| 1426663_s_at | Slc45a3        | Çözünürlük taşıyıcı ailesi 45, üye 3                                             | 2.21 | 0.007554 | 3.07  |
| 1419651_at   | 2610200G18Rik  | RIKEN cDNA 2610200G18 geni                                                       | 2.21 | 0.000406 | 6.29  |
| 1422188_s_at | NA             | NA                                                                               | 2.20 | 0.000397 | 6.39  |
| 1435468_at   | D230025D16Rik  | RIKEN cDNA D230025D16 geni                                                       | 2.15 | 0.018503 | 1.71  |
| 1417991_at   | Dio1           | Deiodinaz, iyodotironin, tip I                                                   | 2.12 | 0.026066 | 1.24  |
| 1451557_at   | Tat            | Tirozin aminotransferaz                                                          | 2.11 | 0.046376 | 0.38  |
| 1428989_at   | 0710001 D07Rik | RIKEN cDNA 0710001D07 geni                                                       | 2.03 | 0.04028  | 0.54  |
| 1456680_at   | B3gnt6         | UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-asetilglukozaminiltransferaz 6 (çekirdek 3 sentaz) | 2.01 | 0.024447 | 1.35  |
| 1443235_at   | Eif2ak4        | Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2 alfa kinaz 4                            | 1.97 | 0.002156 | 4.51  |
| 1419759_at   | Abcb1a         | ATP- bağlayan kaset, alt aile B (MDR/TAP), üye 1A                                | 1.97 | 0.009639 | 2.79  |
| 1456389_at   | Zeb2           | Çinko parmak E-kutu bağlama homeobox 2                                           | 1.96 | 0.013795 | 2.16  |
| 1440840_at   | D630004K10Rik  | RIKEN cDNA D630004K10 geni                                                       | 1.96 | 0.017697 | 1.80  |



|                   |               |                                                                        |      |          |      |
|-------------------|---------------|------------------------------------------------------------------------|------|----------|------|
| 1457619_at        | Ces6          | Karboklesteraz 6                                                       | 1.94 | 0.04028  | 0.55 |
| 1449049_at        | Tlr1          | Toll-benzeri reseptör 1                                                | 1.92 | 0.018503 | 1.72 |
| NuGO_emt049113_at | Ptprh         | Protein tirozin fosfataz, reseptör tipi, H                             | 1.89 | 0.002961 | 4.17 |
| 1424376_at        | Cdc42ep1      | CDC42 efektör proteini (Rho GTPaz bağlama) 1                           | 1.88 | 0.014337 | 2.10 |
| 1436566_at        | Rab40b        | Rab40b, üye RAS onkogen ailesi                                         | 1.87 | 0.028805 | 1.04 |
| 1432590_at        | LOC621549     | NA                                                                     | 1.83 | 0.012459 | 2.38 |
| 1430543_at        | Clip3         | Bağlayıcı protein 3'ü içeren CAP-GLY bölgesi                           | 1.82 | 6.24E-05 | 8.47 |
| 1435553_at        | Pdzd2         | 2'yi içeren PDZ bölgesi                                                | 1.81 | 0.048735 | 0.32 |
| 1428271_at        | Acbd4         | 4 ihtiva eden asil-koenzim A bağlama alanı                             | 1.80 | 0.014378 | 2.09 |
| 1418059_at        | Eltd1         | EGF, 1 içeren latrophilin yedi transmembran alan                       | 1.79 | 0.005331 | 3.47 |
| 1456532_at        | Pdqfd         | Platelet kaynaklı büyüme faktörü, D polipeptid                         | 1.77 | 0.007554 | 3.05 |
| 1437393_at        | Al875142      | Eksprese edilen sekans Al875142                                        | 1.77 | 0.03504  | 0.78 |
| 1428332_at        | 1500004A08Rik | RIKEN cDNA 1500004A08 geni                                             | 1.77 | 0.038684 | 0.61 |
| 1434015_at        | Slc2a6        | Çözünürlük taşıyıcı ailesi 2 (kolaylaştırılmış glikoz taşıyıcı), üye 6 | 1.75 | 0.000437 | 6.19 |
| 1449403_at        | Pde9a         | Fosfodiesteraz 9A                                                      | 1.71 | 0.03504  | 0.79 |
| 1428260_at        | Spg3a         | Spastik parapleji 3A homolog (insan)                                   | 1.69 | 0.011437 | 2.55 |
| 1417803_at        | 1110032A04Rik | RIKEN cDNA 11110032A04 geni                                            | 1.66 | 0.001103 | 5.27 |
| 1430245_at        | Fxrlh         | Kırılğan X mental retardasyon geni 1, otozomal homolog                 | 1.66 | 0.012459 | 2.36 |
| 1422542_at        | Gpr34         | G protein-çiftli reseptör 34                                           | 1.65 | 0.031372 | 0.95 |
| 1427020_at        | Scara3        | Scavenger reseptör sınıfı A, üye 3                                     | 1.60 | 0.010425 | 2.69 |
| 1430211_at        | 4930415020Rik | RIKEN cDNA 4930415020                                                  | 1.57 | 0.045    | 0.42 |

|                       |               |                                                                             |      |          |      |
|-----------------------|---------------|-----------------------------------------------------------------------------|------|----------|------|
|                       |               | geni                                                                        |      |          |      |
| 1452809_at            | 9030607L17Rik | RIKEN cDNA 9030607L17<br>geni                                               | 1.53 | 0.013564 | 2.22 |
| NuGO_emt06628<br>2_at | Defb37        | Defensin beta 37                                                            | 1.51 | 0.005422 | 3.44 |
| 1451498_at            | BC004853      | cDNA sekans BC004853                                                        | 1.50 | 0.037045 | 0.69 |
| 1434140_at            | Mcf21         | Mcf.2 sekans benzeri<br>dönüştürme                                          | 1.49 | 0.025597 | 1.30 |
| 1452650_at            | Trim62        | 62 içeren üçlü motif                                                        | 1.46 | 0.02652  | 1.19 |
| 1427492_at            | Pof1b         | Prematüre over<br>yetmezliği 1B                                             | 1.46 | 0.004679 | 3.61 |
| 1426601_at            | Slc37a1       | Çözünürlük taşıyıcı<br>ailesi 37 (gliserol-3-<br>fosfat taşıyıcı), üye 1    | 1.42 | 0.032433 | 0.90 |
| 1448188_at            | Ucp2          | Ayırma proteini 2<br>(mitokondrial, proton<br>taşıyıcı)                     | 1.42 | 0.008209 | 2.96 |
| 1460409_at            | Cpt1a         | Karnitin<br>palmitoiltransferaz 1a,<br>karaciğer                            | 1.40 | 0.025932 | 1.26 |
| 1460652_at            | Esrra         | Östrojen ile ilgili<br>reseptör, alfa                                       | 1.39 | 0.038182 | 0.65 |
| 1453869_at            | LOC328277     | NA                                                                          | 1.36 | 0.017271 | 1.86 |
| 1435985_at            | Farp2         | FERM, RhoGEF ve<br>pleckstrin alan protein<br>2                             | 1.34 | 0.037045 | 0.70 |
| 1454706_at            | Uvrag         | UV radyasyon direnci ile<br>ilişkili gen                                    | 1.34 | 0.021704 | 1.51 |
| 1451232_at            | Cd151         | CD151 antijen                                                               | 1.31 | 0.049274 | 0.31 |
| 1423570_at            | Abcg1         | ATP bağlayıcı kaset, alt<br>aile G (WHITE), üye 1                           | 1.30 | 0.04028  | 0.55 |
| 1418817_at            | Chmp1b        | Kromatin modifiye edici<br>protein 1B                                       | 1.25 | 0.010981 | 2.61 |
| 1441059_at            | 1700049G17Rik | RIKEN cDNA 1700049G17<br>geni                                               | 1.25 | 0.028805 | 1.05 |
| NuGO_emt06134<br>6_at | NA            | NA                                                                          | 1.24 | 0.026697 | 1.17 |
| 1420503_at            | Slc6a14       | Çözünürlük taşıyıcı<br>ailesi 6<br>(nörotransmitter nakil<br>aracı), üye 14 | 1.22 | 0.012499 | 2.32 |

|                          |               |                                                                              |       |          |      |
|--------------------------|---------------|------------------------------------------------------------------------------|-------|----------|------|
| NuGO_empt07310<br>3_x_at | NA            | NA                                                                           | 1.21  | 0.01946  | 1.63 |
| 1452592_at               | Mqst2         | Mikrozomal glutatyon S-<br>transferaz 2                                      | 1.18  | 0.038684 | 0.60 |
| 1441135_at               | NA            | NA                                                                           | -1.10 | 0.01646  | 1.92 |
| 1428482_at               | Akap10        | A kinaz (PRKA) bağlantı<br>proteini 10                                       | -1.20 | 0.022427 | 1.47 |
| 1426679_at               | Zfp706        | çinko parmak proteini<br>706                                                 | -1.26 | 0.028805 | 1.05 |
| 1415816_at               | Cct7          | Şaperonin altbirimi 7<br>(eta)                                               | -1.26 | 0.011936 | 2.47 |
| 1445024_at               | Stard7        | 7 içeren START bölgesi                                                       | -1.27 | 0.03504  | 0.79 |
| 1453591_at               | 5730437N04Rik | RIKEN cDNA 5730437N04<br>geni                                                | -1.32 | 0.02652  | 1.19 |
| 1450788_at               | Saa1          | Serum amiloid A 1                                                            | -1.32 | 0.002156 | 4.54 |
| 1436157_at               | Ccar1         | Hücre bölünme döngüsü ve<br>apoptosis regülatörü 1                           | -1.33 | 0.034783 | 0.81 |
| 1450987_a_at             | 2310004I24Rik | RIKEN cDNA 2310004I24<br>geni                                                | -1.35 | 0.0361   | 0.73 |
| 1433850_at               | Ppp4r2        | Protein fosfataz 4,<br>düzenleyici altbirim 2                                | -1.36 | 0.018503 | 1.71 |
| 1434835_at               | Wapal         | Kanatları birbirine<br>benzeyen homolog<br>(Drosophila)                      | -1.37 | 0.027058 | 1.14 |
| NuGO_empt09001<br>7_s_at | Cdk7          | Siklin bağımlı kinaz 7<br>(Xenopus MO15 cdk-aktif<br>edici kinazın homologu) | -1.37 | 0.044186 | 0.44 |
| 1422579_at               | Hspe1         | Isı şoku proteini 1<br>(chaperonin 10)                                       | -1.38 | 0.017697 | 1.81 |
| 1455726_at               | Gm71          | Gen modeli 71, (NCBI)                                                        | -1.42 | 0.029302 | 1.02 |
| 1420461_at               | Mst1r         | Makrofaj uyarıcı 1<br>reseptörü (c-met ile<br>ilişkili tirozin kinaz)        | -1.49 | 0.046838 | 0.37 |
| 1453264_at               | Marveld3      | MARVEL (membran<br>ilişkili) domain 3                                        | -1.49 | 0.005522 | 3.40 |
| 1425030_at               | Zfp622        | çinko parmak proteini<br>622                                                 | -1.49 | 0.000586 | 5.89 |
| 1458507_at               | 2810055G22Rik | RIKEN cDNA 2810055G22<br>geni                                                | -1.50 | 0.032433 | 0.89 |
| 1443988_at               | Rbm39         | RNA bağlama motifi<br>proteini 39                                            | -1.51 | 0.037045 | 0.68 |

|                        |               |                                                     |       |          |       |
|------------------------|---------------|-----------------------------------------------------|-------|----------|-------|
| 1460465_at             | A930038C07Rik | RIKEN cDNA A930038C07<br>geni                       | -1.51 | 0.004627 | 3.64  |
| 1428784_at             | Gmip          | Gem- etkileşimli protein                            | -1.51 | 0.045    | 0.42  |
| 1451621_at             | 5830417C01Rik | RIKEN cDNA 5830417C01<br>geni                       | -1.65 | 0.014536 | 2.07  |
| 1422837_at             | Scel          | Sciellin                                            | -1.68 | 0.0361   | 0.74  |
| 1454617_at             | Arrdc3        | 3 içeren Arrestin<br>bölgesi                        | -1.71 | 0.038496 | 0.62  |
| 1452047_at             | Cacybp        | Calcyclin bağlayıcı<br>protein                      | -1.72 | 0.018495 | 1.75  |
| 1434724_at             | Usp31         | Ubiquitin spesifik<br>peptidaz 31                   | -1.75 | 0.024018 | 1.39  |
| 1417032_at             | Ube2g2        | Ubiquitin-konjuge enzim<br>E2G 2                    | -1.76 | 0.04028  | 0.56  |
| 1448628_at             | Scg3          | Secretogranin III                                   | -1.77 | 0.016351 | 1.93  |
| 1443877_a_at           | Rapgef6       | Rap guanin nükleotid<br>değişim faktörü (GEF) 6     | -1.82 | 0.004044 | 3.80  |
| 1427944_at             | Caprin2       | Caprin aile üyesi 2                                 | -1.85 | 0.04248  | 0.49  |
| 1415909_at             | Stip1         | Strese bağlı<br>fosfoprotein 1                      | -1.89 | 0.024018 | 1.38  |
| 1422452_at             | Bag3          | Bcl2 ile ilişkili<br>athonogen 3                    | -1.89 | 0.026066 | 1.24  |
| 1438041_at             | Pde7a         | Fosfodiesteraz 7A                                   | -1.91 | 0.025597 | 1.29  |
| 1433927_at             | Usp11         | 1 gibi Ubiquitin<br>spesifik peptidaz               | -1.92 | 0.024018 | 1.38  |
| 1422860_at             | Nts           | Nörotensin                                          | -1.94 | 1.84E-07 | 14.19 |
| 1451194_at             | Aldob         | Aldolaz 2, B izoform                                | -1.94 | 7.08E-06 | 10.59 |
| 1441662_at             | Cyp4x1        | Sitorkrom P450, aile 4,<br>alt aile x, polipeptit 1 | -1.95 | 0.00019  | 7.22  |
| 1445490_at             | C77805        | Eksprese edilmiş sekans<br>C77805                   | -1.96 | 0.003479 | 4.00  |
| NuGO_empt06685<br>2_at | NA            | NA                                                  | -2.07 | 0.013658 | 2.19  |
| 1442427_at             | NA            | NA                                                  | -2.11 | 0.033207 | 0.86  |
| 1430185_at             | Akap13        | A kinaz (PRKA) bağlama<br>proteini 13               | -2.12 | 0.0361   | 0.74  |
| 1452462_a_at           | Banp          | Nükleer proteinle<br>ilişkili Btg3                  | -2.16 | 0.038182 | 0.64  |
| 1446158_at             | Exoc6b        | Exocvst karmaşık<br>bileşeni 6B                     | -2.19 | 0.010302 | 2.72  |

|              |               |                                                                           |       |          |       |
|--------------|---------------|---------------------------------------------------------------------------|-------|----------|-------|
| 1418113_at   | Cyp2d10       | Sitokrom P450, aile 2, alt aile d, polipeptit 10                          | -2.24 | 0.012383 | 2.42  |
| 1426645_at   | Hsp90aa1      | Isı şoku proteini 90kDa alfa (sitosolik), A sınıfı üye 1                  | -2.30 | 0.012459 | 2.34  |
| 1420150_at   | Spsb1         | SplA / rianodin reseptörü bölgesi ve 1 içeren SOCS kutusu                 | -2.36 | 0.015257 | 2.01  |
| 1452382_at   | Dnm3os        | Dynamin 3, karşıt iplik                                                   | -2.37 | 0.025932 | 1.26  |
| 1460645_at   | Chordc1       | Sistein ve histidin zengin alan (CHORD) içeren, çinko bağlayıcı protein 1 | -2.38 | 0.002156 | 4.53  |
| 1457477_at   | NA            | NA                                                                        | -2.39 | 0.027058 | 1.14  |
| 1430175_at   | Tmtc2         | Transmembran ve 2 içeren tetratricopeptide tekrarı                        | -2.40 | 0.028805 | 1.05  |
| 1433266_at   | 2810416A17Rik | RIKEN cDNA 2810416A17 geni                                                | -2.43 | 0.0361   | 0.73  |
| 1416756_at   | Dnajb1        | DnaJ (Hsp40) homolog, alt aile B, üye 1                                   | -2.50 | 0.013658 | 2.19  |
| 1415938_at   | Spink3        | Serin peptidaz inhibitörü, Kazal tipi 3                                   | -2.53 | 0.012459 | 2.35  |
| 1429273_at   | Bmper         | BMP bağlayıcı endotel düzenleyici                                         | -2.53 | 0.012459 | 2.34  |
| 1450518_at   | Hnf4g         | Hepatosit nükleer faktör 4, gama                                          | -2.53 | 0.019018 | 1.66  |
| 1440227_at   | BF642829      | Eksprese edilmiş sekans BF642829                                          | -2.58 | 0.038494 | 0.63  |
| 1451924_a_at | Edn1          | Endotelin 1                                                               | -2.63 | 0.011568 | 2.51  |
| 1425952_a_at | Gcg           | Glukagon                                                                  | -2.65 | 2.76E-06 | 11.57 |
| 1459253_at   | Arrdc3        | 3 içeren Arrestin bölgesi                                                 | -2.69 | 0.026081 | 1.23  |
| 1416288_at   | Dnaja1        | DnaJ (Hsp40) homolog, alt aile A, üye 1                                   | -2.75 | 0.000154 | 7.45  |
| 1435160_at   | 1110064P04Rik | RIKEN cDNA 1110064P04 geni                                                | -2.76 | 0.011568 | 2.52  |
| 1460179_at   | Dnaja1        | DnaJ (Hsp40) homolog, alt aile A, üye 1                                   | -2.78 | 0.000251 | 6.92  |
| 1419349_a_at | Cyp2d9        | Sitokrom P450, aile 2,                                                    | -2.78 | 0.000134 | 7.68  |

|                     |               |                                      |        |          |       |
|---------------------|---------------|--------------------------------------|--------|----------|-------|
|                     |               | alt aile d, polipeptit 9             |        |          |       |
| NuGO_empt04429_9_at | Sstr1         | Somatostatin reseptörü 1             | -2.80  | 3.73E-07 | 13.38 |
| 1449493_at          | Insl5         | Insulin-benzeri 5                    | -2.91  | 5.33E-08 | 15.35 |
| NuGO_empt05410_5_at | D630013G24Rik | RIKEN cDNA D630013G24 geni           | -2.99  | 0.004044 | 3.83  |
| 1419185_a_at        | Mlxip1        | MLX etkileşimli protein benzeri      | -3.16  | 4.43E-06 | 11.08 |
| 1449939_s_at        | Dlk1          | Delta-benzeri 1 homolog (Drosophila) | -3.29  | 9.19E-11 | 20.69 |
| 1458385_at          | Hspa41        | Isı şoku proteini 4 gibi             | -3.36  | 0.032433 | 0.90  |
| 1422639_at          | Calcb         | Kalsitoninle ilgili polipeptit, beta | -3.75  | 0.010981 | 2.62  |
| 1425993_a_at        | Hsp110        | Isı şoku proteini 110                | -4.08  | 0.028805 | 1.05  |
| NuGO_empt09106_3_at | NA            | NA                                   | -6.03  | 3.11E-07 | 13.63 |
| 1419473_a_at        | Cck           | Kolesistokinin                       | -10.87 | 4.94E-1  | 21.66 |
| 1452388_at          | Hspala        | Isı şoku proteini 1A                 | -25.30 | 0.02652  | 1.19  |

Tablo S4B 28. Günde R. hominis aşılannmış hayvanlar ve mikropsuz hayvanlar arasında çıkan kolonda farklı şekilde ifade edilen transkriptler.

| ID         | Symbol  | Name                                              | FC    | P-değeri | B     |
|------------|---------|---------------------------------------------------|-------|----------|-------|
| 1416809_at | Cyp3a11 | Sitokrom P450, aile 3, ali aile a, polipeptit 11  | 89.84 | 1.45E-06 | 12.00 |
| 1424973_at | Cyp3a25 | Sitokrom P450, aile 3, alit aile a, polipeptit 25 | 52.30 | 7.31E-07 | 12.67 |
| 1419393_at | Abcg5   | ATP- bağlayan kaset, alt aile G (WHITE), üye 5    | 42.06 | 1.60E-09 | 18.55 |
| 1449375_at | Ces6    | Karboksilesteraz 6                                | 26.10 | 1.75E-16 | 31.66 |
| 1422749_at | Ly6g6c  | Lenfosit antijen 6                                | 25.49 | 2.06E-   | 20.64 |

|                     |               |                                                    |       |          |        |
|---------------------|---------------|----------------------------------------------------|-------|----------|--------|
|                     |               | kompleksi, konum G6C                               |       | 10       |        |
| 1448964_at          | S100g         | S100 kalsiyum bağlayan protein G                   | 17.88 | 4.82E-07 | 13.11  |
| 1455540_at          | Cps1          | Karbamoyl- fosfat sentetaz 1                       | 11.50 | 0.010507 | 1.76   |
| 1449133_at          | Sprrla        | Küçük prolinden zengin protein 1A                  | 11.27 | 0.009303 | 1.97   |
| NuGO_emt070648_at   | Abca12        | ATP- bağlayan kaset, alt aile A (ABC1), üye 12     | 7.97  | 4.05E-08 | 15.43  |
| 1448485_at          | Gut1          | Gama- glutamiltransferaz 1                         | 7.45  | 0.020934 | 0.94   |
| 1417828_at          | Aqp8          | Aquaporin 8                                        | 6.67  | 0.001582 | 4.30   |
| 1437060_at          | Olfm4         | Olfaktomedin 4                                     | 5.80  | 0.023469 | 0.77   |
| 1420437_at          | Indo          | Indoleamin- pirol 2,3 dioksijenaz                  | 5.18  | 0.000637 | 5.44   |
| 1425452_s_at        | AW125753      | İfade edilen dizi AW125753                         | 4.97  | 0.001639 | 4.20   |
| 1439934_at          | Slc30a10      | Çözgen taşıyıcı ailesi 30, üye 10                  | 4.68  | 0.000119 | 7.49   |
| 1430641_at          | 9030605104Rik | RIKEN cDNA 9030605I04 geni                         | 4.47  | 0.000199 | 6.89   |
| 1423556_at          | Akr1b7        | Aldo- keto redüktaz aile 1, üye B7                 | 4.36  | 0.000304 | 6.44   |
| 1428400_at          | 2200002K05Rik | RIKEN cDNA 2200002K05 geni                         | 4.31  | 4.81E-07 | 13.18  |
| 1424626_at          | 2010003K11Rik | RIKEN cDNA 2010003K11 geni                         | 4.25  | 0.024887 | 0.68   |
| 1439727_at          | Clca6         | Klorür kanalı kalsiyumla aktive 6                  | 4.09  | 0.000869 | 5.07   |
| 1450355_a_at        | Capg          | Capping protein (aktin filamanı), gelsolin benzeri | 3.90  | 4.67E-05 | 8.59   |
| 1427119_at          | Spink4        | Serin peptidaz inhibitörü, Kazal tip 4             | 3.67  | 0.007507 | 2.25   |
| NuGO_emt092118_s_at | NA            | NA                                                 | 3.51  | 0.040399 | - 0.04 |
| 1451239_a_at        | Slc26a1       | Çözgen taşıyıcı ailesi 26 (sülfat taşıyıcı), üye 1 | 3.36  | 0.004508 | 2.94   |

|                       |               |                                                          |      |              |        |
|-----------------------|---------------|----------------------------------------------------------|------|--------------|--------|
| 1418283_at            | Cldn4         | Claudin 4                                                | 2.97 | 0.002809     | 3.51   |
| 1418165_at            | Itlna         | İntelektin a                                             | 2.88 | 0.0005       | 5.82   |
| 14401972_at           | 1810054D07Rik | RIKEN cDNA 1810054D07<br>geni                            | 2.86 | 0.000108     | 7.65   |
| 1426980_s_at          | E130012A19Rik | RIKEN cDNA E130012A19<br>geni                            | 2.83 | 0.002052     | 3.91   |
| 1431042_at            | Paqr8         | Progesterin ve adipoQ<br>reseptör ailesi üye<br>VIII     | 2.67 | 0.000637     | 5.46   |
| 1424688_at            | Creb3I3       | cAMP duyarlı elemanı<br>bağlayan protein 3-<br>benzeri 3 | 2.67 | 0.035165     | 0.19   |
| NuGO_emt04911<br>3_at | Ptprh         | Protein tirozin<br>fosfataz, reseptör<br>tip, H          | 2.54 | 6.75E-<br>06 | 10.55  |
| 1432358_at            | Muc16         | Mucin 16                                                 | 2.47 | 0.044391     | - 0.20 |
| 1419759_at            | Abcb1a        | ATP- bağlayan kaset,<br>alt aile B (MDR/TAP),<br>üye 1A  | 2.46 | 0.00017      | 7.13   |
| NuGO_emt03361<br>0_at | Nox1          | NADPH oksidaz 1                                          | 2.43 | 0.035165     | 0.20   |
| 1418661_at            | Abhd2         | 2 içeren abhidrolaz<br>bölgesi                           | 2.41 | 0.043727     | - 0.17 |
| 1420499_at            | Gch1          | GTP siklohidrolaz 1                                      | 2.38 | 0.040391     | - 0.03 |
| 1416607_at            | 4931406C07Rik | RIKEN cDNA 4931406C07<br>geni                            | 2.31 | 3.39E-<br>11 | 22.26  |
| 1417991_at            | Dio1          | Deiyodinaz,<br>iyodotironin, tip I                       | 2.29 | 0.006845     | 2.39   |
| 1455455_at            | Glt28d2       | 2 içeren<br>glikoziltransferaz 28<br>bölgesi             | 2.16 | 0.015457     | 1.33   |
| 1417164_at            | Dusp10        | Çift spesifik<br>fosfataz 10                             | 2.13 | 0.031006     | 0.40   |
| 1428937_at            | Atp2b1        | ATPaz, Ca++ taşıma,<br>plazma membrane 1                 | 2.13 | 1.13E-<br>05 | 9.98   |
| 1429833_at            | Ly6g6e        | Lenfosit antijen 6<br>kompleksi, konum G6E               | 2.10 | 0.042694     | - 0.12 |
| 1419582_at            | Cyp2c55       | Sitokrom P450, aile<br>2, alt aile c,<br>polipeptit 55   | 2.06 | 0.022426     | 0.83   |
| 1448562_at            | Upp1          | Üridin fosforilaz 1                                      | 2.06 | 0.007369     | 2.29   |



|              |          |                                                                                            |      |          |        |
|--------------|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------|------|----------|--------|
| 1444254_at   | NA       | NA                                                                                         | 2.05 | 0.009642 | 1.90   |
| 1428936_at   | Atp2b1   | ATPaz Ca++ taşıma, plazma membranı 1                                                       | 2.05 | 0.000378 | 6.15   |
| 1421268_at   | Ugcg     | UDP- glikoz seramid glikoziltransferaz                                                     | 2.05 | 0.035029 | 0.21   |
| 1419478_at   | Sectm1b  | Salgılanan ve transmembran 1B                                                              | 2.02 | 0.004814 | 2.83   |
| 1428336_at   | Agpat4   | 1- açilgliserol- 3- fosfat O- açiltransferaz 4 (lyscfosfatidik asit açiltransferaz, delta) | 2.02 | 0.047797 | - 0.32 |
| 1456231_at   | Pla2g3   | Fosfolipaz A2, grup III                                                                    | 1.99 | 0.000365 | 6.21   |
| 1421709_a_at | Fmo5     | Flavin içeren monooksijenaz 5                                                              | 1.97 | 0.02187  | 0.86   |
| 1455104_at   | NA       | NA                                                                                         | 1.95 | 0.010934 | 1.71   |
| 1417133_at   | Pmp22    | Periferal myelin proteini                                                                  | 1.95 | 0.027135 | 0.58   |
| 1418206_at   | Sdf2l1   | Stromal hücre türevli faktör 2- benzeri 1                                                  | 1.94 | 0.045914 | - 0.25 |
| 1436614_at   | Al843639 | İfade edilen dizi Al843639                                                                 | 1.94 | 0.006795 | 2.41   |
| 1452070_at   | Dedd2    | Ölüm efektör bölgesi içeren DNA bağlayan protein 2                                         | 1.92 | 0.046848 | - 0.28 |
| 1417404_at   | Elov16   | ELOVL ailesi üye 6, uzun zincirli yağ asitlerinin uzatılması (maya)                        | 1.90 | 0.012549 | 1.55   |
| 1417277_at   | Cyp4f16  | Sitokrom P450, aile 4, alt aile f, polipeptit 16                                           | 1.87 | 0.000119 | 7.50   |
| 1422983_at   | Itqb6    | Integrin beta 6                                                                            | 1.87 | 0.03266  | 0.33   |
| 1454746_at   | Plekhl1  | Aile M (RUN bölgesi ile) üye 1 içeren plekstrin homoloji bölgesi                           | 1.86 | 0.001042 | 4.88   |
| 1425079_at   | Tm6sf2   | Transmembran 6 süper ailesi üye 2                                                          | 1.85 | 0.001269 | 4.60   |

|                      |               |                                                                    |      |          |        |
|----------------------|---------------|--------------------------------------------------------------------|------|----------|--------|
| 1455099_at           | Mogat2        | Monoaçilgliserol O-açiltransferaz 2                                | 1.85 | 0.024887 | 0.68   |
| 1435749_at           | Gda           | Guanin deaminaz                                                    | 1.82 | 0.002467 | 3.67   |
| 1416488_at           | Ccng2         | Siklin G2                                                          | 1.81 | 0.003976 | 3.09   |
| 1418256_at           | Srf           | Serum yanıt faktörü                                                | 1.79 | 0.033108 | 0.26   |
| 1426744_at           | Srebf2        | Sterol düzenleyici eleman bağlayan factor 2                        | 1.76 | 0_041026 | - 0.07 |
| 1457253_at           | Trim40        | 40 içeren tripartite motifi                                        | 1.75 | 0.001269 | 4.61   |
| 1433556_at           | Cental        | Centaurin, alfa 1                                                  | 1.75 | 0.009141 | 2.01   |
| NuGO_emt08479_2_x_at | NA            | NA                                                                 | 1.74 | 0.020944 | 0.92   |
| 1417823_at           | Gcat          | Glisin C-asetiltransferaz (2-amino-3-ketobutirat-koenzim A ligazı) | 1.74 | 0.049235 | - 0.38 |
| NuGO_emt06628_2_at   | Defb37        | Defensin beta 37                                                   | 1.74 | 6.42E-05 | 8.25   |
| 1429550_at           | Entpd8        | Ektonükleosit trifosfat difosfohidrolaz 8                          | 1.73 | 0.004814 | 2.85   |
| 1430594_at           | Rab11fip1     | RAB11 ailesi ile etkileşen protein 1 (sınıf I)                     | 1.73 | 0.033108 | 0.27   |
| 1420913_at           | Slco2a1       | Çözgen taşıyıcı organik anyon taşıyıcı aile, üye 2a1               | 1.73 | 0.001791 | 4.09   |
| NuGO_emt04344_0_at   | 2210010C17Rik | RIKEN cDNA 2210010C17 gene                                         | 1.73 | 0.01702  | 1.21   |
| 1430674_at           | 1700016C15Rik | RIKEN cDNA 1700016C15 geni                                         | 1.73 | 0.036022 | 0.14   |
| 1430890_at           | 2210010C17Rik | RIKEN cDNA 2210010C17 geni                                         | 1.72 | 0.011201 | 1.68   |
| 1417803_at           | 1110032A04Rik | RIKEN cDNA 1110032A04 geni                                         | 1.71 | 0.000358 | 6.25   |
| 1449873_at           | Bmp8a         | Kemik morfogenetik proteini 8a                                     | 1.71 | 0.044796 | - 0.22 |
| 1434130_at           | Lhfp12        | Liporna HMGIC füzyon                                               | 1.71 | 0.004814 | 2.83   |

|                     |               |                                                           |      |          |        |
|---------------------|---------------|-----------------------------------------------------------|------|----------|--------|
|                     |               | partner- benzeri 2                                        |      |          |        |
| 1448605_at          | Rhoc          | Ras homolog geni ailesi, üye C                            | 1.70 | 0.001099 | 4.79   |
| 1432363_at          | 2410018E23Rik | RIKEN cDNA 2410018E23 gene                                | 1.69 | 0.04853  | - 0.34 |
| 1427878_at          | 0610010012Rik | RIKEN cDNA 0610010012 geni                                | 1.68 | 2.48E-05 | 9.21   |
| 1416379_at          | Panx1         | Pannexin 1                                                | 1.67 | 0.002404 | 3.74   |
| 1434059_at          | B230312A22Rik | RIKEN cDNA B230312A22 geni                                | 1.65 | 0.001763 | 4.12   |
| 1452475_at          | Pcsk5         | Proprotein konvertaz subtilisin/keksin tip 5              | 1.65 | 0.036022 | 0.12   |
| 1454399_at          | 2010D03H20Rik | RIKEN cDNA 2010003H20 geni                                | 1.62 | 0.016629 | 1.24   |
| 1460550_at          | Mtmr11        | Myotubularin ilişkili protein 11                          | 1.62 | 0.010762 | 1.73   |
| NuGO_emt070892_at   | NA            | NA                                                        | 1.62 | 0.020773 | 0.95   |
| 1436710_at          | Zswim4        | Çinko parmağı, 4 içeren SWIM bölgesi                      | 1.62 | 0.009718 | 1.88   |
| 1420663_at          | Zbtb7b        | Çinko finger ve 7B bölgesi içeren BTB                     | 1.61 | 0.042694 | - 0.13 |
| 1418991_at          | Bak1          | BCL2-antagonist/katil 1                                   | 1.61 | 0.01094  | 1.71   |
| 1417990_at          | Ppplr14d      | Protein fosfataz 1, düzenleyici (inhibitör) alt birim 14D | 1.59 | 0.003746 | 3.16   |
| 1452837_at          | Lpin2         | Lipin 2                                                   | 1.58 | 0.035702 | 0.16   |
| NuGO_emt021769_s_at | Slc17a4       | Çözgen taşıyıcı ailesi 17 (sodyum fosfat), üye 4          | 1.57 | 0.015878 | 1.30   |
| 1418671_at          | Capn5         | Calpain 5                                                 | 1.57 | 0.041629 | - 0,09 |
| 1417751_at          | Stk10         | Serin/treonin kinaz 10                                    | 1.57 | 0.027636 | 0.55   |
| 1452294_at          | Pcdh1         | Protokaderin 1                                            | 1.56 | 0.003042 | 3.42   |
| 1429154_at          | Slc35f2       | Çözgen taşıyıcı ailesi 35, üye F2                         | 1.56 | 0.004185 | 3.02   |
| 1450982_at          | Slc9a3r1      | Çözgen taşıyıcı ailesi 9 (sodium /                        | 1.56 | 0.008755 | 2.06   |

|              |          |                                                                                                |      |          |        |
|--------------|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------|------|----------|--------|
|              |          | hidrojen<br>değiştirici), izoform<br>3 regülatör 1                                             |      |          |        |
| 1434015_at   | Slc2a6   | Çözgen taşıyıcı<br>ailesi 2<br>(kolaylaştırılan<br>glikoz taşınması),<br>üye 6                 | 1.55 | 0.005093 | 2.72   |
| 1418712_at   | Cdc42ep5 | CDC42 efektör protein<br>(Rho GTPaz bağlayan)<br>5                                             | 1.55 | 0.003976 | 3.09   |
| 1424809_at   | Crb3     | Crumbs homolog 3<br>(Drosophila)                                                               | 1.53 | 0.014107 | 1.43   |
| 1428953_at   | Otud7b   | 7B içeren OTU bölgesi                                                                          | 1.53 | 0.035702 | 0.17   |
| 1424090_at   | Sdcbp2   | Sindekan bağlayan<br>protein (sintenin) 2                                                      | 1.53 | 0.023574 | 0.76   |
| 1418215_at   | Mep1b    | Meprin 1 beta                                                                                  | 1.53 | 0.027636 | 0.55   |
| 1434456_at   | Gm440    | gen modeli 440,<br>(NCBI)                                                                      | 1.53 | 0.032752 | 0.32   |
| 1423521_at   | Lmnbl    | Lamin B1                                                                                       | 1.53 | 0.007369 | 2.31   |
| 1425298_a_at | Naip1    | NLR ailesi, apoptoz<br>inhibitor proteini 1                                                    | 1.51 | 0.002438 | 3.70   |
| 1456619_at   | Liph     | Lipaz, üye H                                                                                   | 1.50 | 0.044796 | - 0.22 |
| 1418976_s_at | Cideb    | Hücre ölümünü uyarıcı<br>DNA fragmentasyon<br>faktörü, alfa alt<br>birimi-benzeri<br>efektör B | 1.49 | 0.020944 | 0.93   |
| 1423376_a_at | Dok4     | Docking protein 4                                                                              | 1.49 | 0.005089 | 2.73   |
| 1415793_at   | Pnpo     | Piridoksin 5'- fosfat<br>oksidaz                                                               | 1.48 | 0.00252  | 3.63   |
| 1435461_at   | Magi3    | Membran ilişkili<br>guanilat kinaz, WW ve<br>3 içeren PDZ bölgesi                              | 1.48 | 0.001623 | 4.23   |
| 1444951_at   | BC042698 | cdNA dizisi BC042698                                                                           | 1.45 | 0.042694 | - 0.14 |
| 1452214_at   | Skil     | SKI- benzeri                                                                                   | 1.45 | 0.020383 | 0.99   |
| 1426284_at   | Krt20    | Keratin 20                                                                                     | 1.43 | 0.021519 | 0.88   |
| 1460406_at   | Al427122 | İfade edilen dizi<br>Al427122                                                                  | 1.42 | 0.016225 | 1.27   |
| 1419331_at   | Cdh17    | Kaderin 17                                                                                     | 1.41 | 0.009399 | 1.94   |
| 1428509_at   | Myole    | Miyosin IE                                                                                     | 1.41 | 0.043727 | - 0.17 |

|              |               |                                                   |      |          |        |
|--------------|---------------|---------------------------------------------------|------|----------|--------|
| 1429117_at   | Tradd         | TNFRSF1A- ilişkili ölüm bölgesi                   | 1.41 | 0.020944 | 0.91   |
| 1460681_at   | Ceacam2       | CEA- ilişkili hücre adezyon molekülü 2            | 1.41 | 0.036022 | 0.14   |
| 1455678_at   | NA            | NA                                                | 1.41 | 0.048555 | - 0.36 |
| 1440218_at   | BC040758      | cDNA dizisi BC040758                              | 1.41 | 0.026321 | 0.62   |
| 1416009_at   | Tspan3        | Tetraspanin 3                                     | 1.40 | 0.002052 | 3.91   |
| 1456200_at   | Ipmk          | Inositol polifosfat multikinaz                    | 1.40 | 0.033108 | 0.28   |
| 1424126_at   | Alas1         | Aminolevulinik asit sentaz 1                      | 1.39 | 0.040391 | - 0.03 |
| 1434482_at   | D4Ertd22e     | DNA segmenti, Chr 4, ERATO Doi 22, ifade edilmiş  | 1.39 | 0.038213 | 0.05   |
| 1416690_at   | Gtpbp2        | GTP bağlayan protein 2                            | 1.38 | 0.035702 | 0.16   |
| 1417895_a_at | Tmem54        | Transmembran proteini 54                          | 1.38 | 0.001332 | 4.53   |
| 1424245_at   | Ces2          | Karboksilesteraz 2                                | 1.37 | 0.020383 | 0.99   |
| 1434559_at   | Stx3          | Sentaksin 3                                       | 1.37 | 0.032755 | 0.31   |
| 1426733_at   | Itpk1         | Inositol 1,3,4-trifosfat 5/6 kinaz                | 1.35 | 0.010099 | 1.81   |
| 1451139_at   | Slc39a4       | Çözgen taşıyıcı ailesi 39 (çinko taşıyıcı), üye 4 | 1.34 | 0.04853  | - 0.34 |
| 1417398_at   | Rras2         | İlgili RAS viral (r-ras) onkojen homoloğu 2       | 1.34 | 0.040085 | - 0.02 |
| 1427203_at   | Myo15b        | Miyosin XVB                                       | 1.33 | 0.020944 | 0.92   |
| 1428331_at   | 2210016F16Rik | RIKEN cDNA 2210016F16 geni                        | 1.32 | 0.047659 | - 0.30 |
| 1427128_at   | Ptpn23        | Protein tirozin fosfataz, reseptör dışı tip 23    | 1.31 | 0.042694 | - 0.13 |
| 1420426_at   | Myo7b         | Miyosin VIIb                                      | 1.30 | 0.036022 | 0.13   |
| 1452304_a_at | Arhgef5       | Rho guanin nükleotit değişim faktörü (GEF) 5      | 1.30 | 0.047797 | - 0.31 |
| 1434303_at   | Raph1         | Ras ilişkili (RalGDS/AF-6) ve plekstrin homoloji  | 1.29 | 0.024887 | 0.69   |

|              |          |                                                                                                                                 |      |          |        |
|--------------|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|----------|--------|
|              |          | bölgeleri 1                                                                                                                     |      |          |        |
| 1433885_at   | Al788777 | İfade edilen dizi<br>Al788777                                                                                                   | 1.28 | 0.018321 | 1.10   |
| 1415765_at   | Hnrpul2  | Heterojen nükleer<br>ribonükleoprotein U-<br>benzeri 2                                                                          | 1.28 | 0,009181 | 2.00   |
| 1448110_at   | Sema4a   | Sema bölgesi,<br>immüoglobulin<br>bölgesi (Ig),<br>transmembran bölgesi<br>(TM) ve kısa<br>sitoplazmik bölge,<br>(semaforin) 4A | 1.27 | 0.00151  | 4.40   |
| 1423960_at   | Mboat5   | 5 içeren membran O-<br>açıltransferaz<br>bölgesi                                                                                | 1.27 | 0.043727 | - 0.18 |
| 1415676_a_at | Psm5     | Proteazom (prosom,<br>makropain) alt birim,<br>beta tip 5                                                                       | 1.27 | 0.040399 | - 0.04 |
| 1434345_at   | Clrn3    | Klarin 3                                                                                                                        | 1.27 | 0.027133 | 0.59   |
| 1426014_a_at | Mucdhl   | Musin ve kaderin<br>benzeri                                                                                                     | 1.27 | 0.036152 | 0.11   |
| 1420503_at   | Slc6a14  | Çözgen taşıyıcı<br>ailesi 6<br>(nörotransmitter<br>taşıyıcı), üye 14                                                            | 1.26 | 0.001582 | 4.31   |
| 1418817_at   | Chmp1b   | Kromatin modifiye<br>eden protein 1B                                                                                            | 1.25 | 0.004961 | 2.78   |
| 1423686_a_at | Prr13    | Prolinden zengin 13                                                                                                             | 1.25 | 0.026919 | 0.60   |
| 1420826_at   | Letm1    | Transmembran protein<br>1 içeren lösün<br>fermuar- EF- hand                                                                     | 1.24 | 0.036022 | 0.13   |
| 1448618_at   | Mvp      | Ana vault proteini                                                                                                              | 1.24 | 0.031006 | 0.39   |
| 1417178_at   | Gipc2    | GIPC PDZ bölgesi<br>içeren aile, üye 2                                                                                          | 1.24 | 0.014863 | 1.38   |
| 1416627_at   | Spint1   | Serin proteaz<br>inhibitörü, Kunitz<br>tip 1                                                                                    | 1.23 | 0.048555 | - 0.36 |
| 1428163_at   | Sarl1b   | SAR1 geni homolog B<br>(S. cerevisiae)                                                                                          | 1.22 | 0.036022 | 0.13   |
| 1416193_at   | Carl     | Karbonik anhidraz 1                                                                                                             | 1.21 | 0.009728 | 1.87   |

|            |               |                                                                         |        |          |        |
|------------|---------------|-------------------------------------------------------------------------|--------|----------|--------|
| 1444884_at | Ppt1          | Palmitoyl- protein<br>tiyoesteraz 1                                     | 1.18   | 0.032755 | 0.31   |
| 1448279_at | Arpc3         | Aktin ilişkili<br>protein 2/3<br>kompleksi, alt birim<br>3              | 1.14   | 0.049367 | - 0.38 |
| 1417282_at | Mmp23         | Matriks<br>metallopeptidaz 23                                           | - 1.14 | 0.024366 | 0.72   |
| 1429615_at | Zfp91         | Çinko parmağı protein<br>91                                             | - 1.22 | 0.038424 | 0.04   |
| 1453577_at | 2610018103Rik | RIKEN cDNA 2610018103<br>geni                                           | - 1.22 | 0.04853  | - 0.35 |
| 1417999_at | Itm2b         | Integral membran<br>proteini 2B                                         | - 1.22 | 0.020944 | 0.91   |
| 1454994_at | Klhl20        | Kelch- benzeri 20<br>(Drosophila)                                       | - 1.24 | 0.040433 | - 0.05 |
| 1435563_at | Mrps5         | Mitokondriyal<br>ribozomal protein S5                                   | - 1.25 | 0.022222 | 0.84   |
| 1445561_at | NA            | NA                                                                      | - 1.27 | 0.04853  | - 0.34 |
| 1436854_at | Trpc2         | Geçici reseptör<br>potansiyel katyon<br>kanalı, alt aile C,<br>üye 2    | - 1.27 | 0.002008 | 3.97   |
| 1416452_at | Oat           | Ornitin<br>aminotransferaz                                              | - 1.27 | 0.009757 | 1.86   |
| 1415961_at | Itm2c         | Integral membran<br>protein 2C                                          | - 1.28 | 0.007369 | 2.28   |
| 1448933_at | Pcdhb17       | Protokaderin beta 17                                                    | - 1.28 | 0.048555 | - 0.35 |
| 1440391_at | Gcn111        | GCN1 amino- asit<br>sentezi 1- benzeri<br>1'in genel kontrolü<br>(maya) | - 1.29 | 0.030585 | 0.42   |
| 1450788_at | Saa1          | Serum amiloid A1                                                        | - 1.31 | 0.001623 | 4.23   |
| 1444451_at | Pappa2        | Papalisin 2                                                             | - 1.31 | 0.038548 | 0.03   |
| 1457029_at | C030010B13Rik | RIKEN cDNA C030010B13<br>geni                                           | - 1.31 | 0.023793 | 0.74   |
| 1417088_at | Zfp346        | Çinko parmak proteini<br>346                                            | - 1.33 | 0.039077 | 0.01   |
| 1436220_at | Zfp287        | Çinko parmak protein<br>287                                             | - 1.33 | 0.022441 | 0.82   |
| 1445824_at | Zfp458        | Çinko parmak proteini                                                   | - 1.37 | 0.044011 | - 0.18 |

|                    |               |                                                                    |        |          |        |
|--------------------|---------------|--------------------------------------------------------------------|--------|----------|--------|
|                    |               | 458                                                                |        |          |        |
| 1420191_s_at       | Dl6Bwg1494e   | DNA segmenti, Chr 16, Briqham & Women's Genetics 1494 ifade edilen | - 1.37 | 0.035165 | 0.19   |
| 1415871_at         | Tgfbi         | Beta uyarımlı, büyüme faktörünün dönüştürülmesi                    | - 1.38 | 0.039653 | 0.00   |
| 1442731_at         | 9030416H16Rik | RIKEN cDNA 9030416H16 geni                                         | - 1.41 | 0.012107 | 1.59   |
| 1424889_at         | Nupl2         | Nükleoporin benzeri 2                                              | - 1.42 | 0.001582 | 4.31   |
| 1416178_a_at       | Plekhl1       | Aile B (evectins) üye 1 içeren plekstrin homolojisi                | - 1.44 | 0.047797 | - 0.32 |
| 1447946_at         | Adam23        | Bir disintegrin ve metallopeptidaz bölgesi 23                      | - 1.44 | 0.017961 | 1.13   |
| NuGO_emt08086_9_at | NA            | NA                                                                 | - 1.45 | 0.032755 | 0.31   |
| 1452050_at         | Camkl1        | Kalsiyum / kalmodulin- bağımlı protein kinaz ID                    | - 1.45 | 0.006002 | 2.56   |
| 1442447_at         | Znrf3         | Çinko ve yüzük parmağı 3                                           | - 1.45 | 9.00E-06 | 10.24  |
| 1416865_at         | Fgd1          | 1 içeren FYVE, RhoGEF ve PH bölgesi                                | - 1.46 | 0.049235 | - 0.37 |
| 1442197_at         | Al480624      | İfade edilen dizi Al480624                                         | - 1.47 | 0.033108 | 0.27   |
| 1427020_at         | Scara3        | Yakalayıcı reseptör sınıf A, üye 3                                 | - 1.47 | 0.029906 | 0.45   |
| 1434961_at         | Asb1          | Ankirin tekrarı ve protein 1 içeren SOCS kutusu                    | - 1.48 | 0.0093   | 1.97   |
| 1431873_a_at       | Tub1          | Epsilon- tubulin 1                                                 | - 1.48 | 0.033108 | 0.26   |
| 1424367_a_at       | Homer2        | Homer homoloğu 2 (Drosophila)                                      | - 1.49 | 0.00269  | 3.56   |
| 1441662_at         | Cyp4x1        | Sitokrom P450, aile 4, alt aile x, polipeptit 1                    | - 1.50 | 0.028455 | 0.51   |
| 1429086_at         | Grhl2         | Grainyhead- benzeri 2 (Drosophila)                                 | - 1.51 | 0.04298  | - 0.15 |



|              |               |                                                            |        |          |        |
|--------------|---------------|------------------------------------------------------------|--------|----------|--------|
| 1439078_at   | Klhl4         | Kelch- benzeri 4<br>(Drosophila)                           | - 1.52 | 0.020679 | 0.96   |
| 1451194_at   | Aldob         | Aldolaz 2, B izoform                                       | - 1.54 | 0.002438 | 3.70   |
| 1449913_at   | Zfp2          | Çinko parmak proteini<br>2                                 | - 1.55 | 0.033108 | 0.29   |
| 1431820_at   | 4632404H12Rik | RIKEN cDNA 4632404H12<br>geni                              | - 1.56 | 0.036071 | 0.12   |
| 1437900_at   | 4930523C07Rik | RIKEN cDNA 4930523C07<br>geni                              | - 1.56 | 0.044391 | - 0.20 |
| 1449462_at   | 3110049J23Rik | RIKEN cDNA 3110049J23<br>geni                              | - 1.57 | 0.041709 | - 0.09 |
| 1457373_at   | Cdh19         | Kaderin 19, tip 2                                          | - 1.57 | 0.032755 | 0.31   |
| 1423072_at   | 6720475J19Rik | RIKEN cDNA 6720475J19<br>geni                              | - 1.58 | 0.006244 | 2.51   |
| 1422542_at   | Gpr34         | G protein- kenetli<br>reseptör 34                          | - 1.58 | 0.040399 | - 0.04 |
| 1448475_at   | Olfml3        | Olfactomedin- benzeri<br>3                                 | - 1.58 | 0.032964 | 0.30   |
| 1417676_a_at | Ptpro         | Protein tirosin<br>fosfataz, reseptör<br>tip, 0            | - 1.59 | 0.001623 | 4.24   |
| 1456763_at   | AA536749      | İfade edilen dizi<br>AA536749                              | - 1.59 | 0.017774 | 1.15   |
| 1417732_at   | Anxa8         | Anneksin A8                                                | - 1.59 | 0.027267 | 0.57   |
| 1425510_at   | Mark1         | MAP / mikrotübül<br>afinite düzenleyici<br>kinaz 1         | - 1.60 | 0.004814 | 2.85   |
| 1417234_at   | Mmp11         | Matriks<br>metallopeptidaz 11                              | - 1.61 | 0.036152 | 0.11   |
| 1416194_at   | Cyp4b1        | Sitokrom P450, aile<br>4, alt aile b,<br>polipeptit 1      | - 1.62 | 0.002404 | 3.74   |
| 1429679_at   | Fbxl13        | F- kutusu ve lösinden<br>zengin tekraralama<br>proteini 13 | - 1.64 | 0.010507 | 1.76   |
| 1428260_at   | Spg3a         | Spastik paraplegia 3A<br>homoloğu (insan)                  | - 1.68 | 0.007369 | 2.28   |
| 1426413_at   | Neurod1       | Nörojenik farklılaşma<br>1                                 | - 1.68 | 0.009718 | 1.88   |
| 1455500_at   | Rnf213        | Yüzük parmağı<br>proteini 213                              | - 1.68 | 0.017961 | 1.13   |

|                    |               |                                                                                          |        |          |        |
|--------------------|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------|--------|----------|--------|
| 1456532_at         | Pdgfd         | Platelet-türevli büyüme faktörü, D polipeptidi                                           | - 1.70 | 0.008375 | 2.11   |
| 1419754_at         | Myo5a         | Myosin Va                                                                                | - 1.71 | 0.020595 | 0.97   |
| 1460147_at         | NA            | NA                                                                                       | - 1.71 | 0.037207 | 0.08   |
| 1440014_at         | Pacs1         | Fosfofurin asidik küme sınıflandırma proteini 1                                          | - 1.72 | 7.34E-05 | 8.05   |
| 1451342_at         | Spon1         | Spondin 1, (f-spondin) hücre dışı matriks proteini                                       | - 1.73 | 0.045023 | - 0.23 |
| 1438530_at         | Tfpi          | Doku faktörü yolağı inhibitörü                                                           | - 1.76 | 0.001582 | 4.29   |
| 1449563_at         | Cntn1         | Kontaktin 1                                                                              | - 1.77 | 0.029208 | 0.48   |
| 1435829_at         | B930008K04Rik | RIKEN cDNA B930008K04 geni                                                               | - 1.78 | 0.004961 | 2.78   |
| NuGO_empt010210_at | Cacna2d2      | Kalsiyum kanal, voltaj- bağımlı, alfa 2/delta alt birimi 2                               | - 1.80 | 0.035702 | 0.17   |
| 1455633_at         | Zfp647        | Çinko parmak proteini 647                                                                | - 1.80 | 0.041245 | - 0.08 |
| 1420416_at         | Sema3a        | Sema bölgesi, immünoglobulin bölgesi (1g), kısa temel bölge, salgınlanan, (semaforin) 3A | - 1.81 | 0.000506 | 5.78   |
| 1417644_at         | Sspn          | Sarkospan                                                                                | - 1.83 | 0.003984 | 3.08   |
| 1419687_at         | D930010J01Rik | RIKEN cDNA D930010J01 geni                                                               | - 1.83 | 0.045963 | - 0.25 |
| 1439618_at         | Pde10a        | Fosfodiesteraz 10A                                                                       | - 1.83 | 0.017774 | 1.16   |
| 1440430_at         | Elp4          | Uzama protein 4 homoloğu (S. cerevisiae)                                                 | - 1.84 | 0.023065 | 0.79   |
| 1425069_at         | BC018285      | cDNA dizisi BC018285                                                                     | - 1.84 | 0.042264 | - 0.11 |
| 1419376_at         | 1110018M03Rik | RIKEN cDNA 1110018M03 geni                                                               | - 1.85 | 0.009718 | 1.88   |
| 1434194_at         | Mtap2         | Mikrotübül ilişkili protein 2                                                            | - 1.85 | 0.007048 | 2.36   |
| 1459707_at         | Pacs1         | Fosfofurin asidik                                                                        | - 1.86 | 0.004814 | 2.86   |

|                    |          |                                                               |        |          |        |
|--------------------|----------|---------------------------------------------------------------|--------|----------|--------|
|                    |          | küme sınıflandırma proteini 1                                 |        |          |        |
| 1434475_at         | Ppig     | Peptidil-prolil izomeraz G (siklofilin G)                     | - 1.86 | 0.045576 | - 0.24 |
| 1449158_at         | Kcnk2    | Potasyum kanalı, alt aile K, üye 2                            | - 1.87 | 0.004961 | 2.77   |
| 1460606_at         | Hsd17b13 | Hidroksisteroid (17-beta) dehidrojenaz 13                     | - 1.88 | 0.003153 | 3.38   |
| 1436087_at         | Dpp10    | Dipeptidilpeptidaz 10                                         | - 1.89 | 0.043727 | - 0.17 |
| NuGO_emt02963_3_at | Npy2r    | Nöropeptit Y reseptörü Y2                                     | - 1.90 | 0.000199 | 6.88   |
| 1418606_at         | Hoxd10   | Homeo box D10                                                 | - 1.91 | 0.007866 | 2.18   |
| 1417411_at         | Nap115   | Nükleozom birleşme proteini 1- benzeri 5                      | - 1.91 | 0.047023 | - 0.29 |
| NuGO_emt03483_1_at | Nr2e3    | Nükleer reseptör alt ailesi 2, grup E, üye 3                  | - 1.91 | 0.040798 | - 0.06 |
| 1434740_at         | Scarf2   | Yakalayıcı reseptör sınıf F, üye 2                            | - 1.91 | 0.046195 | - 0.26 |
| 1420858_at         | Pkia     | Protein kinaz inhibitörü, alfa                                | - 1.92 | 0.003616 | 3.21   |
| 1457072_at         | Bcl11a   | B- hücreleri CLL/ lenfoma 11A (çinko parmak proteini)         | - 1.93 | 0.04853  | - 0.35 |
| 1428347_at         | Cyfip2   | Sitoplazmik FMR1 ile etkileşen protein 2                      | - 1.93 | 0.000484 | 5.87   |
| 1448823_at         | Cxcl12   | Kemokin (C- X- C motif) ligandı 12                            | - 1.95 | 0.007369 | 2.28   |
| 1436051_at         | Myo5a    | Miyosin Va                                                    | - 1.95 | 0.000596 | 5.61   |
| 1425065_at         | Oas2     | 2'- 5' oligoadenilat sentetaz 2                               | - 1.96 | 0.032484 | 0.34   |
| 1454876_at         | Rab23    | RAB23, onkojen ailesi, üye RAS                                | - 1.97 | 0.029208 | 0.48   |
| NuGO_emt02215_0_at | Cartpt   | CART prepropeptit                                             | - 1.98 | 0.008035 | 2.16   |
| 1423396_at         | Agt      | Anjiyotensinojen (serpin peptidaz inhibitörü, clade A, üye 8) | - 1.98 | 0.017774 | 1.15   |
| 1418213_at         | Krt23    | Keratin 23                                                    | - 1.99 | 0.031284 | 0.38   |

|              |               |                                                           |        |          |       |
|--------------|---------------|-----------------------------------------------------------|--------|----------|-------|
| 1444670_at   | Smyd3         | 3 içeren SET ve MYND bölgesi                              | - 2.02 | 0.022766 | 0.80  |
| 1453251_at   | Dhx30         | DEAH (Asp- Glu- Ala- His) kutusu polipeptit 30            | - 2.03 | 0.027622 | 0.56  |
| 1440925_at   | Rhoq          | Ras homolog gen ailesi, üye Q                             | - 2.05 | 0.031006 | 0.40  |
| 1422640_at   | Pcdhb9        | Protokaderin beta 9                                       | - 2.07 | 0.015304 | 1.34  |
| 1450708_at   | Scg2          | Secretogranin II                                          | - 2.09 | 0.010099 | 1.81  |
| 1435673_at   | Hoxd3         | Homeo kutusu D3                                           | - 2.09 | 0.029426 | 0.47  |
| 1416710_at   | Tmem35        | Transmembran protein 35                                   | - 2.10 | 0.007507 | 2.24  |
| 1423150_at   | Scg5          | Secretogranin V                                           | - 2.11 | 0.002438 | 3.69  |
| 1418392_a_at | Gbp3          | Guanilat nükleotit bağlayan protein 3                     | - 2.11 | 0.020383 | 0.99  |
| 1436566_at   | Rab40b        | Rab40b, onkojen ailesi, üye RAS                           | - 2.12 | 0.003512 | 3.25  |
| 1441231_at   | EG665123      | Öngörülen gen, EG665123                                   | - 2.14 | 0.035789 | 0.15  |
| 1419349_a_at | Cyp2d9        | Sitokrom P450, aile 2, alt aile d, polipeptit 9           | - 2.14 | 0.003512 | 3.25  |
| 1445481_at   | Al317158      | İfade edilen dizi Al317158                                | - 2.18 | 0.033108 | 0.26  |
| 1443698_at   | Fbxo39        | F- kutu proteini 39                                       | - 2.19 | 0.009359 | 1.95  |
| 1424900_at   | Slc29a4       | Çözgen taşıyıcı ailesi 29 (nükleosit taşıyıcıları), üye 4 | - 2.22 | 0.001105 | 4.77  |
| 1419185_a_at | Mlxip1        | MLX etkileşim protein- benzeri                            | - 2.23 | 0.000867 | 5.09  |
| 1435504_at   | Clip4         | Bağlayıcı protein ailesi içeren CAP-GLY bölgesi, üye 4    | - 2.24 | 0.006244 | 2.51  |
| 1438868_at   | Phf11         | PHD finfler proteini 11                                   | - 2.24 | 0.000857 | 5.12  |
| 1422860_at   | Nts           | Nörotensin                                                | - 2.28 | 1.04E-09 | 19.02 |
| 1451860_a_at | Trim30        | Tripartit motif proteini 30                               | - 2.28 | 0.038792 | 0.03  |
| 1434788_at   | D930050A07Rik | RIKEN cDNA D930050A07 geni                                | - 2.33 | 0.009359 | 1.95  |

|                    |                |                                                                    |        |          |        |
|--------------------|----------------|--------------------------------------------------------------------|--------|----------|--------|
| 1450684_at         | Etv1           | Ets varyant geni 1                                                 | - 2.38 | 0.000606 | 5.57   |
| 1433536_at         | Lrp11          | Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör-ilişkili protein 11          | - 2.39 | 0.000793 | 5.21   |
| NuGO_emt06055_1_at | 9030421 J09Rik | RIKEN cDNA 9030421 J09 geni                                        | - 2.44 | 0.044497 | - 0.20 |
| 1428758_at         | Tmem86a        | Transmembran protein 86A                                           | - 2.45 | 0.004961 | 2.76   |
| 1445881_at         | NA             | NA                                                                 | - 2.54 | 0.031006 | 0.39   |
| 1451426_at         | D11Lgp2e       | DNA segment, Chr 11, Lothar Hennighausen 2, ifade edilmiş          | - 2.55 | 0.0093   | 1.98   |
| 1416639_at         | Sic2a5         | Çözgen taşıyıcı ailesi 2 (kolaylaştırılan glikoz taşınması), üye 5 | - 2.67 | 0.006738 | 2.43   |
| 1429313_at         | Ror1           | Reseptör tirozin kinaz- benzeri orfan reseptörü 1                  | - 2.70 | 0.001269 | 4.59   |
| 1433184_at         | 6720477C19Rik  | RIKEN cDNA 6720477C19 geni                                         | - 2.72 | 0.017774 | 1.16   |
| 1419136_at         | Akr1c98        | Aldo- keto redüktaz aile 1, üye C18                                | - 2.77 | 0.0113   | 1.66   |
| 1418113_at         | Cyp2d10        | sitokrom P450, aile 2, alt aile d, polipeptit 10                   | - 2.79 | 0.000483 | 5.90   |
| 1417988_at         | Resp18         | Düzenlenen endokrin-spesifik protein 18                            | - 2.83 | 0.003512 | 3.26   |
| 1453196_a_at       | Oasl2          | 2'- 5' oligoadenilat sentetaz benzeri 2                            | - 2.84 | 0.011794 | 1.62   |
| 1423555_a_at       | Ifi44          | Interferon uyarımlı protein 44                                     | - 2.86 | 0.042694 | - 0.13 |
| 1449939_s_at       | Dlk1           | Delta- benzeri 1 homoloğu (Drosophila)                             | - 2.99 | 5.20E-10 | 19.73  |
| NuGO_emt09106_3_at | NA             | NA                                                                 | - 3.08 | 0.000637 | 5.49   |
| 1436998_at         | Ankrd43        | Ankirin tekrar bölgesi 43                                          | - 3.13 | 0.001056 | 4.85   |
| 1418293_at         | Ifit2          | Tetratrikopeptit tekrarları 2 ile                                  | - 3.14 | 0.000637 | 5.44   |

|                    |       |                                                               |         |          |        |
|--------------------|-------|---------------------------------------------------------------|---------|----------|--------|
|                    |       | interferon uyarımlı protein                                   |         |          |        |
| NuGO_emt04429_9_at | Sstr1 | Somatostatin reseptörü 1                                      | - 3.16  | 2.31E-08 | 16.00  |
| 1421492_at         | Ptgd2 | Prostaglandin D2 sentaz 2, hematopoietik                      | - 3.18  | 7.03E-05 | 8.13   |
| 1449025_at         | Ifit3 | Tetratrikopeptit tekrarları 3 ile interferon uyarımlı protein | - 3.34  | 0.007674 | 2.21   |
| 1455528_at         | NA    | NA                                                            | - 3.47  | 0.002046 | 3.94   |
| 1429273_at         | Bmper | BMP- bağlayan endotelyal düzenleyici                          | - 3.55  | 0.000199 | 6.93   |
| 1425952_a_at       | Gcg   | Glukagon                                                      | - 3.68  | 3.98E-09 | 17.68  |
| 1448628_at         | Scg3  | Secretogranin III                                             | - 3.77  | 1.61E-08 | 16.39  |
| 1448201_at         | Sfrp2 | Salgılanan kıvrık-ilişkili protein 2                          | - 4.18  | 0.000257 | 6.62   |
| 1418191_at         | Usp18 | Ubikitin spesifik peptidaz 18                                 | - 4.45  | 0.046848 | - 0.28 |
| 1449493_at         | Ins15 | İnsülin- benzeri 5                                            | - 9.54  | 5.98E-16 | 30.51  |
| 1419473_a_at       | Cck   | Kolesistokinin                                                | - 11.97 | 1.17E-11 | 23.32  |

Tablo S4C.14. Günde R. hominis aşılannmış hayvanlar ile mikropsuz hayvanlar arasında ileumda farklı şekilde ifade edilen transkriptler.

| ID           | Sembol | İsim                   | FC   | P-değeri | B    |
|--------------|--------|------------------------|------|----------|------|
| 1427343_at   | Rasd2  | RASD ailesi, üye 2     | 4.21 | 0.008352 | 3.02 |
| 1420673_a_at | Acox2  | Asil-Koenzim A oksidaz | 3.37 | 0.02344  | 1.29 |

|              |               |                                                  |      |          |      |
|--------------|---------------|--------------------------------------------------|------|----------|------|
|              |               | 2, dallı zincir                                  |      | 5        |      |
| 1418174_at   | Dbp           | D site albumin destekleyici bağlama proteini     | 3.26 | 0.04708  | 0.16 |
| 1434116_at   | Cbx2          | Chromobox homologu 2 (Drosophila Pc sınıfı)      | 3.15 | 0.01298  | 2.21 |
| 1456284_at   | Tmem171       | Transmembran protein 171                         | 2.94 | 0.011378 | 2.45 |
| 1460713_at   | BC048355      | cDNA sekansı BC048355                            | 2.61 | 0.035037 | 0.67 |
| 1438689_at   | 4632433K11Rik | RIKEN cDNA 4632433K11 geni                       | 2.41 | 0.04048  | 0.41 |
| 1460187_at   | Sfrp1         | Sırlanmış frizzled ilişkili dizi protein 1       | 2.37 | 0.021033 | 1.51 |
| 1420645_at   | Pcqf2         | Polycomb grubu halka parmak 2                    | 2.31 | 0.003987 | 4.19 |
| 1455547_at   | Zc3h7b        | 7B içeren çinko parmaklı CCCH tipi               | 2.16 | 0.008352 | 2.98 |
| 1416258_at   | Tk1           | Timidin kinazı 1                                 | 2.12 | 0.017451 | 1.78 |
| 1449845_a_at | Ephb4         | Eph reseptörü B4                                 | 2.12 | 0.033002 | 0.77 |
| 1455120_at   | Hpd1          | 4-hidroksifenilpiruvat dioksijenaz- benzeri      | 2.07 | 0.023445 | 1.30 |
| 1417399_at   | Gas6          | Büyüme durdurma spesifiği 6                      | 2.06 | 0.000167 | 8.81 |
| 1452862_at   | Rreb1         | Ras duyarlı eleman bağlama proteini 1            | 2.05 | 0.03901  | 0.47 |
| 1455246_at   | NA            | NA                                               | 2.02 | 0.032868 | 0.78 |
| 1434322_at   | Micall2       | MICAL-benzeri 2                                  | 1.99 | 0.009875 | 2.69 |
| 1428207_at   | Bcl7a         | B-hücresi CLL/lenfoma 7A                         | 1.99 | 0.04708  | 0.11 |
| 1420845_at   | Mrps2         | Mitokondriyal ribozomal protein S2               | 1.97 | 0.042267 | 0.36 |
| 1444254_at   | NA            | NA                                               | 1.96 | 0.025132 | 1.19 |
| 1448656_at   | Cacnb3        | Kalsiyum kanalı, voltaja bağlı, beta 3 altbirimi | 1.96 | 0.032019 | 0.86 |

|                         |               |                                                                       |      |              |      |
|-------------------------|---------------|-----------------------------------------------------------------------|------|--------------|------|
| 1434908_at              | Al480556      | Eksprese edilmiş sekans<br>Al480556                                   | 1.95 | 0.02959<br>1 | 0.99 |
| 1424376_at              | Cdc42ep1      | CDC42 efektör proteini<br>(Rho GTPaz bağlama) 1                       | 1.89 | 0.01298      | 2.20 |
| 1430274_a_at            | Stard3nl      | STARD3 N-terminal<br>benzeri                                          | 1.88 | 0.00859<br>6 | 2.92 |
| 1416513_at              | Lamb2         | Laminin, beta 2                                                       | 1.87 | 0.01639<br>8 | 1.89 |
| 1416536_at              | Mum1          | Melanoma ile ilişkili<br>antijen (mutasyon<br>geçirmiş) 1             | 1.86 | 0.02513<br>2 | 1.17 |
| NuGO_emt084041<br>_s_at | Defcr20       | Defensine bağlı<br>kriptidin 20                                       | 1.84 | 0.02050<br>2 | 1.55 |
| 1418320_at              | Prss8         | Proteaz, serin, 8<br>(prostasin)                                      | 1.83 | 0.02103<br>3 | 1.49 |
| 1455163_at              | Guf1          | GUF1 GTPaz homologu (S.<br>cerevisiae)                                | 1.80 | 0.02461      | 1.22 |
| 1436665_a_at            | Ltbp4         | Latent transforme edici<br>büyüme faktörü beta<br>bağlayıcı protein 4 | 1.80 | 0.03658<br>1 | 0.57 |
| 1420643_at              | Lfng          | Çılgın saçak gen<br>homologu (Drosophila)                             | 1.79 | 0.00324<br>8 | 4.57 |
| 1428695_at              | 9130227C08Rik | RIKEN cDNA<br>9130227C08Rik geni                                      | 1.79 | 0.03616<br>7 | 0.59 |
| 1453018_at              | Nvl           | Nükleer VCP-benzeri                                                   | 1.77 | 0.03503<br>7 | 0.65 |
| 1419101_at              | Sin3a         | Transkripsiyonel<br>düzenleyici, SIN3A<br>(maya)                      | 1.76 | 0.03088<br>2 | 0.91 |
| 1424459_at              | Aytl2         | 2 benzeri<br>asiltransferaz                                           | 1.74 | 0.03992<br>1 | 0.43 |
| 1415935_at              | Smoc2         | SPARC ile ilgili<br>modüler kalsiyum<br>bağlama 2                     | 1.73 | 0.04615      | 0.19 |
| 1424618_at              | Hpd           | 4-hidroksifenilpiruvik<br>asit dioksijenaz                            | 1.73 | 0.03901      | 0.47 |
| 1426297_at              | Tcfe2a        | Transkripsiyon faktörü<br>E2a                                         | 1.73 | 0.00221<br>5 | 5.11 |
| 1425391_a_at            | Osbpl5        | Öksisterol bağlayıcı<br>protein benzeri 5                             | 1.73 | 0.04615      | 0.19 |
| 1455719_at              | Tubb5         | Tubulin, beta 5                                                       | 1.73 | 0.03247      | 0.82 |



|              |         |                                                                        |      |          |      |
|--------------|---------|------------------------------------------------------------------------|------|----------|------|
|              |         |                                                                        |      | 7        |      |
| 1451912_a_at | Fgfr11  | Fibroblast büyüme faktörü reseptör benzeri 1                           | 1.73 | 0.02321  | 1.33 |
| 1429582_at   | Btbd14a | 14A içeren BTB(POZ) alanı                                              | 1.72 | 0.003987 | 4.21 |
| 1454777_at   | Slco2b1 | Çözücü taşıyıcı organik anyon taşıyıcı ailesi, üye 2b1                 | 1.70 | 0.01298  | 2.22 |
| 1424101_at   | Hnrp1   | Heterojen nükleer ribonükleoprotein L                                  | 1.69 | 0.044481 | 0.25 |
| 1448691_at   | Ubqln4  | Ubiquilin 4                                                            | 1.65 | 0.016054 | 1.92 |
| 1417604_at   | Camk1   | Kalsiyum / kalmodulin bağımlı protein kinaz I                          | 1.63 | 0.033233 | 0.74 |
| 1442757_at   | Lrch1   | Leucine açısından zengin tekrarlar ve calponin homologisi (CH) alanı 1 | 1.63 | 0.007505 | 3.30 |
| 1460675_at   | Igsf8   | İmmunoglobulin süper aile, üye 8                                       | 1.62 | 0.04708  | 0.13 |
| 1418671_at   | Capn5   | Calpain 5                                                              | 1.58 | 0.04708  | 0.15 |
| 1426897_at   | Rcc2    | Kromozom yoğunlaştırması regülatörü 2                                  | 1.57 | 0.035037 | 0.65 |
| 1417594_at   | Gkap1   | G kinazı bağlama proteini 1                                            | 1.52 | 0.019831 | 1.60 |
| 1433539_at   | Commd3  | 3'ü içeren COMM alanı                                                  | 1.51 | 0.009875 | 2.72 |
| 1435469_at   | Qscn6l1 | Quiescin Q6 benzeri 1                                                  | 1.51 | 0.041412 | 0.38 |
| 1448561_at   | Ncf2    | Nötrofil sitozolik faktör 2                                            | 1.51 | 0.044087 | 0.30 |
| 1427022_at   | Ddx42   | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) kutu polipeptidi 42                             | 1.50 | 0.01872  | 1.67 |
| 1416030_a_at | Mcm7    | Minikromozom bakım eksikliği 7 (S. cerevisiae)                         | 1.49 | 0.02321  | 1.34 |
| 1450023_at   | Gtpbp1  | GTP bağlama protein 1                                                  | 1.48 | 0.044113 | 0.27 |
| 1417879_at   | Nenf    | Nöron türevi nörotrofik                                                | 1.48 | 0.03901  | 0.46 |

|              |               |                                                                                               |      |          |      |
|--------------|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------|----------|------|
|              |               | faktör                                                                                        |      |          |      |
| 1424640_at   | Arl8a         | ADP-ribosilasyon faktörü-benzeri 8A                                                           | 1.47 | 0.044113 | 0.28 |
| 1418982_at   | Cebpa         | CCAAT / arttırıcı bağlama proteini (C / EBP), alfa                                            | 1.47 | 0.036167 | 0.60 |
| 1428382_at   | Smarcc2       | SWI / SNF ilişkili, matriks ilişkili, kromatin aktine bağımlı regülatör, alt familya c, üye 2 | 1.47 | 0.044113 | 0.28 |
| 1434134_at   | Wdr42a        | WD tekrar bölgesi 42A                                                                         | 1.45 | 0.009875 | 2.74 |
| 1450519_a_at | Prkaca        | Protein kinaz, cAMP bağımlı, katalitik, alfa                                                  | 1.44 | 0.008352 | 2.99 |
| 1451306_at   | Cdca7l        | Hücre bölme çevrimi 7 benzer                                                                  | 1.44 | 0.035037 | 0.65 |
| 1426724_at   | Cnn3          | Calponin 3, asidik                                                                            | 1.44 | 0.033105 | 0.76 |
| 1424644_at   | Tbcc          | Tubulin'e özgü şaperon c                                                                      | 1.42 | 0.032128 | 0.85 |
| 1417266_at   | Ccl6          | Kemokin (C-C motif) liqand 6                                                                  | 1.42 | 0.021206 | 1.47 |
| 1415975_at   | Carhsp1       | Kalsiyum düzenlenmiş ısıya dayanıklı protein 1                                                | 1.38 | 0.014132 | 2.10 |
| 1448277_at   | Pold2         | Polimeraz (DNA yönlendirmeli), delta 2, düzenleyici altbirim                                  | 1.38 | 0.044481 | 0.24 |
| 1433736_at   | Hcfcl         | Ana hücre faktörü C1                                                                          | 1.35 | 0.035162 | 0.64 |
| 1435149_at   | Plcg1         | Fosfolipaz C, gama 1                                                                          | 1.35 | 0.036167 | 0.59 |
| 1417500_a_at | Tgm2          | Transglutaminaz 2, C polipeptidi                                                              | 1.33 | 0.022457 | 1.39 |
| 1428125_at   | 4921506J03Rik | RIKEN cDNA 4921506J03 geni                                                                    | 1.32 | 0.030752 | 0.92 |
| 1452100_at   | Dullard       | Dullard homoloğu (Xenopus laevis)                                                             | 1.32 | 0.030391 | 0.94 |
| 1448148_at   | Grn           | Granulin                                                                                      | 1.30 | 0.01178  | 2.33 |

|                   |               |                                                           |       |          |      |
|-------------------|---------------|-----------------------------------------------------------|-------|----------|------|
|                   |               |                                                           |       | 3        |      |
| 1451984_at        | Hnrpull1      | Heterojen nükleer ribonükleoprotein U-benzeri 1           | 1.30  | 0.016884 | 1.85 |
| 1426401_at        | Ppp3ca        | Protein fosfataz 3, katalitik altbirim, alfa izoform      | 1.29  | 0.009875 | 2.72 |
| 1428380_at        | 0610007C21Rik | RIKEN cDNA 0610007C21 geni                                | 1.26  | 0.043354 | 0.32 |
| 1418364_a_at      | Ftl1          | Ferritin hafif zincir 1                                   | 1.24  | 0.01702  | 1.82 |
| 1456854_at        | Neurl         | Neuralized benzeri homolog (Drosophila)                   | -1.18 | 0.031207 | 0.89 |
| 1448853_at        | Synj2bp       | Synaptojanin 2 bağlayıcı protein                          | -1.19 | 0.04708  | 0.15 |
| 1416281_at        | Wdr45l        | Wdr45 benzeri                                             | -1.22 | 0.016971 | 1.84 |
| 1418843_at        | Slc30a4       | Çözünmüş taşıyıcı aile 30 (çinko taşıyıcı), üye 4         | -1.30 | 0.037239 | 0.54 |
| 1459557_at        | Zbtb16        | Çinko parmak ve 16 içeren BTB alanı                       | -1.31 | 0.001423 | 5.62 |
| 1418116_at        | Ifrg15        | İnterferon alfa yanıt veren gen                           | -1.32 | 0.038411 | 0.50 |
| 1448762_at        | Rad17         | RAD17 homolog (S. pombe)                                  | -1.32 | 0.044087 | 0.30 |
| 1435461_at        | Magi3         | Membran ilişkili guanilat kinaz, 3 içeren WW ve PDZ alanı | -1.33 | 0.044113 | 0.26 |
| 1434835_at        | Wapal         | Kanatları birbirine benzeyen homolog (Drosophila)         | -1.33 | 0.046851 | 0.17 |
| 1444328_at        | NA            | NA                                                        | -1.34 | 0.010408 | 2.57 |
| NuGO_emt073151_at | Nlrp9b        | NLR ailesi, 9B içeren pirin alanı                         | -1.34 | 0.045959 | 0.20 |
| 1427269_at        | Sfrs11        | Ekleme faktörü, arginin / serin açısından zengin 11       | -1.35 | 0.02461  | 1.22 |
| 1436157_at        | Ccar1         | Hücre bölünme döngüsü ve apoptosis regülatörü 1           | -1.36 | 0.021206 | 1.46 |

|                    |               |                                                     |       |          |      |
|--------------------|---------------|-----------------------------------------------------|-------|----------|------|
| NuGO_empt081039_at | Eif4e1b       | Ökaryotik çeviri başlatma faktörü 4E aile üyesi 1B  | -1.38 | 0.037239 | 0.54 |
| 1422217_a_at       | Cypl1a1       | Sitokrom p450, aile 1, alt aile a, polipeptit 1     | -1.38 | 0.005253 | 3.71 |
| 1434654_at         | Cog3          | Oligomerik golgi kompleksinin bileşeni 3            | -1.38 | 0.03901  | 0.46 |
| 1421680_at         | NA            | NA                                                  | -1.39 | 0.044113 | 0.28 |
| 1424296_at         | Gclc          | Glutamat-sistein ligaz, katalitik altbirim          | -1.41 | 0.023137 | 1.36 |
| 1440722_at         | D19Ertd386e   | DNA segmenti, Chr 19, ERATO Doi 386, ekprese edildi | -1.41 | 0.008352 | 3.15 |
| 1429849_at         | 4632411B12Rik | RIKEN cDNA 4632411B12 geni                          | -1.44 | 0.015927 | 1.94 |
| 1451407_at         | Jam4          | Bağlantı adhezyon molekülü 4                        | -1.44 | 0.015521 | 1.99 |
| 1424324_at         | Escol1        | Birleşmenin kurulması 1 homolog 1 (S. cerevisiae)   | -1.47 | 0.010277 | 2.60 |
| 1441403_at         | 6430501K19Rik | RIKEN cDNA 6430501K19 geni                          | -1.47 | 0.019952 | 1.59 |
| 1453160_at         | Thrap1        | Tiroid hormon reseptörü ile bağlantılı protein 1    | -1.48 | 0.034193 | 0.71 |
| 1432962_at         | 2610024D14Rik | RIKEN cDNA 2610024D14 geni                          | -1.49 | 0.018436 | 1.70 |
| 1456896_at         | 6720462K09Rik | RIKEN cDNA 6720462K09 geni                          | -1.50 | 0.011783 | 2.34 |
| 1444705_at         | App           | Amiloid beta (A4) öncü protein                      | -1.50 | 0.032477 | 0.80 |
| 1426886_at         | Cln5          | Ceroid-lipofuksinöz, nöronal 5                      | -1.52 | 0.01702  | 1.81 |
| 1459059_at         | 2010308F09Rik | RIKEN cDNA 2010308F09 geni                          | -1.53 | 0.008352 | 2.97 |
| 1436616_at         | R74740        | Eksprese edilmiş sekans R74740                      | -1.55 | 0.011378 | 2.44 |
| 1453269_at         | Unc5b         | Unc-5 homolog B (C. elegans)                        | -1.55 | 0.018436 | 1.70 |

|            |               |                                                                                                                          |       |              |      |
|------------|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|--------------|------|
| 1424536_at | Oasle         | 2'-5' oligoadenilat<br>sentetaz 1E                                                                                       | -1.55 | 0.00835<br>2 | 3.08 |
| 1444565_at | NA            | NA                                                                                                                       | -1.56 | 0.00525<br>3 | 3.70 |
| 1448049_at | Jmjd1c        | 1C içeren Jumonji alanı                                                                                                  | -1.58 | 0.02321      | 1.33 |
| 1441546_at | Mpp6          | Membran proteini,<br>palmitoillenmiş 6<br>(MAGUK p55 alt-aile<br>üyesi 6)                                                | -1.58 | 0.00987<br>5 | 2.70 |
| 1442605_at | Bach2         | BTB ve CNC homolojisi 2                                                                                                  | -1.59 | 0.03247<br>7 | 0.80 |
| 1451415_at | 1810011010Rik | RIKEN cDNA 1810011010<br>geni                                                                                            | -1.66 | 0.02344<br>5 | 1.29 |
| 1436637_at | Eif4h         | Ökaryotik çeviri<br>başlatma faktörü 4H                                                                                  | -1.66 | 0.01157<br>1 | 2.40 |
| 1453457_at | Sri           | Sorcin                                                                                                                   | -1.67 | 0.02415<br>2 | 1.25 |
| 1429680_at | Tra2a         | Transformatör 2 alfa<br>homologu (Drosophila)                                                                            | -1.68 | 0.03310<br>5 | 0.75 |
| 1429624_at | Sltn          | SAFB benzeri<br>transkripsiyon<br>modülatörü                                                                             | -1.68 | 0.03690<br>6 | 0.56 |
| 1429870_at | Tnik          | TRAF2 ve NCK etkileşen<br>kinaz                                                                                          | -1.72 | 0.00135<br>6 | 5.94 |
| 1444065_at | Cyb5d2        | 2 ihtiva eden sitokrom<br>b5 bölgesi                                                                                     | -1.72 | 0.00023<br>7 | 8.03 |
| 1424208_at | Ptger4        | Prostaglandin E<br>reseptörü 4 (EP4 alt<br>tipi)                                                                         | -1.74 | 0.02959<br>2 | 0.98 |
| 1452837_at | Lpin2         | Lipin 2                                                                                                                  | -1.74 | 0.01178<br>3 | 2.33 |
| 1448185_at | Herpud1       | Homosistein ile<br>indüklenebilir,<br>endoplazmik retikulum<br>stres indüklenebilir,<br>ubikitin benzeri alan<br>üyesi 1 | -1.75 | 0.00289<br>5 | 4.81 |
| 1432719_at | 4833412K13Rik | RIKEN cDNA 4833412K13<br>geni                                                                                            | -1.76 | 0.04708      | 0.13 |
| 1437868_at | BC023892      | cDNA sekansı BC023892                                                                                                    | -1.76 | 0.04411<br>3 | 0.28 |

|              |               |                                                                                       |       |              |       |
|--------------|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-------|--------------|-------|
| 1433101_at   | 9030419F21Rik | RIKEN cDNA 9030419F21<br>geni                                                         | -1.77 | 0.00859<br>6 | 2.90  |
| 1451621_at   | 5830417C01Rik | RIKEN cDNA 5830417C01<br>geni                                                         | -1.77 | 0.00495      | 3.81  |
| 1432423_a_at | C530008M17Rik | RIKEN cDNA C530008M17<br>geni                                                         | -1.78 | 0.01164      | 2.38  |
| 1429399_at   | Rnf125        | Yüzük parmak proteini<br>125                                                          | -1.84 | 0.03300<br>2 | 0.77  |
| 1453264_at   | Marveld3      | 3 içeren Marvel<br>(membran-birleştirici)<br>etki alanı                               | -1.86 | 4.82E-<br>05 | 10.38 |
| 1454343_at   | Ppapdc1       | 1 içeren fosfatidik<br>asit fosfataz tip 2<br>alanı                                   | -1.88 | 0.00365<br>8 | 4.42  |
| 1435571_at   | A530065117Rik | RIKEN cDNA A530065117<br>geni                                                         | -1.90 | 0.01579<br>5 | 1.96  |
| 1443164_at   | NA            | NA                                                                                    | -1.91 | 0.01016<br>3 | 2.63  |
| 1437776_at   | Tmcc1         | Transmembran ve sargı<br>bobini alanları 1                                            | -1.91 | 0.02819<br>2 | 1.04  |
| 1442111_at   | D430033H22Rik | RIKEN cDNA D430033H22<br>geni                                                         | -1.91 | 0.00707<br>2 | 3.40  |
| 1424451_at   | Acaa1b        | Asetil-Koenzim A<br>asiltransferaz 1B                                                 | -1.92 | 0.03503<br>7 | 0.67  |
| 1459879_at   | 4921513D23Rik | RIKEN cDNA 4921513D23<br>geni                                                         | -1.92 | 0.00835<br>2 | 2.99  |
| 1428776_at   | Slc10a6       | Çözülmüş taşıyıcı aile<br>10 (sodyum / safra<br>asidi kotransporter<br>ailesi), üye 6 | -1.92 | 0.01137<br>8 | 2.45  |
| 1458079_at   | Usp40         | Ubiquitin spesifik<br>peptidaz 40                                                     | -1.93 | 0.00469<br>6 | 3.98  |
| 1442897_at   | 2610024E20Rik | RIKEN cDNA 2610024E20<br>geni                                                         | -1.95 | 0.00402      | 4.15  |
| 1455744_at   | Tmem181       | Transmembran proteini<br>181                                                          | -1.97 | 0.03784<br>3 | 0.52  |
| 1449385_at   | Hsd17b6       | Hidroksisteroit (17-<br>beta) dehidrojenaz 6                                          | -1.98 | 0.02513<br>2 | 1.18  |
| 1443068_at   | D130084N16Rik | RIKEN cDNA D130084N16<br>geni                                                         | -1.98 | 0.04708      | 0.11  |
| 1419582_at   | Cyp2c55       | Sitokrom P450, aile 2,                                                                | -1.99 | 0.04226      | 0.35  |

|                       |                         |                                        |       |              |       |
|-----------------------|-------------------------|----------------------------------------|-------|--------------|-------|
|                       |                         | alt-aile c, polipeptid<br>55           |       | 7            |       |
| 1457801_at            | 9930024M15Rik           | RIKEN cDNA 9930024M15<br>geni          | -2.01 | 0.04708      | 0.13  |
| 1438331_at            | Ypel2                   | Yippee benzeri 2<br>(Drosophila)       | -2.02 | 0.03784<br>3 | 0.51  |
| 1428833_at            | 4930406D14Rik           | RIKEN cDNA 4930406D14<br>geni          | -2.04 | 0.01541<br>8 | 2.01  |
| 1419388_at            | Tm4sf20                 | Transmembran 4 L altı<br>aile üyesi 20 | -2.05 | 0.01016<br>3 | 2.65  |
| 1455510_at            | Spop                    | Leke tipi POZ proteini                 | -2.08 | 0.02344<br>5 | 1.29  |
| 1444178_at            | ENSMUSG000000052<br>976 | Tahmini gen,<br>ENSMUSG000000052976    | -2.09 | 0.02959<br>2 | 0.97  |
| 1443159_at            | Txnrd1                  | Tioredoksin redüktaz 1                 | -2.10 | 0.04708      | 0.11  |
| 1457161_at            | 9530029012Rik           | RIKEN cDNA 9530029012<br>geni          | -2.11 | 0.01903<br>2 | 1.65  |
| 1459887_at            | NA                      | NA                                     | -2.11 | 0.00398<br>7 | 4.29  |
| 1459005_at            | NA                      | NA                                     | -2.13 | 0.00738<br>4 | 3.34  |
| 1439283_at            | NA                      | NA                                     | -2.18 | 0.00782<br>3 | 3.24  |
| 1438338_at            | Mdh1                    | Malat dehidrogenaz 1,<br>NAD (çözünür) | -2.21 | 0.00144<br>6 | 5.54  |
| 1458452_at            | NA                      | NA                                     | -2.21 | 0.01027<br>7 | 2.59  |
| 1442256_at            | Prkcd                   | Protein kinaz C, delta                 | -2.21 | 0.02663<br>3 | 1.11  |
| 1443969_at            | Irs2                    | İnsülin reseptörü<br>substratı 2       | -2.22 | 0.00398<br>7 | 4.22  |
| 1452462_a_at          | Banp                    | Btg3 ile ilişkili<br>nükleer protein   | -2.30 | 0.02103<br>3 | 1.52  |
| 1454558_at            | 5430416B10Rik           | RIKEN cDNA 5430416B10<br>geni          | -2.32 | 1.71E-<br>07 | 15.68 |
| 1430393_at            | C030048B08Rik           | RIKEN cDNA C030048B08<br>geni          | -2.32 | 0.00138<br>8 | 5.78  |
| 1446929_at            | Bach2                   | BTB ve CNC homoloji 2                  | -2.32 | 0.02736<br>9 | 1.07  |
| NuGO_emt067737<br>_at | 9130230L23Rik           | RIKEN cDNA 9130230L23<br>geni          | -2.34 | 0.04708      | 0.15  |

|            |               |                                                                  |       |          |      |
|------------|---------------|------------------------------------------------------------------|-------|----------|------|
| 1441138_at | Foxn2         | Forkhead kutusu N2                                               | -2.36 | 0.001356 | 6.01 |
| 1416041_at | Sgk           | Serum / glukokortikoid düzenlenmiş kinaz                         | -2.40 | 0.04048  | 0.41 |
| 1454158_at | Mpp7          | Membran proteini, palmitoillenmiş 7 (MAGUK p55 alt-aile üyesi 7) | -2.40 | 0.011571 | 2.40 |
| 1459253_at | Arrdc3        | Arrestin etki alanı içeren, 3                                    | -2.46 | 0.044113 | 0.27 |
| 1444376_at | Sesn1         | Sestrin 1                                                        | -2.48 | 0.036167 | 0.59 |
| 1430362_at | 5730409N24Rik | RIKEN cDNA 5730409N24 geni                                       | -2.49 | 0.032477 | 0.83 |
| 1442069_at | D5Wsu178e     | DNA segment, Chr 5, Wayne State University 178, eksprese edilmiş | -2.50 | 0.032477 | 0.80 |
| 1433203_at | 6030400A10Rik | RIKEN cDNA 6030400A10 geni                                       | -2.56 | 0.000747 | 6.76 |
| 1456706_at | 1700109H08Rik | RIKEN cDNA 1700109H08 gene                                       | -2.60 | 0.004825 | 3.89 |
| 1441561_at | Fbx13         | F-kutusu ve lösin açısından zengin tekrar protein 3              | -2.60 | 0.034193 | 0.70 |
| 1437884_at | Arl5b         | ADP-ribosilasyon faktörü-benzeri 5B                              | -2.65 | 0.022457 | 1.40 |
| 1445843_at | Chd2          | Kromodomain helikaz DNA bağlayıcı protein 2                      | -2.66 | 0.044481 | 0.24 |
| 1428306_at | Ddit4         | DNA hasar indüklenabilir transkript 4                            | -2.66 | 0.008352 | 3.09 |
| 1421009_at | Rsad2         | 2'yi içeren radikal S-adenosil metiyonin alanı                   | -2.69 | 0.04708  | 0.14 |
| 1440227_at | BF642829      | Eksprese edilmiş sekans BF642829                                 | -2.69 | 0.026633 | 1.11 |
| 1453595_at | Bcl6          | B hücreli lösemi / lenfoma 6                                     | -2.70 | 0.004825 | 3.89 |
| 1444775_at | 9930033D15Rik | RIKEN cDNA 9930033D15 geni                                       | -2.71 | 0.003248 | 4.61 |
| 1439972_at | Etnk1         | Etanolamin kinaz 1                                               | -2.74 | 0.03247  | 0.83 |



|                   |               |                                                                   |       |          |      |
|-------------------|---------------|-------------------------------------------------------------------|-------|----------|------|
|                   |               |                                                                   |       | 7        |      |
| 1440536_at        | Slc22a5       | Çözünmüş taşıyıcı aile 22 (organik katyon taşıyıcı), üye 5        | -2.90 | 0.021033 | 1.49 |
| 1438660_at        | Gcnt2         | Glukozaminil (N-asetil) transferaz 2, I-dallanma enzimi           | -2.95 | 0.018436 | 1.70 |
| 1437759_at        | Pfkip         | Fosfopüktokinaz, trombosit                                        | -2.97 | 0.008352 | 3.11 |
| NuGO_emt050020_at | Amica1        | Yapışma molekülü, CXADR antijeni 1 ile etkileşir                  | -2.97 | 0.000981 | 6.41 |
| 1446950_at        | Tox           | Timosit seleksiyonu ile ilişkili HMG kutu geni                    | -3.00 | 0.008352 | 2.98 |
| 1447141_at        | AW107722      | Eksprese edilmiş gen AW107722                                     | -3.14 | 0.013251 | 2.17 |
| 1459219_at        | Rapgef2       | Rap guanin nükleotid değişim faktörü (GEF) 2                      | -3.21 | 0.000747 | 6.75 |
| 1449496_at        | 2010109103Rik | RIKEN cDNA 2010109103 geni                                        | -3.22 | 0.000167 | 8.69 |
| 1458296_at        | NA            | NA                                                                | -3.23 | 0.001388 | 5.70 |
| 1440749_at        | NA            | NA                                                                | -3.38 | 0.001388 | 5.76 |
| 1440892_at        | BC017647      | cDNA sekansı BC017647                                             | -3.52 | 0.004881 | 3.85 |
| 1441115_at        | Rnf125        | Yüzük parmak proteini 125                                         | -3.90 | 0.000237 | 8.14 |
| 1421365_at        | Fst           | Follistatin                                                       | -4.33 | 0.04708  | 0.12 |
| 1446972_at        | D15Wsu126e    | DNA segmenti, Chr 15, Wayne State University 126, eksprese edildi | -7.09 | 0.003054 | 4.72 |

**Tablo S4D.28.** Günde R. hominis aşılannış hayvanlar ile mikropsuz hayvanlar arasında ileumda farklı şekilde ifade edilen transkriptler.

| ID         | Sembol | isim                                                  | M         | P-<br>değeri | B    |
|------------|--------|-------------------------------------------------------|-----------|--------------|------|
| 1458427_at | Brip1  | BRCA1<br>etkileşen<br>protein C-<br>uçlu helikaz<br>1 | -<br>1.72 | 0.002194     | 4.97 |

Doğal bağışıklık ve bağırsak bariyer işlevine dahil olan genler, çıkan kolonda *R. hominis* varlığında anlamlı ölçüde uyarılmıştır. GO süreci 'doğuştan gelen bağışıklık yanıtı' (GO: 0045087) yukarı regüle edilmiş ve önemli TLR ile ilişkili genleri, *TLR5*, *TLR1* ve *Vnn1*, içermiştir. *TLR5*'in yukarı regüle edilmesi, flagellar genlerin ve flagellin proteininin *R. hominis* içinde bağırsak kolonizasyonu sırasında ortaya çıkan indüksiyonu göz önüne alındığında, özellikle ilgi çekicidir ve doğuştan gelen ve adaptif bağışık yanıtlara aracılık yapmada bu doğuştan gelen sinyal yolağı bir role sahip olabilir. Kolonda *R. hominis*'den etkilenen diğer doğal immün genler antimikrobiyal peptitler *Defb37*, *Pla2g3*, *Muc16* ve *Itln*'yi ve bağırsak bariyer fonksiyon genleri *Sprrla*, *Cldn4*, *Pmp22*, *Crb3* ve *Magi3*'ü içerir. *R. hominis*'e yanıt olarak ileumda yukarı regülasyon sergileyen doğuştan gelen bağışıklık genleri *Defcr20*, *Pcgf2*, *Ltbp4*, *Igsf8* ve *Tcfe2a*'yı içerir. İlginçtir ki burada, NF- $\kappa$ B yolağının (GO: 0043124) *R. hominis* ile negatif regülasyonu gösterilmektedir (ör. S2), örneğin *B tetaiotaomikron* (Kelly vd. 2004) bu enflamatuar kaskadın aşağı regüle edilmesiyle bağışıklık homeostazına katkıda bulunabilir.

Bu yanıtların, *R. hominis*'e özgü olduğunu göstermek için, mikropsuz hayvanların başka bir ortakçı bakteriye cevabı araştırılmıştır. *E. coli* MG1655 (K12) ile kolonizasyona karşı gen ifadesi yanıtları, kolonizasyondan 10- 14. gün ve 22- 28. gün sonra *R. hominis* ile karşılaştırılmıştır. Bu zaman aralığında gen ifadesinde *E. coli*'ye değil, ancak *R. hominis*'e

yanıt olarak büyük farklılıklar gözlenmiştir, bu da *R. hominis*'in *E. coli*'nin minimum etkisinin tersine, bağırsakta biyolojik açıdan çok aktif olduğunu gösterir (Şek. S3). Çıkan kolonda *E. coli*'ye yanıtın, artan kolondaki gen ifadesi verilerinden yola çıkan, esasen bir B- hücresi aracılı antikör yanıtı olduğu görülmüştür.

#### ***R. hominis* çoğunlukla kolondaki T hücresi yolaklarını etkiler**

14. Günde etkilenen yolakların çoğunluğu hücre farklılaşması, hücre döngüsü düzenlemesi ve dokunun yeniden modellenmesi kategorilerine ayrılmıştır. Önemlisi, bağışıklık yanıtı çıkan kolonda 28. günde indüklenen önemli bir yolaktır. Bu kategorideki belirgin olarak etkilenen yolaklar çoğunlukla IL-10 sinyal verme ve CTLA- 4 ile T hücre fonksiyonunun regülasyonu da dahil olmak üzere T hücre fonksiyonuna dahil olmuştur (Tablo S5). Bu yolaklardaki genler hem yukarı regülasyon hem de aşağı regülasyon göstermiştir; bu nedenle yolaklar, *R. hominis*'in varlığından önemli derecede etkilense de, T hücresi farklılaşması üzerindeki kesin net fonksiyonel etkiler daha fazla araştırmayı gerekli kılmıştır. T hücrelerinin farklılaşmasına ilişkin olarak *R. hominis*'in rolünü açıklığa kavuşturmak üzere, *R. hominis*'e sahip geleneksel fareler 14 gün süreyle tedavi edilmiş ve hem lamina propriada hem de mezenterik lenf düğümlerinde (MLN) T hücre alt gruplarına olan etkisi belirlenmiştir. *R. hominis* ile tedavi her iki konumda CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T hücrelerinin popülasyonunu arttırmıştır (Şek. 4). Bir çift pozitif mono-ilişkili C3H / HeN ve C57Bl6 hayvanlarının çıkan ve inen kolonlarının lamina propriasındaki çift pozitif CD3<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> hücrelerinin sayısına ilişkin bir değerlendirme yapılmış ve tedavi edilen *R. hominis* farelerinin düzenleyici T hücrelerinde anlamlı bir artış doğrulanmıştır (Şek. 5A). 'Aktin polimerizasyonu' için GO- işlemi (GO: 0030041) (*Arp3*, *Capg*, *Cdc42ep5* ve *RhoC*), *R. hominis* kolonize farelerde 28. günde kolonda yukarı regüle edilmiştir (Şek. S2). T hücre

aktivasyonu ve efektör fonksiyonu için bağışıklık sinapsında aktin polimerizasyonu gereklidir. Genel olarak, bu veriler göstermektedir ki R. hominis T hücresi düzenlemesini olumlu bir şekilde etkileyerek, kolondaki adaptif bağışıklık tepkisini aktif olarak etkiler.

**Tablo S5. Tedavi edilen R. hominis fareleri ve mikropsuz fareler arasında 28. günde çıkan kolonda farklı şekilde ifade edilen transkriptlerin bağışıklık sistemi yanıt yolağı analizi.** Farklı olarak ifade edilen genler ( $P < 0.05$ ) GeneGo MetaCore analitik yazılımına aktarılarak, her grupta belirgin şekilde zenginleştirilmiş kanonik yollar belirlenmiştir. \* Her bir haritada, spesifik tedavi karşılaştırmasında farklı olarak ifade edilen gen sayısı. \*\* Her bir haritada toplam gen sayısı.

| Düzenleyici prosesler/<br>İmmün system yanıt yolağı                   | P-<br>değeri | Anlamlı* | Toplam** |
|-----------------------------------------------------------------------|--------------|----------|----------|
| İmmün yanıtı_IL-10 sinyalleşme yolağı                                 | 0.00125      | 10       | 26       |
| İmmün yanıtı_IL-9 sinyalleşme yolağı                                  | 0.00592      | 11       | 36       |
| İmmün yanıtı_HMGB1/RAGE sinyalleşme yolağı                            | 0.00832      | 14       | 53       |
| İmmün yanıtı_BCR yolağı                                               | 0.00992      | 14       | 54       |
| Gelişim_GM-CSF sinyalleşme                                            | 0.01258      | 13       | 50       |
| Gelişim_PEDF sinyalleşme                                              | 0.02618      | 12       | 49       |
| İmmün yanıtı_IL-5 sinyalleşme                                         | 0.02840      | 11       | 44       |
| İmmün yanıtı_TCR ve NF-kB'nin aktivasyonunda CD28 ile birlikte uyarım | 0.03611      | 10       | 40       |
| İmmün yanıtı_CTLA-4 ile T hücresi                                     | 0.04598      | 9        | 36       |

|                                  |         |    |    |
|----------------------------------|---------|----|----|
| fonksiyonunun düzenlenmesi       |         |    |    |
| İmmün yanıtı_CD40 sinyalleşmesi  | 0.04796 | 14 | 65 |
| Sinyal transdüksiyonu_JNK yolağı | 0.04921 | 10 | 42 |

Çıkan kolondaki Ly6 gen ailesinin indüksiyonu bu sonuçlarla ilişkilidir. Özellikle, *Ly6g6c*'nin GPI'ye bağlı bir gen ürünü 25 kat yukarı regüle edilmiş ve ilgili gen *Ly6g6e* 28. günde 5 iki kat yukarı regüle edilmiştir. Nötrofiller ve plazmositoid dendritik hücreler de dahil olmak üzere çoğu hematopoietik hücre, Ly6 ailesinin bir veya daha fazla üyesini ifade eder. Ayrıca, T hücresi aktivasyonu, farklılaşması ve olgunlaşmasında Ly6'nın olası bir rolü önerilmiştir (Mallya, 10 Campbell & Aguado 2006). İmmünohistokimya, *R. hominis* kolonize farelerde artmış Ly6G<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> ve CD3<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> hücrelerinin varlığında artışı doğrulamıştır (Şek. 5B).

#### ***R. hominis* flagellinler T hücre farklılaşmasını modüle eder.**

15 Bakterilerin T hücrelerinin farklılaşmasına etkisi, görüntülenen TLR ligand dizisini yansıtabilir. Örneğin, TLR5 sinyali ile CD4<sup>+</sup> T hücre yanıtları arasındaki birleşme, kısa süre önce flagellat patojenler için gösterilmiştir (Letran vd. 2011). İlginç olarak, deneysel düzene bağlı olarak, flagellin, 20 Th1, Th2, Th17 ve Treg yanıtları da dahil olmak üzere bir dizi T hücre yanıtı oluşturabilir (Wilson vd. 2012).

FlaA1 (RH1) ve FlaA2 (RH2) bakteriyel flagellinlerin işlevselliği, benzersiz *R. hominis* flagellin dizilerine karşı üretilen yeni çözünür rekombinant flagellin proteinleri 25 kullanılarak araştırılmıştır. RH1 ve RH2'nin yetenekleri, FLT3L veya GM-CSF ile genleşen bağırsak epitel hücre hatları ve kemik iliği kaynaklı dendritik hücrelerdeki sinyal verme

yanıtlarını aktive etmek için, özdeş protokoller kullanılarak üretilen çeşitli ortakçı ve patojen flammellinler ile karşılaştırılmıştır.

Farklı bakteriyel flammellinlerin özdeş konsantrasyonları ile tedavi edilen epitel hücreleri farklı gen ifadesi modelleri sergilemiştir (Şek. 6A). Önemlisi, rekombinant protein preparatlarında endotoksin kontaminasyonu tespit edilmemiştir. *Salmonella enteritidis* (SE), *E. coli* K12 (EC) veya RH1 flammellinden daha tesirli olmuştur. RH1 flammellin de güçlü bir yanıt vermiş ancak ortakçı AK ile birlikte ayrı bir kılıf altında kümelenmiştir. Yanıtların, dominant negatif TLR5 ifade eden epitel hücreler kullanılarak, TLR5'e bağımlı olduğu gösterilmiştir. Buna karşılık, RH2'nin minimum düzeyde aktif olduğu gösterilmiştir; genel olarak ne pro- enflamatuardır ne de diğer rekombinant bakteriyel flammellinler tarafından indüklenen korunan gen işareti (IL- 8, CXCL- 1, CXCL- 2 ve CXCL- 10) aktive ederler. RH1 flammellin proteini, her hiki rekombinant proteinin de *in vivo*, ifade edilmesine rağmen, *in vitro* olarak RH2'den biyolojik olarak daha aktiftir, RH1, aynı zamanda, *in vivo* olarak gen ifadesi seviyesinde önemli derecede yukarı regüle edilmiştir. *R. hominis*'den elde edilen RH1 flammellinin Flt3L ve GM- CSF'den türetilmiş dendritik hücrelerde ortakçı *E. colive* patojenik *Salmonella enteritidis*'e göre farklı yanıtlar uyandırdığı gösterilmiştir. (Şek. 6B- C). Özellikle, RH1, IA / IE ve CD40'ın yukarı regülasyonu ve C3H / HeN hem de C57BI / 6 farelerinden alınan kemik iliği kaynaklı DC'ler ile IL- 10 üretimiyle Flt3L- genişletilmiş DC'leri aktive etme kabiliyetinde benzersizdir. IL- 10 / IL- 12 oranı özellikle C57BI / 6 DC'lerde yükselmiştir (Şek. 6D), bunların CD103 + Siglec- H + olduğu bulunmuştur. Buradaki gözlemlerle tutarlı olarak, bir dizi yeni rapor, flammellinin CD103 + DC popülasyonlarını (Flores- Langarica vd. 2012, Kinnebrew ve ark. 2012) aktive ettiğini göstermektedir.

R. hominis'in ve bunun flagellinlerinin fonksiyonel önemini değerlendirmek için mikropsuz TLR5KO ve WT fareleri monokolonize edilmiştir. Hem TLR5KO hem de R. hominis ile kolonize doğal tip için farklı olarak ifade edilen genleri gösteren ısı haritası, TLR5'in çok güçlü bir etkisini ortaya koymuştur (Şekil S4). T hücresi yolakları hala TLR5KO farelerinde R. hominis kolonizasyonundan etkilenmiş olsa da, yanıtlar IL- 10 ve CTLA- 4 ile değil, ancak IL4, IL5, IL- 6, IL- 9 yolakları ile daha fazla ilişkili olmuştur (Tablo S6). Dahası, TLR5KO farelerinin lamina propriasındaki çift- pozitif CD3<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> hücrelerin sayısı, mono- ilişkili C3H / HeN ve C57Bl6 hayvanlarının aksine R. hominis tedavisi ile artmamıştır (Şek. 6E), (Şek. 5A).

**Tablo S6. R. hominis ile monokolonize TLR5 KO fareleri ile WT fareleri arasında çıkan kolondaki farklı olarak ifad edilen transkriptlerin immün sistem yanıt yolak analizi.** Farklı olarak ifade edilen genler ( $P < 0.05$ ) GeneGo MetaCore analitik yazılımına aktarılarak, her grupta belirgin şekilde zenginleştirilmiş kanonik yollar belirlenmiştir. \* Her bir haritada, spesifik tedavi karşılaştırmasında farklı olarak ifade edilen gen sayısı. \*\* Her bir haritada toplam gen sayısı.

| # | Haritalar                                                | P değeri | Oran |    |
|---|----------------------------------------------------------|----------|------|----|
| 1 | İmmün yanıtı_IL- 9 sinyalleşme yolağı                    | 0.00001  | 7    | 36 |
| 2 | İmmün yanıtı_Dendritik hücrelerde histamin sinyalleşmesi | 0.00008  | 7    | 50 |
| 3 | İmmün yanıtı_HMGB1/RAGE sinyalleşme yolağı               | 0.00012  | 7    | 53 |
| 4 | İmmün yanıtı_IL- 6 sinyalleşme yolağı                    | 0.00046  | 5    | 31 |
| 5 | İmmün yanıtı_Histamin immune yanıtında H1 reseptör       | 0.00052  | 6    | 48 |

|    |                                                                             |         |   |    |
|----|-----------------------------------------------------------------------------|---------|---|----|
|    | sinyalleşmesi                                                               |         |   |    |
| 6  | İmmün yanıtı_Oncostatin fare hücrelerinde MAPK aracılığıyla M sinyalleşmesi | 0.00082 | 5 | 35 |
| 7  | İmmün yanıtı_Oncostatin fare hücrelerinde MAPK aracılığıyla M sinyalleşmesi | 0.00107 | 5 | 37 |
| 8  | Sinyal transdüksiyonu_JNK yolağı                                            | 0.00191 | 5 | 42 |
| 9  | İmmün yanıtı_IL- 7, B lenfositlerde sinyalleşme                             | 0.00213 | 5 | 43 |
| 10 | IL- 6 ve IL- 1'in aracılık ettiği immün yanıtı sinyalleşme yolağı           | 0.00362 | 4 | 30 |
| 11 | Gelişim_GM- CSF sinyalleşmesi                                               | 0.00415 | 5 | 50 |
| 12 | İmmün yanıtı_T hücre reseptör sinyalleşme yolağı                            | 0.00492 | 5 | 52 |
| 13 | Kemotaksis_Lökosit kemotaksis                                               | 0.00528 | 6 | 75 |
| 14 | İmmün yanıtı_CCL2 sinyalleşmesi                                             | 0.00579 | 5 | 54 |
| 15 | İmmün yanıtı_CD28 sinyalleşmesi                                             | 0.00579 | 5 | 54 |
| 16 | NK hücrelerinde DAP12 reseptörlerinin immün yanıtı_rolü                     | 0.00579 | 5 | 54 |
| 17 | İmmün yanıtı_Fc epsilon RI yolağı                                           | 0.00626 | 5 | 55 |
| 18 | Stresle uyarılan antiviral hücre yanıtında PKR'nin immüh yanıtı_rolü        | 0.00728 | 5 | 57 |
| 19 | İmmün yanıtı_HMGB1, hücreden serbest kalma                                  | 0.01114 | 4 | 41 |
| 20 | İmmün yanıtı_IL- 15 sinyalleşmesi                                           | 0.01176 | 5 | 64 |
| 21 | cPLA2'nin immün yanıtı_HTR2A- uyarımlı aktivasyonu                          | 0.01313 | 4 | 43 |
| 22 | İmmün yanıtı_IL- 4 sinyalleşme yolağı                                       | 0.01421 | 4 | 44 |
| 23 | İmmün yanıtı_IL- 5 sinyalleşmesi                                            | 0.01421 | 4 | 44 |
| 24 | Makrofajlarda immün yanıtı_Fc gama R- aracılı fagositoz                     | 0.01653 | 4 | 46 |



|    |                                                            |         |   |    |
|----|------------------------------------------------------------|---------|---|----|
| 25 | İmmün yanıtı_NF- AT sinyalleşmesi ve lökosit etkileşimleri | 0.01653 | 4 | 46 |
| 26 | Gelişim_PEDF sinyalleşmesi                                 | 0.02043 | 4 | 49 |
| 27 | İmmün yanıtı_IL- 2 aktivasyonu ve sinyalleşme yolağı       | 0.02043 | 4 | 49 |
| 28 | İmmün yanıtında immune yanıtı_NFAT                         | 0.02332 | 4 | 51 |
| 29 | İmmün yanıtı_IL- 3 aktivasyonu ve sinyalleşme yolağı       | 0.02803 | 3 | 31 |
| 30 | İmmün yanıtı_BCR yolağı                                    | 0.02809 | 4 | 54 |
| 31 | İmmün yanıtı_TLR sinyalleşme yolakları                     | 0.02809 | 4 | 54 |
| 32 | İmmün yanıtı_İmmünolojik sinaps oluşturma                  | 0.03727 | 4 | 59 |
| 33 | İmmün yanıtı_Th17 hücre farklılaşması                      | 0.03836 | 3 | 35 |
| 34 | İmmün yanıtı_İnsan NKG2D sinyalleşmesi                     | 0.04722 | 3 | 38 |

TLR5KO'da değil, ancak geleneksel ve mikropsuz farelerde R. hominis'in Treg'leri etkilediği gözlemi, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>düzenleyici T hücrelerini destekleyen flagellin-  
5 TLR5 etkileşimlerinin raporları ile uyumludur (Crellin vd. 2005, Hossain ve ark. 2011). Benzer şekilde, bir flagellin-ovalbümin füzyon proteininin, bir IL- 10 bağımlı mekanizması yoluyla OVA- T- hücresi reseptör CD4 (+) T hücreleri tarafından IL- 4 üretimini bastırma kabiliyeti son zamanlarda  
10 tarif edilmiştir (Schulke ve ark. 2011), ki bu flagellinin T hücre alt gruplarının yönelimli farklılaşmasını etkileyebileceğini göstermiştir. Ek olarak, TLR5KO'nun, R. hominis tarafından yönlendirilen T hücresi yanıtları üzerindeki etkisi RH1'in (sinyalleme flagellini) RH2'ye  
15 (sinyal vermeyen flagellin) değil, Treg yanıtlarına aracılık etmede çok önemli olduğunu gösterir. Son olarak, ek bir

gözlem, Tip I IFN genlerinin TLR5KO farelerindeki (*Ifi202b*, *Ifi203* ve *Irf4*) artışıdır ve bu, TLR5 sinyalleşmesinin Tip I interferon yanıtlarını zayıflatabileceğini ortaya koymaktadır.

5 ***R. hominis* hem ileum hem de kolondaki doğal immün yanıt genlerini modüle eder ve DSS ile tedavi edilen farelerde koliti zayıflatır.**

DSS fare modeli, enflamatuar yolakların kontrolü ve mono ilişkili farelerde Treg indüksiyonu üzerindeki olumlu etkileri  
10 nedeniyle *R. hominis*'in terapötik etkinliğini test etmek için kullanılmıştır. Fareler 14 gün süreyle günlük olarak dozlanmış (~50 µL, 10<sup>9</sup>CFU) ve 8. günden itibaren içme suyuna DSS (MW 50kDa, 30g / l) verilmiştir. Pro- enflamatuar biyomarkörlerden oluşan bir panelin gen ifadesi, tedavi edilmemiş DSS  
15 farelerinin, doğal tip farelerle karşılaştırıldığında, araştırılan genlerin tümünde 4- 49 kat arasında değişen gen indüksiyonu ile birlikte güçlü bir yükselmeye sahip olduğunu göstermiştir (Şek. 7A). Pro- inflamatuvar gen indüksiyonu, tedavi edilmeyen farelere kıyasla *R. hominis* tedavi edilen  
20 farelerde anlamlı derecede daha düşüktür, bu da *R. hominis*'in oral uygulamasının güçlü terapötik yararlarına işaret eder. Histolojik analiz, tedavi edilmemiş DSS'nin çıkan kolonunda şiddetli enflamasyon varlığını göstermiştir; buna karşın *R. hominis* ile tedavi edilen hayvanların kolonik mukozası daha  
25 düşük seviyede enflamasyonla birlikte normal olmuştur, bu da azalan enflamatuar gen ifadesi ile uyumludur (Şek. 7B ve C).

***R. hominis* kolonizasyonu vücut bileşimini ve tokluk genlerinin ifadesini etkiler**

30 *R. hominis*'in önemli metabolik faaliyetleri mono ilişkili farelerde de belirgindir. 'Gıdaya yanıtın negatif düzenlenmesi' (GO: 0032096), 'iştahın negatif düzenlenmesi' (GO: 0032099) ve 'katekolamin salınımının düzenlenmesi' (GO: 0050433) GO proseslerinin tamamı *R. hominis* ile kolonizasyondan  
35 sonra artan oranda aşağı regüle edilmiştir (Şek. S5). Bu veri,

R. hominis'ın konak iştahında uyarıcı bir etki yaptığını gösterir. Bu süreçlerde yer alan genler 2- 12 arasındaki kat değişimleriyle birlikte *Agt*, *Cartpt*, *Cck* ve *Cxcl12*'dir. *Cck*, özellikle, açlık bastırıcı olarak sindirim ve doymamada önemli bir rol oynamaktadır. Gcg, bu bağırsak alanında da aşağı regülasyon sergilemiştir.

Bu gen değişikliklerinin gıda alımı ve vücut bileşimi ile ilişkili olarak fizyolojik açıdan uygun olup olmadığını belirlemek için kuru karkas ağırlığı ve bileşim analizleri yapılmıştır. R. hominis ilişkili farelerin kuru karkas ağırlıkları GF hayvanlarına kıyasla belirgin şekilde daha ağırdır ve farklılıklar en çok 14. günde fark edilmiştir (Şek. S6A). 14. Günde karkas lipid analizi, toplam adipozitenin aynı zamanda R. hominis ile tedavi edilen hayvanlarda önemli ölçüde yüksek olduğunu göstermiştir (Şek. S6B). Bu bulgular, diyet fermentasyonu yoluyla Firmicutes'in enerji hasadındaki rolünü ortaya çıkaran son verilerle tutarlıdır; aynı zamanda, bağırsak bakterilerinin beyin- bağırsak eksenini ve iştah düzenleyen hormonları modüle edebileceği fikrini desteklemektedir.

## **Tartışma**

Konak mikrop mutualizminin uzun vadeli birlikte evrimi muhtemelen diğer ekosistemlerde fazla temsil edilmeyen, bağırsaktaki işlevsel olarak önemli bakteri türlerinin seçimini yönlendirmiştir. Günümüzde, mukozal bağışıklık sisteminin geliştirilmesi ile bağlantılı olarak, mikrobiyal topluluğun bireysel üyelerinin bağırsak işlevlerine katkısı hakkında sınırlı bilgi bulunmaktadır.

Tersinir kolonizasyon modelini kullanarak yapılan son çalışmalar *E. coli* (HA 107) canlı bakterilerin IgA üzerinde bağışıklığı uyaran etkiler için içeriğin gramı başına  $10^8$  CFU'lara yaklaşan sayılarda gerekli olduğunu göstermiştir (Hapfelmeier vd. 2010). SFB ve *Bacteroides fragilis*'in özel işlevleri fare bağırsağında T hücresi biyolojisine bireysel

katkılarını tanımlamak için araştırılmış ve bu bakterilerin Treg ve Th17 hücrelerinin (Mazmanian) güçlü indükleyicileri olduğu gösterilmiştir vd. 2005, Gaboriau- Routhiau ve ark. 2009, İvanov vd. 2009). XIVA Firmicutes kümesi üyelerinin etkileri daha önce bildirilmemiştir, ancak ASF'deki varlığı ve aynı zamanda T hücre farklılaşmasını etkileyen 46 Clostridial suşun karışık bir kültürünün katkısı not edilmiştir (Geuking vd. 2011, Atarashi vd. 2011).

Burada, mikrop içermeyen fare bağırsağının, Firmicutes filum üyesi olan anaerobik bir *R. hominis* bakterisi ile ilk başarılı mono birliği olduğu bildirilmiştir. *Roseburia* gibi bakterilerin aşırı oksijen duyarlılığı katı anaerobik kültür teknikleri gerektirir, bu da işlevsel karakterizasyonun uygulanmasını zorlaştırır. *R. hominis*'in stabil mono kolonizasyonu mikropsuz farelerde sağlanmış ve bunun metabolik organizasyonunu, fizyolojisini ve simbiyotik özelliklerini ortaya çıkarmak için tam olarak açıklanmış genomik dizisi üretilmiştir. *R. hominis*'in transkripsiyonel yanıtlarının kolonizasyon sonrasında hem konak bağırsak ortamına hem de diyetle atfedilebileceği bulunmuştur. Konak tarafından yönlendirilen etkiler, tek birleşme sonrası *R. hominis*'in yanıtını domine etmiştir. Bunlar gen transferi, membran taşıma, kemotaksis ve motilite alt sistemlerini içerir. Mobilizasyon transferinde yer alan genlerin güçlü yukarı regülasyonu, bağırsak ortamının bağırsak mikrobiyotasının üyeleri arasındaki yatay gen alışverişine oldukça elverişli olduğu görüşünü desteklemektedir. Böylece, bu ortam, bağırsak ekosisteminde bakteri sağkalımı, kolonizasyon ve işlev için önemli genlerin yaygınlaşmasını hızlandırabilir. Konağın kolonizasyonunda motilite ve flagellar aygıt patojen bakteriler için iyi hazırlanmıştır ancak ortakçı bakterilerde flagellar proteinlerin rolü hakkında çok az şey bilinmektedir. *In vivo* deneyler, konak bağırsak ortamının flagellin genlerinin ifadesi üzerinde uyarıcı bir etkisi olduğunu ortaya koymuştur.

Bağırsak bariyer fonksiyonunun ve fare kolonunda doğuştan gelen bağışıklığın desteklenmesinde *R. hominis* için net bir rol belirlenmiştir. Sıkı kavşaklar, boşluk kavşakları ve yapışkan kavşaklar, bakteriyel translokasyonu alt epitel tabakaya sınırlamak için çalışırlar (Werth vd. 2010). Crohn hastalığı ve ülseratif kolit, bariyer fonksiyon kaybı ve sıkı kavşak bütünlüğü ile karakterizedir. İlginç bir şekilde, IBD'de bağırsak mikrobiyotasının disbiyozu Firmicutes'teki bir azalma ile ilişkilidir (Spor, Koren & Ley 2011, Qin vd. 2010).

*R. hominis*'in aktif bir şekilde bariyer genlerin ifadesini arttırmasına yönelik gözlem, IBD hastalarında kayıplarının işlevsel olarak anlamlı olabileceğini düşündürmektedir. Sıkı kavşak komplekslerinin harekete geçirilmesi, sadece *R. hominis*'in ayrıcalığı değildir, diğer ortakçılar, örneğin *Bacteroides thetaiotaomicron* ve *Lactobacillus acidophilus* de aynı zamanda insan IBD'sinde bu bakteriler ile probiyotik fırsatlar yaratarak mukozal bariyer fonksiyonunu arttırır (Hooper vd. 2001, Ukena vd. 2007).

*R. hominis*'in bağırsak bağışıklık sistemi üzerindeki etkileri merak uyandırıcıdır. En güçlü etkiler çıkan kolonda gözlenmiştir ve *Ly6g6c* gibi genler ve bunun yanı sıra T hücreleri aktivasyonunda ve efektör fonksiyonlarında rol oynayan, bağışıklık sinapsında T hücreleri düzenlenmesi ve farklılaşması ve aktin polimerizasyonu ile ilgili yolaklar güçlü bir şekilde yukarı regüle edilmiştir. En çok etkilenen T hücre yolakları, tamamı Treg farklılaşmasını destekleyen IL-10, ICOS ve CTLA-4 ile ilgili olanları içerir. Önemli bir şekilde, mikrop içermeyen farelerin ve *R. hominis* ile kolonize edilmiş geleneksel farelerin kolonlarındaki CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> + CD25<sup>+</sup> + FoxP3<sup>+</sup> hücrelerindeki belirgin artışlar, akış sitometrisi ve immünohistokimya kullanılarak gösterilmiştir. Bu bulgular, Treg farklılaşmasına neden olan diğer *Clostridium* türleri hakkındaki son verileri tamamlamaktadır. Açıkça, *R. hominis* tek bir bakteri türü olarak mukozal T hücre genişlemesini ve T hücre farklılaşmasını etkileyebilir.

Flagellin sinyalleri konak TLR5 reseptörleri tarafından algılanır ve birçok patojenik flagellin yapısı güçlü pro-enflamatuar yanıtlara neden olur (Hayashi vd. 2001). Yerleşik flagellalı ortakçılara yanıt olarak TLR5 aracılığıyla sinyalleşme, homeostaz için önemli olabilir, zira TLR5'in silinmesi farelerde spontan kolit ile sonuçlanır (Vijay- Kumar vd. 2007). *R. hominis* flagellin FlaA1'in (RH1) *in vivo* artan ifadesi ve epitelyal hücrelerin ve BMDC'lerin aktivasyonundaki gücü de büyük önem taşımaktadır. Diğer çalışmalar şunu göstermiştir: *E. coli* flagellin mutantları, muhtemelen TLR5 sinyalleşmesi ile doğuştan tanımanın bulunmaması nedeniyle doğal tip flagellalı suşlara kıyasla bir kolonizasyon avantajına sahiptir (De Paepe vd. 2011, Giraud vd. 2008). Burada bazı Firmicute'ler için, flagellinin ifadesi ya da muhtemelen yukarı regülasyonunun bağırsak kolonizasyonuna doğal bir cevap olduğu gösterilmiştir. *R. hominis* flagellin proteini *in vivo* ifade edilmiş olarak kalır ve sürekli kolonizasyon, bariz enflamasyon yokluğu ve düzenleyici fenotip T hücrelerinin genişlemesi ile korelasyon gösterir. SFB'de flagellin genlerinin son doğrulaması (Prakash vd. 2011, Sczesnak vd. 2011), bu bakteri tarafından indüklenen konak T hücre yanıtları ile ilişkili olabilir (Gaboriau- Routhiau vd. 2009, İvanov vd. 2009). İlginçtir ki RH1 hem epitelyal hem de DC kültürlerinde diğer flagellinlere kıyasla benzersiz bir etki yaratmıştır, ancak test edilen yapıların tümü, TLR5'e bağlanan ve bunu etkinleştiren flagellinler ile ilişkili korunan Arg90'a sahiptir (Yoon vd. 2012), bu da diğer dizisel / yapısal farklılıkların RH1 aracılı benzersiz sinyal yanıtlarını açıklayabileceğini düşündürmektedir. *R. hominis* tarafından indüklenen, Treg yanıtlarında flagellin- TLR5 sinyalleşmesinin önemi TLR5KO kullanılarak teyit edilmiştir. Teoriye bağlı kalmak istememekle birlikte, belirli ortakçı flagellin yapıları, CD103 + DC veya Treg alt gruplarında ifade edilen TLR5 yoluyla direkt olarak bağışıklık toleransı tepkilerine yardımcı olabilir (Flores- Langarica vd. 2012,

Kinnebrew vd. 2012, Crellin vd. 2005). Ayrıca, bütirat gibi diğer sinyal verme grupları bağışıklık toleransına katkıda bulunabilse de, *R. hominis* bağışıklık homeostatik etkisini DSS ile tedavi edilen farelerde doğrulamıştır. Bu veriler, IBD'de *R. hominis*'in potansiyel bir terapötik faydasını ortaya koyar.

*R. hominis* kolonizasyonunun ilginç bir ilave biyolojik etkisi, gıda ve iştah kontrolüne yanıtları etkileyen genlerin düzenlenmesidir. Özellikle, tokluk hormonları *Cck* ve *GCG* önemli ölçüde azalmıştır. Gıda alımı üzerine *Cck*'nin etkilerine bir vagal aferent yolağı aracılığıyla aracılık edilmiştir. Bu, yutulan besin maddeleri hakkındaki bilgilerin, hem bağırsak işlevini hem de beslenme davranışını etkilemek için merkezi sinir sistemine ulaştığı ana sinir yoludur. *Cck* iştah ve beslemeyi teşvik eden moleküllerin ifadesini azaltmak ve iştahı besleyen ve azaltan moleküllerin ifadesini artırmak için vagal sistem üzerinde etki eder (*Npy2r* ve *Cartpt*, her ikisi de bu çalışmada iki kat aşağı regüle edilmiştir). *Cck*, *GCG* ve ortakçı bakteriler arasında şu ana kadar rapor edilmiş bir bağlantı yoktur, ancak hem yağ asitleri hem de proteinler, *Cck* ve *GCG*'nin potansiyel uyarıcısıdır (Geraedts vd. 2010). *R. hominis* altı karbondan daha az alifatik kuyruklu bütirat gibi kısa zincirli yağ asitleri üretir; bu metabolik aktivitenin plazma üzerindeki uyarıcı etkiyi azalttığı bildirilmiştir. *Cck* daha uzun zincirli yağ asitleri ile gözlenmiştir (McLaughlin vd. 1999). Karkas ağırlık analizi, hem vücut ağırlığı hem de lipid içeriğinin *R. hominis* ile arttığını ortaya koymuştur, bu da mikropsuz farelerin gelenekselleştirilmesinde gözlenen vücut ağırlığı artışlarıyla tutarlıdır (Turnbaugh vd. 2006). Bunun, mevcut araştırmada görüldüğü gibi tokluk hormonlarının azaltılmasının direkt bir etkisi olup olmadığı, *Cck* ve *GCG* daha önce bildirilmediği için önümüzdeki dönemde görülecektir. Bununla birlikte, mikrobiyota kolonizasyonu ile diyetten enerji toplama arasındaki bir bağlantının SCFA'ların salınması yoluyla kısmen daha önce gösterildiğini kabul etmek önemlidir (Turnbaugh vd. 2006) (Tremaroli, Kovatcheva-Datchary &

Backhed 2010). *R. hominis*'in önemli bir bütirat üreticisi olduğu dikkate alındığında, bu mekanizmanın *R. hominis* tedavisini takiben aşağıdaki gözlemlenen metabolik etkinliğe katkıda bulunması olasıdır.

- 5 Özetle, fare bağırsağıyla mono- birlikteliği *R. hominis* ile murin bağırsağının mono- birlikteliği ortakçı bakteri adaptasyonu ve konak toleransı ile sonuçlanan güçlü iki yönlü gen ifadesi olaylarını indüklemiştir. Flagellin ürünü RH1, tercihen Treg'lerin genişlemesine neden olan benzersiz bir
- 10 sinyal etkisi sergiliyor gibi görünmektedir. TLR5'in Treg farklılaşmasını ve genişlemesini yönlendirmedeki önemi gösterilmiştir. Toplu olarak, bu veri, ortakçı flagellinlerin ilave fonksiyonelliği, TLR5 sinyalizasyonu ve mukozal T hücre yanıtının net yönünü vurgular.

15

### **Fonksiyonel Analizler**

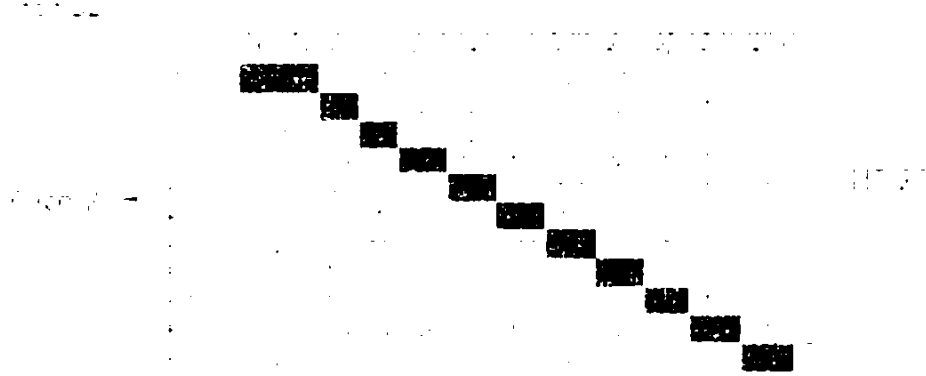
#### **In vitro Model**

#### **Bağırsak epitel hücrelerinin (IEC'lerin) farklı rekombinant flagellinlere yanıtının analizi.**

- 20 CCL20 gen (bir proenflamatuar gen) ifadesinin moleküler analizi Farklı rekombinant flagellinler (Şekil D.2) için IEC'lerin uyarılmasından sonra patojenik flagellinler (SE, ST, LF ve HM) benzer fakat aynı olmayan seviyelerde CCL20 mRNA uyarmış, ortakçı flagellinler çok daha değişken indüksiyon
- 25 seviyeleri sergilemiştir. *EREupacterium rectale* 33656), K12 (*Escherichia coli* K12), RH1 ve RI3 flagellinleri, patojenik flagellinlere benzer seviyelerde CCL20'yi indüklemiştir, RI1 ve RI4'ün ara uyarıcı aktivitesi olmuştur; RH2, HT- 29'da CCL20'nin düşük indükleyicisi olarak ortaya çıkmıştır ve Caco-
- 30 2 hücrelerinde agonistik potansiyelden yoksundur ve RI2 her iki hücre dizisinde de gözlemlenebilir bir aktiviteye sahip değildir. Sonuç olarak, buluş sahipleri (i) çok düşük immünostimülatör etkinliği olan veya hiç olmayanlar, (ii) orta derecede immünostimülatör etkinliğe sahip olanlar ve (iii)



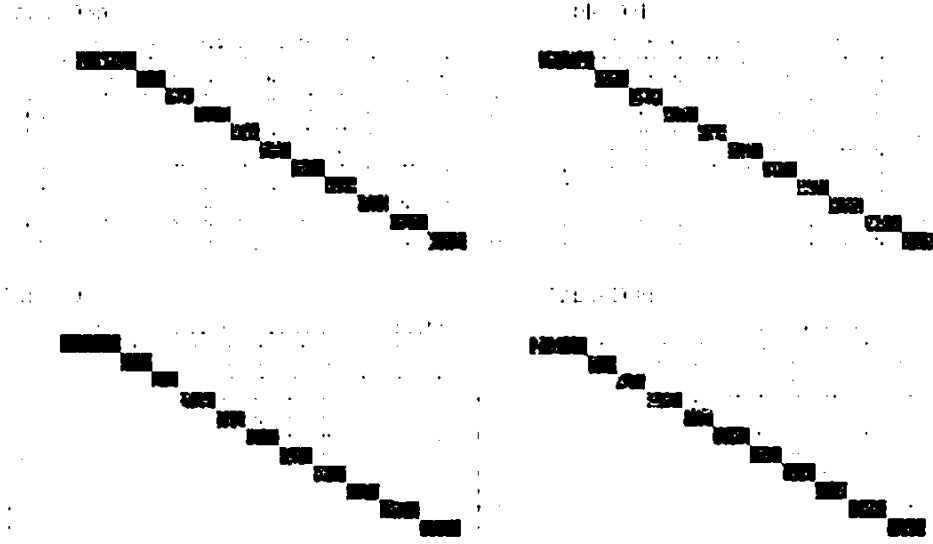
yüksek immüno­stimülatör etkinliğe sahip olanlar olmak üzere TLR5 agonistlerini üç kategoriye ayırmışlardır.



Tablo D2, HT- 29 (sağ üst) ve Caco- 2 (alt sol) arasında eşleştirilmiş t testi ile hesaplanan her bir tedavi arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir. Kullanılan T testleri, uyarılmamış hücrelere (unstim) verilen tedavileri karşılaştırmak için tek yönlü ve bir tedaviyi diğer NS ile karşılaştırmak için çift yönlüdür (anlamlı değil); \* (P <0.05); \*\* (p <0.01); \*\*\* (p <0.001).

Rekombinant flagellinlerin IEC'ler üzerindeki etkilerinin hücresel ve immünolojik analizi, salgılanan sitokinler, CXCL8, CXCL10 ve CCL2'nin (MCP- 1) ölçülmesi ile belirlenmiştir. IECS, rekombinant flagellinler ile 24 saat boyunca uyarılmıştır (Şekil D3).

Özellikle Caco- 2'de ST, SE, K12, ER, RI3 ve RH1 flagellinleri değişken fakat benzer seviyelerde IL- 8, IP- 10 ve MCP- 1 kemokinlerinin salınımını indüklemiştir, diğer taraftan RI1, RI2, RI4 ve RH2, özellikle Caco- 2 salgılanan kemokinlerin daha düşük miktarlarını indükleyerek TLR5'in düşük agonistleri olarak davranmıştır.



Tablolar D3a, D3b, D3c ve D3d, bağımsız t testiyle hesaplanan her bir tedavi arasında önemli farklılıkları gösterir. Tablo D3a ve D3b'nin sağ üst tarafı, IL- 8 için ve sol alt taraf IP- 10 için t değerlerini verir ve Tablo D3c ve D3d, MCP- 1 için t değerlerini verir. NS (anlamlı değil); \* (P <0.05); \*\* (p <0.01); ); \*\*\* (p <0.001).

Şekil D4'te gösterildiği gibi, TLR5'in bir anti- TLR5 spesifik antikor ile nötralizasyonu, flagellinin ortakçı veya patojenik orijininden bağımsız olarak, flagellin aracılı enflamatuar cevabı kaldırmıştır. Dolayısıyla, Caco- 2 hücrelerinde gözlenen flagellinin enflamasyon öncesi etkileri, TLR5 aktivasyonuna bağlıdır.

#### **Kemik iliği kaynaklı dendritik hücrelerin ve kültürlerin üretilmesi**

Kemik iliği, C3H / HeN ve C57Bl6 farelerinin femur ve tibialardan hasat edilmiştir. GMCSF'den türetilen dendritik hücreler için, kemik iliği hücreleri  $1 \times 10^6$ / mL % 10 FCS ve 20ng / mL rmGM- CSF ile takviye edilmiş RPMI içinde tekrar süspansiyon haline getirilmiş ve 10 mL / plakada 100 mm<sup>2</sup> doku kültürü plakalarında tohumlanmıştır. Üç gün kültürden sonra, gevşek yapışık hücreler toplanmış ve 12 kuyucuklu doku kültürü plakalarında  $1 \times 10^6$ / mL'de GM- CSF ile takviye edilmiş ortamla tekrar plakalanmıştır. 5. Günde, hücreler 6. günde hasat

edilmeden önce 100 ng / mL flagellinler ile uyarılmıştır. Flt3L'den türetilmiş dendritik hücreler için kemik iliği hücreleri % 10 FCS ve 200ng / mL rmFlt3 ile takviye edilmiş RPMI içinde  $2 \times 10^6$  / mL'de tekrar süspansiyon haline getirilmiş ve 12- kuyucuklu doku kültürü plakalarında 2 mL / kuyucukta tohumlanmıştır. Hücreler, 4. günde her kuyuya ilave edilen Flt3 ile takviye edilmiş ortam ile 10 gün boyunca kültürlenmiştir. 9. Günde, hücreler, 10. günde hasat edilmeden önce 100 ng / mL flagellin ile uyarılmış ve akış sitometrisi ile analiz edilmiştir.

Akış Sitometresi Rekombinant flagellinler ile uyarılan GM- CSF / IL- 4 türevi dendritik hücrelerin (Şekil D5) ve Flt3L'den türetilmiş dendritik hücrelerin (Şekil D6) analizi gerçekleştirilmiştir. Flagellin Rh1, GM- CSF / IL- 4'den türetilen dendritik hücrelerde hücre sel yanıtın indüklenmesinde en güçlü olanıdır; Ri4 ve Ri3, ortakçı flagellinler K12 ve Er'e ve patojenik flagellinler SE ve ST'ye benzer bir yanıtı sahiptir. Aksine, Rh2 ve Ri2, GM- CSF / IL- 4'ten türetilmiş dendritik hücrelerle hücre sel tepkiyi uyarmamıştır; ancak Flt3L'den türetilen dendritik hücrelere hücre sel tepkileri önemli ölçüde artırmıştır. Bu flagellinler ve özellikle Ri1, Flt3L'den türetilen dendritik hücrelerin aktivasyonu ile yanıtlarda fark yaratma kabiliyetleri açısından farklıdır. Bu yanıt, belirli dendritik hücrelerin alt kümelerine ait flagellinlerin özgüllüğünü belirtir. Bu Flt3L'den türetilmiş dendritik hücreler immünolojik toleransta önemli bir rol oynayan plasmositoid dendritik hücreler olarak sınıflandırılır.

### **In vivo Model**

*R. hominis* ve bunun flagellinlerinin fonksiyonel önemini değerlendirmek için BOY / J WT ve TLR5KO fareleri kullanılmıştır. Fareler, *R. hominis* ile kolonize edilmiştir. Hayvanlara ötenazi uygulanmış ve bağırsak dokusu örnekleme

yapılmıştır. Akış sitometrisi ile immünolojik analiz için ince bağırsak toplanmıştır.

5 T hücre popülasyonlarının, özellikle T düzenleyici (Treg) hücrelerinin ince bağırsak laminası propriasında flow sitometri analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 6A ve B). CD4 + T hücre popülasyonunda FoxP3 + CD25 + hücrelerinin yüzdesi, BOY / J WT farelerinde TLR5KO farelerine kıyasla anlamlı şekilde daha yüksek olmuştur. Bu şunu gösterir: R. hominis ve daha spesifik olarak flagellinler, CD4 + FoxP3 + CD25 +  
10 düzenleyici T hücrelerini teşvik ederek T reg'leri etkiler. Dolayısıyla, flagellinlerin, TLR5 etkileşimleri yoluyla konak immün yanıtını yönlendirmesinde önemli olduğu sonucuna varılabilir.

## 15 **Özet Maddeler**

Mevcut buluş istemlerde tanımlanmıştır. Kolaylık sağlamak için mevcut açıklamanın diğer yönleri burada numaralandırılmış maddeler vasıtasıyla sunulmuştur.

20 1. Bir deneğin bağışıklık sistemini düzenlemekte kullanım için *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia*  
25 flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücre.

30 2. Madde 1'e göre, bir deneğin adaptif bağışıklık sistemini düzenlemekte kullanım için *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi  
35 ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia*

flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücre.

5 3. Madde 1'e göre, bir deneğin doęuŗtan gelen baęıŗıklık sistemini düzenlemekte kullanım için *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi  
10 ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücre.

15 4. Bir deneğin baęıŗıklık hemeostazını korumakta kullanım için *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia*  
20 flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücre.

25 5. Bir denekte bir baęıŗıklık bozukluğunu tedavi etmekte kullanım için *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya  
30 *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücre.

6. Madde 5'e göre kullanım için *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücre olup, bağışıklık bozukluğu ülseratif kolit, kaşeksi, romatoid artrit de dahil olmak üzere diğer otoimmün bozukluklar, sedef hastalığı, multipl skleroz, çölyak hastalığı dahil alerjiler, atopik dermatit ve rinitten seçilir.

7. Bir denekte enflamatuvar bir bozukluk, bir immün bozukluk ve bir bağırsak bozukluğundan seçilen bir bozukluğu tedavi etmekte kullanım için *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücre.

8. Madde 7'ye göre kullanım için *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücre olup, bozukluk irritabl bağırsak sendromu (IBS), kolit, Crohn hastalığı ve ülseratif kolit gibi

enflamatuar barsak hastalığı (IBD), kese iltihabı, fonksiyonel dispepsi, fonksiyonel kabızlık, fonksiyonel diyare (antibiyotik bağlantılı ishal, turist ishali ve pediatrik diyare dahil), fonksiyonel karın ağrısı, 5 fonksiyonel şişkinlik, Epigastrik Ağrı Sendromu, Postprandiyal Distres Sendromu, gastrointestinal reflü hastalığı (GERD), şeker hastalığı, artrit, multipl skleroz ve sedef hastalığı gibi otoimmün hastalıklar, alerjiler, atopik hastalıklar örneğin atopik dermatit, 10 nekrotizan enterokolit, diğer enfeksiyonlar ve bunların kombinasyonlarından seçilir.

9. Bir denekte bağırsak mikrobiyotasını iyileştirmekte kullanım için *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) 15 ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya 20 adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücre.

10. Bir denekte iştahı düzenlemekte kullanım için *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya 25 FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı 30 geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücre.

11. Bir denekte bağırsak sağlığını desteklemekte kullanım için *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya 35 FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi

kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücre.

12. Bir deneğin bağışıklık sisteminde Tregs hücrelerini ve tolerans mekanizmalarını desteklemekte kullanım için *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücre.

13. Madde 1 ila 12'den herhangi birine göre kullanım için *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücre olup, en az bir mobilizasyon veya kemotaksis geninin uyarılmasını ve/ veya ifadesini düzenler.

14. Madde 13'e göre kullanım için *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre



ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücre olup, en az bir mobilizasyon veya kemotaksis genini yukarı regüle eder ve burada söz konusu gen *MobAve MobL*'den seçilir.

5 15. Önceki maddelerden herhangi birine göre kullanım için *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia*  
10 flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücre olup, *FlaA1*, *Fla2*, *FlaA3*, ve *FlaB*'den seçilen en az birini  
15 düzenler.

16. Önceki maddelerden herhangi birine göre kullanım için *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi  
20 kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücre  
25 olup, aşağıdakilerden en az birinin ifadesini düzenler. asetil- CoA asetiltransferaz, 3- hidroksiasil- CoA dehidrojenaz, butiril- CoA dehidrojenaz, elektron transfer flavoprotein beta alt- birimi, elektron transferi flavoprotein alfa alt- birimi.

30 17. Önceki maddelerden herhangi birine göre kullanım için *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia*  
35 flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini

kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücre olup, *Agt*, *Cartpt*, *Cck*, *Cxcl12* and *Gcg*'den seçilen en az

5

18. Önceki maddelerden herhangi birine göre kullanım için *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücre olup, kolon veya ileumda en az bir bağışıklık yanıtını aktive eder.

10

15

19. Önceki maddelerden herhangi birine göre kullanım için *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücre olup, T- hücre düzenlemesi ile ilişkili genlerin uyarılması ve/ veya ifadesini regüle ederek adaptif bağışıklık yanıtını aktive eder.

20

25

20. Önceki maddelerden herhangi birine göre kullanım için *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya vektör ve/

30

35

veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücre olup, çıkan kolonda *Ly6g6c* ve *Ly6g6e*'den seçilen en az bir genin ifadesini yukarı düzenler.

5 21. Önceki maddelerden herhangi birine göre kullanım için *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia*  
10 flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücre olup, *Tlr5*, *Tlr1*, *Vnn1*, *Defb37*, *Pla2g*, *Muc16*, *Itln*,  
15 *Sprrla*, *Cldn4*, *Pmp22*, *Crb3*, *Magi3*, *Marveld3*, *Mpp7*, *Defcr20*, *Pcgf2*, *Ltbp4*, *Igsf8* ve *Tcf2a*'dan seçilen en az bir geni düzenler.

22. Bir deneğin bağışıklık sistemini düzenlemek üzere bir ilacın hazırlanmasında kullanım için *Roseburia* (*Roseburia*  
20 *hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı  
25 geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücre.

23. Madde 22'ye göre, bir deneğin doğuştan gelen bağışıklık sistemini düzenlemek üzere bir ilacın  
30 hazırlanmasında kullanım için *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA22 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen  
35 *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi

ve/ veya vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücre.

24. Madde 22'ye göre, bir deneğin adaptif bağışıklık sistemini düzenlemek üzere bir ilacın hazırlanmasında kullanım için *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA22 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücre.

25. Bir denekte bağışıklık homeostazını korumak üzere bir ilacın hazırlanmasında kullanım için *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücre.

26. Bir denekte bir bağışıklık bozukluğunu tedavi etmek üzere bir ilacın hazırlanmasında kullanım için *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücre.

27. Bir deneğin bağışıklık sistemini düzenlemeye yönelik bir yöntem olup, söz konusu yöntem *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücreyi içeren bir bileşimin deneğe uygulanmasını içerir.

28. Bir deneğin doğuştan gelen bağışıklık sistemini aktive etmeye yönelik bir yöntem olup, söz konusu yöntem *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücreyi içeren bir bileşimin deneğe uygulanmasını içerir.

29. Bir deneğin adaptif bağışıklık sistemini aktive etmeye yönelik bir yöntem olup, söz konusu yöntem *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücreyi içeren bir bileşimin deneğe uygulanmasını içerir.

30. Bir denekte bir bağıışıklık bozukluğunu tedavi etmeye yönelik bir yöntem olup, söz konusu yöntem *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücrenin farmasötik olarak etkili bir miktarının deneğe uygulanmasını içerir.

31. Madde 1 ila 21'den herhangi birine göre kullanım için veya madde 27 ila 30'dan herhangi birine göre bir yöntem veya madde 22 ila 26'dan herhangi birine göre kullanım için *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücre olup, denek bir memelidir.

32. Tıpta kullanım için *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücre.

33. *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya

- FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücreyi ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir eksipiyan, taşıyıcı veya seyrelticiyi içeren farmasötik bir bileşim.
34. *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücreyi ve besinsel olarak kabul edilebilir bir eksipiyan, taşıyıcı veya seyrelticiyi içeren bir besin takviyesi.
35. *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücreyi içeren bir probiyotik bileşim.
36. *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini

kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücreyi içeren bir yem, gıda ürünü, diyet takviyesi, besin takviyesi veya gıda katkı maddesi.

37. Madde 32'ye göre farmasötik bir bileşim üretmek üzere bir proses olup, söz konusu proses *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücrenin ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir eksipiyen, taşıyıcı veya seyreltici ile karıştırılmasını içerir.

38. Madde 33'e göre farmasötik bir bileşim üretmek üzere bir proses olup, söz konusu proses *Roseburia* (*Roseburia hominis* , bakteri türleri veya *Roseburia intestinalis* bakteri türleri gibi) ve/ veya FlaA1 polipeptidi ve/ veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya *Roseburia* flagellin ve/ veya adı geçen *Roseburia* flagellini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/ veya adı geçen polinükleotit dizisini içeren bir vektör ve/ veya adı geçen vektörü içeren bir konak hücre ve/ veya söz konusu polinükleotit dizisini içeren konak hücrenin besinsel olarak kabul edilebilir bir eksipiyen, taşıyıcı veya seyreltici ile karıştırılması.

### **Özet Paragraflar**

Kolaylık sağlamak için mevcut açıklamanın diğer yönleri burada numaralandırılmış maddeler vasıtasıyla sunulmuştur.



1. Bir denekte bir dokunun veya bir organın enflamasyonunu modüle etmekte kullanım için polipeptit FlaAl veya sözü geçen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi.
- 5 2. Paragraf 1'e göre polipeptit veya polinükleotit, olup, burada adı geçen polipeptit veya polinükleotit doku veya organın enflamasyonunu azaltır.
3. Paragraf 2'ye göre polipeptit veya polinükleotit olup, burada sözü geçen polipeptit veya polinükleotit doku veya  
10 organın epitel hücreleri ile enflamasyonu azaltır.
4. Paragraf 3'e göre polipeptit veya polinükleotit olup, burada adı geçen epitelyal hücreler sindirim kanalının epitel hücreleridir.
5. Bir denekte T hücrelerinin üretiminin düzenlenmesinde  
15 kullanılmak üzere polipeptit FlaAl veya adı geçen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi olup, tercihen, polipeptit veya polinükleotit bir denekte T düzenleyici hücrelerin üretimini arttırır.
6. Polipeptit FlaAl veya sözü geçen polipeptidi kodlayan  
20 bir polinükleotit dizisi olup, immünolojik toleransın düzeltilmesinde kullanım içindir.
7. Polipeptit FlaAl veya adı geçen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi olup, bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde ve bir hastanın immünolojik toleransının  
25 geri kazanılmasında kullanım içindir.
8. Paragraf 7'ye göre polipeptit veya polinükleotit olup, bir kişinin adaptif bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde kullanım içindir.
9. Paragraf 7'ye göre polipeptit veya polinükleotit olup,  
30 bir deneğin doğuştan gelen bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde kullanım içindir.
10. Bir denekte bir bozukluğun tedavi edilmesi için polipeptit FlaAl veya sözü geçen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi olup, burada söz konusu bozukluk

enflamatuar bir bozukluk ve/ veya otoimmün bir bozukluktur.

11. Paragraf 10'a göre polipeptit veya polinükleotit olup, burada sözü edilen bozukluk, sözü edilen deneğin sindirim kanalını veya bunun bir bölümünü etkiler.

12. Paragraf 10'a göre polipeptit veya polinükleotit olup, söz konusu bozukluk romatoid artrit, sedef hastalığı, multipl skleroz, tip I diyabet, çölyak hastalığı, atopik dermatit, rinit, irritabl bağırsak sendromu (IBS), kolit, enflamatuar bağırsak bozukluğu (IBD), ülseratif kolit, kese iltihabı, Crohn hastalığı, fonksiyonel dispepsi, atopik hastalıklar, nekrotizan enterokolit ve bunların kombinasyonlarından seçilir.

13. Polipeptit FlaAl veya adı geçen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi olup, bir deneğin bir dokusunda veya bir organında dendritik hücrelerin ve/ veya epitelyal hücrelerin modülü edilmesinde kullanım içindir.

14. Paragraf 13'e göre polipeptit veya polinükleotit olup, burada adı geçen polipeptit veya polinükleotit dendritik hücreleri ve/ veya epitel hücreleri aktive eder.

15. Polipeptit FlaAl veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi olup, bir deneğin bir hücresindeki veya hücrelerindeki IL- 10 ve/ veya TGFβ üretiminin düzenlenmesinde kullanım içindir.

16. Paragraf 15'e göre polipeptit veya polinükleotit olup, burada IL- 10'un üretimi dendritik hücreler tarafından yapılır.

17. Paragraf 15 veya 16'ya göre polipeptit veya polinükleotit olup, söz konusu polipeptit veya polinükleotit, IL- 10 ve/ veya GFβ üretimini yukarı regüle eder.

18. Polipeptit FlaAl veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi olup, bir deneğin bir

hücresindeki veya hücrelerindeki CD40 ve/ veya I- A/I- E üretiminin düzenlenmesinde kullanım içindir.

19. Paragraf 18'e göre polipeptit veya polinükleotit olup, CD40 ve/ veya IA / IE üretiminin dendritik hücreler tarafından yapılmasıdır.

20. Paragraf 18 veya 19'a göre polipeptit veya polinükleotit olup, söz konusu polipeptit veya polinükleotit CD40 ve / veya I- A/I- E'nin üretimini yukarı regüle eder.

21. Polipeptit FlaAl veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi olup, bir deneğin bir hücresindeki veya hücrelerindeki bir veya daha fazla Tip I IFN geninin ifadesinin düzenlenmesinde kullanım içindir.

22. Polipeptit FlaAl veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi olup, bir deneğin bir hücresindeki veya hücrelerindeki bir veya daha fazla proenflamatuar genin ifadesinin düzenlenmesinde kullanım içindir.

23. Polipeptit FlaAl veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi olup, bir denekte bağırsak mikrobiyotasının iyileştirilmesinde kullanım içindir.

24. Polipeptit FlaAl veya adı geçen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi olup, bir denekte iştahı düzenlemekte kullanım içindir.

25. Paragraf 24'e göre polipeptit veya polinükleotit olup, burada adı geçen polipeptit veya polinükleotit denekte iştahı uyarır.

26. Paragraf 24 veya 25'e göre polipeptit veya polinükleotit olup, kolesistokinin (Cck) ve/ veya glukagon (Gcg) seviyesinin, bir deneğin kanında azalmasıdır.

27. Polipeptit FlaAl veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi olup, bir deneğin bir hücresinde veya hücrelerinde genin kolesistokinini (Cck) kodlayan

genin ifadesini ve/ veya bir glukagonu (Gcg) kodlayan genin ifadesini düzenlemede kullanım içindir.

28. Polipeptit FlaA1 veya söz konusu polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi olup, bir deneğin sindirim kanalı sağlığının iyileştirilmesinde kullanım içindir.

29. Paragraf 1 ila 28'den herhangi birine göre polipeptit veya polinükleotit, burada adı geçen polipeptit veya polinükleotit kapsülленir.

30. FlaA1 polipeptidini veya adı geçen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisini ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir eksipiyan, taşıyıcı veya seyrelticiyi içeren bir farmasötik bileşim.

31. Paragraf 30'a göre farmasötik bileşim olup, adı geçen polipeptit veya polinükleotit kapsülленir.

32. FlaA1 polipeptidini veya adı geçen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisini ve besinsel olarak kabul edilebilir bir eksipiyan, taşıyıcı veya seyrelticiyi içeren bir besin takviyesi.

33. Paragraf 32'ye göre besin takviyesi olup, burada adı geçen polipeptit veya polinükleotit kapsülленir.

34. FlaA1 polipeptidini veya adı geçen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisini içeren bir yem, gıda ürünü, diyet takvimi veya gıda katkı maddesi.

35. Paragraf 34'e göre yem, gıda ürünü, diyet takviyesi veya gıda katkı maddesi olup, bahsedilen yem, gıda ürünü, diyet takviyesi veya gıda katkı maddesi kapsülленir.

36. Paragraf 30'a göre bir farmasötik bileşimin üretilmesi için bir proses olup, bahsedilen proses, bahsedilen polipeptit veya polinükleotitin, farmasötik açıdan kabul edilebilir bir eksipiyan, taşıyıcı veya seyreltici ile kanştırılmasını içerir; isteğe bağlı olarak adı geçen polipeptit veya polinükleotit kapsülленir.

37. Paragraf 32'ye göre bir besin takviyesi üretmek için bir proses olup, bahsedilen proses, sözü edilen

polipeptit veya polinükleotidin besleyici olarak kabul edilebilir bir eksipiyan, taşıyıcı veya seyreltici ile karıştırılmasını içerir; isteğe bağlı olarak adı geçen polipeptit veya polinükleotit kapsüllenir.

5 38. Bir denekte bir doku veya organın enflamasyonunu modüle etmek için bir yöntem olup, sözü geçen yöntem deneğe söz konusu polipeptit FlaA1'in veya sözü edilen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisinin uygulanmasını içerir ve burada, deneğe ait doku veya  
10 organın enflamasyonu modüle edilir.

39. Bir denekte T hücrelerinin üretimini modüle etmek için bir yöntem, bahsedilen yöntem, söz konusu polipeptit FlaA1'in veya polipeptidi kodlayan polinükleotit dizisinin uygulanmasını içerir ve burada denekteki T  
15 hücrelerinin üretimi, özellikle T düzenleyici hücreler tarafından modüle edilir.

40. Bir deneğin bağışıklık sistemini düzenleyen bir yöntem olup, bahsedilen yöntem, söz konusu polipeptit FlaA1'in ve söz konusu polipeptidi kodlayan bir  
20 polinükleotit dizisinin uygulanmasını içerir ve deneğin bağışıklık sistemi düzenlenir.

41. Bir denekte bir bozukluğun tedavisine yönelik bir yöntem olup, bahsedilen yöntem, söz konusu polipeptidi kodlayan polipeptit FlaA1'in veya bir polinükleotit  
25 dizisinin uygulanmasını içerir; burada söz konusu bozukluk bir enflamatuar bozukluk ve/ veya bir otoimmün bozukluktur.

42. Bir denekte dendritik hücreleri ve/ veya epitel hücreleri modüle etmek için bir yöntem olup, sözü geçen  
30 yöntem, polipeptit FlaA1'in veya sözü edilen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisinin uygulanmasını içerir ve burada denekteki dendritik hücreler ve/ veya epitel hücreler modüle edilir.

43. Bir deneğin bir hücresindeki veya hücrelerindeki IL-  
35 10 ve/ veya TGF $\beta$  üretimini düzenleyen bir yöntem olup,

sözü edilen yöntem, polipeptit FlaA1'in veya adı geçen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisinin hastaya uygulanmasını içerir ve burada deneğin bir hücrelerinde veya hücrelerinde IL- 10 ve/ veya GFβ'nın üretimi düzenlenir.

44. Bir deneğin bir hücrelerindeki veya hücrelerindeki CD40 ve/ veya IA / IE üretimini düzenleyen bir yöntem olup, adı geçen yöntem, polipeptit FlaA1'in veya adı geçen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisinin hastaya uygulanmasını içerir ve burada bir deneğin hücrelerinde veya hücrelerinde CD40 ve/ veya IA / IE'nin üretimi düzenlenir.

45. Bir deneğin bir hücrelerinde veya hücrelerinde çok sayıda Tip I IFN geninden birinin ifadesini düzenleyen bir yöntem olup, adı geçen yöntem, polipeptit FlaA1'in veya adı geçen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisinin uygulanmasını içerir, burada bir deneğin hücrelerinde veya hücrelerinde çok sayıda Tip I IFN geninden birinin ifadesi düzenlenir.

46. Bir deneğin bir hücrelerindeki veya hücrelerindeki bir veya daha fazla pro- enflamatuar genin ifadesini düzenleyen bir yöntem olup, adı geçen yöntem, polipeptit FlaA1'in veya adı geçen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisinin uygulanmasını içerir, burada deneğin bir hücrelerinde veya hücrelerinde bir veya daha fazla pro- enflamatuar genin ifadesi düzenlenir.

47. Bir denekte bağırsak mikrobiyotasını iyileştirmeye yönelik yöntem olup, bahsedilen yöntem, polipeptit FlaA1'in veya adı geçen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisinin uygulanmasını içerir ve burada bir denekteki bağırsak mikrobiyotası iyileştirilir.

48. Bir denekte iştahı düzenlemek için bir yöntem olup, bahsedilen yöntem, polipeptit FlaA1'in veya adı geçen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisinin uygulanmasını içerir ve burada deneğin iştahı düzenlenir.

49. Bir deneğin bir hücresinde veya hücrelerinde kolesistokinini (Cck) kodlayan genin ifadesini ve/ veya glukagonu (Gcg) kodlayan genin ifadesini düzenleyen bir yöntem olup, bahsedilen yöntem, polipeptit FlaA1'in veya adı geçen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisinin uygulanmasını içerir ve burada bir deneğin hücresinde veya hücrelerinde kolesistokinini (Cck) kodlayan genin ifadesi ve/ veya glukagonu (Gcg) kodlayan genin ifadesi düzenlenir.
50. Bir denekte sindirim kanalı sağlığının iyileştirilmesi için bir yöntem olup, bahsedilen yöntem, polipeptit FlaA1'in veya adı geçen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisinin uygulanmasını içerir ve burada bir denekteki sindirim kanalı sağlığı iyileştirilir.
51. Bir denekte bir dokunun veya bir organın enflamasyonunu modüle etmekte kullanım için polipeptit FlaA1 veya sözü geçen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisi.
52. Bir denekte T hücrelerinin üretimini modüle etmek üzere bir ilacın üretiminde polipeptit FlaA1'in veya bahsedilen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisinin kullanılması.
53. Bir kişinin bağışıklık sistemini düzenlemek üzere bir ilacın üretiminde polipeptit FlaA1'in veya bahsedilen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisinin kullanılması.
54. Bir denekte bir bozukluğu tedavi etmek üzere bir ilacın üretiminde polipeptit FlaA1'in veya sözü edilen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisinin kullanımı, burada adı geçen bozukluk bir enflamatuvar bozukluk ve/ veya bir otoimmün bozukluktur.
55. Bir deneğin bir dokusunda veya organında dentritik hücreleri ve/ veya epitel hücreleri modüle etmek üzere bir ilacın üretiminde polipeptit FlaA1'in veya sözü

edilen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisinin kullanılması.

56. Bir deneğin bir hücreesindeki veya hücrelerindeki IL-10 ve/ veya TGF $\beta$  üretimini düzenlemek üzere bir ilacın üretiminde polipeptit FlaA1'in veya sözü edilen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisinin kullanılması.

57. Bir deneğin bir hücreesindeki veya hücrelerindeki CD40 ve/ veya IA / IE üretimini düzenlemek üzere bir ilacın üretiminde polipeptit FlaA1'in veya adı geçen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisinin kullanılması.

58. Bir hastanın bir hücreesindeki veya hücrelerindeki çok sayıda Tip I IFN geninden birinin ifadesini düzenlemek üzere bir ilacın üretiminde polipeptit FlaA1'in veya adı geçen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisinin kullanılması.

59. Bir deneğin bir hücreesindeki veya hücrelerindeki bir veya daha fazla pro- enflamatuar genin ifadesini düzenlemek üzere bir ilacın üretiminde polipeptit FlaA1 veya adı geçen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisinin kullanılması.

60. Bir denekte bağırsak mikrobiyotasını iyileştirmek üzere bir ilacın üretiminde polipeptit FlaA1 veya adı geçen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisinin kullanılması.

61. Bir denekte iştahı düzenlemek üzere bir ilacın üretiminde polipeptit FlaA1'in veya sözü edilen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisinin kullanılması.

62. Bir deneğin bir hücreesinde veya hücrelerinde kolesistokinini kodlayan genin (Cck) ve/ veya glukagonu (Gcg) kodlayan genin ifadesini düzenlemek üzere bir ilacın üretiminde polipeptit FlaA1'in veya bahsedilen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisinin kullanılması.



63. Bir denekte sindirim kanalı sağlığını iyileştirmek üzere bir ilacın üretiminde polipeptit FlaA1'in veya bahsedilen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisinin kullanılması.

5 64. Bir denekte immünolojik toleransı geri kazandırmak üzere bir ilacın üretiminde polipeptit FlaA1'in veya bahsedilen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisinin kullanılması.

10 65. Bir deneğe imünolojik toleransı geri kazandırmak için bir yöntem olup, bahsedilen yöntem, polipeptit FlaA1'in veya bahsedilen polipeptidi kodlayan bir polinükleotit dizisinin uygulanmasını içerir ve burada bir deneğe immünolojik tolerans geri kazandırılır.

## 15 **Referanslar**

- Aminov, R.I., Walker, A.W., Duncan, S.H., Harmsen, H.J., Welling, G.W. & Flint, H.J. 2006, "Molecular diversity, cultivation, and improved detection by fluorescent in situ hybridization of a dominant group of human gut bacteria related to Roseburia spp. or Eubacterium rectale", Applied and Environmental Microbiology, cilt. 72, no. 9, sayfa 6371- 6376.
- 20 Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., Taniguchi, T., Takeda, K., Hori, S., Ivanov, I.I., Umesaki, Y., Itoh, K. & Honda, K. 2011, "Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species", Science (New York, N.Y.), cilt 331, no. 6015, sayfa 337- 341.
- 25 Berg, D.J., Davidson, N., Kuhn, R., Muller, W., Menon, S., Holland, G., Thompson- Snipes, L., Leach, M.W. & Rennick, D. 1996, "Enterocolitis and colon cancer in interleukin- 10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1- like responses", The Journal of clinical investigation, cilt 98, no. 4, sayfa, 1010- 1020.
- 30

- Chung, H. & Kasper, D.L. 2010, "Microbiota- stimulated immune mechanisms to maintain gut homeostasis", *Current opinion in immunology*, cilt 22, no. 4, sayfa 455- 460.
- Crellin, N.K., Garcia, R.V., Hadisfar, O., Allan, S.E.,  
5 Steiner, T.S. & Levings, M.K. 2005, "Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells", *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), cilt 175, no. 12, sayfa 8051- 8059.
- 10 De Paepe, M., Gaboriau- Routhiau, V., Rainteau, D., Rakotobe, S., Taddei, F. & Cerf- Bensussan, N. 2011, "Trade- off between bile resistance and nutritional competence drives *Escherichia coli* diversification in the mouse gut", *PLoS genetics*, cilt 7, no. 6, sayfa e1002107.
- 15 Duck, L.W., Walter, M.R., Novak, J., Kelly, D., Tomasi, M., Cong, Y. & Elson, C.O. 2007, "Isolation of flagellated bacteria implicated in Crohn's disease", *Inflammatory bowel diseases*, cilt 13, no. 10, sayfa 1191- 1201.
- Duncan, S.H., Aminov, R.I., Scott, K.P., Louis, P., Stanton,  
20 T.B. & Flint, H.J. 2006, "Proposal of *Roseburia faecis* sp. nov., *Roseburia hominis* sp. nov. and *Roseburia inulinivorans* sp. nov., based on isolates from human faeces", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, cilt 56, no. Pt 10, sayfa 2437- 2441.
- 25 Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E. & Relman, D.A. 2005, "Diversity of the human intestinal microbial flora", *Science* (New York, N.Y.), cilt 308, no. 5728, sayfa 1635- 1638.
- 30 Flores- Langarica, A., Marshall, J.L., Hitchcock, J., Cook, C., Jobanputra, J., Bobat, S., Ross, E.A., Coughlan, R.E., Henderson, I.R., Uematsu, S., Akira, S. & Cunningham, A.F. 2012, "Systemic flagellin immunization stimulates mucosal CD103+ dendritic cells and drives Foxp3+ regulatory T CELL and  
35 IgA responses in the mesenteric lymph node", *Journal of*

immunology (Baltimore, Md.: 1950), cilt 189, no. 12, sayfa 5745- 5754.

Frank, D.N., StAmand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N. & Pace, N.R. 2007, "Molecular- phylogenetic  
5 characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, cilt 104, no. 34, sayfa 13780- 13785.

Gaboriau- Routhiau, V., Rakotobe, S., Lecuyer, E., Mulder, I.,  
10 Lan, A., Bridonneau, C., Rochet, V., Pisi, A., De Paepe, M., Brandi, G., Eberl, G., Snel, J., Kelly, D. & Cerf- Bensussan, N. 2009, "The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses", Immunity, cilt 31, no. 4, sayfa 677- 689.

15 Geraedts, M.C., Troost, F.J., Tinnemans, R., Soderholm, J.D., Brummer, R.J. & Saris, W.H. 2010, "Release of satiety hormones in response to specific dietary proteins is different between human and murine small intestinal mucosa", Annals of Nutrition & Metabolism, cilt 56, no. 4, sayfa 308- 313.

20 Geuking, M.B., Cahenzli, J., Lawson, M.A., Ng, D.C., Slack, E., Hapfelmeier, S., McCoy, K.D. & Macpherson, A.J. 2011, "Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses", Immunity, cilt 34, no. 5, sayfa 794- 806.

25 Giraud, A., Arous, S., De Paepe, M., Gaboriau- Routhiau, V., Bambou, J.C., Rakotobe, S., Lindner, A.B., Taddei, F. & Cerf- Bensussan, N. 2008, "Dissecting the genetic components of adaptation of Escherichia coli to the mouse gut", PLoS genetics, cilt 4, no. 1, sayfa e2. Hapfelmeier, S., Lawson,

30 M.A., Slack, E., Kirundi, J.K., Stoel, M., Heikenwalder, M., Cahenzli, J., Velykoredko, Y., Balder, M.L., Endt, K., Geuking, M.B., Curtiss, R., 3rd, McCoy, K.D. & Macpherson, A.J. 2010, "Reversible microbial colonization of germ- free mice reveals the dynamics of IgA immune responses", Science (New  
35 York, N.Y.), cilt 328, no. 5986, sayfa 1705- 1709.

- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M. & Aderem, A. 2001, "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll- like receptor 5", *Nature*, cilt 410, no. 6832, sayfa 1099- 1103.
- Hooper, L.V., Wong, M.H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P.G. & Gordon, J.I. 2001, "Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine", *Science* (New York, N. Y.), cilt 291, no. 5505, sayfa 881- 884.
- 10 Hossain, M.S., Jaye, D.L., Pollack, B.P., Farris, A.B., Tselanyane, M.L., David, E., Roback, J.D., Gewirtz, A.T. & Waller, E.K. 2011, "Flagellin, a TLR5 agonist, reduces graft-versus- host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients while enhancing antiviral
- 15 immunity", *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), cilt 187, no. 10, sayfa 5130- 5140.
- Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K. & Littman, D.R. 2009, "Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria", *Cell*, cilt 139, no. 3, sayfa 485- 498.
- 20 Kang, S., Denman, S.E., Morrison, M., Yu, Z., Dore, J., Leclerc, M. & McSweeney, C.S. 2010, "Dysbiosis of fecal microbiota in Crohn's disease patients as revealed by a custom phylogenetic microarray", *Inflammatory bowel diseases*, cilt 16, no. 12, sayfa 2034- 2042.
- 25 Kelly, D., Campbell, J.I., King, T.P., Grant, G., Jansson, E.A., Coutts, A.G., Pettersson, S. & Conway, S. 2004, "Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear- cytoplasmic shuttling of PPAR- gamma and RelA", *Nature immunology*, cilt 5, no. 1, sayfa 104- 112.
- 30 Kinnebrew, M.A., Buffie, C.G., Diehl, G.E., Zenewicz, L.A., Leiner, I., Hohl, T.M., Flavell, R.A., Littman, D.R. & Pamer, E.G. 2012, "Interleukin 23 production by intestinal

CD103(+)CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense", *Immunity*, cilt 36, no. 2, sayfa 276- 287.

Letran, S.E., Lee, S.J., Atif, S.M., Flores- Langarica, A.,  
5 Uematsu, S., Akira, S., Cunningham, A.F. & McSorley, S.J.  
2011, "TLR5- deficient mice lack basal inflammatory and metabolic defects but exhibit impaired CD4 T cell responses to a flagellated pathogen", *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), cilt 186, no. 9, sayfa 5406- 5412.

10 Machiels K., Joossens M., Sabino J., De Preter V., Arijs I., Ballet V., Claes K., Verhaegen J., Van Assche G., Rutgeerts P. & Vermeire S. 2013, "Predominant dysbiosis in patients with ulcerative colitis is different from Crohn's disease patients", *Inflammatory Bowel Diseases*. 8th Congress of ECCO,  
15 Feb 14- 16, 2013.

Macpherson, A.J. 2006, "IgA adaptation to the presence of commensal bacteria in the intestine", *Current topics in microbiology and immunology*, cilt 308, sayfa 117- 136.

Macpherson, A.J., Hunziker, L., McCoy, K. & Lamarre, A. 2001,  
20 "IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non- pathogenic microorganisms", *Microbes and infection/Institut Pasteur*, cilt 3, no. 12, sayfa 1021- 1035.

Macpherson, A.J., Martinic, M.M. & Harris, N. 2002, "The functions of mucosal T cells in containing the indigenous  
25 commensal flora of the intestine", *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, cilt 59, no. 12, sayfa 2088- 2096.

Mahowald, M.A., Rey, F.E., Seedorf, H., Turnbaugh, P.J., Fulton, R.S., Wollam, A., Shah, N., Wang, C., Magrini, V., Wilson, R.K., Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Henrissat, B.,  
30 Crock, L.W., Russell, A., Verberkmoes, N.C., Hettich, R.L. & Gordon, J.I. 2009, "Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, cilt 106, no. 14, sayfa 5859- 5864.

- Mallya, M., Campbell, R.D. & Aguado, B. 2006, "Characterization of the five novel Ly- 6 superfamily members encoded in the MHC, and detection of cells expressing their potential ligands", *Protein science : a publication of the Protein Society*, cilt 15, no. 10, sayfa 2244- 2256.
- Mazmanian, S.K., Liu, C.H., Tzianabos, A.O. & Kasper, D.L. 2005, "An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system", *Cell*, cilt 122, no. 1, sayfa 107- 118.
- 10 McLaughlin, J., Grazia Luca, M., Jones, M.N., D'Amato, M., Dockray, G.J. & Thompson, D.G. 1999, "Fatty acid chain length determines cholecystokinin secretion and effect on human gastric motility", *Gastroenterology*, cilt 116, no. 1, sayfa 46- 53.
- 15 Monteleone, I., Platt, A.M., Jaensson, E., Agace, W.W. & Mowat, A.M. 2008, "IL- 10- dependent partial refractoriness to Toll- like receptor stimulation modulates gut mucosal dendritic cell function", *European journal of immunology*, cilt 38, no. 6, sayfa 1533- 1547. Nutsch, K.M. & Hsieh, C.S. 2012,
- 20 "T cell tolerance and immunity to commensal bacteria", *Current opinion in immunology*, cilt 24, no. 4, sayfa 385- 391.
- Prakash, T., Oshima, K., Morita, H., Fukuda, S., Imaoka, A., Kumar, N., Sharma, V.K., Kim, S.W., Takahashi, M., Saitou, N., Taylor, T.D., Ohno, H., Umesaki, Y. & Hattori, M. 2011,
- 25 "Complete genome sequences of rat and mouse segmented filamentous bacteria, a potent inducer of th17 cell differentiation", *Cell host & microbe*, cilt 10, no. 3, sayfa 273- 284.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S.,
- 30 Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E., Renault, P.,
- 35 Sicheritz- Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S.,

Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Dore, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., MetaHIT Consortium, Bork, P., Ehrlich, S.D. & Wang, J. 2010, "A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing", *Nature*, cilt 464, no. 7285, sayfa 59- 65.

Round, J.L., Lee, S.M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., Chatila, T.A. & Mazmanian, S.K. 2011, "The Toll- like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota", *Science (New York, N.Y.)*, cilt 332, no. 6032, sayfa 974- 977.

Scanlan, P.D., Shanahan, F., O'Mahony, C. & Marchesi, J.R. 2006, "Culture- independent analyses of temporal variation of the dominant fecal microbiota and targeted bacterial subgroups in Crohn's disease", *Journal of clinical microbiology*, cilt 44, no. 11, sayfa 3980- 3988.

Schulke, S., Burggraf, M., Waibler, Z., Wangorsch, A., Wolfheimer, S., Kalinke, U., Vieths, S., Toda, M. & Scheurer, S. 2011, "A fusion protein of flagellin and ovalbumin suppresses the TH2 response and prevents murine intestinal allergy", *The Journal of allergy and clinical immunology*, cilt 128, no. 6, sayfa 1340- 1348.e12.

Sczesnak, A., Segata, N., Qin, X., Gevers, D., Petrosino, J.F., Huttenhower, C., Littman, D.R. & Ivanov, I.I. 2011, "The genome of th17 cell- inducing segmented filamentous bacteria reveals extensive auxotrophy and adaptations to the intestinal environment", *Cell host & microbe*, cilt 10, no. 3, sayfa 260- 272.

Spor, A., Koren, O. & Ley, R. 2011, "Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome", *Nature reviews.Microbiology*, cilt 9, no. 4, sayfa 279- 290.

Tremaroli, V., Kovatcheva- Datchary, P. & Backhed, F. 2010, "A role for the gut microbiota in energy harvesting?", *Gut*, cilt 59, no. 12, sayfa 1589- 1590.

- Turnbaugh, P.J., Backhed, F., Fulton, L. & Gordon, J.I. 2008, "Diet- induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome", *Cell host & microbe*, cilt 3, no. 4, sayfa 213- 223.
- 5 Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R. & Gordon, J.I. 2006, "An obesity- associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest", *Nature*, cilt 444, no. 7122, sayfa 1027- 1031.
- Ukena, S.N., Singh, A., Dringenberg, U., Engelhardt, R.,  
 10 Seidler, U., Hansen, W., Bleich, A., Bruder, D., Franzke, A., Rogler, G., Suerbaum, S., Buer, J., Gunzer, F. & Westendorf, A.M. 2007, "Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity", *P/oS one*, cilt 2, no. 12, sayfa e1308.
- 15 Vijay- Kumar, M., Sanders, C.J., Taylor, R.T., Kumar, A., Aitken, J.D., Sitaraman, S.V., Neish, A.S., Uematsu, S., Akira, S., Williams, I.R. & Gewirtz, A.T. 2007, "Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice", *The Journal of clinical investigation*, cilt 117, no. 12, sayfa 3909- 3921.
- 20 Werth, M., Walentin, K., Aue, A., Schonheit, J., Wuebken, A., Pode- Shakked, N., Vilianovitch, L., Erdmann, B., Dekel, B., Bader, M., Barasch, J., Rosenbauer, F., Luft, F.C. & Schmidt- Ott, K.M. 2010, "The transcription factor grainyhead- like 2 regulates the molecular composition of the epithelial apical  
 25 junctional complex", *Development (Cambridge, England)*, cilt 137, no. 22, sayfa 3835- 3845.
- Wilson, R.H., Maruoka, S., Whitehead, G.S., Foley, J.F., Flake, G.P., Sever, M.L., Zeldin, D.C., Kraft, M., Garantziotis, S., Nakano, H. & Cook, D.N. 2012, "The Toll-  
 30 like receptor 5 ligand flagellin promotes asthma by priming allergic responses to indoor allergens", *Nature medicine*, cilt 18, no. 11, sayfa 1705- 1710.
- Yoon, S.I., Kurnasov, O., Natarajan, V., Hong, M., Gudkov, A.V., Osterman, A.L. & Wilson, I.A. 2012, "Structural basis of

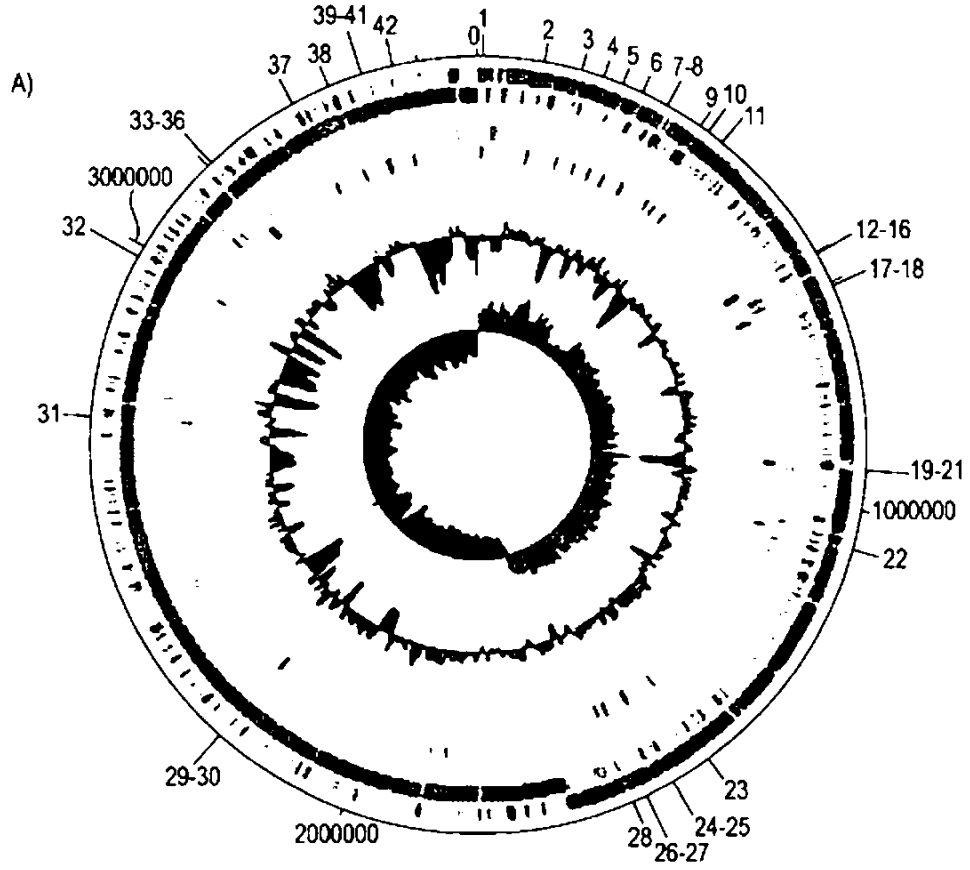


TLR5- flagellin recognition and signaling", Science (New York, N.Y.), cilt 335, no. 6070, sayfa 859- 864.

### **Ek bilgi için referans listesi**

- 5 (1) Genome sequence assembly using trace signals and additional sequence information. Computer Science and Biology: Proceedings of the German Conference on Bioinformatics (GCB); 1999.
- (2) Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards  
10 RA, et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. BMC Genomics 2008 Feb 8;9:75- 2164- 9- 75.
- (3) Dennis G,Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, et al. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. Genome Biol 2003;4(5):P3.
- 15 (4) Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. Nucleic Acids Res 2007 Jul;35(Web Server issue):W71-4.
- (5) Duck LW, Walter MR, Novak J, Kelly D, Tomasi M, Cong Y, et  
20 al. Isolation of flagellated bacteria implicated in Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis 2007 Oct;13(10):1191- 1201.
- (6) Berg DJ, Davidson N, Kuhn R, Muller W, Menon S, Holland G, Thompson- Snipes L, Leach MW, Rennick D. Enterocolitis and colon cancer in interleukin- 10- deficient mice are associated  
25 with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1- like responses. J.Clin.Invest., 1996, 98, 4, 1010- 1020.
- (7) Monteleone I, Platt AM, Jaensson E, Agace WW, Mowat AM. IL- 10- dependent partial refractoriness to Toll- like receptor stimulation modulates gut mucosal dendritic cell  
30 function. Eur J Immunol. 2008 38(6): 1533- 47
- (8) Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony- stimulating factor. J Exp Med  
35 1992 Dec 1;176(6):1693- 1702.

- (9) Brasel K, De Smedt T, Smith JL, Maliszewski CR. Generation of murine dendritic cells from flt3- ligand- supplemented bone marrow cultures. *Blood* 2000 Nov 1;96(9):3029- 3039.
- (10) Weigel BJ, Nath N, Taylor PA, Panoskaltsis- Mortari A,  
5 Chen W, Krieg AM, et al. Comparative analysis of murine marrow- derived dendritic cells generated by Flt3L or GM-CSF/IL- 4 and matured with immune stimulatory agents on the in vivo induction of antileukemia responses. *Blood* 2002 Dec 1;100(12):4169- 4176.
- 10 (10) Xu Y, Zhan Y, Lew AM, Naik SH, Kershaw MH. Differential development of murine dendritic cells by GM- CSF versus Flt3 ligand has implications for inflammation and trafficking. *J Immunol* 2007 Dec 1;179(11):7577- 7584.
- (12) Olivera L, Canul RR, Pereira- Pacheco F, Cockburn J,  
15 Soldani F, McKenzie NH, et al. Nutritional and physiological responses of young growing rats to diets containing raw cowpea seed meal, protein isolate (globulins), or starch. *J Agric Food Chem* 2003 Jan 1;51(1):319- 325.



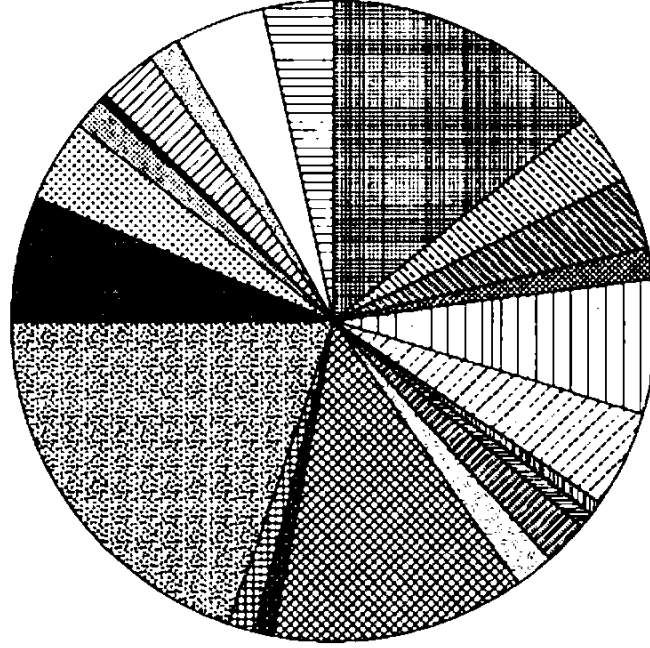
ŞEKİL 1

## A t S stem N te k Sayım arı

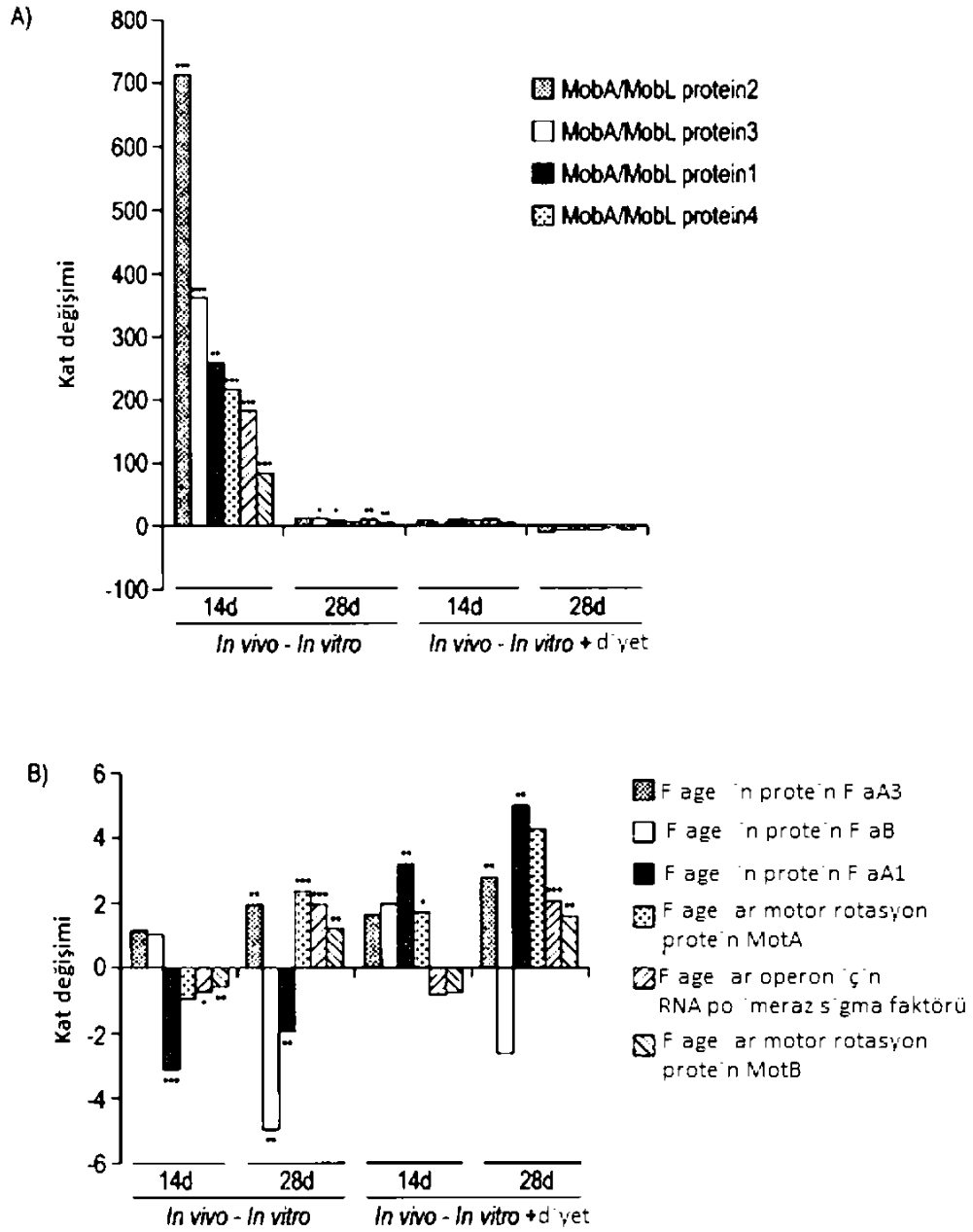
- Kofaktörler, vitaminler, prostetik gruplar, pigmentler (91)
- Hücre duvarı ve kapsülü (57)
- Virüs, hastalık ve savunma (22)
- Potasyum metabolizması (7)
- Fotosentez (36)
- Muhtelif (36)
- Fajlar, profajlar, dönüştürülebilir emanar, plazmidler (0)
- Membran taşıması (24)
- Demir kazanımı ve metabolizması (0)
- RNA metabolizması (61)
- Nükleotitler ve nükleotidler (50)
- Protein metabolizması (197)
- Hücre bölünmesi ve hücre döngüsü (50)
- Motilité ve kemotaksis (49)
- Regülasyon ve hücre sinyalleşmesi (20)
- Sekonder metabolizma (0)
- DNA metabolizması (97)
- Yağ asitler, lipidler ve izoprenoidler (66)
- Azot metabolizması (12)
- Dormansiyel sporülasyon (12)
- Soğuk (29)
- Stres yanıtı (29)
- Aromatik bileşiklerin metabolizması (2)
- Amnolytler ve türevler (175)
- Kükürt metabolizması (11)
- Fosfor metabolizması (19)
- Karbonhidratlar (271)

## A t s stem kategorı dağılımı

B)

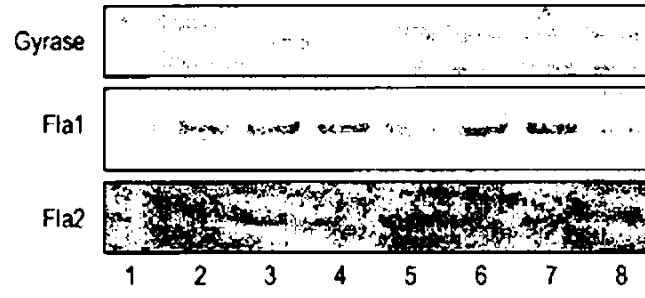


ŞEKİL 1

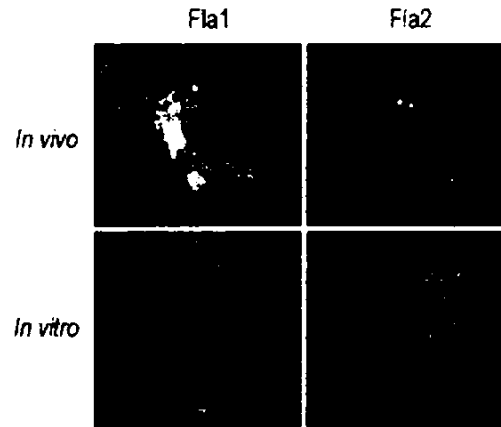


ŞEKİL 2

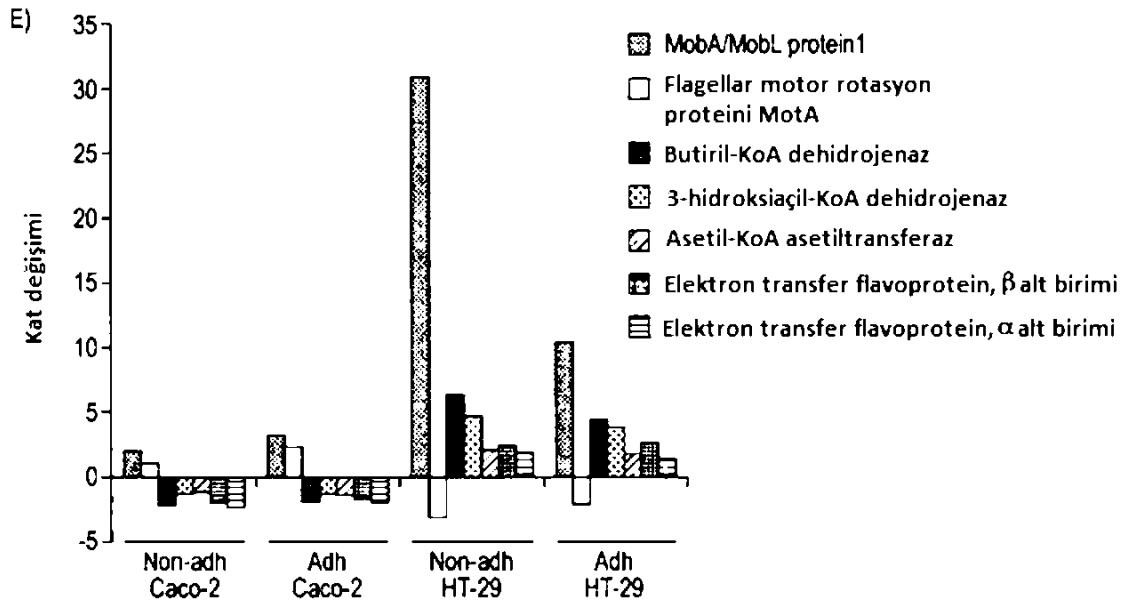
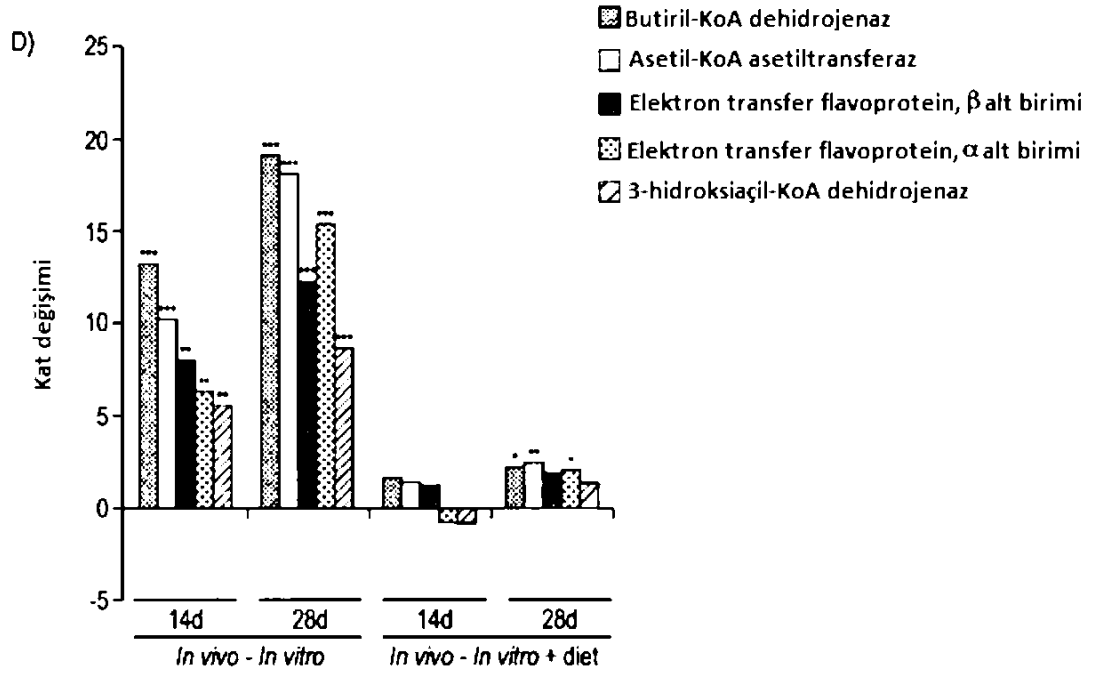
C)



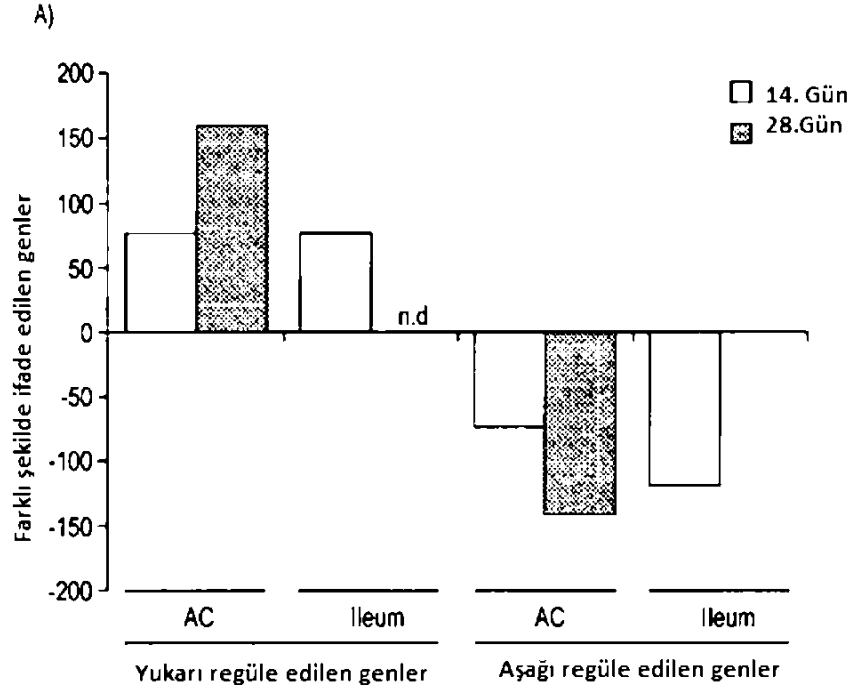
R. hominis (EM)



ŞEKİL 2

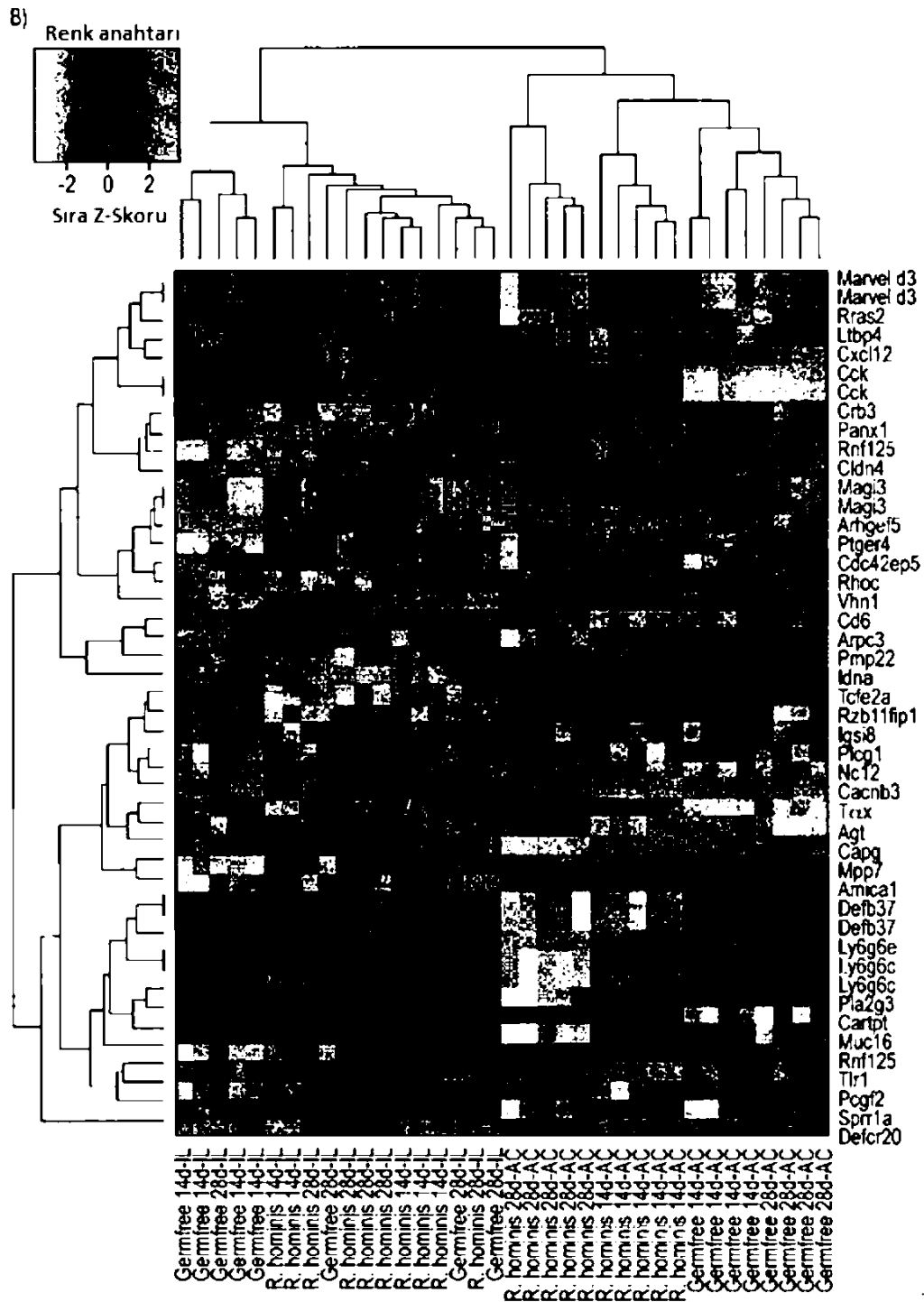


ŞEKİL 2

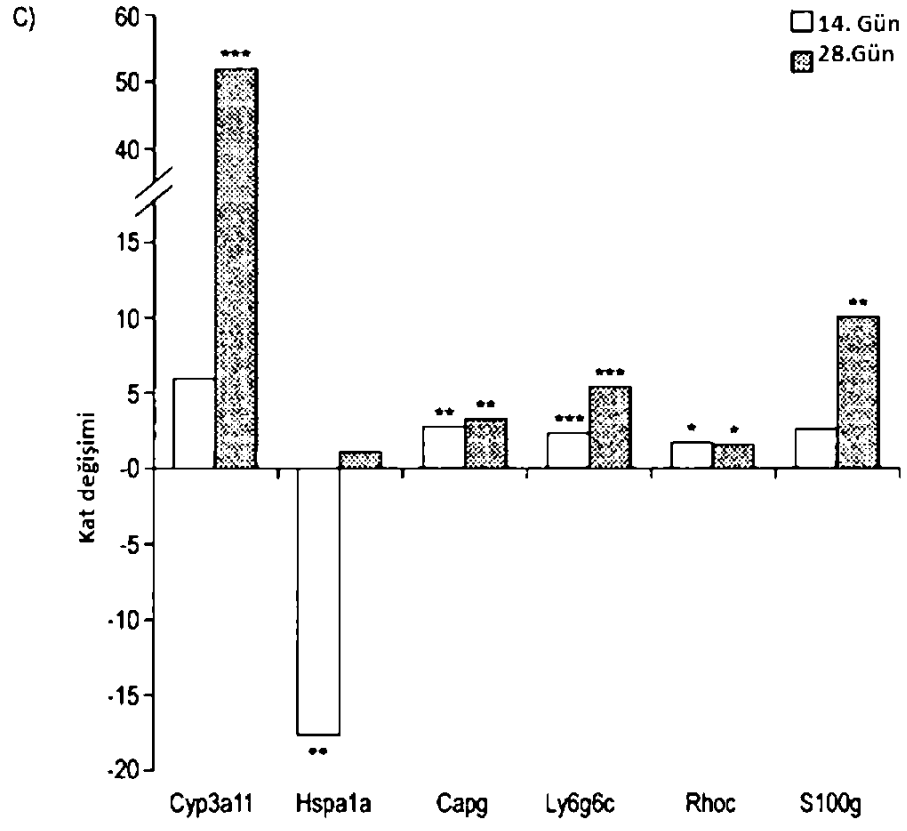


ŞEKİL 3



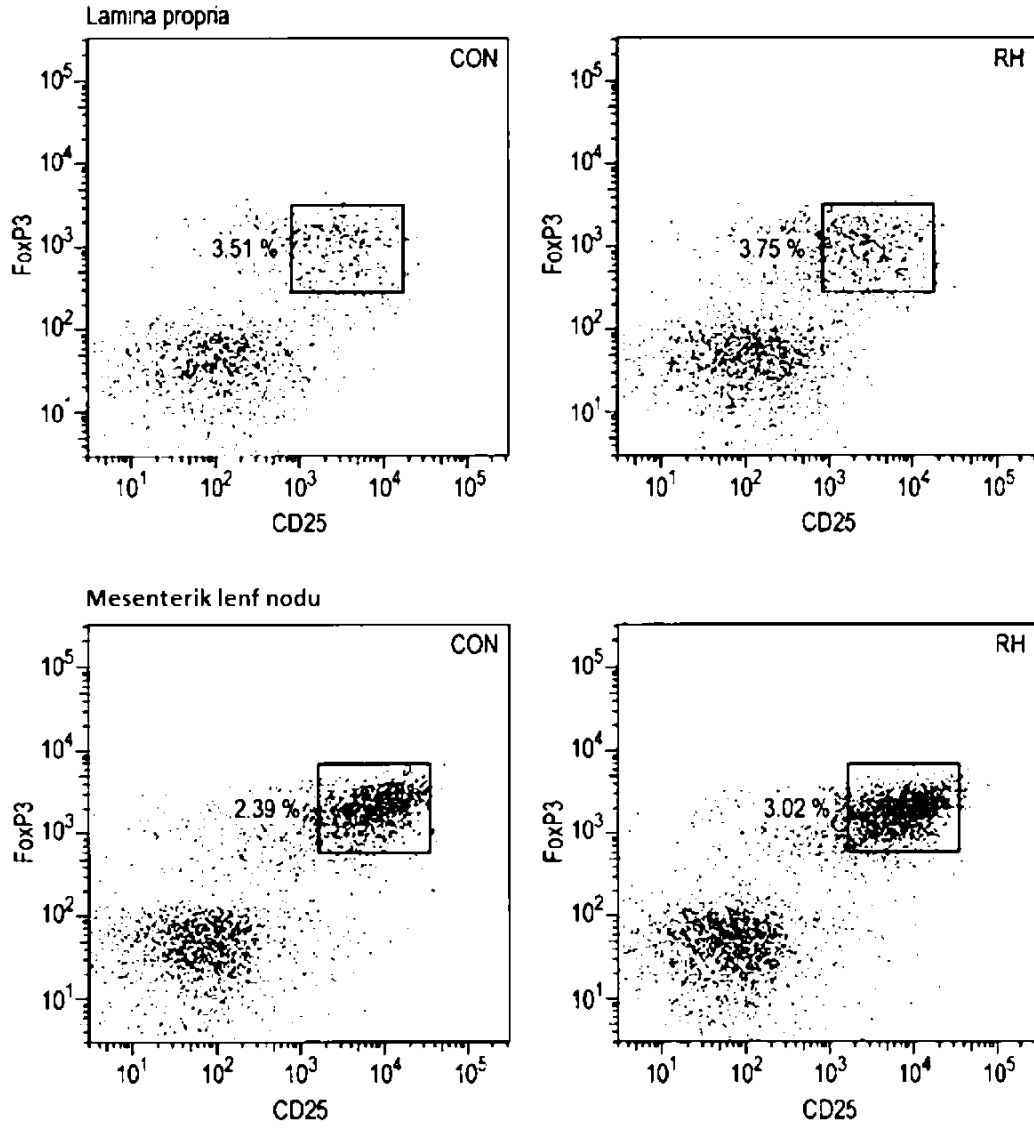


### ŞEKİL 3

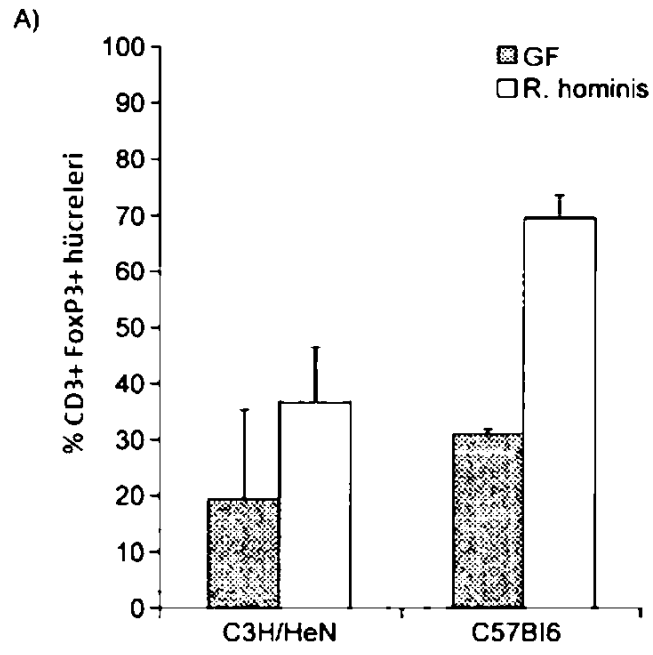


ŞEKİL 3

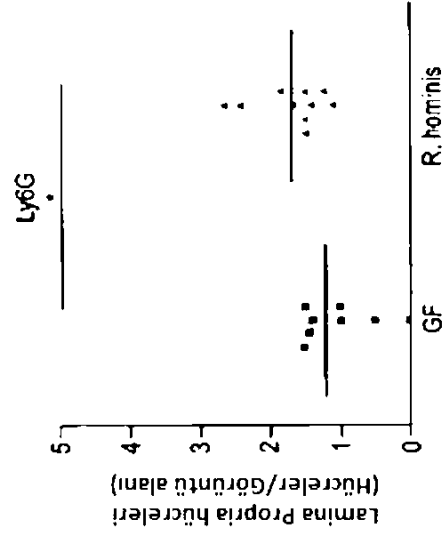
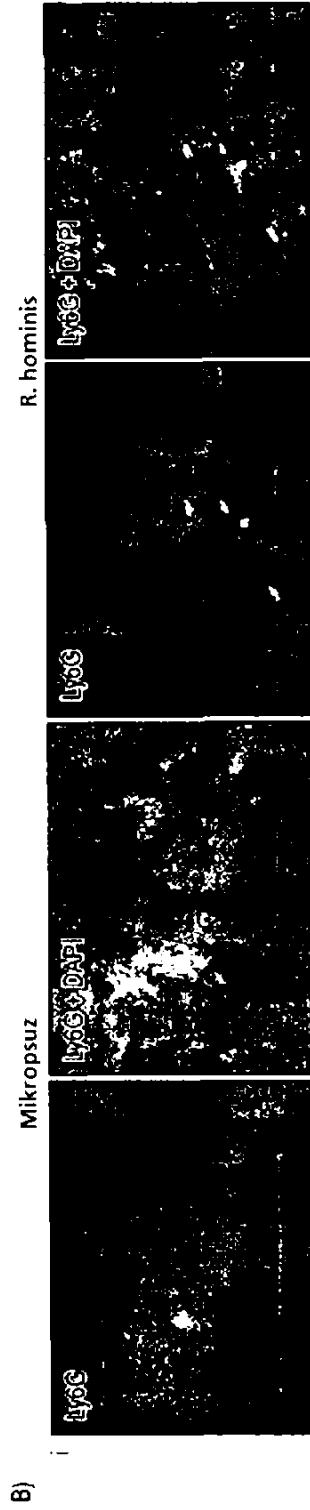
Canlı, singletler, lenfositler, B220- CD3+ CD8- CD4+ alt takımına kapılanan



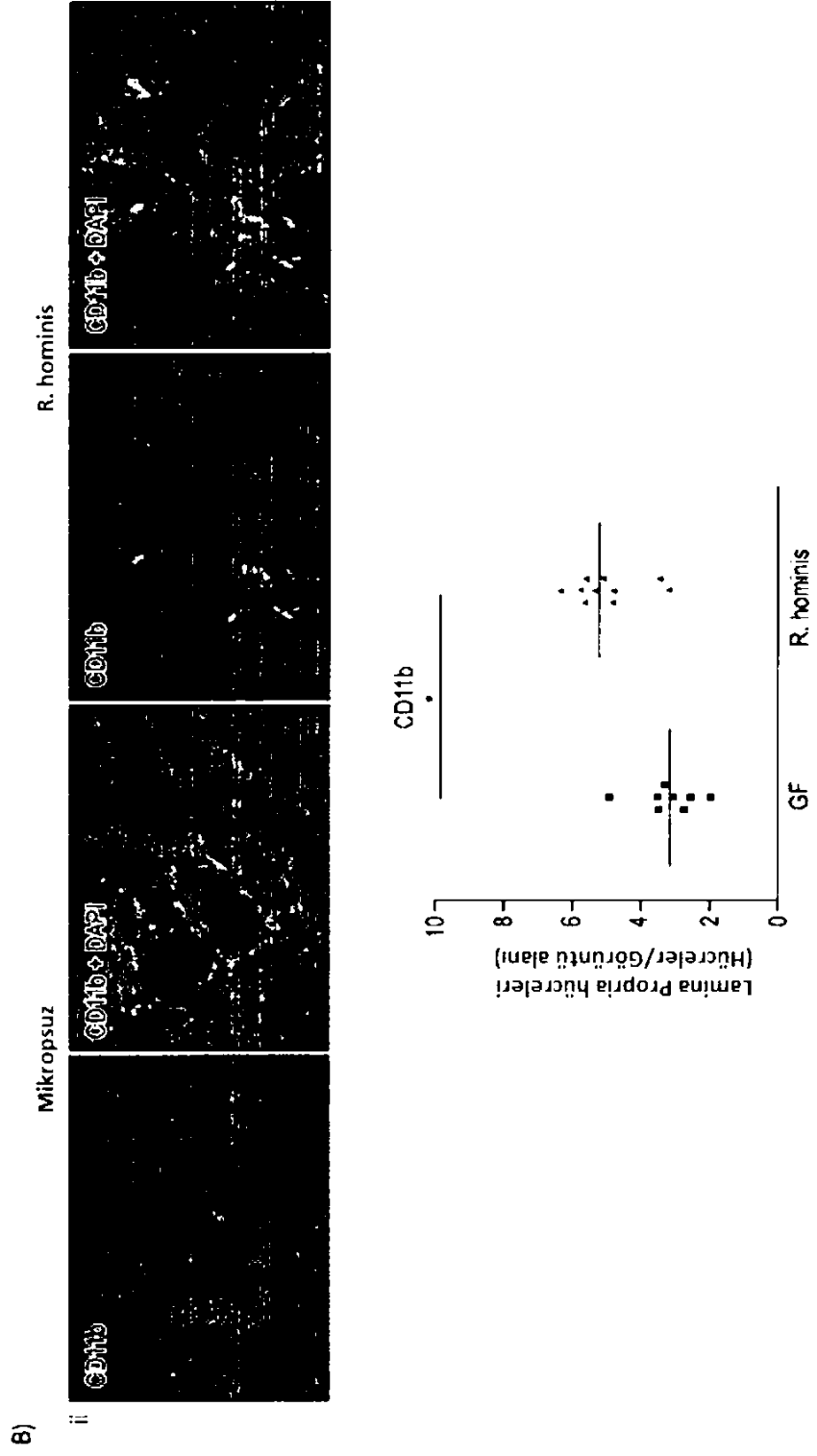
ŞEKİL 4



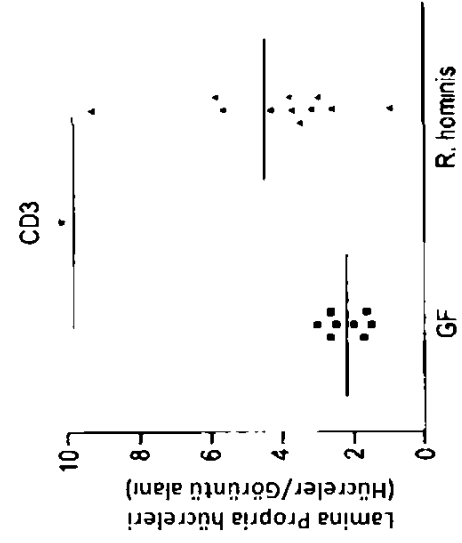
ŞEKİL 5



ŞEKİL 5



b)

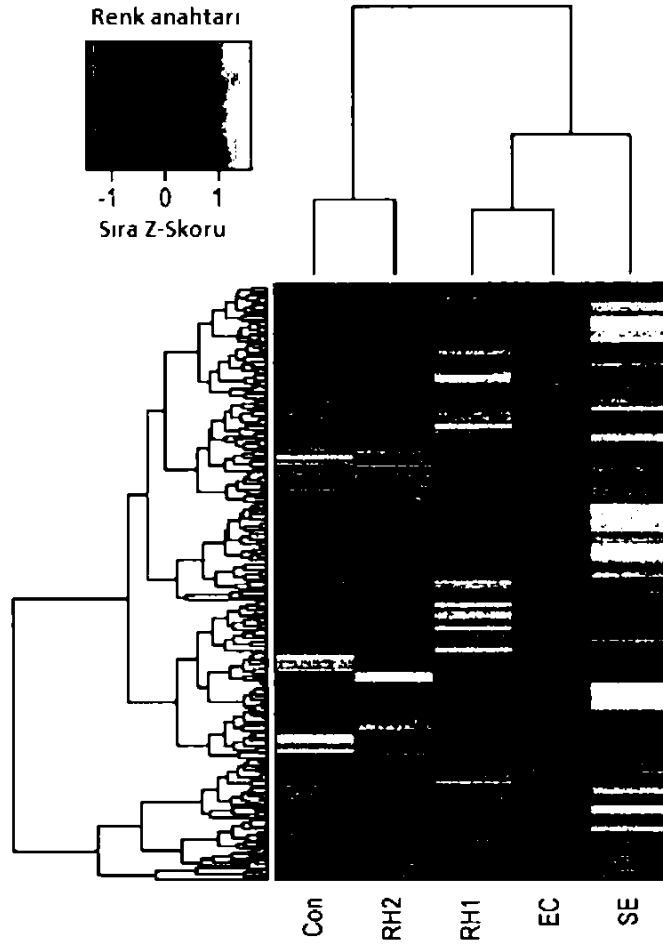


ŞEKİL 5

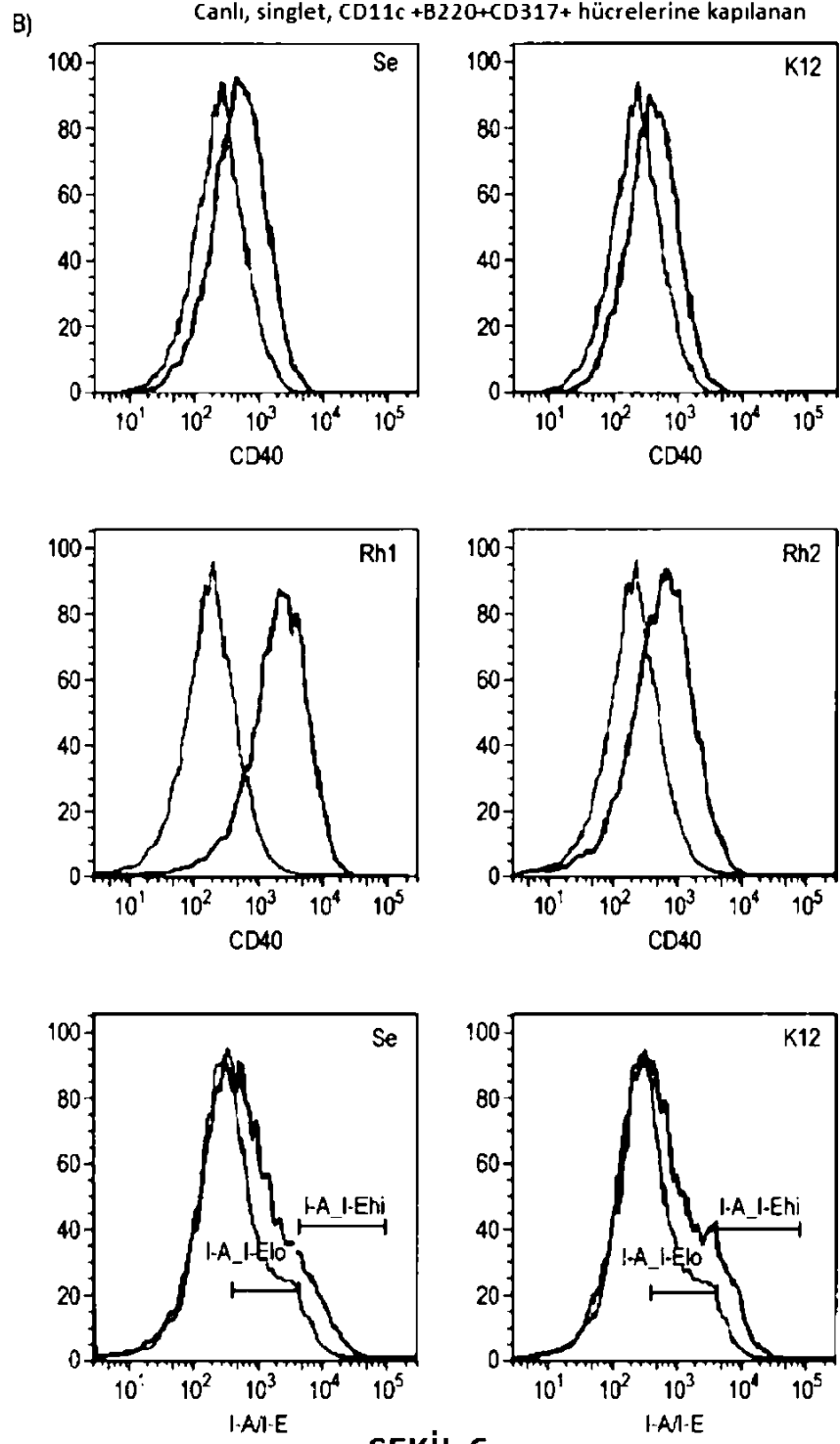




A)

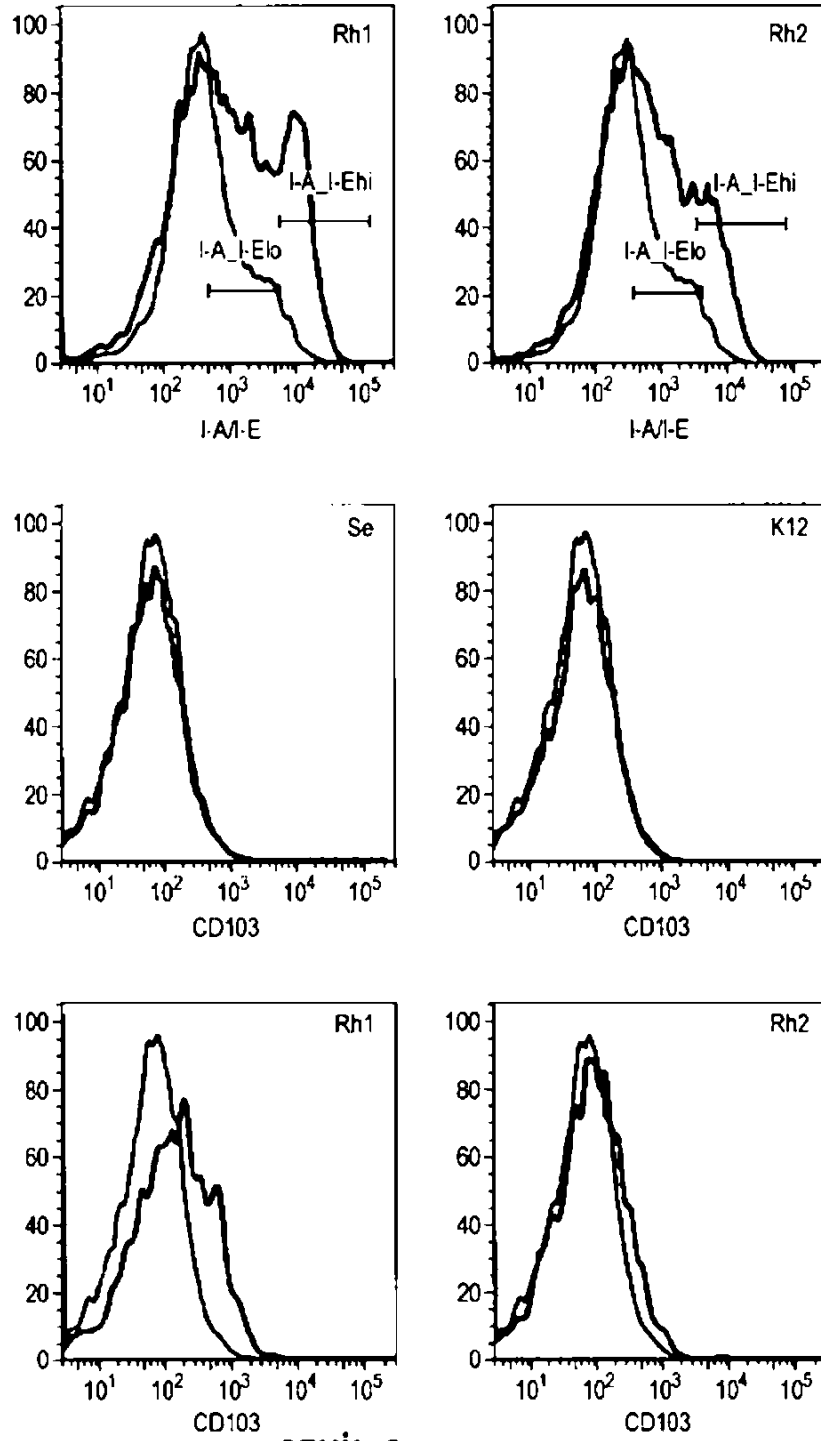


ŞEKİL 6



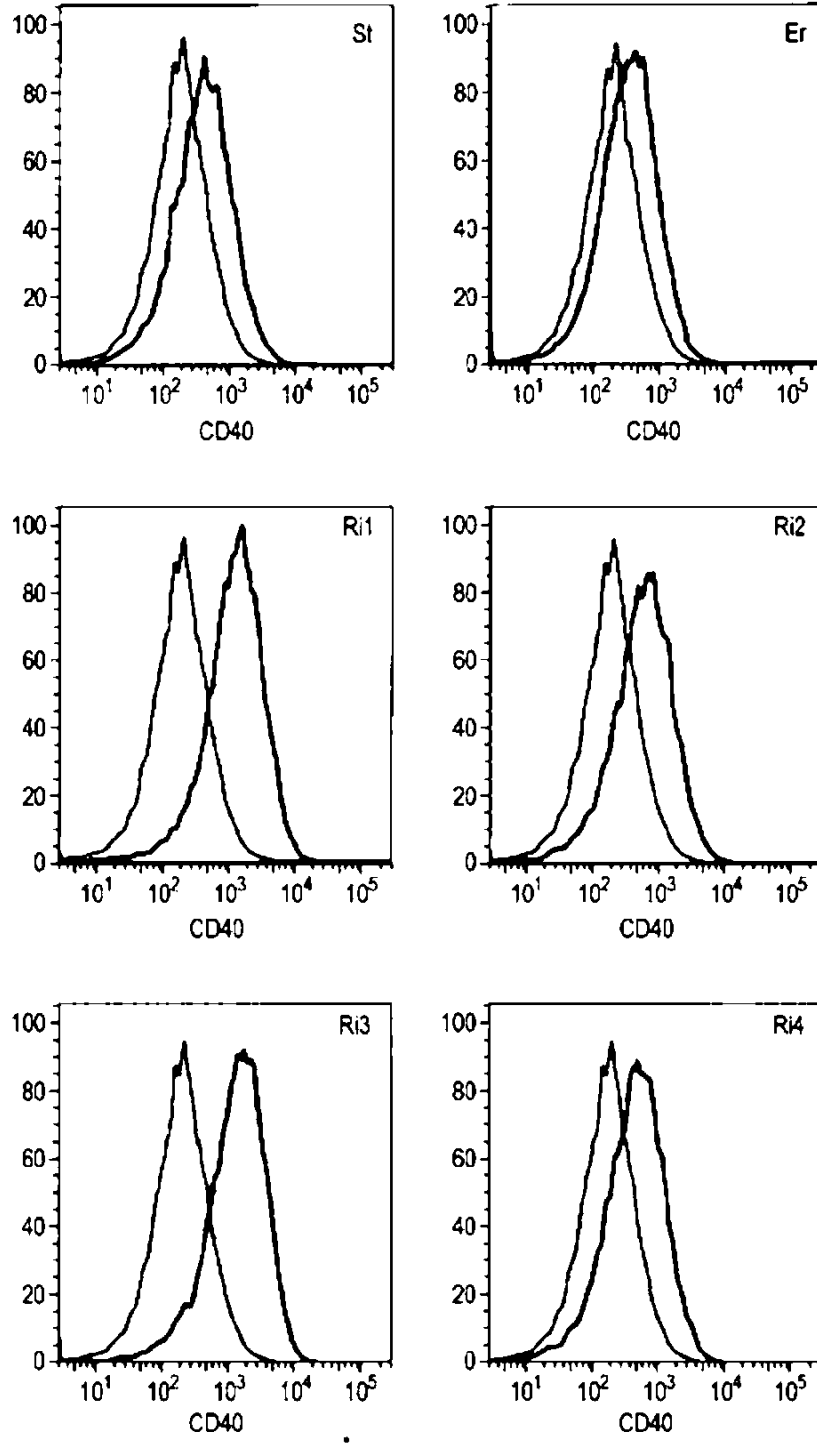
ŞEKİL 6

B)



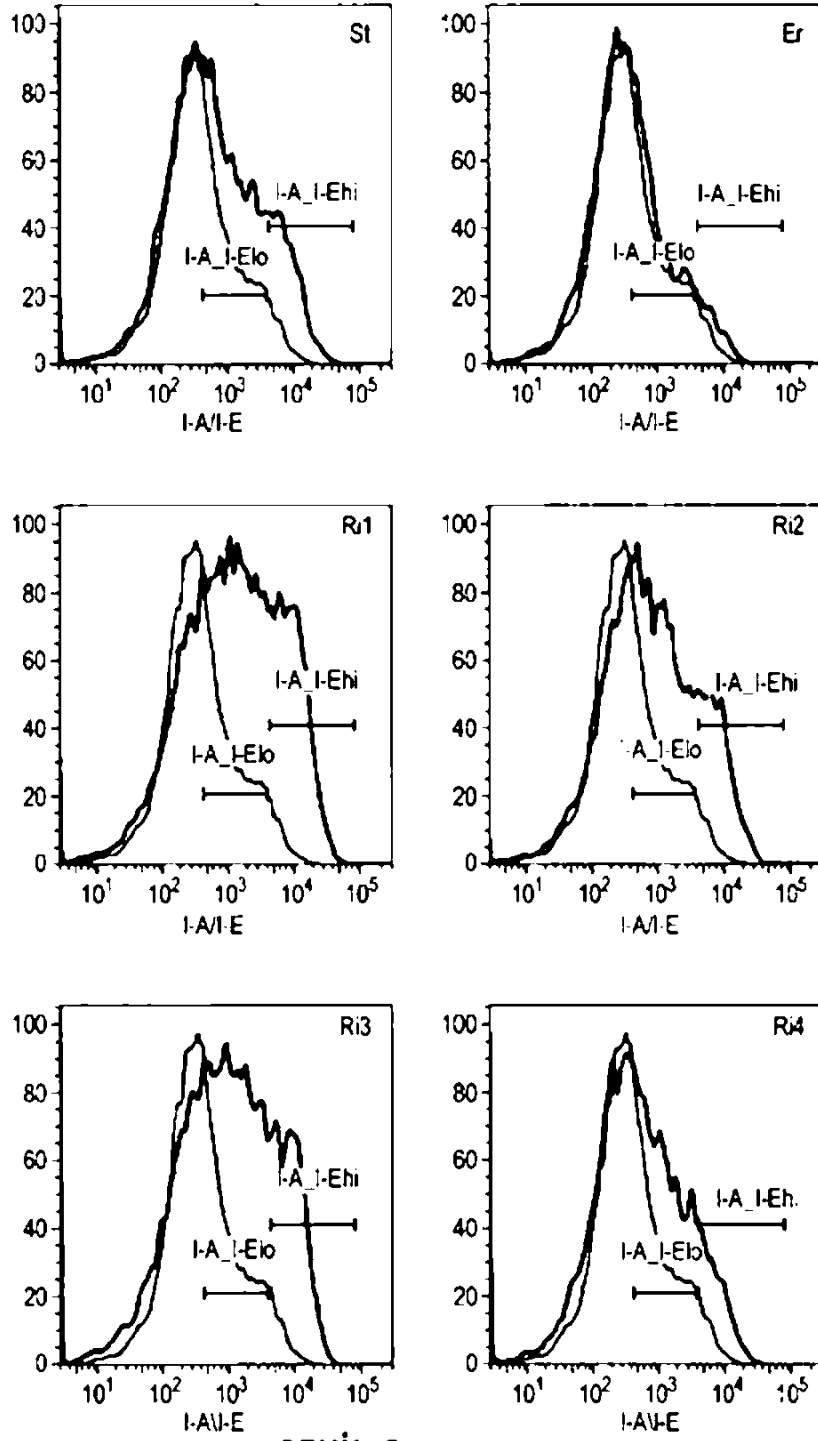
ŞEKİL 6

B)



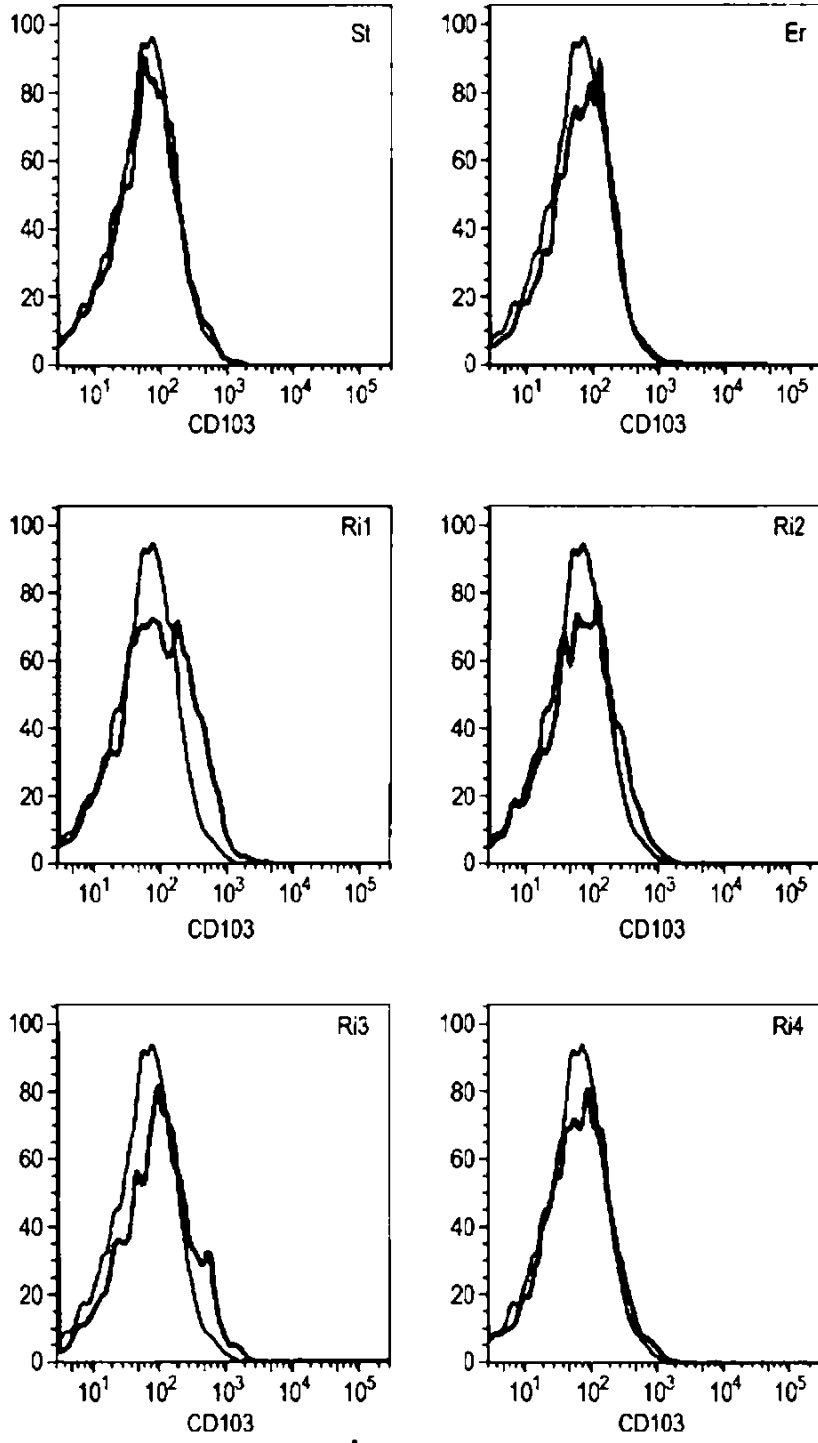
ŞEKİL 6

B)

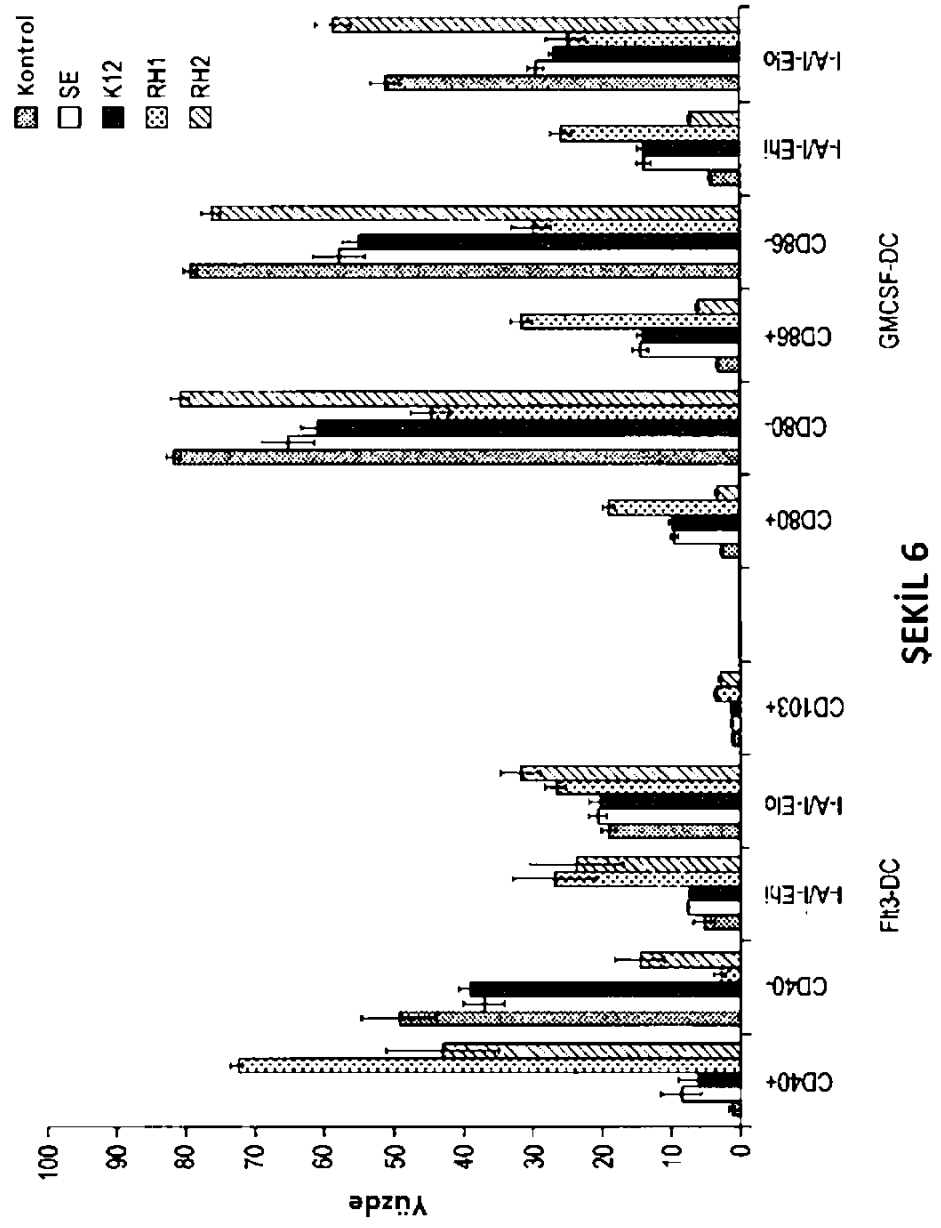


ŞEKİL 6

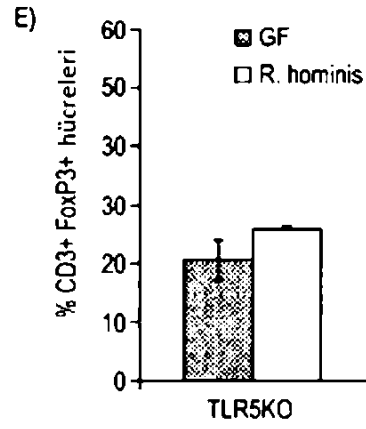
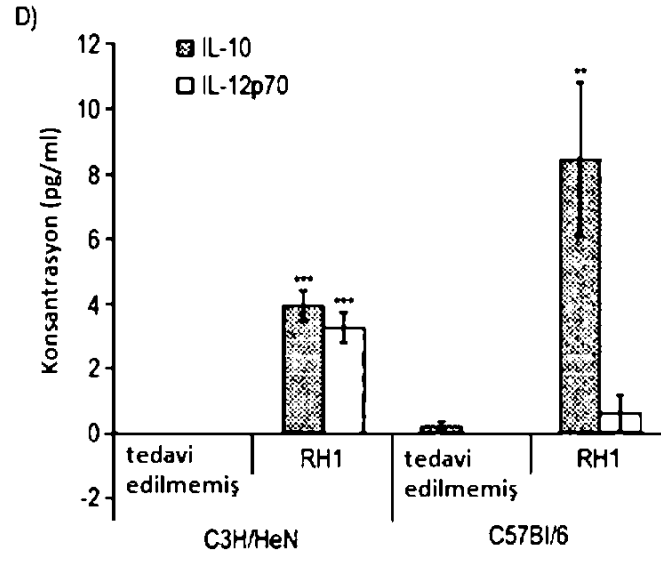
B)



ŞEKİL 6

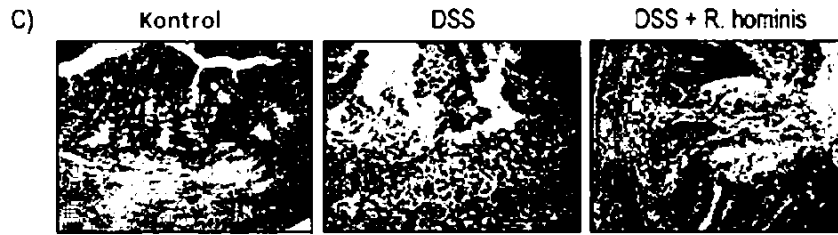
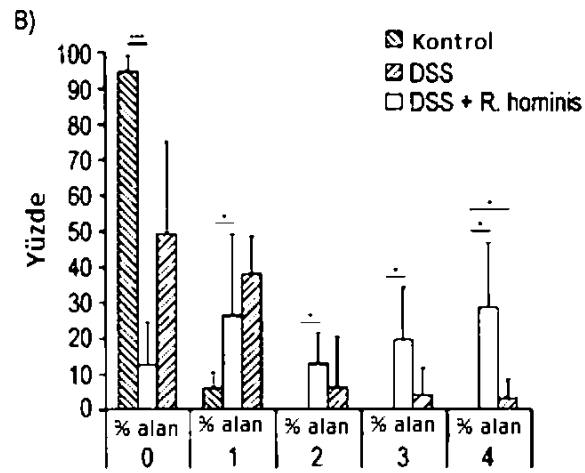
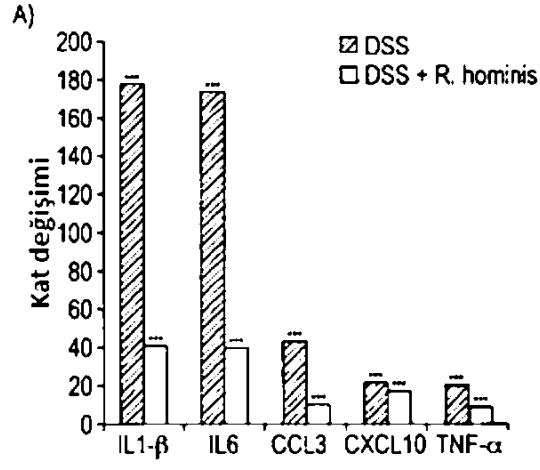


c)



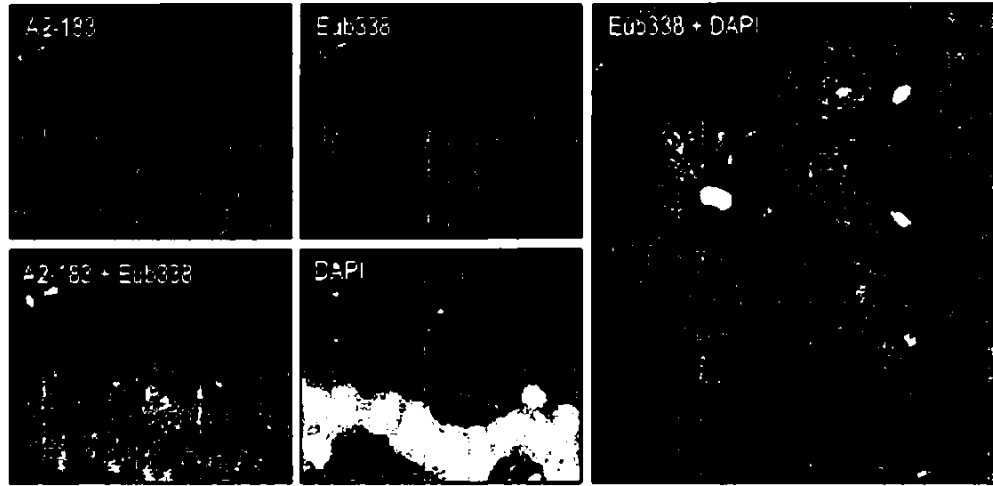
ŞEKİL 6



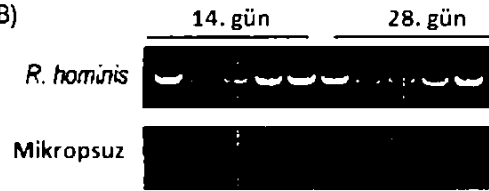


ŞEKİL 7

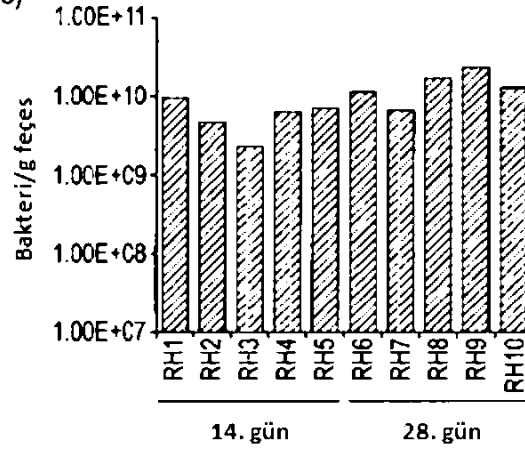
A)



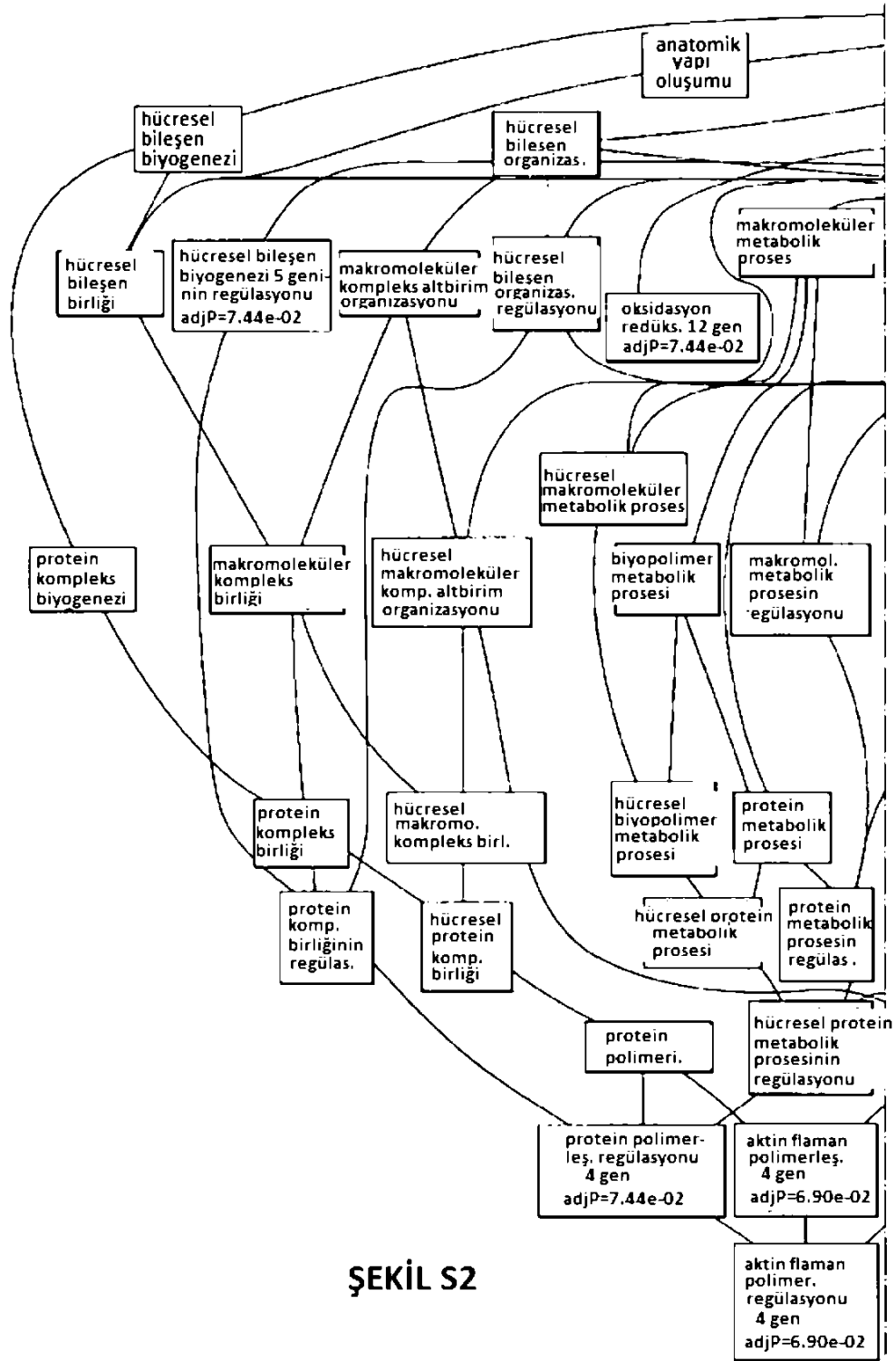
B)



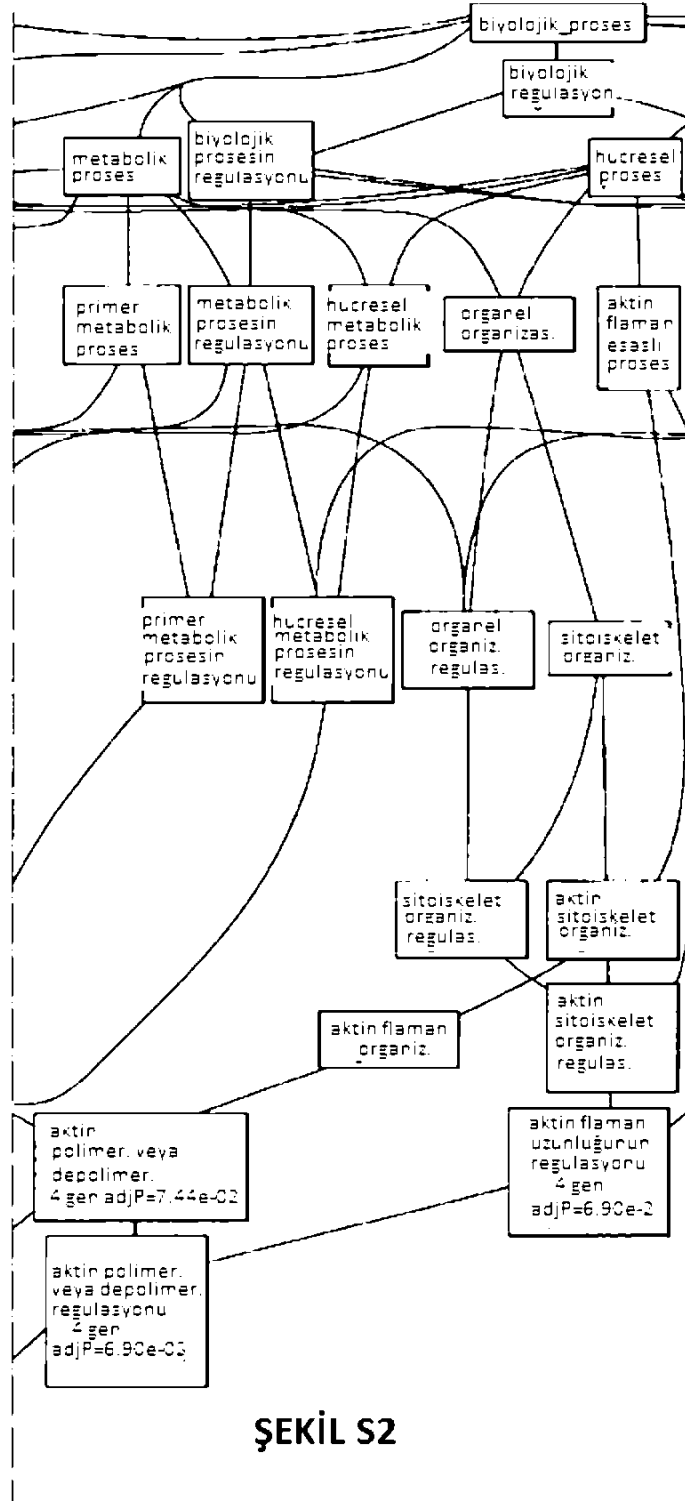
C)



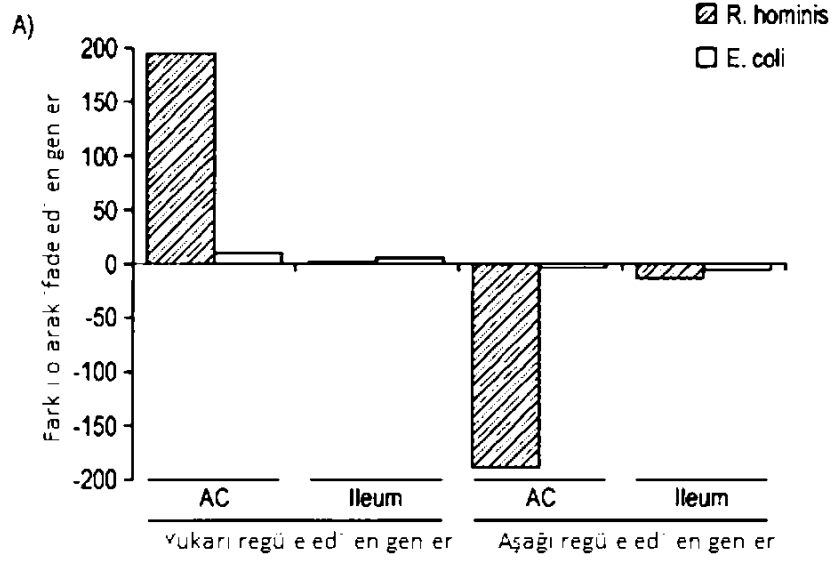
ŞEKİL S1



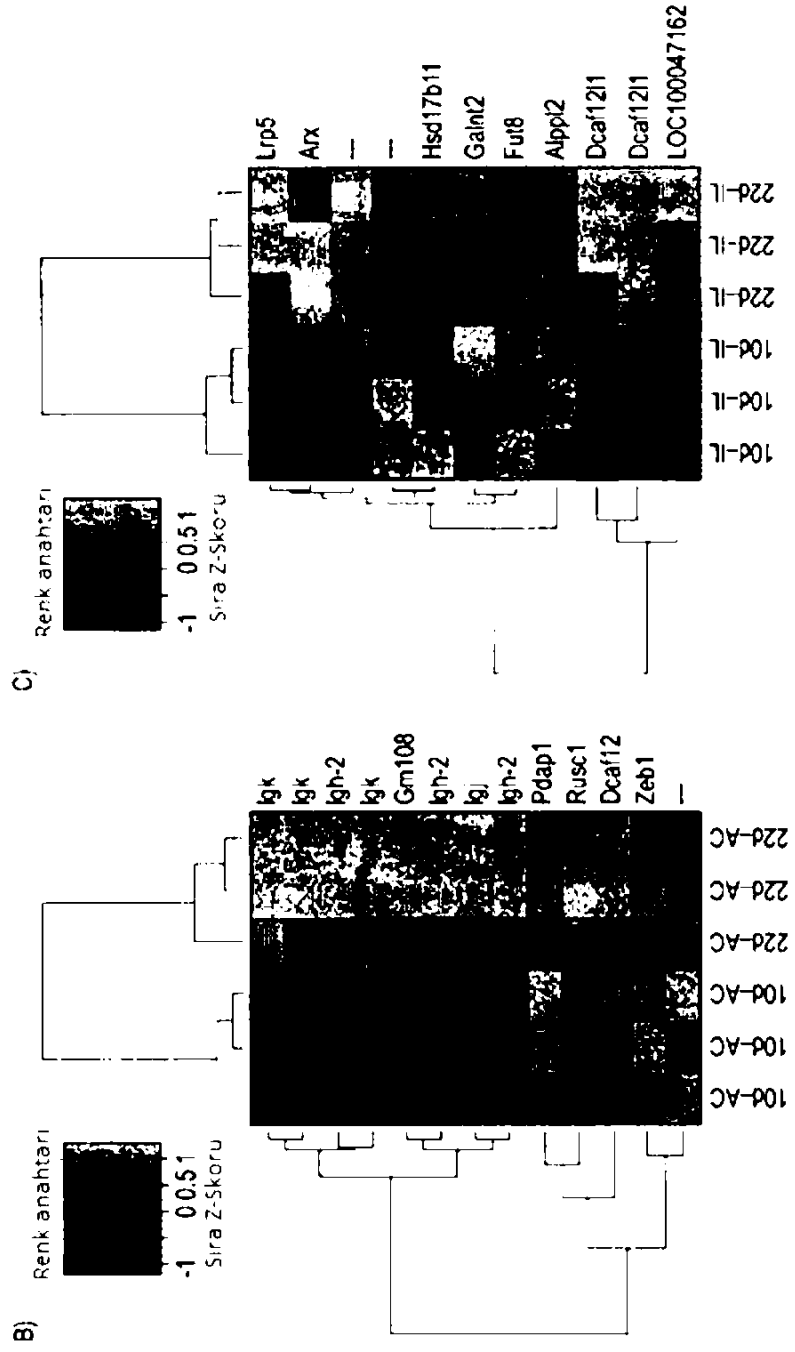
ŞEKİL S2







ŞEKİL S3

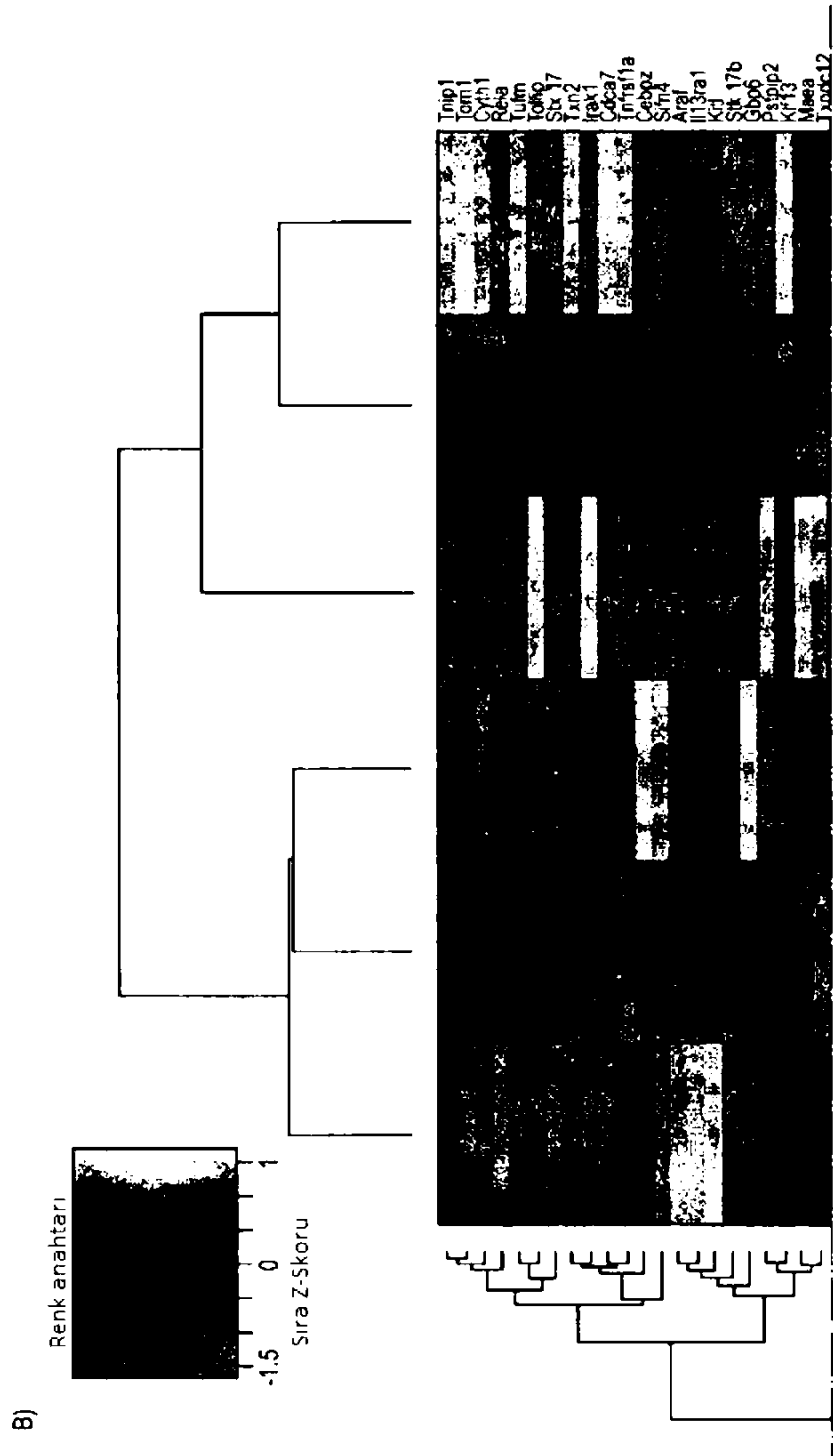


ŞEKİL S3



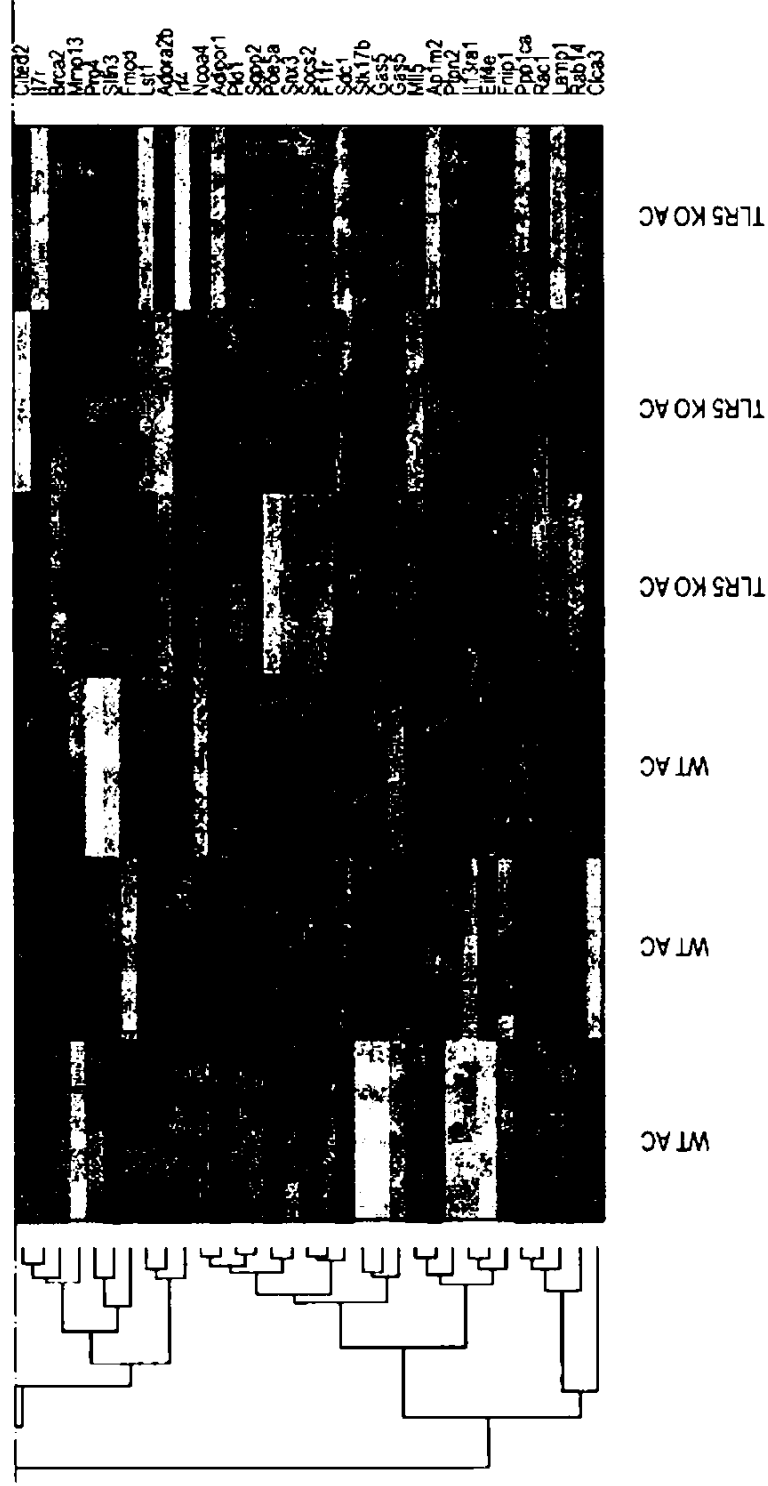
ŞEKİL S4



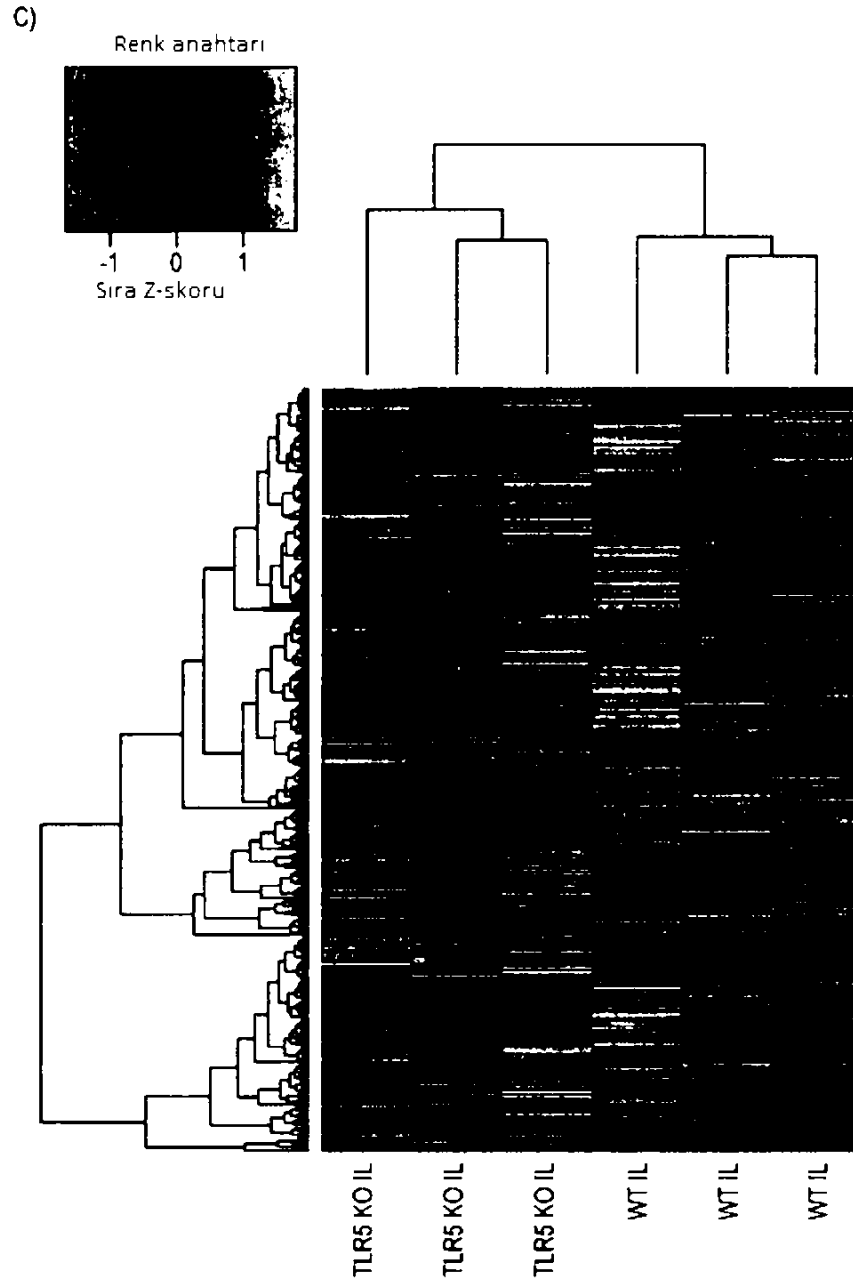




## ŞEKİL S4



ŞEKİL S4

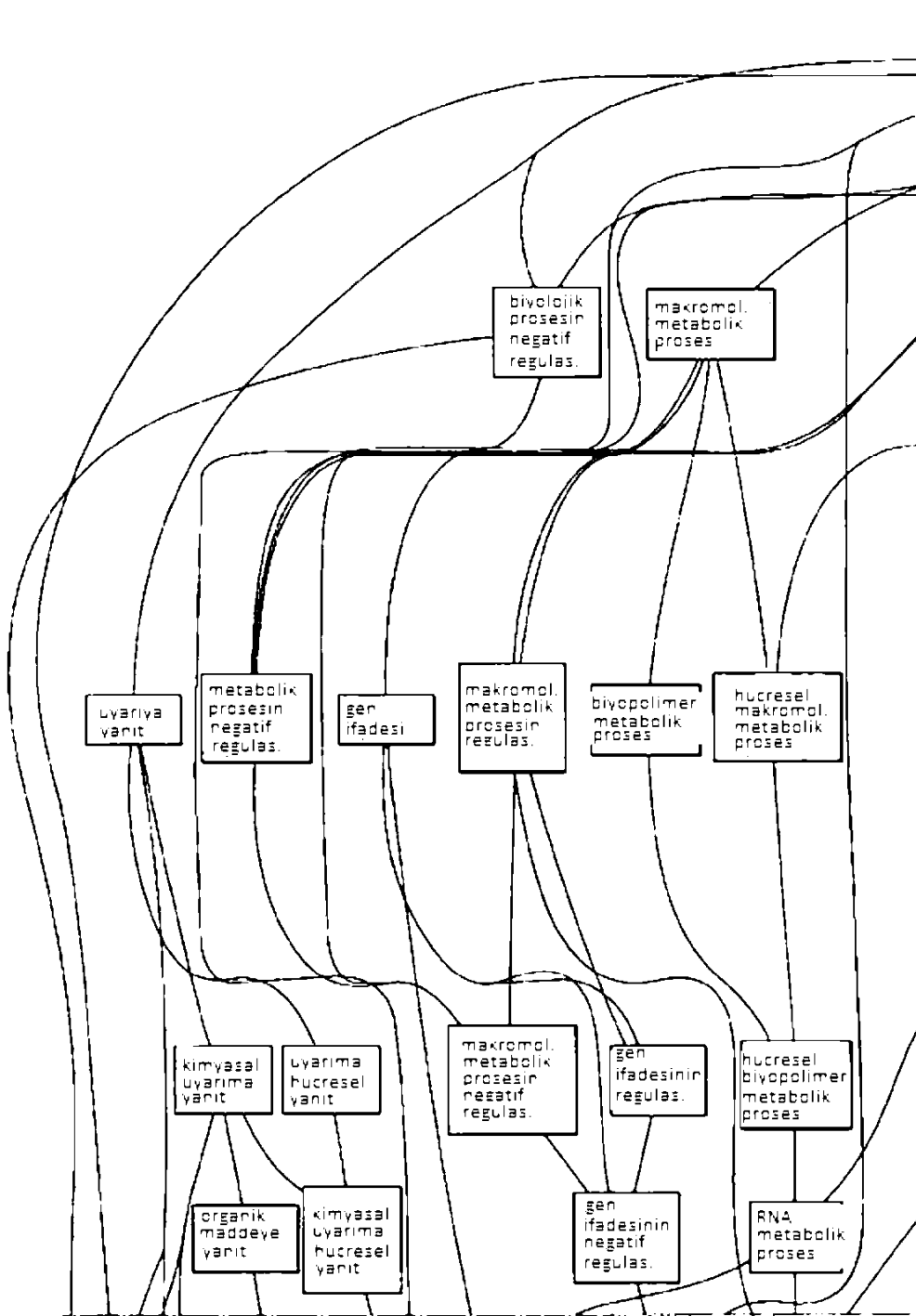


ŞEKİL S4

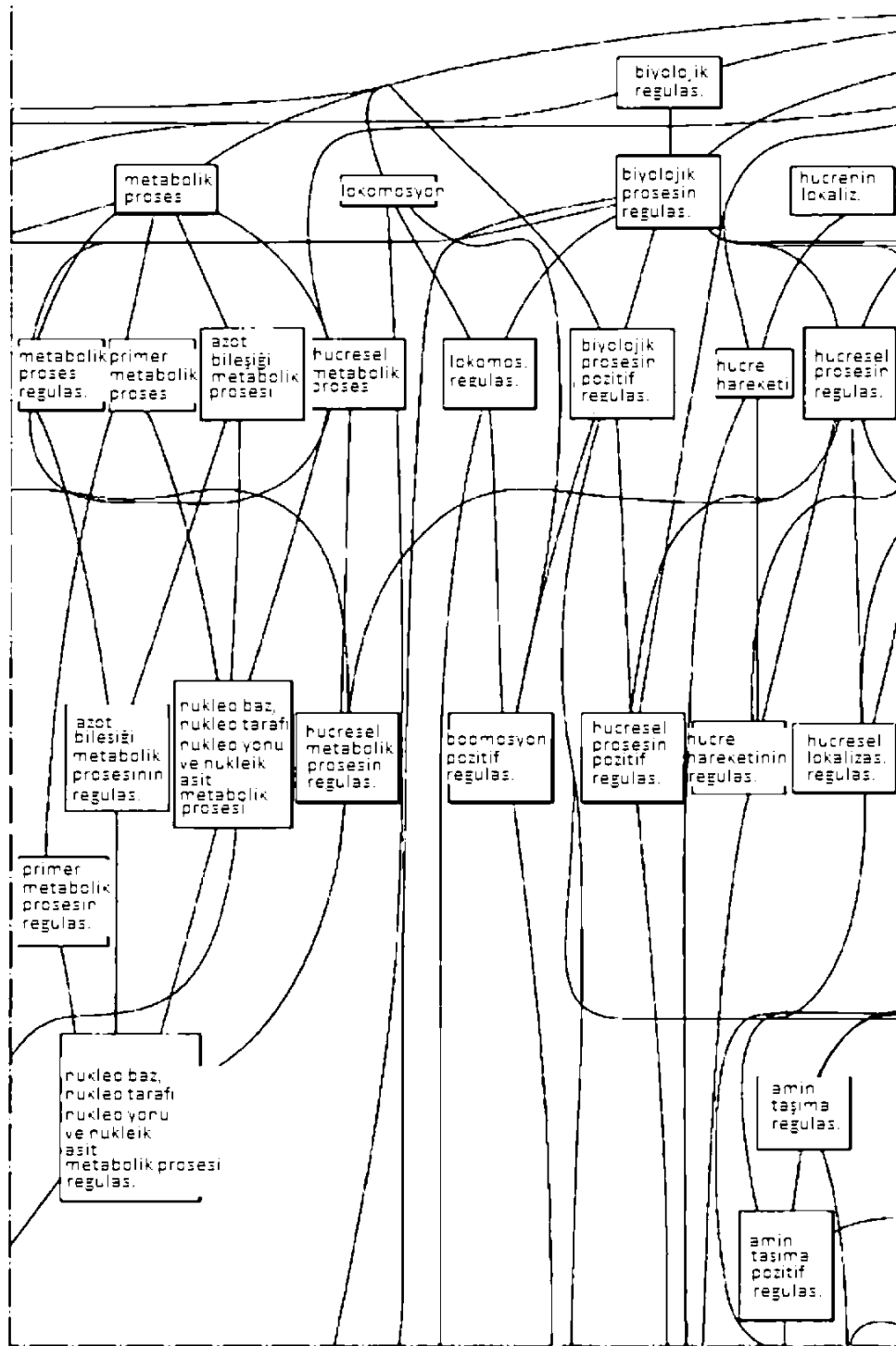


|                  |                  |                  |                  |
|------------------|------------------|------------------|------------------|
| ŞEK. S5          | ŞEK. S5 Cont'd-1 | ŞEK. S5 Cont'd-2 | ŞEK. S5 Cont'd-3 |
| ŞEK. S5 Cont'd-4 | FIG. S5 Cont'd-5 | ŞEK. S5 Cont'd-6 | ŞEK. S5 Cont'd-7 |
| ŞEK. S5 Cont'd-8 | ŞEK. S5 Cont'd-9 |                  |                  |

ŞEK. S5

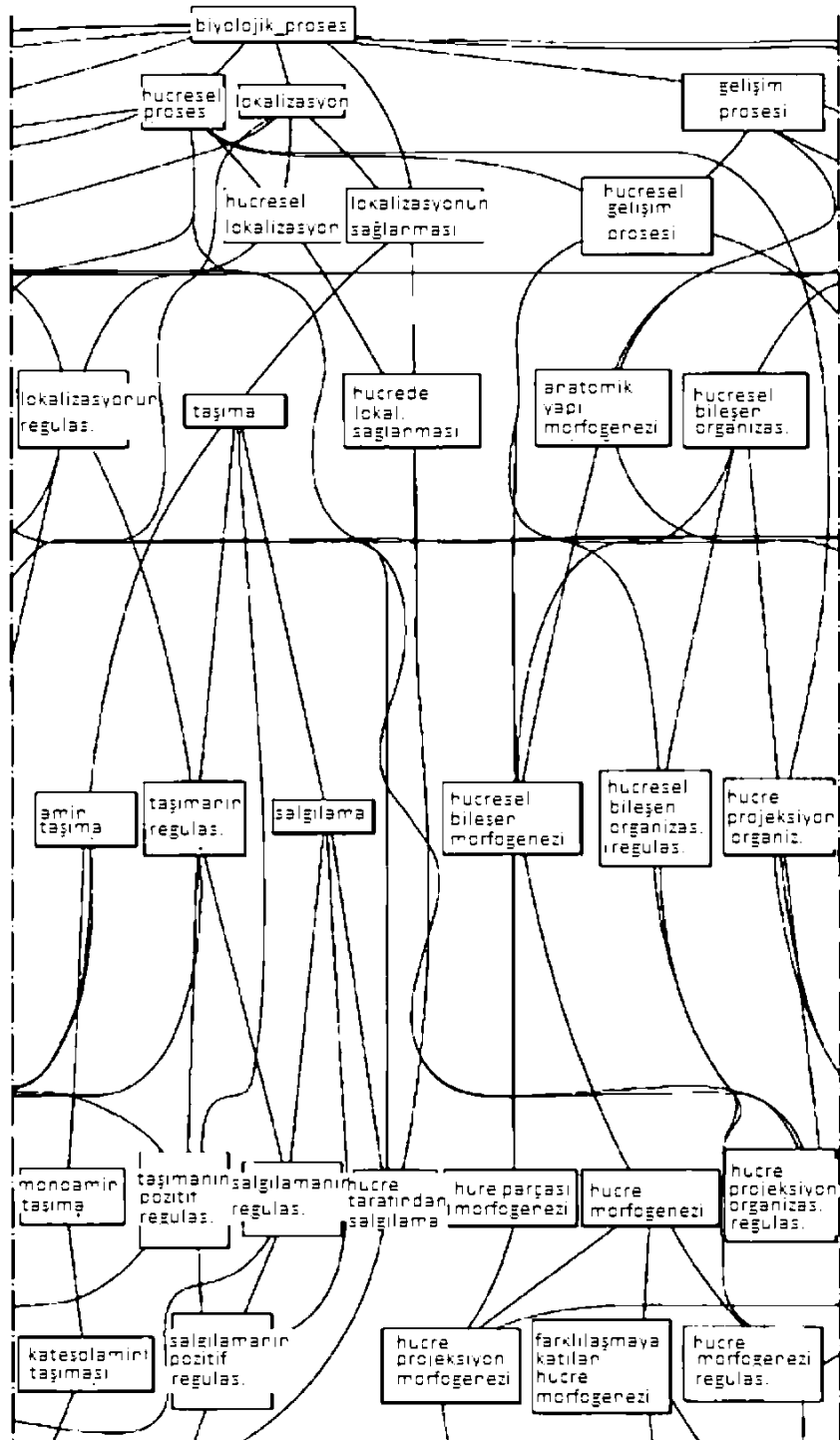


ŞEKİL S5

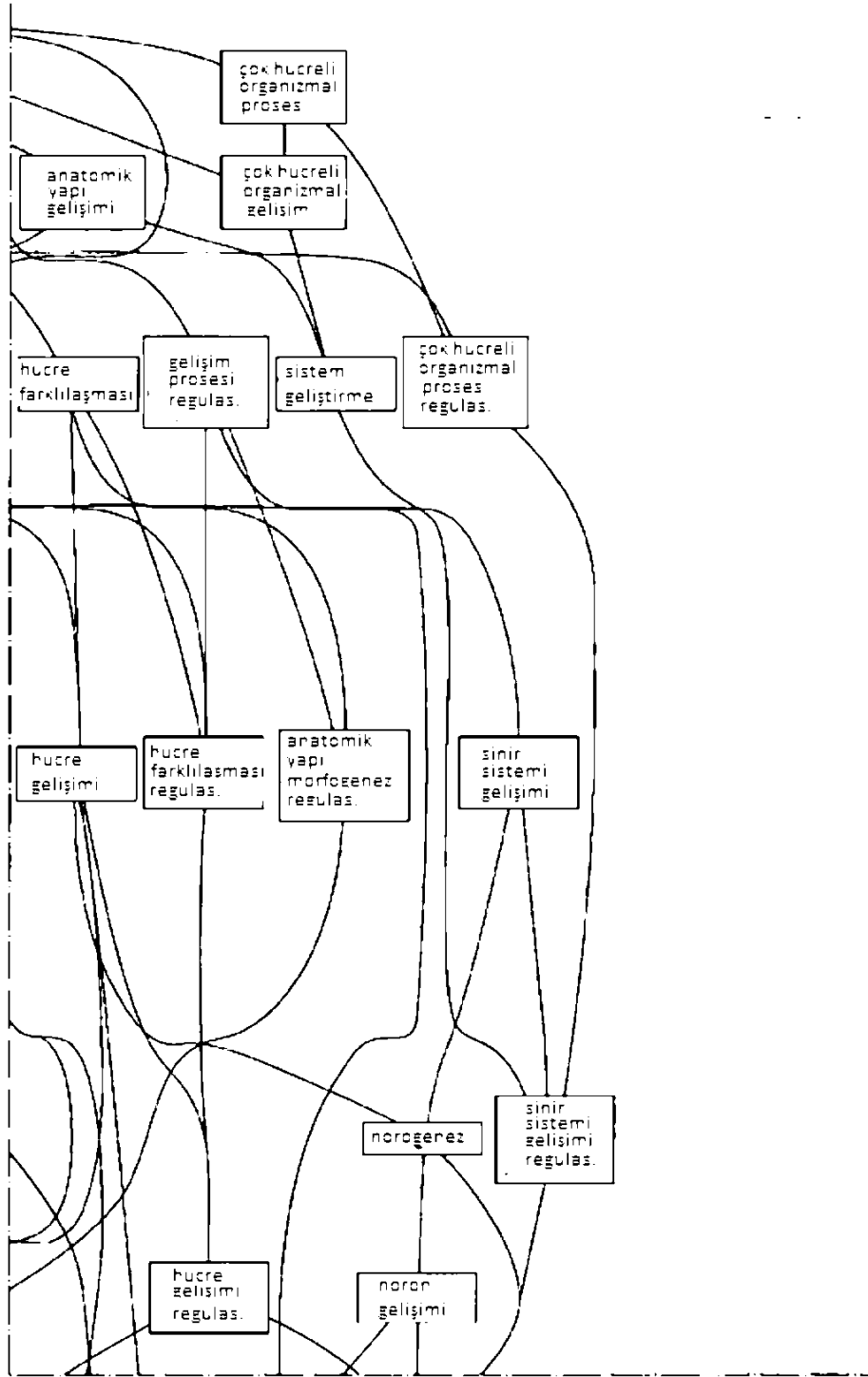


ŞEKİL S5

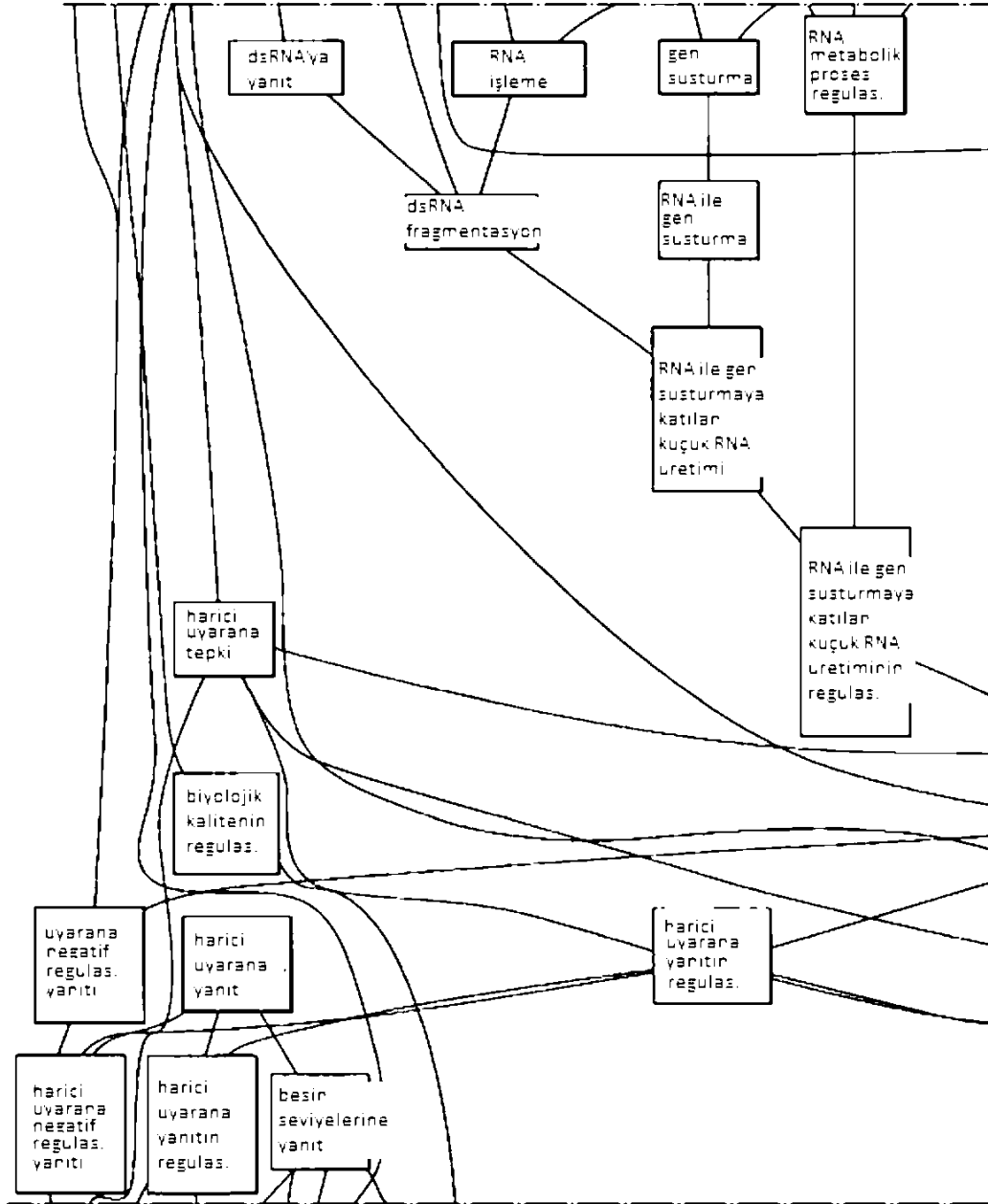




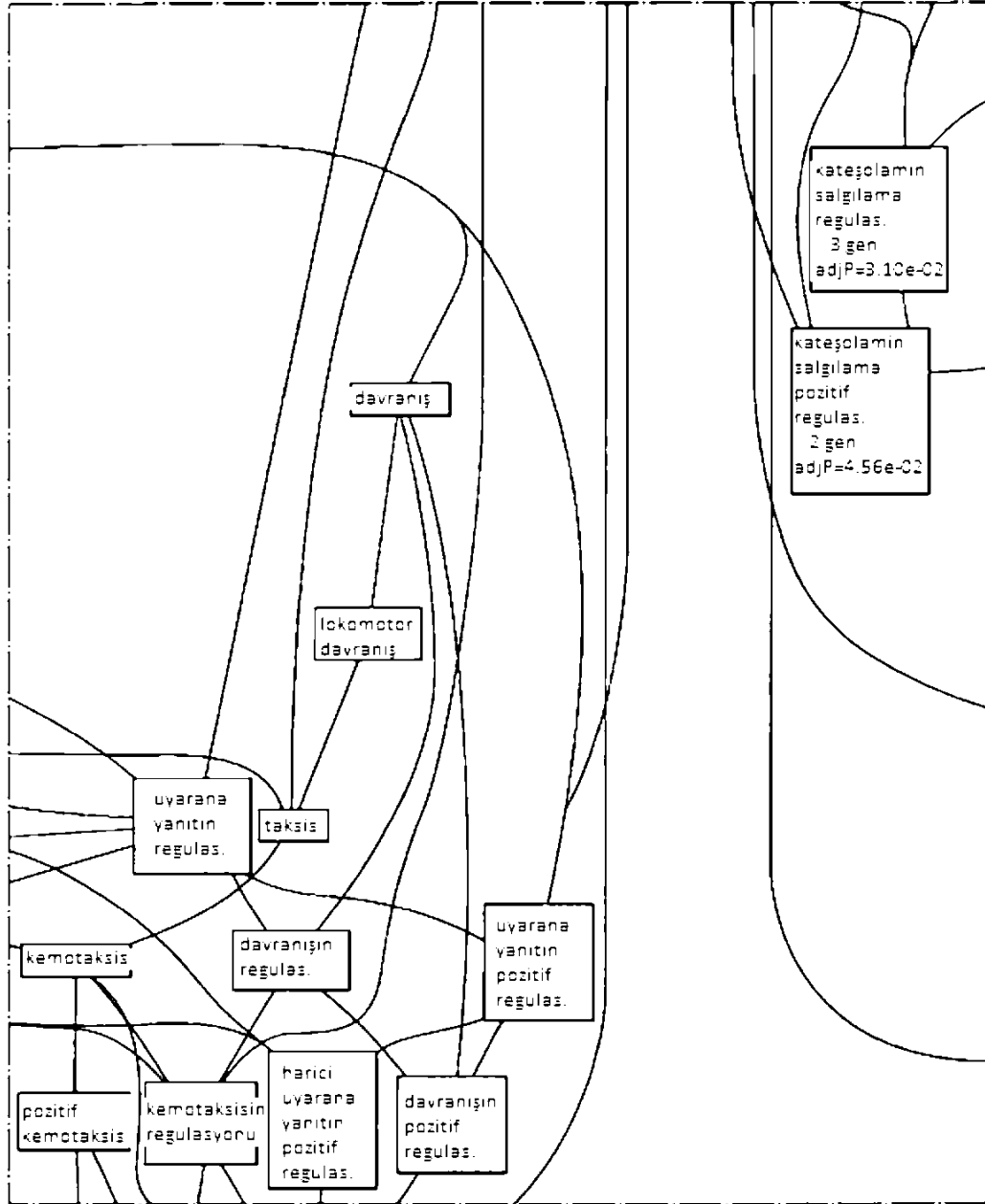
**ŞEKİL S5**



ŞEKİL S5

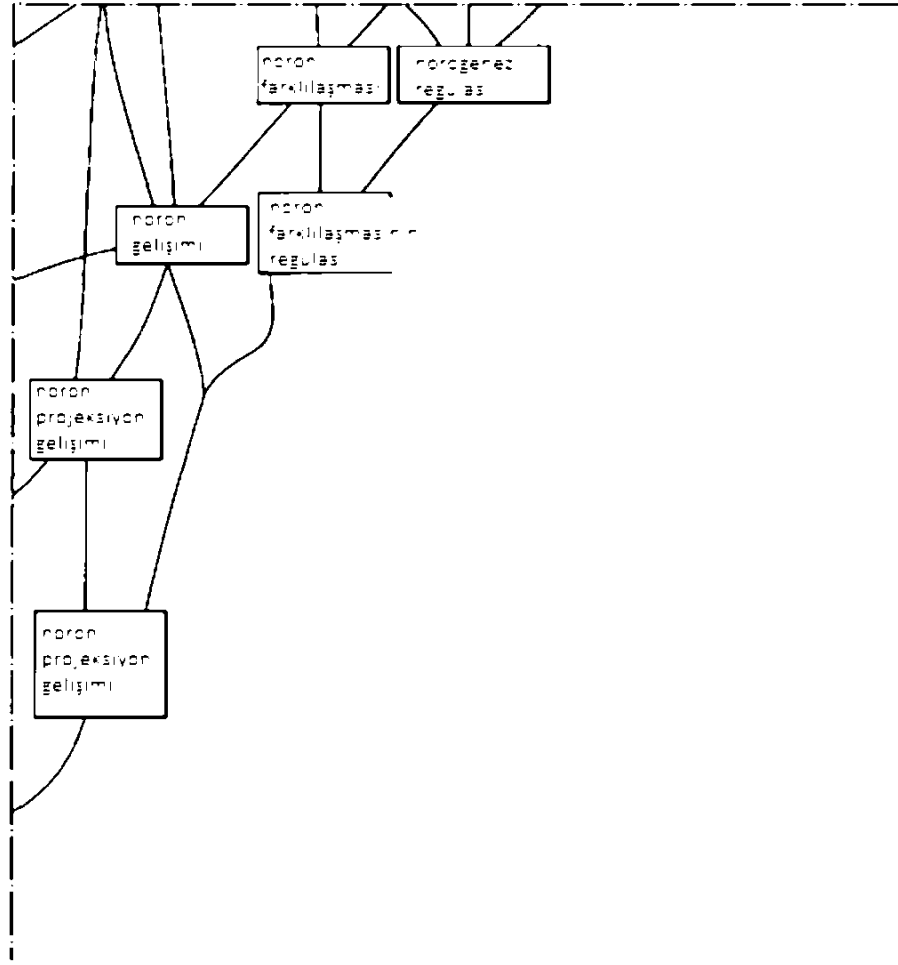


ŞEKİL S5

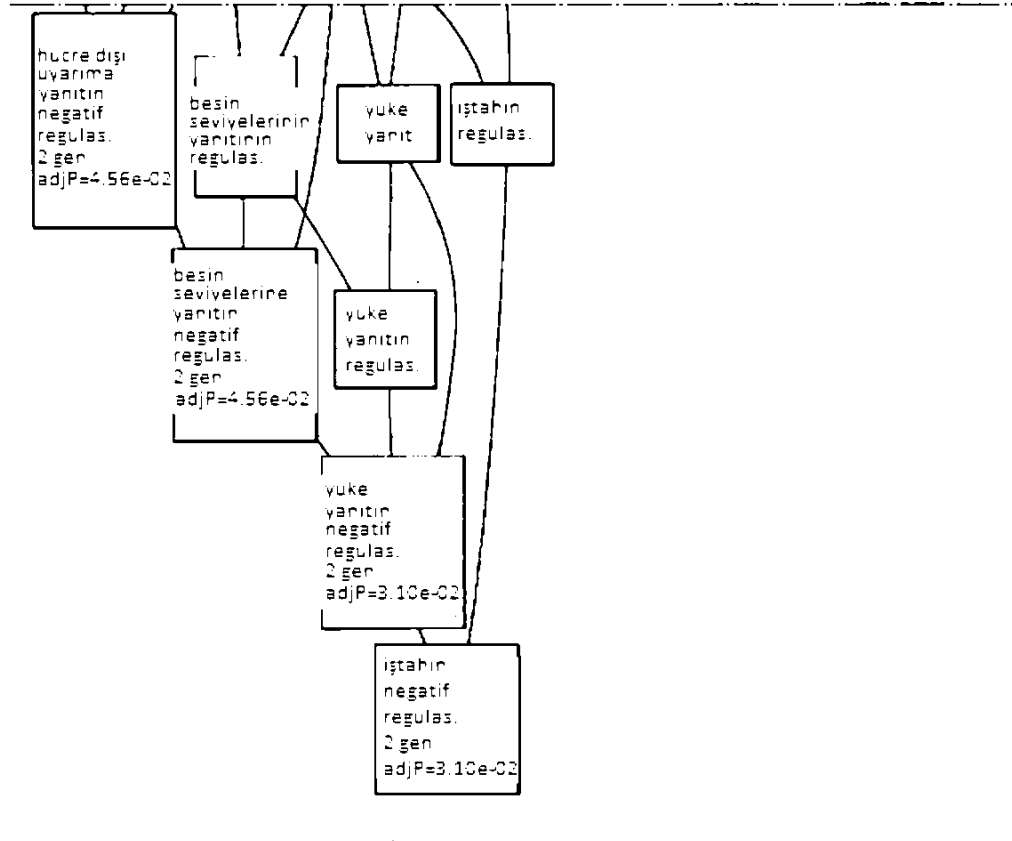


ŞEKİL S5

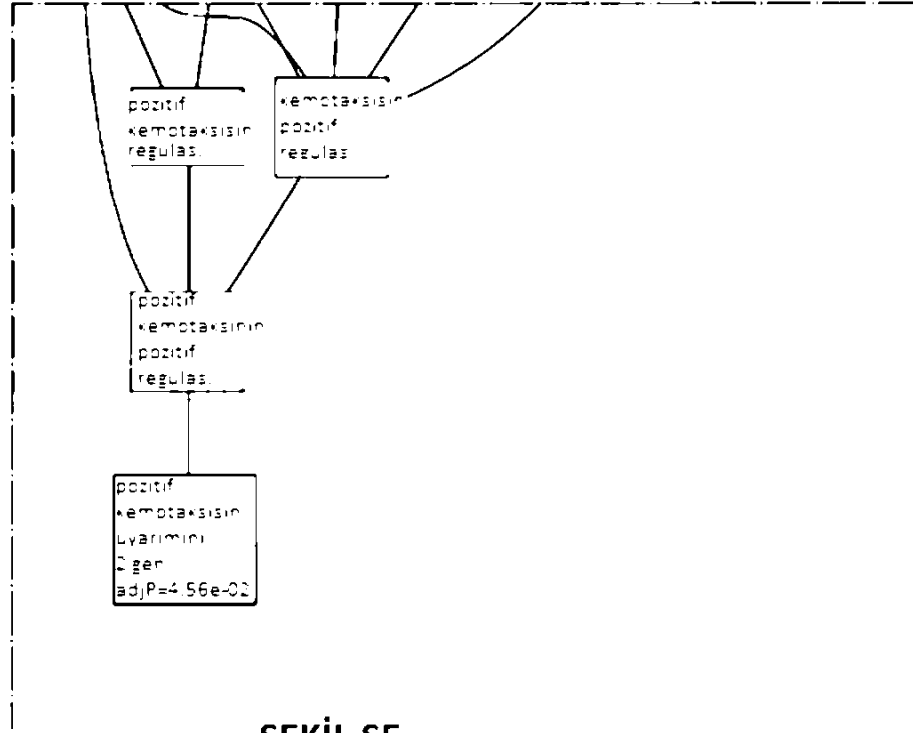




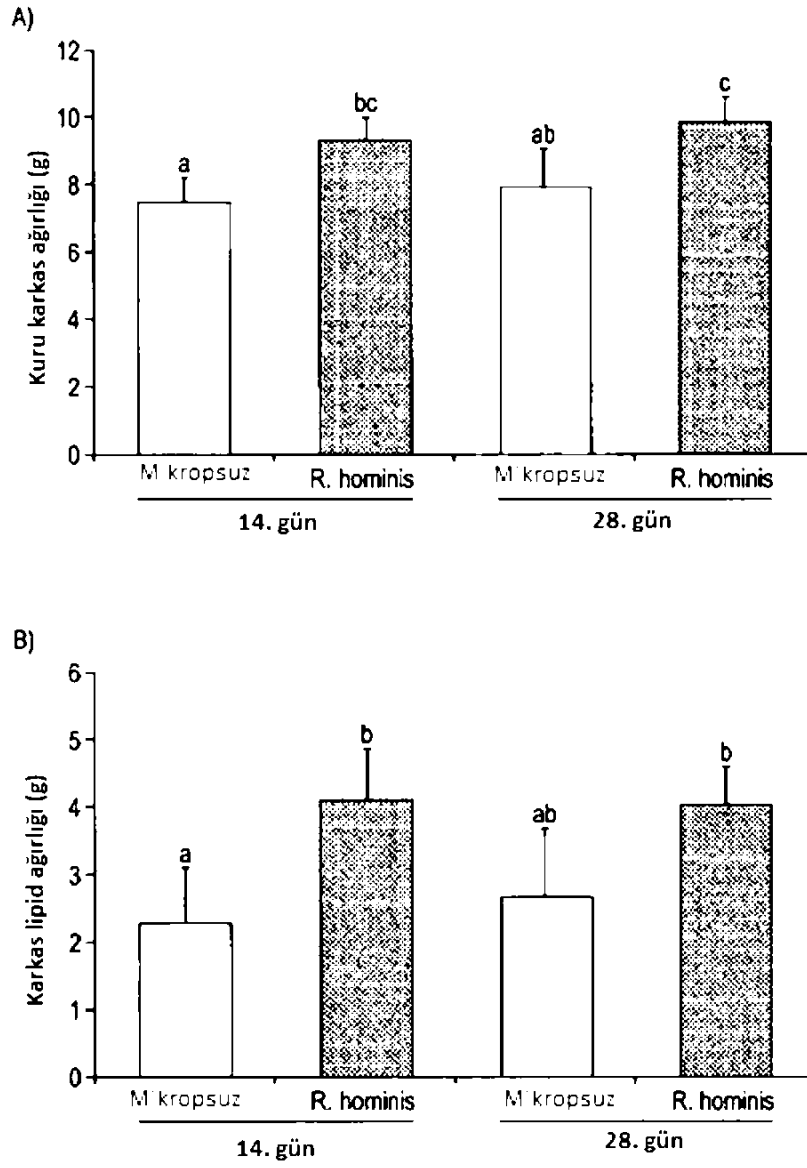
ŞEKİL S5



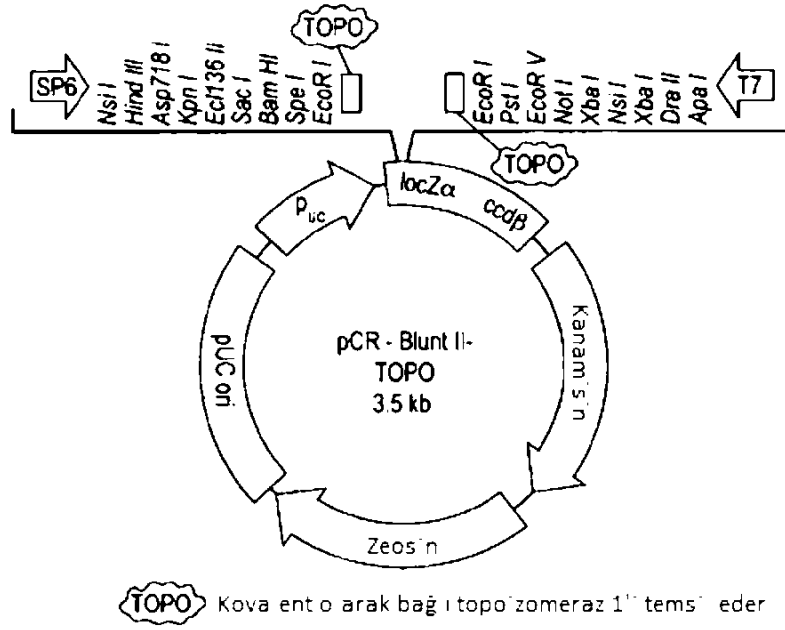
ŞEKİL S5



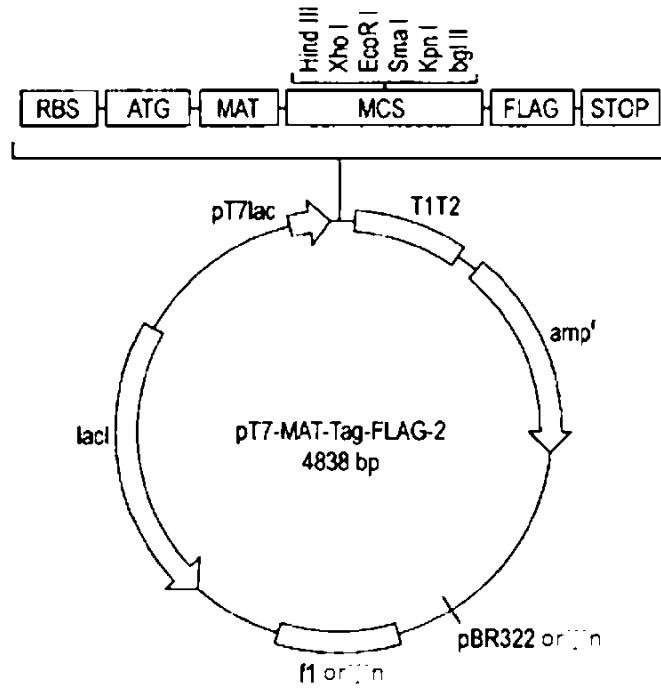




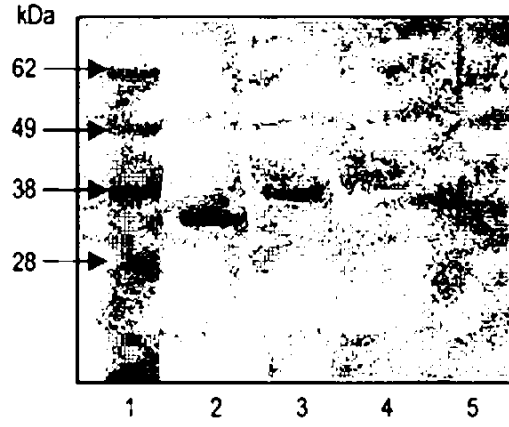
ŞEKİL S6



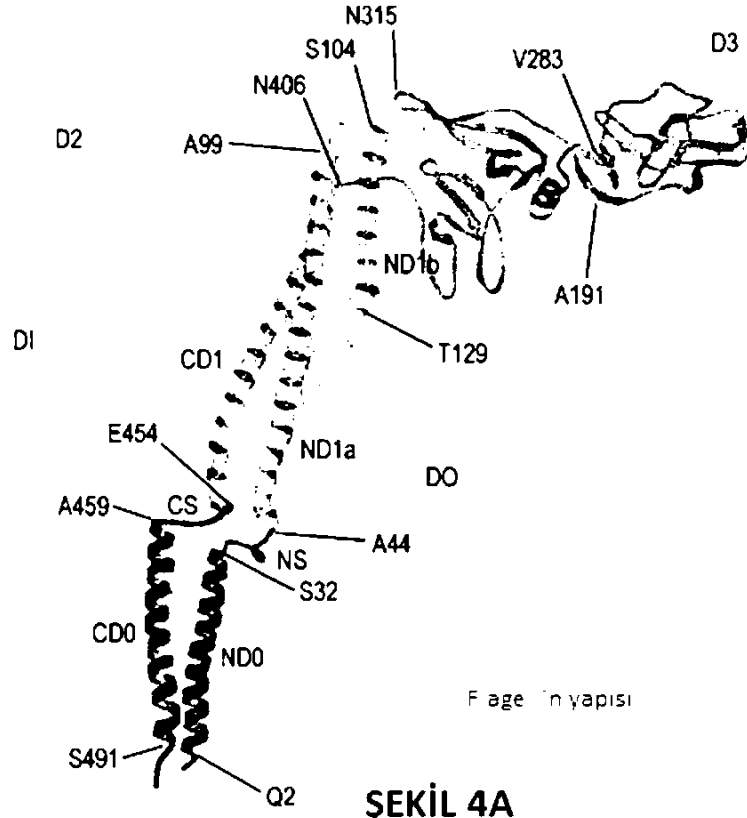
ŞEKİL 1A



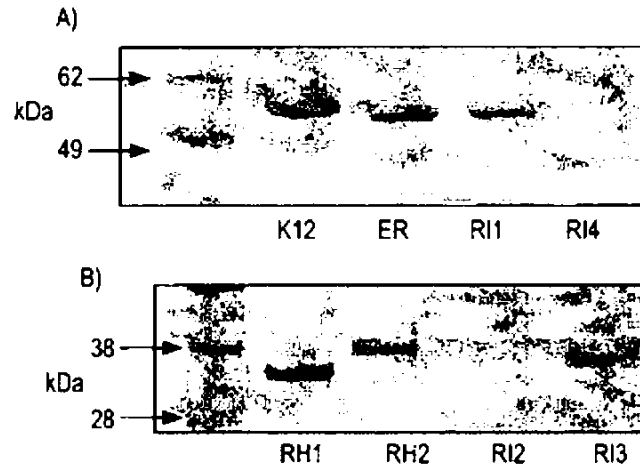
ŞEKİL 2A



ŞEKİL 3A



ŞEKİL 4A

**ŞEKİL B1**

CLUSTAL 2.1 flagellin nükleotit dizisini ve erişim numarasını doğrulayan çoklu sekans dizilimi

|            |                                                                  |
|------------|------------------------------------------------------------------|
| RIFla1     | ATGCGTGGCGGAGACAATAGAAGGAGAAACAGAATGAGAATTAATTACAATGTGTCAGCA 60  |
| RIEEV02820 | ATGCGTGGCGGAGACAATAGAAGGAGAAACAGAATGAGAATTAATTACAATGTGTCAGCA 60  |
| RIFla1     | GCGATTGCGAATAAACATTTACTTGGAATTGAGGATAATTTAAGTGCATCGATGGAACGG 120 |
| RIEEV02820 | GCGATTGCGAATAAACATTTACTTGGAATTGAGGATAATTTAAGTGCATCGATGGAACGG 120 |
| RIFla1     | CTTTCATCGGGACTTAAGATCAACCATTCCAAGGACAATCCGGCAGGAATGGCTATTTCC 180 |
| RIEEV02820 | CTTTCATCGGGACTTAAGATCAACCATTCCAAGGACAATCCGGCAGGAATGGCTATTTCC 180 |
| RIFla1     | AACAAGATGAAAGCACAGATTGATGGTTTAAACCGGGCTTCCAGAATGCATCGGATGGT 240  |
| RIEEV02820 | AACAAGATGAAAGCACAGATTGATGGTTTAAACCGGGCTTCCAGAATGCATCGGATGGT 240  |
| RIFla1     | ATTTCTGTTATTGAGATCGCAGATGGTGCCTGAGTGAAACGACCAGTATTTTACAGCGT 300  |
| RIEEV02820 | ATTTCTGTTATTGAGATCGCAGATGGTGCCTGAGTGAAACGACCAGTATTTTACAGCGT 300  |
| RIFla1     | ATGAGAGAACTTTCCGTGCAGGCAGCGAGTGATGCAACAATGACACCGGCGGATAAAGAA 360 |
| RIEEV02820 | ATGAGAGAACTTTCCGTGCAGGCAGCGAGTGATGCAACAATGACACCGGCGGATAAAGAA 360 |
| RIFla1     | GCAATCCAGAAAGAAATCACTTCATTAAAAGATGAAGTTGACCGTATTTCTACAGATACA 420 |
| RIEEV02820 | GCAATCCAGAAAGAAATCACTTCATTAAAAGATGAAGTTGACCGTATTTCTACAGATACA 420 |
| RIFla1     | GAGTATAACAGCAAAACACTTTTAGATGGTTCATTAGATACCAGGGTTACACCAAAAAT 480  |
| RIEEV02820 | GAGTATAACAGCAAAACACTTTTAGATGGTTCATTAGATACCAGGGTTACACCAAAAAT 480  |
| RIFla1     | GCAACAAGAGTGGACATTTCTGATCATGTGAAAGCAGGACAGTATCAGCTTTCCATTGAT 540 |
| RIEEV02820 | GCAACAAGAGTGGACATTTCTGATCATGTGAAAGCAGGACAGTATCAGCTTTCCATTGAT 540 |
| RIFla1     | ACTGCAGCTACACAGGCCGGACCGGTAACAGCAAATCAGAATTATAATTCCACAGCACCG 600 |
| RIEEV02820 | ACTGCAGCTACACAGGCCGGACCGGTAACAGCAAATCAGAATTATAATTCCACAGCACCG 600 |

## ŞEKİL C1

---

|            |                                                                   |
|------------|-------------------------------------------------------------------|
| RIFla1     | GTCGGTGCGTCCGGAACAATGAGTATTAATGGTTCTAAAGTAGAGATAGAGGCAGCCGAC 660  |
| RIEEV02820 | GTCGGTGCGTCCGGAACAATGAGTATTAATGGTTCTAAAGTAGAGATAGAGGCAGCCGAC 660  |
| RIFla1     | ACCTATGCGGAGGCTTTTGAGAAGATCAGAAATGCAGCAGAGACTGGTGAAACAACCGTT 720  |
| RIEEV02820 | ACCTATGCGGAGGCTTTTGAGAAGATCAGAAATGCAGCAGAGACTGGTGAAACAACCGTT 720  |
| RIFla1     | AAGATTGAAAAGAATGGAGCACTTTTCATTTACCGCAGAACAGTACGGAATGTCAAGCATC 780 |
| RIEEV02820 | AAGATTGAAAAGAATGGAGCACTTTTCATTTACCGCAGAACAGTACGGAATGTCAAGCATC 780 |
| RIFla1     | TTAGAGATCGCATTGATGATAAGCAGCTTGCTAATGCACTTGGATTACAGCAGACGGA 840    |
| RIEEV02820 | TTAGAGATCGCATTGATGATAAGCAGCTTGCTAATGCACTTGGATTACAGCAGACGGA 840    |
| RIFla1     | GGAAACAGTGTTGTAGAAGATCCAGAGAATAAAGGCAGCTATGTATACGGACAGATTCA 900   |
| RIEEV02820 | GGAAACAGTGTTGTAGAAGATCCAGAGAATAAAGGCAGCTATGTATACGGACAGATTCA 900   |
| RIFla1     | AATGGCAAAGTGATCGTACCTTCCGGTACAGATGCCGAAGTAACGCTCACAAAACCGAGT 960  |
| RIEEV02820 | AATGGCAAAGTGATCGTACCTTCCGGTACAGATGCCGAAGTAACGCTCACAAAACCGAGT 960  |
| RIFla1     | GATGGAACCGGATTGGTGATACAGTACGGTAAAAACAGATGGAAATAAGATTACGGTT 1020   |
| RIEEV02820 | GATGGAACCGGATTGGTGATACAGTACGGTAAAAACAGATGGAAATAAGATTACGGTT 1020   |
| RIFla1     | ACAGACAGAGCCGGATTGAGATGTCATTTCTTGCTGATGCAGGTTATACGGGTAAGCTG 1080  |
| RIEEV02820 | ACAGACAGAGCCGGATTGAGATGTCATTTCTTGCTGATGCAGGTTATACGGGTAAGCTG 1080  |
| RIFla1     | GATTTTGATGTCACGGATATCGGAACGATGGCACTTCATATTGGAGCAAATGAGGATCAG 1140 |
| RIEEV02820 | GATTTTGATGTCACGGATATCGGAACGATGGCACTTCATATTGGAGCAAATGAGGATCAG 1140 |
| RIFla1     | GAAACAAGAGTGCGTATTCGGGAGGTTTCTGCAAGAGCCTTTACATTGATGATGCAGAC 1200  |
| RIEEV02820 | GAAACAAGAGTGCGTATTCGGGAGGTTTCTGCAAGAGCCTTTACATTGATGATGCAGAC 1200  |
| RIFla1     | GTGACGACTGTAAATGGAGCAGGCAGAGGTATCACACAGTTTGACGATGCCATTTCAAAG 1260 |
| RIEEV02820 | GTGACGACTGTAAATGGAGCAGGCAGAGGTATCACACAGTTTGACGATGCCATTTCAAAG 1260 |
| RIFla1     | GTCAGTGAAGTGCGTTCAAGACTTGGTGCATACCAGAATCGTCTTGAGAGTACGGTATCA 1320 |
| RIEEV02820 | GTCAGTGAAGTGCGTTCAAGACTTGGTGCATACCAGAATCGTCTTGAGAGTACGGTATCA 1320 |
| RIFla1     | AGCCTGGATACGTTTGAAGAAAATATGACAGGAGCCCAGTCACGACTGACAGATGCGGAT 1380 |
| RIEEV02820 | AGCCTGGATACGTTTGAAGAAAATATGACAGGAGCCCAGTCACGACTGACAGATGCGGAT 1380 |
| RIFla1     | ATGGCATCGGAAATGACAGATTATACACATCAGAATGTATTAAATCAGGCAGCAATCTCT 1440 |
| RIEEV02820 | ATGGCATCGGAAATGACAGATTATACACATCAGAATGTATTAAATCAGGCAGCAATCTCT 1440 |
| RIFla1     | GTTTTGACACAGGCAAACGATCTGCCACAGCAGGTATTGCAGATTCTGCAGTAA 1494       |
| RIEEV02820 | GTTTTGACACAGGCAAACGATCTGCCACAGCAGGTATTGCAGATTCTGCAGTAA 1494       |

ŞEKİL C1      Cont'd

CLUSTAL 2.1 çoklu sekans dizilimi

```

RIFla2      ATGGTAGTTAATCATAATATGGCATTGATCTGTGAGAGTAGACAGTTACGATGTAATGTG 60
RIEEV02466 ATGGTAGTTAATCATAATATGGCATTGATCTGTGAGAGTAGACAGTTACGATGTAATGTG 60

RIFla2      AAGAACATGGAGAAGTCTTCAAAAAAGCTGGCAACAGGTTATAAATTGCTTGGAGCAAAT 120
RIEEV02466 AAGAACATGGAGAAGTCTTCAAAAAAGCTGGCAACAGGTTATAAATTGCTTGGAGCAAAT 120

RIFla2      GATGATGCAGCAGGATTACAGATATCAGAAACCATGCGTCATCAGACCAGAGGTCTTAAC 180
RIEEV02466 GATGATGCAGCAGGATTACAGATATCAGAAACCATGCGTCATCAGACCAGAGGTCTTAAC 180

RIFla2      AAAGCATCCAGAAATTCGCAAGATGGAATTAGTATGCTGCAGACAGCAGATGCAGCATT 240
RIEEV02466 AAAGCATCCAGAAATTCGCAAGATGGAATTAGTATGCTGCAGACAGCAGATGCAGCATT 240

RIFla2      CAGGAGACACAGGAAGTGTTGGATCGAATGACGGATCTGACAACACAGGCAGCTAATGAT 300
RIEEV02466 CAGGAGACACAGGAAGTGTTGGATCGAATGACGGATCTGACAACACAGGCAGCTAATGAT 300

RIFla2      ATCAATACGGATGCGGATCGTCGTGCAATTCAGGATGAAATCGATCAGTTAAATCAGGAA 360
RIEEV02466 ATCAATACGGATGCGGATCGTCGTGCAATTCAGGATGAAATCGATCAGTTAAATCAGGAA 360

RIFla2      GTGGATCGTATTGCATATACGACGAATTTAATCAGCAGTATATATTAGCGGATGGAAC 420
RIEEV02466 GTGGATCGTATTGCATATACGACGAATTTAATCAGCAGTATATATTAGCGGATGGAAC 420

RIFla2      CCGCAGGCAAGACCAGGATACTATATGATACAGACAGGAAGTCTTGCGGGACAGGGAATA 480
RIEEV02466 CCGCAGGCAAGACCAGGATACTATATGATACAGACAGGAAGTCTTGCGGGACAGGGAATA 480

RIFla2      GAGATTAAGTTTGTTAATGCGAGCAAAGAGAGCTTGGGTGTGGACAAGGTTGATGTATCA 540
RIEEV02466 GAGATTAAGTTTGTTAATGCGAGCAAAGAGAGCTTGGGTGTGGACAAGGTTGATGTATCA 540

RIFla2      TCGCATGCAAAAGCGACAGAATCTATAGCAGTGGTACAGAATGCAATTGAAAAGGCAGCT 600
RIEEV02466 TCGCATGCAAAAGCGACAGAATCTATAGCAGTGGTACAGAATGCAATTGAAAAGGCAGCT 600

RIFla2      TCGTTTAGAGATACATTTGGGGCACAACAGGAGCGGTTAGAACACGCATTGCGTGGAAACG 660
RIEEV02466 TCGTTTAGAGATACATTTGGGGCACAACAGGAGCGGTTAGAACACGCATTGCGTGGAAACG 660

RIFla2      GATAATACATCAGAAAGTACACAGAGGGCAGAAATCAAGTAGACGCGATACCAACATGAAT 720
RIEEV02466 GATAATACATCAGAAAGTACACAGAGGGCAGAAATCAAGTAGACGCGATACCAACATGAAT 720

RIFla2      ATGGAGATGGTACAATATTCTACAAACCGTATTTTAGTACAGGCATCTCAGAGTATTTTA 780
RIEEV02466 ATGGAGATGGTACAATATTCTACAAACCGTATTTTAGTACAGGCATCTCAGAGTATTTTA 780

RIFla2      GCACAGTACAATGATGATGCAAAATATGTGTTGGAAATGTTAAAATAG 828
RIEEV02466 GCACAGTACAATGATGATGCAAAATATGTGTTGGAAATGTTAAAATAG 828

```

## ŞEKİL C2

CLUSTAL 2.1 çoklu sekans dizilimi

```

RIFla3      ATGGTAGTACAGCACAATATGACCGCAATGAATGCGAACAGAATGTTAGGCGTTACAACA 60
RIEEV00779 ATGGTAGTACAGCACAATATGACCGCAATGAATGCGAACAGAATGTTAGGCGTTACAACA 60

RIFla3      AGCGCACAGGCAAAATCTTCAGAGAAATTATCTTCTGGTTACAGAATCAACCGTGCAGGT 120
RIEEV00779 AGCGCACAGGCAAAATCTTCAGAGAAATTATCTTCTGGTTACAGAATCAACCGTGCAGGT 120

RIFla3      GATGACGCTGCTGGTTTAAACAATTTCTGAGAAGATGAGAAGCCAGATCCGTGGATTAAAC 180
RIEEV00779 GATGACGCTGCTGGTTTAAACAATTTCTGAGAAGATGAGAAGCCAGATCCGTGGATTAAAC 180

RIFla3      AAAGCTTCTGACAACGCACAGGATGGTATTTCTTAATCCAGGTTGCTGAGGGTGCATTA 240
RIEEV00779 AAAGCTTCTGACAACGCACAGGATGGTATTTCTTAATCCAGGTTGCTGAGGGTGCATTA 240

RIFla3      TCTGAGACACATTCTATCTTACAGCGTATGAATGAGTTAGCTACTCAGGCTGCTAACGAT 300
RIEEV00779 TCTGAGACACATTCTATCTTACAGCGTATGAATGAGTTAGCTACTCAGGCTGCTAACGAT 300

RIFla3      ACCAATACAACCTGCTGATAGAGGAGCTATTCAGGATGAGATCAACCAGTTAACATCTGAG 360
RIEEV00779 ACCAATACAACCTGCTGATAGAGGAGCTATTCAGGATGAGATCAACCAGTTAACATCTGAG 360

RIFla3      ATTAACAGAATCTCTTCTACAACCTCAGTTCAATACTCAGAACCTCATCGATGGTACATTC 420
RIEEV00779 ATTAACAGAATCTCTTCTACAACCTCAGTTCAATACTCAGAACCTCATCGATGGTACATTC 420

RIFla3      GCAAAIAAAAACCTTCAGGTTGGTTCTATCTGTGGACAGAGAATTACTGTTTCTATCGAC 480
RIEEV00779 GCAAAIAAAAACCTTCAGGTTGGTTCTATCTGTGGACAGAGAATTACTGTTTCTATCGAC 480

RIFla3      AGTATGTCTGCTGGTAGCTTAAATGTATCTGCTAACTAGTAAAGGTTAACACTTTCAGT 540
RIEEV00779 AGTATGTCTGCTGGTAGCTTAAATGTATCTGCTAACTAGTAAAGGTTAACACTTTCAGT 540

RIFla3      GCAGCAGGTGAAGCAATGTCCAATATTCAGGGTGCTATTTCTGCAATTTCTACACAGCGT 600
RIEEV00779 GCAGCAGGTGAAGCAATGTCCAATATTCAGGGTGCTATTTCTGCAATTTCTACACAGCGT 600

RIFla3      TCTTACTTAGGAGCTCTTCAGAATCGTCTGGAGCATAACAATCTCCAATTGGACAACATT 660
RIEEV00779 TCTTACTTAGGAGCTCTTCAGAATCGTCTGGAGCATAACAATCTCCAATTGGACAACATT 660

RIFla3      TCTGAGAATACTCAGTCTGCTGAATCTCGTATCCGTGATACAGATATGGCTGAAGAGATG 720
RIEEV00779 TCTGAGAATACTCAGTCTGCTGAATCTCGTATCCGTGATACAGATATGGCTGAAGAGATG 720

RIFla3      GTTACTTACAGCAAGAACAATATTCTTGCTCAGGCAGGACAGTCTATGCTTGCTCAGGCT 780
RIEEV00779 GTTACTTACAGCAAGAACAATATTCTTGCTCAGGCAGGACAGTCTATGCTTGCTCAGGCT 780

RIFla3      AACCAGTCTACTCAGGGTGACTTTCTCTGTTACAGTAA 819
RIEEV00779 AACCAGTCTACTCAGGGTGACTTTCTCTGTTACAGTAA 819

```

### ŞEKİL C3



CLUSTAL 2.1 çoklu sekans dizilimi

```

RIFla4      ATGGCAATGGTAGTACAGCACAAACATGTCCGCAATGAATGCGAACAGAAATTTAGGTGTT 60
RIEU99488   ATGGCAATGGTAGTACAGCACAAACATGTCCGCAATGAATGCGAACAGAAATTTAGGTGTT 60

RIFla4      ACAACAGGAATGCAGGCAAAATCATCAGAGAAGTTATCTTCCGGTTACAAGATCAACCGT 120
RIEU99488   ACAACAGGAATGCAGGCAAAATCATCAGAGAAGTTATCTTCCGGTTACAAGATCAACCGT 120

RIFla4      GCAGCAGATGATGCAGCAGGACTTTCTATTTCTGAGAAGATGAGAAGCCAGATCCGCGGT 180
RIEU99488   GCAGCAGATGATGCAGCAGGACTTTCTATTTCTGAGAAGATGAGAAGCCAGATCCGCGGT 180

RIFla4      TTAAATAAAGCATCTGACAATGCACAGGATGGTATCTCTTTAATCCAGACCGCTGAGGGA 240
RIEU99488   TTAAATAAAGCATCTGACAATGCACAGGATGGTATCTCTTTAATCCAGACCGCTGAGGGA 240

RIFla4      GCATTAAATGAGTCCCACTCTATTTTACAGAGAATGAGAGAGTTATCCGTACAGGCAGCC 300
RIEU99488   GCATTAAATGAGTCCCACTCTATTTTACAGAGAATGAGAGAGTTATCCGTACAGGCAGCC 300

RIFla4      AACGGTACAGAGACAGATGACGACCGCGAGGCAGTACAGAACGAGGTTTCCAGTTACAG 360
RIEU99488   AACGGTACAGAGACAGATGACGACCGCGAGGCAGTACAGAACGAGGTTTCCAGTTACAG 360

RIFla4      GAAGAGCTGACAAGAATTTCTGAGACAACAGAGTTCAACACGATGAAGCTGCTGGATGGT 420
RIEU99488   GAAGAGCTGACAAGAATTTCTGAGACAACAGAGTTCAACACGATGAAGCTGCTGGATGGT 420

RIFla4      TCTCAGAGTGGAAGTACATCTTCAACCGGGTCAGGTCCGAAGTTTGGTGTGTAGATGCA 480
RIEU99488   TCTCAGAGTGGAAGTACATCTTCAACCGGGTCAGGTCCGAAGTTTGGTGTGTAGATGCA 480

RIFla4      ACATTAGACGGTGCACTTGTAACATCTAACGTGAAAGGTATTAAGTAGCAACAGCAGCT 540
RIEU99488   ACATTAGACGGTGCACTTGTAACATCTAACGTGAAAGGTATTAAGTAGCAACAGCAGCT 540

RIFla4      GCCACAACAACAAAGGCAGGTGAGGAGACTGCTATCTGGGCTGCTGATGGAAAGACATTA 600
RIEU99488   GCCACAACAACAAAGGCAGGTGAGGAGACTGCTATCTGGGCTGCTGATGGAAAGACATTA 600

RIFla4      ACTTTAAATCTTTCGAAAAATAAGGTATATACACAGGACGAAATTGATGACTTGATCGCA 660
RIEU99488   ACTTTAAATCTTTCGAAAAATAAGGTATATACACAGGACGAAATTGATGACTTGATCGCA 660

RIFla4      AATGCAAAACAGGAAGACAGTTCTGCAACGGGTGCACCGGCTGAAGTGAAAGTATCTTTA 720
RIEU99488   AATGCAAAACAGGAAGACAGTTCTGCAACGGGTGCACCGGCTGAAGTGAAAGTATCTTTA 720

RIFla4      AAGAATGGTATTTTAAATGCAGATGCAGACACAACGCGGAACTGTAACAGCCGGTGGT 780
RIEU99488   AAGAATGGTATTTTAAATGCAGATGCAGACACAACGCGGAACTGTAACAGCCGGTGGT 780

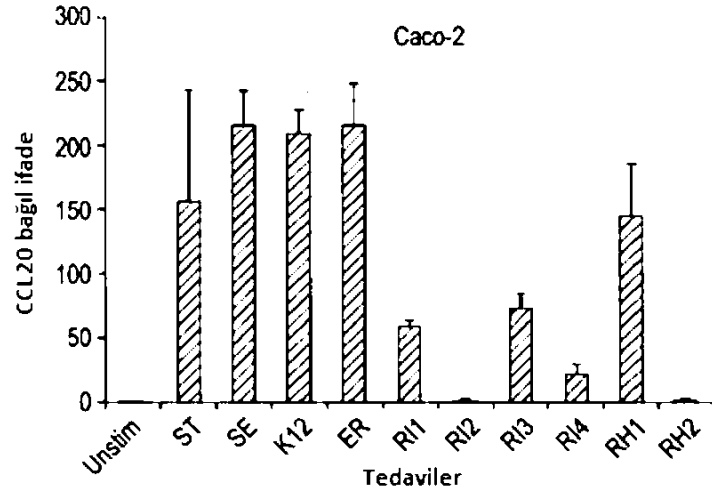
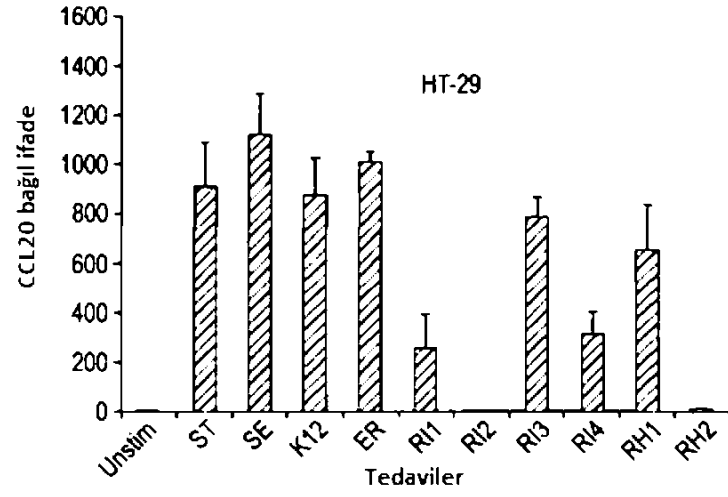
```

## ŞEKİL C4

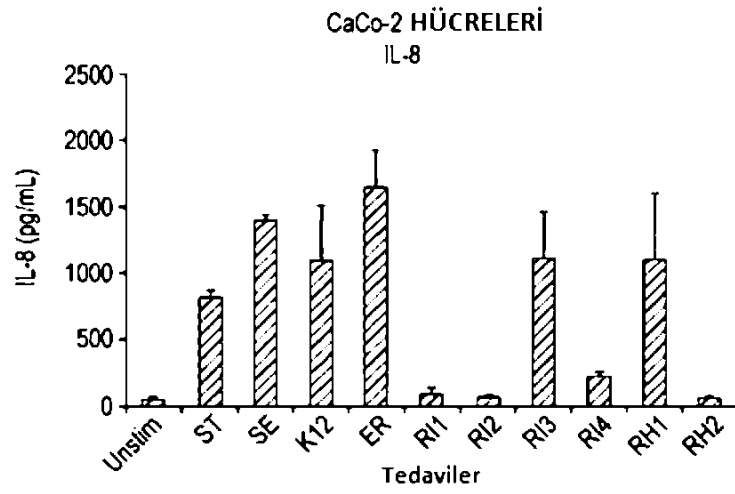
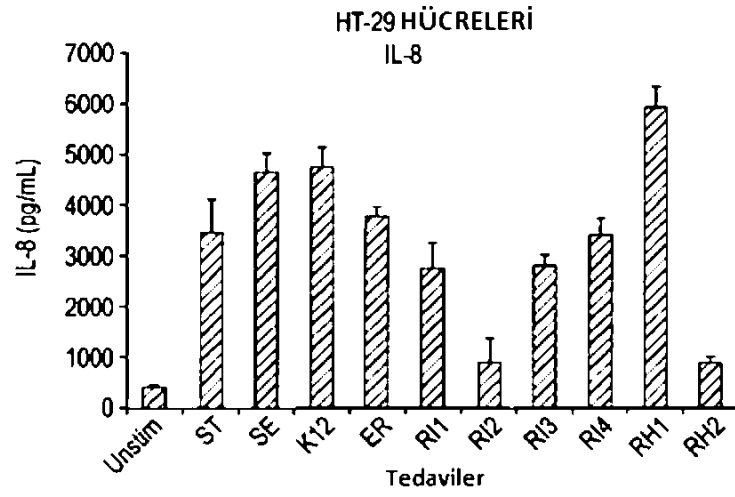
---

|            |                                                                    |
|------------|--------------------------------------------------------------------|
| RIF1a4     | GTGAAGGCAGTATCTGATGAAGGAACAGTAACTGGATTGTGGTGCAGATACAATTTCA 840     |
| RIEEU99488 | GTGAAGGCAGTATCTGATGAAGGAACAGTAACTGGATTGTGGTGCAGATACAATTTCA 840     |
| RIF1a4     | TTTACGGCAAATAAGTATGGAGCAGAGTTCAATGATACTGTATTTAAATTCAAATTTGAT 900   |
| RIEEU99488 | TTTACGGCAAATAAGTATGGAGCAGAGTTCAATGATACTGTATTTAAATTCAAATTTGAT 900   |
| RIF1a4     | AAGGCAGCAGGCAAAGAAGAAGTAGAGACAAATACAGCAATTGAAATTGATGGAGCAAAT 960   |
| RIEEU99488 | AAGGCAGCAGGCAAAGAAGAAGTAGAGACAAATACAGCAATTGAAATTGATGGAGCAAAT 960   |
| RIF1a4     | GCGGTAACAGCAGGTGAATATACAATTCATCTTGACAGCAGGCAAAGAATATACGGCAGAA 1020 |
| RIEEU99488 | GCGGTAACAGCAGGTGAATATACAATTCATCTTGACAGCAGGCAAAGAATATACGGCAGAA 1020 |
| RIF1a4     | GATTTAGAAGATGTTCTTAAACGGCAGGATTCGACTTTGATGTTAAATTAAGTGGAAAT 1080   |
| RIEEU99488 | GATTTAGAAGATGTTCTTAAACGGCAGGATTCGACTTTGATGTTAAATTAAGTGGAAAT 1080   |
| RIF1a4     | ACACCAGATGAGCCAAATACTTTATTTGCAACCAGTGGCGCATCAACTGTGACTGATATT 1140  |
| RIEEU99488 | ACACCAGATGAGCCAAATACTTTATTTGCAACCAGTGGCGCATCAACTGTGACTGATATT 1140  |
| RIF1a4     | ACAATGGGTGCTGGCACCGCCGGAGCTGGTCTTGGGAAGTACAGATGCTATGTGGGGGCAA 1200 |
| RIEEU99488 | ACAATGGGTGCTGGCACCGCCGGAGCTGGTCTTGGGAAGTACAGATGCTATGTGGGGGCAA 1200 |
| RIF1a4     | GCTGGTTATGACAGT-TATCTTCTGGTCTGGCATTACCTTGACAGATTGGTGCAAATGAA 1259  |
| RIEEU99488 | GCTGGTTATGACAGTGTATCTTCTGGTCTGGCATTACCTTGACAGATTGGTGCAAATGAA 1260  |
| RIF1a4     | GGTCAGACCATGAGTTTCTCTATCGATGACATGAGTGCAAGAGCACTTGGCGTAGATGGC 1319  |
| RIEEU99488 | GGTCAGACCATGAGTTTCTCTATCGATGACATGAGTGCAAGAGCACTTGGCGTAGATGGC 1320  |
| RIF1a4     | AACAAAGTTGATTTAAGCACACAGGCTGGCGCACAGAAAGCAACTGATACCATTGATGCA 1379  |
| RIEEU99488 | AACAAAGTTGATTTAAGCACACAGGCTGGCGCACAGAAAGCAACTGATACCATTGATGCA 1380  |
| RIF1a4     | GCAATCAAGAAAGTATCTGCACAGCGTGGTAGAATGGGTGCGATCCAGAACCGTCTGGAG 1439  |
| RIEEU99488 | GCAATCAAGAAAGTATCTGCACAGCGTGGTAGAATGGGTGCGATCCAGAACCGTCTGGAG 1440  |
| RIF1a4     | CACACCATCAGCAACCTTGATACAGCAGCAGAGAATACCCAGACTGCAGAGTCCCGTATC 1499  |
| RIEEU99488 | CACACCATCAGCAACCTTGATACAGCAGCAGAGAATACCCAGACTGCAGAGTCCCGTATC 1500  |
| RIF1a4     | CGTGATACAGATATGGCAGAAGAGATGGTTGAGTACTCCAAGAACAACATTCTTGACAG 1559   |
| RIEEU99488 | CGTGATACAGATATGGCAGAAGAGATGGTTGAGTACTCCAAGAACAACATTCTTGACAG 1560   |
| RIF1a4     | GCAGGTCAGTCTATGCTTGACAGGCGAACCAGTCTACACAGGGTGACTCTCCTTATTA 1619    |
| RIEEU99488 | GCAGGTCAGTCTATGCTTGACAGGCGAACCAGTCTACACAGGGTGACTCTCCTTATTA 1620    |
| RIF1a4     | CAGTAA 1625                                                        |
| RIEEU99488 | CAGTAA 1626                                                        |

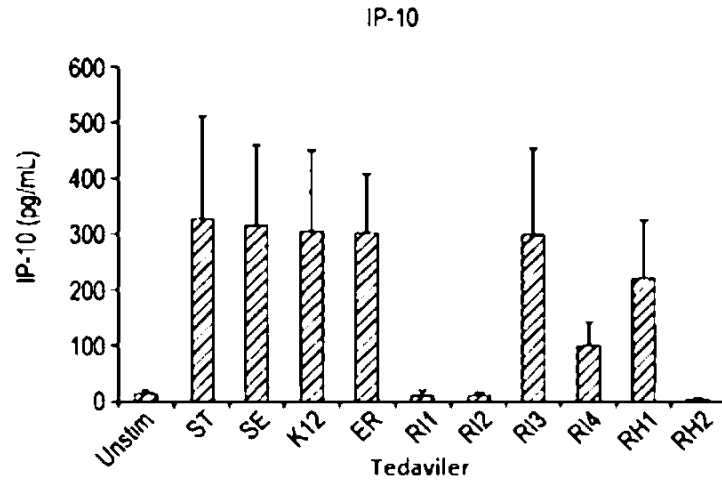
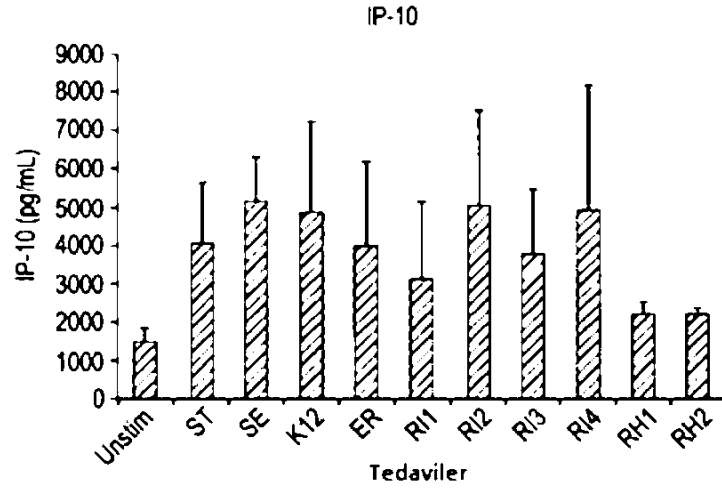
## ŞEKİL C4



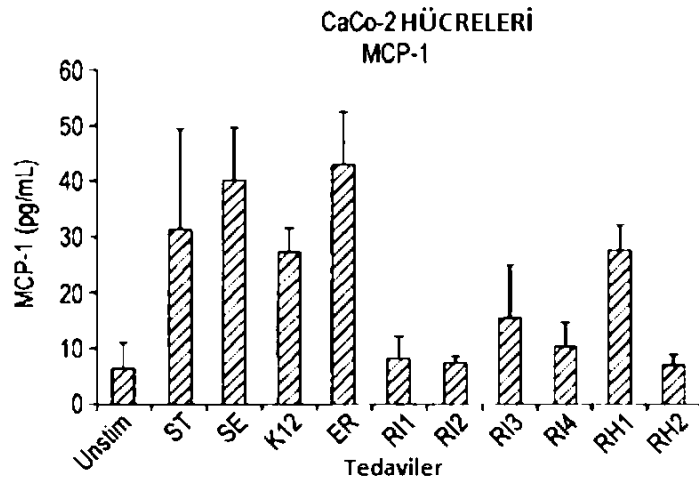
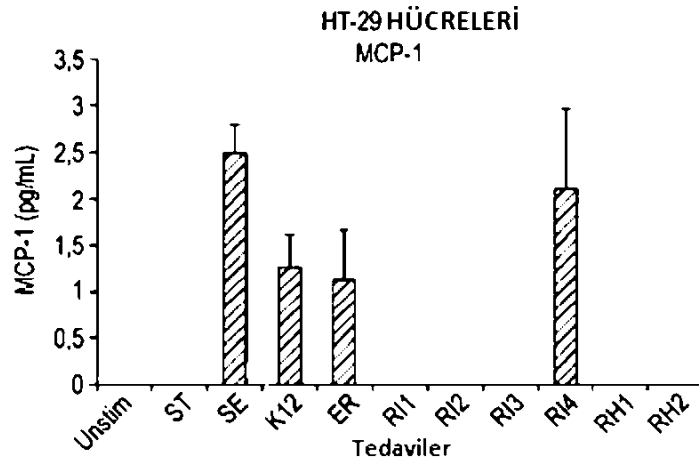
ŞEKİL D2



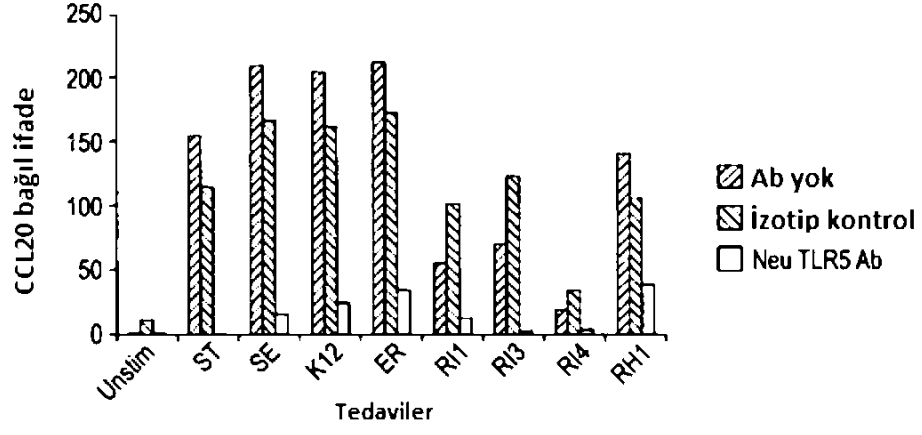
**ŞEKİL D3**



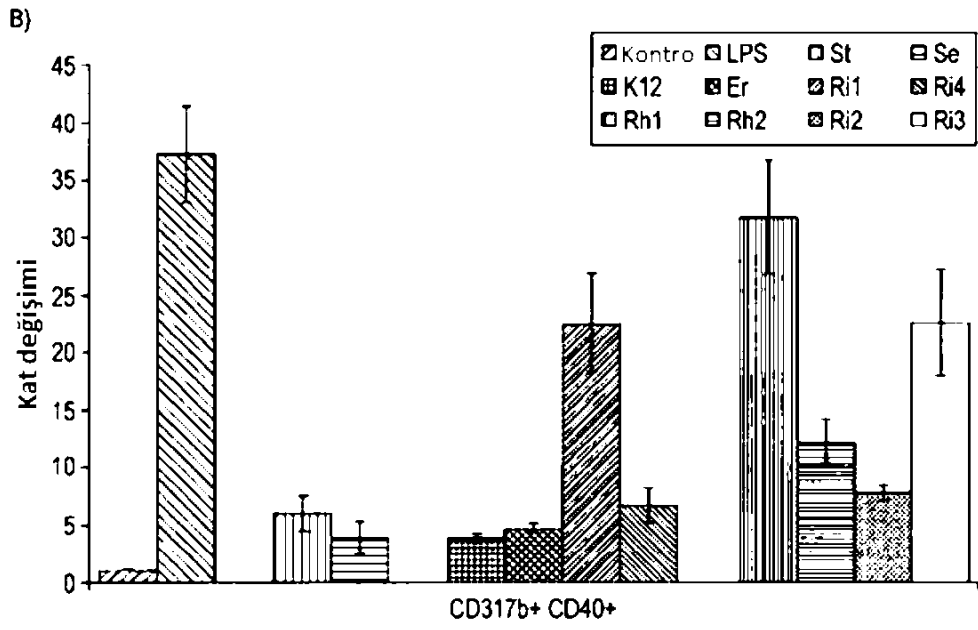
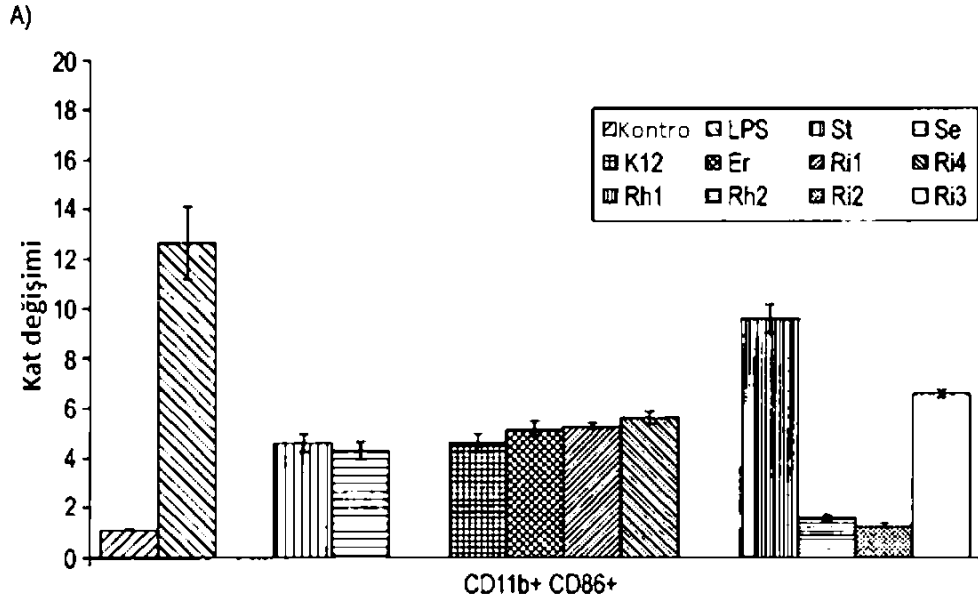
ŞEKİL D3



**ŞEKİL D3**

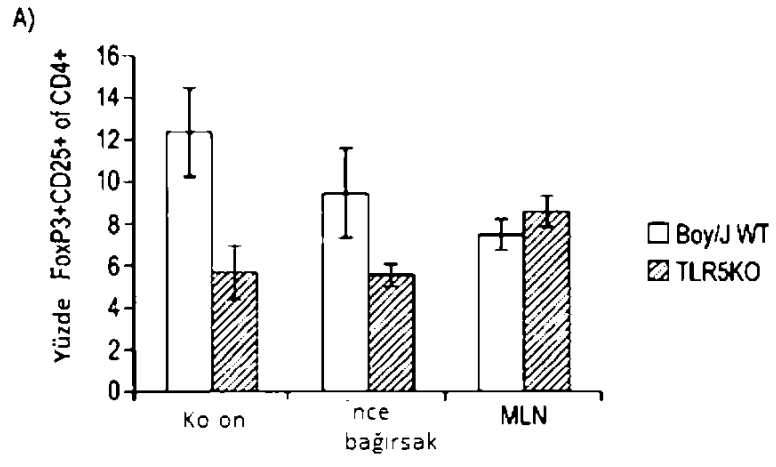


**ŞEKİL D4**



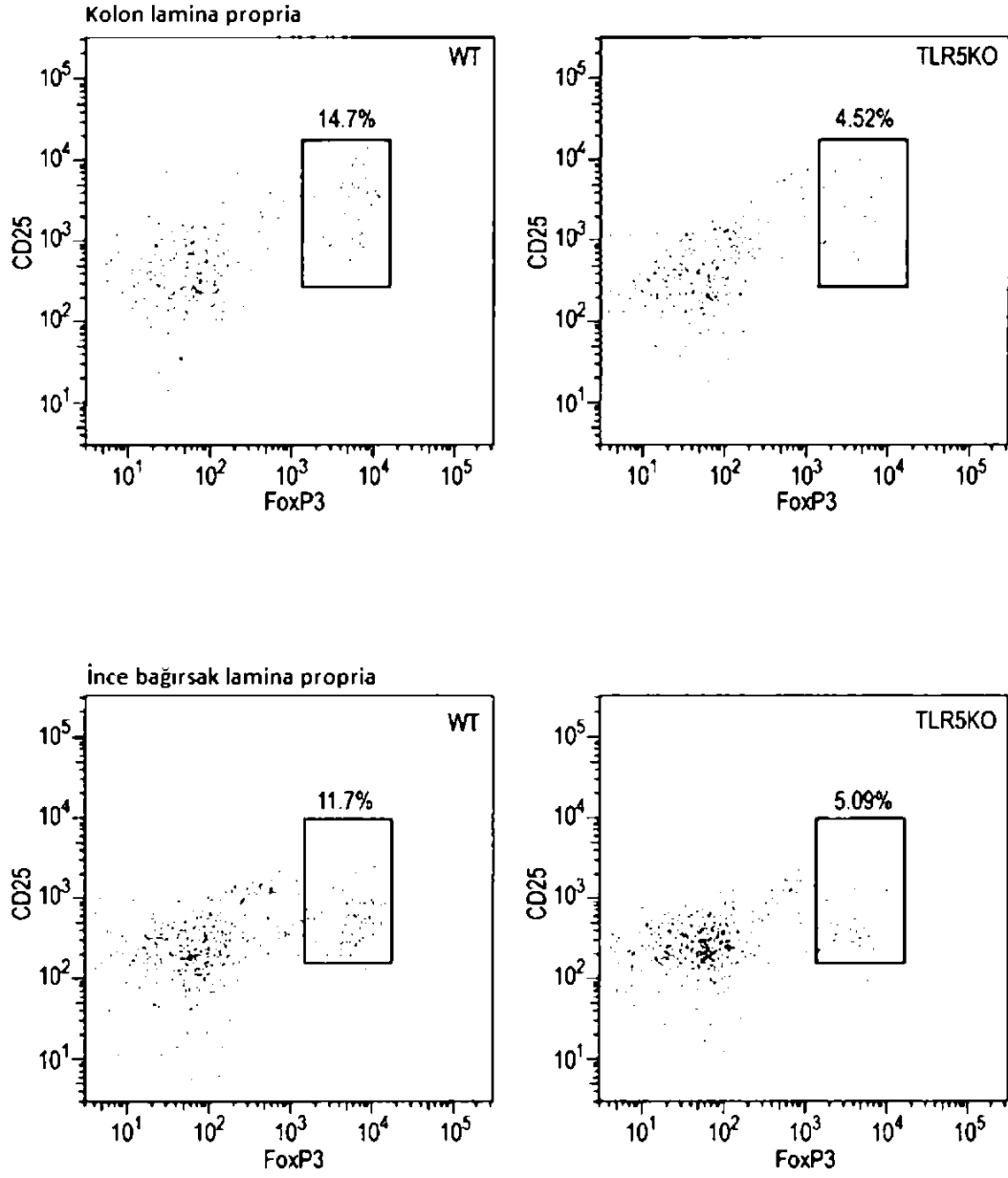
ŞEKİL D5



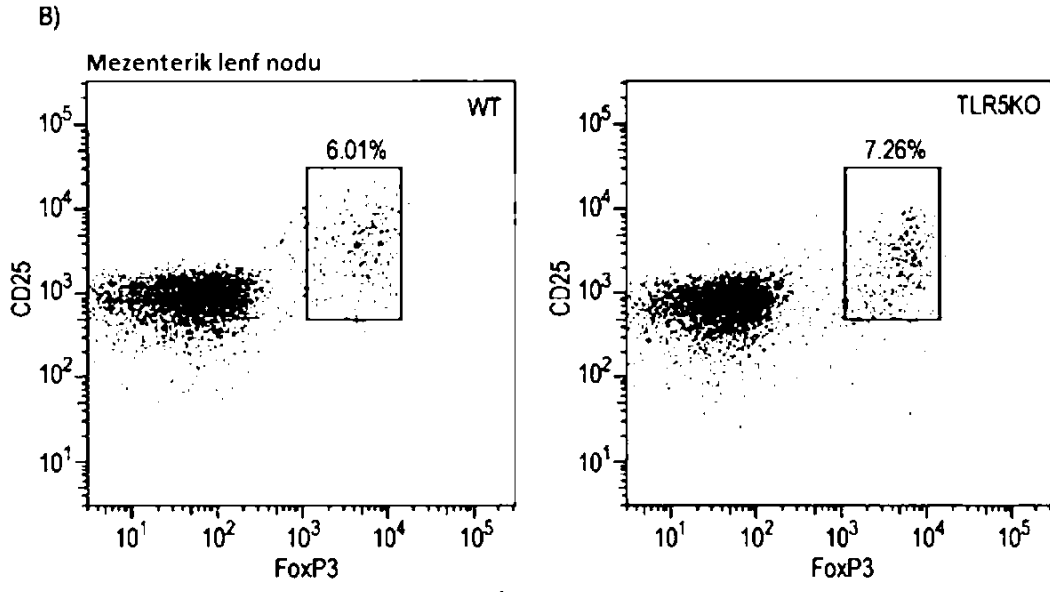


SEKİL D6

B)



ŞEKİL D6



ŞEKİL D6