

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Teoretická a evoluční biologie



Bc. Zuzana Matějková

**Evoluce peptidů s antimikrobiální aktivitou v jedu
kukaččích včel rodu *Nomada* (Hymenoptera: Apoidea)**

Evolution of peptides with an antimicrobial activity in venom of
cockoo bees of genus *Nomada* (Hymenoptera: Apoidea)

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Jakub Straka, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 8. 8. 2017

Zuzana Matějková

Poděkování

Ráda bych poděkovala Václavu Čerovskému z ÚOCHB za odbornou pomoc, Lence Monincové a Zdeňkovi Voburkovi za spolupráci a přátelskou atmosféru. Díky patří i Janě Habermannové za poskytnutí dat pro fylogenezi, a zejména školiteli Jakubovi Strakovi za odbornou pomoc a rady, podporu i motivaci obzvláště v závěrečné části práce.

Děkuji také kamarádům z pracovny entomologie, kteří mi poradili v několika zapeklitých situacích, zejména pak Jírkovi Hadravovi za pomoc se statistikou.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala také kamarádům, kteří mi pomáhali s odchytom včel a jejich neustálými převozy nebo mi poskytli cenné rady k práci: Barce, Alešovi, Filipovi. A stejné díky patří i mé rodině, která mě vytrvale podporuje a obveseluje.

Abstrakt

Peptidy s antimikrobiální aktivitou jsou již dlouho známou součástí vrozené imunity hmyzu. Většinu z nich můžeme nalézt v hemolymfě, ale vyskytují se také na povrchu těla, či v různých žlázách hmyzu. Řada jich byla nalezena právě v jedových žlázách blanokřídlého hmyzu. Zatímco jejich imunitní funkce v hemolymfě je zřejmá, o tom, proč se vyskytují tak hojně i v jedových žlázách se zatím spíše spekuluje. V úvahu přichází například hypotéza kolektivní imunity u sociálních blanokřídlých. Ta však nevysvětluje, proč se tyto peptidy vyskytují (navíc v tolika variacích) i u samotářských včel. Nejen jejich funkce je velmi málo prozkoumanou oblastí – mnoho informací v současnosti nemáme ani o jejich původu a rozmanitosti. Tato práce podrobně charakterizuje evoluci peptidů v jedových žlázách včel na příkladu kukaččích včel z tribu Nomadini. Odhaluje možnou homologii dvou peptidů včel rodu *Nomada* s melittinem a MCD-peptidem – již známými peptidy z jedu včely medonosné. Metodou rekonstrukce ancestrálních peptidových sekvencí mapuje vývoj hlavního peptidu přítomného u většiny nomád. Kromě druhu *N. fuscicornis* jsou rozdíly mezi druhy založené na mutacích, které nemění antimikrobiální aktivitu peptidu. Nemůžeme tedy vyloučit, že selekční tlak, který působí na zachování antimikrobiální funkce, je skutečně ze strany mikroorganismů.

Práce dále porovnává míru substitučních a delečních změn těchto peptidových sekvencí u rodu *Nomada* se sekvencemi peptidů méně příbuzných druhů. Na základě zjištěných informací navrhuje hypotézu o funkci antimikrobiálních peptidů u samotářských včel.

Klíčová slova:

jedová žláza, jed, peptidy, antimikrobiální aktivita, včely

Abstract

Peptides with an antimicrobial activity are a well-known component of an innate immunity of insects. A major part of them has been found in haemolymph, but they occur at the body surface and various glands of insects as well. Some of them have been found in venom glands of Hymenoptera. Whereas their immunity function in haemolymph seems to be obvious, the purpose of their frequent presence in venom glands is still more or less a matter of speculation. A hypothesis of their function in a collective immunity comes into consideration in social Hymenoptera. But this hypothesis doesn't explain, why does this sort of peptides occur also at solitary bees (and even in such diversity). There is not only little explanation of their function, but there is not even not much information about their origin and diversity.

This thesis brings a detailed description of the evolution of peptides in venom glands of cuckoo-bees from the genus *Nomada*. A possible homology of two peptides from *Nomada* bees with previously known peptides melittin and MCD-peptide of *Apis mellifera* is revealed. The evolution of a main peptide with antimicrobial activity in *Nomada* genus is traced with a method of ancestral reconstruction. Except for species *N. fuscicornis* the differences among species are based on changes that do not alter the antimicrobial activity of the peptide. We cannot rule out, that the selective pressure, which maintains the antimicrobial function, is really caused by microorganisms.

Furthermore, the rate of substitution a deletion changes in *Nomada* genus is compared to the rates of other, less related species. Based on the information acquired, a hypothesis on the function of antimicrobial peptides in solitary bees is proposed.

Keywords:

venom gland, venom, peptides, antimicrobial activity, bees

Obsah

1	Úvod	6
2	Cíle práce	8
3	Literární přehled	8
3.1	Nomády	8
3.1.1	Charakteristika a zařazení nomád (rod <i>Nomada</i>) v rámci Blanokřídlých	8
3.1.2	Kleptoparazitismus nomád	8
3.1.3	Fylogeneze tribu <i>Nomadini</i>	9
3.1.4	Žihadlo, jedová žláza a její obsah	9
3.2	Imunita hmyzu	11
3.2.1	Sociální imunita	11
3.3	Antimikrobiální peptidy	12
3.3.1	Struktura peptidů a mechanismus funkce	12
3.3.2	Rozšíření a klasifikace	13
4	Materiál a metodika	14
4.1	Materiál	14
4.1.1	Přehled sledovaných druhů	15
4.2	Metoda	18
4.2.1	Rozvržení prací	18
4.2.2	Kapalinová chromatografie (HPLC)	18
4.2.3	Testování antimikrobiální (antibakteriální) aktivity	18
4.2.4	Hmotnostní spektrometrie	19
4.2.5	Edmanova degradace	19
4.3	Analýza molekulárních dat	19
4.3.1	Rekonstrukce fylogeneze	19
4.3.2	Výpočet fylogenetického stromu	20
4.3.3	Rekonstrukce ancestrálních stavů	21
4.3.4	Vizualizace a úprava fylogenetických dat	22
4.3.5	Statistická analýza	22
5	Výsledky	24
5.1	Peptidy	24
5.1.1	Charakteristika izolovaných peptidů	24
5.1.2	Antimikrobiální aktivita izolovaných peptidů	25
5.2	Fylogeneze a datování	26
5.3	Rekonstrukce ancestrálních stavů sekvencí peptidu melittinového typu u nomád	27

5.4	Srovnání rychlosti evoluce	28
5.4.1	Popisné charakteristiky rychlosti evoluce	28
5.4.2	Srovnání rychlostí evoluce sekvence v rámci rodu <i>Nomada</i>	29
5.4.3	Srovnání rychlosti evoluce peptidů s dalšími druhy včel	31
6	Diskuze	32
6.1	Fylogeneze	32
6.2	Charakter peptidů v jedu nomád	32
6.3	Rekonstrukce ancestrálních sekvencí pro peptid melittinového typu	33
6.4	Srovnání rychlosti evoluce	33
6.4.1	Srovnání rychlostí evoluce peptidu melittinového typu v rámci rodu <i>Nomada</i> .	33
6.4.2	Srovnání rychlostí změn peptidových sekvencí s dalšími zástupci včel.....	35
6.5	Použití metod a jejich limity	35
7	Závěr.....	36
8	Seznam zkratk	37
9	Použitá literatura:.....	37

1 Úvod

Antimikrobiální peptidy jsou v posledních letech předmětem intenzivního výzkumu. Jedná se zejména o jejich farmaceutické využití: pokud není možné využít přímo jejich bakteriostatických, antimikrobiálních či cytolytických účinků, slouží jejich struktura alespoň jako významný ukazatel možné cesty při chemické syntéze antimikrobiálně účinných peptidů k léčebným účelům. Syntézou takovýchto peptidových analogů se zabývá skupina Antimikrobiální peptidy z ÚOCHB Akademie věd, se kterou jsme spolupracovali na molekulárně analytické části projektu.

Vzhledem k propojení s aplikovaným výzkumem dosahují po chemické stránce informace o antimikrobiálních peptidech značné šíře. Na jejich biologickou stránku – funkci u konkrétních organismů, evoluci, či rozmanitost, chybí ucelený pohled. Informace, které jsou zatím známy, snad s výjimkou jedné review (Moreau, 2013) jsou spíše fragmentární.

Hypotézy o funkci peptidů s antimikrobiální aktivitou z jedu blanokřídlých se různí podle životních strategií skupin, u kterých byly nalezeny. Přítomnost antimikrobiálních peptidů (AMP) byla prokázána jak v jedu predátorsko-parazitických vos a sociálních včel, tak u řady včel se samotářským a také kukaččím způsobem života (Čeřovský *et al.* 2008; Mendes *et al.* 2005; Monincová *et al.* 2010). Funkci peptidů u původní predátorsko-parazitické životní strategie rozumíme – vedle synergického působení při paralýze kořisti ji také konzervují. Konzervační funkce by pro zásoby pylu teoreticky mohly využívat i samotářské včely. Přítomnost antimikrobiálních peptidů v zásobách pylu však dosud nebyla prokázána. Nabízí se i další hypotézy: například vosíci druhu *Polistes dominulus* (Vespoidea) používají peptidy z jedu jako komunikační molekuly. Spářené matky vosíků vylétávají na koci léta hledat místo k přezimování, tzv. hibernaculum. K přezimování preferují stále stejná místa, označená specifickými látkami. Ačkoli při konečném výběru se mohou samice orientovat také dalšími látkami, reagují jednoznačně na přítomnost či nepřítomnost antimikrobiálních peptidů zvaných dominuliny. Ty se vyskytují právě v jedu vosíků. Širší využití těchto peptidů naznačuje také jejich výskyt na kutikule uvedeného druhu (S. Turillazzi *et al.*, 2006). Vezmeme-li v úvahu praktičnost žihadla coby potenciálního „aplikátoru“ jedu na povrchy, dalo by se v podobném duchu uvažovat o univerzálnější feromonové funkci peptidů. Antimikrobiální potenciál by byl v takovém případě spíše jakýmsi by-produktem jiné funkce.

Antimikrobiální peptidy mohou také fungovat jako látky podporující účinek dalších komponent jedu. Synergické fungování je známé například u melittinu, který působí jako mediátor vezikulárních substrátových výměn s fosfolipidy a aktivuje tak funkci fosfolipázy A2 (Cajal & Jain, 1997).

Antimikrobiální peptidy v hemolymfě jsou podstatnou složkou imunitní obrany hmyzu – a od toho se také odvíjí hypotéza o jejich funkci u sociálního hmyzu. Díky specifickým podmínkám v hnízdě jsou sociální druhy vystaveny většímu riziku rozvoje patogenních nákaz (Li, Xiang, Zhang, Huang, & Su, 2012). Vzhledem k tomu, že přítomnost AMP byla prokázána na kutikule (Baracchi, Francese, & Turillazzi, 2011; S. Turillazzi & Pardi, 1981), na povrchu hnízda i na plodu (Obin & Vander Meer, 1985) některých sociálních blanokřídlých, předpokládá se, že mohou být součástí externí imunity společenství – tzv. kolektivní imunity.

Obdobně by mohly mít antimikrobiální peptidy podobnou desinfekční funkci také u samotářských druhů. Skrze žihadlo je jedový váček v kontaktu s vnějším prostředím a je tak potenciálním terčem oportunních patogenů z okolí. Přesto se v jedových váčcích včel neprokázalo, s výjimkou parazitických hub (Schmid-Hempel, 1998), osídlení žádnými mikroorganismy. Podle Moreau (2013) slouží antimikrobiální látky v jedu obecně jako obrana proti přenosům patogenů - ať už se jedná o kontaminaci žihadla při kontaktu s tkání jiného živočicha, či naopak kontaminaci tkáně v oblasti vpichu.

Hypotéz se tedy nabízí řada, ale ukazuje se, že nemáme zatím jednoznačné kritérium, jak dojít ke konkrétnějšímu závěru o jejich pravděpodobnosti. Snad s výjimkou toho, že ať už jde o vysvětlení funkce, diverzity, či charakteru změn, ve hře budou zásadními aktéry mikroorganismy, které jsou zjevně schopné vytvořit takový selekční tlak, který udržuje antimikrobiální peptidy v jedu stále připravené. Odráží ale diverzita v početnosti peptidů nebo diverzita v jejich sekvencích také diverzitu působících tlaků? A jsou antimikrobiální účinky tak různorodých peptidů v jedu spíše vlastností, ke které konvergují různé peptidy, neboť je adaptivní, nebo se jedná spíše o konzervativní znak, který se v evoluci udržuje skrze stále podobné molekuly a diverzita je pak pouze v podobě mutací, které nemění funkčnost peptidu? Co byly tyto evoluční tlaky, pod kterými se vyvíjely sekvence peptidů a jaké faktory určovaly počty změn v sekvencích a charakter aminokyselinových záměn?

Vzhledem k tomu, že výzkum je běžně zacílen spíš na hledání potenciálních antibiotik, známe pouze peptidy, které vykazují nějakou využitelnou aktivitu (ať už antimikrobiální nebo třeba cytolytickou). Nevíme tak, u kterých druhů jsou tyto peptidy nepřítomné, nebo přítomné v nefunkční formě. Záměrem této práce je určit sekvence antimikrobiálně aktivních i neaktivních peptidů z jedu včel a popsat jejich evoluci na rodu *Nomada*. Rod *Nomada* zahrnuje pouze kukaččí (kleptoparazitické) samotářské druhy včel. Jsou to tedy včely, které jsou (jako všechny ostatní) býložravé, ale neshromažďují pylové zásoby, nehnízdí a o své potomky nepečují. Jejich žihadlo a jedová žláza nejsou redukovány a nomády je aktivně používají. Zdá se tedy, že hypotézy kolektivní imunity, konzervace či desinfekce hnízda nemusíme v tomto případě brát v potaz a můžeme se zaměřit na poznání evoluce těchto peptidů. Podrobnější poznání mechanismů může dovolit nastínění hypotézy o jejich funkci, či podpořit některou z hypotéz stávajících.

2 Cíle práce

1. Určit sekvence peptidů izolovaných z jedových žláz vybraných jedinců rodu *Nomada*.
2. Typově charakterizovat tyto peptidy s ohledem na jejich podobnost s již známými peptidy a zjistit jejich antimikrobiální vlastnosti.
3. Zrekonstruovat historii sekvencních změn peptidů v jedových žlázách včel rodu *Nomada*.
4. Charakterizovat trendy a rychlost změn v sekvencích peptidů v kontextu způsobu života a parazitického chování včel.

3 Literární přehled

3.1 Nomády

3.1.1 Charakteristika a zařazení nomád (rod *Nomada*) v rámci Blanokřídlých

Rod *Nomada* patří mezi větší rody čeledi Apidae, v ČR je známo zatím 86 druhů. Jedná se o malé až středně velké včely vosího vzhledu: téměř lysé, s tuhou kutikulou, s tergity zbarvenými v kombinacích černé a žluté, často v kombinaci s červenou, u dalších druhů v různých odstínech hnědočervené až černé, často se světlými skvrnami. Jejich celkový habitus nápadně odpovídá jejich životní strategii: kleptoparazitismu. Jejich let je rychlý a obratný, tělo je štíhlé a lysé, chybí prakticky jakékoli součásti pylosběrného aparátu. Kleptoparazitické včely se vyznačují tím, že nestaví hnízdo, nesbírají pylové a ani nektarové zásoby. Larvy se vyvíjí na zásobách jiných druhů (Macek et al., 2010).

Ačkoli by fyzické vybavení nomád mohlo naznačovat jejich útočnost, jejich strategií je naopak spíše využití dočasné nepřítomnosti hostitelské samice a zajištění si tak bezpečí a klidu při kladení vajíček do cizího hnízda. Pokud však ke střetu stejně dojde, překvapivě nebývá agresivní. Útočnost hostitelky je pravděpodobně utlumena pachem parazita, který se podezřele podobá pachu hostitele. Slinné žlázy samců nomád obsahují tutéž látku, která se vyskytuje v Dufourově žláze hostitelky. Samci některých nomád potírají touto látkou samice během páření a zajišťují tak vlastně určitý druh „pachové mimese“ (Macek et al., 2010; Tengo & Bergstrom, 1977).

3.1.2 Kleptoparazitismus nomád

Kleptoparazitismus, tedy životní strategie zakládající se na uzurpaci jídla či hnízd jiným jedincům, je značně rozšířeným typem parazitismu. Téměř notoricky známý fenomén je to u ptáků (Brockmann & Barnard, 1979), vyskytuje se však u řady dalších skupin živočichů: savců (Höner, Wachter, East, & Hofer, 2002), ryb (Hamilton & Dill, 2003) a několika skupin členovců, (Rosenheim, 1989; Vollrath, 1979) včetně včel (Michener, 2007). U skupiny včel (Apoidea) jsme

svědky značné diverzity životních strategií. V případě hnízdění varíují jejich strategie mezi samotářským způsobem života, přes různorodé jednoduše sociální formy hnízdění, až k formě odvozeně eusociálního společenství. Kleptoparazitismus se může svojí extrémností v rámci této škály zdát jako raritní strategie, ale není tomu tak. Jedná se naopak o strategii velmi běžnou: kleptoparazitické druhy tvoří v rámci včel čeledi Apidae 28% (kleptoparazitické triby 50%) (Cardinal, Straka, & Danforth, 2010).

V případě kleptoparazitických druhů včel, obvykle nazývaných včely kukaččí, se jedná o strategii skutečně srovnatelnou s chováním kukaček – ptáků. Včelí matka si také nestaví vlastní hnízdo, ani neshromažďuje zásoby potravy. Vajíčka jednoduše naklade do hnízda cizího druhu. Buď samotná matka, nebo později larvy kleptoparazitické včely zabijí plod cizího druhu a samy se živí na zásobách pylu, nektaru, či rostlinných olejů.

Mezi včelími kleptoparazity a hostiteli nejsou výjimkou poměrně blízké příbuzenské vztahy (například čmeláci a pačmeláci). Běžné jsou ale také parazitace u zcela nepříbuzných druhů, mezi které patří také nomády (Macek et al., 2010). Jejich hostiteli jsou převážně pískorypky rodu *Andrena* a řídce *Panurgus*, částečně také ploskočelky (*Lasioglossum*), hedvábnice (*Colletes*), pilorožky (*Melitta*), stepnice (*Eucera*) a zřejmě i další rody včel.

Podle současných informací vznikl kleptoparazitismus u včel čeledi Apidae čtyřikrát: dvakrát v rámci tribu Euglossini, jednou u tribu Clenoplectrini a jednou u společného předka části podčeledi Apinae (Ericrocidini, Rhathymini, Isepeolini, Protepeolini, Osirini, Melectini, *Coelioxoides*) a podčeledi Nomadinae.

3.1.3 Fylogeneze tribu Nomadini

Rod *Nomada* je jediným rodem, který tvoří tribus Nomadini. Tribus Nomadini je zařazen do podčeledi Nomadinae, monofyletické skupiny s obligátně kleptoparazitickou životní strategií. Vyšší zařazení této podčeledi prošlo však v nedávné době díky podrobnějšímu vhladu do evoluce kleptoparazitismu u včel revizí: vzhledem k existenci velkého kleptoparazitického kladu čítajícímu všechny skupiny z původních Nomadinae a řadu skupin z původních Apinae, je patrné, že podčeleď Apinae je v tomto pojetí parafyletická (Cardinal et al., 2010). Můžeme tedy očekávat, že reklasifikace fylogenetických vztahů uvnitř čeledi Apidae se tedy zcela jistě dotkne i přehodnocení pozice tohoto hlavního kleptoparazitického kladu, jehož je tribus Nomadini součástí.

3.1.4 Žihadlo, jedová žláza a její obsah

Včely, spolu s mravenci a vosami patří do skupiny Žahadloví (Aculeata), která tvoří monofyletickou skupinu podřádu Štíhlopasí (Apocrita) z řádu blanokřídlý (Hymenoptera). Linie

žahadlových se v rámci podřádu Apocrita oddělila od linií skupin „Parasitica“ (Peters et al., 2017). Synapomorfii žahadlových je kladélko přeměněné v žihadlo. Skupina Parasitica má kladélko naopak v plesiomorfii formě, tedy ovipor neseparovaný od kladélka. U žahadlových se původní dutina kladélka změnila v jedový kanálek žihadla (Steiner & Piek, 1986). Vajíčka, která u předka procházela dutinou kladélka, vychází u žahadlových oviporem na bázi žihadla (Chapman, Simpson, & Douglas, 2013).

Na jeho bázi ústí do žihadla jedová žláza, a také Dufourova žláza (ve starší literatuře nazývané také žláza zásaditá, resp. kyselá). Dufourova žláza je žlázou I. typu (Chapman et al., 2013) s jednovrstevným glandulárním epitelem. Vyvinula se pravděpodobně z přídatné žlázy samičích pohlavních orgánů – u většiny blanokřídlých slouží k lubrikaci vnitřku kladélka a usnadnění průchodu vajíček. U žahadlových produkuje látky různých, druhově specifických funkcí (Macek et al., 2010). U mravenců ústí do žihadla, u vos a včel do zadní vaginální stěny (Mitra, 2013). Jedová žláza je žláza II. typu, rovněž epidermálního původu. Je tvořena dvojicemi sekrečních buněk s extracelulárním rezervoárem spojených s kanálkovými buňkami, které obklopují kutikulární sekreční kanálek (Betz, 2010; Chapman et al., 2013). Jeden či více sekrečních kanálků pak ústí do jedového váčku, ve kterém je jed skladován. Epitel uvnitř jedového váčku (nazývaný také convoluted gland, stočená žláza) má také sekreční funkci, vyskytuje se však jen u některých skupin včel (Britto & Caetano, 2005).

Jed blanokřídlých tvoří obecně malé molekuly neproteinové povahy o hmotnosti do 300 Da (např. biogenní aminy), volné aminokyseliny nebo jejich deriváty, peptidy (1500- 4000 Da) a větší enzymy spolu s dalšími proteiny (Schmidt, 1983).

Z jedů včel je podrobněji popsán jed včely medonosné. Z enzymaticky působících látek obsahuje fosfolipázy A1 a A2 (12 % sušiny jedu) a hylauronidázu, které způsobují narušení fosfolipidových membrán a vznik lysofosfolipidů. Z dalších enzymů je součástí jedu serinová proteáza (CUB), která štěpí peptidové vazby v proteinech (Nico Peiren et al., 2005). Nejznámějším peptidem z tohoto jedu je melittin, helikální amfipatický peptid, sestávající se z 26 aminokyselinových zbytků. Tvoří až 50 % sušiny jedu. Melittin působí hemolyticky, snižuje povrchové napětí buněk, čímž narušuje jejich membrány. Má antimikrobiální i hemolytické účinky (DeGrado, Musso, Lieber, Kaiser, & Kezdy, 1982; Park & Lee, 2010; N. Peiren et al., 2008). Dalším peptidem je apamin, malý (10 AMK zbytků) neurotoxický peptid se dvěma disulfidickými můstky, který působí jako inhibitor Ca^{2+} aktivovaných draselných kanálů (Banks et al., 1979). MCD (mast-cell degranulating) peptid je peptid složený z 22 AMK zbytků, který stimuluje degranulaci žírných buněk (Buku & Price, 2001). Včelí jed obsahuje také malý peptid minimin (Habermann, 1972), a nepříliš známé peptidy secapin a terciapin (Palma, 2006). Antimikrobiální peptidy se však vyskytují u včel také v hemolymfě, u včely medonosné například apidaecin či abaecin (P. Casteels & Tempst, 1994; Peter Casteels et al., 1990). Žihadlo u včel, vos či mravenců může zastávat řadu různých funkcí, s nimiž může úzce souviset funkce antimikrobiálních peptidů. Funkce žihadla se odvíjí v první řadě od životní strategie jeho

uživatelé: u predátorsko-parazitických vos k paralýze a manipulaci kořisti (Hook & Matthews, 1980; O'Neill, 2001), u řady druhů žahadlových k obraně před predátory (Starr, 1985). Může mít také sensorickou funkci (Buku & Price, 2001), produkovat feromony (Wilson, 1965) či impregnační látky (Albans, Aplin, Brehcist, Moore, & O'toole, 1980). Z hlediska obsahu jedu se jeví také jako významná role žihadla v imunitě hmyzu.

3.2 Imunita hmyzu

Je známo, že imunitní systém hmyzu se od systému obratlovců liší zejména absencí imunitní paměti, tedy adaptivní složky imunity, kterou u obratlovců představují T-lymfocyty a B-lymfocyty produkující specifické protilátky. Zdá se tedy, že u hmyzu probíhají veškeré imunitní reakce hmyzu pouze na úrovni imunity vrozené (Vilmos & Kurucz, 1998), nedávné studie však naznačují, že i u bezobratlých jsme svědky určitého druhu adaptivní imunitní odpovědi. Přesné mechanismy zatím nejsou známy, ale podstatnou roli nejspíše hraje kvalitativně i kvantitativně odlišná diferenciací různých subpopulací hemocytů (Masri & Cremer, 2014).

Hemocyty tvoří ústřední část buněčné imunitní odpovědi hmyzu, řídí hlavně enkapsulaci a fagocytózu patogenních částic. Vedle indukce proteolytických kaskád v důsledku zranění, melanizace a produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku je podstatným dílem hmyzí imunity tvorba peptidů s cytolytickou, potažmo antimikrobiální funkcí (Hoffmann, Reichhart, & Hetru, 1996) (Lavine & Strand, 2002). Takové peptidy jsou syntetizovány v tukovém tělísku a sekretovány převážně do hemolymfy, ale u různých druhů mohou patrně vznikat také v hemocytech, epiteliálních buňkách kutikuly, ve střevě, slinných žlázách, reprodukčním aparátu hmyzu (Vilmos & Kurucz, 1998) a právě v jedových žlázách žahadlových (Kuhn-Nentwig, 2003). Podle nedávné studie (Otti, Tragust, & Feldhaar, 2014) je právě produkce antimikrobiálních látek vně těla spolu se sanitačním či profylaktickým chováním externalizovanou částí imunity, která je adaptivní pro druhy žijící ve stabilním prostředí, ve kterém jsou jejich příslušníci neustále vystaveni vysokému, ale málo proměnlivému selekčnímu tlaku patogenů. Takovými druhy jsou právě příslušníci hnízdícího hmyzu: je pro ně účelnější vynaložit prostředky na efektivní externí obranu spíše než investovat tolik do své vnitřní imunity, jako je tomu třeba u druhů, které se setkávají s proměnlivějším spektrem patogenů (Otti et al., 2014).

3.2.1 Sociální imunita

Speciálním případem této externalizované části imunity je fenomén nazývaný jako sociální či kolektivní imunita známý u sociálního hmyzu. Sociální druhy jsou díky společnému hnízdění množství jedinců, jejich těsným interakcím i díky jejich blízké příbuznosti vystaveni většímu riziku nákazy patogenem a jejímu šíření (Schmid-Hempel, 1998). Jako reakce na toto riziko se u sociálního hmyzu vyvinuly různé preventivní protiinfekční způsoby chování: jde jak o opatření

profylaktická, tak o opatření aktivovaná až po setkání s patogenem (Cremer, Armitage, & Schmid-Hempel, 2007). Patří mezi ně například separace infikovaných jedinců či péče o ně (Cremer et al., 2007), odstraňování mrtvých jedinců (Howard & Tschinkel, 1976), vzájemné čištění (allogrooming) (Hughes, Eilenberg, & Boomsma, 2002), enkapsulace parazitů (Neumann et al., 2001), sběr či produkce antimikrobiálních látek (Chapuisat, Oppliger, Magliano, & Christe, 2007), aplikace antimikrobiálních látek (Tragust et al., 2013; Stefano Turillazzi et al., 2006) či konzumace antimikrobiálních látek (McCleskey & Melampy, 1939). Skrze sociální interakce rovněž získává individuální imunita další rozměr: i na úrovni společenství dochází k sociální imunizaci. Jedinci, kteří se s určitým patogenem nesečkali, jsou po kontaktu s infikovanými jedinci (nebo i takovými, kteří se s patogenem pouze setkali), vůči patogenu odolnější (Traniello, Rosengaus, & Savoie, 2002). K takovéto sociální imunizaci dochází jak horizontálně, tak transgeneračně – odolnost vůči patogenu se přenáší na potomky (Masri & Cremer, 2014).

3.3 Antimikrobiální peptidy

3.3.1 Struktura peptidů a mechanismus funkce

Antimikrobiální peptidy jsou malé termostabilní polypeptidy, nesoucí zbytky méně než 100 aminokyselin (Bahar & Ren, 2013). Byly identifikovány v mnoha skupinách organismů, včetně blanokřídlého hmyzu. V jedech žahadlových se vyskytují jako součást komplexní účinné směsi spolu s enzymy, neurotoxiny a dalšími nízkomolekulárními látkami (Kuhn-Nentwig, 2003). Antimikrobiální peptidy obvykle obsahují aminokyseliny s kladně nabitými postranními řetězci (jakými jsou lysin (K) či arginin (R)) a další hydrofobní aminokyselinové zbytky. Díky tomu získávají kladný náboj (nejčastěji o hodnotách +2 až +9 (Brown & Hancock, 2006)), který je zásadní pro interakci s bakteriálními membránami (Baltzer & Brown, 2011). Ve vodném prostředí často zaujímají neuspořádanou konformaci, v blízkosti biologické membrány se však zformují do některé z konformací amfipatického charakteru. To znamená, že ve výsledku obsahují hydrofobní aminokyseliny na jedné straně a hydrofilní aminokyseliny spolu s lysiny či argininy na straně druhé. Toto rozložení jim umožňuje specificky interagovat s membránami (Čeřovský, 2014). Membrány bakterií jsou tvořeny dvouvrstvou fosfolipidů, jejichž fosfátové skupiny jsou záporně nabitě. Přiblíží-li se kladně nabitý peptid do bezprostředního okolí membrány, je k ní vlivem opačných nábojů přitahován a zaujme svou finální, α -helikální konformaci. Působením náboje se membrána naruší, následně se vytvoří pór, umožňující peptidu kontakt s vnitřním prostředím buňky (Straus & Hancock, 2006). Samotná lyze buňky patogenu může následně probíhat různými způsoby – navázáním peptidů na buněčné složky a následnou inhibicí jejich syntézy, či narušením membránového potenciálu a pH gradientu, v důsledku čehož je znemožněna osmotická regulace a respirace (Brown & Hancock, 2006; Li et al., 2012). Takové peptidy jsou toxické pro většinu bakterií (Yeaman & Yount, 2003). Membrány eukaryotických buněk jsou však tvořeny fosfolipidy neutrálního charakteru (a navíc částečně

chráněny cholesterolem), a tak jsou vůči fatální interakci s antimikrobiálním peptidem chráněné (Gottler & Ramamoorthy, 2009).

3.3.2 Rozšíření a klasifikace

Je patrné, že antimikrobiální peptidy jsou druhově poměrně specifické látky. V současnosti je známo více než 200 antimikrobiálních peptidů původem z hmyzu (Li et al., 2012). Klasifikace peptidů podle univerzálních kritérií je poměrně komplikovaná, a tím pádem také nejednotná – jsou rozlišovány na základě struktury, náboje (kationické x anionické), mechanismu působení, zacílení účinku (antivirální, antibakteriální, antifungální, hemolytické, cytolytické), či původu – z něž je také většinou odvozen název (dominuliny, ponericy, atp.). Peptidy izolované z jedu hmyzu patří obvykle z hlediska náboje do kationické kategorie. Na základě struktury spadají do tří kategorií: lineární peptidy s α -helixem, lineární peptidy bohaté na určitou aminokyselinu (Pro, Gly, His) a cyklické peptidy s disulfidickými můstky (Vizioli & Salzet, 2002). V rámci žahadlových byla zatím publikována přítomnost antimikrobiálních peptidů u zástupců včel, vos (Xu et al., 2006) i mravenců (Orivel et al., 2001). Jejich množství se pohybuje v rozsahu 1-15 peptidů (Čeřovský, 2014). (Tabulka 1 podává přehled v současnosti známých sekvencí peptidů z jedu včel. (zdroje v Příloze 14).

Tabulka 1: Peptidy izolované z jedu včel

čeleď	druh	název	sekvence
Halictidae	<i>Halictus sexcinctus</i>	HAL-1	GMWSKILGHLIR
Halictidae	<i>Halictus sexcinctus</i>	HAL-2	GKWMSLLKHILK
Halictidae	<i>Lasioglossum laticeps</i>	LL-I	HVNWKKVLGKIIKVAK
Halictidae	<i>Lasioglossum laticeps</i>	LL-II	HVNWKKILGKIIKVAK
Halictidae	<i>Lasioglossum laticeps</i>	LL-III	HVNWKKILGKIIKVVK
Halictidae	<i>Lasioglossum laticeps</i>	LL III/5	HVNWKKILGKIIKVVKOH
Halictidae	<i>Lasioglossum laticeps</i>	Lasioepsin	GLPRKILCAIAKKKGKCKGPLKLV CKC
Mellitidae	<i>Macropis fulvipes</i>	MAC-I	GTGLPMSERRKIMLMR
Mellitidae	<i>Macropis fulvipes</i>	MAC-II	GFGMALKLLKKVL
Andrenidae	<i>Panurgus calcaratus</i>	PNG-1	LNWGAILKHIK
Andrenidae	<i>Panurgus calcaratus</i>	PNG-K	LDVKKIICVACKIKPNPACKKICPK
Andrenidae	<i>Panurgus calcaratus</i>	PNG-R	LDVKKIICKIRPNPACKKICPK
Megachillidae	<i>Osmia rufa</i>	osmin	GFLSALKKYLPIVLKHV
Apidae	<i>Ceratina cucurbitina</i>	nepublikov án	GLASILKKLIPAIKYMPPKSHK NQ
Apidae	<i>Apis mellifera</i>	tertiapin	ALCNCNRIIPHMCWKKCGKK
Apidae	<i>Apis mellifera</i>	secapin	YIIDVPPRCPPGSKFIKNRGRVPV
Apidae	<i>Apis mellifera</i>	MCD/401	IKCNKRHVVIKPHICRKICGKN
Apidae	<i>Apis mellifera</i>	mellitín	GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKR QQ
Apidae	<i>Apis mellifera</i>	apamin	CNCKAPETALCARRRCQQH
Apidae	<i>Melecta albifrons</i>	melectin	GFLSILKKVLPKVMAMHK
Apidae	<i>Xylocopa appendiculata</i>	Xac-1	GFVALLKKLPLILKHLH

Apidae	<i>Xylocopa appendiculata</i>	Xac-2	GFVALLKKLPLILKHL P
Apidae	<i>Apis dorsata</i>	melittin-like	GIGAILKVLSTGLPALISWIKRKR QEG
Apidae	<i>Apis florea</i>	melittin-like	GIGAILKVLATGLPTLISWIKNKR KQG
Apidae	<i>Apis cerana</i>	melittin-like	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKR QQG
Apidae	<i>Apis mellifera carnica</i>	melittin-like	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKR QQG
Apidae	<i>Bombus pennsylvanicus</i>	bombolitin 1	IKITTMLAKLGKVL AHV
Apidae	<i>Bombus pennsylvanicus</i>	bombolitin 2	SKITDILAKLGKVL AHV
Apidae	<i>Bombus pennsylvanicus</i>	bombolitin 3	IKIMDILAKLGKVL AHV
Apidae	<i>Bombus pennsylvanicus</i>	bombolitin 4	INIKDILAKLVKVLGHV
Apidae	<i>Bombus pennsylvanicus</i>	bombolitin 5	INVLGILGLLGKALSHL
Apidae	<i>Bombus lapidarius</i>	bombolitin 6	LNLTKWLGKLGVILSHLNK
Apidae	<i>Bombus lapidarius</i>	bombolitin 7	LKLDILGKIKVILSHLNK
Apidae	<i>Bombus lapidarius</i>	bombolitin 8	LKLSILGKLGVILSHLNK






4 Materiál a metodika






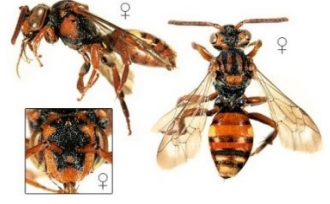
4.1 Materiál







Odchyt jedinců probíhal po celou sezónu 2015 a 2016. Odchycené včely pochází z těchto oblastí: Hodkovicko (50.6677289N, 15.1104833E, 50.6725975N, 15.0895836E), Lysá nad Labem (50.2111125N, 14.8052842E), Strašnice (50.0778319N, 14.5021267E), Malá skála (50.6385444N, 15.2072917E), Jívka (50.544208N, 16.091930E), Semín (50.0594925N, 15.5188503E), Podbaba (50.1185336N, 14.3907347E, 50.1184228N, 14.3867811E), Trója (50.124134, 14.407502). Odchyt samic nomád byl proveden smykem do sítě, včely byly co nejdříve zamrazeny a určeny do druhu. Materiál byl následně uchovávan v malých uzavřených epruvětách s vlhkým ubrouskem bránícím vysychání v -20 °C. I přes tuto úpravu materiál rychle vysychá, proto bylo nutné jedové žlázy s vácíky vypreparovat pod stereomikroskopem cca do 14 dní od zamražení. Od každého druhu bylo odchyceno více jedinců, vzhledem k tomu, že množství jedu ve vácích je u různých jedinců variabilní. Pro izolaci peptidů bylo použito od každého druhu 1-8 vácíků: v závislosti na jejich plnosti a také podle jejich velikosti (podle druhu). Žlázy a vácíky od každého druhu byly umístěny zvlášť a uchovány ve 25 µl fixačního roztoku – směsi acetonitrilu/vody 1:1 s 0,1% kyseliny trifluoroacetylové.

4.1.1 Přehled sledovaných druhů

Pro následnou izolaci peptidů byly použity extrahované jedové žlázy včetně váčků ze samic celkem 17 druhů rodu *Nomada* (Tabulka 2). Zastoupené druhy byly vybrány odhadem tak, aby reprezentovaly jak blízké příbuzné, tak evolučně vzdálenější druhy. Níže uvedení zástupci tak reprezentují všechny typové skupiny nomád, jak je rozlišuje (Macek et al., 2010), obývajících různé typy habitatů, parazitující na hostitelích rodu *Andrena*, *Mellita*, *Panurgus* a *Lassioglossum*.

	Druh (<i>Nomada</i>)	vzhled	hostitel
1.	<i>ruficornis</i>		<i>A. haemorrhoea</i>
2.	<i>flavopicta</i>		<i>Mellita leporina</i> , <i>M. haemorrhoidalis</i> , <i>M. tricolor</i>
3.	<i>fuscicornis</i>		<i>Panurgus calcaratus</i>
4.	<i>sheppardana</i>		<i>Lassioglossum nitidiusculum</i> , <i>L. sexstrigatum</i>
5.	<i>flavoguttata</i>		<i>Aminutula</i> , <i>A. minutuloides</i> , <i>A. subopaca</i> , <i>A. semilaevis</i> , <i>A. falsifica</i>

6.	<i>flava</i>		<i>A. nitida</i> , <i>A. carantonica</i> , <i>A. fulva</i> , <i>A. nigroaenea</i>
7.	<i>leucothalma</i>		<i>A. clarkella</i> , <i>A. nycthemera</i> , <i>A. apicata</i>
8.	<i>panzeri</i>		<i>A. varians</i> , <i>A. helvola</i> , <i>A. lapponica</i> , <i>A. fucata</i> , <i>A. synadelpha</i>
9.	<i>signata</i>		<i>A. fulva</i>
10.	<i>fulvicornis</i>		<i>A. tibialis</i> , <i>A. pilipes</i> , <i>A. bimaculata</i> , (<i>A. agilissima</i> , <i>A. thoracica</i>)
11.	<i>striata</i>		<i>A. wilkella</i>

12.	<i>rufipes</i>		<i>A. fuscipes</i> , <i>A. denticulata</i> , <i>A. simillima</i>
13.	<i>lathburiana</i>		<i>A. vaga</i> , <i>A. cineraria</i> , <i>A. barbarea</i>
14.	<i>goodeniana</i>		<i>A. tibialis</i> , <i>A. nigroaenea</i> , <i>A. nitida</i> , <i>A. thoracica</i> , <i>A. cineraria</i>
15.	<i>succincta</i>		<i>A. nigroaenea</i> , <i>A. nitida</i> , (<i>A. curvungula</i> , <i>A. florea</i>)
16.	<i>bifasciata</i>		<i>A. gravida</i>
17.	<i>fucata</i>		<i>A. flavipes</i>

Tabulka 2: Sledované druhy nomád a jejich hostitelé. Zdroj: biolib.cz, Macek et al. (2010)

4.2 Metoda

4.2.1 Rozvržení prací

Získávání dat z peptidů probíhala ve spolupráci s pracovištěm ÚOCHB Akademie věd ČR pod vedením Václava Čeřovského, Ph.D. ze skupiny Antimikrobiální peptidy. Změření hmotnostních spekter peptidů provedla Lenka Monincová, Ph.D. z téže skupiny, sekvenaci edmanovou degradací provedl odborný pracovník ÚOCHB Zdeněk Voburka. Izolace DNA a analýza sekvencí probíhala na PŘF UK. Na zpracování dat se podíleli Mgr. Jana Habermannová a školitel Jakub Straka, Ph.D.

Metodika laboratorních postupů určování aktivity a sekvencí peptidů již byla optimalizována na pracovišti ÚOCHB během předchozích úspěšných studií – použili jsme tedy následující, již osvědčené postupy a protokoly.

4.2.2 Kapalinová chromatografie (HPLC)

Extrahované jedové vāčky a žlázy ve fixačním roztoku byly podrceny kovovou tyčinkou, promíchané vzorky byly centrifugovány, poté byl supernatant rozdělen metodou kapalinové chromatografie (HPLC Agilent Technologies 1200 Series, Vydac C-18) na frakce jednotlivých látek. Byl použit lineární gradient od 100 % směsi A (5 % ACN/H₂O s 0,1 % TFA) do 100 % směsi B (70 % ACN/H₂O s 0,1 % TFA). Promývací roztok byl monitorován na absorpci světla o vlnových délkách 220, 254 a 280 nm. Z vybraných frakcí naměřenými pro vlnovou délku 220 nm byl odpařen promývací roztok a tyto frakce peptidů byly po rozpuštění v HPLC destilované vodě testovány na antimikrobiální aktivitu.

4.2.3 Testování antimikrobiální (antibakteriální) aktivity

Antimikrobiální aktivita byla testována orientačně vůči jednomu druhu grampozitivní bakterie. Pro zevrubnější poznání by bylo nutné testovat také aktivitu vůči gramnegativním bakteriím a eukaryotním organismům.

Pro každý druh včely byla připravena jedna Petriho miska (Ø=90 mm) s 20 ml standardního LB agarového média. Na povrch každé misky byly nanесeny 2ml kultury bakterií *Micrococcus luteus* (10⁷ CFU) z České sbírky mikroorganismů v Brně. *Micrococcus luteus* je grampozitivní nesporulující obligátně aerobní bakterie z kmene Actinobacteria. Je nepohyblivá, tvoří tetrády koků. Přírodně se nachází v půdě, prachu, vzduchu, vodě i na kůži savců.

Frakce rozpuštěných peptidů z kapalinové chromatografie byly zcentrifugovány, rozpouštědlo odpařeno a rotačním vakuovým koncentrátorem (Speed-Vac, Labconco, USA) a jednotlivé peptidy rozpuštěny ve 20 μl HPLC destilované H₂O. 10 μl roztoku z každého izolovaného peptidu bylo nanесeno na misku v jedné kapce. Vzorky byly inkubovány při 37°C po dobu 24 hodin, na

konci níž byla stanovena antibakteriální aktivita na základě přítomnosti inhibiční zóny v místě nanesené kapky (*Příloha 2*).

Antibakteriální aktivita je u izolovaných peptidů uváděna ve třech kategoriích: neaktivní (inhibiční zóna nebyla v testu přítomna), částečná (inhibiční zóna menší, s rozmlženými okraji) a aktivní (inhibiční zóna poměrně velká, s jasně ohraničenými okraji). Zbytek rozpuštěného peptidu byl znovu centrifugován a odpařen a použit pro určení hmotnostního spektra a sekvenování.

4.2.4 Hmotnostní spektrometrie

Nejdříve byla získána hmotnostní spektra jednotlivých peptidů z analýzy Micromass Q-Toff micro hmotnostním spektrometrem. Vzorky byly rozpuštěny v 20 μ l mobilní fáze (acetonitril/voda/0,1% kyselina mravenčí) a vstříknuty skrze 2 μ l smyčku a následně pozitivně ionizovány. Přesné hmotnosti byly změřeny LTQ Orbitrap XL hybridním hmotnostním spektrometrem (Kawakami et al., 2017; Monincová et al., 2014).

4.2.5 Edmanova degradace

Konkrétní aminokyseliny peptidové sekvence byly následně analyzovány Edmanovou degradací na sekvenátoru proteinů Procise 491. Pro aminokyselinové složení jednotlivých peptidů, které bylo zjištěno sekvenací byla následně spočtena molekulová hmotnost pomocí online kalkulátoru www.pepcalc.com. Porovnáním teoreticky vypočtené hmotnosti na základě sekvence a výsledku z hmotnostního spektrometru byla ověřena správná sekvenace. Vzhledem k omezeným možnostem sekvenace umožnilo toto srovnání dopočíst či ověřit špatně osekvenovanou aminokyselinu a zajistit tak kompletní sekvenci. U několika peptidů se vyskytují rozdíly v těchto dvou hmotnostech z důvodu degradace SH-můstek v cysteinech. Do celkové analýzy jsou zařazeny pouze kompletně osekvenované peptidy, ostatní, u kterých je možné přibližně odhadnout přiřazení k určitému typu, jsou uvedeny v *Příloze 3* jako nekompletní.

4.3 Analýza molekulárních dat

4.3.1 Rekonstrukce fylogeneze

Fylogenetický strom byl zrekonstruován pro 17 druhů rodu *Nomada*. V celkové analýze byly použity na základě předchozí zkušenosti DNA sekvence z 5 jaderných genů: (EF1, 28S, Nak, Pol II, WG) a jednoho mitochondriálního gen (COI). Jako outgroup byly použity rody *Ammobates*, *Hexepeolus*, *Ammobatoides*, *Epeolus* a *Biastes*. Sekvenční data byla po manuální editaci alignována v programu Geneious R9 (Kearse et al., 2012) modelem Geneious alignment.

4.3.2 Výpočet fylogenetického stromu

Nejpravděpodobnější fylogenetická topologie byla spočtena bayesovskými metodami ve dvou programech: MrBayes a BEAST.

4.3.2.1 Výběr modelu evoluce sekvencí

Pro výpočet nejlepších modelů evoluce byl použit program PartitionFinder 2 (PF2) (Lanfear, Frandsen, Wright, Senfeld, & Calcott, 2016). Alignmenty byly v PF2 rozděleny podle rychlosti evoluce pomocí algoritmu k-means (Frandsen, Calcott, Mayer, & Lanfear, 2015) na 14 částí. Všechny alignmenty byly testovány metodou Maximum likelihood v programu PhyML 3.0 (Guindon et al., 2010). Rozdělení na části a navržené modely jsou uvedeny v *Příloze 4*. Pro výpočet modelů pro bayesovské analýzy (BA) bylo nastavení následující: branchlengths = linked; models = mrbayes/Beast; model_selection = aicc; search = greedy.

4.3.2.2 Bayesovská analýza v MrBayes

Základní bayesovská analýza byla provedena v programu MrBayes (Ronquist et al., 2012). Výpočty proběhly ve dvou oddělených řetězcích, jejichž modely byly nastaveny podle PF 2 a odděleny (příkaz unlink). Počet generací Markov chain Monte Carlo (MCMC) byl nastaven na 60 milionů. Ukládán byl vždy každý šestitisíc strom. Pro výpočet konsenzuálního stromu byly odstraněny počáteční neustálené stormy (burn-in = 10%).

Pro kontrolu konvergence výsledných řetězců byl použit program Tracer 1.6 (Rambaut, Suchard, Xie, & Drummond, 2014).

4.3.2.3 Bayesovská analýza fylogeneze a molekulární datování v BEAST

Sestavení fylogeneze a molekulární datování bylo provedeno v programu BEAST 1.8.3 (Drummond, Suchard, Xie, & Rambaut, 2012). Nejprve bylo připraveno nastavení a vstupní soubor do BEAST pomocí grafického rozhraní BEAUti (Drummond et al., 2012). Model byl nastaven opět na základě výstupu z PF2 (*Příloha 5*).

Stáří rodu *Nomada* bylo nastaveno na 65 Mya a stáří kořene (podčeleď Nomadinae) na 91,7 podle (Cardinal et al., 2010). Molekulární hodiny byly nastaveny na relaxed a Yule process. Řetězení proběhlo nezávisle dvakrát ve 30 milionech generací, ukládán byl každýtisíc strom. Oba výstupy byly porovnány v Tracer 1.6. Z obou souborů bylo odstraněno prvních 10% stromů (burn-in = 10%) a oba runy byly spojeny pomocí LogCombiner (BEAST). Finální strom byl vytvořen v TreeAnnotator (BEAST).

4.3.3 Rekonstrukce ancestrálních stavů

Na základě znalosti fylogeneze lze zpětně zmapovat, v jaké podobě se vyskytovaly sledované znaky u předků žijících druhů. Analýza metodou ML či bayesovskými metodami vyhodnotí, s jakou konkrétní pravděpodobností se v určitém nodu vyskytovala daná forma znaku. V našem případě byla rekonstruována evoluce peptidových sekvencí skupiny 1 (melittinového typu) – každá pozice, odpovídající jedné aminokyselině v peptidu, byla mapována zvlášť.

Vzhledem k tomu, že se jednalo o poměrně krátké sekvence (méně než 20 AMK) se nezanedbatelným množstvím inzercí a delecí a k tomu, zjevně neexistují spolehlivé modely pro takováto proteinová data v žádném z běžných rekonstrukčních programů. Proto jsme zvolili kombinaci namapování substitučních změn a inzerčně delečních změn odděleně. Historie substitučních změn byla zrekonstruována v programu BEAST bayesovskou metodou. Jelikož tento program umožňuje mapování proteinových sekvencí a má pro ně dostupný model, byly spočteny rovnou celkově nejpravděpodobnější sekvence pro všechny sledované ancestrální stavy. Ancestrální stavy kategoričtých znaků inzerčně delečních změn byly spočteny metodou ML v programu Mesquite.

Jelikož výstupní topologie stromu z programu MrBayes i BEAST se shodovala, byla použita i pro následné rekonstrukce substitučních a inzerčně-delečních změn.

Pro lepší orientaci byl všem větvením fylogenetického stromu přidělen kód NX (X=1, 17). (Obrázek 5).

4.3.3.1 Rekonstrukce substitučních změn v BEAST

Veškerá genetická informace kódující proteiny byla přeložena do aminokyselin a spojena do jednoho datasetu s příslušným peptidem odpovídající druhu. Pro jaderné geny byl použit model WAG (Whelan & Goldman, 2001), pro mitochondriální gen COI model mtREV (Adachi & Hasegawa, 1996). Molekulární hodiny byly nastaveny na uniform a použita topologie z předchozích výsledků (MrBayes+BEAST), která byla pro jednotlivé větve uzamčena. Následně bylo nastavena ancestrální rekonstrukce pro všechny nody pro sekvenci peptidu.

Řetězení proběhlo opět nezávisle dvakrát ve 30 milionech generací, ukládán byl každý tisící strom. Oba výstupy byly porovnány v Tracer 1.6. a proveden burn-in 10%. Oba runy byly spojeny pomocí LogCombiner (BEAST) a finální strom vytvořen v TreeAnnotator (BEAST).

4.3.3.2 Rekonstrukce inzerčně-delečních změn v Mesquite

Změny v inzercích a delecích peptidových sekvencí byly následně namapovány v programu Mesquite 3.2 (Maddison & Maddison, 2017) metodou maximální věrohodnosti (ML) pomocí přednastaveného modelu Mk1 (Markov kstate 1 parameter model). Pro rekonstrukci byl použit výstupní strom z fylogenetické analýzy v BEASTu. Namapovány byly inserce/delece jedné aminokyseliny na pozicích 1, 2 a 20. Delece na pozici 16-20 (*N. ruficornis*, *N. striata*, *N. panzeri*) byla mapována jako celý motiv, stejně také delece na pozici 12-20 a následná inserce na pozici 12-15 (*N. ruficornis*, *N. striata*).

4.3.4 Vizualizace a úprava fylogenetických dat

Vizualizace a částečná úprava výstupů z Bayesovské a ML analýzy byla provedena v programu Figtree (Rambaut, A., 2016). Výsledná grafická vizualizace byla provedena pomocí vektorového programu CorelDRAW 2017.

4.3.5 Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena v programu R (R Core Team, 2014).

4.3.5.1 Výpočet rychlostí změn

Rychlost změn v sekvencích se odehrává dvěma způsoby: substitučními záměnami a inzerčně-delečními změnami. Optimální způsob výpočtu celkové rychlosti změn by vycházel ze „substituční“ rychlosti a „inzerčně-deleční“ rychlosti. Sekvence krátkých peptidů však pro takový výpočet představují nedostatečně robustní soubor dat. Aby bylo možné alespoň základně kvantifikovat počet změn mezi jednotlivými sekvencemi, byla vypočtena pouze rychlost substitučních změn na alignmentu všech homologických peptidů skupiny 1 podle vzorce:

$$R = \frac{\text{hammingova vzdálenost ancestrální a odvozené sekvence} / \text{počet porovnávaných AMK}}{\text{čas}}$$

Výsledná rychlost tedy vyjde v jednotkách:

$$\left[\frac{\text{počet změn na jednu pozici}}{1\,000\,000 \text{ let}} \right]$$

Nebo případně převedena na:

$$\left[\frac{\text{počet změn na jednu pozici}}{\text{rok}} \right]$$

4.3.5.2 Srovnání rychlostí změn v rámci skupin

Měřené úseky fylogenetického stromu byly rozděleny do ancestrálních skupin N3 – N10; N12; N14, N15 nazvaných podle nodů, od kterých byla rychlost měřena vždy ke všem koncům větví reprezentujících současné druhy. Další dvě skupiny vznikly z úseků mezi každými dvěma sousedícími nody (skupina Nody) a z úseků mezi současným druhem rodu *Nomada* a jejich posledním větvením (skupina Nomady). Byly tak vytvořeny soubory dat, v rámci nichž mohly být porovnávány rychlosti na podobně dlouhém časovém úseku. Přehled úseků zahrnutých do výpočtu znázorňuje *Příloha 6*.

V jednotlivých skupinách byly porovnány rychlosti evoluce na jednotlivých úsecích. Výrazné odchylky v rychlostech byly spočteny jako tzv. odlehlé hodnoty, které mohou poukazovat na hodnoty, které se vymykají očekávanému rozložení. Za odlehlé hodnoty se v praxi považují hodnoty, které překročí absolutní vzdálenost od průměru o $3 \cdot sd$; v tomto případě¹ bylo použito mírnější kritérium $2 \cdot sd$, které může ve výsledcích zvýraznit i méně statisticky významné trendy.

4.3.5.3 Určení závislosti množství změn na jednu pozici a na délce úseku

K ověření hypotézy, že na kratších úsecích fylogeneze jsme schopni zachytit více změn (a rychlosti vývoje se tak jeví vyšší) byla provedena analýza závislosti nenulové rychlosti sekvenčních změn na délce úseku. (Nulová rychlost se vyskytla ve 14 případech). Vzhledem k tomu, že tato data nemají normální rozložení, byl použit zobecněný lineární model typu Gama, který optimalizuje výpočet pro spojitě rozdělení bez záporných a nulových hodnot. Pro určení závislosti rychlosti na délce úseku jsme použili pouze poměr počtu substitučních změn na počet bazí.

4.3.5.4 Návrh srovnání rychlosti evoluce peptidů s dalšími druhy včel z čeledi Apidae

Srovnání rychlosti evoluce peptidu nomád a vzdáleněji příbuzných druhů včel bylo provedeno u těchto druhů: *Melecta albifrons* (Apinae), *Apis mellifera* (Apinae), *Xylocopa appendiculata* (Xylocopinae), *Osmia rufa* (Megachilidae), *Ceratina cucurbitina* (Xylocopinae).

Pro srovnání rychlosti evoluce peptidových sekvencí s dalšími druhy včel byl spočten koeficient (k), porovnávající *předpokládanou rychlost evoluce* (průměr ze skutečných rychlostí evoluce mezi nejmladším a nejstarším druhem nomády a jejich společným předkem) na daném úseku se *skutečnou rychlostí evoluce* (rozdíl mezi sekvencemi dvou druhů/dvojnásobek doby od vzniku jejich společného předka.) Jako předpokládaná rychlost evoluce byla použita rychlost mezi bazální linií a nejodvozenějším druhem nomády, tedy mezi *N.leucothalma* a *N. rufipes*.

¹ Pro kritérium $3 \cdot sd$ vychází jako odlehlá hodnota pouze rychlost v úseku N3-*Nomada flavopicta*.

Rychlost evoluce pak byla vždy spočítána na úseku mezi *N. leucothalma* a sledovaným druhem, například pro *A. mellifera* takto:

$$k = \frac{[(\text{rychlost na úseku } N. leucothalma: N3) + (\text{rychlost na úseku } N. rufipes: N3)]/2}{\text{rozíl mezi sekvencemi } A. mellifera \text{ a } N. leucothalma / \text{počet srovnávaných pozic} \times 2 \text{ stáří společného předka}}$$

Tento koeficient byl spočten jak pro substituční, tak pro inserčně-deleční rychlost. Průměr těchto dvou koeficientů umožňuje velmi přibližně porovnat celkovou míru evoluční proměnlivosti peptidu v čase u vzdálenějších druhů. Odchytky jednoho typu vývoje jsou vyváženy tím druhým. Pokud se peptid hodně změní insercemi a delecemi, je obvykle ve zbylých homologických aminokyselinách konzervativní a naopak, pokud je málo insercí a delecí jeví se homologické aminokyseliny více variabilní, protože neznáme sekvenci předka obou linií. K výpočtu bylo použito datování společných předků na základě publikovaných dat (Branstetter et al., 2017; Cardinal et al., 2010).

5 Výsledky

5.1 Peptidy

5.1.1 Charakteristika izolovaných peptidů

Z jedu včel rodu *Nomada* bylo izolováno a kompletně osekvenováno 30 peptidů o délce 10–22 AMK. Většinu modifikací peptidových c-konců tvoří NH₂ skupiny (monoamid), jeden ze sekvenovaných peptidů (RP 16; *N. rufipes*, *Příloha 3*) má na c-konci pouze kyselou skupinu COOH.

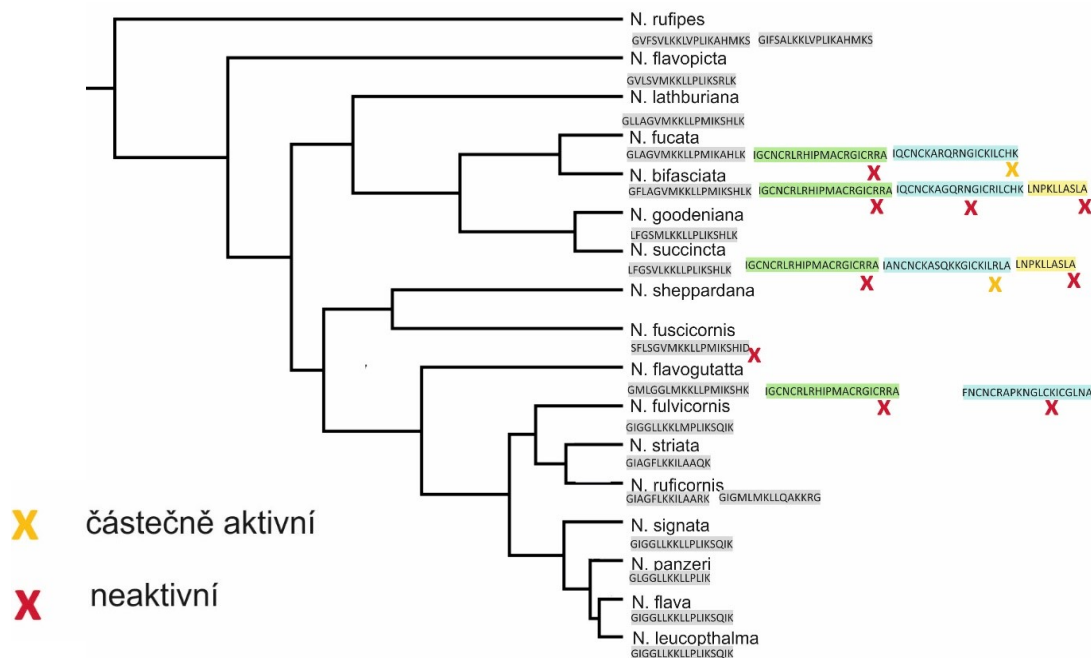
Tyto peptidy pochází celkem z 16 druhů: u 2 druhů byly identifikovány peptidy dva, u 2 druhů 3, u 2 druhů 4. U zbylých 10 druhů byl identifikován pouze jediný peptid (*Obrázek 1*).

Peptidy byly na základě podobnosti rozděleny do skupin 1, 2a, 2b, 3. Pátou skupinu (2c) tvoří pouze nekompletně osekvenované peptidy (pro přehled *Příloha 2*). Skupiny považujeme za evolučně homologické, případně paralogické, pokud mají více variant.

Skupinu 1 (šedé podbarvení) tvoří peptidy nápadně podobné mellitinu včely medonosné. Již v další literatuře je upozorňováno na „mellitin-like“ peptidy kódované v genomech blízkých příbuzných včely medonosné (rod *Apis*) (Kreil, 1975). S největší pravděpodobností homologické peptidy nacházíme tedy i u dalších vývojových větví, včetně nomád. Skupinu 2a (zelené podbarvení) tvoří 4 sekvenčně identické peptidy druhů *N. fucata*, *N. bifasciata*, *N. succincta* a *N. flavoguttata*. U týchž druhů se vyskytují také 4 peptidy skupiny 2b (modré podbarvení). Jejich sekvence už jsou poměrně diverzifikované a vykazují homologii s MCD peptidem včely medonosné. Vzhledem k tomu, že se vyskytují u stejných druhů jako skupina 2a a obsahují stejné sekvenční motivy, můžeme usuzovat, že skupiny 2a a 2b vznikly pravděpodobně duplikací jednoho genu a rozdílnou evolucí jeho dvou produktů. Skupina 3 (žluté podbarvení)

čítá pouze dva identické peptidy izolované z *N. bifasciata* a *N. succincta*. S délkou 10 AMK se řadí k nejkratším peptidům izolovaným z jedu hmyzu.

Možnou homologii peptidů melittinového typu a MCD typu zobrazují alignmenty v Příloze 7.



Obrázek 1: Skupiny izolovaných peptidů. Skupina 1 (melittin-like) šedě, skupina 2a zeleně, skupina 2b modře, skupina 3 žlutě. Červená a žlutá X označují neaktivní, resp. částečně aktivní peptidy.

5.1.2 Antimikrobiální aktivita izolovaných peptidů

Celkem 8 ze 30 izolovaných peptidů antimikrobiální aktivitu vůči *Micrococcus luteus* nevykazuje vůbec, 2 peptidy vykazují aktivitu částečnou, zbývajících 20 peptidů má aktivitu normální.

Je tedy patrné, že u většiny sledovaných druhů je běžně přítomen alespoň jeden aktivní peptid. Výjimku tvoří sesterské druhy *N. fuscicornis* + *N. sheppardana*, u nichž nebyl nalezen žádný aktivní peptid. (Nekompletní sekvenace u *N. sheppardana* naznačuje přítomnost peptidu, nicméně ani ten v testování nevykázal aktivitu.) Zde je možné usuzovat na druhotnou ztrátu antimikrobiální aktivity v průběhu evoluce: u všech ostatních druhů je aktivita homologického peptidu skupiny 1 jednoznačná. U skupiny 2b už takový závěr vyvodit nemůžeme; posloupnost změn není ze zjištěných dat možné odhadnout.

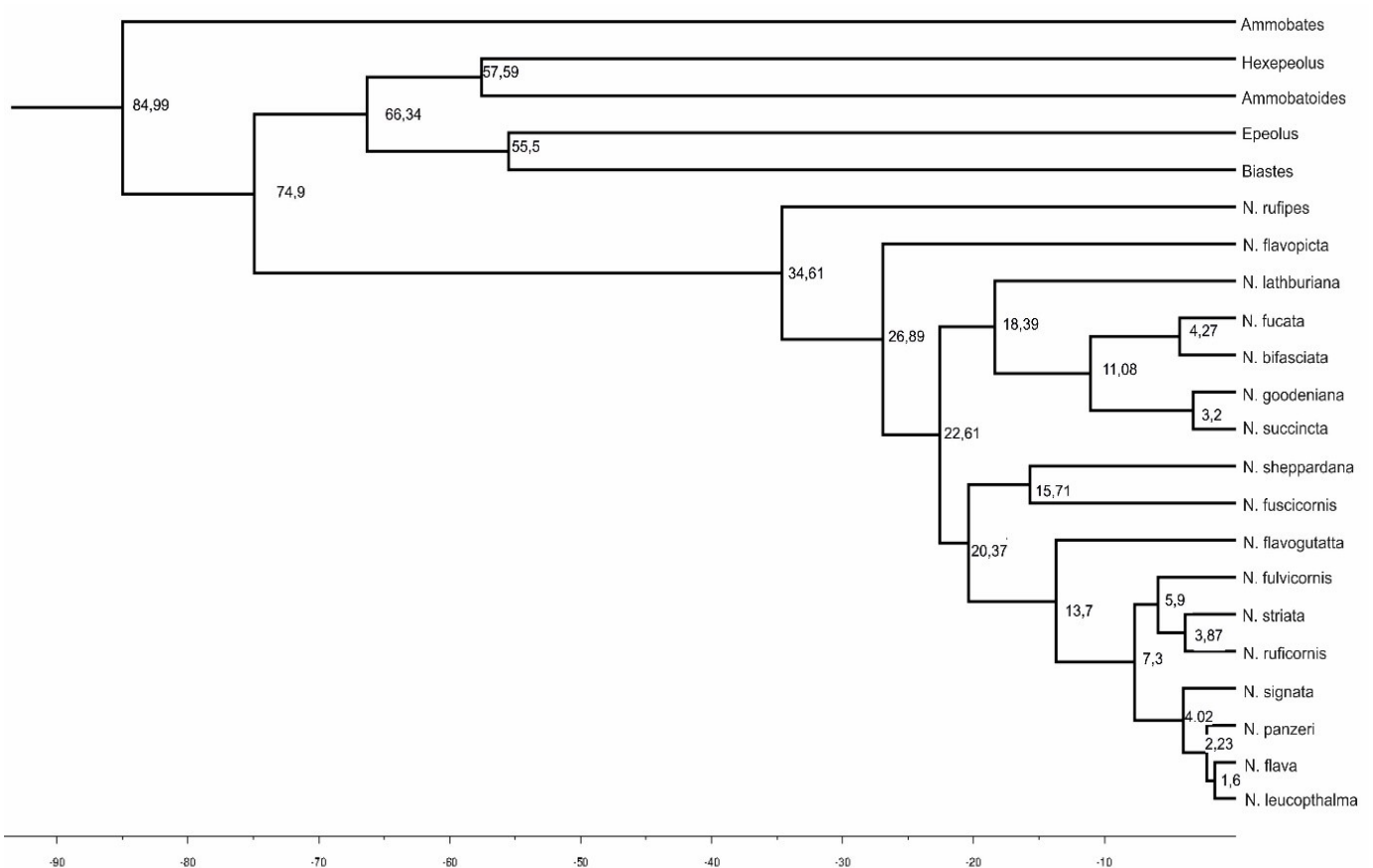
Zcela neaktivní peptidy najdeme ve skupině 2a a 3. Je známo, že v jedu se vyskytuje řada biologicky aktivních látek často s enzymatickou aktivitou a nejspíš mezi ně budou patřit i tyto peptidy. (Obrázek 1)

5.2 Fylogeneze a datování

Výstupy z MrBayes i BEAST potvrdily stejnou topologii evoluce. Posteriorní pravděpodobnosti jednotlivých větví jsou shrnuty v Příloze 8.

Molekulární datování (Cardinal et al., 2010) zasadilo vznik rodu *Nomada* do svrchní křídy. Z výsledků fylogenetické analýzy (Obrázek 2) je vidět, že následné období nejvyšší radiace rod pokrývá prakticky celý neogén, ale začíná již ve svrchním eocénu.

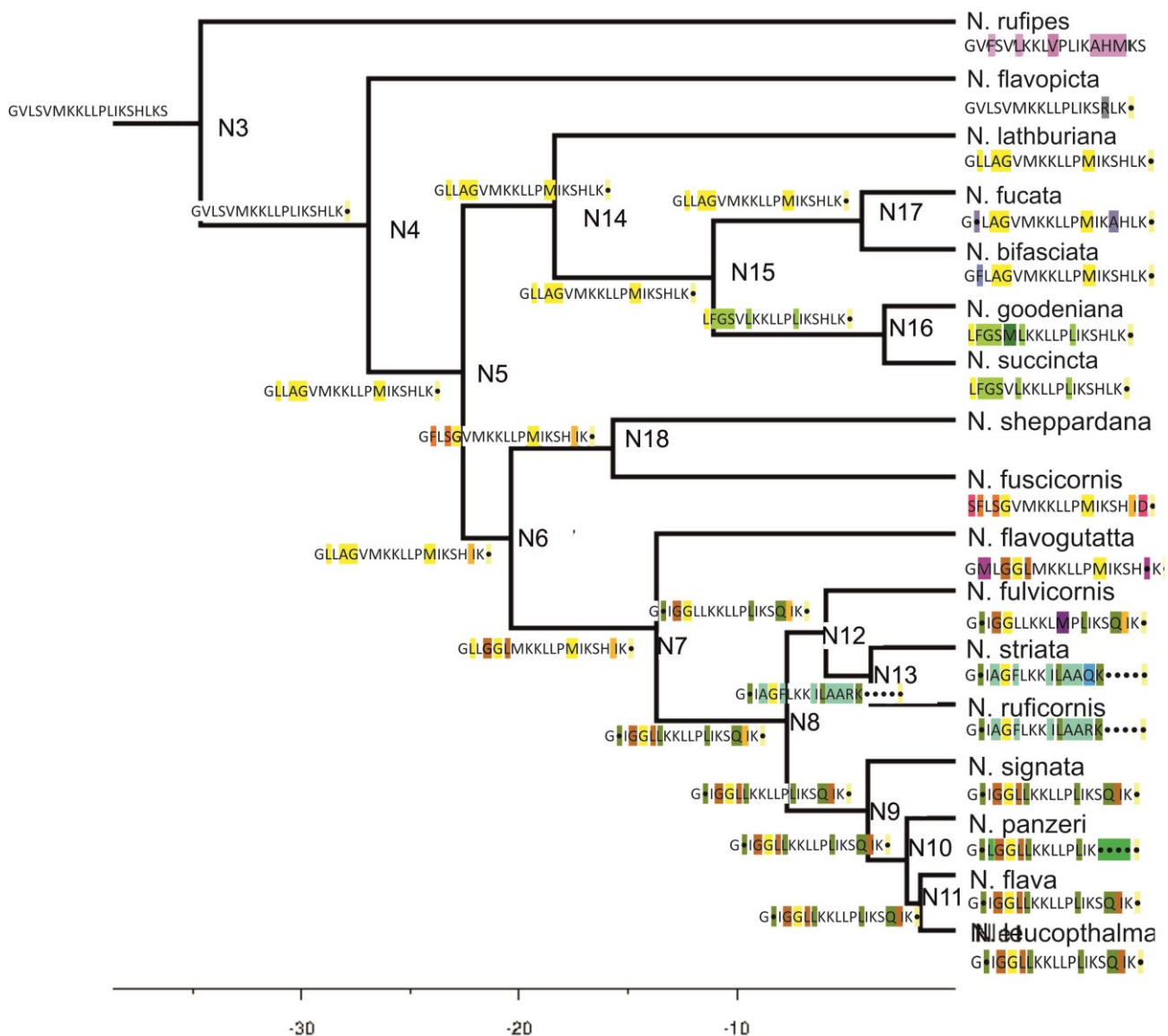
Ačkoli do uvedené analýzy bylo zahrnuto jen omezené množství druhů a pro podrobnější zmapování by bylo třeba jejich počet navýšit, uvedená topologie naznačuje základní rozdělení skupin v rámci tohoto tribu.



Obrázek 2: Evoluce tribu Nomadini. Časová osa označuje dobu v milionech let směrem do minulosti, údaje v jednotlivých větvích označují stáří nodu.

5.3 Rekonstrukce ancestrálních stavů sekvencí peptidu melittinového typu u nomád

Rekonstrukce ancestrálních stavů peptidových sekvencí metodou ML byla provedena pro skupinu 1 (melittinového typu) (Obrázek 3). Je patrné, že v průběhu evoluce nomád došlo k množství substitučních změn. Tedy například všechny tmavě žlutě značené substituce vznikly už u společného předka v nodu N5. Dochází také k několika případům delecí: u předka N4 v S na poslední pozici, u předka N16 na 1. pozici, u předka N8 na 2. pozici, u předka N13 na pozicích 12 – 19 a u *N. panzeri* na pozicích 16-19. Nejméně četným typem změn jsou inserce, došlo k nim však zřejmě pouze v jednom případě: jedná se o inserci motivu AARK následující po deleci koncového motivu PLIKSQUIK v nodu N13.



Obrázek 3: Rekonstrukce ancestrálních sekvencí peptidů melittinového typu. Čteme-li strom po nodech vzestupně, přibývající barvy označují přibývající změny v po sobě následujících krocích. Barevně jsou znázorněny substituční změny v jednotlivých krocích, tečky představují delecí změny. Inzerční změny nejsou graficky odlišeny.

Posteriorní pravděpodobnosti ancestrální sekvence peptidu v jednotlivých nodech a posteriorní pravděpodobnosti pro pozice v jednotlivých nodech jsou uvedeny níže. (Tabulka 3)

nod	pozice 1	pst 0	pst 1	2	pst 0	pst 1	16 PLIKSQIK	pp 0	pp 1	16 AARK	pp 0	pp 1	20	pp 0	pp 1	pst sekvence
N3	1	0,01	1	0	0,89	0,11	1	0,01	0,99	0	0,99	0	1	0,49	0,51	0,9
N4	1	0,01	1	0	0,81	0,19	1	0,01	0,99	0	0,99	0	0	0,98	0,02	0,23
N5	1	0,01	1	1	0,23	0,77	1	0,01	0,99	0	0,99	0	0	1,00	0	0,3
N6	1	0,01	1	1	0,13	0,87	1	0,01	0,99	0	0,99	0	0	1,00	0	0,22
N7	1	0,01	1	1	0,21	0,79	1	0,01	0,99	0	0,99	0	0	1,00	0	0,42
N8	1	0,01	1	0	0,85	0,15	1	0,01	0,99	0	0,99	0	0	1,00	0	0,43
N9	1	0,01	1	0	0,97	0,03	1	0,01	0,99	0	0,99	0	0	1,00	0	0,44
N10	1	0,01	1	0	0,99	0,01	1	0,01	0,99	0	0,99	0	0	1,00	0	0,44
N11	1	0,01	1	0	0,99	0,01	1	0,01	0,99	0	0,99	0	0	1,00	0	0,44
N12	1	0,01	1	0	0,97	0,03	1	0,08	0,92	0	0,96	0	0	1,00	0	0,44
N13	1	0,01	1	0	0,99	0,01	0	0,93	0,07	0	0,03	1	0	1,00	0	0,26
N14	1	0,01	1	1	0,07	0,93	1	0,01	0,99	0	0,99	0	0	1,00	0	0,77
N15	1	0,01	1	1	0,06	0,94	1	0,01	0,99	0	0,99	0	0	1,00	0	0,77
N16	0	0,97	0	1	0,01	0,99	1	0,01	0,99	0	0,99	0	0	1,00	0	0,93
N17	1	0,89	0,1	1	0,19	0,81	1	0,01	0,99	0	0,99	0	0	1,00	0	0,6

Tabulka 3: Posteriorní pravděpodobnosti delecí a insercí v pozicích 1,2, 16 a 20 pro jednotlivé nody. Poslední sloupec nese posteriorní pravděpodobnosti sekvence celého peptidu.

5.4 Srovnání rychlosti evoluce

5.4.1 Popisné charakteristiky rychlosti evoluce

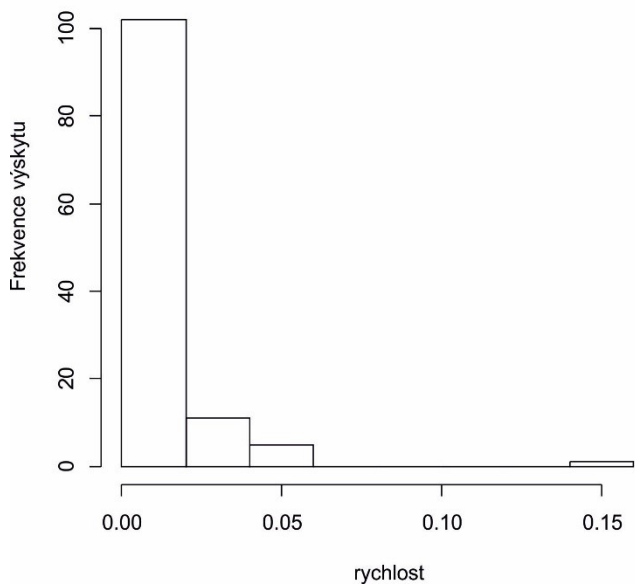
Průměrné rychlosti evoluce pro celý sledovaný úsek stromu byly spočteny z rychlostí na všech jednotlivých větvích (tedy od nodu k nodu či ke konci větve) a z rychlostí mezi každým nodem a konečnými sekvencemi, které se z něho vyvinuly (Příloha 9).

Popisné charakteristiky pro rychlost evoluce peptidu melittinového typu v rámci rodu *Nomada* shrnuje tabulka níže. (Tabulka 4) Směrodatná odchylka je v našem případě poměrně vysoká. Je to způsobeno přítomností většího množství nulových rychlostí. Gama rozložení dat je upraveno na normální rozložení logaritmováním proměnné rychlost (Obrázek 4).

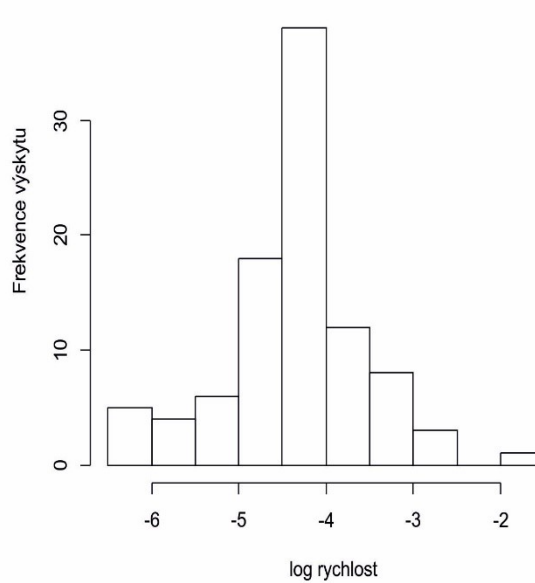
Charakteristiky rychlosti evoluce peptidových sekvencí rodu <i>Nomada</i>	[počet substitucí×pozice ⁻¹ ×rok ⁻¹]
Průměr	1.3628×10 ⁻⁸
Medián	1.1236×10 ⁻⁸
Směrodatná odchylka	1.6887×10 ⁻⁸

Tabulka 4: popisné charakteristiky rychlosti evoluce peptidu melittinového typu u nomád

Histogram rychlostí změn na jednotlivých úsecích



Histogram logaritmované rychlosti změn na jednotlivých úsecích



Obrázek 2: Rozložení hodnot rychlosti evoluce na jednotlivých úsecích.

5.4.2 Srovnání rychlostí evoluce sekvence v rámci rodu *Nomada*

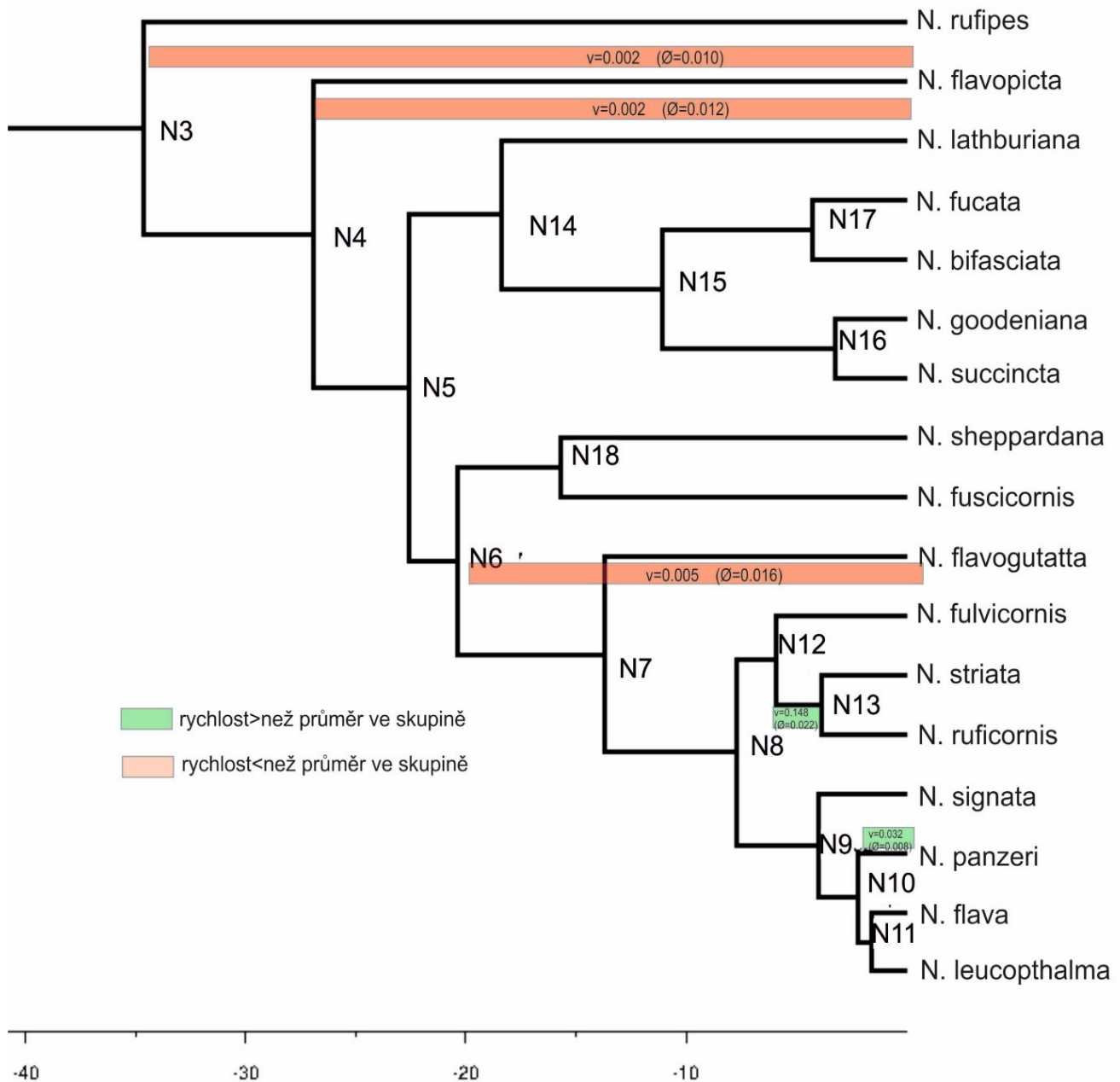
Byla spočtena rychlost evoluce pro melittin-like peptid skupiny 1.

Odlehle hodnoty v rámci jednotlivých skupin byly nalezeny hodnoty v 5 skupinách z celkových 14. Vyšší rychlost evoluce vykazovaly peptidy na úsecích *N. panzeri*_N10 a N12_13, pomalejší rychlost evoluce měly peptidy na úsecích *N. flavopicta*_N3, *N. flavopicta*_N4 a *N. flavogutatta*_N5. (Tabulka 5)

Skupina	Úsek s odlehlou hodnotou	Rychlost evoluce v úseku s odlehlou hodnotou (počet změn pozici za milion let)	Průměr rychlosti ve skupině (počet změn pozici za milion let)
Nomady	panzeri_N10	0,032	0,008
Nody	N12_N13	0,148	0,022
N3	flavopicta_N3	0,002	0,010
N4	flavopicta_N4	0,002	0,012
N5			
N6	flavogutatta_N6	0,005	0,016
N7			
N8			
N9			
N10			
N12			
N13			
N14			
N15			

Tabulka 5: odlehle hodnoty rychlosti evoluce peptide melittinového typu u Nomád v jednotlivých skupinách

V kontextu evolučního stromu je patrné, že vyšší rychlosti se vyskytují na kratších úsecích, nižší rychlosti na delších úsecích bez větvení. (Obrázek 5.)



Obrázek 3: Odlehle hodnoty rychlostí evoluce sekvencí peptidu melittinového typu u nomad.

5.4.2.1 Testování závislosti rychlosti evoluce peptidu na délce úseku

V souboru dat byla zobecněným lineárním modelem otestována závislost rychlosti změn na délce úseku, na kterém k těmto změnám došlo. Jak je patrné, závislost rychlosti evoluce na délce úseku vyšla signifikantní, se směrnicí přímkou $k=-0,11043$.

β -koeficient	p-hodnota
6.329e-01	1.14e-14

5.4.3 Srovnání rychlosti evoluce peptidů s dalšími druhy včel

Ty mohou vypovídat buď o pomalé, nebo konvergentní evoluci. Jednotlivé kroky výpočtu jsou dokumentovány v Příloze 10.

Porovnávané druhy	K1 (předpokládaná substituční rychlost×skutečná subst. rychlost ⁻¹)	K2 (předpokládaná indel rychlost×skutečná indel rychlost ⁻¹)
<i>N. rufipes</i> <i>N. leucothalma</i> ,	1,47	0,71
<i>Melecta albifrons</i> <i>N. leucothalma</i>	3,52	7,22
<i>Apis mellifera</i> <i>N. leucothalma</i>	10,10	2,08
<i>Xylocopa appendiculata</i> (Xac-1) <i>N. leucothalma</i>	5,77	4,42
<i>Osmia rufa</i> (Megachilidae)	3,55	5,12
<i>Ceraina cucurbitina</i>	4,56	3,02

Tabulka 6: Shrnutí hodnoty koeficientů změn pro oba typy rychlostí (substituce, indely). První dvojice je dvojicí kalibrační: rychlost skutečného vývoje obou větví od společného předka známe a nemusíme ji tedy odhadovat. Číslo koeficientu je u ostatních dvojic tím **nížší**, čím **větší** jsou rozdíly v jejich sekvencích.

6 Diskuze

6.1 Fylogeneze

Fylogenetická analýza zahrnuje pouze zlomek druhů z rodu *Nomada*, přináší však přesnější pohled na některé fylogenetické vztahy. Uvedená topologie naznačuje příbuznost nomád v několika skupinách:

- mezi bazální druhy se podle všeho řadí *N. rufipes*
- (*N. bifasciata*, *N. fucata*), + (*N. goodeniana*, *N. succincta*) tvoří sesterské skupiny, dohromady jim je patrně sesterský druh *N. lathburiana*. Ta je vzhledově podobná také nomádám ze skupiny *N. flava*, kam ji třeba (Macek et al., 2010) řadí, ale těm je evolučně vzdálenější.
- naopak do skupiny (*N. bifasciata*, *N. fucata*) + (*N. goodeniana*, *N. succincta*) nepatří *N. fulvicornis*, která je do ní řazena (Macek et al., 2010), bude spíše sesterská skupině (*N. striata* + *N. ruficornis*).

6.2 Charakter peptidů v jedu nomád

Získané výsledky ukazují, že v jedu nomád je přítomno více typů peptidů, které je možno rozdělit na základě zřetelné podobnosti sekvencí přinejmenším do 4 skupin. Skupiny 2a a 2b jsou si velmi podobné a patrně jde o peptidy vzniklé duplikací jednoho genu. Zajímavým zjištěním jsou pravděpodobné příbuznosti peptidů nomád s peptidy včely medonosné. Příbuznost je patrná u peptidů skupiny 2b s MCD peptidem a u peptidů skupiny 1 s melittinem, který je přítomný téměř u všech sledovaných druhů. Není zcela samozřejmé, že jsou antimikrobiální peptidy produktem samotné včely: původci těchto látek by mohly stejně dobře být i symbiotické organismy. Mezi mikroorganismy produkující antimikrobiální peptidy patří například některé druhy laktobacilů (Quadri, 2002), které jsou ale také součástí mikrobiomu včely medonosné a některých druhů čmeláků rodu *Bombus* (Engel, Martinson, & Moran, 2012). Pro peptid melittin včely medonosné (a jeho homology z dalších druhů rodu *Apis*) i pro MCD peptid byly však identifikované jaderné geny (*A. mellifera*: NCBI, ID 406130 (melittin), NM_001011611.2 (MCD peptid), www.ncbi.nlm.nih.gov), které je kódují. Můžeme tak předpokládat, že zdrojem peptidů melittinového typu a nejspíš i peptidů ostatních skupin budou, stejně jako v případě dalších komponent jedu, spíše sekreční buňky jedové žlázy a buňky žláznatého epitelu jedového váčku včely, než organismy symbiotické. Takový původ peptidů v jedu podporují i velmi sporadické nálezy mikroorganismů v jedových žlázách včel (Moreau, 2013).

Nepříliš často nacházíme u více druhů včel strukturně úplně identický peptid. V případě sledovaných druhů jsou např. u skupiny 1 (melittinový typ) shodné pouze peptidy evolučně mladých druhů *N. signata*, *N. flava*, *N. leucothalma*), u ostatních druhů jsou přítomné více či méně výrazné strukturní změny. Antimikrobiální funkce je však zachována (kromě

N. fuscicornis) u všech těchto peptidů, což zjevně odráží fakt, že pro antimikrobiální účinky peptidu je spíše než primární či sekundární struktura zásadní celková amfipaticita molekuly. Hydrofobní projekce (Příloha IIA) schematicky ilustrují míru amfipatického rozložení aminokyselin v helixu peptidu pro všechny tyto peptidy a narušení amfipaticity u peptidu *N. fuscicornis*. U MCD peptidu a jemu příbuzných peptidů ze skupiny 2b vykazují mírnou antimikrobiální aktivitu peptidy *N. fucata* a *N. succincta*. Rozdíl v amfipaticitě, tedy uspořádání hydrofilních AMK a hydrofobních AMK na opačných stranách helixu v kruhové projekci už zde potom není tak jednoznačný (Příloha IIB).

6.3 Rekonstrukce ancestrálních sekvencí pro peptid melittinového typu

Výsledky rekonstrukce ancestrálních sekvencí peptidu melittinového typu přináší v první řadě informaci, že evoluce sekvence se u nomád odehrává především substitučními mutacemi. Tyto mutace ve většině případů zjevně neovlivňují změny v antimikrobiální funkci peptidu. O antimikrobiální funkci máme k dispozici jen velmi základní informace. Je možné, že kdybychom testovali antimikrobiální aktivitu vůči dalším organismům než jenom G+ bakterii, rozdíl by se projevit mohly. Přesto však tento fakt naznačuje, že změny jsou projevem neutrální evoluce a hromadí se, aniž by výrazněji ovlivňovaly aktivitu peptidu.

Skokové změny, které v sekvencích peptidů vznikají, se pak odehrávají prostřednictvím delecí a insercí celých motivů, jak je vidět například u rodu *Apis* a druhů *Ceratina cucurbitina* nebo *Macropis fulvipes*. U nomád máme pouze dva příklady inzerčně-deleční změny celého motivu a v obou případech zůstává antimikrobiální aktivita nezměněna. Nemáme bohužel více příkladů neaktivních forem peptidů od dalších druhů a nemůžeme tak odhadnout, zda se v případě inzerčně-delečních změn jedná také o projevy neutrální evoluce. Zatím však příklady neaktivních, či částečně aktivních peptidů nomád ukazují, že pro změny v amfipaticitě peptidu (podstatném faktoru pro antimikrobiální aktivitu) stačí i velmi malé rozdíly (např. substituční záměny pouze ve dvou AMK u peptidu MCD-typu *N. fucata* a *N. bifasciata*, Příloha I3B).

6.4 Srovnání rychlosti evoluce

6.4.1 Srovnání rychlostí evoluce peptidu melittinového typu v rámci rodu *Nomada*

Záměrem srovnání rychlostí bylo zjistit, zda se peptid v některé evoluční větvi vyvíjel signifikantně rychleji než na jiných srovnatelných úsecích stromu. V takovém případě by extrémní hodnota rychlosti evoluce mohla svědčit o působícím selekčním tlaku. Tím by mohly být například jiné podmínky v místě výskytu druhu, jiný hostitel, specializace na jiný druh potravy nebo jakýkoli další faktor, který ovlivňuje míru a zastoupení mikroorganismů, se kterými se druh běžně setkává. Následně by bylo možné pokusit se zdroj tlaku identifikovat.

Jedním z možných srovnání rychlosti evoluce je porovnání substituční rychlosti – tedy počtu substitucí na jednu pozici za určené časové období. Pro srovnání rychlosti evoluce peptidů

v rámci rodu *Nomada* udáváme počet substitucí na jednu pozici za rok. Ten je pro peptid melitinového typu v rodu *Nomada* roven $1,3628 \times 10^{-8}$. Toto číslo je kvůli vysoké směrodatné odchylce průměru třeba brát se značnou rezervou, avšak přibližně odpovídá očekávání – u hominidů je průměrná substituční rychlost v proteinech $0,118 \times 10^{-8}$ (F.-C. Chen & Li, 2001), tedy o řád nižší. Rychlost evoluce vztažená k času (a nikoli třeba na jednu generaci) se však odvíjí od generační doby, která je u nomád řádově kratší, jednak je evoluce imunitních genů z principu rychlejší, ještě výrazněji pak právě u genů antimikrobiálních peptidů (Erler, Lhomme, Rasmont, & Lattorff, 2014).

Ze všech čtrnácti sledovaných skupin zahrnovalo odlehlé hodnoty 5 skupin a v každé z nich se vyskytovala právě jedna taková hodnota (Obrázek 5). Opravdu poměrně vysoká je rychlost evoluce mezi nody N12 a N13, o něco nižší pak mezi nodem N10 a sekvencí *N. panzeri*. V obou těchto případech se však jedná o místo s uvedenou delecí, případně rovnou inzercí celého motivu o několika aminokyselinách. Samotné delece nejsou do výpočtu rychlosti započteny, ale v takto krátkých sekvencích se jimi značně zkracuje délka sekvence, na které je možné srovnání substitučních změn provést, což výpočet zkresluje směrem k vyšší rychlosti. Pro relativně pomalejší rychlosti evoluce na úsecích mezi N3_ *N. flavopicta*, N4_ *N. flavopicta* a N6_ *N. flavogutatta* by se snad dalo hledat i evoluční vysvětlení. Vzhledem k tomu, že kritérium pro určení hodnot muselo být sníženo (ze vzdálenosti od průměru o 3*sd na 2*sd), vypadají tyto výsledky spíše než jako ukazatele selekčního tlaku jako artefakt výpočtu: na úsecích, které jsou zdánlivě bez větvení existuje reálně méně informací o změnách, které na nich proběhly, než na úsecích s větvením, ačkoli samozřejmě existují, ale my dané taxony nemáme k dispozici. Je zajímavé, že rychlost evoluce peptidu je spíše málo rozkolísaná. Výsledky vypovídají o tom, že peptidy u různých druhů nomád nepodléhaly v evoluci zásadně odlišným selekčním tlakům. Peptidy nejspíš účinkují stejně na širokou škálu mikroorganismů, včetně patogenních. AMP jedového včáku je spíše preventivním dezinfekčním prostředkem a nemá cílenou funkci. Takové zjištění je v souladu se závěry studie (Erler et al., 2014), která se zabývá evolucí genů kódujících antimikrobiální peptidy čmeláků. Zde se sice jednalo o druhy sociální, ale nomádám příbuzné. Srovnáváním poměru všech mutací k mutacím neutrálním (evolution rate) dochází k závěru, že těchto imunitních genů působí výrazně více negativní selekce než pozitivní. Selekční tlaky tedy nepůsobí selektivně na produkci specifického antimikrobiálního peptidu vůči konkrétním patogenům, ale pravděpodobně spíše na efektivitu, množství účinné látky, či rychlost použití (Erler et al., 2014).

V souboru dat byla také testována závislost průměrného množství změn v jedné pozici na délce sledovaného úseku fylogenetického stromu. Závislost byla prokázána na hladině významnosti $< 0,001$. Jedná se o závislost mírně negativní (se sklonem přímky $k = -0,11043$), která potvrzuje obecně známý trend, kdy jsou naměřeny rychlejší změny na kratších úsecích. Na delších úsecích řadu probíhajících změn vůbec nezachytíme.

6.4.2 Srovnání rychlostí změn peptidových sekvencí s dalšími zástupci včel

Díky tomu, že nejčastěji zastoupený peptid v jedu nomád je právě peptid melittinového typu, který byl popsán u několika dalších druhů včel, můžeme porovnat, jak moc velké rozdíly ve struktuře tyto jeho jednotlivé podoby v průběhu evoluce zaznamenaly. Uvedený výpočet, který srovnává poměr hypotetické a reálné rychlosti změn na úseku je spíše návrhem toho, jakým směrem by se taková srovnání mohla ubírat. Je totiž zřejmé, že ani popis substituční, ani deleční rychlosti sám o sobě nestačí. Nebereme-li v potaz delece a inserce, působí peptid *A. mellifera* a peptidu nomád jen velmi málo odlišně, a přitom jsou v něm dvě velké inserce. Pokud naopak nezapočteme substituční změny, působí oba tyto peptidy naopak jako poměrně odlišné látky. Aritmetickým průměrem koeficientu substituční rychlosti a koeficientu inserčně deleční rychlosti už získáme porovnatelnější čísla. Ačkoli se vztahují ke skutečnosti jen přibližně do jisté míry znázorňují četnost změn v průběhu evoluce sekvencí u vzdálenějších druhů. Vysoký koeficient tedy vypovídá o větší podobnosti peptidových sekvencí dvou druhů.

Relativně nízký koeficient substituční rychlosti u *Melecta albifrons*, která je z uvedených druhů nomádám nejbliže příbuzná (patří do stejného kleptoparazitického kladu), znamená větší míru substitučních změn. Je pravděpodobné, že se jedná, podobně jako v rámci nomád, o změny nahromaděné neutrální evolucí. Podobně nízký koeficient substituční rychlosti má také *Osmia rufa*, která je však nomádám ze všech srovnávaných druhů evolučně nejvzdálenější. *Apis mellifera* zde můžeme brát jako relativně reprezentativního zástupce dalších druhů rodu *Apis*, jejich melittinové peptidy vykazují velkou míru podobnosti. Nízký koeficient inserčně-deleční rychlosti *A. mellifera* může vypovídat o tom, že se evoluce těchto peptidů u některých větví včel ubírala spíše mechanismem inserčně-delečních změn. Nízký koeficient inserčně-deleční rychlosti nacházíme rovněž u *X. appendiculata* velkou míru inserčně-delečních změn pak také u druhu *Ceratina cucurbitina*. Oba tyto druhy evolučně patří do stejné podčeledi jako *A. mellifera* (Cardinal et al., 2010) a oba zároveň vykazují určité rysy sociálního chování. Jak je již zmíněno v kapitole 6.3, zda opravdu existuje spojitost mezi evolucí mechanismem inserčně-delečních změn a sociálním chováním či nekleptoparazitickou větví Apinae, je spíše otázka. Na vyvozování jakýchkoli závěrů tato data zdaleka nedostačují, bylo by potřeba srovnat sekvence více druhů ze vzdálenějších větví včel a různých životních strategií.

6.5 Použití metod a jejich limity

Vyjma fylogenetických programů vycházejí statistické výpočty v této práci z poměrně malého souboru dat, daného omezeným počtem sekvenovaných peptidů a krátkou délkou jejich sekvencí. Statistická analýza dat je pak spíše než spolehlivou metodou pokus o nalezení vůbec nějaké metody a naznačením směru, kudy se může analýza evoluce peptidů v obecné rovině ubírat. Data však byla primárně shromážděna k rekonstrukční analýze ancestrálních stavů, která tvoří těžiště práce. I u té je však jistá míra nepřesnosti způsobena limity dostupných

programů. Kombinace metody ML a použitelného modelu pro evoluci proteinů je k dispozici v programu BEAST, v případě krátkých sekvencí však problém představuje mapování inzerčně-delečních změn.

7 Závěr

Byly popsány 4 skupiny peptidů vyskytujících se v jedu nomád. Peptidy ve dvou z nich byly identifikovány jako homologické peptidům včely medonosné. Prvním z nich je melittin, peptid s antimikrobiální aktivitou, druhým MCD peptid, který sice vykazuje protizánětlivé účinky, ale antimikrobiální aktivitu ne. Homology melittinu z jedu nomád s výjimkou jednoho rovněž antimikrobiální aktivitu vykazují, homology MCD peptidu mají aktivitu částečnou nebo žádnou. Tyto homologie zároveň potvrzují, že oba peptidy jsou pravděpodobně i u nomád kódovány jadernými geny.

Výsledky fylogenetické analýzy a molekulárního datování zasazují vznik rodu *Nomada* do svrchní křídy (74,9 Mya) a následnou radiaci do prakticky celého neogénu. Z následné rekonstrukce ancestrálních sekvencí peptidu melittinového typu plyne, že diverzita v sekvencích antimikrobiálních peptidů skutečně existuje, nicméně s ohledem na vysokou konzervativnost antimikrobiální funkce peptidu jsou příčinou většiny nakumulované variability substituční mutace neměnící funkci peptidu. Srovnání rychlostí evoluce tohoto peptidu mezi jednotlivými úseky fylogenetického stromu je s tímto pozorováním ve shodě: nepřilíš průkazné rozdíly v rychlostech vypovídají spíše o průběhu změn neutrální evolucí, než o rozdílech v selekčních tlacích, které by na jednotlivé druhy působily. Přítomnost alespoň jednoho antimikrobiálně aktivního peptidu je však v rámci rodu *Nomada* poměrně konzervativním znakem. U žahadlových obecně je přítomnost AMP častá. Selekční tlak mikroorganismů z bezprostředního okolí, které zřejmě na vznik a udržení takového znaku působí, tedy rozhodně existuje, ale je spíše nespecifický a je možné, že působí spíše na množství či efektivnost a rychlost produkce antimikrobiálního peptidu. Žihadlo a jeho žlázy se nachází v bezprostřední blízkosti pohlavních orgánů i rekta a jejich antimikrobiální charakter může být preventivního rázu. Bránit infekci ve vstupu do těla touto cestou může být pro organismus poměrně zásadní. Naše závěry podporují hypotézu přítomnosti AMP v jedové žláze jako univerzální obrany proti vstupu patogenů do organismu právě touto cestou (Moreau, 2013).

O možné evoluci spíše skrze inzerčně-deleční změny, než skrze substituce u vzdálenějších druhů vypovídá srovnání koeficientů změn s dalšími druhy čeledi Apidae. Je možné, že výraznější změny ve funkci peptidu se odehrávají právě skrze inserce či delece celých motivů.

8 Seznam zkratek

AMP – antimikrobiální peptidy

AMK – aminokyselina

ACN – acetonitril

TFA – kyselina trifluoroacetylová

sd – směrodatná odchylka

PF2 – Partition Finder 2

MCMC – Markov chain Monte Carlo

Indel – inzece a delece, inzerčně-deleční

9 Použitá literatura:

- Adachi, J., & Hasegawa, M. (1996). Model of amino acid substitution in proteins encoded by mitochondrial DNA. *Journal of molecular evolution*, 42(4), 459–468.
- Albans, K. R., Aplin, R. T., Brehcist, J., Moore, J. F., & O'toole, C. (1980). Dufour's gland and its role in secretion of nest cell lining in bees of the genus *Colletes* (Hymenoptera: Colletidae). *Journal of Chemical Ecology*, 6(3), 549–564.
- Argiolas, A., & Pisano, J. J. (1985). Bombolitins, a new class of mast cell degranulating peptides from the venom of the bumblebee *Megabombus pennsylvanicus*. *J Biol Chem*, 260.
- Bahar, A. A., & Ren, D. (2013). Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543–1575.
- Baltzer, S. A., & Brown, M. H. (2011). Antimicrobial peptides—promising alternatives to conventional antibiotics. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 20(4), 228–235.
- Banks, B. E. C., Brown, C., Burgess, G. M., Burnstock, G., Claret, M., Cocks, T. M., & Jenkinson, D. H. (1979). Apamin blocks certain neurotransmitter-induced increases in potassium permeability. *Nature*, 282(5737), 415–417.
- Baracchi, D., Francese, S., & Turillazzi, S. (2011). Beyond the antipredatory defence: honey bee venom function as a component of social immunity. *Toxicon*, 58(6), 550–557.
- Betz, O. (2010). Adhesive exocrine glands in insects: morphology, ultrastructure, and adhesive secretion. In *Biological adhesive systems* (s. 111–152). Springer.
- Branstetter, M. G., Danforth, B. N., Pitts, J. P., Faircloth, B. C., Ward, P. S., Buffington, M. L., Brady, S. G. (2017). Phylogenomic insights into the evolution of stinging wasps and the origins of ants and bees. *Current Biology*, 27(7), 1019–1025.
- Britto, F. B., & Caetano, F. H. (2005). Ultramorphological analysis of the venom glands and their histochemical relationship with the convoluted glands in the primitive social paper wasp *Polistes versicolor* (Hymenoptera: Vespidae). *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 11(2), 160–174.
- Brockmann, H. J., & Barnard, C. J. (1979). Kleptoparasitism in birds. *Animal behaviour*, 27, 487–514.
- Brown, K. L., & Hancock, R. E. W. (2006). Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current Opinion in Immunology*, 18(1), 24–30.
- Buku, A., & Price, J. A. (2001). Further studies on the structural requirements for mast cell degranulating (MCD) peptide-mediated histamine release. *Peptides*, 22(12), 1987–1991.

- Cajal, Y., & Jain, M. K. (1997). Synergism between mellitin and phospholipase A2 from bee venom: apparent activation by intervesicle exchange of phospholipids. *Biochemistry*, 36(13), 3882–3893.
- Cardinal, S., Straka, J., & Danforth, B. N. (2010). Comprehensive phylogeny of apid bees reveals the evolutionary origins and antiquity of kleptoparasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(37), 16207–16211.
- Casteels, P., & Tempst, P. (1994). Apidaecin-Type Peptide Antibiotics Function through a Nonporeforming Mechanism Involving Stereospecificity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 199(1), 339–345.
- Casteels, Peter, Ampe, C., Rivière, L., DAMME, J., Elicone, C., Fleming, M., ... Tempst, P. (1990). Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *The FEBS Journal*, 187(2), 381–386.
- Čerovský, V., Hovorka, O., Čvačka, J., Voburka, Z., Bednářová, L., Borovičková, ... L., Fučík, V. (2008). Melectin: a novel antimicrobial peptide from the venom of the kleptoparasitic bee *Melecta albifrons*. *Chembiochem: a European journal of chemical biology*, 9(17), 2815–2821.
- Cremer, S., Armitage, S. A. O., & Schmid-Hempel, P. (2007). Social Immunity. *Current Biology*, 17(16), R693–R702.
- Čerovský, V. (2014). Antimikrobiální peptidy izolované z hmyzu. *Chem. Listy*, 108, 344–353.
- Čujová, S., Slaninová, J., Monincová, L., Fučík, V., Bednářová, L., Štokrová, J., ... Čerovský, V. (2013). Panurgines, novel antimicrobial peptides from the venom of communal bee *Panurgus calcaratus* (Hymenoptera: Andrenidae). *Amino acids*, 45(1), 143–157.
- DeGrado, W. F., Musso, G. F., Lieber, M., Kaiser, E. T., & Kezdy, F. J. (1982). Kinetics and mechanism of hemolysis induced by melittin and by a synthetic melittin analogue. *Biophysical journal*, 37(1), 329–338.
- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular biology and evolution*, 29(8), 1969–1973.
- Engel, P., Martinson, V. G., & Moran, N. A. (2012). Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(27), 11002–11007.
- Erler, S., Lhomme, P., Rasmont, P., & Lattorff, H. M. G. (2014). Rapid evolution of antimicrobial peptide genes in an insect host–social parasite system. *Infection, Genetics and Evolution*, 23, 129–137.
- Favreau, P., Menin, L., Michalet, S., Perret, F., Cheneval, O., & Stöcklin, M. (2006). Mass spectrometry strategies for venom mapping and peptide sequencing from crude venoms: case applications with single arthropod specimen. *Toxicon*, 47.
- Frandsen, P. B., Calcott, B., Mayer, C., & Lanfear, R. (2015). Automatic selection of partitioning schemes for phylogenetic analyses using iterative k-means clustering of site rates. *BMC evolutionary biology*, 15(1), 13.
- Gauldie, J., Hanson, J. M., Shipolini, R. A., & Vernon, C. A. (1978). The structures of some peptides from bee venom. *The FEBS Journal*, 83(2), 405–410.
- Gottler, L. M., & Ramamoorthy, A. (2009). Structure, membrane orientation, mechanism, and function of pexiganan—a highly potent antimicrobial peptide designed from magainin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(8), 1680–1686.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology*, 59(3), 307–321.
- Habermann, E. (1972). Bee and Wasp Venoms. *Science*, 177(4046), 314–322.
- Hamilton, I. M., & Dill, L. M. (2003). The use of territorial gardening versus kleptoparasitism by a subtropical reef fish (*Kyphosus cornelii*) is influenced by territory defendability. *Behavioral Ecology*, 14(4), 561–568.
- Hoffmann, J. A., Reichhart, J., & Hetru, C. (1996). Innate immunity in higher insects. *Current Opinion in Immunology*, 8(1), 8–13.
- Höner, O. P., Wachter, B., East, M. L., & Hofer, H. (2002). The response of spotted hyaenas to long-term changes in prey populations: functional response and interspecific kleptoparasitism. *Journal of Animal Ecology*, 71(2), 236–246.

- Hook, A. W., & Matthews, R. W. (1980). Nesting Biology of *Oxybelus Sericeus* With a Discussion of Nest Guarding by Male Sphecid Wasps (Hymenoptera). *Psyche: A Journal of Entomology*, 87(1–2), 21–37.
- Howard, D. F., & Tschinkel, W. R. (1976). Aspects of necrophoric behavior in the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. *Behaviour*, 56(1), 157–178.
- Hughes, W. O., Eilenberg, J., & Boomsma, J. J. (2002). Trade-offs in group living: transmission and disease resistance in leaf-cutting ants. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 269(1502), 1811–1819.
- Chapman, R. F., Simpson, S. J., & Douglas, A. E. (2013). *The Insects: Structure and Function* (5th edition). New York: Cambridge University Press 1998.
- Chapuisat, M., Oppliger, A., Magliano, P., & Christe, P. (2007). Wood ants use resin to protect themselves against pathogens. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1621), 2013.
- Chen, F. C., & Li, W. H. (2001). Genomic divergences between humans and other hominoids and the effective population size of the common ancestor of humans and chimpanzees. *The American Journal of Human Genetics*, 68(2), 444–456.
- Chen, J., Guan, S. M., Sun, W., & Fu, H. (2016). Melittin, the major pain-producing substance of bee venom. *Neurosci Bull*, 32.
- Kawakami, H., Goto, S. G., Murata, K., Matsuda, H., Shigeri, Y., Imura, T., ... Shinada, T. (2017). Isolation of biologically active peptides from the venom of Japanese carpenter bee, *Xylocopa appendiculata*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 23(1), 29.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., ... Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647–1649.
- Kreil, G. (1975). The structure of *Apis dorsata* melittin: Phylogenetic relationships between honeybees as deduced from sequence data. *FEBS Letters*, 54(1), 100–102.
- Kuhn-Nentwig, L. (2003). Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(12), 2651–2668.
- Lanfear, R., Frandsen, P. B., Wright, A. M., Senfeld, T., & Calcott, B. (2016). PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular biology and evolution*, 34(3), 772–773.
- Lavine, M. D., & Strand, M. R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect biochemistry and molecular biology*, 32(10), 1295–1309.
- Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y., & Su, Z. (2012). Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*, 37(2), 207–215.
- Macek et al. (2010). *Blanokřídli České republiky I.* (1. vyd.). Praha: Academia.
- Maddison, W. P., & Maddison, D. R. (2017). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis.
- Masri, L., & Cremer, S. (2014). Individual and social immunisation in insects. *Trends in immunology*, 35(10), 471–482.
- McCleskey, C. S., & Melampy, R. M. (1939). Bactericidal properties of royal jelly of the honeybee. *Journal of Economic Entomology*, 32(4), 581–587.
- Michener, C. D. (2007). *The bees of the world* (2. vyd., Roč. 1). Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Mitra, A. (2013). Function of the Dufour's gland in solitary and social Hymenoptera. *Journal of Hymenoptera Research*, 35, 33–58.
- Monincová, L., Veverka, V., Slaninová, J., Budešínský, M., Fučík, V., & Bednářová, L. (2014). Structure-activity study of macropin, a novel antimicrobial peptide from the venom of solitary bee *Macropis fulvipes* (Hymenoptera: Melittidae). *J Pept Sci*, 20. <https://doi.org/10.1002/psc.2625>
- Moreau, S. J. M. (2013). “It stings a bit but it cleans well”: Venoms of Hymenoptera and their antimicrobial potential. *Immune Interactions Between Insects and Their Natural Antagonists: a Workshop Honoring Professor Stuart E. Reynolds*, 59(2), 186–204. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.10.005>

- Neumann, P., Pirk, C., Hepburn, H., Solbrig, A., Ratnieks, F., Elzen, P., & Baxter, J. (2001). Social encapsulation of beetle parasites by Cape honeybee colonies (*Apis mellifera capensis* Esch.). *Naturwissenschaften*, 88(5), 214–216.
Nucleotide [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988]. Accession No. 406130, *Apis mellifera* melittin (Melt), mRNA; [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/406130>
- Nucleotide [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988]. Accession No. NM_001011611.2, *Apis mellifera* MCD-peptide, mRNA; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/406130>
- Obin, M. S., & Vander Meer, R. K. (1985). Gaster flagging by fire ants (*Solenopsis* spp.): functional significance of venom dispersal behavior. *Journal of chemical ecology*, 11(12), 1757–1768.
- O'Neill, K. M. (2001). *Solitary Wasps: Behavior and Natural History*. New York: Cornell University Press.
- Orivel, J., Redeker, V., Le Caer, J.-P., Krier, F., Revol-Junelles, A.-M., Longeon, A., ... Rossier, J. (2001). Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides from the venom of the ant *Pachycondyla goeldii*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(21), 17823–17829.
- Otti, O., Tragust, S., & Feldhaar, H. (2014). Unifying external and internal immune defences. *Trends in ecology & evolution*, 29(11), 625–634.
- Palma, M. S. (2006). Insect venom peptides. *The handbook of biologically active peptides*, 409–416.
- Park, C., & Lee, D. G. (2010). Melittin induces apoptotic features in *Candida albicans*. *Biochemical and biophysical research communications*, 394(1), 170–172.
- Peiren, N., de Graaf, D. C., Vanrobaeys, F., Danneels, E. L., Devreese, B., Van Beeumen, J., & Jacobs, F. J. (2008). Proteomic analysis of the honey bee worker venom gland focusing on the mechanisms of protection against tissue damage. *Toxicon*, 52(1), 72–83.
- Peiren, Nico, Vanrobaeys, F., de Graaf, D. C., Devreese, B., Van Beeumen, J., & Jacobs, F. J. (2005). The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1752(1), 1–5.
- Peters, R. S., Krogmann, L., Mayer, C., Donath, A., Gunkel, S., Meusemann, K., ... Niehuis, O. (2017). Evolutionary History of the Hymenoptera. *Current Biology*, 0(0).
- Quadri, L. E. (2002). Regulation of antimicrobial peptide production by autoinducer-mediated quorum sensing in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82(1–4), 133–145.
- R Core Team. (2014). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
- Rambaut, A. (2016). *FigTree. Tree figure drawing tool version 1.4. 1*. Institute of Evolutionary biology, University of Edinburgh.
- Rambaut, A., Suchard, M., Xie, D., & Drummond, A. (2014). Tracer v1. 6 <http://beast.bio.ed.ac.uk>. *Tracer* (Online 2015, May 29).
- Rietschoten, J., GRANIER, C., ROCHAT, H., MIRANDA, F., & LISSITZKY, S. (1975). Synthesis of apamin, a neurotoxic peptide from bee venom. *The FEBS Journal*, 56(1), 35–40.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Mark, P. van der, Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., ... Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*.
<https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Rosenheim, J. A. (1989). Behaviorally mediated spatial and temporal refuges from a cleptoparasite, *Argochrysis armilla* (Hymenoptera: Chrysididae), attacking a ground-nesting wasp, *Ammophila dysmica* (Hymenoptera: Sphecidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 25(5), 335–348. <https://doi.org/10.1007/BF00302991>
- Schmid-Hempel, P. (1998). *Parasites in social insects*. Princeton University Press.
- Schmidt, J. O. (1983). Hymenopteran envenomation. In *Urban entomology, interdisciplinary perspectives* (s. 187–216).
- Starr, C. K. (1985). Enabling mechanisms in the origin of sociality in the Hymenoptera—the sting's the thing. *Annals of the Entomological Society of America*, 78(6), 836–840.
- Steiner, A. L., & Piek, T. (1986). Stinging behaviour of solitary wasps. In *Venoms of the Hymenoptera: biochemical, pharmacological, and behavioural aspects* (s. 63–160). London ; Orlando: Academic Press.

- Stocklin, R., Favreau, P., Thai, R., Pflugfelder, J., Bulet, P., & Mebs, D. (2010). Structural identification by mass spectrometry of a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary bee *Osmia rufa* (hymenoptera: megachilidae). *Toxicon*, 55. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.12.011>
- Straus, S. K., & Hancock, R. E. W. (2006). Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(9), 1215–1223.
- Tengo, J., & Bergstrom, G. (1977). Cleptoparasitism and odor mimetism in bees - do *Nomada* males imitate odor of *Andrena* females? *Science*, 196(4294), 1117–1119.
- Tragust, S., Mitteregger, B., Barone, V., Konrad, M., Ugelvig, L. V., & Cremer, S. (2013). Ants disinfect fungus-exposed brood by oral uptake and spread of their poison. *Current Biology*, 23(1), 76–82.
- Traniello, J. F., Rosengaus, R. B., & Savoie, K. (2002). The development of immunity in a social insect: evidence for the group facilitation of disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(10), 6838–6842.
- Turillazzi, S., Dapporto, L., Pansolli, C., Boulay, R., Dani, F. R., Moneti, G., & Pieraccini, G. (2006). Habitually used hibernation sites of paper wasps are marked with venom and cuticular peptides. *Current biology*, 16(14), R530–R531.
- Turillazzi, S., & Pardi, L. (1981). Ant guards on nests of *Parischnogaster Nigricans Serrei* (Buysson) (Stenogastrinae). *Monitore Zoologico Italiano - Italian Journal of Zoology*, 15(1), 1–7.
- Turillazzi, Stefano, Mastrobuoni, G., Dani, F. R., Moneti, G., Pieraccini, G., la Marca, G., ... Cavallini, V. (2006). Dominulin A and B: two new antibacterial peptides identified on the cuticle and in the venom of the social paper wasp *Polistes dominulus* using MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF, and ESI-ion trap. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 17(3), 376–383.
- Vilmos, P., & Kurucz, E. (1998). Insect immunity: Evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters*, 62(2), 59–66.
- Vizioli, J., & Salzet, M. (2002). Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(11), 494–496.
- Vollrath, F. (1979). Behaviour of the kleptoparasitic spider *Argyrodes elevatus* (Araneae, Theridiidae). *Animal behaviour*, 27, 515–521.
- Whelan, S., & Goldman, N. (2001). A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Mol Biol Evol*, 18.
- Wilson, E. O. (1965). Chemical communication in the social insects. *Science*, 149(3688), 1064–1071.
- Xu, X., Li, J., Lu, Q., Yang, H., Zhang, Y., & Lai, R. (2006). Two families of antimicrobial peptides from wasp (*Vespa magnifica*) venom. *Toxicon*, 47(2), 249–253.
- Yeaman, M. R., & Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacological Reviews*, 55(1), 27–55. <https://doi.org/10.1124/pr.55.1.2>