Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τμήμα Βιολογίας

Διδακτορική Διατριβή

Ελβίρα Μητράκα

Η καταπολέμηση ασθενειών μεταφερόμενων από το κουνούπι με δύο προσεγγίσεις:

Η οδός της παραδιαγένεσης

Η οδός της οντολογίας

Ηράκλειο, 2014

Διδακτορική Διατριβή

Ελβίρα Μητράκα

Η καταπολέμηση ασθενειών μεταφερόμενων από το κουνούπι με δύο προσεγγίσεις:

Η οδός της παραδιαγένεσης

Η οδός της οντολογίας

Ηράκλειο, 2014

Το πρώτο μέρος της παρούσας εργασίας χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα της Ευρωπαϊκής Ένωσης FP7. Το δεύτερο μέρος χρηματοδοτήθηκε από την VectorBase, ένα ερευνητικό πρόγραμμα του Εθνικού Ινστιτούτου Αλλεργιών και Μολυσματικών Νόσων των ΗΠΑ (NIAID).

Επιβλέπων καθηγητής:

Χρήστος Λούης

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Χρήστος Λούης, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Ιωάννης Βόντας, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Ιωάννης Ηλιόπουλος, Λέκτορας Πανεπιστημίου Κρήτης

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Χρήστος Λούης, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Ιωάννης Βόντας, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Ιωάννης Ηλιόπουλος, Λέκτορας Πανεπιστημίου Κρήτης

Χρήστος Δελιδάκης, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Γεώργιος Ροδάκης, Καθηγητής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Νικόλαος Πουλακάκης, Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Χριστόφορος Νικολάου, Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Για την θεία μου.

Πάντα και τα πάντα.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Δεν γίνεται παρά να αναφέρω πρώτο τον κ. Λούη. Τον άνθρωπο που από τα προπτυχιακά μου χρόνια μου στάθηκε και με εμπιστεύτηκε. Ακόμα δεν ξέρω το γιατί. Χωρίς αυτόν δεν θα ήμουν εδώ, δεν θα είχα συνεχίσει για μεταπτυχιακό, πόσο μάλλον για διδακτορικό. Μου έδωσε ευκαιρίες που ούτε καν ήξερα ότι μπορούσα να έχω. Μακάρι να υπήρχαν και άλλοι καθηγητές – και άνθρωποι – σαν αυτόν.

Σε αυτό το σημείο να ευχαριστήσω και τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, τον Ιωάννη Βόντα και τον Ιωάννη Ηλιόπουλο. Όλα αυτά τα χρόνια ήταν δίπλα μου, για οποιοδήποτε απορία κι αν είχα. Ιδιαιτέρως ο κ. Βόντας, που μου παραχώρησε χώρο στο εργαστήριό του για την διεκπεραίωση κάποιων πειραμάτων.

Μετά περνάω στον Παντελή. Άλλος ένας άνθρωπος που νιώθω τυχερή και ευτυχισμένη που βρίσκεται στη ζωή μου. Τα καυστικά, αλλά πάντα πετυχημένα, σχόλιά του ήταν μία καθημερινή συντροφιά σε όλη αυτή την πορεία. Έχουμε περάσει άπειρες ώρες στον «Κάτω Κόσμο», σε όλες του τις μορφές. Μου έμαθε πολλά πράγματα, και όχι μόνο σχετικά με την βιολογία. Ακόμα του χρωστάω ένα ζευγάρι βατραχοπέδιλα…

Σε αυτόν τον «Κάτω Κόσμο» υπάρχουν και άλλα δύο άτομα που θα ήθελα να αναφέρω, ο Μανώλης και ο Γιάννης. Πραγματικά, τους ευχαριστώ.

Δεν θα μπορούσα να μην αναφέρω και όλα τα μέλη του εργαστηρίου, πρώην και νυν, με τα οποία συνεργαζόμαστε όλα αυτά τα χρόνια. Πέρα από την άψογη επαγγελματική μας σχέση υπήρχε και μία εξαιρετική προσωπική. Νιώθω τυχερή που πέρασα αυτά τα χρόνια με αυτά τα άτομα. Οπότε ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Inga, στον Λευτέρη, στην Έλενα, στην Rhiannon και στην Μαρία.

Ευχαριστώ τη μητέρα μου που με άντεξε και με αντέχει. Ειδικά στις στιγμές που η κούραση και τα νεύρα έβρισκαν αποκούμπι σε αυτήν. Ήταν πάντα εκεί, είτε ήξερα ότι τη χρειαζόμουν, είτε όχι. Είμαι από τα τυχερά άτομα που η μητέρα τους, τους αγαπάει χωρίς όρια. Οι θυσίες που έκανε για τα παιδιά της δεν τις κάνουν πολλοί. Την αγαπάω όσο δε φαντάζεται. Με ξέρει και για αυτό θα καταλάβει γιατί η συγκεκριμένη εργασία είναι αφιερωμένη σε κάποιον άλλον και νομίζω πως θα συμφωνήσει μαζί μου σε αυτό.

Τον πατέρα μου, γιατί έκανε αυτό που νόμιζε ότι ήταν σωστό.

Την αδερφή μου, που με έκανε να γελάω κι ας το έκανε άθελά της. Μπορεί να μη μοιάζουμε σε πολλά πράγματα, αλλά αυτό την κάνει ξεχωριστή. Ήταν σα να ήξερε πότε να μου στείλει μία άκυρη ερώτηση ή ένα αστείο για να με κάνει να ξεχαστώ. Όσο κι αν της το χτυπάω, δε θέλω να αλλάξει.

Τη Νίκη και τη Ράνια, που μπορεί εδώ και χρόνια να μην είναι πια στην Κρήτη, αλλά όποτε βρισκόμαστε είναι σα να μην πέρασε μια μέρα. Ήταν πάντα δίπλα μου, όση απόσταση κι αν μας χώριζε.

Την Αφροδίτη, η οποία θα είναι πάντα η Αντιγόνη μου.

Τον Μάνο, που είναι ο αδερφός που ποτέ δεν είχα, αλλά πάντα ήθελα.

Τα άτομα που ήταν κοντά μου και που έκαναν τα χρόνια στο ΙΤΕ ευχάριστα, τον Χρήστο, τη Σεμέλη, την Εμμανουέλλα, τον Κώστα, τον Γιώργο, τον Γιάννη και τον Παναγιώτη.

Τέλος, η εργασία αυτή είναι αφιερωμένη στη θεία μου. Λίγοι την έχουν ακουστά, αλλά όσοι ανήκουν σε αυτή την ομάδα ξέρουν πολύ καλά γιατί δεν γινόταν – και ούτε ήθελα – να κάνω αλλιώς.

Για εσένα, λοιπόν, θεία μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ 7

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ 10

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 12

ABSTRACT 13

ΕΙΣΑΓΩΓΗ 15

Η ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΜΕΣΩ ΠΑΡΑΔΙΑΓΕΝΕΣΗΣ 16

ΒΑΣΕΙΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ 21

ΟΝΤΟΛΟΓΙΕΣ 22

GENE ONTOLOGY 'GO' 23

OBO FOUNDRY 25

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 27

ΜΕΡΟΣ Α' 30

ΕΙΣΑΓΩΓΗ 30

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 31

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ASAIA SP. ΣΕ ΕΝΗΛΙΚΑ ΚΟΥΝΟΥΠΙΑ 31

ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ 36

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ 48

ΜΕΡΟΣ Β΄ 52

ΕΙΣΑΓΩΓΗ 52

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ 55

ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΟΝΤΟΛΟΓΙΑΣ 55

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΟΝΤΟΛΟΓΙΑΣ 61

ΔΕΔΟΜΕΝΟ ΜΕΤΡΗΣΗΣ (MEASUREMENT DATUM) 62

ΙΔΙΟΤΗΤΑ (QUALITY) 64

ΣΥΜΠΤΩΜΑ (SYMPTOM) 69

ΔΙΑΘΕΣΗ (DISPOSITION) 70

ΡΟΛΟΣ (ROLE) ΚΑΙ 'ΒΙΟΤΙΚΟ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ' (BIOTIC OBJECT) 72

ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ (BIOLOGICAL REGION) 74

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΓΙΑ ΕΛΕΓΧΟ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΟΥ ΔΑΓΚΕΙΟΥ (DENGUE RAPID DIAGNOSTIC TEST PRODUCTS), ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ (DIAGNOSTIC PROCEDURE) ΚΑΙ ΓΕΝΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ (GENERAL THERAPEUTIC TREATMENT) 75

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ (PROCESS) 78

ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΟΝΤΟΛΟΓΙΑΣ 84

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 90

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 92

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το κουνούπι είναι ένας από τους πιο επικίνδυνους οργανισμούς για τον άνθρωπο, λόγω της ικανότητάς του να δρα ως φορέας σε διάφορες ασθένειες, όπως είναι η ελονοσία και ο δάγκειος πυρετός. Για δεκαετίες γίνονται προσπάθειες αντιμετώπισης των νόσων, είτε από πλευράς του φορέα, είτε από πλευράς του παθογόνου. Μέχρι πρόσφατα, ο κύριος τρόπος αντιμετώπισης του φορέα ήταν τα εντομοκτόνα. Έχουμε φτάσει όμως σε ένα κομβικό σημείο της ανθεκτικότητας και για αυτόν τον λόγο η επιστημονική κοινότητα έχει στραφεί και σε άλλες μεθόδους, όπως αυτή της παραδιαγένεσης. Στην παρούσα διατριβή εξετάστηκε η καταλληλότητα του *Asaia* sp. να δράσει ως παράγοντας σε αυτή τη μέθοδο.

Τις τελευταίες δεκαετίες, στην προσπάθεια αντιμετώπισης του προβλήματος ήρθε να συμβάλει και η βιοπληροφορική, μέσω ανάπτυξης ενός πλήθους εργαλείων και της δημιουργίας βάσεων δεδομένων, όπου αποθηκεύεται ο τεράστιος όγκος πληροφοριών που παράγονται. Καθίσταται αναγκαίο τα εργαλεία αυτά να μπορούν να επικοινωνούν αφενός μεταξύ τους και αφετέρου με τα δεδομένα που υπάρχουν και που θα υπάρξουν μελλοντικά. Η λύση για αυτό το ζήτημα είναι οι οντολογίες. Με αυτό το σκεπτικό και στα πλαίσια αυτή της διατριβής αναπτύχθηκε η οντολογία του δάγκειου πυρετού, για να δράσει ως ο συνδετικός κρίκος ανάμεσα σε όλα αυτά τα εργαλεία.

ABSTRACT

The mosquito is one of the most dangerous organisms for the human, due to its ability to act as a vector to a multitude of diseases, e.g. malaria and dengue fever. There have been many attempts at combating those diseases in many decades, either looking at the problem from the side of the vector or from the side of the pathogen. Until recently, the main mode of defense against the vector was the use of insecticides, but we have reached a crucial point in the phenomenon of insecticide resistance. Thus, the scientific community is also starting to look into new avenues, one which is the method of paratransgenesis. Here, the suitability of *Asaia* sp. to act as an agent in this method was examined.

In the last few decades the field of bioinformatics has come to aid in this field, through the development of a slew of IT tools and data bases, wherein the huge amounts of information that are constantly produced, can be stored. It is imperative that those tools can not only communicate with each other, but also with the data available right now, and in the future. The solution to this matter are ontologies. Having in mind all those facts, we decided to develop the ontology of dengue fever, so that it can act as a linchpin between all those tools.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Εάν ρωτήσει κανείς τυχαία δέκα άτομα: «Ποιό είναι το πιο επικίνδυνο ζώο για τον άνθρωπο;» Οι απαντήσεις που θα πάρει θα αφορούν συνήθως κάποιο μεγαλόσωμο ζώο, όπως το λιοντάρι, ή τίγρης. Σαφώς και όλοι αυτοί οι οργανισμοί αποτελούν κίνδυνο για τον άνθρωπο, σε σχέση όμως με έναν άλλο οργανισμό, ο αριθμός των θυμάτων τους μοιάζει αμελητέος. Ο οργανισμός αυτός δεν είναι ένα ζώο το οποίο θα σκεφτεί κανείς αμέσως διότι είναι τόσο μικρός που μοιάζει ακίνδυνος. Ο οργανισμός αυτός είναι το κουνούπι. Μπορεί να φαντάζει περίεργο, αλλά όντως αυτό συμβαίνει. Κάθε χρόνο τα θύματα των νόσων που μεταδίδονται μέσω του κουνουπιού φτάνουν τα εκατομμύρια. Οι ασθένειες αυτές περιλαμβάνουν, ανάμεσα σε άλλες, την ελονοσία, τον δάγκειο πυρετό, την ιαπωνική εγκεφαλίτιδα και τον κίτρινο πυρετό.

Η παρούσα εργασία ασχολείται με το κουνούπι ως φορέας ασθενειών που προσβάλλουν τον άνθρωπο. Χωρίζεται σε δύο διακριτά μέρη:

Μέρος Α: Έρευνα σχετικά με την επίδραση του βακτηρίου *Asaia* sp. στα ενήλικα κουνούπια του είδους *Anopheles coluzzii,* και η ανάλυση των δεδομένων από υβριδοποίηση μικροσυστοιχίων με υλικό προερχόμενο από όλα τα προνυμφικά στάδια του ιδίου οργανισμού.

Μέρος Β: Δημιουργία και ανάπτυξη της οντολογίας του δάγκειου πυρετού (IDODEN), με σκοπό τη χρήση της για οργάνωση και διασύνδεση του τεράστιου όγκου πληροφοριών και την υποστήριξη εργαλείων, όπως το Σύστημα Διευκόλυνσης της Λήψης Αποφάσεων για το Δάγκειο Πυρετό (DDSS, Dengue Decision Support System).

Η προσέγγιση μέσω παραδιαγένεσης

Οι ασθένειες που μεταδίδονται από έντομα-φορείς προσβάλλουν μεγάλο ποσοστό ανθρώπων οδηγώντας, μεταξύ των άλλων, και σε μεγάλα ποσοστά θνησιμότητας. Μία από τις κύριες μεθόδους αντιμετώπισης της απειλής αυτής ήταν, και συνεχίζει να είναι, η χρήση των εντομοκτόνων. Δυστυχώς όμως για τον άνθρωπο, οι φορείς αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα με γρήγορους ρυθμούς (Rivero et al., 2010). Το γεγονός αυτό καθιστά αναγκαία την αναζήτηση και μία άλλης οδού για την καταπολέμηση της εξάπλωσης των ασθενειών αυτών.

Κάθε χρόνο καταγράφονται περίπου 300-350 εκατομμύρια κρούσματα ελονοσίας, τα οποία οδηγούν σε 0.7 εώς 3 εκατομμύρια θανάτους. Το μεγαλύτερο ποσοστό των θυμάτων είναι μικρά παιδιά που ζούνε στην Αφρική (Hay et al., 2005). Η ελονοσία μεταδίδεται από τα θηλυκά κουνούπια του γένους *Anopheles*. Κατά τη διάρκεια του τσιμπήματος, το θηλυκό κουνούπι αφαιρεί μία μικρή ποσότητα αίματος. Εάν το άτομο αυτό ήταν μολυσμένο με ελονοσία, το κουνούπι έχει πλέον μολυνθεί με παράσιτα του γένους *Plasmodium*. Τα παράσιτα αναπτύσσονται μέσα στο κουνούπι και όταν αυτό είναι έτοιμο για την επόμενη εισρόφηση μιας μικρής ποσότητας αίματος, μετά από περίπου τρεις εβδομάδες, εισχωρούν, μέσω της σιέλου του κουνουπιού, στον άνθρωπο. Ανάλογα με το είδος του παρασίτου, το χρονικό διάστημα απαιτούμενο για την έναρξη του πολλαπλασιασμού του στα ερυθρά αιμοσφαίρια μπορεί να κρατήσει από δύο εβδομάδες μέχρι και μήνες. Τα συμπτώματα που παρουσιάζονται συμπεριλαμβάνουν πυρετό και πονοκέφαλο. Σε σοβαρές περιπτώσεις ο ασθενής χειροτερεύει και μπορεί να πέσει σε κώμα και να οδηγηθεί ακόμη και στον θάνατο. Έχουν γίνει έντονες προσπάθειες τις τελευταίες δεκαετίες για την ανάπτυξη ενός εμβολίου, δυστυχώς όμως χωρίς κάποιο θετικό αποτέλεσμα (Marquardt, 2004).

Για τους παραπάνω λόγους, ένα μέρος της επιστημονικής κοινότητας έχει στρέψει την προσοχή του στην ανάπτυξη μίας νέας μεθόδου, η οποία βασίζεται στην γενετική επέμβαση των βακτηριακών συμβιωτικών οργανισμών που ζουν στις κοιλότητες του μεσεντέρου των φορέων. Η τροποποίηση των βακτηρίων έχει ως σκοπό την δημιουργία συμβιωτικών οργανισμών που να παράγουν μόρια καταπολέμησης του πλασμωδίου μέσα στο ίδιο το κουνούπι (Riehle and Jacobs-Lorena, 2005). Η μέθοδος αυτή ονομάζεται παραδιαγένεση.

Η γενετική τροποποίηση των βακτηρίων είναι πιο εύκολη και πιο γρήγορη από ότι η γενετική τροποποίηση των κουνουπιών. Τα βακτήρια είναι πολύ πιο εύκολο να εισχωρήσουν σε πληθυσμούς κουνουπιών και μπορούν να παραχθούν με μικρό κόστος σε μεγάλες ποσότητες. Πράγμα σημαντικό για την ιατρική βιομηχανία, ειδικά αν αναλογιστεί κανείς ότι οι χώρες που πλήττονται από ασθένειες, όπως ελονοσία και δάγκειο πυρετό, έχουν έλλειψη χρηματικών πόρων και ανθρώπινου δυναμικού. Πέραν τούτου, η είσοδος γενετικά τροποποιημένων βακτηρίων σε πληθυσμούς κουνουπιών θα προσπεράσει πιθανά γενετικά φράγματα, που συναντώνται σε αναπαραγωγικά απομονωμένους πληθυσμούς, όπως συμβαίνει συχνά στην ενδημική ελονοσία.

Υπάρχουν όμως κάποιες απαραίτητες προϋποθέσεις που πρέπει να τηρούνται ώστε να έχει θετικά αποτελέσματα αυτή η προσέγγιση (Damiani et al., 2010). Έχουν προταθεί έξι χαρακτηριστικά που είναι αναγκαία για μια επιτυχημένη στρατηγική ελέγχου των κουνουπιών μέσω της παραδιαγένεσης (Beard et al., 2002):

1. Συμβιωτική σχέση μεταξύ βακτηρίου και εντόμου-φορέα.
2. Η δυνατότητα της καλλιέργειας και γενετικής τροποποίησης του συμβιωτικού βακτηρίου.
3. Τα γενετικά τροποποιημένα βακτήρια πρέπει να παρουσιάζουν μία σταθερότητα
4. Η προσαρμοστικότητα των τροποποιημένων βακτηρίων στο εσωτερικό του φορέα δεν πρέπει να επηρεαστεί.
5. Θα πρέπει να υπάρχει δυνατότητα τα γενετικά τροποποιημένα βακτήρια να μπορούν να παράγουν μία ουσία που να καταπολεμάει τη νόσο.
6. Πρέπει να έχει βρεθεί ένα αποτελεσματικός τρόπος ώστε τα τροποποιημένα βακτήρια να εισαχθούν στο έντομο-φορέα.

Η πρώτη επιτυχημένη απόπειρα έγινε με τον μετασχηματισμό του συμβιωτικού βακτηρίου *Rhodococcus rhodnii,* του οποίου ξενιστής είναι το ημίπτερο *Rhodnius prolixus*, ένα έντομο-φορέας της νόσου του Chagas (Durvasula et al., 1997). Η νόσος του Chagas είναι μία τροπική παρασιτική νόσος που οφείλεται στο πρωτόζωο *Trypanosoma cruzi,* το οποίο εισέρχεται στο *Rhodnius prolixus* μέσω της τροφής, όταν αυτό ρουφάει αίμα από κάποιον μολυσμένο ξενιστή.

Το παράσιτο αναπτύσσεται στο μεσέντερο και μεταφέρεται στον επόμενο ξενιστή μέσω των περιττωμάτων του φορέα και όχι μέσω του σιέλου, όπως συμβαίνει σε άλλες ασθένειες. Το παράσιτο μπορεί να εισχωρήσει στον ξενιστή όταν αυτός τρίψει το σημείο του τσιμπήματος, μέσω μίας ανοιχτής πληγής ή των βλεννογόνων μεμβρανών.

Αυτό που καθιστά το *T. cruzi* ιδανικό για έλεγχο μέσω παραδιαγένεσης είναι το ότι το *R. prolixus* χρειάζεται το συμβιωτικό βακτήριο *R. rhodnii* για να επιζήσει (Baines, 1956; Harrington, 1960). Εάν οι προνύμφες του *R. prolixus* δεν προσλάβουν μέσω της στοματική οδού το *R. rhodnii* κατά το πρώτο ή δεύτερο προνυμφικό στάδιο, τότε

πεθαίνουν πριν φτάσουν στο τρίτο. Η απόλυτα εξαρτημένη αυτή σχέση το καθιστά ιδανικό βακτήριο για την παραδιαγένεση.

Το μόριο τελεστής που επιλέχθηκε να εκφράζεται και να εκκρίνεται από το *R. rhodnii* ήταν το Cecropin A. Ένα αντιμικροβιακό πεπτίδιο μήκους 38 αμινοξέων. Το Cecropin A επιτίθεται στα μικρόβια με την εισχώρησή του στις κυτταρικές μεμβράνες, όπου και δημιουργεί πόρους, το οποίο οδηγεί σε κυτταρική λύση και στον θάνατο. Το πεπτίδιο λύει αποτελεσματικά τα κύτταρα του *T. cruzi* χωρίς να προσβάλλει τον ξενιστή, *R. prolixus,* ή τα συμβιωτικά βακτήρια (Durvasula et al., 1997).

Έχοντας ως πρότυπο την επιτυχία του παραπάνω συστήματος, έχουν γίνει προσπάθειες για μία παρόμοια προσέγγιση για το κουνούπι του γένους *Anopheles*. Απομονώθηκαν τα συμβιωτικά βακτήρια του *An. stephensi*, ένα των οποίων ήταν το *Asaia* sp. (Favia et al., 2007). Το συναντάμε κυρίως στα άνθη του plumbago, ενός τροπικού φυτού. Έχει αποδειχθεί ότι το *Asaia* συμβιώνει χωρίς αρνητικές επιπτώσεις στις προνύμφες και στα ενήλικα κουνούπια του είδους *An. stephensi* και ότι είναι το κυρίαρχο βακτήριο στο μεσέντερο του κουνουπιού. Ανάλυση με PCR έδειξε ότι DNA του *Asaia* υπήρχε στα αυγά, στα διάφορα προνυμφικά στάδια, στις νύμφες και σε μια πληθώρα των εσωτερικών οργάνων του κουνουπιού, όπως το μεσέντερο, οι σιελογόνοι αδένες, οι όρχεις και οι ωοθήκες (Favia et al., 2007).

Τα βακτήρια τροποποιήθηκαν με πλασμίδια που εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) και χρησιμοποιήθηκαν για να μολύνουν εκ νέου κουνούπια του είδους *An. stephensi.* Τα τροποποιημένα βακτήρια βρέθηκαν στα εσωτερικά όργανα του κουνουπιού, όπως σιελογόνοι αδένες και μεσέντερο, τα οποία είναι τοποθεσίες για την ανάπτυξη παθογόνων. Βρέθηκαν επίσης στους απογόνους των κουνουπιών που είχαν μολυνθεί με τα τροποποιημένα βακτήρια (Favia et al., 2007).

Το βακτήριο *Asaia* εμφανίζει όλα τα απαιτούμενα οικολογικά χαρακτηριστικά, καθιστώντας το τον καλύτερο υποψήφιο για την ανάπτυξη μιας προσέγγισης μέσω

της παραδιαγένεσης, για την επέμβαση στην μεταφορική ικανότητα ασθενειών του κουνουπιού. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι τα εξής:

1. Κυριαρχία ανάμεσα στην εσωτερική πανίδα του κουνουπιού
2. Καλλιεργήσιμο σε απλό θρεπτικό υγρό
3. Ευκολία στον μετασχηματισμό με ξένο DNA
4. Ευρεία κατανομή στα σώματα των προνυμφών και των ενηλίκων

Όλα τα παραπάνω τοποθετούν το *Asaia* στις πρώτες θέσεις για να αποτελέσει ένα πιθανότατα πολύ χρήσιμο εργαλείο για τη μάχη με την ελονοσία, ίσως ακόμη και για περισσότερες ασθένειες, που μεταφέρονται μέσω των κουνουπιών.

Βάσεις βιολογικών δεδομένων

Μία βιολογική βάση δεδομένων είναι ένα μεγάλο, οργανωμένο σώμα από δεδομένα, συνήθως συσχετισμένη με προγράμματα σχεδιασμένα για την ανανέωση, αναζήτηση και ανάκτηση των δεδομένων μέσα στο σύστημα. Μία απλή βάση μπορεί να αποτελείται από ένα αρχείο με πολλαπλά δεδομένα, από τα οποία κάθε ένα να περιέχει το ίδιο σετ πληροφοριών. Για παράδειγμα, δεδομένα που σχετίζονται με βάσεις δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών συνήθως περιλαμβάνουν πληροφορίες όπως την αλληλουχία με μία περιγραφή του τύπου του σωματιδίου, την επιστημονική ονομασία του οργανισμού από τον οποίο απομονώθηκε και βιβλιογραφικές αναφορές.

Για να έχουν οι ερευνητές όφελος από τα δεδομένα που υπάρχουν στη βάση, δύο επιπλέον προϋποθέσεις πρέπει να τηρούνται:

1) Εύκολη και γρήγορη πρόσβαση στις πληροφορίες
2) Ύπαρξη μίας μεθόδου για εξαγωγή μόνο των πληροφοριών που ζητήθηκαν μέσω μίας συγκεκριμένης ερώτησης

Πριν αρκετά χρόνια, στην προ-γονιδιωματική εποχή, οι βιολογικές βάσεις δεδομένων ισορροπούσαν ακόμα με τον όγκο των δεδομένων που υπήρχε. Μετά την ανάλυση της δομής του DNA από τους Watson και Crick (Watson and Crick, 1953), παρουσιάστηκε μία έξαρση στον κλάδο της μοριακής βιολογίας και ο συνεχώς αυξανόμενος όγκος πληροφοριών έπρεπε να κατανεμηθεί και να οργανωθεί. Αυτό έγινε ακόμα πιο εμφανές μετά την ανεύρεση μεθόδων αλληλούχισης του DNA στα

τέλη του 1970, όπως επίσης και με την αρχή των προγραμμάτων αλληλούχισης γονιδιωμάτων στα τέλη του 1980. Όλα αυτά συντέλεσαν σε μία ακόμα ταχύτερη έρευνα σε αυτόν τον τομέα. Η προσπάθεια να συμβαδίσουν οι οργανωμένες βάσεις δεδομένων γινόταν όλο και πιο έντονη.

Η ύπαρξη πολλών βάσεων αρχικά ικανοποίησε αρκετούς ερευνητές γρήγορα όμως παρουσιάστηκαν τα πρώτα προβλήματα. Όλες αυτές οι βάσεις λειτουργούσαν αυτόνομα και ήταν ανεξάρτητες μεταξύ τους. Έτσι όμως δεν θα μπορούσαν ποτέ να πραγματοποιήσουν ολόκληρο το δυναμικό τους. Ήταν αναγκαίο να βρεθεί ένας τρόπος ώστε να μπορέσουν όλες οι πληροφορίες να οργανωθούν και να ιεραρχηθούν, για να είναι δυνατή η επιτυχής χρήση των βάσεων.

Οντολογίες

Ο τρόπος αυτός βρέθηκε με την μορφή των οντολογιών. Τι ακριβώς όμως είναι οι οντολογίες; Με την ευρεία έννοια η οντολογία είναι μία μελέτη των συλλήψεων της πραγματικότητας και της φύσης. Στην φιλοσοφία η οντολογία είναι μία μελέτη του είναι ή της ύπαρξης και σχηματίζει το βασικό θέμα του μεταφυσικού. Προσπαθεί να περιγράψει τις βασικές κατηγορίες και σχέσεις και να ορίσει οντότητες και τους τύπους τους.

Οι οντολογίες είναι κάτι παραπάνω από απλά, οργανωμένα λεξιλόγια (controlled vocabularies, CV). Σε μία οντολογία δεν αναφέρονται απλώς οι όροι, αλλά δίνεται και ένας ορισμός, περιγράφονται οι σχέσεις και το πως συνδέονται οι διάφοροι όροι μεταξύ τους. Δεν υπάρχει μόνο ένα είδος σχέσης σύνδεσης.

Όταν δουλεύει κανείς με οντολογίες είναι αναγκαίο να θυμάται γιατί αυτές είναι τόσο χρήσιμες και εύχρηστες, κάποιες κατευθυντήριες γραμμές είναι:

- η χρήση ήδη υπαρχουσών οντολογιών
- η αλλαγή ήδη υπαρχουσών οντολογιών
- η ενσωμάτωση ήδη υπαρχουσών οντολογιών
- ανεύρεση σφαλμάτων μεταξύ οντολογιών
- διατήρηση ισορροπίας ανάμεσα στην εξειδίκευση και στο μέγεθος κατά την δημιουργία μίας οντολογίας
- αποφυγή μη αναγκαίας πολυπλοκότητας η οποία πιθανότατα να αποτρέψει την ευρεία χρήση
- διατήρηση συμβατότητας με άλλα πρότυπα

Στο πλαίσιο της VectorBase (Lawson et al., 2007; Lawson et al., 2009; Megy et al., 2012), ξεκινήσαμε, ως εργαστήριο, με την ανάπτυξη μίας ομάδας οντολογιών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την περιγραφή αρθροπόδων που μεταφέρουν ασθένειες και ασθενειών που μεταδίδονται από έντομα-φορείς (Topalis et al., 2011). Οι οντολογίες αυτές ασχολούνται με την ανατομία του κουνουπιού και του τσιμπουριού (Topalis et al., 2008), με την ανθεκτικότητα του κουνουπιού σε εντομοκτόνα (Dialynas et al., 2009) και με την ελονοσία γενικά (Topalis et al., 2010).

Gene Ontology 'GO'

Ένα από τα πρώτα λειτουργικά συστήματα ιεράρχησης δημιουργήθηκε το 1993 από την Monica Riley για την *Escherichia coli* (Riley, 1993). Βασισμένος κυρίως σε αυτό το σύστημα ο Michael Ashburner έστησε τα θεμέλια για κάτι που αργότερα θα εξελισσόταν στην Gene Ontology (GO) (Ashburner et al., 2000; Gene Ontology, 2001), αρχικά κυρίως για τις ανάγκες της FlyBase (Tweedie et al., 2009). Πέντε χρόνια αργότερα, το 1998, οι τρεις μεγάλες βάσεις δεδομένων που σχετίζονται με

οργανισμούς μοντέλα: η FlyBase, η Saccharomyces Genome Database (SGD) (Cherry et al., 2012) και η Mouse Genome Database (MGD) (Blake et al., 2014) αποφάσισαν να δεχτούν την πρόταση του Michael Ashburner για τη δημιουργία ιεραρχικών, οργανωμένων λεξιλογίων, τη δημιουργία των οντολογιών και την υιοθέτηση τους στην περιγραφή των μοριακών λειτουργιών και βιολογικών ρόλων για κάθε γονίδιο στην αντίστοιχη βάση δεδομένων.

Η GO δεν χρησιμοποιείται μονάχα για επισημείωση γονιδίων, γονιδιωμάτων και σχετικών πειραμάτων (Beissbarth, 2006; Lewis et al., 2000; Thomas et al., 2007), αλλά έχει οδηγήσει και στην ανάπτυξη επιπλέον εργαλείων της επιστήμης της πληροφορικής τα οποία έχουν ενισχύσει σημαντικά την ανάλυση των δεδομένων που λαμβάνονται από μία πληθώρα ερευνών. Για παράδειγμα, συγκεκριμένες αναζητήσεις σε βάσεις δεδομένων έχουν αποκτήσει ένα νέο επίπεδο, εφόσον είναι πλέον δυνατόν να αναζητήσει κανείς για κοινές ιδιότητες, όπως κυτταρικός εντοπισμός και λειτουργίες, σε αποθήκες που εμπεριέχουν δεδομένα από διαφορετικούς οργανισμούς που έχουν αποκτηθεί με ποίκιλες μεθοδολογίες από μία πληθώρα ερευνητών. Αυτή η διασύνδεση και επικοινωνία των βάσεων δεδομένων, ίσως να είναι η πιο αποδοτική χρήση οντολογιών και ειδικότερα της GO (Bodenreider, 2008).

Στα 13 χρόνια από την δημοσίευση της GO έχουν αναπτυχθεί δεκάδες καινούριες οντολογίες βιολογικού περιεχομένου που συλλέγονται σε αποθήκες πληροφοριών όπως η OBO Foundry (The Open Biological and Biomedical Ontologies Foundry) (Smith et al., 2007) και το National Center for Biomedical Ontologies (NCBO) (Whetzel et al., 2011). Η πληθώρα των οντολογιών αυτών καλύπτουν ένα μεγάλο φάσμα της βιολογίας, όπως ανατομία, δομή και φυσιολογία.

OBO Foundry

Με την ραγδαία ανάπτυξη της βιολογίας αλλά και τις τεχνολογίας των υπολογιστών σήμερα, υπάρχει η δυνατότητα δημιουργίας και συντήρησης εκτενών βάσεων δεδομένων οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, χρησιμοποιώντας πολλαπλά αρχεία που αποτελούνται από οργανωμένα λεξιλόγια (controlled vocabularies). Στην ιδανική περίπτωση τα λεξιλόγια αυτά έχουν την μορφή οντολογιών, αυτό σημαίνει ότι είναι δομημένες με τέτοιο τρόπο ώστε να υπάρχει μία λογική σχέση μεταξύ τους.

Η επιτυχία αυτής της γενικής προσέγγισης στην έξαρση βιοϊατρικών πληροφοριών έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη συγκεκριμένων αρχών και κανόνων κατά την δημιουργία οντολογιών, που έχουν αρχίσει να εφαρμόζονται μέσω της OBO Foundry. Ήδη υπάρχουσες οντολογίες όπως η GO, υφίστανται διορθώσεις και νέες οντολογίες δημιουργούνται σε μία οργανωμένη προσπάθεια να δημιουργηθεί μία οικογένεια οντολογιών, σχεδιασμένες να αλληλεπιδρούν και να αναπαριστούν ορθά την βιολογική πραγματικότητα.

Οι οντολογίες της OBO Foundry αποτελούν, από το 2006, κομμάτι του NCBO. Οι οντολογίες αυτές είναι μία προσπάθεια για τη δημιουργία μίας ομάδας οντολογιών που θα περιγράφουν όλους τους τομείς του βιοϊατρικού πεδίου. Η οικογένεια αυτή των οντολογιών είναι σχεδιασμένη με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι εύκολη η επικοινωνία μεταξύ των μελών της και να εμπεριέχουν ορθή αναπαράσταση του βιολογικού κόσμου.

Βασικές αρχές της OBO-Foundry

1) Οι οντολογίες είναι ανοιχτές και διαθέσιμες σε όλους να τις χρησιμοποιήσουν με τον όρο να αναφέρουν την πηγή και αν τις τροποποιήσουν οι ίδιοι καθ' οποιονδήποτε τρόπο να μην τις διαθέσουν με το ίδιο όνομα σε κανέναν. Ο προτεινόμενος τρόπος αλλαγών είναι να ζητηθεί από αυτούς που δημιούργησαν την οντολογία να την τροποποιήσουν ανάλογα.
2) Οι οντολογίες πρέπει να έχουν αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας ένα κοινό συντακτικό πρότυπο.
3) Στα πλαίσια της OBO Foundry οι οντολογίες διαθέτουν ένα μοναδικό αναγνωριστικό στοιχείο το οποίο κληρονομείται σε κάθε όρο της οντολογίας και συνήθως αποτελείται από ένα πρόθεμα κι έναν αριθμό.
4) Υπάρχει σαφής τρόπος διάκρισης ανάμεσα στις διαφορετικές εκδόσεις/ενημερώσεις της ίδιας οντολογίας.
5) Όλοι οι όροι πρέπει να διαθέτουν ένα μόνο γονικό όρο με τον οποίο να συνδέονται με την σχέση *is_a.*
6) Η οντολογία έχει ένα καθαρά διαχωρισμένο περιεχόμενο.
7) Η οντολογία περιέχει ορισμούς για όλους τους όρους.
8) Η οντολογία πρέπει να χρησιμοποιεί σχέσεις που είναι μονοσήμαντα ορισμένες κατ' αναλογία αυτών που υπάρχουν στην οντολογία σχέσεων που συντηρεί η OBO Foundry (Smith and Grenon, 2004).
9) Όπου είναι δυνατόν, οι νέοι όροι πρέπει να προκύπτουν από ήδη υπάρχοντες όρους και σχέσεις που ήδη υπάρχουν σε άλλες οντολογίες της OBO Foundry. Για να προστεθούν νέοι όροι σε κάποια άλλη οντολογία προτείνεται μια διαδικασία ανάλογη με αυτή των αλλαγών που περιγράφεται στην πρώτη αρχή.
10) Οι οντολογίες θα αναπτύσσονται με την χρήση της βασικής τυπικής οντολογίας σαν οντολογία ανώτερου επιπέδου.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Το κουνούπι

Το είδος κουνουπιού που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν το *Anopheles coluzzii* (παλαιότερα γνωστό ως η μορφή M του *An. gambiae*) (Coetzee et al., 2013). Τα κουνούπια μεγάλωναν σε στάνταρ συνθήκες: 16/8 κύκλος φωτός/σκοταδιού, θερμοκρασία 28°C, υγρασία 80% ενώ τα πειράματα έλαβαν χώρα σε ελαφρώς διαφορετικές συνθήκες: 16/8 κύκλος φωτός/σκοταδιού, θερμοκρασία 27°C, υγρασία 60%. Ελέγχθηκε ότι οι διαφορετικές συνθήκες δεν είχαν επίδραση στα αποτελέσματα.

Μόλυνση προνυμφών και ενήλικων κουνουπιών με Asaia sp. SF2.1(Gfp)

Asaia sp. SF2.1 (Gfp) (Favia et al., 2007) αναπτύσσονταν σε καλλιέργειες 3ml για 48 ώρες σε 30°C σε θρεπτικό GLY (γλυκερόλη 25g/l, εκχύλισμα ζύμης 10g/l, pH 5.0), στο οποίο προσθέτονταν 50mg/ml καναμυκίνης. Τα κύτταρα συλλέγονταν και πλένονταν με PBS τρεις φορές. 50ml από το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύονταν σε 1ml PBS. Πενήντα προνύμφες *A. gambiae* του πρώτου σταδίου μεταφέρονταν σε δοχείο με 500ml νερό. Στα μισά δοχεία προσθέτονταν το βακτήριο.

Το μεσέντερο των ενήλικων κουνουπιών αφαιρούνταν και παρατηρούνταν με τη χρήση του Zeiss Axioskop 2 μαζί με μικροσκόπιο φθορισμού.

Απομόνωση RNA (RNA extraction)

Μετά την αρχική μόλυνση με *Asaia*, δέκα προνύμφες αφαιρούνταν από την καλλιέργεια ανά 24 ώρες, έως ότου φτάσουν στο στάδιο της νύμφης. Πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση και απομόνωση του RNA ακολουθώντας τις οδηγίες για ολόκληρους οργανισμούς του Qiagen RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia,

CA, USA; cat. no. 74104), μαζί με το Qiagen RNase-free DNase set (cat. no. 79524) Η μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA έγινε με το φασματοφωτόμετρο Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Τα δείγματα φυλάσσονταν στους -80°C.

Μικροσυστοιχίες (Microarrays)

Τα δείγματα προερχόμενα από την εξαγωγή RNA συγκεντρώθηκαν σε δύο ομάδες. Η μία ομάδα αποτελούνταν από δείγματα από το πρώτο και δεύτερο προνυμφικό στάδιο και η άλλη από δείγματα από το τρίτο και τέταρτο προνυμφικό στάδιο. Το RNA πολλαπλασιάσθηκε και σημάνθηκε με το Agilent Low Input Quick Amp Labeling Kit, two-color (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA; Agilent #5190-2306). Ακολούθησε η υβριδοποίηση του RNA με συστοιχίες της Agilent (όνομα: Pfalcip_Agamb_2009, design ID: 026247) (http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/arrays/A-MEXP-2324/), με τη χρήση του kit υβριδοποίησης της Agilent σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μετά την υβριδοποίηση και τις πλύσεις τα πλακίδια με τις μικροσυστοιχίες περάστηκαν από έναν σαρωτή GenePix (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA; Genepix4000B).

Ανάλυση δεδομένων των μικροσυστοιχίων (Microarray data analysis)

Τα ακατέργαστα δεδομένα της γονιδιακής έκφρασης που προήλθαν από την υβριδοποίηση μικροσυστοιχιών εξήχθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού GenePix Pro Software v7 και εισήχθησαν στο λογισμικό GeneSpring GX για περαιτέρω ανάλυση. Ακολούθησε η κανονικοποίηση των σετ των δεδομένων και όλα τα δεδομένα ερμηνεύτηκαν με την χρήση της log-ratio ρύθμισης. Τα γονίδια που επηρεάστηκαν από την ύπαρξη του *Asaia* στον οργανισμό τους ταυτοποιήθηκαν θέτοντας ως όρια την υπερ- ή υπο-έκφραση μεγαλύτερη του 2 και p-value < 0.05.

Επίσης χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση της Gene Ontology (GO), για την ανεύρεση των κατηγοριών της GO, στις οποίες ανήκουν τα γονίδια.

Δημιουργία και ανάπτυξη της οντολογίας

Για την δημιουργία και την ανάπτυξη της οντολογίας χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Protégé 4 (http://protege.stanford.edu) (Noy et al., 2003). Το Protégé είναι γραμμένο στη γλώσσα Java. Αυτό το γεγονός το καθιστά δυνατό να εγκατασταθεί και χρησιμοποιηθεί σε οποιοδήποτε λειτουργικό σύστημα (Windows, Linux, OSX), αρκεί να υπάρχει εγκατεστημένη η πιο πρόσφατη έκδοση της Java στον υπολογιστή. Το Protégé είναι ελεύθερο λογισμικό, το οποίο σημαίνει ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί από οποιονδήποτε χωρίς κάποια χρέωση. Η γλώσσα που επιλέχθηκε να γραφτεί η οντολογία είναι η OWL (Web Ontology Language) (McGuinness and van Harmelen, 2004).

Υπολογιστής

Ο υπολογιστής που χρησιμοποιήθηκε για την διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας είχε την παρακάτω σύνθεση:

Επεξεργαστής: CPU Intel Core i7 3.40G 8MB i7x2600

Μητρική: Gigabyte P67-DS3-B3 LGA 1155 P67 DDR3

Γραφικά: Asus Nvidia GT 520 1GB DDR3

Μνήμη: Kingston DDR3 4 x 2GB 1333MHz

Σκληρός δίσκος: SSD Corsair Force 3 Series 2,5'' SATA3 120GB

Λειτουργικό σύστημα: Ubuntu Release 11.10 & 12.04

ΜΕΡΟΣ Α’

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παραδιαγένεση είχε χρησιμοποιηθεί παλαιότερα, με επιτυχία, για την καταπολέμηση της μετάδοσης νόσων (Durvasula et al., 1997). Η επιστημονική κοινότητα στράφηκε προς αυτή την προσέγγιση και για την καταπολέμηση της ελονοσίας σχετικά πρόσφατα, αφού το πρόβλημα της ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα είχε φτάσει σε ανησυχητικά επίπεδα (Enayati and Hemingway, 2010).

Από το εργαστήριό μας είχε γίνει μία προηγούμενη έρευνα για την επίδραση του βακτηρίου *Asaia* sp. στα προνυμφικά στάδιο του κουνουπιού *An. coluzzii.* Ως συνέχεια της έρευνας αυτής και για να παρουσιαστεί μία, όσο το δυνατότερο, ολοκληρωμένη εικόνα του θέματος, πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα του Μέρους Α’ της διδακτορικής αυτής διατριβής.

Σκοπός ήταν η διερεύνηση της ικανότητας τους βακτηρίου να δράσει ως μέσο στην μέθοδο της παραδιαγένεσης στο *An. coluzzii*.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Επίδραση του Asaia sp. σε ενήλικα κουνούπια

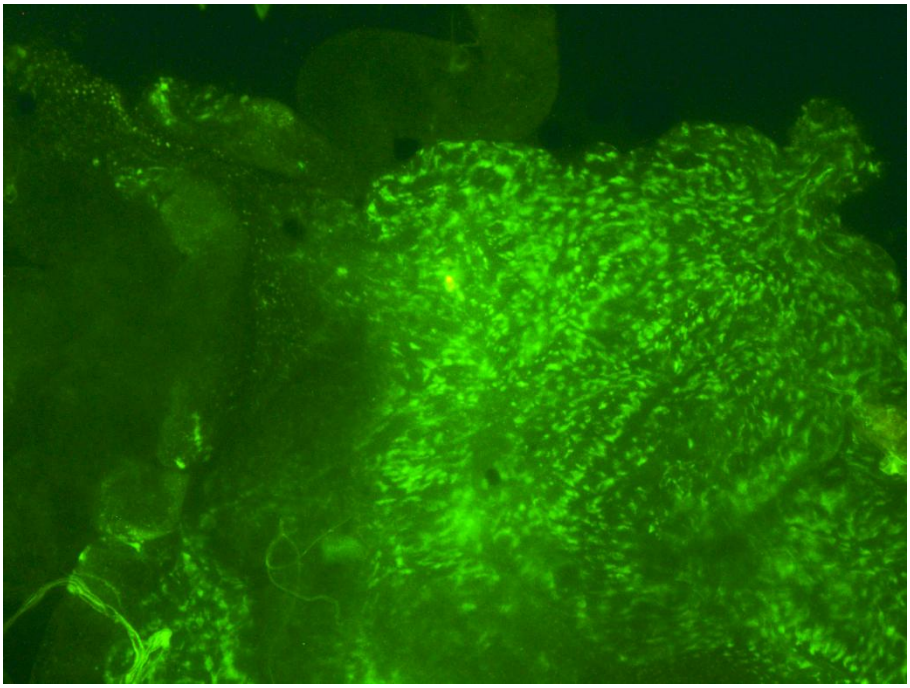
Σε προηγούμενη έρευνα είχε αποδειχθεί ότι η μόλυνση του κουνουπιού *An. coluzzii,* το οποίο κατά τη διάρκεια της έρευνας ήταν γνωστό ως *An. gambiae* M molecular form (Coetzee et al., 2013), με το *Asaia sp. οδηγεί* στην επιτάχυνση της ανάπτυξης στο προνυμφικό στάδιο (Mitraka, 2010). Ως συνέχεια αυτής έρευνας αποφασίστηκε να εξεταστεί εάν το βακτήριο αυτό έχει την ίδια ή και κάποια άλλη επίδραση στο ενήλικο στάδιο του κουνουπιού και αν μεταφέρεται στους απογόνους αυτών.

Αρχικά μολύνθηκαν εκ νέου προνύμφες του *An. coluzzii* με *Asaia sp*. Το στέλεχος του βακτηρίου που χρησιμοποιήθηκε ήταν το SF2.1, το οποίο είναι ανθεκτικό στην καναμυκίνη και εκφράζει την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP, λόγω εισαγωγής ενός πλασμιδίου (Favia et al., 2007). Οι προνύμφες παρουσίασαν την επιτάχυνση της ανάπτυξης στο προνυμφικό τους στάδιο, όπως ήταν αναμενόμενο, και αφέθηκαν να εισέλθουν στο στάδιο της νύμφης, ώστε να περάσουν μετέπειτα στο ενήλικο στάδιο. Η διαδικασία αυτή διήρκησε από 7 έως 9 μέρες για τα κουνούπια που είχαν μολυνθεί, ενώ 9 έως 11 για τα κουνούπια που αναπτύσσονταν για τη χρήση του θετικού ελέγχου (Πίνακας 1).

	Μολυσμένα	**Μη μολυσμένα**
24 ώρες	Προνύμφες 1^{ου} σταδίου	Προνύμφες 1^{ου} σταδίου
48 ώρες	Προνύμφες 2^{ου} σταδίου	Προνύμφες 1^{ου} σταδίου
72 ώρες	Προνύμφες 3^{ου} σταδίου	Προνύμφες 2^{ου} σταδίου
96 ώρες	Προνύμφες 4^{ου} σταδίου	Προνύμφες 2^{ου} σταδίου
5 ημέρες	Προνύμφες 4^{ου} σταδίου/Νύμφες	Προνύμφες 3^{ου} σταδίου
6 ημέρες	Νύμφες /Ενήλικα	Προνύμφες 3^{ου} σταδίου
7 ημέρες	Νύμφες / Ενήλικα	Προνύμφες 4^{ου} σταδίου
8 ημέρες	Ενήλικα	Νύμφες
9 ημέρες	Ενήλικα	Νύμφες / Ενήλικα

Πίνακας 1. Η επιταχυμένη ανάπτυξη των προνυμφών προερχόμενες από μολυσμένα κουνούπια.

Κάθε 5 μέρες πραγματοποιούνταν απομόνωση του εντέρου σε 10 κουνούπια, θηλυκά και αρσενικά, ώστε να ελεγχθούν για την ύπαρξη του βακτηρίου. Η παρουσία των βακτηρίων ήταν ορατή σε όλες τις διαφορετικές χρονικές περιόδους, μέχρι και έως 3 μέρες πριν τον θάνατο των κουνουπιών (Εικόνα 1). Να τονιστεί εδώ ότι δεν παρατηρήθηκε κάποια μείωση στον χρόνο ζωής των μολυσμένων κουνουπιών σε σχέση με τα μη μολυσμένα. Ο χρόνος ζωής και για τις δύο κατηγορίες κυμαίνονταν από 27 έως 30 περίπου ημέρες. Δεν παρατηρήθηκε κάποια άλλη μορφολογική επίδραση του βακτηρίου στους οργανισμούς. Τα μολυσμένα κουνούπια δεν παρουσίασαν κάποια διαφορά στη συμπεριφορά τους, σε σχέση με τα μη μολυσμένα.

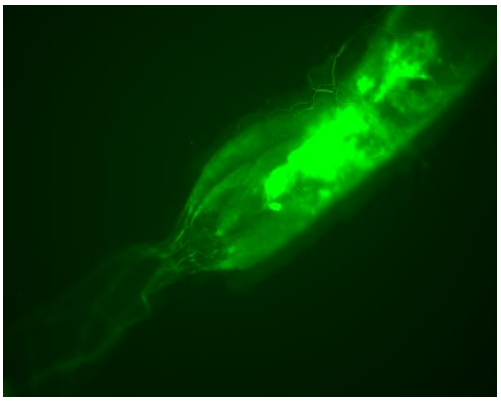


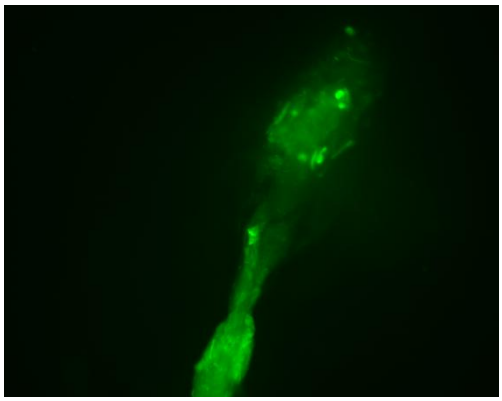
Εικόνα 1. Μέρος του εντέρου ενός μολυσμένου κουνουπιού, ηλικίας 24 ημερών. Είναι εμφανής ο πράσινος φθορισμός λόγω της ύπαρξης του γενετικά τροποποιημένου Asaia.

Δεδομένου των παραπάνω αποτελεσμάτων, το επόμενο ερώτημα που τέθηκε ήταν εάν τα ενήλικα αυτά άτομα μπορούσαν να αναπαραχθούν και να δημιουργήσουν απογόνους. Τα θηλυκά και τα αρσενικά κουνούπια μπορούν να επιζήσουν μόνο με γλυκόζη ως τροφή, χωρίς να παρουσιάσουν κάποιο πρόβλημα. Για την αναπαραγωγή τους όμως είναι απαραίτητη η σίτιση των θηλυκών με αίμα. Αποφασίστηκε να ταΐστούν τα θηλυκά με αίμα ώστε να μπορέσουν να γεννήσουν. Κατά πρώτον, παρατηρήθηκε ότι δεν υπήρχε κάποια μετατροπή στον απαιτούμενο για τη γέννηση των αυγών χρόνο. Κατά δεύτερον, δεν παρουσιάστηκε αλλαγή στον αριθμό των αυγών που γεννήθηκαν. Και τέλος, κατά τρίτον, παρατηρήθηκε ότι οι προνύμφες δεν εμφάνιζαν την επιτάχυνση στην ανάπτυξή τους.

Αυτό οδήγησε στην εκ νέου εξαγωγή του εντέρου στις προνύμφες για να ελεγχθεί εάν το βακτήριο υπήρχε στον οργανισμό τους. Συγκεκριμένα ελέγχθηκαν προνύμφες

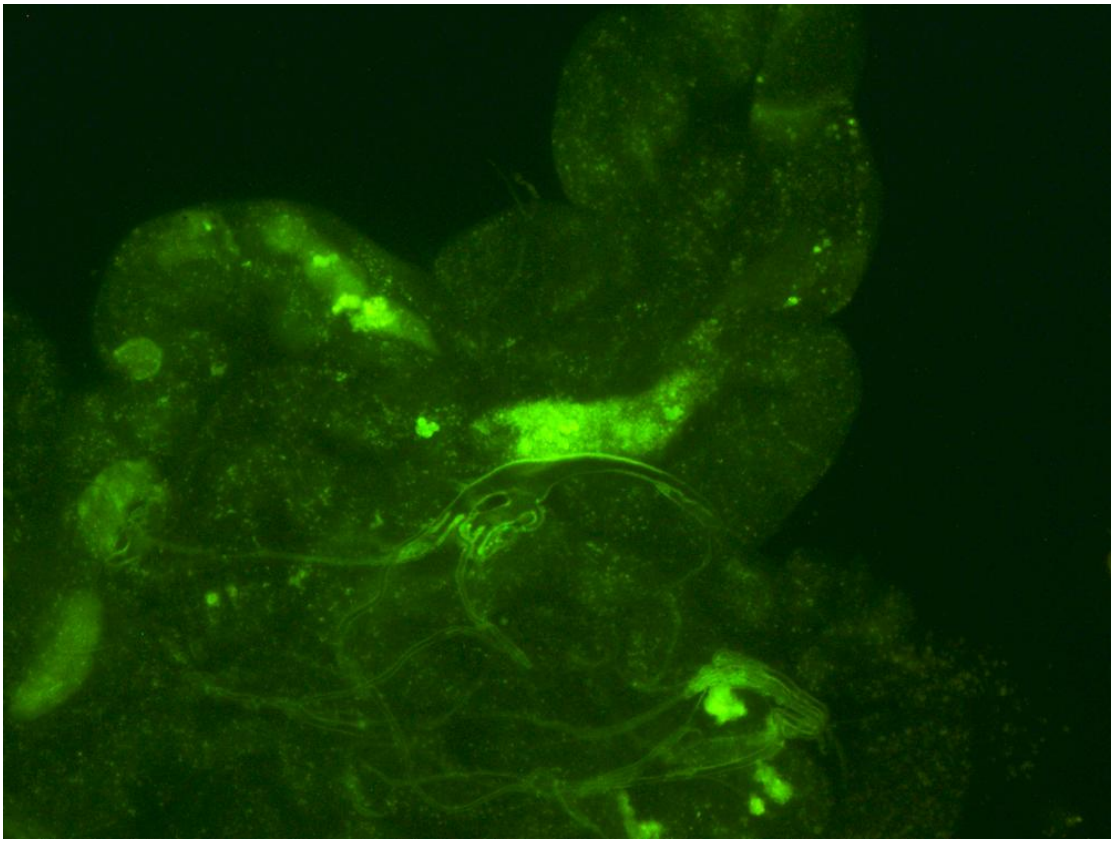
3^{ου} και 4^{ου} σταδίου (Εικόνα 2). Το βακτήριο υπήρχε στο έντερο των προνυμφών, χωρίς όμως να τους προσδίδει το χαρακτηριστικό της επιταχυμένης ανάπτυξης.


A


B

Εικόνα 2. Α) Έντερο προνύμφης 3^{ου} σταδίου και Β) Έντερο προνύμφης 4^{ου} σταδίου.

Οι προνύμφες αφέθηκαν να αναπτυχθούν φυσιολογικά, χωρίς νέα μόλυνση με το βακτήριο. Παρουσίασαν τον φυσιολογικό για το είδος τους ρυθμό ανάπτυξης και έφτασαν στο στάδιο του ενήλικου χωρίς να είναι εμφανής κάποια άλλη τροποποίηση. Ακολούθησε εξαγωγή του μεσέντερου σε ενήλικα, θηλυκά και αρσενικά, και παρατήρηση σε φθορίζον μικροσκόπιο (Εικόνα 3). Εκεί επιβεβαιώθηκε και πάλι η ύπαρξη του *Asaia*. Επίσης μετρήθηκε ο χρόνος ζωής των ενήλικων, όπου και δεν σημειώθηκε κάποια μείωση, σε σχέση με τα μη μολυσμένα κουνούπια. Ο χρόνος ζωής του ήταν περίπου 27-30 μέρες, γεγονός που θεωρείται φυσιολογικό για στέλεχος κουνουπιών που μεγαλώνει σε εργαστηριακές συνθήκες.

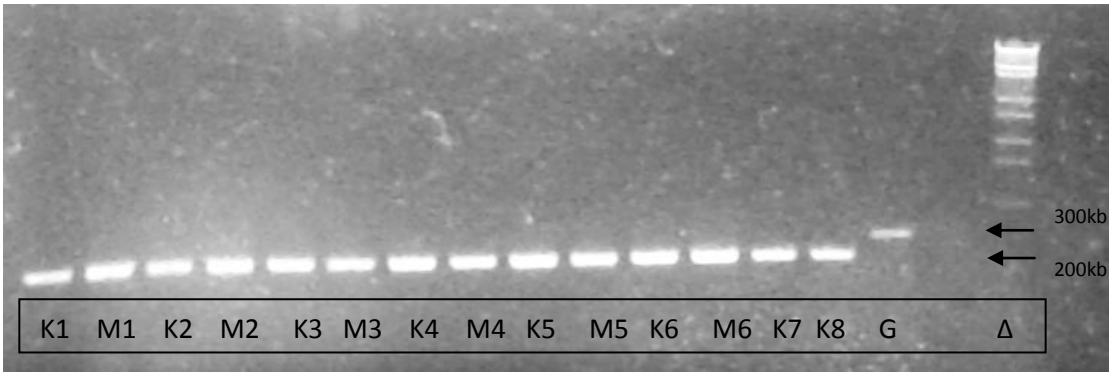


Εικόνα 3. Μέρος του μεσέντερου ενός μολυσμένου κουνουπιού, ηλικίας 21 ημερών. Είναι εμφανής ο πράσινος φθορισμός λόγω της ύπαρξης του γενετικά τροποποιημένου Asaia.

Μικροσυστοιχίες

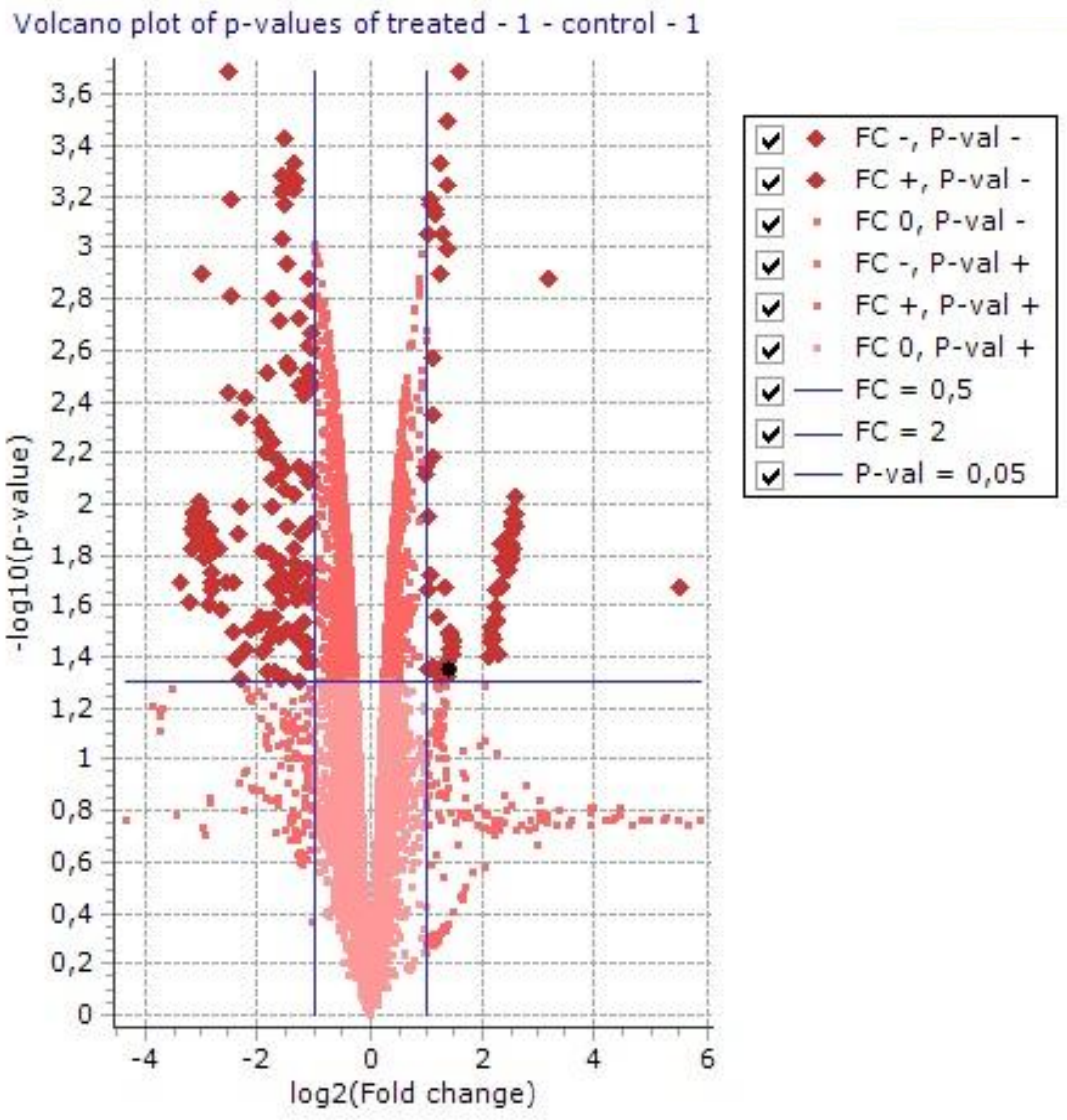
Έχοντας παρατηρήσει τα αποτελέσματα που περιγράφηκαν πιο πάνω δημιουργήθηκε η απορία για το τι είναι αυτό που θα μπορούσε να επηρεάζει το βακτήριο στον οργανισμό της προνύμφης, ώστε να οδηγεί στον φαινότυπο αυτό. Η οδός που επιλέχτηκε να ακολουθηθεί για την απάντηση του ερωτήματος ήταν οι μικροσυστοιχίες. Με τον τρόπο αυτό θα αποκαλύπτονταν το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων υπό τις συνθήκες που ήταν το ζητούμενο να μελετηθούν.

Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε απομόνωση του RNA από μολυσμένες και μη μολυσμένες προνύμφες. Η απομόνωση του RNA γινόταν κάθε 24 ώρες σε 10 προνύμφες της κάθε κατηγορίας, μέχρι να φτάσουν στο στάδιο της νύμφης. Λόγω των διαφορετικών ρυθμών ανάπτυξης στις δύο ομάδες, αποφασίστηκε τα δείγματα να χωριστούν σε δύο ομάδες. Η ομάδα Α περιείχε το RNA από προνύμφες που βρισκόταν στο πρώτο και στο δεύτερο στάδιο και η ομάδα Β το RNA από προνύμφες του τρίτου και τέταρτου σταδίου. Για να επιβεβαιωθεί ότι όντως είχε απομονωθεί καθαρό RNA χρησιμοποιήθηκε RT-PCR ώστε να παραχθεί cDNA. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι S7, οι οποίοι αναγνωρίζουν ριβοσωμικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες. Το προϊόν που δίνουν έχει μοριακό βάρος περίπου 200kb για cDNA, ενώ για γονιδιωματικό DNA το προϊόν αυτό έχει μοριακό βάρος περίπου 300kb. Για αυτό και χρησιμοποιήθηκε ως θετικός έλεγχος. (Εικόνα 4). Έπειτα ακολούθησε η παραγωγή cDNA κατάλληλου για τη χρήση μικροσυστοιχιών. Στο βήμα αυτό ελέγχθηκε και η καταλληλότητα του απομονωμένου RNA, όπου και δεν παρουσιάστηκε κάποιο πρόβλημα.

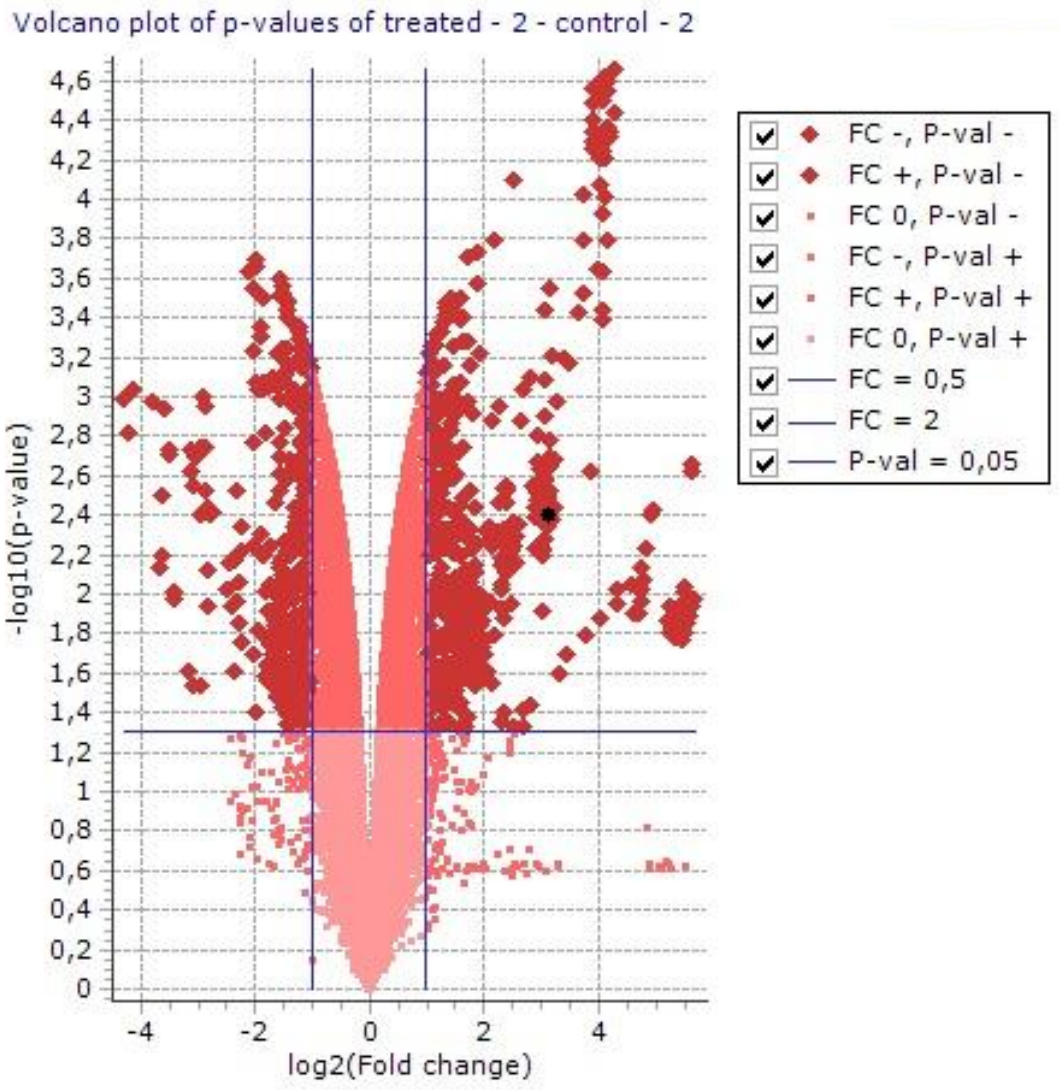


Εικόνα 4. Τα αποτελέσματα της RT-PCR με cDNA προερχόμενο από το απομονωμένο RNA μολυσμένων και μη μολυσμένων προνυμφών. K = μη μολυσμένα, M = μολυσμένα και Δ = δείκτης.

Το πλακίδιο που χρησιμοποιήθηκε για την υβριδοποίηση ήταν της Agilent, συγκεκριμένα το Pfalcip_Agamb_2009, design ID: 026247. Η ανάλυση της υβριδοποίησης έδειξε ότι στην ομάδα Α, η σύγκριση μεταξύ μολυσμένων και μη μολυσμένων, 205 γονίδια είχαν σημαντική υπερ- ή υπο-έκφραση. Στην ομάδα Β είχαμε 825 γονίδια που είχαν σημαντικές διαφορές στην έκφρασή τους. Τα όρια που τέθηκαν για να θεωρηθούν σημαντικές οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης ήταν i) πάνω από δύο φορές υπέρ- ή υπο-έκφραση και ii) *p-value*< 0.05 (Εικόνα 5 & 6). Από τα 205 γονίδια της ομάδας Α, 75 παρουσίαζαν υπερ-έκφραση ενώ 130 υπο-έκφραση. Στην ομάδα Β, 409 από τα συνολικά 825 γονίδια παρουσίαζαν υπερ-έκφραση, ενώ 416 υπο-έκφραση.

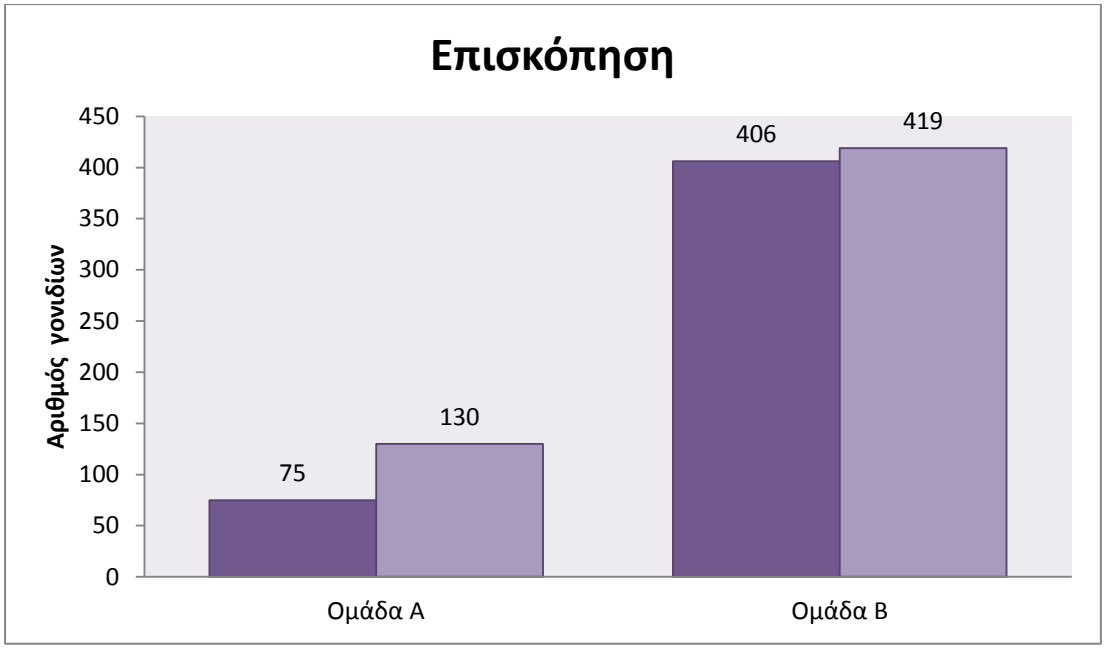


Εικόνα 5. Volcano-plot των αποτελεσμάτων της υβριδοποίησης της ομάδας Α. Φαίνονται τα όρια που τέθηκαν ώστε η αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης να θεωρείται σημαντική.



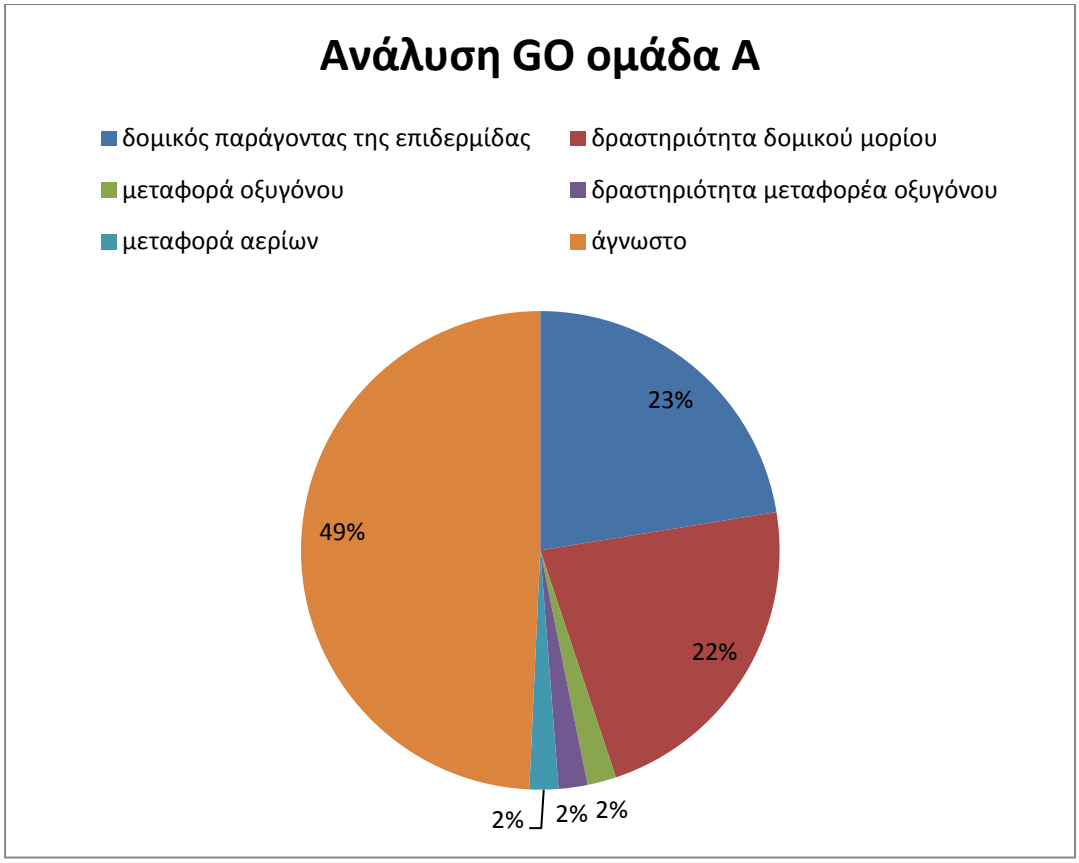
Εικόνα 6. Ένα Volcano-plot των αποτελεσμάτων της υβριδοποίησης της ομάδας Β. Φαίνονται τα όρια που τέθηκαν ώστε η αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης να θεωρείται σημαντική.

Ακολούθησε ανάλυση μέσω της Gene ontology ώστε να ληφθούν πιο λεπτομερείς λειτουργικές πληροφορίες σχετικά με τα γονίδια των οποίων τα επίπεδα έκφρασης ήταν επηρεασμένα από την παρουσία του *Asaia*. Στην ομάδα Α βρέθηκαν επιπλέον πληροφορίες για 104 γονίδια, και στην ομάδα Β για 249 (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Σύγκριση αριθμού γονιδίων και στις δύο ομάδες που παρουσίασαν υπερ- και υπο-έκφραση. Με το σκούρο χρώμα είναι τα γονίδιο με υπερ-έκφραση ενώ με το ανοιχτό τα γονίδια με υπο-έκφραση.

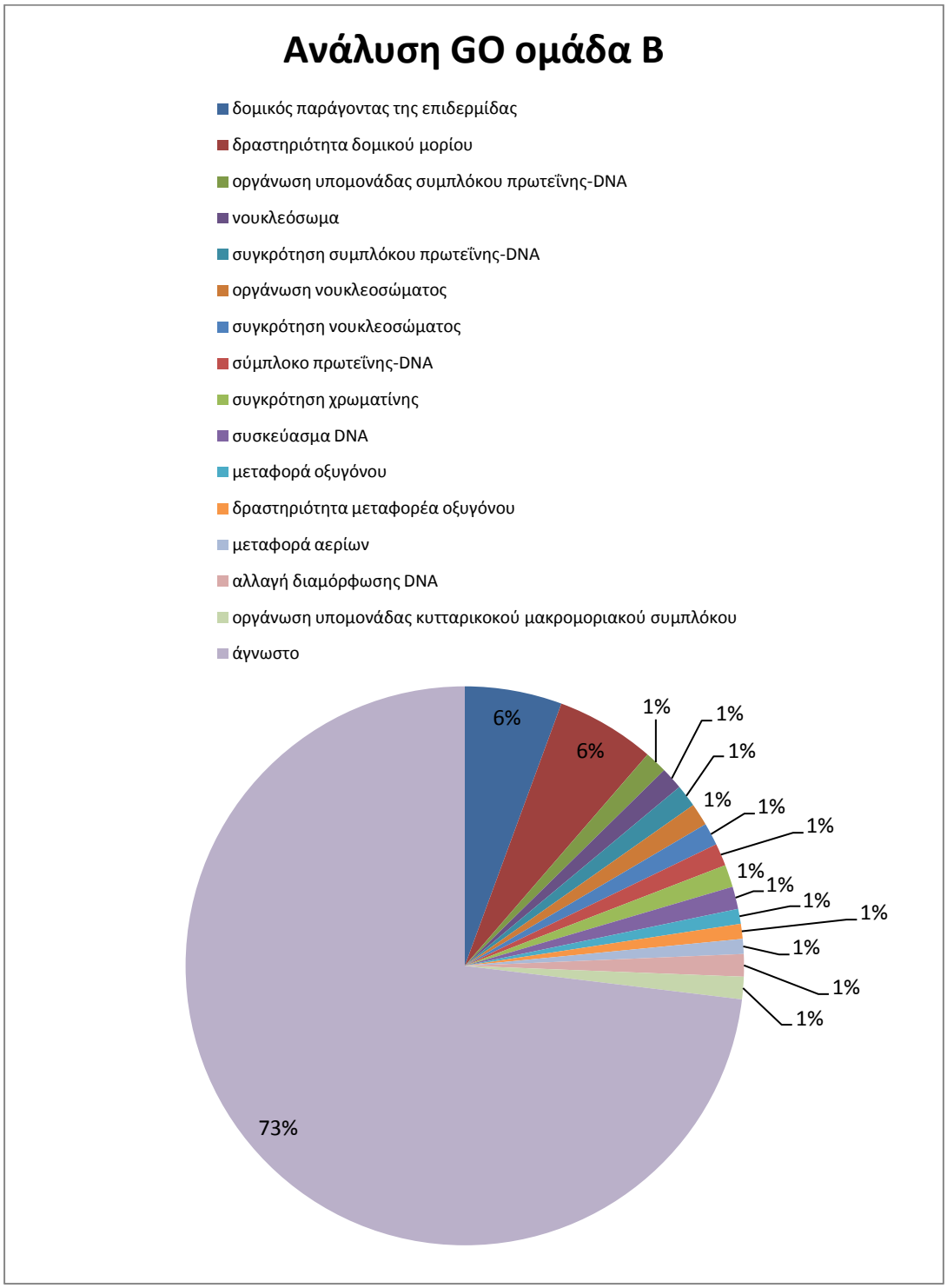
Στην ομάδα Α το 49% των γονιδίων ήταν επισημειωμένα με όρους της GO που αναφέρονταν σε άγνωστες διεργασίες και λειτουργίες. Δύο ακόμη μεγάλες κατηγορίες, με ποσοστό 23% η κάθε μία, σχετίζονταν με την επιδερμίδα, συγκεκριμένα με τους όρους '*δομικός παράγοντας της επιδερμίδας*' και '*δραστηριότητα δομικού μορίου*'. Υπήρχαν και τρεις μικρότερες κατηγορίες, με ποσοστό 2% η κάθε μία, που αναφέρονταν στους όρους '*μεταφορά οξυγόνου*', '*δραστηριότητα μεταφορέα οξυγόνου*' και '*μεταφορά αερίων*' (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Κυκλικό διάγραμμα με ποσοτική αναπάρασταση των γονιδίων της ομάδας Α, που επηρεάστηκαν σημαντικά από την παρουσία του βακτηρίου.

Στην ομάδα Β το μεγαλύτερο ποσοστό των γονιδίων, 73%, δεν μπόρεσε να αναγνωριστεί με κάποιους όρους της GO. Κι εδώ διακρίνονται δύο μεγαλύτερες κατηγορίες, αυτή τη φορά με ποσοστό 6% η κάθε μία. Όπως και στην ομάδα Α, οι κατηγορίες αυτές σχετίζονταν με την επιδερμίδα, συγκεκριμένα με τους όρους '*δομικός παράγοντας της επιδερμίδας*' και '*δραστηριότητα δομικού μορίου*'. Τα υπόλοιπα γονίδια άνηκαν σε κατηγορίες με ποσοστό 1% η κάθε μία, που αναφέρονταν στους όρους '*οργάνωση υπομονάδας συμπλόκου πρωτεΐνης-DNA*', '*νουκλεόσωμα*', '*συγκρότηση συμπλόκου πρωτεΐνης-DNA*', '*οργάνωση νουκλεοσώματος*', '*συγκρότηση νουκλεοσώματος*', '*σύμπλοκο πρωτεΐνης-DNA*', '*συγκρότηση χρωματίνης*', '*συσκεύασμα DNA*', '*μεταφορά οξυγόνου*', '*δραστηριότητα*

μεταφορέα οξυγόνου’, ‘*μεταφορά αερίων*’, ‘*αλλαγή διαμόρφωσης DNA*’ και ‘*οργάνωση υπομονάδας κυτταρικού μακρομοριακού συμπλόκου*’ (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Κυκλικό διάγραμμα με ποσοτική αναπαράσταση των γονιδίων της ομάδας B, που επηρεάστηκαν σημαντικά από την παρουσία του βακτηρίου.

Στους πίνακες 2 και 3 αναγράφεται ο αριθμός των γονιδίων, της ομάδας Α και Β αντίστοιχα, που είχαν διαφορά στα επίπεδα έκφρασής τους, λόγω της ύπαρξης του *Asaia*, όπως επίσης και περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την ανάλυση.

Πίνακας 2. Τα γονίδια της ομάδας Α για τα οποία βρέθηκαν πληροφορίες μέσω της ανάλυσης GO.

GO ID	**Όρος GO**	**p-value**	**Αριθμός γονιδίων**
GO:0042302	structural constituent of cuticle	2.34E-97	46
GO:0005198	structural molecule activity	2.48E-36	46
GO:0015671	oxygen transport	1.47E-04	4
GO:0005344|GO:0015033	oxygen transporter activity	1.47E-04	4
GO:0015669	gas transport	1.47E-04	4

Πίνακας 3. Τα γονίδια της ομάδας Β για τα οποία βρέθηκαν πληροφορίες μέσω της ανάλυσης GO.

GO ID	**Όρος GO**	**p-value**	**Αριθμός γονιδίων**
GO:0042302	structural constituent of cuticle	9.25E-23	52
GO:0005198	structural molecule activity	9.72E-12	53
GO:0071824	protein-DNA complex subunit organization	2.15E-05	12
GO:0000786|GO:0005718	nucleosome	1.69E-05	12
GO:0065004	protein-DNA complex assembly	2.15E-05	12
GO:0034728	nucleosome organization	2.15E-05	12
GO:0006334	nucleosome assembly	2.15E-05	12
GO:0032993	protein-DNA complex	2.15E-05	12
GO:0031497	chromatin assembly	2.15E-05	12
GO:0006323	DNA packaging	2.72E-05	12
GO:0015671	oxygen transport	3.80E-05	8
GO:0005344|GO:0015033	oxygen transporter activity	3.80E-05	8
GO:0015669	gas transport	3.80E-05	8
GO:0071103	DNA conformation change	6.54E-05	12
GO:0034621	cellular macromolecular complex subunit organization	1.37E-04	12

Η κατηγορία με το μεγαλύτερο ποσοστό γονιδίων και στις δύο ομάδες ήταν '*δομικός παράγοντας της επιδερμίδας*' (GO: 0042302), που περιείχε τα γονίδια CPR. Αυτά ανήκουν στην οικογένεια των δομικών CP πρωτεϊνών (cuticular protein) (Willis, 2010). Η οικογένεια αυτή έχει πολυάριθμα μέλη και το χαρακτηριστικό των μελών της

είναι η παρουσία μίας περιοχής, της επονομαζόμενης Rebers & Riddiford (RR) (Rebers and Riddiford, 1988).

Στην ομάδα Α, 45 γονίδια ανήκαν στην οικογένεια των CP πρωτεϊνών. Από αυτά τα 43 παρουσίασαν υπερ-έκφραση και 2 υπο-έκφραση. Στην ομάδα Β, από τα συνολικά 48 γονίδια που ανήκαν στην οικογένεια των CP πρωτεϊνών, τα 24 παρουσίαζαν υπερ-έκφραση και τα υπόλοιπα 24 υπο-έκφραση. Δεκαεννιά γονίδια παρουσίασαν μετατροπή στα επίπεδα έκφρασης και στις δύο ομάδες. Δύο από τα τρία γονίδια της ομάδας Α που παρουσίασαν υπερ-έκφραση βρέθηκε ότι παρουσιάζουν υπερ-έκφραση και στην ομάδα Β. Συνολικά 12 γονίδια βρέθηκαν να υπο-εκφράζονται και στις δύο ομάδες. Συν αυτού, 4 γονίδια που υπο-εκφράζονταν στην ομάδα Α βρέθηκαν να υπερ-εκφράζονται στην ομάδα Β, ενώ το ανάποδο συνέβη για ένα γονίδιο της ομάδας Β.

Για την περαιτέρω έρευνα στα CPR γονίδια που επηρεάστηκαν από την παρουσία τους *Asaia*, χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο biomart που βρίσκεται στην Vectorbase (http://www.vectorbase.org) (Megy et al., 2012). Με τη βοήθεια αυτού του εργαλείου προσδιορίστηκε ότι από το συνολικό αριθμό των γονιδίων που παρουσίασαν μεταβολές στα επίπεδα έκφρασής τους, τα 32 περιείχαν το μοτίβο RR-1, 38 περιείχαν το μοτίβο RR-2 (Cornman et al., 2008) και μόλις ένα το μοτίβο RR-3 (Πίνακας 5) (Andersen, 2000). Το μοτίβο RR-1 εμφανίζεται σε πρωτεΐνες σχετικές με μαλακή επιδερμίδα, ενώ το RR-2 σε αυτές σχετικές με σκληρή (Andersen, 1998).

Επιπλέον ανάλυση με βοήθεια της βάσης δεδομένων Pfam (http://pfam.sanger.ac.uk) (Finn et al., 2006) έδειξε ότι όλα έχουν την ίδια ‘chitin_bind_4’ περιοχή (PF00379).

Πίνακας 4. Υπερ-έκφραση και υπο-έκφραση των CPR γονιδίων στην ομάδας Α, στην ομάδα Β και στον συνδυασμό των δύο ομάδων. Τα γονίδια που είναι σημειωμένα με αστερίσκο είναι αυτά που παρουσιάζουν υπερ- και υπο-έκφραση.

Ομάδα Α		**Ομάδα Β**		**Ομάδα Α&Β**	
Υπερ-έκφραση	Υπο-έκφραση	Υπερ-έκφραση	Υπο-έκφραση	Υπερ-έκφραση	Υπο-έκφραση
CPR150	CPR101	CPR100	CPR101	CPR150	CPR101
CPR24	CPR106	CPR109	CPR106	CPR98	CPR106
CPR98	CPR121	CPR110	CPR117		CPR121
	CPR135	CPR111	CPR119		CPR136
	CPR136	CPR131	CPR120		CPR33
	CPR148	CPR142	CPR121		CPR42
	CPR149	CPR150	CPR123		CPR43
	CPR32	CPR34	CPR125		CPR44
	CPR33	CPR35	CPR129		CPR45
	CPR35*	CPR38	CPR136		CPR47
	CPR36	CPR40	CPR2		CPR49
	CPR37	CPR66	CPR24*		CPR70
	CPR38*	CPR73	CPR32		
	CPR39	CPR77	CPR33		
	CPR41	CPR78	CPR4		
	CPR42	CPR80	CPR42		
	CPR43	CPR92	CPR43		
	CPR44	CPR93	CPR44		
	CPR45	CPR94	CPR45		
	CPR46	CPR95	CPR47		
	CPR47	CPR96	CPR49		
	CPR48	CPR97	CPR67		
	CPR49	CPR98	CPR70		
	CPR50	CPR99	CPR71		
	CPR51				
	CPR52				
	CPR53				
	CPR54				
	CPR60				
	CPR61				
	CPR62				
	CPR66*				
	CPR67				
	CPR70				
	CPR73*				
	CPR85				
	CPR86				
	CPR87				
	CPR88				
	CPR89				
	CPR90				
	CPR91				

Πίνακας 5. Τα CPR γονίδια που περιέχουν τα RR-1, RR-2 και RR-3 μοτίβα.

Μοτίβο RR-1	**Μοτίβο RR-2**	**Μοτίβο RR-3**
CPR106	CPR100	CPR111
CPR125	CPR101	
CPR129	CPR109	
CPR24	CPR110	
CPR32	CPR117	
CPR33	CPR119	
CPR34	CPR120	
CPR35	CPR121	
CPR36	CPR123	
CPR37	CPR131	
CPR38	CPR136	
CPR39	CPR142	
CPR40	CPR2	
CPR41	CPR4	
CPR42	CPR42	
CPR43	CPR43	
CPR44	CPR44	
CPR45	CPR45	
CPR46	CPR47	
CPR47	CPR49	
CPR48	CPR67	
CPR49	CPR70	
CPR50	CPR71	
CPR51	CPR85	
CPR52	CPR86	
CPR61	CPR87	
CPR62	CPR88	
CPR66	CPR89	
CPR73	CPR90	
CPR77	CPR91	
CPR78	CPR92	
CPR80	CPR93	
	CPR94	
	CPR95	
	CPR96	
	CPR97	
	CPR98	
	CPR99	

Συμπεράσματα-Συζήτηση

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, οι βακτηριακοί συμβιωτικοί οργανισμοί που ζουν μέσα σε έντομα-φορείς ασθενειών, είναι ένας σχετικά νέος τρόπος για την καταπολέμηση της μετάδοσης των ασθενειών αυτών (Riehle and Jacobs-Lorena, 2005). Τα βακτήρια έχουν την υποθετική ικανότητα να επηρεάσουν είτε τους ίδιους τους παράγοντες της ασθένειας, είτε να τροποποιηθούν με τέτοιο τρόπο ώστε να παράγουν τα ίδια βλαβερές ουσίες. Με αυτό το σκεπτικό θα ήταν δυνατή η δημιουργία στελεχών εντόμων-φορέων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε στρατηγικές, που έχουν ως σκοπό τη μείωση της εξάπλωσης της ασθένειας. Είναι όμως απαραίτητο να γνωρίζουμε τον ρόλο των συμβιωτικών οργανισμών στον ξενιστή τους, υπό φυσιολογικές συνθήκες, χωρίς, δηλαδή, να έχει προηγηθεί τροποποίηση.

Στην παρούσα εργασία αποδείχθηκε ότι το βακτήριο *Asaia,* παρά την επίδρασή του στα στάδια ανάπτυξης της προνύμφης, δεν έχει κάποια θετική ή αρνητική επίδραση στα ενήλικα άτομα του είδους *An. coluzzii,* παρόλο που παραμένει στο μεσέντερο του κουνουπιού για όλη τη διάρκεια της ενήλικης ζωής του. Επίσης, δείχθηκε ότι πραγματοποιείται μεταφορά των βακτηρίων από τους γονείς στους απογόνους της F1 γενιάς. Γεγονός που σημαίνει ότι το *Asaia* πολύ πιθανόν να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φορέας για την μέθοδο της παραδιαγένεσης, εφόσον μεταφέρεται από γενιά σε γενιά. Άρα δεν θα είναι απαραίτητη η συνεχής και επαναλαμβανόμενη μόλυνση των κουνουπιών. Αυτή είναι μία επίπονη και δαπανηρή διαδικασία, που έχει τη δυνατότητα να σταθεί εμπόδιο στην προσέγγιση του προβλήματος μέσω της παραδιαγένεσης.

Έχει αποδειχθεί ότι η έλλειψη του βακτηρίου *Asaia* σε κουνούπια του γένους *Anopheles* οδηγεί στη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των προνυμφών (Chouaia et

al., 2012). Αυτό, σε συνδυασμό με τις παρατηρήσεις της παρούσας διατριβής, ότι υπάρχει αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης όταν χορηγηθεί επιπλέον βακτήριο στα κουνούπια, οδηγεί στην υπόθεση ότι το *Asaia* παίζει κάποιον σημαντικό, αλλά άγνωστο ακόμα, ρόλο στα προνυμφικά στάδια. Συν αυτού, το γεγονός ότι η χορήγηση νεκρών βακτηρίων δεν έχει κάποια επίδραση στα προνυμφικά στάδια (Mitraka, 2010), μπορεί να θεωρηθεί ως ένδειξη ότι το *Asaia* βοηθάει στην πέψη κάποιων θρεπτικών ουσιών ή ότι παράγει κάποιο μόριο που παίζει ρόλο στην ταχύτερη ανάπτυξη.

Λόγω του άγνωστου ρόλου του βακτηρίου στον ξενιστή του, μπορούν να εκφραστούν μόνο εικασίες για το τι συμβαίνει σε προνύμφες προερχόμενες από μολυσμένους γονείς. Οι προνύμφες αυτές δεν παρουσίαζαν τους αυξανόμενους ρυθμούς ανάπτυξης, παρόλο που αποδείχθηκε ότι το βακτήριο υπάρχει στο έντερο. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι στους γονείς υπήρξε σημαντική αύξηση του αριθμού των βακτηρίων στους οργανισμούς τους. Άρα και μεγαλύτερος αριθμός μορίων που παράχθηκαν από αυτά. Είναι, λοιπόν, άλλη μία ένδειξη ότι κάποιο παράγωγο του βακτηρίου οδηγεί στην ταχύτερη ανάπτυξη των προνυμφών.

Η ανάλυση της υβριδοποίησης των μικροσυστοιχίων έδειξε ότι σε μεγαλύτερο βαθμό επηρεάζονται γονίδια που σχετίζονται με τη δημιουργία της επιδερμίδας. Μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί δώδεκα διαφορετικές οικογένειες των CP πρωτεϊνών. Τα μέλη της κάθε οικογένειας μοιράζονται κάποια κοινά χαρακτηριστικά (Willis, 2010). Στην ανάλυση φάνηκε ότι η κύρια κατηγορία των γονιδίων που εμφάνισαν μετατροπές στα επίπεδα έκφρασής τους, είτε θετική, είτε αρνητική, ήταν αυτή των μελών της οικογένειας γονιδίων CPR. Τα γονίδια αυτά έχουν ένα χαρακτηριστικό μοτίβο, μεγέθους 35-36 αμινοξέων, το οποίο είναι συντηρημένο. Το μοτίβο ονομάζεται RR και ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Rebers και Riddiford το 1988 (Rebers and Riddiford, 1988).

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τη θεωρία ότι η επιτάχυνση στο ρυθμό ανάπτυξης των προνυμφών οφείλεται στον μεγαλύτερο αριθμό βακτηρίων στο έντερό τους. Μία εικασία επί του θέματος είναι ότι η επιτάχυνση αυτή καθιστά αναγκαία την πιο γρήγορη παραγωγή νέας επιδερμίδας.

Η ανάλυση μέσω biomart και Pfam έδειξε επίσης ότι όλα τα γονίδια που επηρεάστηκαν από την ύπαρξη του *Asaia* περιείχαν την περιοχή chitin_bind_4. Επιπλέον όλα αυτά τα γονίδια είχαν τα μοτίβα RR-1 και RR-2. Το RR-1 βρίσκεται σε πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη δημιουργία μαλακής επιδερμίδας, ενώ το RR-2 σε αυτές έχουν σχέση με τη δημιουργία σκληρής επιδερμίδας (Andersen, 1999) (Iconomidou et al., 1999). Μία μόνο πρωτεΐνη, η CPR-111, βρέθηκε να περιέχει το μοτίβο RR-3, το οποίο είναι μία παραλλαγή του γενικού RR μοτίβου.

Στην παρούσα έρευνα αποδείχθηκε ότι το γενετικά τροποποιημένο *Asaia* μπορεί να παραμείνει εφ' όρου ζωής σε κουνούπια τους είδους *An. coluzzii*, χωρίς να παρουσιαστούν αρνητικές επιπτώσεις. Όπως επίσης, ότι μπορεί να μεταφερθεί σε απογόνους μολυσμένων γονιών, έστω και για μία γενιά. Χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για τον αν το βακτήριο μπορεί να παραμείνει και για περισσότερες γενιές στα κουνούπια. Καθ' όλη τη διάρκεια της έρευνας, όμως, δεν παρατηρήθηκε κάτι που να προϊδεάζει αρνητικά για το γεγονός αυτό.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δεδομένων της υβριδοποίησης των μικροσυστοιχίων αποκάλυψαν τον, πιθανότατα, σημαντικό ρόλο που μπορεί να έχουν οι βακτηριακοί συμβιωτικοί οργανισμοί στα προνυμφικά στάδια ανάπτυξης.

Ως συμπέρασμα μπορεί να ειπωθεί ότι το βακτήριο *Asaia* είναι από τους πλέον κατάλληλους υποψηφίους για χρήση ως μέσο στην παραδιαγένεση, με σκοπό την καταπολέμηση της εξάπλωσης ασθενειών μεταφερόμενων από έντομα-φορείς. Θεωρείται ότι είναι αναγκαίο να συνεχιστεί η έρευνα στο βακτήριο αυτό, ώστε να

αποκαλυφθεί και η μοριακή βάση του φαινόμενου της επιτάχυνσης του αναπτυξιακού ρυθμού που παρατηρήθηκε.

ΜΕΡΟΣ Β΄

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο δάγκειος πυρετός είναι μία ασθένεια που μεταφέρεται από έντομα-φορείς συγκεκριμένα από τέσσερα ήδη κονουπιών, το *Aedes aegypti,* το *A. albopictus,* το *A. polynensiensis* και το *A. scutelaris*. Προκαλείται από τον ιό του δαγκείου, DENV (Henchal and Putnak, 1990). Ένας μονόκλονος RNA ιός, του οποίου το γονιδίωμα έχει μέγεθος περίπου 11kb. Κωδικοποιεί συνολικά δέκα πρωτεΐνες, από τις οποίες οι τρεις είναι δομικές και οι υπόλοιπες μη δομικές (Rodenhuis-Zybert et al., 2010). Ο ιός αυτός έχει πέντε διαφορετικούς ορότυπους (DENV1 – 5). Μέχρι πρόσφατα ήταν γνωστοί μόνο τέσσερις, μέχρις ότου ανακαλύφθηκε και ο πέμπτος (Normile, 2013). Η ανακάλυψη αυτή μπορεί πιθανότατα να αποδειχθεί επιζήμια για τις μέχρι τώρα προσπάθειες για δημιουργία ενός εμβολίου, διότι οι προσπάθειες αυτές επικεντρωνόταν στη δημιουργία ενός εμβολίου κατά των τεσσάρων, έως προσφάτως, γνωστών ορότυπων του ιού. Τα υποψήφια εμβόλια και για τους τέσσερις ορότυπους ονομάζονται τετρασθενή (tetravalent), ενώ αυτά που προορίζονται για έναν μόνο ορότυπο ονομάζονται μονοσθενή (monovalent).

Η νόσος εμφανίζεται σε διαφορετικές μορφές. Υπάρχει ο ασυμπτωματικός δάγκειος πυρετός, όπου το άτομο που έχει προσβληθεί δεν παρουσιάζει συμπτώματα, και ο συμπτωματικός δάγκειος πυρετός, όπου το άτομο παρουσιάζει υψηλό πυρετό και υποφέρει από φρικτούς πόνους. Το τελευταίο αυτό χαρακτηριστικό έδωσε και στη νόσο και το όνομα ‘breakbone fever’, δηλαδή πυρετός των σπασμένων οστών, διότι ο πόνος που νιώθουν οι ασθενείς είναι τόσο ισχυρός. Υπάρχουν και δύο επιμέρους μορφές του συμπτωματικού δάγκειου πυρετού, ο αιμορραγικός πυρετός του δάγκειου (dengue hemorrhagic fever, DHF) και το σύνδρομο καταπληξίας του δάγκειου

(dengue shock syndrome, DSS) (Gubler, 1998; Ranjit and Kissoon, 2011; Simmons et al., 2012). Οι δύο αυτές μορφές μπορούν να οδηγήσουν στον θάνατο του ασθενούς. Οι δύο αυτές σοβαρές μορφές παρουσιάζονται όταν υπάρξει μία δεύτερη μόλυνση με διαφορετικό ορότυπο του ιού στον ίδιο ασθενή (Guzman et al., 2010).

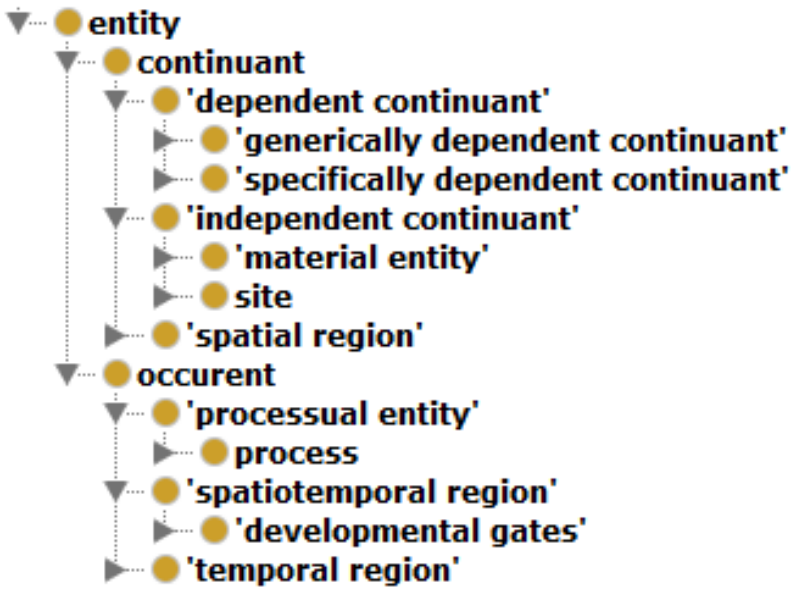
Μέχρι σήμερα η καταπολέμηση του δάγκειου βασίζεται εξ' ολοκλήρου στον περιορισμό του κουνουπιού που το μεταδίδει. Για την ίδια τη νόσο δεν υπάρχει εμβόλιο, παρόλο που γίνονται προσπάθειες. Επίσης έχει παρουσιαστεί μία αύξηση των κρουσμάτων του δάγκειου την τελευταία δεκαετία. Υπολογίζεται ότι περίπου 2,5 δισεκατομμύρια άτομα βρίσκονται σε κίνδυνο να νοσήσουν (WHO, 2009). Κάθε χρόνο υπάρχουν 50 με 100 εκατομμύρια κρούσματα της νόσου (Gubler, 2002). Όλα αυτά τα γεγονότα καθιστούν απαραίτητη την ανεύρεση νέων μεθόδων προσέγγισης του προβλήματος και τη δημιουργία νέων εργαλείων που θα συνεισφέρουν στην διαχείριση και στην πρόληψη της ασθένειας. Παρόλο που διάφορες νέες τεχνικές όπως τα Γεωγραφικά Συστήματα Πληροφόρησης (GIS, Geographic Information Systems) (Duncombe et al., 2012; Eisen and Lozano-Fuentes, 2009; Fisher and Myers, 2011) και Συστήματα Διευκόλυνσης Λήψης Αποφάσεων (DSS, Decision Support Systems) (Eisen et al., 2011) έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται κατά του δάγκειου, απέχουμε ακόμα από την πλήρη εκμετάλλευση των δυνατοτήτων που μας παρέχει η επιστήμη των υπολογιστών σε αυτόν τον τομέα. Δεδομένου της έκτασης που καλύπτει το έντομο-φορέας της νόσου, είναι απαραίτητο να δράσουμε όσο το συντομότερο δυνατό και να χρησιμοποιήσουμε στο έπακρο όποιο εργαλείο έχουμε στη διάθεσή μας για να διαχειριστούμε τον όγκο δεδομένων και να εξασφαλίσουμε την δυνατότητα γρήγορης και εύκολης πρόσβασης σε αυτά, ασχέτως με τα όρια των χωρών και των δομικά και τεχνικά διαφορετικών βάσεων δεδομένων και εργαλείων που υπάρχουν ήδη και αυτών που θα δημιουργηθούν μελλοντικά. Το μέσο που πληρεί όλες τις παραπάνω προϋποθέσεις για την ομαλή λειτουργία, διασύνδεση και πρόσβαση ανάμεσα σε εργαλεία της πληροφορικής είναι οι οντολογίες.

Στην εργασία αυτή περιγράφεται τη δομή της οντολογίας του δάγκειου πυρετού, IDODEN, η οποία δημιουργήθηκε ακριβώς για τις ανάγκες της κοινότητας που ασχολείται με την ασθένεια αυτή, καθώς και την καταπολέμησή της. Θα ακολουθήσει περιγραφή της δομής της οντολογίας και περιγραφή του περιεχομένου της.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Δομή της οντολογίας

Στο ανώτερο επίπεδο η οντολογία του δάγκειου πυρετού έχει υιοθετήσει τη δομή της Βασικής Τυπικής Οντολογίας (Basic Formal Ontology, BFO) (Simon et al., 2006), έτσι ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή συμβατότητα με άλλες οντολογίες (Εικόνα 10). Κρατώντας τη βασική δομή της BFO, η αλληλεπίδραση και η επικοινωνία με άλλα εργαλεία της βιοπληροφορικής που χρησιμοποιούν οντολογίες καθίσταται εύκολη, γρήγορη και πάνω από όλα λειτουργική.



Εικόνα 10. Το ανώτερο επίπεδο της IDODEN, υιοθετημένη από την BFO.

Η BFO είναι, κατά παραδοχή, η οντολογία ανώτερου επιπέδου που χρησιμοποιείται στις οντολογίες του βιολογικού και βιοϊατρικού γνωστικού αντικειμένου. Η τάξη από την οποία προέρχονται όλες οι επικείμενες είναι ο όρος '*οντότητα*' (*entity*). Από αυτόν ξεκινούν τα πάντα. Από εκεί και πέρα η BFO διαχωρίζεται σε '*συνεχής οντότητα*'

(*continuant*) και '*ασυνεχής οντότητα*' (*occurent*). Κάτω από την '*συνεχής οντότητα*' υπάρχει ο διαχωρισμός σε '*εξαρτημένη συνεχής οντότητα*' (*dependent continuant*) και σε '*αυθύπαρκτη συνεχής οντότητα*' (*independent continuant*). Κάτω από τον όρο '*συνεχής οντότητα*' βρίσκεται επίσης και ο όρος '*χωρική περιοχή*' (*spatial region*). Οι όροι αυτοί ανήκουν στην τάξη της '*συνεχής οντότητας*' ακριβώς επειδή παραμένουν σταθερές στον χρόνο.

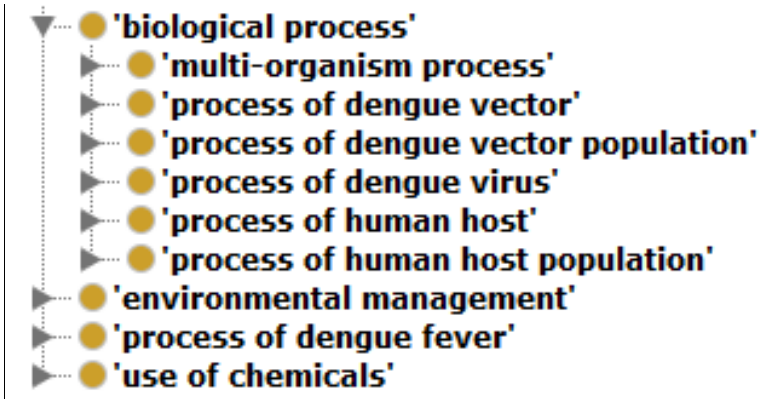
Στην '*ασυνεχή οντότητα*' συναντάμε τους όρους '*διαδικασία*' (*process*), '*χωροχρονική περιοχή*' (*spatiotemporal region*) και '*χρονική περιοχή*' (*temporal region*). Όλοι αυτοί οι όροι έχουν ως βασικό κοινό στοιχείο τη μεταβολή τους στον χρόνο. Για αυτό ακριβώς έχουν κατηγοριοποιηθεί και με αυτόν τον τρόπο.

Δεν θα συνεχιστεί περαιτέρω η περιγραφή της BFO, διότι αυτό δεν είναι το θέμα της παρούσας διατριβής. Θα ακολουθήσει η περιγραφή επιμέρους τμημάτων της οντολογίας.

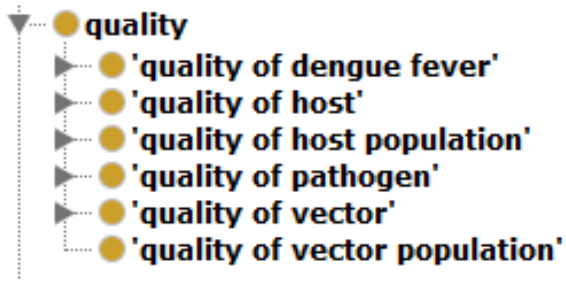
Ο δάγκειος πυρετός, ως μία νόσος που μεταφέρεται από ένα έντομο-φορέα, στη συγκεκριμένη περίπτωση από κουνούπια του γένους *Aedes*, έχει μία επιπλέον πολυπλοκότητα από άλλες νόσους. Συνήθως, όταν αναφερόμαστε σε άλλες ασθένειες έχουμε δύο οργανισμούς, το παθογόνο και τον οργανισμό που νοσεί από αυτόν. Στη συγκεκριμένη περίπτωση όμως υπάρχουν τρεις διαφορετικοί οργανισμοί. Το παθογόνο, δηλαδή ο ιός του δάγκειου, το έντομο-φορέας, το κουνούπι και τέλος ο οργανισμός που νοσεί, τον άνθρωπο. Για τις ανάγκες της οντολογίας έγινε η παραδοχή ότι ο ιός είναι το παθογόνο (pathogen), το κουνούπι είναι ο φορέας (vector) και ο άνθρωπος είναι ο ξενιστής (host).

Για αυτόν τον λόγο οι τάξεις που περιγράφουν τις διαδικασίες και τις ιδιότητες (*process* και *quality*, αντίστοιχα), υπέστησαν έναν επιπλέον διαχωρισμό ώστε οι απόγονοί τους να μπορέσουν να παραμείνουν συγκεντρωμένοι υπό έναν πιο γενικό

πατρικό όρο (Εικόνα 11 & 12). Ο όρος '*βιολογική διαδικασία*' (*biological process*) έχει, συν της άλλης, ως απογόνους τους όρους '*διαδικασία του φορέα του δάγκειου*' (*process of dengue vector*), '*διαδικασία του πληθυσμού του φορέα του δάγκειου*' (*process of dengue vector population*), '*διαδικασία του ιού του δάγκειου*' (*process of dengue virus*), '*διαδικασία του ανθρώπινου ξενιστή*' (*process of human host*) και '*διαδικασία του πληθυσμού του ανθρώπινου ξενιστή*' (*process of human host population*). Είναι εμφανές ότι δεν έχει γίνει διαχωρισμός μόνο για τους τρεις οργανισμούς που συμμετέχουν στη νόσο, αλλά και για τους πληθυσμούς τους. Αυτό συμβαίνει διότι το πλήθος των επιδημιολογικών και εντομολογικών ερευνών που λαμβάνουν χώρα ασχολούνται κυρίως με πληθυσμούς και όχι με μεμονωμένα άτομα. Ο ίδιος διαχωρισμός λαμβάνει χώρα για την τάξη '*ιδιότητα*'.



Εικόνα 11. Ο διαχωρισμός της τάξης 'βιολογική διαδικασία' (biological process).



Εικόνα 12. Ο διαχωρισμός της τάξης 'ιδιότητα' (quality)

Με το σκεπτικό ότι η οντολογία αυτή προορίζεται για χρήση από μια πληθώρα ανθρώπων από διαφορετικά γνωστικά αντικείμενα και πεδία αποφασίστηκε να συμπεριληφθούν όσο το δυνατόν περισσότεροι όροι ώστε να καλυφτούν όλες αυτές οι ανάγκες. Η οντολογία αυτή δημιουργήθηκε με σκοπό να σταθεί ως η βάση για διάφορα εργαλεία της πληροφορικής, για βάσεις δεδομένων και για μελλοντικές πηγές. Σαφέστατα η δομή της είναι τέτοια ώστε να είναι δυνατή και η επέκτασή της, όταν αυτό γίνει αναγκαίο μελλοντικά, για να καλύψει τις μέχρι σήμερα μη γνωστές πτυχές της πολύπλοκης αυτής νόσου. Επίσης έχει ως σκοπό τη διασύνδεση των έως τώρα διαχωρισμένων πληροφοριών και δεδομένων που υπάρχουν σχετικά με τη νόσο. Απώτερος σκοπός είναι η IDODEN να συμβάλλει σε όλους τους τομείς της καταπολέμησης του δάγκειου πυρετού, έτσι ώστε να τελικά να υπάρξει έλεγχος της νόσου.

Η IDODEN καλύπτει το πεδίο του δάγκειου πυρετού από ανώτερα επίπεδα όπως οικοσυστήματα και βιότοποι, φτάνοντας μέχρι το επίπεδο των πρωτεϊνών. Οι όροι που είναι πολλοί γενικοί και δεν είναι ειδικοί για την οντολογία έχουν εισαχθεί από άλλες οντολογίες που θεωρούνται οι πλέον κατάλληλες για το συγκεκριμένο αντικείμενο (Πίνακας 6). Η προσθήκη των όρων αυτών έγινε σύμφωνα με την προσέγγιση MIREOT (Minimum Information to Reference an External Ontology Term) (Xiang et al., 2010). Σύμφωνα με αυτή την αρχή ο κάθε εισαγόμενος όρος πρέπει να έχει τον κωδικό από την οντολογία από την οποία προήρθε, ο ορισμός του

όρου να παραμείνει αυτούσιος, όπως επίσης και όλα τα συνώνυμά του. Έγινε η προσπάθεια, λοιπόν, ώστε να επιτευχθεί έτσι η καλύτερη δυνατή διασύνδεση της οντολογίας με ήδη υπάρχουσες.

Μελλοντικά, εάν δημιουργηθούν οντολογίες που θα είναι πιο ειδικές για κάποιους όρους της IDODEN, τότε θα πρέπει να αλλαχθούν οι κωδικοί των όρων αυτών σε αυτή την οντολογία και να υιοθετηθούν οι καινούριοι. Σε αυτή την περίπτωση, για διευκόλυνση όσων ήδη χρησιμοποιούν την IDODEN σε διάφορα εργαλεία ή βάσεις δεδομένων, οι αρχικοί κωδικοί της οντολογίας μπορούν να παραμείνουν ως δευτερεύοντες κωδικοί.

Αυτή ακριβώς η περίπτωση είχε συμβεί στην οντολογία της ελονοσίας (IDOMAL) που είχε αναπτυχθεί παλαιότερα από το εργαστήριό μας, η οποία πρόσφατα υποβλήθηκε σε μία πληθώρα αλλαγών και σε μία αλλαγή δομής για αυτόν το σκοπό (Topalis et al., 2013). Επειδή η IDOMAL ήταν παλαιότερη των πιο ειδικών σε κάθε πεδίο οντολογιών, έπρεπε να εξεταστεί και να αλλαχτούν οι αρχικοί κωδικοί με αυτούς των νέων οντολογιών. Κρατήθηκαν όμως οι παλαιότεροι κωδικοί ως δευτερεύοντες, για τους λόγους που αναφέρθηκαν προηγουμένως.

Πίνακας 6. Οντολογίες από τις οποίες έχουν εισαχθεί όροι στην IDODEN.

Οντολογία	**Αριθμός όρων**
IDOMAL	724
CHEBI	251
GO	116
MIRO	99
ENVO	63
SYMP	42
NCBITaxon	39
CL	34
PR	30
BFO	29
IDO	27
IAO	7
SO	7
OBI	5
VO	5
OGMS	4
MESH	3
UBERON	2
CARO	1
NPO	1
HP	1

IDOMAL=Malaria Ontology, CHEBI=Chemical Entities of Biological Interest, GO=Gene Ontology, MIRO=Mosquito Insecticide Resistance Ontology, ENVO=Environmental Ontology, SYMP=Symptom Ontology, NCBITaxon=Taxonomical Classification Ontology, CL=Cell Line Ontology, PR=Protein Ontology, BFO=Basic Formal Ontology, IDO=Infectious Disease Ontology, IAO=Information Artifact Ontology, SO=Sequence Ontology, OBI=Ontology for Biomedical Investigations, VO=Vaccine Ontology, OGMS= Ontology for General Medical Science , MESH=Medical Subheadings, CARO=Common Anatomy Reference Ontology, NPO=Nucleotide Polymorphism Ontology

Πέραν της BFO, επιλέχθηκε, επίσης, η IDODEN να αναπτυχθεί ως μία επέκταση της Infectious Disease Ontology (IDO) (http://www.infectiousdiseaseontology.org/). Η IDO προσφέρει μία βασική δομή, έναν πυρήνα γενικών όρων, που σχετίζονται με μολυσματικές ασθένειες. Πάνω σε αυτόν τον πυρήνα έχουν βασιστεί διάφορες οντολογίες ασθενειών όπως η οντολογία της βουκέλλωσης (IDOBRU) (Lin et al., 2011), η οντολογία της γρίπης (Influenza Ontology) (http://infectiousdiseaseontology.org/page/Influenza_Ontology) και βεβαίως και η IDOMAL.

Το ότι η IDO αποτελεί έναν πυρήνα για την IDODEN δεν σημαίνει ότι δεν υπάρχουν και περιπτώσεις που οι αυτές οντολογίες δεν είναι απόλυτα συμβατές. Αυτό συμβαίνει κυρίως λόγω των ιδιαιτεροτήτων που εμπεριέχει η νόσος. Για τον λόγο αυτό πρέπει να υπάρχει συνεχής επικοινωνία με τους δημιουργούς της IDO ώστε να επιλύνονται τέτοια ζητήματα, όπως πρόσφατα έγινε με την IDOMAL (Topalis et al., 2013).

Περιεχόμενο της οντολογίας

Όλοι οι όροι της IDODEN έχουν πλήρης *is_a* σχέση με έναν μόνο γονέα, ασχέτως με την πληθώρα των υπολοίπων σχέσεων με τις οποίες συνδέονται μεταξύ τους. Στην έκδοση IDODEN version 1.0 (http://bioportal.bioontology.org/ontologies/IDODEN), περιέχει 5035 όρους, οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με εννέα διαφορετικές σχέσεις (Πίνακας 7).

Πίνακας 7. Γενική επισκόπηση της IDODEN και των σχέσεων που εμπεριέχει.

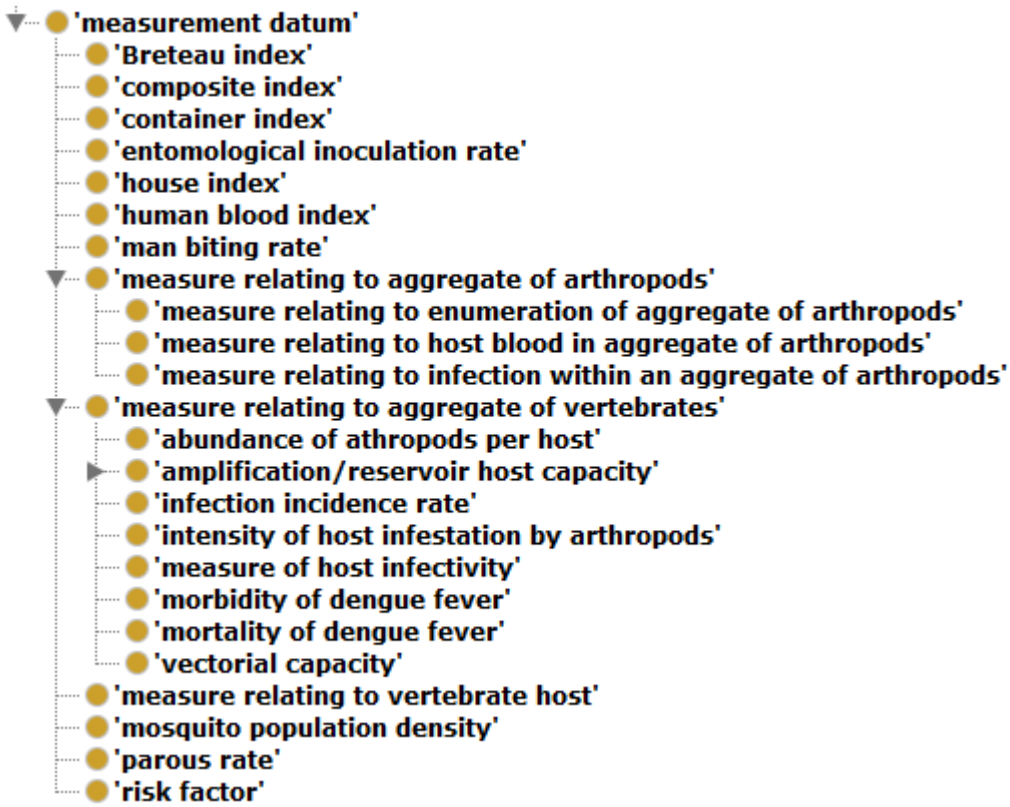
Όροι της οντολογίας	**Αριθμός**	**Σχέσεις**
Μοναδικοί όροι	5035	*agent_in* *bearer_of* *happens_during* *has_role* *part_of* *participates_in* *preceded_by* *realizes* *results_in*
Όροι ειδικοί για την IDODEN	3545	
Εισαγόμενοι όροι	1490	
Σχέσεις	9	

Δεδομένο μέτρησης (measurement datum)

Η περιγραφή της οντολογίας ξεκινάει με την τάξη '*δεδομένο μέτρησης*' (*measurement datum*) (Εικόνα 13). Η τάξη αυτή είναι παιδί του '*αντικείμενο δεδομένων*' (*data item*), που ανήκει στον γενικότερο όρο '*οντότητα πληροφοριακού περιεχομένου*' (*information content entity*).

Στην τάξη '*δεδομένο μέτρησης*' βρίσκονται αρχικά διάφοροι δείκτες (indexes) οι οποίοι χρησιμοποιούνται κυρίως σε επιδημιολογικές και εντομολογικές έρευνες. Ο όρος '*δείκτης Breteau*' (*Breteau index*) δείχνει τον αριθμό των σκευών όπου βρέθηκαν προνύμφες, ανά κάθε 100 ελεγμένες κατοικίες. Άλλος σημαντικός όρος της κατηγορίας είναι ο '*δείκτης κατοικίας*' (*house index*). Αυτός δίνει πληροφορίες για το ποσοστό των κατοικιών στις οποίες βρέθηκαν να υπάρχουν προνύμφες ή/και νύμφες του γένους *Aedes*. Δεν υπάρχουν όμως μόνο όροι που σχετίζονται αποκλειστικά με τον φορέα, αλλά υπάρχουν και όροι όπως ο '*ρυθμός τσιμπήματος ανθρώπου*' (*man biting rate*), που περιγράφει τον αριθμό των τσιμπημάτων σε ένα

άτομο για μία συγκεκριμένη χρονική περίοδο. Εδώ βρίσκεται και ο όρος '*πυκνότητα του πληθυσμού των κουνουπιών*' (*mosquito population density*). Όρος απαραίτητος για οποιαδήποτε σχετική έρευνα.



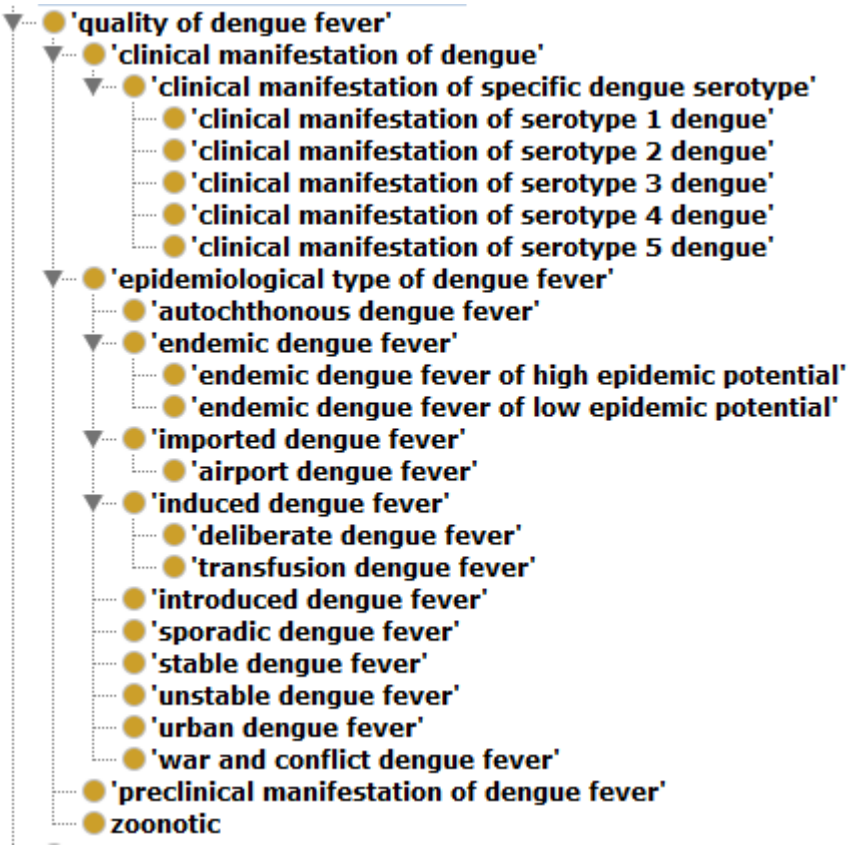
Εικόνα 13. Η δομή της τάξης 'δεδομένο μέτρησης' (measurement datum).

Συναντώνται όμως και δύο όροι που έχουν σχέση με μετρήσεις συσσωματωμάτων. Οι όροι αυτοί είναι '*μέτρηση σχετική με συσσωματώματα αρθροπόδων*' (measure *relating to aggregate of arthropods*) και '*μέτρηση σχετική με συσσωματώματα σπονδυλωτών*' (*measure relating to aggregate of vertebrates*). Σε αυτούς βρίσκονται όροι όπως '*ένταση της μόλυνσης του ξενιστή με αρθρόποδα*' (*intensity of host infestation by arthropods*), που δίνουν πληροφορίες για τον αριθμό των αρθροπόδων ανά τους μολυσμένους ξενιστές. Άλλοι σημαντικοί όροι της κατηγορίας αυτής είναι οι '*νοσηρότητα του δάγκειου πυρετού*' (*morbidity of dengue fever*) και '*θνησιμότητα του δάγκειου πυρετού*' (*mortality of dengue fever*).

Ιδιότητα (quality)

Ακολουθεί τώρα μία μεγάλη και σημαντική τάξη, η '*ιδιότητα*'. Η αρχική της δομή έχει περιγραφεί ήδη (Εικόνα 12). Εδώ θα εξεταστούν κάποιες επιμέρους τάξεις της, ξεκινώντας με την τάξη '*ιδιότητα του δάγκειου πυρετού*' (*quality of dengue fever*), όπου βρίσκονται οι όροι που σχετίζονται με την τάξη αυτή (Εικόνα 14). Υπάρχει η τάξη '*κλινική εκδήλωση του δάγκειου*' (*clinical manifestation of dengue*). Εδώ παρουσιάζεται για πρώτη φορά ο τρόπος με τον οποίο αποφασίστηκε να αντιμετωπιστεί το θέμα των πέντε διαφορετικών ορότυπων του ιού. Αντί να εμφανίζονται όλοι οι κατώτεροι όροι σε πενταπλά αντίγραφα, υπάρχει ένας ανώτερος όρος και από κάτω οι πέντε διαφορετικοί ορότυποι. Στην αντίθετη περίπτωση ο αριθμός των όρων της οντολογίας θα αυξανόταν υπερβολικά. Επίσης έτσι θα δημιουργούνταν μία επιπλέον πολυπλοκότητα, η οποία θα έκανε τη χρήση και τη διαχείριση της οντολογίας πολύ δύσκολη.

Η απόφαση αυτή αποδείχθηκε σωστή, με την πρόσφατη ανακάλυψη του πέμπτου ορότυπου του ιού του δάγκειου (Normile, 2013). Όταν ξεκίνησε η ανάπτυξη της οντολογίας η επιστημονική κοινότητα γνώριζε μόνο για την ύπαρξη τεσσάρων ορότυπων, άρα μόνο αυτοί είχαν συμπεριληφθεί στην οντολογία. Πρόσφατα όμως, η ανακάλυψη ενός πέμπτου οδήγησε στην ανάγκη της προσαρμογής την IDODEN. Ήταν μία γρήγορη και εύκολη διαδικασία, ακριβώς επειδή είχε αρχικά επιλεχθεί να δομηθεί με αυτόν τον συγκεκριμένο τρόπο η οντολογία.

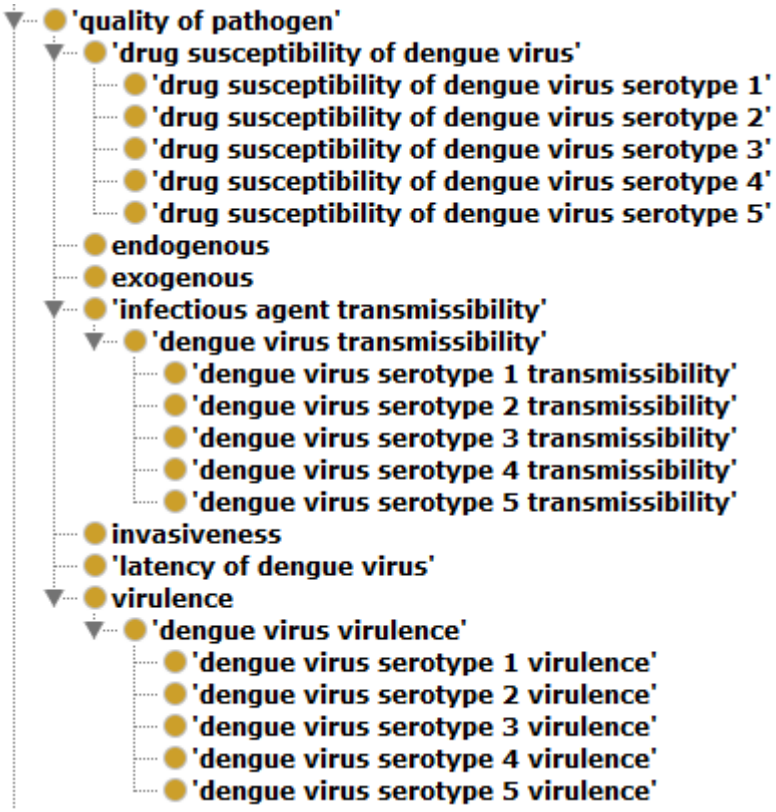


Εικόνα 14. Η δομή της τάξης 'ιδιότητα του δάγκειου πυρετού' (quality of dengue fever).

Πέραν, λοιπόν, της τάξης '*κλινική εκδήλωση του δάγκειου*' και των πέντε παιδιών της, ένα για κάθε ορότυπο, στην τάξη '*ιδιότητα του δάγκειου πυρετού*' συναντάται και η τάξη '*επιδημιολογικός τύπος του δάγκειου πυρετού*' (*epidemiological type of dengue fever*). Κάτω από τον όρο βρίσκονται οι διαφορετικοί τύποι του δάγκειου πυρετού, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την κατηγοριοποίηση της νόσου σε επιδημιολογικές μελέτες, οι οποίες, για παράδειγμα, προσπαθούν να δώσουν μία εξήγηση για το πώς προέκυψε μία επιδημία, ή να κάνουν προβλέψεις για το επόμενο ξέσπασμα.

Επίσης, η ύπαρξη των όρων αυτών καθίσταται αναγκαία λόγω της παρουσίας κρουσμάτων της νόσου σε νέο-κατοικημένες περιοχές (Koyadun et al., 2012), και λόγω της ευκολίας που υπάρχει πλέον στα ταξίδια από ένα ενδημικό μέρος του δάγκειου σε ένα μη ενδημικό (Allwinn, 2011; Centers for Disease and Prevention, 2010; Ratnam et al., 2013).

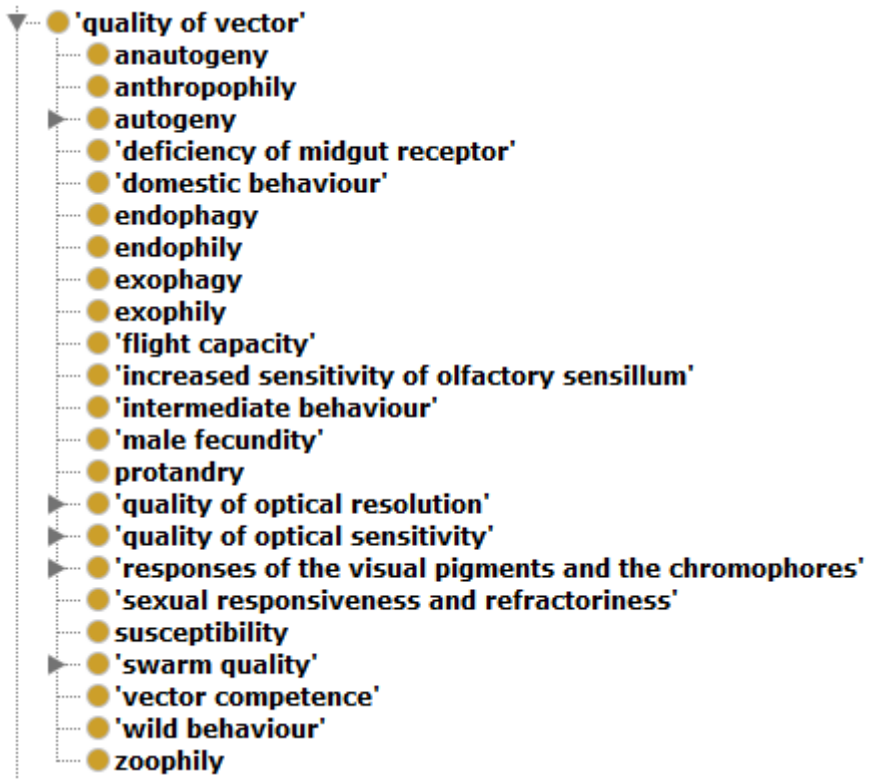
Στην τάξη '*ιδιότητα του παθογόνου*' (*quality of pathogen*) συμπεριλαμβάνονται οι όροι που σχετίζονται με τις ιδιότητες του ιού του δάγκειου (Εικόνα 15). Με τον όρο '*φαρμακολογική ευαισθησία του ιού του δάγκειου*' (*drug susceptibility of dengue virus*) περιγράφουμε την ιδιότητα του ιού να ζημιωθεί ή να ανασταλεί από κάποια φαρμακευτική ουσία. Κι εδώ έχει γίνει ο διαχωρισμός για τους πέντε διαφορετικούς ορότυπους του ιού.



Εικόνα 15. Η δομή της τάξης 'ιδιότητα του παθογόνου' (quality of pathogen).

Με τον όρο '*ιδιότητα της μετάδοσης του ιού του δάγκειου*' (*dengue virus transmissibility*) περιγράφεται η ιδιότητα του ιού να υποβληθεί στη διαδικασία της οριζόντιας μετάδοσης. Η μετάδοση, δηλαδή, του ιού του δάγκειου από ένα άτομο σε ένα άλλο χωρίς αυτά να έχουν σχέση γονέα-παιδιού μεταξύ τους. Συναντάται επίσης και ο όρος '*μολυσματικότητα του ιού του δάγκειου*' (*dengue virus virulence*), που περιγράφει την ιδιότητα του ιού να προκαλεί ασθένεια που να οδηγεί στις σοβαρές μορφές της νόσου ή σε θάνατο.

Στην τάξη '*ιδιότητα του φορέα*' (*quality of vector*) βρίσκονται όλοι οι όροι σχετικοί με τις ιδιότητες του κουνουπιού (Εικόνα 16). Εδώ δεν τίθεται το θέμα του διαχωρισμού όπως στις δύο προηγούμενες τάξεις, διότι η αναφορά γίνεται πλέον στον φορέα και όχι στο παθογόνο.



Εικόνα 16. Η δομή της τάξης 'ιδιότητα του φορέα' (quality of vector).

Όπως παρατηρείται εδώ υπάρχει μία ποικιλία όρων, και εφόσον το σημείο αναφοράς είναι πλέον το κουνούπι, διαφέρουν αρκετά από αυτούς που συναντήθηκαν μέχρι τώρα. Οι όροι που βρίσκονται εδώ είναι αναγκαίοι για την περιγραφή του κύκλου ζωής του κουνουπιού και για διάφορες εντομολογικές μελέτες. Για παράδειγμα ο όρος '*οικιακή συμπεριφορά*' (*domestic behaviour*) αναφέρεται στην ιδιότητα που έχουν τα κουνούπια να ξεκουράζονται μέσα στην κατοικία μετά τη λήψη ενός γεύματος αίματος. Να τονιστεί εδώ ότι παρόλο που ο όρος έχει μέσα τη λέξη «συμπεριφορά» δεν συγκαταλέγεται στην τάξη '*διαδικασία συμπεριφοράς ενήλικου*' (*adult behavior*), αλλά στην τάξη '*ιδιότητα*'. Εδώ παίζει σημαντικό ρόλο ο ορισμός, ο οποίος αναφέρεται στην ιδιότητα αυτή των κουνουπιών και όχι στην διαδικασία αυτή καθαυτή. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και στον όρο '*ενδιάμεση συμπεριφορά*' (*intermediate behaviour*), που αναφέρεται στην ιδιότητα των κουνουπιών να εξέρχονται της κατοικίας μετά τη λήψη ενός γεύματος αίματος.

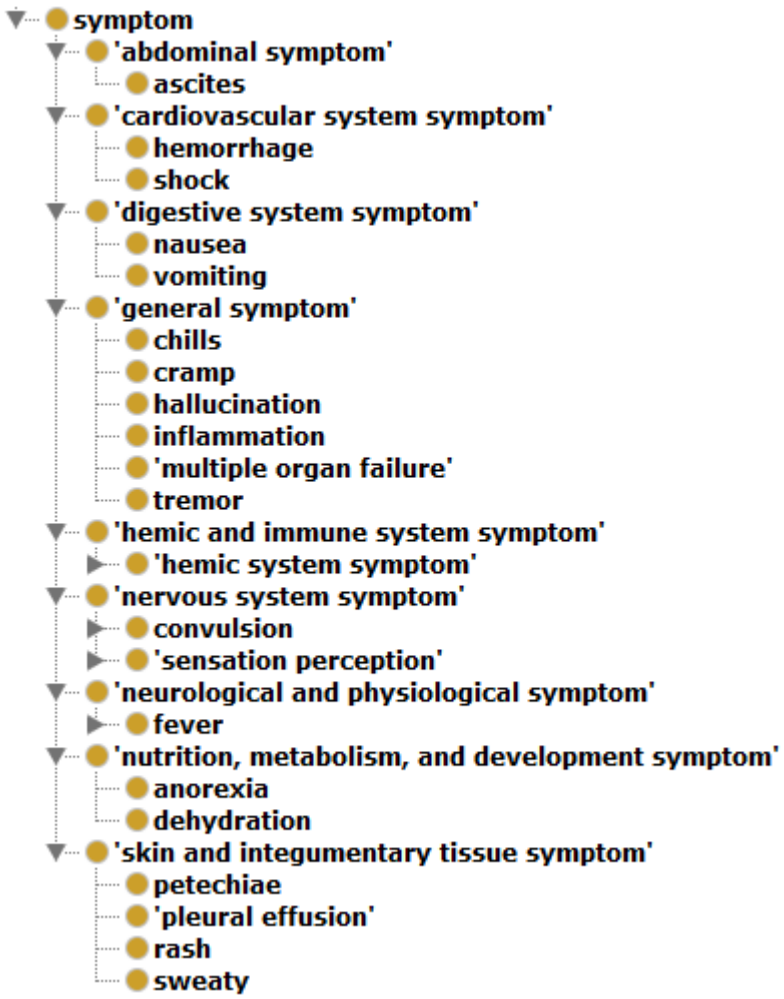
Στην τάξη '*ιδιότητα του παθογόνου*' είχε παρουσιαστεί ο όρος '*φαρμακολογική ευαισθησία του ιού του δάγκειου*' (*drug susceptibility of dengue virus*). Εδώ συναντάται ο πιο γενικός όρος '*ευαισθησία*' (*susceptibility*). Είναι εμφανές εδώ πόσο σημαντικό είναι να γίνεται σαφής διαχωρισμός τόσο στο όνομα των όρων, όσο και στους ορισμούς τους. Στην συγκεκριμένη τάξη ο όρος '*ευαισθησία*' ορίζεται πλέον ως η ιδιότητα που έχει μία οντότητα να ζημιωθεί από μία άλλη οντότητα συγκεκριμένου τύπου. Είναι σαφές πόσο πιο γενικός είναι ο ορισμός αυτού του όρου σε σχέση με τον προαναφερμένο.

Ένας ακόμη σημαντικός και χρήσιμος όρος στην τάξη '*ιδιότητα του φορέα*' είναι ο όρος '*ικανότητα του φορέα*' (*vector competence*). Ο ορισμός του είναι ο εξής: «Η ικανότητα ενός φορέα να αποκτήσει ένα παθογόνο και να το μεταφέρει με επιτυχία σε έναν άλλο δεκτικό οργανισμό». Πέραν της χρησιμότητάς του στην IDODEN, θεωρούμε ότι ο όρος αυτός είναι αρκετά γενικός και θα έπρεπε να συμπεριληφθεί

στον πυρήνα της IDO. Το αίτημα στους δημιουργούς της IDO, ώστε να πραγματοποιηθεί αυτό, έχει ήδη γίνει.

Σύμπτωμα (Symptom)

Εφόσον η IDODEN έχει ως θέμα της μία νόσο η οποία εμφανίζει κλινική εικόνα, δεν θα μπορούσαν να λείπουν τα συμπτώματα από αυτήν (Εικόνα 17).



Εικόνα 17. Η δομή της τάξης 'σύμπτωμα' (symptom).

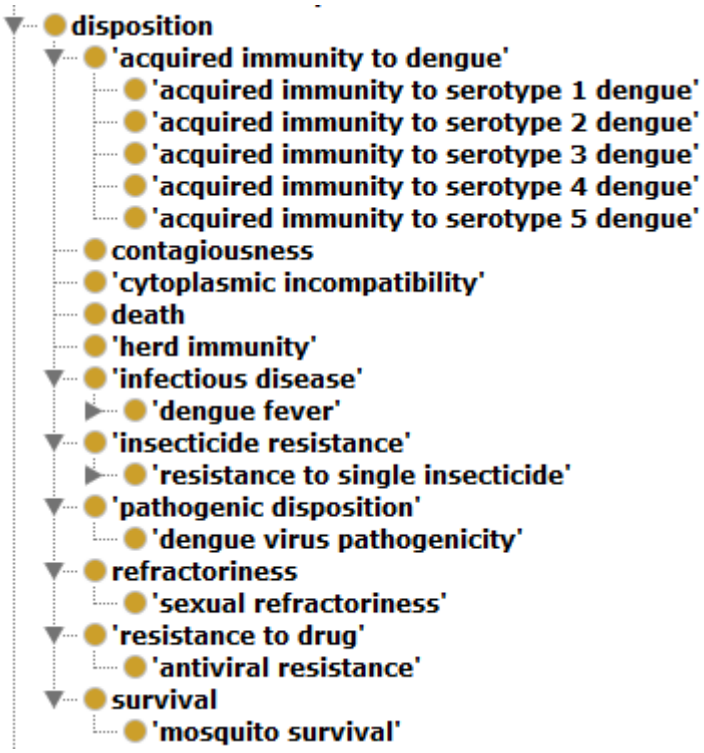
Όταν ξεκίνησε η δημιουργία της οντολογίας, δεν υπήρχε κάποια πιο εξειδικευμένη που να περιγράφει το σύνολο των όρων του πεδίου αυτού. Οπότε αρχικά, όλοι οι όροι της τάξης '*σύμπτωμα*' (*symptom*) είχαν κωδικό είτε από την IDOMAL, η οποία περιείχε κάποια από τα συμπτώματα ήταν αναγκαία, είτε κωδικό της IDODEN, αφού δημιουργήθηκαν για αυτήν. Κατά την πορεία της ανάπτυξης της οντολογίας, όμως, εμφανίστηκε η οντολογία των συμπτωμάτων (Symptom Ontology, SO), οπότε και όλοι οι όροι άλλαξαν κωδικούς και υιοθετήθηκε και η δομή της (http://symptomontologywiki.igs.umaryland.edu/wiki/index.php/Main_Page). Να σημειωθεί ότι δεν κρατήθηκαν οι αρχικοί κωδικοί IDODEN ως δευτερεύοντες, διότι η οντολογία βρισκόταν ακόμα σε beta μορφή.

Εδώ συναντάται κι ένα από τα μειονεκτήματα του δανεισμού όρων από άλλες οντολογίες. Κάποια παιδιά της τάξης '*σύμπτωμα*', όπως '*σύμπτωμα του πεπτικού συστήματος*' (*digestive system symptom*) και '*σύμπτωμα του νευρικού συστήματος*' (*nervous system symptom*), δεν έχουν ορισμούς. Βάση της αρχής MIREOT (Xiang et al., 2010), απαγορεύεται η επέμβαση και η εισαγωγή ορισμών από τρίτους. Πρέπει να ενημερωθούν οι δημιουργοί της οντολογίας και να πραγματοποιηθεί η προσθήκη από τους ίδιους.

Διάθεση (disposition)

Ο όρος '*διάθεση*' (*disposition*) ορίζεται ως «μία πραγματοποιήσιμη οντότητα που ουσιαστικά προκαλεί μία συγκεκριμένη διαδικασία ή αλλαγή, υπό συγκεκριμένες συνθήκες σύμφωνα με τους κανόνες της φύσης». Για παράδειγμα, ο όρος '*μολυσματική ασθένεια*' (*infectious disease*) είναι παιδί αυτής της τάξης, διότι είναι μία ασθένεια της οποίας η φυσική βάση είναι μία μόλυνση (Εικόνα 18). Ένα πιο απλό

παράδειγμα είναι η διάθεση ενός ασθενούς με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα να νοσήσει.



Εικόνα 18. Η δομή της τάξης 'διάθεση' (disposition).

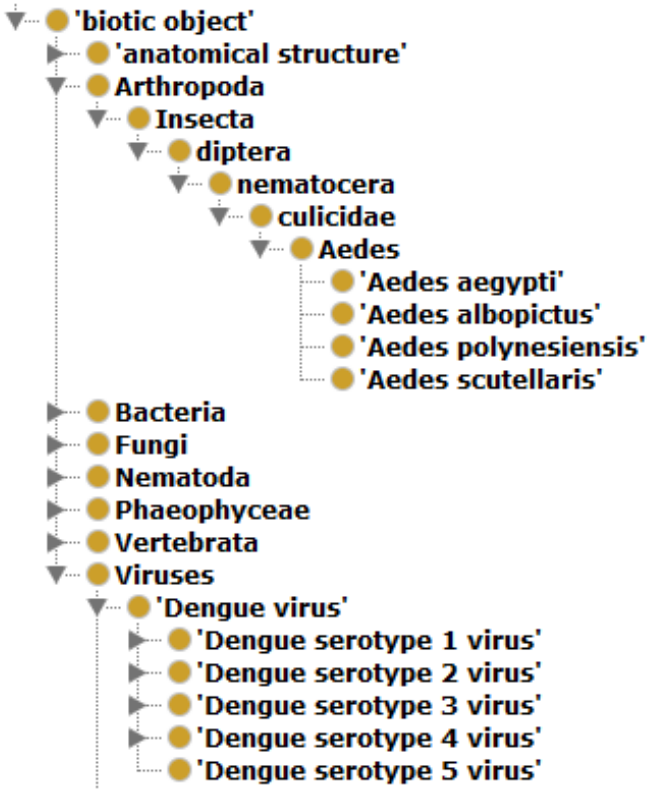
Στην τάξη αυτή συναντάται, λοιπόν, ο όρος '*δάγκειος πυρετός*' (*dengue fever*). Άλλοι σημαντικοί όροι της τάξης '*διάθεση*' είναι '*ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα*' (*insecticide resistance*), '*μεταδοτικότητα*' (*contagiousness*), '*παθογένεια του ιού του δάγκειου*' (*dengue virus pathogenicity*), '*ανθεκτικότητα σε αντιϊκό*' (*antiviral resistance*) και '*επιβίωση*' (*survival*).

Οι όροι που έχουν να κάνουν με την ανθεκτικότητα είναι υψίστης σημασίας, διότι, όπως έχει προαναφερθεί, τα κουνούπια εμφανίζουν όλο και μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα, ενώ η καταπολέμηση του ιού του δάγκειου δεν έχει δώσει μέχρι σήμερα θετικά αποτελέσματα, όμως γίνονται συνεχώς μελέτες σε αυτόν τον τομέα (Low et al., 2011; Noble et al., 2010; Sampath and Padmanabhan, 2009).

Ρόλος (role) και 'βιοτικό αντικείμενο' (biotic object)

Η τάξη '*ρόλος*' (*role*) είναι από τις πιο πολυπληθέστερες της οντολογίας. Αυτό συμβαίνει διότι επικρατεί η τάση να σκεφτόμαστε στην καθημερινότητά μας κάποια πράγματα, τα οποία οντολογικά είναι τελείως διαφορετικά. Για παράδειγμα, συνήθως σκεφτόμαστε το κουνούπι ως φορέα και τον ιό του δάγκειου ως παθογόνο, και αυτό είναι σωστό υπό άλλες συνθήκες. Στην οντολογία, όμως, αυτό είναι λάθος. Το *Aedes aegypti* δεν είναι φορέας, αλλά είναι απόγονος του *Aedes*, το οποίο με τη σειρά του είναι απόγονος της τάξης '*έντομα*' (*insecta*). Ενώ ακόμα πιο πάνω στη δομή βρίσκεται η τάξη '*βιοτικό αντικείμενο*'. Παρομοίως, παρατηρείται ότι και ο '*ιός του δάγκειου*' (*Dengue virus*) είναι απόγονος της τάξης '*ιοί*' (*viruses*) (Εικόνα 19). Γιατί όμως συμβαίνει αυτό; Διότι στην οντολογία οι όροι '*φορέας*' και '*παθογόνο*' είναι ρόλοι που κατέχουν οι δύο αυτές τάξεις, που είναι '*αυθύπαρκτη συνεχής οντότητα*' (*independent continuant*). Είναι ρόλοι που έχουν προσωρινά, σε κάποιο στάδιο του κύκλου ζωής τους, δεν είναι απαραίτητοι για την ύπαρξη των προαναφερθέντων οντοτήτων.

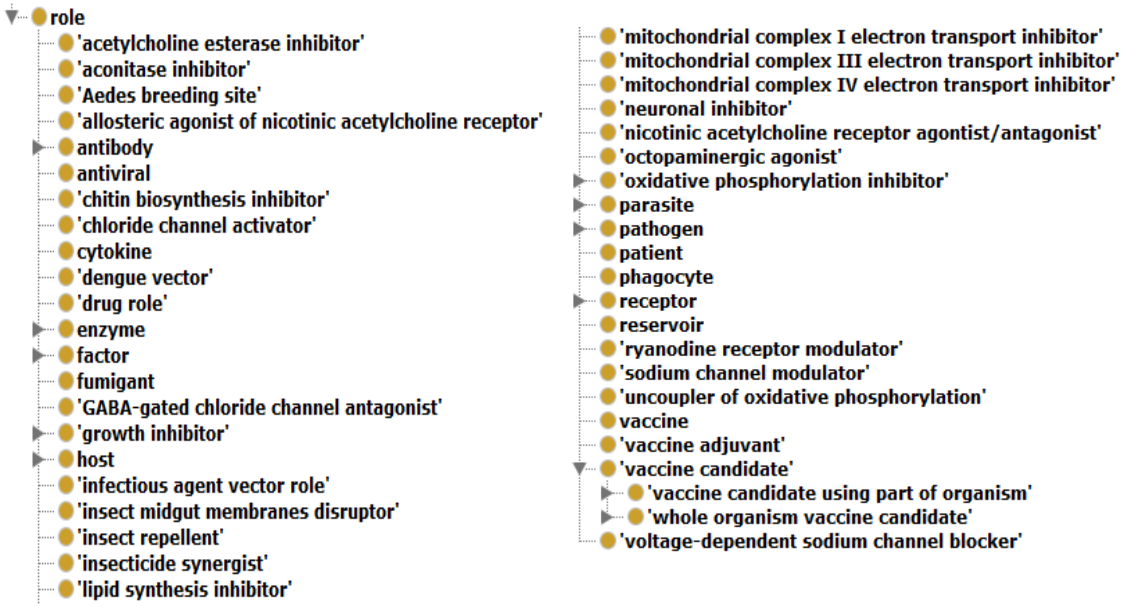
Εδώ να αναφερθεί, επίσης, ότι ως απόγονοι των ορότυπων του ιού του δάγκειου έχουν εισαχθεί τα διαφορετικά στελέχη τους που χρησιμοποιούνται σε μελέτες. Η λογική αυτής της εισαγωγής ήταν ότι οι όροι αυτοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν, για παράδειγμα, για την αναζήτηση συγκεκριμένου στελέχους σε σχέση με το σκοπό που είχε ήδη χρησιμοποιηθεί και σε ποιες μελέτες συμμετείχε.



Εικόνα 19. Η ιεραρχία των όρων Aedes και 'ιός του δάγκειου' (Dengue virus)

Είναι, λοιπόν, λογικό ότι η τάξη '*ρόλος*' περιέχει όρους που παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία (Εικόνα 20). Εδώ βρίσκονται όλοι οι πιθανοί ρόλοι που μπορεί να έχει κάποια χημική ουσία, όπως '*φάρμακο*' (*drug role*), '*εμβόλιο*' (*vaccine*), '*υποψήφιο εμβόλιο*' (*vaccine candidate*), '*αντιϊκό*' (*antiviral*), ή κάποιος οργανισμός, όπως '*παθογόνο*' (*pathogen*), '*ασθενής*' (*patient*), '*ξενιστής*' (*host*).

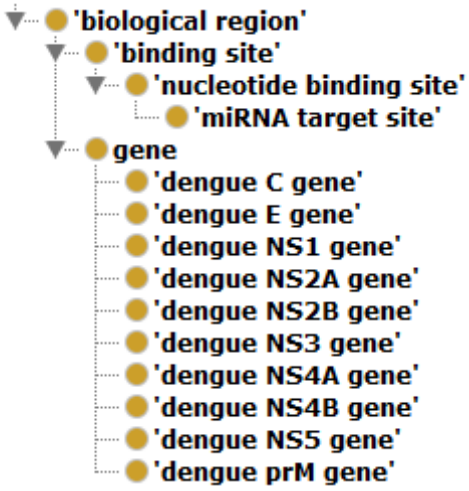
Όροι που ανήκουν στην τάξη '*αυθύπαρκτη συνεχής οντότητα*' συνδέονται με τους διάφορους ρόλους τους μέσω της σχέσης *has_role*. Είναι μία από τις εννέα σχέσεις που περιέχεται στην οντολογία του δάγκειου. Για παράδειγμα, όλα τα υποψήφια εμβόλια έχουν κατηγοριοποιηθεί ως '*χημικό σκεύασμα*' (*chemical compound*), έχουν όμως τον ρόλο '*υποψήφιο εμβόλιο*'.



Εικόνα 21. Η δομή της τάξης 'ρόλος' (role).

Βιολογική περιοχή (biological region)

Ο όρος '*γονίδιο*' (*gene*) έχει οριστεί ως εξής: «Μία περιοχή (ή περιοχές) που εμπεριέχει όλα τα στοιχεία μία αλληλουχίας που είναι απαραίτητα για την κωδικοποίηση ενός λειτουργικού μετάγραφου. Ένα γονίδιο μπορεί να περιλαμβάνει ρυθμιστικές περιοχές, μεταγραφόμενες περιοχές ή/και άλλες λειτουργικές περιοχές». Οπότε ο όρος αυτός είναι απόγονος του όρου '*βιολογική περιοχή*' (*biological region*) (Εικόνα 22). Ως παιδιά του έχει τα επτά γονίδια του ιού.



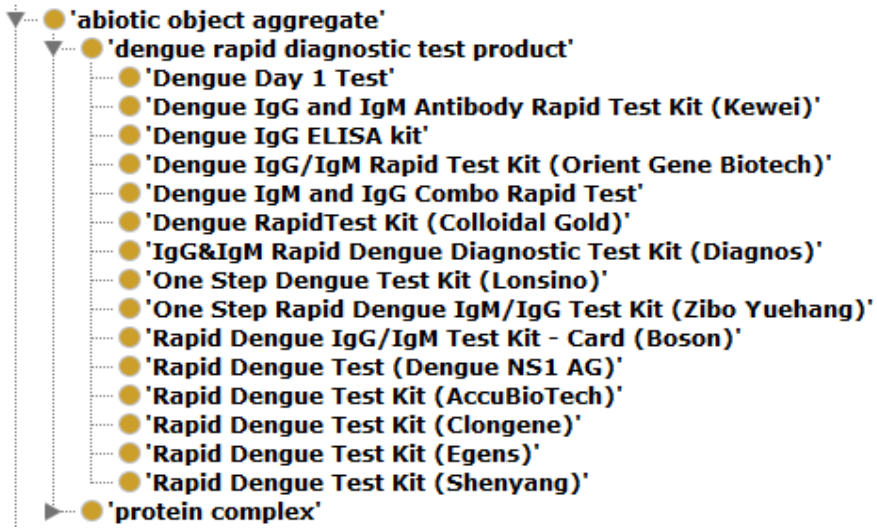
Εικόνα 22. Η δομή της τάξης 'βιολογική περιοχή' (biological region).

Όπως έχει προαναφερθεί ο δάγκειος πυρετός προκαλείται από έναν ιό. Έχει αποδειχθεί ότι κουνούπια του είδους *Aedes aegypti, παρόμοια με* την *Drosophila melanogaster*, έχουν την ικανότητα της γονιδιακής σίγησης (Sanchez-Vargas et al., 2004). Η επιστημονική κοινότητα έχει στραφεί και προς αυτή την οδό για τη επίλυση του προβλήματος. Προσπαθούν να χρησιμοποιήσουν το παρεμβαλλόμενο RNA (RNA interference, RNAi) για να καταστείλουν τη μόλυνση (Kakumani et al., 2013; Lee et al., 2010), δημιουργώντας ακόμα και τεχνητά microRNAs ώστε να παρεμποδίσουν τον πολλαπλασιασμό του ιού (Xie et al., 2013). Για αυτό το λόγο υπάρχει οι όροι '*θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίων*' (*nucleotide binding site*) και '*θέση στόχος miRNA*' (*miRNA target site*) (Εικόνα 22).

Διαγνωστικά προϊόντα για έλεγχο ύπαρξης του ιού του δάγκειου (Dengue rapid diagnostic test products), διαγνωστική διαδικασία (diagnostic procedure) και γενική θεραπευτική διαδικασία (general therapeutic treatment)

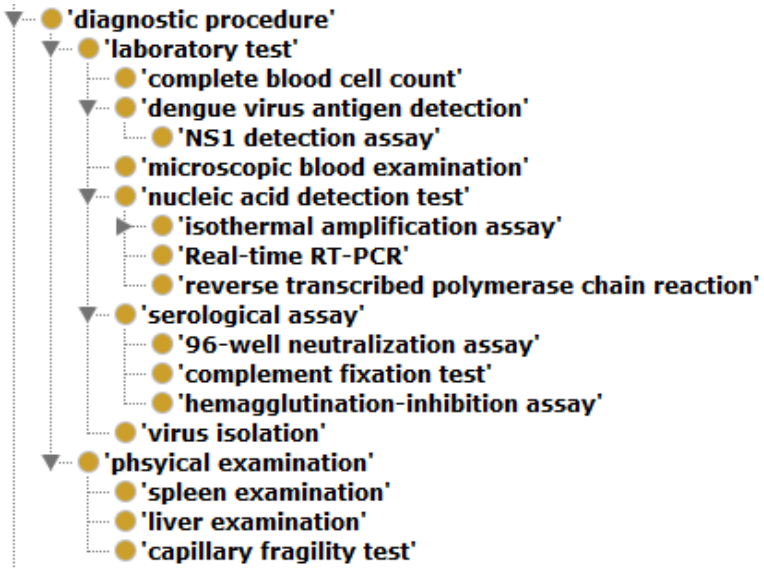
Ο δάγκειος είναι ενδημικός σε πάνω από 110 χώρες. Δεν είναι όμως εύκολο να τον διαχωρίσει κανείς από άλλες νόσους, κυρίως στα αρχικά του στάδια (Ranjit and

Kissoon, 2011). Για αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί διάφορα διαγνωστικά προϊόντα ελέγχου για την ταυτοποίηση του ιού (Εικόνα 23).



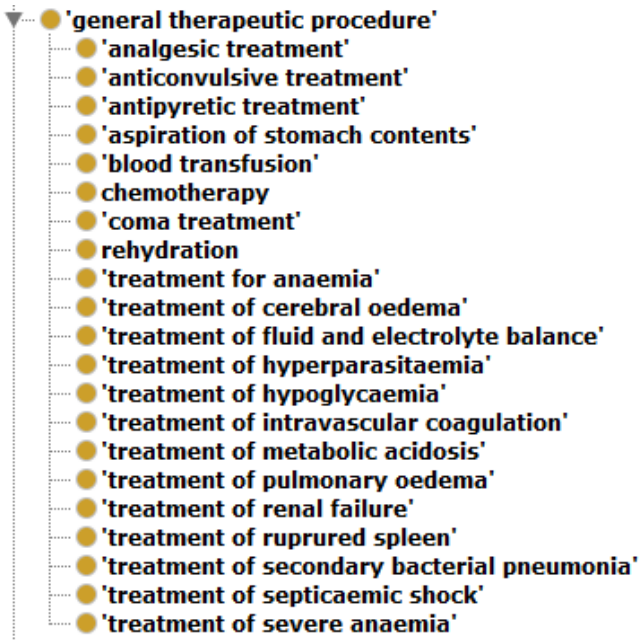
Εικόνα 23. Η δομή της τάξης 'διαγνωστικά προϊόντα για έλεγχο ύπαρξης του ιού του δάγκειου' (Dengue rapid diagnostic test product).

Πέρα όμως από διαγνωστικά προϊόντα υπάρχουν και διαγνωστικές διαδικασίες που ακολουθούνται από μέλη του ιατρικού κλάδου για την αναγνώριση του δάγκειου πυρετού (Εικόνα 24). Οι δύο αυτοί όροι είναι απαραίτητοι εάν σκεφτεί κανείς ότι η οντολογία αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για συστήματα διευκόλυνσης λήψης αποφάσεων ή από ιατρικό προσωπικό που δεν βρίσκεται σε κάποια κλινική ή νοσοκομείο, αλλά στο πεδίο.



Εικόνα 24. Η δομή της τάξης 'διαγνωστική διαδικασία' (diagnostic process).

Πέραν της διάγνωσης έχει συμπεριληφθεί και η τάξη '*γενική θεραπευτική διαδικασία*' (*general therapeutic procedure*), όπου βρίσκονται οι διαδικασίες που ακολουθούνται από το ιατρικό προσωπικό για την θεραπεία του ασθενούς (Εικόνα 25).

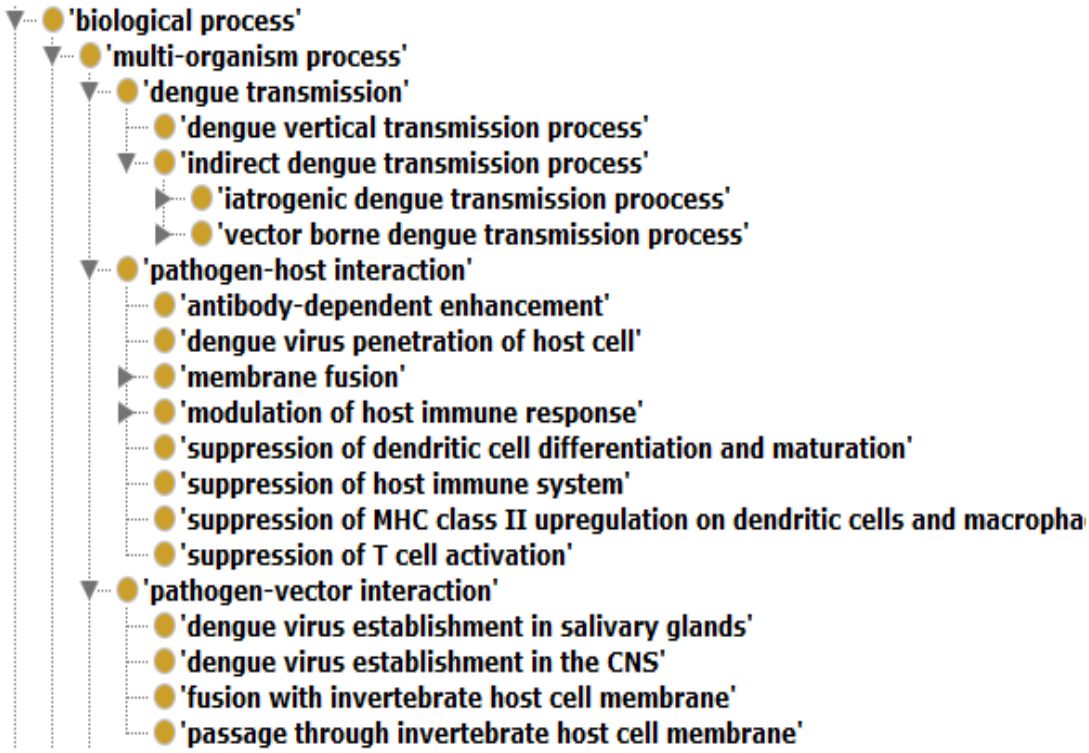


Εικόνα 25. Η δομή της τάξης 'γενική θεραπευτική διαδικασία' (general therapeutic procedure).

Διαδικασία (process)

Όπως περιγράφτηκε ήδη νωρίτερα, η τάξη '*διαδικασία*' (*process*) παρουσιάζει τον γνωστό, πλέον, διαχωρισμό σε φορέα, παθογόνο, ξενιστή και τους αντίστοιχους πληθυσμούς τους (Εικόνα 12). Θα εξεταστεί τώρα σε λίγο μεγαλύτερο βάθος η τάξη αυτή.

Αρχικά συναντάται η τάξη '*πολύ-οργανισμική διαδικασία*' (*multi-organism process*), η οποία περιέχει όρους οι οποίοι περιγράφουν διαδικασίες στις οποίες ένας οργανισμός έχει κάποια επίδραση σε έναν άλλο οργανισμό του ίδιου ή διαφορετικού είδους (Εικόνα 26).



Εικόνα 26. Η δομή της τάξης 'πολυ-οργανισμική διαδικασία' (multi-organism process).

Στον τάξη αυτή βρίσκονται και οι διάφορες διαδικασίες με τις οποίες μεταδίδεται ο δάγκειος. Πέραν του συνηθισμένου τρόπου μετάδοσης, υπάρχει και η '*διαδικασία της*

ιατρογενούς μετάδοσης του δάγκειου’ (*iatrogenic dengue transmission process*), κατά την οποία ο δάγκειος μεταδίδεται σε ασθενής λόγω ιατρικής παρέμβασης, όπως μετάδοση μέσω μολυσμένου αίματος κατά τη μετάγγιση.

Πέραν αυτού του τρόπου μετάδοσης υπάρχει κι ένας ακόμα πιο σπάνιος, ο οποίος περιγράφεται με τον όρο ‘*διαδικασία κάθετης μετάδοσης του δάγκειου*’ (*dengue vertical transmission process*). Κατά τη διαδικασία αυτή ο δάγκειος μεταδίδεται από τη μητέρα στο παιδί. Είναι ένα σπάνιο φαινόμενο, έχουν όμως καταγραφεί τέτοια περιστατικά (Chye et al., 1997; Fatimil et al., 2003; Maroun et al., 2008).

Στην τάξη ‘*πολυ-οργανισμική διαδικασία*' συναντώνται επίσης και όροι που σχετίζονται με τις διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ παθογόνου-φορέα, παθογόνου-ξενιστή. Αυτές είναι τάξεις όπου μελλοντικά αναμένουμε ότι θα αποκτήσουν πληθώρα απογόνων. Μέχρι στιγμής δεν είναι γνωστό τι ακριβώς συμβαίνει στο εσωτερικού του κουνουπιού όταν αυτό προσβληθεί από τον ιό του δάγκειου.

Στην τάξη ‘*αλληλεπίδραση παθογόνου-ξενιστή*’ (*pathogen-host interaction*) υπάρχει ο όρος ‘*ενίσχυση εξαρτημένη από αντισώματα*’ (*antibody-dependent enhancement*). Ο όρος αυτός είναι αναγκαίος για να την περιγραφή μίας ακόμη ιδιαιτερότητας του δάγκειου, κατά την οποία οι πιθανότητες ένας άνθρωπος να εμφανίσει συμπτώματα δάγκειου και μία από τις δύο σοβαρές μορφές της νόσου, αυξάνεται εκθετικά αν μολυνθεί για δεύτερη φορά με διαφορετικό ορότυπο (Guzman et al., 2013; Guzman et al., 2010; Webster et al., 2009). Δεν είναι ακόμα σαφές γιατί συμβαίνει, αλλά εικάζεται ότι τα αντισώματα που δημιουργήθηκαν κατά την πρώτη μόλυνση, δεν μπορούν να εξουδετερώσουν τον ιό του καινούριου ορότυπου της δεύτερης μόλυνσης και αντ’ αυτού ενισχύουν την είσοδο στο κύτταρα του ξενιστή. Αυτό οδηγεί σε αυξημένη μολυσματικότητα των κυττάρων αυτών (Guzman, Halstead et al. 2010, Guzman, Alvarez et al. 2013).

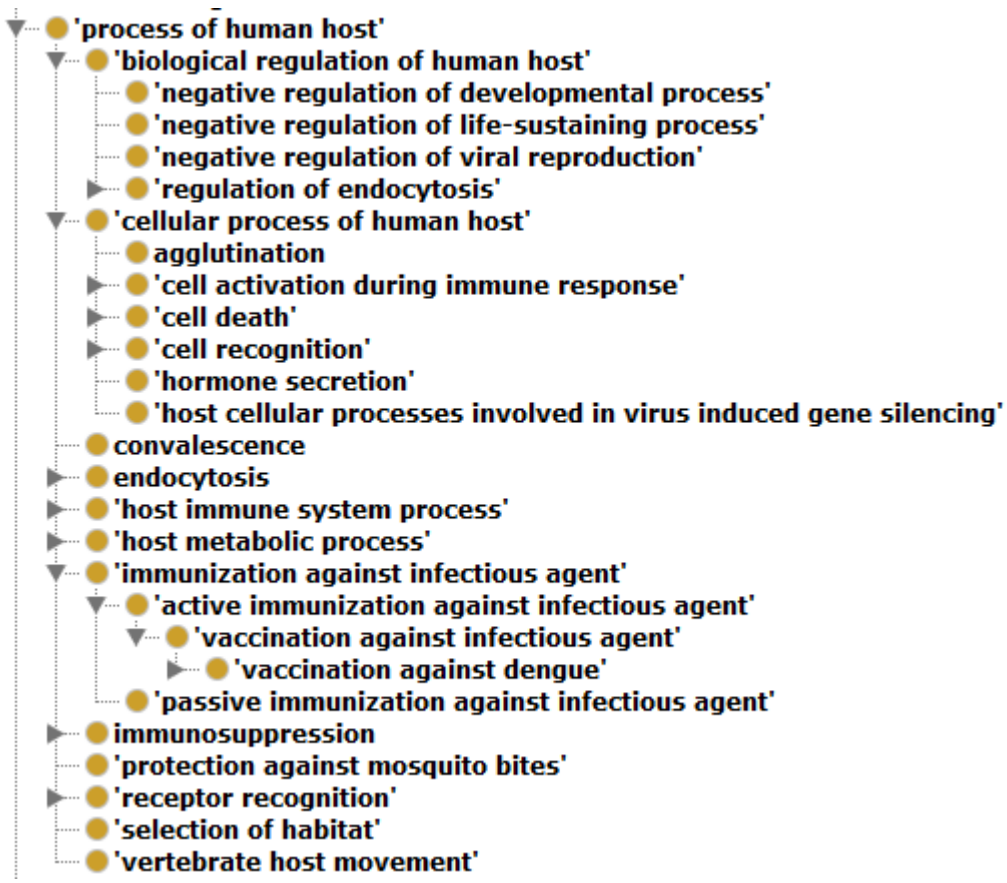
Αυτό ακριβώς το γεγονός καθιστά και απαραίτητη την ανάγκη για ένα εμβόλιο το οποίο θα καλύπτει όλους τους ορότυπους του ιού. Οι μέχρι τώρα κλινικές δοκιμές λάμβαναν υπόψη τους τέσσερις ορότυπους, η εμφάνιση όμως του πέμπτου θέτει σε κίνδυνο όλες αυτές τις μελέτες (Normile, 2013).

Ακολουθεί μία τάξη με πολλούς όρους, η τάξη '*φυσιολογική διαδικασία του φορέα του δάγκειου*' (*physiological process of dengue vector*) της οποίας κύριος απόγονος είναι η τάξη '*διαδικασία της συμπεριφοράς*' (*behavioural process*) (Εικόνα 27). Στην τάξη αυτή έχουν συμπεριληφθεί μία πληθώρα όρων που σχετίζονται με τη συμπεριφορά του κουνουπιού σε όλα του τα στάδια, προνύμφη, νύμφη και ενήλικο. Έχει δοθεί έμφαση κυρίως στη συμπεριφορά του ενήλικου κουνουπιού διότι σε αυτό το στάδιο του κύκλου της ζωής του είναι που μεταδίδει τη νόσο. Συμπεριλαμβάνονται όροι όπως '*συμπεριφορά εναπόθεσης αυγών'* (*egg-laying behaviour*) και '*τροφική συμπεριφορά ενήλικου*' (*adult feeding behaviour*). Ο δεύτερος όρος και οι απόγονοί του είναι απαραίτητοι στην οντολογία, εφόσον ο τρόπος που μεταδίδεται ο ιός του δάγκειου από ένα μολυσμένο κουνούπι στον άνθρωπο είναι το τσίμπημα. Γενικότερα οι όροι της τάξης '*διαδικασία της συμπεριφοράς*' είναι ύψιστης σημασίας για όσους δουλεύουν στο πεδίο.

- 'behavioural process'
  - 'adult behavioural process'
    - activation
    - 'adult feeding behaviour'
    - 'adult locomotion behaviour'
    - 'adult responses to visual stimulus'
    - 'approach of oviposition site'
    - 'behaviour of crepuscular and nocturnal species'
    - 'behaviour of diurnal species'
    - copulation
    - courtship
    - 'development of competence'
    - 'development of competence to respond to host cue'
    - 'effect of insemination'
    - 'effect of insemination in the adult circadian rhythm'
    - 'effect of simulated crepuscular conditions and moonlight'
    - 'egg laying behaviour'
    - 'exploration and examination of the body surface'
    - 'flight patterns in swarms'
    - 'flower visiting'
    - 'formation of assembly'
    - 'free-running of rhythm'
    - 'host seeking'
    - 'long-range approach'
    - mating
    - migration
    - 'pre-mating coupling'
    - 'pre-oviposition behaviour'
    - 'responsiveness to host cue'
    - 'senses and flight response during mating'
    - 'sexual behaviour'
    - 'short-range approach to the host'
    - 'short-range approach, alighting and exploration'
    - skin-hopping
    - 'sustained flight'
    - swarming
    - take-off

Εικόνα 27. Η δομή της τάξης 'διαδικασία της συμπεριφοράς ενήλικου' (adult behavioural process).

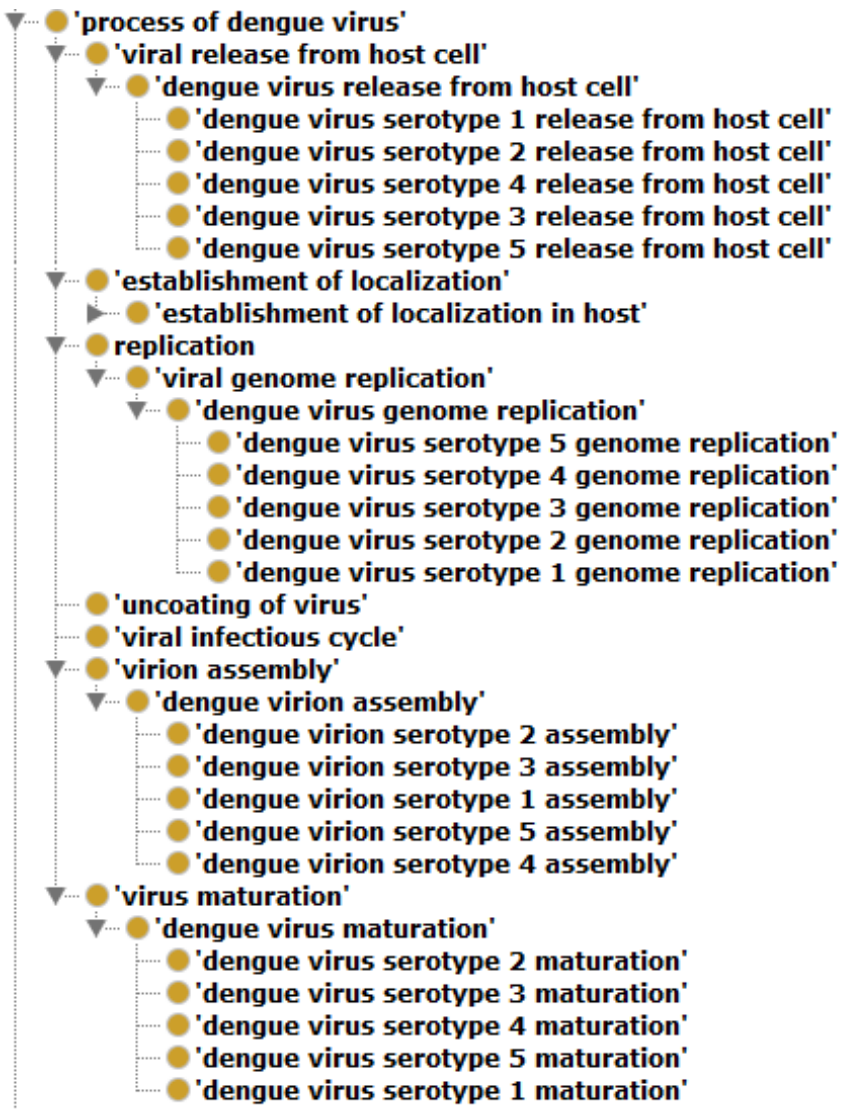
Οι δύο επόμενες τάξεις, '*διαδικασία του ανθρώπινου ξενιστή*' (*process of human host*) και '*διαδικασία του ιού του δάγκειου*' (*process of dengue virus*) αναμένεται, μελλοντικά, να αποκτήσουν περισσότερους όρους και διασυνδέσεις μεταξύ τους, καθώς γίνονται συνεχώς μελέτες για την αποσαφήνιση των διαδικασιών που προκαλεί ο ιός στον ξενιστή του, αλλά και λεπτομέρειες για τις διαδικασίες του ιού (Εικόνα 28 & 29).



Εικόνα 28. Η δομή της τάξης 'διαδικασία του ανθρώπινου ξενιστή' (process of human host)

Με αυτό το σκεπτικό έχει συμπεριληφθεί ήδη ο όρος '*εμβολιασμός κατά του δάγκειου*' (*vaccination against dengue*) στην οντολογία.

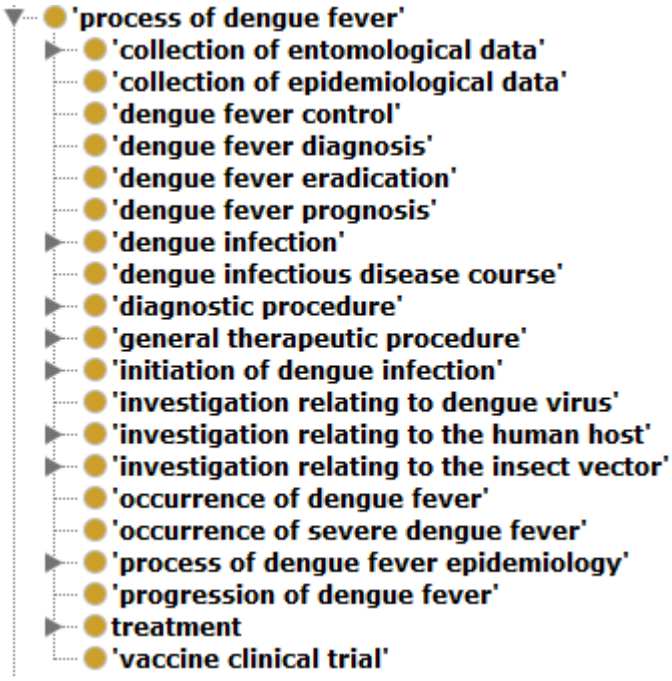
Η τάξη '*διαδικασία του ιού του δάγκειου*' εμπεριέχει όρους όπως '*έξοδος του ιού του δάγκειου από το κύτταρο ξενιστή*' (*dengue virus release from host cell*) και '*αντιγραφή του γονιδιώματος του ιού του δάγκειου*' (*dengue virus genome replication*). Κι εδώ παρατηρείται ότι υπάρχει διαχωρισμός για τους πέντε ορότυπους του ιού, ώστε να καθίσταται πιο ακριβής μία πιθανή επισημείωση δεδομένων.



Εικόνα 29. Η δομή της τάξης 'διαδικασία του ιού του δάγκειου' (process of dengue virus).

Στην τάξη '*διαδικασία του δάγκειου πυρετού*' συναντώνται όροι που είναι σχετικοί με την ασθένεια αυτή καθαυτή (Εικόνα 30). Δύο απόγονοι αυτής της τάξης έχουν εμφανιστεί πρωτύτερα, η '*διαγνωστική διαδικασία*' (*diagnostic procedure*) και η '*γενική θεραπευτική διαδικασία*' (*general therapeutic treatment*) (Εικόνα 24 & 25). Πέραν αυτών στη συγκεκριμένη τάξη βρίσκονται οι όροι '*συλλογή εντομολογικών δεδομένων*' (*collection of entomological data*) και '*συλλογή επιδημιολογικών δεδομένων*' (*collection of epidemiological data*). Μέσω τον όρων αυτών και μέσω των

σχέσεων με άλλους όρους της οντολογίας, οι οποίοι έχουν αναφερθεί προηγουμένως, μπορεί κανείς να επισημειώσει, ακόμα και να περιγράψει τις μελέτες που γίνονται σε αυτόν τον τομέα.



Εικόνα 30. Η δομή της τάξης 'διαδικασία του δάγκειου πυρετού' (process of dengue fever).

Χρήση της οντολογίας

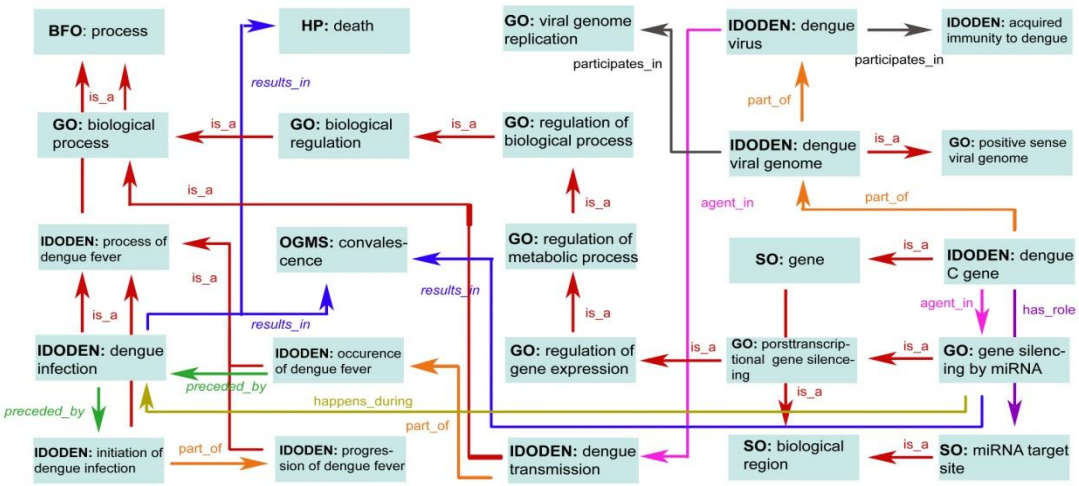
Η οντολογία του δάγκειου πυρετού είναι ελεύθερα διαθέσιμη στην VectorBase (https://www.vectorbase.org/navigation/downloads) και στο Bioportal του NCBO (http://bioportal.bioontology.org/ontologies/IDODEN). Η VectorBase είναι κι ένας από τους χρήστες της IDODEN, εφόσον είναι μία βάση δεδομένων που ασχολείται με φορείς που μεταδίδουν ασθένειες. Η IDODEN μπορεί μελλοντικά να χρησιμοποιηθεί ώστε να υπάρξει διασύνδεση της VectorBase, μέσω του εργαλείου Population

Biology Browser (PopBio), με δεδομένα πληθυσμών κουνουπιών, που συλλέγονται από διάφορες πηγές, όπως τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO).

Εκτός από την VectorBase, άλλος ένας χρήστης της οντολογίας είναι το IVCC (Innovative Vector Control Consortium) (Hemingway et al., 2006). Ένας οργανισμός που έχει ως σκοπό τη μείωση της μετάδοσης ασθενειών από το κουνούπι και άλλα έντομα. Για αυτό το σκοπό έχει αναπτύξει ένα Σύστημα Διευκόλυνσης της Λήψης Αποφάσεων (Decision Support System, DSS). Ήδη χρησιμοποιεί την IDOMAL για τα θέματα της ελονοσίας (Malaria Decision Support System), ενώ σύντομα θα συμπεριλάβει και την IDODEN για τα θέματα του δάγκειου πυρετού (Dengue Decision Support System).

Ένας από τους κύριους στόχους του DDSS είναι η δημιουργία και η διανομή ενός συστήματος που να προσφέρει πληροφορίες για όλους τους τομείς του φορέα και του δάγκειου πυρετού, ώστε να επιτρέπει σε διαχειριστές προγραμμάτων ελέγχου να εφαρμόζουν και να αποτιμούν τις κατάλληλες στρατηγικές ελέγχου και πρόληψη ασθενειών. Το μεγάλο φάσμα όρων που εμπεριέχει η IDODEN καλύπτει της ανάγκες αυτού του συστήματος και θα αποτελέσει τη βάση του.

Υπάρχει όμως και μία άλλη πλευρά στη χρήση της οντολογίας, αυτή της μοντελοποίησης μελετών και δεδομένων. Προηγουμένως έχουμε αναφέρει ότι μία προσπάθεια αντιμετώπισης της νόσου είναι η χρήση των miRNA με σκοπό τη γονιδιακή σίγηση (Kakumani et al., 2013; Lee et al., 2010). Για να γίνει πιο εύκολα κατανοητή αυτή η διαδικασία τόσο από τον άνθρωπο, όσο κι από έναν υπολογιστή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η οντολογία (Εικόνα 31).

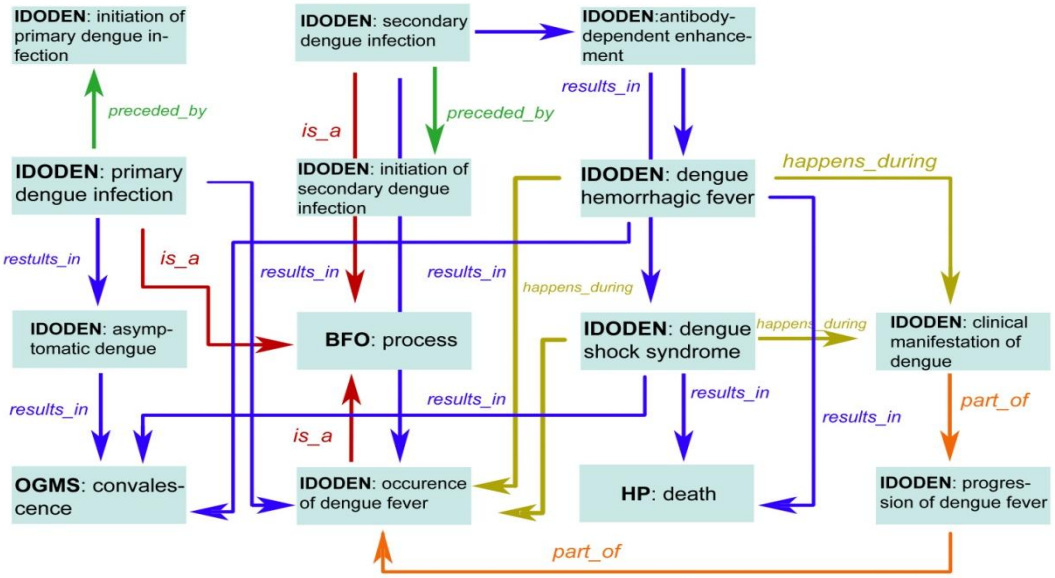


Εικόνα 31. Θεωρητική μοντελοποίηση της γονιδιακής σίγασης μέσω miRNA. Με έντονη γραμματοσειρά εμφανίζονται οι οντολογίες από τις οποίες προέρχονται οι όροι.

Μία '*μόλυνση με δάγκειο*' (*dengue infection*) μπορεί να είχε δύο αποτελέσματα, είτε '*θάνατο*' (*death*), είτε '*ανάρρωση*' (*convalescence*). Της ίδιας της μόλυνσης προηγείται η '*έναρξη μόλυνσης με δάγκειο*' (*initiation of dengue infection*), η οποία είναι μέρος της '*πορεία του δάγκειου πυρετού*' (*progression of dengue fever*). Ο όρος '*μόλυνση με δάγκειο*' είναι μία '*διαδικασία του δάγκειου πυρετού*' (*process of dengue fever*), που έχει ως γονέα τον όρο '*διαδικασία*' (*process*). Επιπλέον, αυτό που συμβαίνει κατά μία πιθανή μόλυνση με δάγκειο είναι ότι ενεργοποιείται η 'γονιδιακή *σίγηση μέσω miRNA*' (*gene silencing by miRNA*) που έχει ως αποτέλεσμα την '*ανάρρωση*'. Αυτό έχει κατηγοριοποιηθεί ως '*μετα-μεταγραφική γονιδιακή σίγηση*' (*posttranscriptional gene silencing*), το οποίο, μέσω των πατρικών όρων '*ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης*' (*regulation of gene expression*), '*ρύθμιση μεταβολικής διαδικασίας*' (*regulation of metabolic process*) και '*ρύθμιση βιολογικής διαδικασίας*' (*regulation of biological process*), μας οδηγεί στον όρο '*βιολογική ρύθμιση*' (*biological regulation*). Ακόμα πιο ψηλά βρίσκεται ο όρος '*βιολογική διαδικασία*' (*biological process*) και καταλήγουμε έτσι στον όρο '*διαδικασία*'. Το '*γονίδιο C του δάγκειου*' (*dengue C gene*), στο οποίο οφείλεται η κάψα του ιού (Rodenhuis-Zybert et al.,

2010), συμμετέχει με πολλαπλές σχέσεις σε αυτόν τον μηχανισμό. Συμμετέχει στην '*γονιδιακή σίγηση μέσω miRNA*', ενώ έχει το ρόλο μίας '*θέση στόχος miRNA'* (*miRNA target site*) και είναι επίσης παιδί του όρου '*γονίδιο*' (*gene*). Πέραν τούτου, το γονίδιο αυτό είναι μέρος από το '*γονιδιώμα τους ιού του δάγκειου*' (*dengue viral genome*), το οποίο με τη σειρά του είναι μέρος από το '*ιός του δάγκειου*' (*dengue virus*), ο οποίος συμμετέχει στην '*επίκτητη ανοσία στον δάγκειο*' (*acquired immunity to dengue*). Ο '*ιός του δάγκειου*' είναι βασικός παράγοντας στην '*μετάδοση του δάγκειου*' (*dengue transmission*), που συμμετέχει στο '*περιστατικό του δάγκειου πυρετού*' (*occurrence of dengue fever*).

Έχει αναφερθεί προηγουμένως ότι ο δάγκειος παρουσιάζει την ιδιαιτερότητα του ADE (Antibody-Dependent Enhancement). Το γεγονός κατά το οποίο οι πιθανότητες ένας άνθρωπος να εμφανίσει συμπτώματα δάγκειου και μία από τις δύο σοβαρές μορφές της νόσου, αυξάνεται εκθετικά αν μολυνθεί για δεύτερη φορά με διαφορετικό ορότυπο. Αυτό στην IDODEN περιγράφεται σε θεωρητικό επίπεδο (Εικόνα 32).



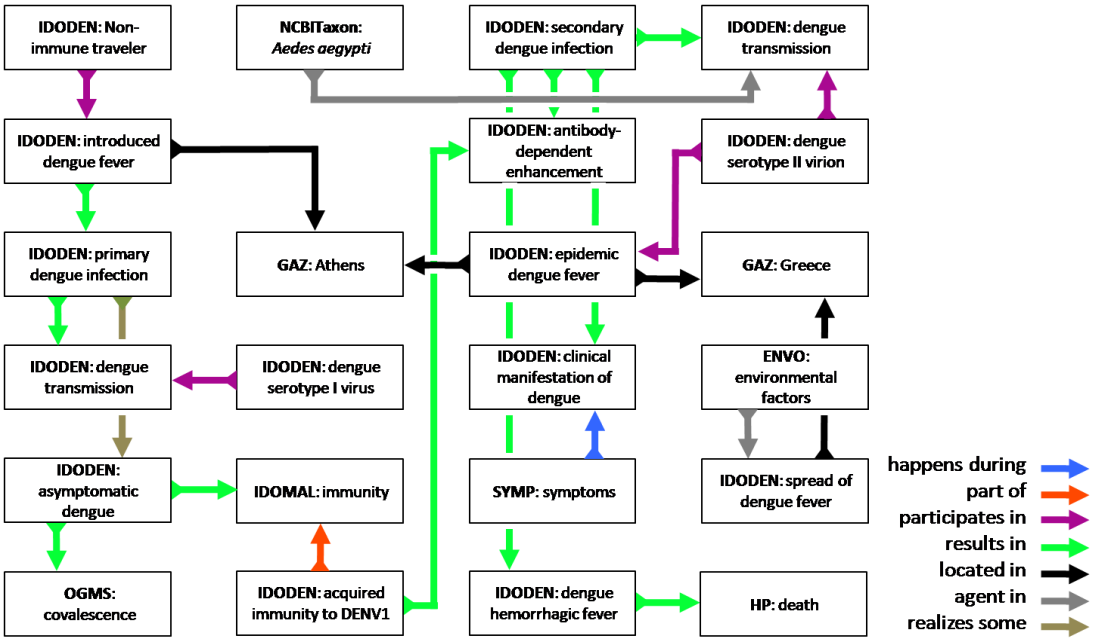
Εικόνα 32. Η θεωρητική μοντελοποίηση του Antibody-Dependent Enhancement (ADE). Με έντονη γραμματοσειρά εμφανίζονται οι οντολογίες από τις οποίες προέρχονται οι όροι.

Η ‘*αρχική μόλυνση με δάγκειο*’ (*primary dengue infection*), της οποίας προηγείται η ‘*έναρξη της αρχικής μόλυνσης με δάγκειο*’ (*initiation of primary dengue infection*), έχει ως αποτέλεσμα ‘*ασυμπτωματικό δάγκειο*’, που έχει ως τελικό αποτέλεσμα την ‘*ανάρρωση*’ (*convalescence*). Σύμφωνα με την υπόθεση του ADE, μία ‘*δεύτερη μόλυνση με δάγκειο*’ (*secondary dengue infection*) έχεις ως αποτέλεσμα ένα ‘*περιστατικό του δάγκειου πυρετού*’ (*occurrence of dengue fever*). Συν αυτού, έχει ως αποτέλεσμα και την ‘*ενίσχυση εξαρτημένη από αντισώματα*’ (*antibody-dependent enhancement*), η οποία μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα το ‘*αιμορραγικός πυρετό του δάγκειου*’ (*dengue hemorrhagic fever*) και το ‘*σύνδρομο καταπληξίας του δάγκειου*’ (dengue shock *syndrome*). Αυτές οι δύο σοβαρές μορφές της νόσου μπορούν έχουν ως αποτέλεσμα είτε την ‘*ανάρρωση*’ (*convalescence*), είτε τον ‘*θάνατο*’ (*death*). Σε αντίθεση με τον ‘*ασυμπτωματικό δάγκειο*’, οι σοβαρές μορφές της νόσου συμβαίνουν κατά τη διάρκεια ενός ‘*περιστατικού του δάγκειου*’ (*occurrence of dengue fever*) και της ‘*κλινική εκδήλωση του δάγκειου*’ (*clinical manifestation of dengue*), η οποία είναι μέρος της ‘*πορεία του δάγκειου πυρετού*’ (*progression of dengue fever*). Αυτή είναι η θεωρητική προσέγγιση, η οποία όμως μπορεί να μεταφερθεί και στην πράξη.

Η πιο πρόσφατη, σοβαρή επιδημία του δάγκειου πυρετού στην Ευρώπη έλαβε χώρα στην Ελλάδα. Ήταν μία διφασική επιδημία που παρουσιάστηκε τα καλοκαίρια του 1927 και 1928 και έπληξε κυρίως την περιοχή της Αθήνας. Περίπου το 90% του πληθυσμού νόσησε, ενώ τα θύματα ξεπέρασαν τα 1000 στην Αθήνα, και έφτασαν τα 1533 σε όλη την Ελλάδα (Louis, 2012). Αρχικά, το 1927 τα πολυάριθμα κρούσματα του δάγκειου είχαν παρουσιασθεί ως απλή γρίπη, τον Αύγουστο του 1928 όμως ένας ιατρός, ανώνυμα, αποκάλυψε ότι η επιδημία του προηγούμενου έτους οφείλονταν στον ιό του δάγκειου, ο οποίος είχε εισέλθει στην Ελλάδα μέσω μίας νεαρής γυναίκας που ήρθε στην Αθήνα από την Αλεξάνδρεια. Η γυναίκα αυτή παρουσίασε συμπτώματα του δάγκειου πυρετού δύο μέρες μετά την άφιξή της στην Αθήνα. Τον Αύγουστο του 1928 παρουσιάστηκαν τα πρώτα θύματα της νόσου και ο αριθμός τους

αυξανόταν συνεχώς. Επίσης τότε ήταν που παρουσιάστηκαν και τα πρώτα κρούσματα εκτός της Αθήνας. Αυτό οφείλεται κατά πάσα πιθανότητα στις εκλογές που πραγματοποιήθηκαν εκείνη την περίοδο, οπότε πολύς κόσμος επέστρεφε στη γενέτειρά του για να ψηφήσει. Εικάζεται, πλέον, κατά τη διάρκεια της επιδημία του 1928 υπήρξε και νέα από έναν διαφορετικό ορότυπο του ιού. Λόγω έλλειψης μελετών με βιολογικό υλικό Αθηναίων που ζούσαν τότε, δεν είναι σαφές τι ακριβώς συνέβη τότε. Η παραπάνω μελέτη μπορεί να παρουσιαστεί μέσω της οντολογίας (Εικόνα 33).

Εάν εκείνη την περίοδο υπήρχαν τα βιοπληροφορικά εργαλεία που έχουμε σήμερα, μέσα σε αυτά και η IDODEN, το ιατρικό προσωπικό θα μπορούσε να ήταν υποψιασμένο και καλύτερο προετοιμασμένο για το δεύτερο κύμα της επιδημίας που οδήγησε σε θύματα.



Εικόνα 33. Η μοντελοποίηση της επιδημίας του δάγκειου πυρετού στην Αθήνα. Με έντονη γραμματοσειρά εμφανίζονται οι οντολογίες από τις οποίες προέρχονται οι όροι.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο δάγκειος πυρετός είναι μία σοβαρή νόσος. Ο αριθμός των ασθενών αυξάνεται συνεχώς τα τελευταία 50 χρόνια (WHO, 2009). Μέχρι πρόσφατα γνωρίζαμε για την ύπαρξη μόνο τεσσάρων ορότυπων, εώς ότου ανακαλύφθηκε ένας πέμπτος (Normile, 2013). Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει κάποιο εμβόλιο, και ενώ εικαζόταν όταν μέσα στην επόμενη δεκαετία αυτό θα μπορούσε να γίνει πραγματικότητα (Norrby, 2014), η εμφάνιση του πέμπτου ορότυπου πιθανότατα να καθυστερήσει το γεγονός αυτό.

Γνωρίζοντας όλα αυτά, η IDODEN αναπτύχθηκε με τέτοιο τρόπο ώστε να καλύπτει όλες τις σημαντικές, για τους ερευνητές και το ιατρικό προσωπικό, πτυχές της νόσου, ώστε να συνεισφέρει στις προσπάθειές τους. Αφιερώθηκε, επίσης, πολύς χρόνος στην εξασφάλιση της διασύνδεσης και αλληλεπίδρασης της οντολογίας με βάσεις δεδομένων που βασίζονται και αυτές σε οντολογίας. Όπου ήταν δυνατόν εισήχθηκαν όρους από ήδη υπάρχουσες οντολογίες, για αυτόν ακριβώς τον σκοπό.

Πολλοί όροι που υπάρχουν στην οντολογία έχουν σχέση με εντομολογικές και επιδημιολογικές μελέτες. Με αυτούς τους όρους μία βάση δεδομένων που περιέχει αυτές τις μελέτες και χρησιμοποιεί την οντολογία, θα έχει μία πολύ δυνατή μηχανή αναζήτησης για την εύκολη και γρήγορα εύρεση σχετικών πληροφοριών.

Οι διαγνωστικές διαδικασίες και οι διαγνωστικοί έλεγχοι που προτείνει ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχουν επίσης συμπεριληφθεί στην IDODEN. Αυτό επιτρέπει σε Συστήματα Διευκόλυνσης της Λήψης Αποφάσεων να ενισχύει το ιατρικό προσωπικό σε περιοχές όπου ο δάγκειος είναι ενδημικός. Αποτελεί έναν εστιασμένο τρόπο για πρόσβαση σε δεδομένα. Οι όροι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για επισημείωση δεδομένων σχετικά με τα αποτελέσματα της πορείας της νόσου και για το πόσο λειτουργικές ήταν αυτές οι διαγνωστικές διαδικασίες στα διάφορα στάδια αυτής. Θα

μπορούσε ακόμα και να χρησιμοποιηθεί για σύγκριση αποτελεσμάτων των διαγνωστικών ελέγχων.

Δείχθηκε επίσης ότι η οντολογία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μοντελοποίηση πολύπλοκων διαδικασιών, με έναν τρόπο που μπορεί να γίνει κατανοητός τόσο από ανθρώπους, όσο και από τεχνητή νοημοσύνη, με την προϋπόθεση να έχει γίνει σωστή επισημείωση των δεδομένων. Η IDODEN έχει τη δυνατότητα να είναι το θεμέλιο για πιο «έξυπνες» βάσεις δεδομένων. Με τον τρόπο αυτό, ερευνητές θα μπορούν να προσδιορίζουν τις ανάγκες των πειραμάτων τους πιο αποδοτικά, για παράδειγμα θα μπορούν να αναζητήσουν συγκεκριμένο στέλεχος του ιού, ώστε να δούνε σε ποιες μελέτες είχε χρησιμοποιηθεί και για ποιο σκοπό. Τέτοια εργαλεία και τέτοιες βάσεις δεδομένων δεν είναι κάτι το εξωπραγματικό, ήδη χρησιμοποιούνται και αναπτύσσονται (Dialynas et al., 2009; Megy et al., 2012). Η IDODEN έχει στόχο να αποτελέσει μέρος τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Allwinn, R. 2011. Significant increase in travel-associated dengue fever in Germany. *Medical microbiology and immunology*. 200:155-159.

Andersen, S.O. 1998. Amino acid sequence studies on endocuticular proteins from the desert locust, Schistocerca gregaria. *Insect biochemistry and molecular biology*. 28:421-434.

Andersen, S.O. 1999. Exoskeletal proteins from the crab, Cancer pagurus. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*. 123:203-211.

Andersen, S.O. 2000. Studies on proteins in post-ecdysial nymphal cuticle of locust, Locusta migratoria, and cockroach, Blaberus craniifer. *Insect biochemistry and molecular biology*. 30:569-577.

Ashburner, M., C.A. Ball, J.A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J.M. Cherry, A.P. Davis, K. Dolinski, S.S. Dwight, J.T. Eppig, M.A. Harris, D.P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J.C. Matese, J.E. Richardson, M. Ringwald, G.M. Rubin, and G. Sherlock. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics*. 25:25-29.

Baines, S. 1956. The role of the symbiotic bacteria in the nutrition of Rhodnius prolixus (Hemiptera). *Journal of Experimental Biology*:533-541.

Beard, C.B., C. Cordon-Rosales, and R.V. Durvasula. 2002. Bacterial symbionts of the triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission. *Annual review of entomology*. 47:123-141.

Beissbarth, T. 2006. Interpreting experimental results using gene ontologies. *Methods in enzymology*. 411:340-352.

Blake, J.A., C.J. Bult, J.T. Eppig, J.A. Kadin, J.E. Richardson, and G. Mouse Genome Database. 2014. The Mouse Genome Database: integration of and access to knowledge about the laboratory mouse. *Nucleic acids research*. 42:D810-817.

Bodenreider, O. 2008. Biomedical ontologies in action: role in knowledge management, data integration and decision support. *Yearbook of medical informatics*:67-79.

Centers for Disease, C., and Prevention. 2010. Travel-associated Dengue surveillance - United States, 2006-2008. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*. 59:715-719.

Cherry, J.M., E.L. Hong, C. Amundsen, R. Balakrishnan, G. Binkley, E.T. Chan, K.R. Christie, M.C. Costanzo, S.S. Dwight, S.R. Engel, D.G. Fisk, J.E. Hirschman, B.C. Hitz, K. Karra, C.J. Krieger, S.R. Miyasato, R.S. Nash, J. Park, M.S. Skrzypek, M. Simison, S. Weng, and E.D. Wong. 2012. Saccharomyces Genome Database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic acids research*. 40:D700-705.

Chouaia, B., P. Rossi, S. Epis, M. Mosca, I. Ricci, C. Damiani, U. Ulissi, E. Crotti, D. Daffonchio, C. Bandi, and G. Favia. 2012. Delayed larval development in Anopheles mosquitoes deprived of Asaia bacterial symbionts. *BMC microbiology*. 12 Suppl 1:S2.

Chye, J.K., C.T. Lim, K.B. Ng, J.M. Lim, R. George, and S.K. Lam. 1997. Vertical transmission of dengue. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 25:1374-1377.

Coetzee, M., R.H. Hunt, R. Wilkerson, A.D. Torre, M.B. Coulibaly, and N.J. Besansky. 2013. Anopheles coluzzii and Anopheles amharicus, new members of the Anopheles gambiae complex. *Zootaxa*. 3619:246-274.

Cornman, R.S., T. Togawa, W.A. Dunn, N. He, A.C. Emmons, and J.H. Willis. 2008. Annotation and analysis of a large cuticular protein family with the R&R Consensus in Anopheles gambiae. *BMC genomics*. 9:22.

Damiani, C., I. Ricci, E. Crotti, P. Rossi, A. Rizzi, P. Scuppa, A. Capone, U. Ulissi, S. Epis, M. Genchi, N. Sagnon, I. Faye, A. Kang, B. Chouaia, C. Whitehorn, G.W. Moussa, M. Mandrioli, F. Esposito, L. Sacchi, C. Bandi, D. Daffonchio, and G. Favia. 2010. Mosquito-bacteria symbiosis: the case of Anopheles gambiae and Asaia. *Microbial ecology*. 60:644-654.

Dialynas, E., P. Topalis, J. Vontas, and C. Louis. 2009. MIRO and IRbase: IT tools for the epidemiological monitoring of insecticide resistance in mosquito disease vectors. *PLoS neglected tropical diseases*. 3:e465.

Duncombe, J., A. Clements, W. Hu, P. Weinstein, S. Ritchie, and F.E. Espino. 2012. Geographical information systems for dengue surveillance. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 86:753-755.

Durvasula, R.V., A. Gumbs, A. Panackal, O. Kruglov, S. Aksoy, R.B. Merrifield, F.F. Richards, and C.B. Beard. 1997. Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:3274-3278.

Eisen, L., M. Coleman, S. Lozano-Fuentes, N. McEachen, M. Orlans, and M. Coleman. 2011. Multi-disease data management system platform for vector-borne diseases. *PLoS neglected tropical diseases*. 5:e1016.

Eisen, L., and S. Lozano-Fuentes. 2009. Use of mapping and spatial and space-time modeling approaches in operational control of Aedes aegypti and dengue. *PLoS neglected tropical diseases*. 3:e411.

Enayati, A., and J. Hemingway. 2010. Malaria management: past, present, and future. *Annual review of entomology*. 55:569-591.

Fatimil, L.E., A.H. Mollah, S. Ahmed, and M. Rahman. 2003. Vertical transmission of dengue: first case report from Bangladesh. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 34:800-803.

Favia, G., I. Ricci, C. Damiani, N. Raddadi, E. Crotti, M. Marzorati, A. Rizzi, R. Urso, L. Brusetti, S. Borin, D. Mora, P. Scuppa, L. Pasqualini, E. Clementi, M. Genchi, S. Corona, I. Negri, G. Grandi, A. Alma, L. Kramer, F. Esposito, C. Bandi, L. Sacchi, and D. Daffonchio. 2007. Bacteria of the genus Asaia stably associate with Anopheles stephensi, an Asian malarial mosquito vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:9047-9051.

Finn, R.D., J. Mistry, B. Schuster-Bockler, S. Griffiths-Jones, V. Hollich, T. Lassmann, S. Moxon, M. Marshall, A. Khanna, R. Durbin, S.R. Eddy, E.L. Sonnhammer, and A. Bateman. 2006. Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic acids research*. 34:D247-251.

Fisher, R.P., and B.A. Myers. 2011. Free and simple GIS as appropriate for health mapping in a low resource setting: a case study in eastern Indonesia. *International journal of health geographics*. 10:15.

Gene Ontology, C. 2001. Creating the gene ontology resource: design and implementation. *Genome research*. 11:1425-1433.

Gubler, D.J. 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical microbiology reviews*. 11:480-496.

Gubler, D.J. 2002. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends in microbiology*. 10:100-103.

Guzman, M.G., M. Alvarez, and S.B. Halstead. 2013. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Archives of virology*. 158:1445-1459.

Guzman, M.G., S.B. Halstead, H. Artsob, P. Buchy, J. Farrar, D.J. Gubler, E. Hunsperger, A. Kroeger, H.S. Margolis, E. Martinez, M.B. Nathan, J.L. Pelegrino, C. Simmons, S. Yoksan, and R.W. Peeling. 2010. Dengue: a continuing global threat. *Nature reviews. Microbiology*. 8:S7-16.

Harrington, J.S. 1960. Studies on Rhodnius prolixus: growth and development of normal and sterile bugs, and the symbiotic relationship. *Parasitology*:279-286.

Hay, S.I., C.A. Guerra, A.J. Tatem, P.M. Atkinson, and R.W. Snow. 2005. Urbanization, malaria transmission and disease burden in Africa. *Nature reviews. Microbiology*. 3:81-90.

Hemingway, J., B.J. Beaty, M. Rowland, T.W. Scott, and B.L. Sharp. 2006. The Innovative Vector Control Consortium: improved control of mosquito-borne diseases. *Trends in parasitology*. 22:308-312.

Henchal, E.A., and J.R. Putnak. 1990. The dengue viruses. *Clinical microbiology reviews*. 3:376-396.

Iconomidou, V.A., J.H. Willis, and S.J. Hamodrakas. 1999. Is beta-pleated sheet the molecular conformation which dictates formation of helicoidal cuticle? *Insect biochemistry and molecular biology*. 29:285-292.

Kakumani, P.K., S.S. Ponia, R.K. S, V. Sood, M. Chinnappan, A.C. Banerjea, G.R. Medigeshi, P. Malhotra, S.K. Mukherjee, and R.K. Bhatnagar. 2013. Role of RNA interference (RNAi) in dengue virus replication and identification of NS4B as an RNAi suppressor. *Journal of virology*. 87:8870-8883.

Koyadun, S., P. Butraporn, and P. Kittayapong. 2012. Ecologic and sociodemographic risk determinants for dengue transmission in urban areas in Thailand. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*. 2012:907494.

Lawson, D., P. Arensburger, P. Atkinson, N.J. Besansky, R.V. Bruggner, R. Butler, K.S. Campbell, G.K. Christophides, S. Christley, E. Dialynas, D. Emmert, M. Hammond, C.A. Hill, R.C. Kennedy, N.F. Lobo, M.R. MacCallum, G. Madey, K. Megy, S. Redmond, S. Russo, D.W. Severson, E.O. Stinson, P. Topalis, E.M. Zdobnov, E. Birney, W.M. Gelbart, F.C. Kafatos, C. Louis, and F.H. Collins. 2007. VectorBase: a home for invertebrate vectors of human pathogens. *Nucleic acids research*. 35:D503-505.

Lawson, D., P. Arensburger, P. Atkinson, N.J. Besansky, R.V. Bruggner, R. Butler, K.S. Campbell, G.K. Christophides, S. Christley, E. Dialynas, M. Hammond, C.A. Hill, N. Konopinski, N.F. Lobo, R.M. MacCallum, G. Madey, K. Megy, J. Meyer, S. Redmond, D.W. Severson, E.O. Stinson, P. Topalis, E. Birney, W.M. Gelbart, F.C. Kafatos, C.

Louis, and F.H. Collins. 2009. VectorBase: a data resource for invertebrate vector genomics. *Nucleic acids research*. 37:D583-587.

Lee, T.C., Y.L. Lin, J.T. Liao, C.M. Su, C.C. Lin, W.P. Lin, and C.L. Liao. 2010. Utilizing liver-specific microRNA-122 to modulate replication of dengue virus replicon. *Biochemical and biophysical research communications*. 396:596-601.

Lewis, S., M. Ashburner, and M.G. Reese. 2000. Annotating eukaryote genomes. *Current opinion in structural biology*. 10:349-354.

Lin, Y., Z. Xiang, and Y. He. 2011. Brucellosis Ontology (IDOBRU) as an extension of the Infectious Disease Ontology. *Journal of biomedical semantics*. 2:9.

Louis, C. 2012. Daily newspaper view of dengue fever epidemic, Athens, Greece, 1927-1931. *Emerging infectious diseases*. 18:78-82.

Low, J.S., K.X. Wu, K.C. Chen, M.M. Ng, and J.J. Chu. 2011. Narasin, a novel antiviral compound that blocks dengue virus protein expression. *Antiviral therapy*. 16:1203-1218.

Maroun, S.L., R.C. Marliere, R.C. Barcellus, C.N. Barbosa, J.R. Ramos, and M.E. Moreira. 2008. Case report: vertical dengue infection. *Jornal de pediatria*. 84:556-559.

Marquardt, W.H. 2004. Biology of disease vectors. Academic Press.

McGuinness, D.L., and F. van Harmelen. 2004. OWLWeb Ontology Language. W3C Recommendation.

Megy, K., S.J. Emrich, D. Lawson, D. Campbell, E. Dialynas, D.S. Hughes, G. Koscielny, C. Louis, R.M. Maccallum, S.N. Redmond, A. Sheehan, P. Topalis, D. Wilson, and C. VectorBase. 2012. VectorBase: improvements to a bioinformatics resource for invertebrate vector genomics. *Nucleic acids research*. 40:D729-734.

Mitraka, E. 2010. Investigating the ability of Asaia sp. to act as a paratransgenic vehicle in the fight against malaria. *In* Department of Biology. Vol. Master of Science. University of Crete.

Noble, C.G., Y.L. Chen, H. Dong, F. Gu, S.P. Lim, W. Schul, Q.Y. Wang, and P.Y. Shi. 2010. Strategies for development of Dengue virus inhibitors. *Antiviral research*. 85:450-462.

Normile, D. 2013. Tropical medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science*. 342:415.

Norrby, R. 2014. Outlook for a dengue vaccine. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 20 Suppl 5:92-94.

Noy, N.F., M. Crubezy, R.W. Fergerson, H. Knublauch, S.W. Tu, J. Vendetti, and M.A. Musen. 2003. Protege-2000: an open-source ontology-development and knowledge-acquisition environment. *AMIA ... Annual Symposium proceedings / AMIA Symposium. AMIA Symposium*:953.

Ranjit, S., and N. Kissoon. 2011. Dengue hemorrhagic fever and shock syndromes. *Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies*. 12:90-100.

Ratnam, I., K. Leder, J. Black, and J. Torresi. 2013. Dengue fever and international travel. *Journal of travel medicine*. 20:384-393.

Rebers, J.E., and L.M. Riddiford. 1988. Structure and expression of a Manduca sexta larval cuticle gene homologous to Drosophila cuticle genes. *Journal of molecular biology*. 203:411-423.

Riehle, M.A., and M. Jacobs-Lorena. 2005. Using bacteria to express and display anti-parasite molecules in mosquitoes: current and future strategies. *Insect biochemistry and molecular biology*. 35:699-707.

Riley, M. 1993. Functions of the gene products of Escherichia coli. *Microbiological reviews*. 57:862-952.

Rivero, A., J. Vezilier, M. Weill, A.F. Read, and S. Gandon. 2010. Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem? *PLoS pathogens*. 6:e1001000.

Rodenhuis-Zybert, I.A., J. Wilschut, and J.M. Smit. 2010. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 67:2773-2786.

Sampath, A., and R. Padmanabhan. 2009. Molecular targets for flavivirus drug discovery. *Antiviral research*. 81:6-15.

Sanchez-Vargas, I., E.A. Travanty, K.M. Keene, A.W. Franz, B.J. Beaty, C.D. Blair, and K.E. Olson. 2004. RNA interference, arthropod-borne viruses, and mosquitoes. *Virus research*. 102:65-74.

Simmons, C.P., J.J. Farrar, V. Nguyen v, and B. Wills. 2012. Dengue. *The New England journal of medicine*. 366:1423-1432.

Simon, J., M. Dos Santos, J. Fielding, and B. Smith. 2006. Formal ontology for natural language processing and the integration of biomedical databases. *International journal of medical informatics*. 75:224-231.

Smith, B., M. Ashburner, C. Rosse, J. Bard, W. Bug, W. Ceusters, L.J. Goldberg, K. Eilbeck, A. Ireland, C.J. Mungall, O.B.I. Consortium, N. Leontis, P. Rocca-Serra, A. Ruttenberg, S.A. Sansone, R.H. Scheuermann, N. Shah, P.L. Whetzel, and S. Lewis. 2007. The OBO Foundry: coordinated evolution of ontologies to support biomedical data integration. *Nature biotechnology*. 25:1251-1255.

Smith, B., and P. Grenon. 2004. The Cornucopia of Formal-Ontological Relations. *Dialectica*. 58:17.

Thomas, P.D., H. Mi, and S. Lewis. 2007. Ontology annotation: mapping genomic regions to biological function. *Current opinion in chemical biology*. 11:4-11.

Topalis, P., E. Dialynas, E. Mitraka, E. Deligianni, I. Siden-Kiamos, and C. Louis. 2011. A set of ontologies to drive tools for the control of vector-borne diseases. *Journal of biomedical informatics*. 44:42-47.

Topalis, P., E. Mitraka, I. Bujila, E. Deligianni, E. Dialynas, I. Siden-Kiamos, M. Troye-Blomberg, and C. Louis. 2010. IDOMAL: an ontology for malaria. *Malaria journal*. 9:230.

Topalis, P., E. Mitraka, V. Dritsou, E. Dialynas, and C. Louis. 2013. IDOMAL: the malaria ontology revisited. *Journal of biomedical semantics*. 4:16.

Topalis, P., C. Tzavlaki, K. Vestaki, E. Dialynas, D.E. Sonenshine, R. Butler, R.V. Bruggner, E.O. Stinson, F.H. Collins, and C. Louis. 2008. Anatomical ontologies of mosquitoes and ticks, and their web browsers in VectorBase. *Insect molecular biology*. 17:87-89.

Tweedie, S., M. Ashburner, K. Falls, P. Leyland, P. McQuilton, S. Marygold, G. Millburn, D. Osumi-Sutherland, A. Schroeder, R. Seal, H. Zhang, and C. FlyBase. 2009. FlyBase: enhancing Drosophila Gene Ontology annotations. *Nucleic acids research*. 37:D555-559.

Watson, J.D., and F.H. Crick. 1953. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 171:737-738.

Webster, D.P., J. Farrar, and S. Rowland-Jones. 2009. Progress towards a dengue vaccine. *The Lancet infectious diseases*. 9:678-687.

Whetzel, P.L., N.F. Noy, N.H. Shah, P.R. Alexander, C. Nyulas, T. Tudorache, and M.A. Musen. 2011. BioPortal: enhanced functionality via new Web services from the National Center for Biomedical Ontology to access and use ontologies in software applications. *Nucleic acids research*. 39:W541-545.

WHO, W.H.O. 2009. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition. *In* Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition, Geneva.

Willis, J.H. 2010. Structural cuticular proteins from arthropods: annotation, nomenclature, and sequence characteristics in the genomics era. *Insect biochemistry and molecular biology*. 40:189-204.

Xiang, Z., M. Courtot, R.R. Brinkman, A. Ruttenberg, and Y. He. 2010. OntoFox: web-based support for ontology reuse. *BMC research notes*. 3:175.

Xie, P.W., Y. Xie, X.J. Zhang, H. Huang, L.N. He, X.J. Wang, and S.Q. Wang. 2013. Inhibition of Dengue virus 2 replication by artificial micrornas targeting the conserved regions. *Nucleic acid therapeutics*. 23:244-252.

Asaia accelerates larval development of *Anopheles gambiae*

Elvira Mitraka[1,2], Stavros Stathopoulos[3], Inga Siden-Kiamos[1], George K. Christophides[3], Christos Louis[1,2,4]

[1]Institute of Molecular Biology and Biotechnology, FORTH, Heraklion, Greece, [2]Department of Biology, University of Crete, Heraklion, Greece, [3]Division of Cell and Molecular Biology, Department of Life Sciences, Imperial College, London, UK, [4]Centre for Functional genomics, Medical School, University of Perugia, Italy

Arthropod borne diseases cause significant human morbidity and mortality and, therefore, efficient measures to control transmission of the disease agents would have great impact on human health. One strategy to achieve this goal is based on the manipulation of bacterial symbionts of vectors. Bacteria of the Gram-negative, acetic acid bacterium genus *Asaia* have been found to be stably associated with larvae and adults of the Southeast Asian malaria vector *Anopheles stephensi*, dominating the microbiota of the mosquito. We show here that after the infection of *Anopheles gambiae* larvae with *Asaia* the bacteria were stably associated with the mosquitoes, becoming part of the microflora of the midgut and remaining there for the duration of the life cycle. Moreover they were passed on to the next generation through vertical transmission. Additionally, we show that there is an increase in the developmental rate when additional bacteria are introduced into the organism which leads us to the conclusion that *Asaia* plays a yet undetermined crucial role during the larval stages. Our microarray analysis showed that the larval genes that are mostly affected are involved in cuticle formation, and include mainly members of the CPR gene family.

Keywords: *Asaia*, *Anopheles gambiae*, Larval development, Cuticle proteins, Paratransgenesis, Symbiont

Introduction

Arthropod borne diseases cause significant human morbidity and mortality. In the absence of effective vaccines, with the exception of the one directed against yellow fever, current preventive methods rely heavily on vector control. Since the discovery of DDT's insecticidal properties in the 1930s, insecticides have played a major role in this approach. However, the emergence of insecticide resistance in many vector species and the worldwide non-acceptance of extensive spraying of chemicals necessitate the development of new strategies for the control of arthropod vectors.[1]

The last few years have witnessed an increased use of mosquito bednets, whose efficacy may be enhanced tremendously if soaked, before use, in insecticidal formulations.[2] Moreover, in addition to an intensified search for new and environment-friendly insecticides, novel strategies being developed include the use of genetically modified organisms in different combinations of approaches. Such proposed strategies include the replacement of vector populations by engineered ones that cannot transmit the pathogens,[3] and the creation of modified vectors that promote the 'emergence' of only one sex, rendering the application of the sterile insect technique simpler.[4] For the latter, field experiments are already underway.[5]

More recently a great deal of attention has been devoted to the development of another approach, based on the manipulation of bacterial symbionts of vectors. For example, the idea is to generate symbiotic bacteria that can be modified to produce anti-plasmodial effector molecules inside mosquitoes,[6] thus preventing malaria transmission. In the case of malaria the mosquito midgut is of special interest, since this is where the *Plasmodium* parasite first enters the vector. Here, the first steps of the parasite development take place. Ookinete development and sporogony represent bottlenecks in the malarial parasite life cycle;[7] in the wild usually only a few oocysts develop inside a single mosquito.[8]

Genetic manipulation of bacteria is simpler and faster than genetic manipulation of mosquitoes. Bacteria are easy to introduce into mosquito populations and can be produced cheaply and efficiently in large quantities. Furthermore, the introduction of modified bacteria into a vector population will bypass any genetic barriers of reproductively isolated mosquito populations, which often occur in regions of disease endemicity.[9] There are, of course, requirements

Correspondence to: Christos Louis, IMBB-FORTH, N. Plastira 100, Heraklion 70013, Greece. Email: louis@imbb.forth.gr

© W. S. Maney & Son Ltd 2013
DOI 10.1179/2047773213Y.0000000106

that must be met for this approach to work for a given vector/parasite combination.[10] Several characteristics have been identified that are necessary for a successful paratransgenic control strategy.[11] This was first demonstrated through the transformation of the bacteria *Rhodococcus rhodnii*, a symbiont of the kissing bug *Rhodnius prolixus*, which is a major vector of Chagas disease.[12]

Bacteria of the Gram-negative, acetic acid bacterium genus *Asaia* have been found to be stably associated with larvae and adults of the Southeast Asian malaria vector *Anopheles stephensi*, dominating the microbiota of the mosquito. PCR analysis showed that *Asaia* spp. DNA is present in eggs, pupae, and different larval stages, as well as in various mosquito organs, including gut, salivary glands, ovaries, and testes.[13]

Asaia bacteria, which had been transformed with green fluorescent protein (GFP)-expressing plasmids, were used to re-infect adult mosquitoes by adding the bacteria to sugar or blood meals. Transformed *Asaia* were found in different mosquito tissues, which are sites for pathogen development, such as midgut and salivary glands. They were also found in male and female reproductive tracts, although at lower numbers. Vertical and venereal transmission of *Asaia* was demonstrated by crossing males fed with the GFP-tagged *Asaia* with normal females of *A. stephensi* in the laboratory. After mating, fluorescent bacteria could be detected in the spermatheca and in the terminal portions of the gastrointestinal tract, thus indicating the transmission of the bacterium along with sperm. Furthermore, the vertical transmission of the bacterium to the progeny was also observed.[13]

Here we report the infection of mosquito larvae with the GFP-expressing *Asaia* strain in order to explore its effects on the mosquito, its suitability as a paratransgenic vehicle, and its role in the organism.

Materials and Methods

Mosquitoes

Anopheles gambiae mosquitoes from the Ngousso strain[14] were obtained from the insectary of Imperial College in London. The mosquito stocks were reared under standard conditions (16/8 light/dark cycle, RT=28°C, humidity=80%) while the experiments on the treated and non-treated specimens were conducted under slightly different conditions (16/8 light/dark cycle, RT=27°C, humidity=60%), after initially making sure that these changes had no effect on the results obtained.

Colonization of larvae and adult mosquitoes with Asaia *sp. SF2.1(Gfp)*

Asaia sp. SF2.1(Gfp)[13] was grown in 3 ml cultures for 48 hours at 30°C in GLY medium (glycerol 25 g/l, yeast extract 10 g/l, pH=5.0) to which 50 μg/ml kanamycin was added. Cells were harvested by centrifugation and washed with PBS three times. Finally 50 μl of the bacterial pellet was resuspended in 1 ml PBS. Fifty 1st instar *A. gambiae* larvae were transferred to containers filled with 500 ml H_2O. To half of the containers the *Asaia* resuspension was added. For the experiments where the mosquitoes were fed with dead bacteria two different methods were used. The bacteria were killed either by freezing in liquid nitrogen for 10 minutes or by heat treatment (20 minutes at 80°C). Development of the mosquitoes was monitored by stereoscopic observation at 24-hour intervals (20 larvae for each time point). At 72 hours larvae were dissected and the guts and peritrophic membranes were mounted in Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA), followed by observation with a Bio-Rad confocal microscope (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) attached to a Zeiss Axioskop 2 plus microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Midguts were also dissected from adult mosquitoes and observed with a Zeiss Axioskop 2 plus fluorescent microscope. In each experiment samples from non-infected mosquitoes were also viewed in parallel using the same settings; in no case was a fluorescence signal detected.

RNA extraction

After initial infection with *Asaia*, samples of 10 larvae were removed at 24-hour intervals until the pupal stage was reached; they were then homogenized using a mortar-and-pestle. RNA was extracted by following the protocol for whole organisms provided with the Qiagen RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA; cat. no. 74104), together with the Qiagen RNase-Free DNase set (cat no.79254). RNA concentration was measured with a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) and the samples were kept at −80°C.

Microarray study

The samples originating from the RNA extraction were pooled into two groups. One group contained samples from first and second instar larvae and the other the samples from the third and the fourth instars. The RNA was amplified and labeled using the Agilent Low Input Quick Amp Labeling Kit, two-color (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA; Agilent #5190-2306). The RNA was then hybridized to Agilent arrays (name: Pfalcip_Agamb_2009, design ID: 026247) using the Agilent hybridization kit according to the manufacturer's instructions. Following hybridization and washing, the slides were scanned using a GenePix scanner (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA; GenePix 4000B).

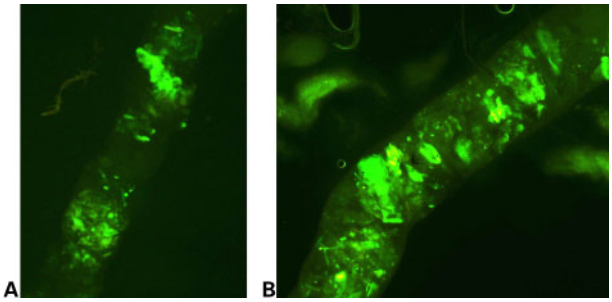


Figure 1 Section of the peritrophic matrix of *Anopheles gambiae* larvae infected with *Asaia*. (A) Peritrophic matrix clearly showing green fluorescent protein (GFP)-expressing bacteria throughout its length, at 72 hours post-infection (larval stage 3). (B) Peritrophic matrix showing the growth of GFP-expressing bacteria, at 96 hours post-infection (larval stage 4).

Microarray data analysis

The raw gene expression data were extracted using the GenePix Pro Software v7 and imported into the Agilent GeneSpring GX software for further analysis. The data sets were normalized and all of the data were interpreted using the log-ratio setting. The affected genes were identified using the parameters fold-change>2 and p-value<0.05. Gene ontology (GO) analysis was used to identify the GO categories to which the affected genes belonged.

Results

Colonization of mosquito larvae with Asaia *sp.*

The bacterium used to infect the mosquito larvae was *Asaia* sp., strain SF2.1, which is kanamycin resistant and expresses GFP.[13] This particular strain of *Asaia* has been shown previously to colonize the mosquitoes *Aedes aegypti* and *A. stephensi* as well as the leafhopper *Scaphoideus titanus*,[15] and it is considered to be a good candidate microorganism for potential paratransgenesis uses.

We first wanted to test whether this strain of *Asaia* would establish symbiosis in the *A. gambiae Ngousso* strain, an M strain recently isolated in Cameroon and now widely used for genomic experiments.[14] Newly hatched 1st stage larvae were added to larval pans (50 per container) including the bacteria. Bacteria were not added to the pans after this initial feed during the development of the mosquitoes. After 72 and 96 hours the larvae were dissected and observed under a fluorescent microscope. Figure 1 shows a dissected midgut that heavily fluoresces. Further analysis demonstrated that the bacteria were present only on the peritrophic membrane; no bacteria were detected inside the actual epithelial cells of the midgut. Infection was maintained throughout the whole duration of the four larval stages.

Developmental effects of Asaia *sp. on* A. gambiae *larvae*

During the infection of mosquito larvae with the bacterium we observed a very significant change in the developmental rate of the insects. Infected larvae progressed through the four larval stages at an accelerated rate, reaching the pupal stage almost 48 hours faster than their non-infected counterparts. The very marked change in the developmental rate seemed to be occurring on the threshold between stage 2 and stage 3 (Table 1). There was a clearly visible size difference 72 hours post-infection, which was maintained throughout the larval stages (Fig. 2). We determined that this developmental effect was dependent upon the presence of viable bacteria; when larvae were fed with dead bacteria there was no change in the duration of larval development (data not shown), irrespective of the procedure used to inactivate the bacteria (high or ultra-low temperature). The length of the pupal stage was unaffected by the presence of *Asaia* bacteria in the food.

Figure 2 Accelerated development of *Asaia*-infected mosquito larvae. (A) Two larvae can be seen at 72 hours after hatching. The bigger larva, on the left, was infected with *Asaia* 72 hours prior to the capture. The smaller larva, to the right, is the non-infected control. The difference in developmental advancement is clearly visible. (B) At 96 hours post-infection, the infected larva on the left has clearly reached the 4th stage, while the non-infected control remains in the 2nd instar.

Colonization of adult mosquitoes with Asaia *sp.*

In order to determine if there were any effects on the development from larvae to adult, we allowed the larvae to reach the full adult stage. No additional *Asaia* was given after molting. There were no visible differences in the size of the infected compared to the non-infected insects. Midgut dissections were performed on 10 mosquitoes, male and female, at different time-points of their adult lives. Bacteria were present in all samples (Fig. 3).

Table 1 Differences in developmental rate between infected and non-infected larvae

	Infected	Uninfected
24 hours	1st instar	1st instar
48 hours	2nd instar	1st instar
72 hours	3rd instar	2nd instar
96 hours	4th instar	2nd instar
5 days	4th instar/pupae	3rd instar
6 days	Pupae/adults	3rd instar
7 days	Pupae/adults	4th instar
8 days	Adults	Pupae
9 days	Adults	Pupae/adults

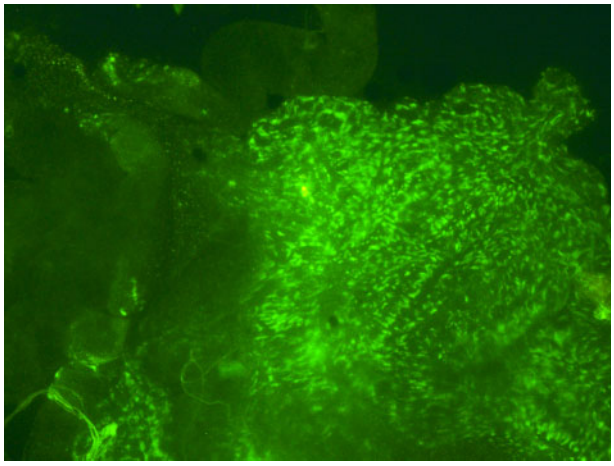


Figure 3 Section of the midgut of an infected, 24-day-old adult mosquito. Green fluorescent protein (GFP)-expressing *Asaia* bacteria are present in the gut.

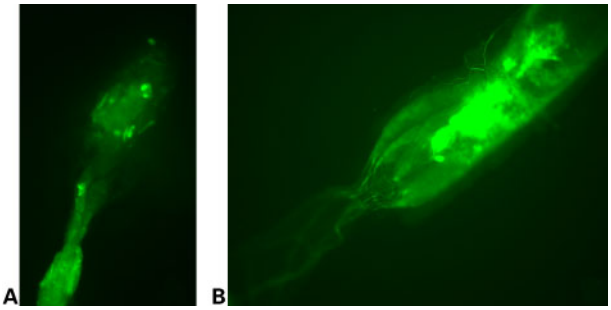


Figure 4 Dissected guts of larvae derived from parents infected with *Asaia* during their larval stage. (A and B) The continuous growth and spread of the genetically modified bacteria is shown here. The bacteria reside along the length of the gut.

Infected adult mosquitoes were blood-fed and allowed to produce eggs to investigate if the faster developmental rate persisted in the next generation. However, no similar acceleration effect was visible on the F1 larvae of the infected cohort. Dissections of third and fourth instar larvae showed that the genetically modified *Asaia* sp. was still present in the endo-peritrophic space (Fig. 4).

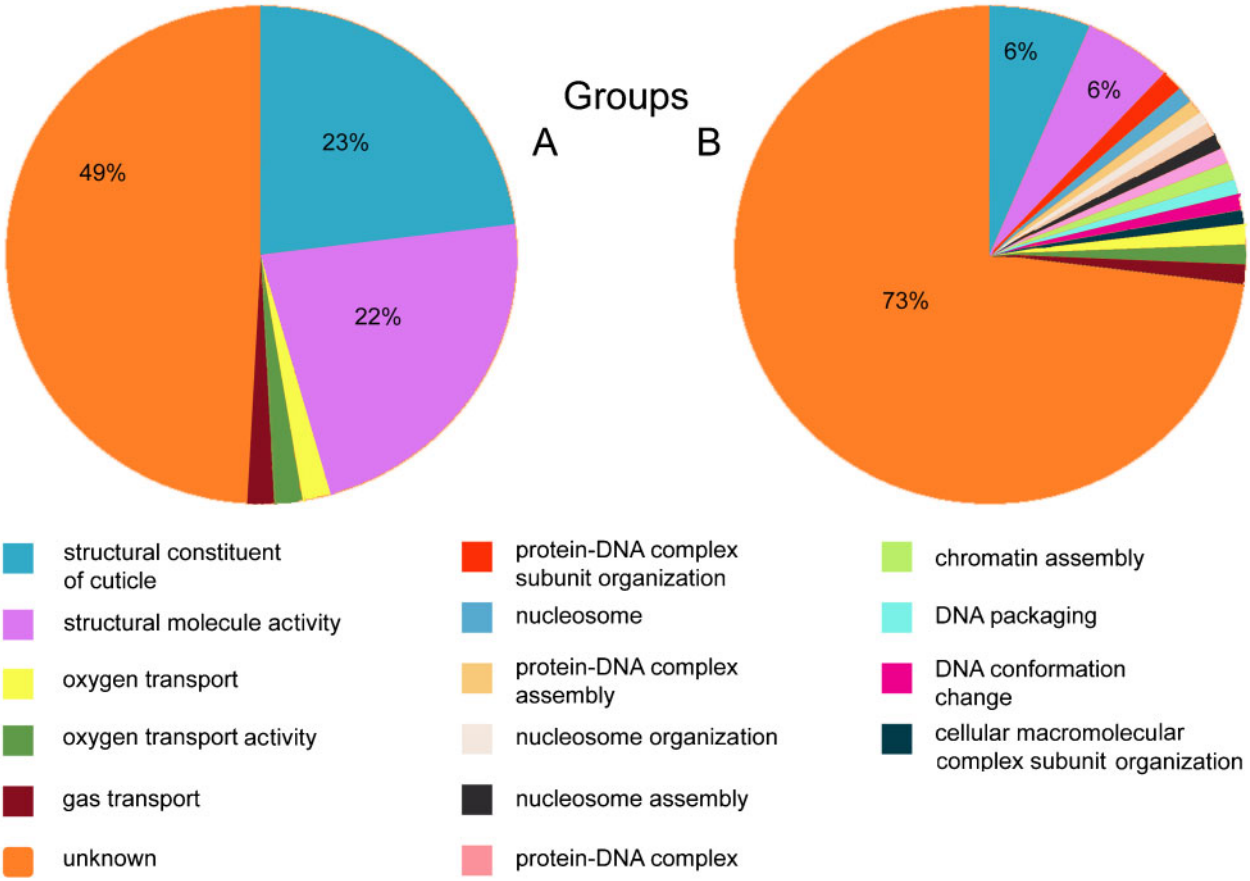


Figure 5 Gene ontology (GO) analysis of the affected genes of Group A (left pie) and Group B (right pie). In Group A 49% of the genes were annotated with GO terms referring to unknown functions and processes. The rest belonged to two large categories (23% each) that had GO annotations related to the cuticle, as well as three small groups (about 2% of the genes each) with GO annotations referring to oxygen transport, oxygen transporter activity, and gas transport. For 73% of the affected genes in Group B no GO terms could be identified. Of the remaining, 6% each belonged to the same two main categories described for Group A (cuticle-related). The remaining genes belonged to small clusters (about 1% each) with GO annotations referring to protein–DNA complex subunit organization, protein–DNA complex assembly, nucleosome assembly, gas transport, chromatin assembly, oxygen transport, nucleosome, nucleosome organization, protein–DNA complex, DNA packaging, oxygen transporter activity, and DNA conformation change. The GO terms that belong to the individual clusters are color-coded (shown below the pies).

RNA profiling of larval samples

Larval RNA was extracted every 24 hours from 10 infected and 10 non-infected individuals until the pupal stage was reached. A microarray analysis of the larval RNA followed. Two groups of samples were created, Group A containing the combined RNA of first and second instar larvae, and Group B containing the combined RNA of third and fourth instar larvae. The results can be summarized as follows. A comparison between infected and non-infected larvae of Group A identified a total of 205 genes, which were significantly up- or down-regulated. The threshold chosen was either above or below a two-fold change with a p-value<0.05. One hundred and thirty genes were down-regulated, while 75 were up-regulated. In Group B, 925 genes fit the significance parameters, with 416 being down-regulated and the remaining 409 being up-regulated. The smaller number of genes affected in Group A can be explained by the observation that the actual change in the developmental rate was initiated between larval stages 2 and 3.

Gene ontology analyses were performed to obtain more detailed functional information regarding the genes whose expression level was affected by the presence of *Asaia*. In Group A, additional information was obtained for 104 genes, while in Group B, for 249 genes (see Fig. 5 for details).

The most common category in both groups was that of 'structural constituent of the cuticle' (GO:0042302), containing the CPR genes, a family of structural cuticular proteins (CPs).[16] This is a large CP gene family that is characterized by the presence of the Rebers and Riddiford (1988) domain.[17] In Group A, of the 45 genes that belonged to this family 42 were down-regulated and 3 were up-regulated, while in Group B, 24 were down-regulated and 24

Table 2 Up- and down-regulated CPR genes of Group A and Group B individually and those affected in both groups

Group A		Group B		Group A & B	
Up-regulated	Down-regulated	Up-regulated	Down-regulated	Up-regulated	Down-regulated
CPR150	CPR101	CPR100	CPR101	CPR150	CPR101
CPR24	CPR106	CPR109	CPR106	CPR98	CPR106
CPR98	CPR121	CPR110	CPR117		CPR121
	CPR135	CPR111	CPR119		CPR136
	CPR136	CPR131	CPR120		CPR33
	CPR148	CPR142	CPR121		CPR42
	CPR149	CPR150	CPR123		CPR43
	CPR32	CPR34	CPR125		CPR44
	CPR33	CPR35	CPR129		CPR45
	CPR35*	CPR38	CPR136		CPR47
	CPR36	CPR40	CPR2		CPR49
	CPR37	CPR66	CPR24*		CPR70
	CPR38*	CPR73	CPR32		
	CPR39	CPR77	CPR33		
	CPR41	CPR78	CPR4		
	CPR42	CPR80	CPR42		
	CPR43	CPR92	CPR43		
	CPR44	CPR93	CPR44		
	CPR45	CPR94	CPR45		
	CPR46	CPR95	CPR47		
	CPR47	CPR96	CPR49		
	CPR48	CPR97	CPR67		
	CPR49	CPR98	CPR70		
	CPR50	CPR99	CPR71		
	CPR51				
	CPR52				
	CPR53				
	CPR54				
	CPR60				
	CPR61				
	CPR62				
	CPR66*				
	CPR67				
	CPR70				
	CPR73				
	CPR85				
	CPR86				
	CPR87				
	CPR88				
	CPR89				
	CPR90				
	CPR91				

Genes with an asterisk are both up- and down-regulated.

were up-regulated. Nineteen CPR genes were shown to be affected in both Groups A and B. Of the three up-regulated CPR genes in Group A two were found to be up-regulated in Group B as well and in total 12 genes were down-regulated in both groups as well (Table 2) while five were both up- and down-regulated. Using VectorBase's biomart tool (http://www.vectorbase.org/) we were able to determine that of the CPR genes that were affected by the *Asaia* infections, there were 33 genes containing the RR-1 motif, 38 genes containing the RR-2 motif, and one gene containing an RR-3 motif (see Table 3).[18,19] Further analysis with the Pfam database (http://pfam.sanger.ac.uk) showed that they had the same chitin_bind_4 domain (PF00379).

Discussion

Symbiotic bacteria residing inside arthropods have been proposed as paratransgenic vehicles.[6] The bacteria can either, as such, negatively affect disease agents or be engineered to produce toxic factors. This way, strains of arthropod vectors could be produced that can be employed in strategies aimed at reducing the disease burden. It is however important to understand the role these symbionts play in the host insect under 'natural', i.e. non-engineered conditions. We show here that after the infection of *A. gambiae* larvae with *Asaia*, the bacteria were stably associated with the mosquitoes, becoming part of the microflora of the midgut and remaining there for the duration of the life cycle. Moreover they were passed on to the next generation through vertical transmission. This suggests that bacteria of the *Asaia* genus could be used to express an effector gene; in addition, the bacteria could possibly be transmitted to subsequent generations. This would render the need for repeated introductions unnecessary, which would reduce the cost substantially for such a strategy. As recently shown in another study,[20] when mosquitoes are deprived of *Asaia* symbionts they experience a delay in larval development. This, combined with our observations that there is an increase in the developmental rate when additional bacteria are introduced into the organism, leads us to the conclusion that *Asaia* plays a yet undetermined crucial role during the larval stages. This role is most likely dependent upon live bacteria, as we saw that the addition of killed bacteria did not result in a similar acceleration. This suggests that acceleration is not just the result of a 'better' food source for larvae, but that live *Asaia* provides specific nutrients or other molecules which are limiting under normal larval development using the conditions in the laboratory. Possible explanations for this finding are that the bacteria in the gut assist in the digestion of nutrients in the mosquito's gut and/or that the bacteria produce molecule(s) that allow faster development. Since adult development was neither impaired nor aided by the presence of the bacteria, it follows that *Asaia* does not play a pivotal role in the adult mosquito.

We also observed that although the genetically modified bacteria were passed on to the next generation, the effects on larval development were no longer observed. This is possibly due to the fact that during the first generation the number of bacteria was much higher in the environment and/or midgut than in the F1 generation.

Our microarray analysis showed that the genes that are mostly affected are involved in cuticle formation. Currently, 12 different families of CPs have been recognized, in which each family shares common features.[16] In our analysis the main category affected included mainly members of the CPR gene family. These genes are characterized by the presence of a conserved 35–36 amino acid motif (R&R consensus) first identified by Rebers and Riddiford (1988).[17] This finding is consistent with the fact that larval molting was accelerated due to the effect that overexposure to *Asaia* has on the larval development. One explanation for this could be that the accelerated development

Table 3 Genes containing the RR-1, RR-2, and RR-3 motifs

RR-1 motif	RR-2 motif	RR-3 motif
CPR106	CPR100	CPR111
CPR125	CPR101	
CPR129	CPR109	
CPR24	CPR110	
CPR32	CPR117	
CPR33	CPR119	
CPR34	CPR120	
CPR35	CPR121	
CPR36	CPR123	
CPR37	CPR131	
CPR38	CPR136	
CPR39	CPR142	
CPR40	CPR2	
CPR41	CPR4	
CPR42	CPR42	
CPR43	CPR43	
CPR44	CPR44	
CPR45	CPR45	
CPR46	CPR47	
CPR47	CPR49	
CPR48	CPR67	
CPR49	CPR70	
CPR50	CPR71	
CPR51	CPR85	
CPR52	CPR86	
CPR61	CPR87	
CPR62	CPR88	
CPR66	CPR89	
CPR66	CPR90	
CPR73	CPR91	
CPR77	CPR92	
CPR78	CPR93	
CPR80	CPR94	
	CPR95	
	CPR96	
	CPR97	
	CPR98	
	CPR99	

induced by the bacteria goes along with an increased necessity to build 'new' integument, at rates that are higher than the ones usually seen. The biomart and Pfam analysis showed that all of the affected genes contained the chitin_bind_4 domain and that those genes had both subgroups of the R&R consensus: RR-1, which is found in proteins that form soft cuticles, and RR-2, which is present in proteins that form hard cuticles.[21,22] One protein, finally, contains the RR-3 domain, which is a variant of the R&R consensus.

In this study we showed that genetically modified *Asaia* can be easily introduced into *A. gambiae* and maintained through at least one generation, without any negative effects on the adult mosquito. Furthermore, we have uncovered evidence that bacterial symbiotic organisms may play a significant role in larval development as the addition of *Asaia* to the larval environment showed a significant boost in developmental rate. Therefore, these bacteria can be considered excellent candidates for use as agents of paratransgenesis in a vector-centered fight against malaria. Taken together with the observation that *Asaia* is reduced using rifampicin treatment,[20] we tend to conclude that the bacteria are needed to maintain the developmental rate of the larvae. The molecular nature of the developmental accelerator, though, remains to be identified.

Acknowledgements

We thank Prof. John Vontas for hosting EM for the mosquito rearing experiments and Dr. Dina Vlachou for sharing the DNA microarrays and analysis tools prior to publication. This work was supported by grants 223736 (Transmalariabloc) and 201588 (Evimalar) of the FP7 (HEALTH) Programme of the European Commission. CL was partly supported by the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement no. 267232.

References

1 Enayati A, Hemingway J. Malaria management: past, present, and future. Annu Rev Entomol. 2010;55:569–91.
2 Curtis CF, Jana-Kara B, Maxwell CA. Insecticide treated nets: impact on vector populations and relevance of initial intensity of transmission and pyrethroid resistance. J Vector Borne Dis. 2003;40(1–2):1–8.
3 Marshall JM, Taylor CE. Malaria control with transgenic mosquitoes. PLoS Med. 2009;6(2):e20.
4 Alphey L, Nimmo D, O'Connell S, Alphey N. Insect population suppression using engineered insects. Adv Exp Med Biol. 2008;627:93–103.
5 Lacroix R, McKemey AR, Raduan N, Kwee Wee L, Hong Ming W, Guat Ney T, *et al*. Open field release of genetically engineered sterile male Aedes aegypti in Malaysia. PloS one. 2012;7(8):e42771.
6 Riehle MA, Jacobs-Lorena M. Using bacteria to express and display anti-parasite molecules in mosquitoes: current and future strategies. Insect Biochem Mol Biol. 2005;35(7):699–707.
7 Alavi Y, Arai M, Mendoza J, Tufet-Bayona M, Sinha R, Fowler K, *et al*. The dynamics of interactions between Plasmodium and the mosquito: a study of the infectivity of Plasmodium berghei and Plasmodium gallinaceum, and their transmission by Anopheles stephensi, Anopheles gambiae and Aedes aegypti. Int J Parasitol. 2003;33(9):933–43.
8 Ghosh A, Edwards MJ, Jacobs-Lorena M. The journey of the malaria parasite in the mosquito: hopes for the new century. Parasitol Today. 2000;16(5):196–201.
9 Fontenille D, Cohuet A, Awono-Ambene P, Kengne P, Antonio-Nkondjio C, Wondji C, *et al*. Vecteurs de paludisme: du terrain a la genetique moleculaire. Recherches en Afrique [Malaria vectors: from the field to genetics. Research in Africa]. Revue d'epidemiologie et de sante publique. 2005;53(3):283–90.
10 Damiani C, Ricci I, Crotti E, Rossi P, Rizzi A, Scuppa P, *et al*. Mosquito-bacteria symbiosis: the case of Anopheles gambiae and Asaia. Microb Ecol. 2010;60(3):644–54.
11 Beard CB, Cordon-Rosales C, Durvasula RV. Bacterial symbionts of the triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission. Annu Rev Entomol. 2002;47:123–41.
12 Durvasula RV, Gumbs A, Panackal A, Kruglov O, Aksoy S, Merrifield RB, *et al*. Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(7):3274–8.
13 Favia G, Ricci I, Damiani C, Raddadi N, Crotti E, Marzorati M, *et al*. Bacteria of the genus Asaia stably associate with Anopheles stephensi, an Asian malarial mosquito vector. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(21):9047–51.
14 Harris C, Lambrechts L, Rousset F, Abate L, Nsango SE, Fontenille D, *et al*. Polymorphisms in Anopheles gambiae immune genes associated with natural resistance to *Plasmodium falciparum*. PLoS Pathog. 2010;6(9):e1001112.
15 Gonella E, Crotti E, Rizzi A, Mandrioli M, Favia G, Daffonchio D, *et al*. Horizontal transmission of the symbiotic bacterium Asaia sp. in the leafhopper Scaphoideus titanus Ball (Hemiptera: Cicadellidae). BMC Microbiol. 2012;12(Suppl 1):S4.
16 Willis JH. Structural cuticular proteins from arthropods: annotation, nomenclature, and sequence characteristics in the genomics era. Insect Biochem Mol Biol. 2010;40(3):189–204.
17 Rebers JE, Riddiford LM. Structure and expression of a Manduca sexta larval cuticle gene homologous to Drosophila cuticle genes. J Mol Biol. 1988;203(2):411–23.
18 Cornman RS, Togawa T, Dunn WA, He N, Emmons AC, Willis JH. Annotation and analysis of a large cuticular protein family with the R&R Consensus in *Anopheles gambiae*. BMC genomics. 2008;9:22.
19 Andersen SO. Studies on proteins in post-ecdysial nymphal cuticle of locust, Locusta migratoria, and cockroach, Blaberus craniifer. Insect Biochem Mol Biol. 2000;30(7):569–77.
20 Chouaia B, Rossi P, Epis S, Mosca M, Ricci I, Damiani C, *et al*. Delayed larval development in Anopheles mosquitoes deprived of Asaia bacterial symbionts. BMC Microbiol. 2012;12(Suppl 1):S2.
21 Andersen SO. Exoskeletal proteins from the crab, Cancer pagurus. Comp Biochem Physiol, Part A: Mol Integr Physiol. 1999;123(2):203–11.
22 Iconomidou VA, Willis JH, Hamodrakas SJ. Is beta-pleated sheet the molecular conformation which dictates formation of helicoidal cuticle? Insect Biochem Mol Biol. 1999;29(3):285–92.