JUSTUS-LIEBIG-
UNIVERSITÄT
GIESSEN

Aus dem Institut für Insektenbiotechnologie
Professur für Angewandte Entomologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Ant Venomics: Identifizierung, Charakterisierung und funktionelle Analyse von ausgewählten Toxinen aus dem Gift heimischer Ameisen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
im Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Sabine Hurka

Wetzlar, 2023

Ant Venomics: Identifizierung, Charakterisierung und funktionelle Analyse von ausgewählten Toxinen aus dem Gift heimischer Ameisen

Sabine Hurka

JUSTUS-LIEBIG-
UNIVERSITÄT
GIESSEN

JUSTUS-LIEBIG-
UNIVERSITÄT
GIESSEN

Aus dem Institut für Insektenbiotechnologie
Professur für Angewandte Entomologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Ant Venomics: Identifizierung, Charakterisierung und funktionelle Analyse von ausgewählten Toxinen aus dem Gift heimischer Ameisen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
im Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Sabine Hurka

Wetzlar, 2023

Mitglieder der Prüfungskommission:

1. Gutachter:	Prof. Dr. Andreas Vilcinskas, Justus-Liebig-Universität Gießen
2. Gutachter:	Prof. Dr. Alexander Goesmann, Justus-Liebig-Universität Gießen
	Prof. Dr. Thomas Wilke, Justus-Liebig-Universität Gießen
	Prof. Dr. Steffen Pauls, Senckenberg Forschungsinstitut und Naturmuseum Frankfurt/M.
Vorsitzender:	Prof. Dr. Marc F. Schetelig, Justus-Liebig-Universität Gießen

Zusammenfassung

Die über 14.000 bisher bekannten Ameisenarten der Familie Formicidae evolvierten ein ausgeklügeltes chemisches Verteidigungssystem in Form von Gift. Diese Gifte haben sich zu hochwirksamen und chemisch komplexen Gemischen entwickelt, die zu einem großen Anteil aus Polypeptidkomponenten bestehen. Das translationale Potenzial einzelner dieser Biomoleküle konnte bereits in vorausgehenden Arbeiten belegt werden. Dennoch sind bisher nur wenige Ameisenarten hinsichtlich ihres Giftes untersucht worden und ein umfangreiches biomolekulares Arsenal liegt bis heute in deren Giften verborgen. Besonders die Gifte der kleineren zentraleuropäischen Vertreter der Myrmicinae verbleiben bislang nahezu unangetastet.

In meiner Arbeit gehe ich am Beispiel der beiden heimischen Arten *Myrmica rubra* und *Myrmica ruginodis* einigen Schlüsselfragen zur Biologie und der Anwendung von Ameisengiften nach. Der erste Teil der Arbeit widmet sich der Fragen wie diese Gifte aufgebaut sind und ob sie ähnlich komplexe sind, wie es von tropischen Arten bekannt ist. Dazu analysierte ich beide Gifte in einem *Venomics*-Ansatz auf Grundlage von kombinierten Proteom- und Transkriptomanalysen. Das Gift beider *Myrmica*-Arten enthält eine Vielzahl an Toxinen, welche typisch für Ameisengifte sind, darunter vor allem Serinproteasen und CAP-Proteine. Ich identifizierte zudem mehrere neuartige, dem epidermalen Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) ähnelnde Toxine. Mitglieder dieser Toxinfamilie sind bekannte Verursacher langanhaltender Schmerzen, weshalb eine ähnliche Aktivität der von mir entdeckten Toxine wahrscheinlich ist. Meine Untersuchungen zeigen weiterhin, dass die Gifte heimischer Myrmicinae eine bislang ungeahnte Komplexität aufweisen. Mit 44 Komponenten in *Myrmica rubra* und 113 Komponenten in *Myrmica ruginodis* gehören sie zu den Ameisengiften mit der größten chemischen Diversität.

Der zweite Teil meiner Arbeit befasst sich mit Fragen zur Translation von Ameisentoxinen aus den beiden *Myrmica*-Arten. Hierfür wurden bekannte antimikrobielle Peptide (*antimicrobial peptides*, AMPs) für eine Ähnlichkeitssuche in den Transkriptomdaten beider *Myrmica*-Arten verwendet. Dieser Ansatz führte zur Entdeckung von zehn Transkripten, die für AMP-ähnliche Toxine kodieren. Die daraus abgeleiteten und synthetisierten Peptide wiesen keine Aktivität gegen MDCK-II-Zellen oder Influenza-Viren auf. Aktivitätsstudien gegen sieben Bakterienstämme, teilweise von klinischer Relevanz, offenbarte ein relativ breites Aktivitätsspektrum gegen Prokaryoten. Insbesondere das Toxin U-MYRTX-Mrug5a zeigte eine breite wachstumshemmende, gegen die klinisch relevanten Bakterienstämme *Listeria monocytogenes* und *Staphylococcus epidermidis* sogar eine bakterizide Wirkung. Aufgrund ihres Breitband-Charakters und der geringen Zytotoxizität stellen diese Toxine interessante Ausgangsstoffe für zukünftige Untersuchungen dar.

Summary

The more than 14,000 ant species (Formicidae) known to date evolved a remarkable chemical defense system in the form of venom. These venoms are a complex mixture of a large number of polypeptides and are highly efficient. Despite their promising translational potential documented in recent studies, most ant venoms have not been examined in any detail and a huge number of bioactive molecules still lies hidden in their venom. The venom of the smaller Central European representatives of the Myrmicinae in particular have so far remained almost unexplored.

In my work, I investigate the two native species, *Myrmica rubra* and *Myrmica ruginodis*, to answer some key questions about the biology and usage of their venom. The first part of my thesis addresses the question of how these venoms are structured and if they are as complex as the venoms known from tropical ant species. I analyzed both venoms using a venomics approach combining proteome with transcriptome analysis. Both venoms contain a lot of toxins which are typical for ant venoms, including serine proteases and CAP-proteins. Further, I identified several novel epidermal growth factor (EGF)-like toxins. Members of the EGF-like toxin family showed long-lasting pain, which makes the assumption that a similar activity of these novel toxins is likely. My work also reveals an unexpected high complexity of the venom of native Myrmicinae. With 44 and 113 components in *M. rubra*, respectively, *M. ruginodis*, both venoms showed one of the highest chemical complexities of known ant venoms.

The second part of my thesis focuses on the translational potential of the *Myrmica* toxins. Therefore, I screened the available transcriptome data of both *Myrmica* species using known antimicrobial peptides (AMPs) as search motif. I identified ten unique transcripts encoding AMPs. All ten mature peptides were synthesized and tested. They showed no activity in MDCK-II cell culture nor against influenza virus strains. Bioactivity testing against a panel of seven bacterial strains, some of clinical relevance, revealed a broad spectrum of activity against prokaryotes. In particular, the toxin U-MYRTX-Mrug5a displayed broad growth-inhibition and even has a bactericidal effect against the clinically relevant bacterial strains *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus epidermidis*. Due to their broad activity spectrum paired with the low cytotoxicity, these toxins may be interesting lead structures for further development.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **1**

1.1 Ameisen: Ein evolutionäres Erfolgsmodell 1
1.2 Vorteile durch Eusozialität und den Einsatz von Gift 2
1.3 Giftkomponenten der Ameisen 5
1.4 Das translationale Potenzial von Ameisengiften 8
1.5 Mit *Venomics* zur Entschlüsselung der Ameisengifte 10
1.6 Fragestellungen und Hypothesen der Dissertation 13
1.7 Aufbau der Dissertation 14

2 Kumulativer Teil der Dissertation **15**

2.1 Aufklärung der Giftzusammensetzung von *Myrmica rubra* und *Myrmica ruginodis* mit Hilfe von *Venomics*-Methoden 15
2.2 Anwendungspotenzial ausgewählter Toxine in *Myrmica rubra* und *Myrmica ruginodis* 20

3 Diskussion **23**

3.1 Gifte heimischer Ameisen sind komplex und beinhalten bislang nicht bekannte Biomoleküle 23
3.2 Giftkomponenten heimischer Ameisen unterstützen die Verteidigungsfunktion . 25
3.3 Ameisentoxine aus heimischen Arten haben Anwendungspotenzial 26

4 Ausblick **29**

Literatur **31**

Veröffentlichte Arbeiten **43**

Venomics of the Central European Myrmicine Ants *Myrmica rubra* and *Myrmica ruginodis* 45
Bioactivity Profiling of In Silico Predicted Linear Toxins from the Ants *Myrmica rubra* and *Myrmica ruginodis* 65

1 Einleitung

1.1 Ameisen: Ein evolutionäres Erfolgsmodell

Die über 14.000 bisher bekannten Ameisenarten [1, 2] gehören zur Familie der Formicidae innerhalb der Ordnung Hymenoptera und bevölkern als ökologisch besonders diverse Tiergruppe, bis auf die Antarktis, alle Kontinente. Innerhalb der Ameisen werden aktuell 16 Unterfamilien anerkannt, unterteilt in die drei Hauptkladen Leptanillae, Ponerinae und Formicoidea [3, 4]. Die innere Systematik der Ameisen basiert großteils auf klassischen morphologischen Merkmalen und ist durch neueste Erkenntnisse auf Grundlage molekularphylogenetischer Methoden Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Diskussion [4–8]. Mit etwa 48 % aller rezenten Arten bilden die Mitglieder der Myrmicinae die artenreichste Unterfamilie, gefolgt von den Formicinae (22 %) und Ponerinae (10 %) [1]. Biogeografisch haben Ameisen ihren Verbreitungsschwerpunkt in den Tropen und beherbergen hier die größte Artenvielfalt. Mit etwa 800 verschiedenen Spezies findet sich aber auch eine beachtliche Anzahl in Europa wieder, von denen der überwiegende Teil (53 %) der Unterfamilie Myrmicinae zuzuordnen ist [1].

Die ersten Ameisen lassen sich im Fossilrekord vor etwa 100 bis 130 Millionen Jahren in der Kreidezeit nachweisen [5, 9, 10]. Seither haben sich die einzelnen Arten nahezu perfekt an die jeweiligen Lebensbedingungen angepasst und mit ihrer großen Formen- und Artenvielfalt beinahe den gesamten Erdball erschlossen. Die diversen Ameisenarten haben in diesem Zusammenhang die unterschiedlichsten Überlebensstrategien entwickelt. Etwa 200 Arten, die als Treiberameisen (*army ant syndrom*) zusammengefasst werden, jagen in großen Gruppen in regelrechten Raubzügen fächerförmig um ihr Nest [11, 12]. Dies zwingt sie typischerweise dazu, regelmäßig mit ihrem Nest umzuziehen, um neue Jagdgebiete zu erschließen. Sie sind durch die Masse an jagenden Ameisen im Stande, auch größere und wehrhafte Beutetiere zu überwältigen. Die rund 40 Blattschneiderameisen der Gattungen *Atta* und *Acromyrmex* [13] wiederum sind für ihre fürsorglich gepflegten Pilzgärten bekannt und werden dem Tribus Attini (pilzzüchtende Ameisen) zugeordnet. Diese versorgen in ihrem Nest sehr aufwendig einen symbiontischen Pilz der Gattung *Leucoagaricus* mit frischem Blattmaterial, welches ihm als Substrat dient. Dieser Pilz dient als primäre Futterquelle der Blattschneiderameisen. Die beschriebene Symbiose

wird durch Bakterien der Gattung *Pseudonocardia* komplettiert, welche die Ameisenkutikula besiedeln. Ein von den Bakterien produziertes Antibiotikum unterdrückt das Wachstum des parasitären Pilzes *Escovopsis* [14, 15] und kann das Wachstum weiterer Antibiotika produzierender Mikroorganismen des Kutikula-Mikrobioms begünstigen [16]. Die Blattschneiderameisen leben also in einer Symbiose mit insgesamt drei festen Partnern und einem Parasiten zusammen. Eine besonders aggressive Ameisenart ist die Weberameise (Gattung *Oecophylla*), die in den tropischen Breiten heimisch ist und in Nestern aus Blättern in Baumkronen lebt. Ihr ausgeprägtes Territorialverhalten gegenüber jeglichem Eindringling, Insekt oder Wirbeltier, wird als natürliche Schädlingsbekämpfung unter anderem auf australischen Mango- und Cashew-Plantagen ausgenutzt. Dies ermöglicht die Reduktion des Einsatzes von Insektiziden [17, 18] und kann sogar die Fruchtqualität von Mangos im Vergleich zur konventionellen Bewirtschaftung verbessern [19]. Neben den ausgefeilten und kontrastierenden Überlebensstrategien zeigen die verschiedenen Arten eine signifikante Größendisparität. Die größten lebenden Exemplare finden sich im südamerikanischen Regenwald in der Unterfamilie Ponerinae. Die dazu gehörenden neun verschiedenen Arten der Gattung *Dinoponera* bringen es dabei auf eine beachtliche Körpergröße von 3 bis 4 cm [1]. Demgegenüber stehen die kleinen Myrmicinae, wie die Pharaoameisen der Gattung *Monomorium*, die Körpergrößen von lediglich 1,5 bis 4 mm erreichen [20].

Die Klasse der Insekten im Allgemeinen ist etwa 500 Millionen Jahre alt [21], im Vergleich zu anderen Mitgliedern dieser Gruppe handelt es sich bei den Ameisen daher um eine junge, aber im öko-evolutionären Kontext überaus erfolgreiche Familie. Eine besonders herausragende Eigenschaft ist ihre Eusozialität, welche den Ameisen und vielen verwandten Hymenoptera den Weg zu ihrem großen Erfolg geebnet hat.

1.2 Vorteile durch Eusozialität und den Einsatz von Gift

Ameisen gehören mit den Wespen und Bienen zur Insektenordnung Hymenoptera und sind mit die wichtigste staatenbildende Insektenfamilie [22]. Ein Ameisenstaat besteht dabei fast ausschließlich aus weiblichen Tieren mit unterschiedlichen Aufgaben (Kasten). Die bekanntesten Kasten bilden neben den Männchen, welche in der Regel aus unbefruchteten Eiern schlüpfen (Haplodiploidie), Königinnen und Arbeiterinnen aus befruchteten Eiern (Diplodiploidie) [23, 24]. Die Kastenzugehörigkeit wird aber nicht nur genetisch bestimmt, sondern ist bei weiblichen Tieren auch abhängig von Umweltbedingungen wie Futterqualität und Temperatur während des Larvenstadiums (Polyphänismus) [25]. Generell stellt die Arbeiterinnenkaste (*minor worker*) die meisten Individuen in einer Kolonie. Abhängig von der jeweiligen Art wird diese noch um eine

Kaste von Soldatinnen (*major worker*) erweitert. Bei den Treiberameisen bewachen und verteidigen die großen Soldatinnen mit ihren kräftigeren Mandibeln beispielsweise die Masse an kleineren, fast blinden Arbeiterinnen am Rand des fächerförmigen Vormarschs gegen äußere Gefahren [25]. Innerhalb der Arbeiterinnenkaste können sich weitere Unterkasten ausbilden, neben den Funktionen im Staat auch an der morphologischen Körpergrößenvariabilität erkennbar [25, 26]. Dieser mögliche Größenunterschied zeigt sich eindrücklich bei der Blattschneiderameise *Atta sexdens*. Die Arbeiterinnen, die außerhalb des Nests die Blätter ernten und zum Nest transportieren übersteigen das 200-Fache des Trockengewichts der kleinsten Arbeiterinnen der Art, die im Inneren des Nests die Pilzgärten bewirtschaften. Ebenso variiert die Kopfbreite zwischen beiden Unterkasten um das Achtfache [15]. Die zugehörige Arbeiterinnenkaste kann auch nur vorübergehend über den Lebenszyklus der Arbeiterin definiert sein. Dieser beginnt meist bei der Versorgung der Eier über die Fütterung der Larven und endet mit Funktionen außerhalb des Nests [15]. Die Kaste der männlichen Tiere dient primär zur Befruchtung. Ameisenkolonien können sich, abhängig von der jeweiligen Art und den äußeren Bedingungen, sowohl durch befruchtete Arbeiterinnen (Gamergate, zum Beispiel *Rhytidoponera* oder *Dinoponera* [27, 28]) oder durch Königinnen reproduzieren. Bei Arten mit Königinnen werden zwei Reproduktionsformen unterschieden: Bei monogynen Arten beherbergt die Kolonie nur eine Königin (z. B. *Harpagoxenus sublaevis*), während polygyne beziehungsweise oligogyne Arten gleichzeitig mehrere Königinnen haben (z. B. *Myrmica rubra*) [24, 29].

Diese als Eusozialität bezeichnete strukturierte Lebensweise und die daran gekoppelte Arbeitsteilung zwischen spezialisierten Kasten verschaffte staatenbildenden Arten über die Jahrmillionen einen evolutionären Vorteil gegenüber solitär lebenden Tieren. Die Transition von solitären zu eusozialen Überlebensstrategien wird deshalb von Szathmáry und Smith auch als einer der wichtigsten Übergänge in der Evolution beschrieben [30]. Sie evolvierte neben den Ameisen konvergent bei anderen Hymenoptera (einige Wespen- und Bienenarten), den Isoptera (Termiten) [31] und bei einigen Säugetieren wie der Gattung *Heterocephalus* [32]. Die Gesamtheit der im Staat zusammengeschlossenen Individuen wird als Superorganismus bezeichnet, der nur aufgrund altruistischer Zusammenarbeit funktioniert und bestehen kann. Neuere Arbeiten zeigen, dass die mehrheitliche Sterilität der Individuen eines Superorganismus für den Zusammenhalt und damit die Funktionsfähigkeit von Vorteil ist. Der fehlende Druck, sich selbst zu reproduzieren, verringert das Streitpotenzial innerhalb des Staates. Erst dadurch können Superorganismen zu einer beachtlichen Größe heranwachsen [33, 34]. Ein weiterer Schlüsselfaktor für den Erfolg eines Superorganismus liegt in der Genetik beziehungsweise der Verwandtschaft der darin lebenden Individuen. Da es sich bei allen Mitgliedern des Staates, mit Ausnahme der reproduktiven Königinnen, um Geschwister handelt, ist der genetische Reproduktionserfolg jedes Individuums durch die Existenz der Königinnen sichergestellt. Auf eigene Reproduktion kann ohne negative

Folgen auf die Fitness verzichtet werden (*sensu* der egoistischen Gen-Hypothese nach Dawkins). Diese einzigartige genetische Organisation liefert die zentrale Grundlage für das altruistische und kooperative Verhalten der Mitglieder einer eusozialen Art [15, 35, 36].

Ein Charakteristikum der eusozialen Lebensweise ist die oftmals hohe Individuenzahl auf engstem Raum in der Kolonie. Während bei manchen Arten nur wenige Individuen eine Kolonie ausbilden, können andere Staaten von ungeahnter Größe hervorbringen und mehrere Millionen Tiere eine Superkolonie bilden [37, 38]. Dabei spielt die effektive Kommunikation untereinander ebenfalls eine wichtige Rolle für das Bestehen der Kolonie. Innerhalb des Staates funktioniert diese in Form von Berührungs- und Vibrationsreizen, überwiegend aber über chemische Signale, worin sie sich zu wahren Spezialisten unter den Insekten entwickelten [15, 39]. Von den Mandibeln bis zum Abdomen befindet sich eine Vielzahl an exokrinen Drüsen, welche situationsbedingt und artenabhängig eine Mischung aus verschiedenen Pheromonen absondern können. So genannte Alarmsubstanzen dienen beispielsweise zur Alarmierung über eine Beschädigung des Nests oder dem Eindringen eines Feindes. Spur- und Rekrutierungssubstanzen sind eine weitere wichtige Pheromonkategorie und funktionieren als Wegmarkierung unter anderem zu Futterquellen, Feinden oder dem neuen Neststandort. Insbesondere bei den Treiberameisen hat sich ein hoch effizientes Rekrutierungssystem entwickelt, das den fast blinden Arbeiterinnen eine chemische Kommunikation ermöglicht [15, 25]. Die räumliche Anhäufung von Tieren macht die jeweilige Ameisenkolonie aber auch anfällig gegenüber Prädatoren und Krankheitserregern. Eusoziale Arten können deshalb langfristig nur erfolgreich sein, wenn sich das Kollektiv auch gegen größere Jäger zur Wehr setzen kann, gegen die ein Individuum chancenlos wäre. Dieses Problem wurde bei den Ameisen und anderen Hymenoptera durch die Evolution von ausgeklügelten chemischen Verteidigungssystemen gelöst. Die nicht reproduzierenden Arbeiterinnen und, sofern vorhanden, Soldatinnen evolvierten ihren einst der Eiablage dienenden Ovipositor zu einem Giftstachel. Dieser ist am Abdomen lokalisiert und über einen schmalen Ductus mit einer Giftdrüse verbunden, in welcher ein chemisch komplexer Giftcocktail produziert und gelagert wird. Dieses Giftsystem ermöglicht das Injizieren von Gift in Prädatoren, kann jedoch auch eingesetzt werden um potenzielle Beute zu überwältigen. Die meisten rezenten Ameisenarten verfügen über solch einen stachelbasierten Verteidigungsmechanismus, jedoch haben manche Arten eine alternative Verteidigungsstrategie entwickelt. Einige Unterfamilien, wie die Formicinae, Dolichoderinae, Aneuretinae oder Dorylinae, reduzierten ihren funktionalen Giftstachel im Laufe der Evolution wieder [40]. Sie setzen vermehrt ihre Mandibeln ein und versprühen ein aus Peptiden und Ameisensäure bestehendes Sekret aus dem Abdomen [41, 42]. Dabei werden zunächst durch Bisse Wunden erzeugt, in welche das schmerzhafte Gemisch appliziert wird. Wenngleich solche säurebasierten Verteidigungssysteme im Volksmund größere Bekanntheit haben, stellen sie doch die Ausnahme dar. Die überwiegende Anzahl der Ameisenarten

verfügen über einen funktionalen Giftstachel mit welchem ein proteinreiches, primär neurotoxisches Gift injiziert wird [40, 43]. Beiden Systemen gemein sind die Folgen: Die Erzeugung eines schnell einsetzenden Schmerzes, damit ein Jäger abgewehrt werden kann und damit das Überleben des Staates gesichert wird. Die Stiche der Feuerameisen (Gattung *Solenopsis*), der 24-Stunden-Ameise (*Paraponera clavata*) oder der Bulldoggenameise (*Myrmecia gulosa*) sind selbst für Menschen äußerst schmerzhaft und erlangten daher große Bekanntheit [40, 44]. Im Schmidt-Stichschmerz-Index wird ein Stich von *P. clavata* mit dem höchsten Schmerzwert angegeben, der der Wissenschaft bekannt ist [45]. Dies zeigt eindrucksvoll die Effizienz solcher Gifte und die Wirksamkeit gegenüber selbst körperlich überlegenen Bedrohungen. Zusätzlich werden Ameisengiften auch desinfizierende Wirkungen zugeschrieben. Dies ist ein entscheidender Vorteil im Kampf gegen Mikroorganismen, die den Staat durch Infektionen schwächen oder auslöschen könnten. Ameisen nutzen das Gift dabei zur Reinigung des Nests und der Beute sowie bei der eigenen (Autogrooming) und der gegenseitigen (Allogrooming) Körperpflege [46]. Die Entwicklung und Nutzung von Giften zeigt damit ihre klare Verteidigungsstrategie gegenüber äußeren Bedrohungen des eusozialen Ameisenstaates.

1.3 Giftkomponenten der Ameisen

Ameisengifte haben sich zu hochwirksamen und chemisch komplexen Gemischen entwickelt und erfüllen so eine zentrale Aufgabe bei der Verteidigung des Staates in dessen Ökologie. Dabei macht das Zusammenspiel der einzelnen Bestandteile und deren Mischung die besondere Wirksamkeit aus. Die Gifte enthalten in unterschiedlichen Mengen, die stark von der jeweiligen Ameisenart abhängig sind, Peptide, Proteine und kleine organische Moleküle wie Alkaloide (Piperidin-, Pyrroidin-, Indolalkaloide), Terpenoide und Polysaccharide [47–51]. Die Polypeptidkomponenten (Peptide und Proteine) stehen bei den allermeisten Arten jedoch im Vordergrund und machen oft einen Großteil des Giftes aus. Die Anzahl der Aminosäuren (AA) reicht dabei von 9 bis 379 AA mit einem Median bei 36 AA für 131 in der Tiergiftdatenbank `VenomZone` aufgeführten Ameisentoxine [52]. Diese Komponenten werden strukturell in zwei Hauptgruppen eingeteilt: Giftpeptide und enzymatische Komponenten.

Die Polypeptide innerhalb der Giftpeptide werden in drei weitere Gruppen unterteilt: Lineare, dimerisierende und cysteinreiche Peptide. Wie bei anderen Hymenoptera-Arten auch, stellen die linearen Peptide dabei die Mehrheit der bisher beschriebenen Toxine aus Ameisen. Dies trifft vor allem auf die Unterfamilien Myrmicinae, Pseudomyrmecinae, Ectatomminae, Myrmeciinae, Paraponerinae und Ponerinae zu [43]. Diese Peptide sind hauptsächlich polykationischer Natur

und mit einem Molekulargewicht von weniger als 5 kDa gehören sie zu den kleineren bekannten Giftbestandteilen. Viele dieser Peptide weisen antimikrobielle, insektizide und zytotoxische Eigenschaften auf [40, 46, 53, 54]. Einige der wichtigsten bekannten Ameisentoxine gehören zu dieser Klasse, wie beispielsweise Poneratoxine aus *Paraponera clavata*, welches eine Hyperpolarisation der Nervenzellen verursachen kann und als das schmerzhafteste bekannte Toxin des Tierreichs gilt [45]. Ponericine aus Ameisen der Gattung *Neoponera* (früher *Pachycondyla*) stellen eine weitere wichtige Klasse dieser Toxingruppe dar. Zu ihnen gehören etwa 30 Peptide, die α-helikale Sekundärstrukturen ausbilden und hämolytische, antimikrobielle wie auch zytotoxische Eigenschaften aufweisen. Als letzte wichtige lineare Peptidklasse sind die Dinoponeratoxine aus den Arten *Dinoponera australis* und *Dinoponera quadriceps* zu nennen. Diese kleinen Peptide (429 bis 3214 Da) zeigen große Sequenzhomologie zu Ponericinen und mikrobiellen Peptiden aus Froschgiften. Ähnlich wie diese, bilden Dinoponeratoxine amphipathische α-Helices aus und sind häufig C-terminal amidiert [40, 54]. Es handelt sich um biomembranschädigende Komponenten, bei denen es zu Poren- oder Mizellenbildung kommt. Primär werden ihnen zytotoxische, antimykotische und antimikrobielle Eigenschaften zugeschrieben [40]. Aufgrund der häufigen Aktivität gegen pathogene Mikroorganismen erfahren die linearen Ameisentoxine ein großes Forschungsinteresse. Allerdings verursachen diese oft hämolytische und zytotoxische Nebenwirkungen, weshalb es bisher nicht gelang, lineare Ameisentoxine als neue antibiotische Wirkstoffe zu etablieren. Die Fähigkeit, eine Membranpermeabilität auszulösen, welche das Eindringen des eigentlichen Pharmazeutikums ermöglicht, ist für die Entwicklung von Krebsmedikamenten interessant. Die linearen Ameisentoxine binden dazu allerdings zu unspezifisch, weshalb eine Translation in neue Krebstherapeutika bisher nicht gelang [43, 55].

Eine zweite wichtige Klasse der Ameisengiftpeptide sind dimerisierende Toxine. Ein Dimer bildet sich aus zwei Untereinheiten (Monomere) zu einer gemeinsamen Einheit und stellt die einfachste Form eines Polymers dar. Die Monomere können identisch (Homodimer) oder unterschiedlich (Heterodimer) sein. In Ameisen wurden dimerisierende Peptide bisher in den Unterfamilien Ectatomminae, Myrmeciinae, Pseudomyrmecinae und Ponerinae beschrieben [56–61]. Die als neurotoxisch beschriebenen Ectatomine gehören zu dieser Peptidklasse und bestehen aus homologen, amphiphilen Monomeren, die über eine Disulfidbrückenbindung miteinander verbunden sind. Die Monomere selbst verfügen über eine weitere Disulfidbrückenbindung, die dem Toxin zusätzliche Stabilität gegenüber Proteasen verleiht, wie es auch für Spinnentoxine beschrieben wird [40, 62]. Das aus *Ectatomma tuberculatum* isolierte Et-1 beispielsweise bildet in hohen Dosen Poren in der Zellmembran, was zu einem Ionenabfluss aus der Zelle führt und im Zelltod enden kann. In geringeren Dosen interagiert Et-1 vermutlich direkt oder als allosterischer Modulator mit β-Adrenozeptoren der Herz- und glatten Muskulatur und beeinflusst damit die Aktivierung von Ca_V-Ionenkanälen. Dieser Eingriff in die Neurotransmission des Nervensystems

führt zu unkontrollierten Muskelkontraktionen, Lähmungen oder zum Tod eines Beutetiers oder Prädator [40, 56]. Die Myrmexine sind ebenfalls Dimere, die eine Gruppe von sechs Toxinen aus *Pseudomyrmex triplarinus* sowie drei weitere Polypeptide aus der verwandten *Pseudomyrmex penetrator* umfassen. Erstgenannte reduzierten in klinischen Studien die Schmerzen und Entzündungen von Patienten mit rheumatischer Arthritis [63]. Myrmexine sind Heterodimere und ebenfalls über Disulfidbrückenbindungen stabilisiert. Aufgrund ihrer Wirkung wird angenommen, dass sie eine neue Klasse der anti-entzündlichen Proteine repräsentieren [59]. Als letzte Gruppe der Dimere sollen die Pilosuline der australischen *Myrmecia pilosula* genannt werden. Diese liegen zum Teil zwar als lineare Peptide vor (Pilosulin 1 und 2, [Ile^5]Pilosulin 1), die Pilosuline 3, 4.1 und 5 aber formen über Disulfidbrückenbindungen Hetero- bzw. Homodimere aus. Pilosulin 3 zeigte antimikrobielle Aktivität [53] und ist das dominante Allergen im Gift von *M. pilosula*. Gemeinsam mit [Ile^5]Pilosulin 1 ist es mit rund 80 % auch der Hauptbestandteil des Giftes [40]. Synthetisch hergestelltes Pilosulin 3, 4 und 5 Dimer führten zu einer Histaminausschüttung, was den allergenen Charakter der Pilosuline unterstreicht [53, 64].

Eine der wichtigsten Molekülstruktur der Giftpeptide stellen die cysteinreichen Peptide dar. Sie zeichnen sich durch ihre große Stabilität aufgrund charakteristischer Disulfidbrückenbindungen zwischen sechs Cysteinen aus. Eines dieser Strukturmotive wird als Inhibitor-Cystein-Knoten (*inhibitor cystine knot*, ICK) bezeichnet und ist eine konservierte Struktur, die sich unter anderem in Pflanzen, Viren, antimikrobiellen Peptiden und im Gift vieler verschiedener Organismen wie Spinnen, Skorpionen und Bienen wiederfindet [40, 65]. Toxine und Inhibitoren mit ICK-Domäne blockieren oftmals die Funktion größerer Proteinrezeptoren wie Ionenkanäle oder Proteasen [66]. Aufgrund der chemischen Stabilität und ihrer Art Resistenz gegenüber proteolytischen Degradation, die durch das ICK-Motiv entsteht, stellen diese Toxine eine interessante Leitstruktur im Wirkstoffdesign dar. Die Substitutionsmöglichkeit der Aminosäuren zwischen den Cysteinen ist ebenfalls hervorzuheben [65–68]. Obwohl die ICK-Strukturmotive in vielen Arthropodengiften, insbesondere Spinnengiften, häufig vorkommen, sind diese in Ameisen bisher nur in *D. quadriceps* entdeckt worden [69]. Ein ICK-ähnliches Proteinstrukturmotiv zeigen die dem epidermalen Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) ähnelnde Toxine auf. Sie bestehen ebenfalls aus drei Disulfidbrückenbindungen zwischen sechs Cysteinen, unterscheiden sich aber im Abstand und der Anordnung ihrer Cysteine. Sie wurden erstmalig in Seeanemonen [70] und im Zusammenhang mit Ameisengift zunächst in *M. gulosa* beschrieben [44, 71]. Das als Signalmolekül fungierende EGF kommt in Abwandlungen im gesamten Tierreich vor [72], bindet an korrespondierende EGF-Rezeptoren und beeinflusst unter anderem Zellwachstum und -differenzierung. Es gibt Anzeichen, dass die dem EGF ähnelnden Toxine diese Signaltransduktion stören und für die Modulation von Schmerzen verantwortlich sind [44].

Zur zweiten Gruppe der Polypeptidkomponenten in Ameisengiften zählen Enzyme, die Hauptver-

mittler der biologischen Aktivität im Gift. Verschiedene Serin-, Metalloproteasen und Phosphatasen sind typische Enzyme in Ameisengiften [43]. Wie bei anderen Hymenoptera auch, spielen die Phospholipasen auch bei den Ameisen eine wichtige Rolle. Diese Enyzmgruppe hydrolysiert Esterverbindungen in Fettsäuren und anderen lipophilen Substanzen. Die Esterspaltung führt in Doppellipidschichten zur Porenbildung und Zytolyse und ist dadurch oft der Anfang von Entzündungsreaktionen, was wiederum zu Gewebeschäden führt. In Ameisengiften ist vor allem die Phospholipase A1 vorherrschend [43, 73–75]. Aus Studien mit anderen Phospholipase A-haltigen Tiergiften ist weiterhin eine neurotoxische und hämolytische Wirkweise bekannt. Die Phospholipasen lösen zudem allergische Reaktion aus und verantworten vermutlich die häufig auftretende Kreuzreaktivität bei Insektengiftallergikern [76–78].

Die beschriebenen Eigenschaften von Ameisentoxinen, mit großer chemischer Stabilität und den mitunter einfachen aber effektiven pharmakologischen Wirkweisen, dienen als Basis und Ideengeber möglicher Anwendungsszenarien und ermöglichen die anwendungsorientierte Grundlagenforschung.

1.4 Das translationale Potenzial von Ameisengiften

Ameisengifte sind über Jahrmillionen hinweg evolutionär für ihre biologischen Funktionen selektiert worden. Als Resultat handelt es sich bei ihnen um eine Mischung hochpotenter Biomoleküle mit wertvollen Aktivitäten gegen verschiedene pharmakologisch relevante Rezeptoren oder Krankheitserreger, wie auch gegen andere Insekten. Dies ermöglicht ihre Translation in verschiedene Anwendungsbereiche, vor allem in der Biomedizin und Landwirtschaft.

Neben der Verteidigung der Kolonie gegen Wirbeltiere, werden Ameisengifte auch eingesetzt, um sie gegen andere Insekten zu verteidigen oder um Insekten als Beutetiere zu überwältigen. Eine Anwendung von Ameisentoxinen als mögliches Bioinsektizid ist daher naheliegend. Rezente Arbeiten von Heep *et al.* identifizierten in den Giften von *M. rubra* und *Manica rubida* via Fraktionierung, Massenspektroskopie und chemischer Synthese bislang unbekannte Peptide mit Aktivität gegen Blattläuse (*Acyrthosiphon pisum*). Vor allem das über Futter zugeführte Toxin U-MYRTX-MRArub1 verursachte eine Mortalität von 60 % nach 3 Tagen [79]. U-MYRTX-MANr1 aus *M. rubida* wurde injiziert und zeigte in höheren Dosen eine Mortalität von 93 % nach 10 Tagen [80]. Histologische Schnitte durch das Abdomen der Blattläuse nach Injektion des Rohgiftes aus *M. rubida* zeigten eine schlechte Wundheilung an der Einstichstelle sowie eine deutlich beeinträchtigte Embryonenentwicklung [80]. Auch wenn die einzelnen Toxine eine geringere Wirksamkeit als das gesamte Rohgift zeigen, unterstützen diese Daten, dass Ameisengifte als mögliche Bioressource für neue insektizide Peptide verwendet werden könnten.

Schnelle und starke insektizide Effekte werden auch von Touchard *et al.* für Toxine aus *Pseudomyrmex penetrator* beschrieben. Über Massenspektrometrie, Fraktionierung und Toxizitätstests in AAL-C6/36-Zellen aus der Asiatischen Tigermücke (*Aedes albopictus*) gelang es, ein heterodimeres Peptid (Δ-PSDTX-Pp1a) zu identifizieren. Dieses zeigte ähnlich starke zytotoxische Wirkung wie das gesamte Rohgift von *P. penetrator* und ist eine dessen Hauptkomponente. Injiziert in *Lucilia cuprina* aus der Familie der Schmeißfliegen (Calliphoridae), setzte sofort eine irreversible und letale Paralyse ein [50]. Zuvor wurden insektizide Effekte durch Ameisengift als deutlich schwächer und oft reversibel beschrieben [50, 80, 81]. Δ-PSDTX-Pp1a zeigt weiterhin eine hohe proteolytische und thermische Stabilität, welche durch dessen Sekundärstruktur bestimmt wird [50]. Diese Stabilität kann eine interessante Vorlage bei der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze sein, bei denen die Stabilität der Moleküle entscheidend ist.

Ein weiteres, vielversprechendes Anwendungsfeld ergibt sich aus der rezenten Arbeit von Nixon *et al.* Die Studie beschreibt fünf Toxine aus den Giften der südamerikanischen Ameisen *Neoponera commutata* und *Neoponera apicalis*. Den Autoren gelang es, Komponenten zu isolieren, welche starke Aktivitäten gegen den veterinärmedizinisch relevanten, blutsaugenden Nematoden *Naemonchus contortus* zeigten. Dieser ist als Endoparasit bei kleinen Wiederkäuern, wie Schafen und Ziegen, in Mitteleuropa weit verbreitet. Ein starker Befall kann für die Tiere lebensbedrohlich werden, da neben einer Entzündungsreaktion im Magen-Darm-Trakt der Blutverlust zur Anämie führen kann [83]. In Versuchen konnte die Entwicklung der Nematodenlarven gehemmt werden und führte in höheren Dosen sogar zu deren Tod direkt nach dem Schlupf [82]. Daraus ergibt sich eine mögliche Anwendung dieser Toxine in der Veterinärmedizin.

Wie bereits erwähnt, zählen die Stiche von *Myrmecia gulosa* zu den besonders schmerzhaften. In einer rezenten Studie konnten Eagles *et al.* im Gift von *M. gulosa* das Toxin identifizieren, welches diesen starken Effekt auslöst. Dabei handelt es sich um ein dem epidermalen Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) ähnelndes Toxin (MIITX$_2$-Mg1a), welches vermutlich an komplementäre EGF-Rezeptoren bindet. Im Mausmodell zeigte sich tagelang anhaltender Schmerz auf mechanische Reizung nach Injektion des Toxins MIITX$_2$-Mg1a in die Pfote der Tiere [44]. Diese Ergebnisse zeigen die potenzielle Modulation von Schmerz über EGF-Rezeptoren und den dazugehörigen Liganden. Es gibt bereits Studien, die den Einfluss von EGF-Rezeptoren auf intrazelluläre Signalwege bestätigen, die bei Schmerzen aktiviert werden [84, 85]. Mit den EGF-ähnlichen Toxinen kommt nun ein weiteres Instrument hinzu, diese Zusammenhänge zu verstehen und in die Schmerztherapie einzubringen.

Obwohl das Potenzial der Ameisengifte schon lange erkannt ist, konnten diese bisher wenig bis kaum zur Anwendung gebracht werden. Ein Grund dafür sind die bisher verfügbaren aufwendigen Analysemethoden. Neueste Methoden der Systembiologie, so genannte *Venomics*-Ansätze,

eröffnen nun erstmalig die Möglichkeit, auch Ameisengifte mit geeigneter Effizienz zu erschließen.

1.5 Mit *Venomics* zur Entschlüsselung der Ameisengifte

Trotz des gewaltigen translationalen Potenzials sind die Gifte der meisten Ameisenarten bislang unerschlossen. Von den über 14.000 bekannten Ameisenarten waren in 2016 lediglich 11 verschiedene Ameisenarten in nennenswerter Weise hinsichtlich ihres Giftes untersucht worden [43]. Im Februar 2023 werden gerade einmal 24 Ameisenarten mit 131 Toxinen in der Tiergiftdatenbank `VenomZone` aufgeführt [1, 52]. Die identifizierten Toxine unterliegen weiterhin einer taxonomisch und geografisch stark verzerrten Perspektive, denn über 70 % der dort gelisteten Ameisentoxine wurden aus den groß werdenden tropischen Arten, vor allem der Unterfamilien Ponerinae, Myrmeciinae oder Ectatomminae, beschrieben [52]. Die Gifte der kleineren zentraleuropäischen Vertreter der Myrmicinae verbleiben bislang nahezu unangetastet.

Der Hauptgrund für das weiträumige Vernachlässigen der Gifte kleinerer Ameisen folgt aus methodischen Hürden [40]. Die Entschlüsselung von Giftkomponenten erfolgte in der Vergangenheit primär mit Hilfe von Massenspektrometrie und Biofraktionierung. Solche Strategien ermöglichten schon im 20. Jahrhundert erste oberflächliche Einblicke in die Zusammensetzung der Gifte von beispielsweise *M. ruginodis* [86], *Solenopsis invicta* [87] und Ameisen der Gattung *Monomorium* [88]. Nach einer chromatographiebasierten Fraktionierung des Giftes konnten einzelne Bestandteile mittels strukturbiologischer Methoden wie der Edman-Degradierung [89] oder NMR-Spektroskopie weitergehend untersucht werden.

Obwohl derartige, traditionelle Ansätze noch immer Anwendung innerhalb der Tiergiftforschung finden [79–81], stoßen sie bei kleinen Arthropoden, wie Ameisen, aufgrund einer hohen Probenintensität schnell an ihre Grenzen. Während bei größeren Gifttieren, wie Schlangen, hohe Ausbeuten an Rohgift gewonnen werden können, enthalten die Giftdrüsen kleiner Arthropoden nur mikroskopische Mengen. Daraus folgt, dass für die notwendige Menge an Rohgift mehrere hundert Tiere benötigt werden. Je nach Methodik müssen die Tiere sogar geopfert werden, was bei streng geschützten Arten, wie es bei vielen Ameisen der Fall ist, ein weiteres Problem darstellt. Des Weiteren ist auch die Giftentnahme *per se* ein wichtiger Faktor. Bei vielen großen Gifttieren kann das Gift relativ einfach durch mechanische Vorgänge, wie dem „Melken“ von Giftschlangen, gewonnen werden. Bei kleineren Arthropoden ist dies in dieser einfachen Form nicht möglich und methodisch umfangreiche, auf die jeweilige Art angepasste Methoden müssen häufig erst entwickelt werden. In großer Regelmäßigkeit scheitert die Giftentnahme vollständig, da so geringe Giftmengen abgegeben werden, dass ein Auffangen gar nicht erst möglich ist. Ein

letzter wichtiger Faktor, der zur Vernachlässigung europäischer Ameisengifte führte, ist ein anthropozentrischer Fokus auf medizinisch bedeutsame Arten. Mehrere tropische Ameisen sind in der Lage, extrem schmerzhafte Vergiftungen zu verursachen. Getrieben durch den Bedarf an einem umfassenden Verständnis der Pharmakologie dieser Gifte hat sich die Forschung primär auf solche Arten fokussiert. Dies resultierte in einer Forschungslücke bei Arten in Hinblick auf deren Gifte, die sprichwörtlich direkt vor der eigenen Haustür leben und mit denen wir tagtäglich in Kontakt kommen können. Auch wenn Ameisenstiche medizinisch in Europa neben den Bienen- und Wespenstichen eine untergeordnete Rolle spielen [90], so können auch Stiche europäischer Ameisen vereinzelt behandlungsbedürftige allergische oder sogar anaphylaktische Reaktionen auslösen [91]. Dies ist zum Teil durch die hohe Kreuzreaktivität bei Wespengiftallergikern zu erklären [90].

Erst in den letzten Jahren ergaben sich effiziente Möglichkeiten, vermehrt die Gifte kleinerer europäischer Ameisen zu untersuchen und auf die Identifikation der Giftkomponenten hinzuwirken [43, 71]. Moderne Methoden der Systembiologie, unterstützt durch leistungsfähige bioinformatische Anwendungen, ermöglichen es mittlerweile mit großer Präzision und hohem Durchsatz, die Gifte von Tieren in Kleinstmengen an Rohgift oder aus dissektierten Giftdrüsen abzuleiten. Die verschiedenen systembiologischen Analysemethoden werden als *Omics*-Methoden bezeichnet und lassen sich in verschiedene Teilbereiche wie Proteomik, Transkriptomik oder Genomik differenzieren. Ihre Anwendung auf Giftsysteme wird als *Venomics* bezeichnet. Durch die Kombination mehrerer *Omics*-Methoden werden auch die Ergebnisse auf unterschiedlichen Ebenen validiert und somit die Präzision weiter gesteigert. Eine besonders schlagfertige Kombination von *Omics*-Methoden ist die der Proteotranskriptomik, die Proteomik mit Transkriptomik verbindet.

Die Generierung von *de novo*-Transkriptomen basiert, im Kontext von *Venomics*, auf der Sequenzierung von isolierter RNA aus Giftdrüsengewebe. Diese Sequenzierungen sind mittlerweile kostengünstig und im großen Maßstab möglich [92, 93]. Die generierten kurzen *Reads* werden mit Assemblieralgorithmen zu längeren *Contigs* (*contiguous sequences*) zusammengesetzt. Ein Qualitätsmerkmal ist hierbei die Verwendung möglichst vieler *Reads* zur Assemblierung der *Contigs*, die dann in ihrer Gesamtheit ein *de novo*-Transkriptom darstellen. Werden *Contigs* gebildet, die *in vivo* nicht vorkommen oder falsch zusammengefügt wurden (Chimären), spricht man von falsch-positiven *Contigs*. Da *de novo*-Transkriptome ohne ein vorhandenes Genom assembliert werden und die Insektengifte oft nur durch kurze Nukleotidsequenzen kodiert werden [52], führt dies zu erhöhten falsch-positiv-Raten und damit einer überschätzten Diversität der Transkripte. Die Qualität der assemblierten Transkriptome ist zudem immer vom verwendeten Programm (Assembler) abhängig. Um Schwächen einzelner Assembler auszugleichen, ist man dazu übergegangen, mehrere Assembler parallel zu verwenden und deren Ergebnisse zu

kombinieren [94–96]. Dadurch erhöht sich zwangsläufig die Anzahl falsch-positiver *Contigs* weiter, da zusätzlich noch kleinste (eine Nukleotidbase) voneinander abweichende *Contigs* parallel erhalten bleiben. Deshalb müssen die Transkriptomdaten möglichst noch durch korrespondierende Proteomdaten gestützt werden, um eine präzisere Charakterisierung der Giftzusammensetzung zu ermöglichen.

Mit der Massenspektrometrie von Rohgiften können heutzutage schon kleinste Giftmengen auf deren Proteinzusammensetzung hin untersucht werden. Bei dieser Methode werden die gemessenen Proteine mit bekannten Proteinsequenzen abgeglichen, was die Methode stark von der zugrunde liegenden Datenbank und deren Qualität abhängig macht. Da es bei den Ameisengiftpeptiden eine Forschungslücke gibt, führt dies dazu, dass zu vielen gemessenen Proteinen keine Vergleichssequenz zur Verfügung steht. Die Lösung besteht in der Nutzung der Transkriptomdaten, woraus sich hervorragende Datenbanken generieren lassen, spezifisch für die jeweilige Ameisenart. Hierfür werden *open reading frames* (ORFs) in den Transkriptomdaten gesucht und als Datenbank für die Massenspektrometrie zur Verfügung gestellt, was auch die Identifikation neuer Biomoleküle in Ameisengiften ermöglicht. Dies geschieht völlig unabhängig von externen Datenbanken und reduziert somit die vielen Voraussagen aus den kombinierten *de novo*-Transkriptomen durch die massenspektrometrische Analyse. Die dadurch validierten ORFs können im Anschluss durch Ähnlichkeitssuchen in externen Datenbanken funktional annotiert werden. Somit werden die Schwächen mit den Stärken der jeweils anderen Methode nivelliert und ermöglichen einen maximalen Erkenntnisgewinn.

Die verschiedenen *Omics*-Daten entstehen mittlerweile im Hochdurchsatzverfahren, wobei eine große Datenmenge entsteht, die in aller Regel nur noch computergestützt zu beherrschen ist. Die Nutzung moderner bioinformatischer Programme und deren individueller Anpassung an die entsprechenden zu analysierenden Daten, bildet damit einen weiteren Teil von *Venomics*. Mit verfügbaren öffentlichen Datenbanken lassen sich durch die Verwendung verschiedener bioinformatischer Algorithmen große Datenmengen aus den *Omics*-Disziplinen annotieren und man erhält in kurzer Zeit sehr viele Ergebnisse. Insbesondere bei den Ameisengiften handelt es sich oft um kurze lineare Peptide [40, 43, 52]. Solche Proteine können heutzutage einfach und kostengünstig synthetisch hergestellt werden. Diese Verfügbarkeit ermöglicht es, die Wirkung und Anwendungsmöglichkeiten der Proteine im Labor zu testen und erweitert das Potenzial von Giftanalysen über deren reine Toxinidentifikation hinaus.

Durch die Kombination der vorgestellten systembiologischen Disziplinen und der kostengünstigen Verfügbarkeit der dazugehörigen Labormethoden, ist es erstmals möglich das Gift kleiner, heimischer Ameisenarten zu untersuchen und zu charakterisieren, selbst mit einer geringen Probenmenge. So können grundlegende biologische Fragestellungen beantwortet und die in

Ameisengiften verborgenen Biomoleküle für die Wertschöpfung erschlossen werden.

1.6 Fragestellungen und Hypothesen der Dissertation

In der vorliegenden Arbeit widme ich mich der Aufklärung der Giftzusammensetzung von zwei in Europa heimischen Ameisenarten, *Myrmica rubra* und *Myrmica ruginodis* (Abbildung 1.1). Gerade weil diese kleineren zentraleuropäischen Arten weitgehend unerforscht und vermutlich unterschätzt sind, möchte ich diese Forschungslücke schließen. Ich habe mich für die Nutzung eines modernen *Venomics*-Ansatzes entschieden, der die Ergebnisse einer Transkriptomanalyse des Giftdrüsengewebes auf Nukleotidebene mit den Auswertungen einer Proteomanalyse des rohen Ameisengiftes auf Aminosäurenebene kombiniert. Mit dieser Methodik will ich den folgenden drei Arbeitshypothesen nachgehen.



Abbildung 1.1: Verschiedene Ameisen der Gattung *Myrmica*. Oben: *Myrmica ruginodis* Unten: *Myrmica rubra* Links: Arbeiterinnen mit Eiern. Rechts: Einzelne Individuen. Alle Bilder mit freundlicher Erlaubnis von Dr. Joachim Holstein (Staatliches Museum für Naturkunde Stuttgart, SMNS), CC BY 4.0.

Hypothese 1: Gifte heimischer Ameisen sind komplex und beinhalten bislang nicht bekannte Biomoleküle
Ich erwarte, dass das Gift der zentraleuropäischen Ameisenarten aufgrund der ähnlichen biologischen Funktion im Bereich der Feindabwehr eine vergleichbare Komplexität aufweist, wie das Gift ihrer tropischen Verwandten. Es wird sich dabei auch um andere Biomoleküle als im Gift der tropischen Vertreter handeln, darunter bisher unbekannte Toxine, die im Gift der heimischen Ameisen noch zu entdecken sind.

Hypothese 2: Giftkomponenten heimischer Ameisen unterstützen die Verteidigungsfunktion
Die heimischen Ameisen setzen ihr Gift zum Eigenschutz und zur Verteidigung gegen Prädatoren und Mikroorganismen ein und nutzen dafür ein Arsenal an zu bestimmenden Giftkomponenten. Ich erwarte daher, dass auch die Gifte der heimischen Ameisen viele, für defensive Anwendungen typischen Toxine, wie zum Beispiel cysteinreiche Toxine oder Serinproteasen beinhalten.

Hypothese 3: Ameisentoxine aus heimischen Arten haben Anwendungspotenzial
Bekannte Ameisentoxine zeigen bereits jetzt ihr translationales Potenzial als Insektizid sowie als Schutz gegen Viren oder Bakterien. Eine ähnliche Wirksamkeit der neuen Biomoleküle aus dem Gift heimischer Arten möchte ich im Labor untersuchen und deren Potenzial als Insektizide oder antimikrobielle Peptide nachweisen.

1.7 Aufbau der Dissertation

Das nachfolgende Kapitel 2 gibt einen Überblick über Methodik und Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Dazu wurden von mir bereits zwei Publikationen im Fachjournal *Toxins* veröffentlicht und einem *Peer Review* unterzogen. In Kapitel 3 diskutiere ich die Ergebnisse auf Basis der in Kapitel 1.6 aufgestellten Arbeitshypothesen und schließe mit einem Ausblick auf sowohl zukünftige als auch bereits begonnene Arbeiten zu den hier erarbeiteten Ergebnissen in Kapitel 4 ab.

Die verwendeten Tiere der beiden Arten *M. rubra* und *M. ruginodis* zählten zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Doktorarbeit nicht zu den „besonders zu schützenden Tierarten“ [97], unterliegen aber dem allgemeinen Schutz des Bundesnaturschutzgesetzes [98]. Für die Verwendung der Tiere war somit keine behördliche Erlaubnis nötig. Internetadressen, Eigennamen von Programmen, Datenbanken und Institutionen sind in `Schreibmaschinenschrift` geschrieben. Englische Bezeichner werden *kursiv* dargestellt. Die Abbildungen 2.1 und 2.3 wurden mit `BioRender.com` erstellt. Die Abbildung auf Seite 43 basiert auf einem Foto aufgenommen von Dr. Joachim Holstein.

2 Kumulativer Teil der Dissertation

Um die in Kapitel 1.6 formulierten Hypothesen zu prüfen, habe ich mich im Rahmen meiner Arbeit eingehend mit den Giften heimischer Ameisen befasst und die resultierenden Ergebnisse in zwei Publikationen veröffentlicht. Nachfolgende Abschnitte geben eine Zusammenfassung der beiden Veröffentlichungen wieder. In Kapitel 2.1 liegt der Schwerpunkt auf der allgemeinen Zusammensetzung des Giftes der von mir untersuchten Ameisenarten. Kapitel 2.2 beschreibt die gezielte Suche nach Anwendungsmöglichkeiten bestimmter Ameisentoxine.

2.1 Aufklärung der Giftzusammensetzung von *Myrmica rubra* und *Myrmica ruginodis* mit Hilfe von *Venomics*-Methoden

Im ersten Teil meiner Arbeit widme ich mich der Beschreibung der Giftzusammensetzung zweier heimischer Ameisenarten. Für die besonders in Zentraleuropa erfolgreichen Vertreter der Myrmicine (Unterfamilie Myrmicinae) *Myrmica rubra* und *Myrmica ruginodis* wurde ein moderner *Venomics*-Ansatz angewandt, welcher Transkriptom- (*Transcriptomics*) mit Proteomdaten (*Proteomics*) kombiniert (Proteotranskriptomik). Eine Übersicht des Arbeitsablaufes ist in Abbildung 2.1 dargestellt und soll im Folgenden kurz erläutert werden.

Das Gift von je zwei Pools, bestehend aus jeweils 26 Tieren je Art, wurde durch ein eigens im Rahmen meiner Arbeit entwickeltes Protokoll direkt in Lösemittel gewonnen. Während frühere Arbeiten auf arbeitsintensiven Prozessen wie Elektrostimulation oder manueller Dissektion des Giftapparates basierten, wird bei dem von mir eingesetzten Verfahren die Ameise für kurze Zeit in Ethanol untergetaucht. Dadurch werden die Tiere gereizt und beginnen mit ihren zum Stachel modifizierten Ovipositor ihr Gift in das Lösemittel zu injizieren. Das Lösemittel wird im Anschluss durch Gefriertrocknung entfernt. Mit der beschriebenen Methode können so innerhalb weniger Stunden große Giftprobenmengen gewonnen werden. Von großem Vorteil dabei ist, dass die Tiere ihr Gift abgeben ohne zwingend geopfert werden zu müssen. Das gewonnene Rohgift dient nachfolgend als Ausgangsprodukt für *bottom-up*-Proteomik. Dazu wurde es mit Trypsin verdaut, die Spektren der resultierenden Peptide auf einem `Orbitrap Elipse`

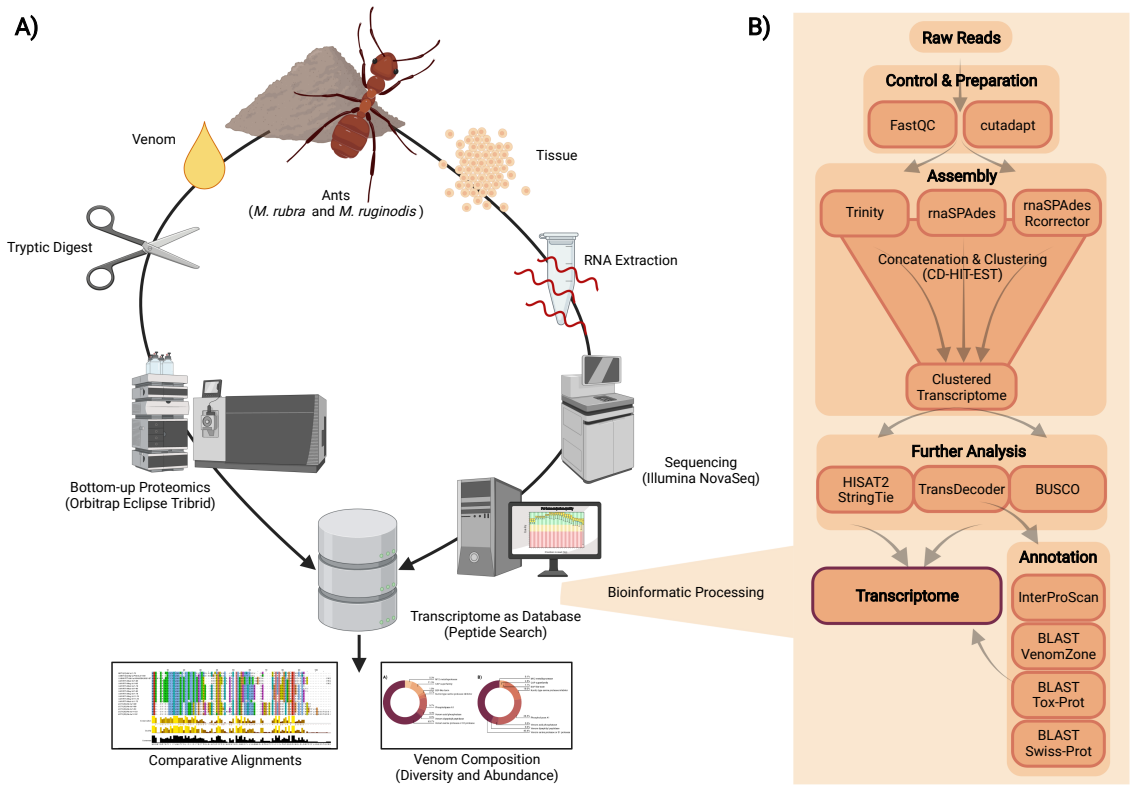


Abbildung 2.1: Proteotranskriptomischer Arbeitsablauf zur Bestimmung von Proteinen in Ameisengift (A) Proteomische Arbeiten mit Gewinnung des Giftes und des *bottom-up*-Ansatzes mit Hilfe der `Orbitrap Elipse Tribrid`-Massenspektrometrie basierend auf der Datenbank aus (B) der Transkriptomanalyse. Hierzu wurde die RNA mit `Illumina NovaSeq` sequenziert, die Daten im Anschluss vorverarbeitet und mit unterschiedlichen Ansätzen zu einem Gesamttranskriptom zusammengefasst und annotiert. Nur die Transkripte, welche auf Proteinebene bestätigt werden konnten, gingen in die weiterführende Analyse ein [99].

`Tribrid`-Massenspektrometer vermessen und mit *in silico* verdauten Aminosäuresequenzen und deren theoretischer Masse zur Proteinidentifikation abgeglichen.

Nach der Giftgewinnung wurden die verwendeten Tiere geopfert und deren Giftdrüsengewebe herauspräpariert. Aus dem Giftdrüsen- und verbliebenen Körpergewebe konnte daraufhin die RNA isoliert und je Gewebetyp und Pool eine RNA-Sequenzierung durchgeführt werden. Die Sequenzdaten wurden unter Berücksichtigung der toxinspezifischen Gegebenheiten, wie beispielsweise zu erwartende kurze Sequenzstücke von maximal 30 Basenpaaren beziehungsweise 10 Aminosäuren, zu einem Transkriptom zusammengefasst. Dieses Transkriptom diente als Datenbank für den *in silico*-Verdau zur Identifikation der Peptide aus dem *bottom-up*-Proteomik-Experiment. Es wurden nur Proteinsequenzen weiter analysiert, deren Anwesenheit auf Proteinebene mit der Massenspektrometrie validiert werden konnte.

Nach weiteren Filterschritten zur Qualitätssicherung ergab sich für *M. rubra* eine Liste von insgesamt 288 Proteinspektren, die einem offenen Leseraster (*open reading frame*, ORF) aus dem Transkriptom zugeordnet wurden, 255 dieser ORFs konnten mit einer `BLAST`-Ähnlichkeitssuche [100] in den öffentlich zugänglichen Datenbanken `UniProtKB/Swiss-Prot` [101], `VenomZone` [52] sowie `UniProtKB/Swiss-Prot Tox-Prot` [102] annotiert werden. Für *M. ruginodis* war von den gefilterten 381 Proteinspektren für 348 der korrespondierenden Aminosäuresequenzen eine Annotation mit den genannten Datenbanken möglich. Die annotierbaren Proteinsequenzen wurden im weiteren Verlauf mit Hilfe von `InterProScan5` [103] verschiedenen Giftproteinfamilien zugeordnet. Einige toxinartige Transkripte werden in Körpergewebe exprimiert und sind keine Bestandteile des eigentlichen Giftes. Um solche „Pseudotoxine“ zu entfernen, habe ich ausschließlich die jeweiligen ORFs von einem *Contig* des Transkriptoms weiterverwendet, die mehrheitlich durch *Reads* aus der RNA-Sequenzierung des Giftdrüsengewebes unterstützt wurden. Alle verbliebenen Proteinsequenzen wurden darüber hinaus manuell durch vergleichende Sequenzalignments mit den Datenbanktreffern aus der `BLAST`-Ähnlichkeitssuche, Proteinfamilienvertretern aus `VenomZone` und `UniProtKB/TrEMBL` [101] sowie verfügbaren Sequenzen der Proteindomäne aus `Pfam` [104] validiert.

Die Kombination von proteomischen mit transkriptomischen Daten und der Einsatz meiner umfassenden bioinformatischen Qualitätssicherung ermöglichten es mir, die Giftzusammensetzung der beiden untersuchten Ameisenarten zum ersten Mal zu beschreiben. *Myrmica rubra* zeigte sich mit 44 Giftproteinen aus drei Familien weniger divers als *M. ruginodis* (113 Giftproteine aus acht Familien). In *M. rubra* gehörte mit 37 der 44 Proteine die Mehrheit zu den Serinproteasen. Vier Proteine konnten den sauren Phosphatasen und die verbliebenen drei Proteine den CAP-Proteinen (*cysteine-rich secretory proteins, antigen 5 and pathogenesis-related 1 proteins*) zugeordnet werden. Auch im Gift von *M. ruginodis* gehörten mit 72 von insgesamt 113 Proteinen die Mehrzahl aller Giftkomponenten zu den Serinproteasen. Die restlichen Bestandteile teilen sich in sieben weitere Proteinfamilien auf: CAP-Proteine (13/113), Phospholipasen A1 (11/113), Metalloproteasen M12 (6/113), saure Phosphatasen (5/113), Serinprotease-Inhibitoren des Kunitz-Typs (3/113), EGF-ähnliche Peptide (2/113) sowie Dipeptidylpeptidasen S9 (1/113). Hervorzuheben ist hier der Nachweis von Phospholipase A1 in *M. ruginodis*. Phospholipase A1-Proteine sind eine in der Ordnung der Hymenoptera weit verbreitete, wichtige allergene Giftkomponente, wurden aber in *M. ruginodis* bisher nicht nachgewiesen [86]. Mit der hier vorliegenden Studie konnten diese Proteine erstmalig in *M. ruginodis* beschrieben werden.

Mit den identifizierten CAP-Proteinen, welche nach einem Stich oder Biss von Ameisen und anderen Hymenoptera oft für allergische Reaktionen verantwortlich sind [105], konnte zusätzlich eine wichtige Komponente in den beiden untersuchten *Myrmica*-Arten identifiziert werden. Die meisten der gefundenen Proteinsequenzen zeigen eine hohe Ähnlichkeit zum Allergen 3 aus

Solenopsis richteri, welches zum Teil schwere anaphylaktische Schocks bei Menschen auslösen kann und eine hohe Kreuzreaktivität aufweist [43, 106–108].

Die Identifikation mehrerer dem epidermalen Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) ähnelnden Toxine in *M. ruginodis* ist eine weitere wichtige Erkenntnis meiner Arbeit. EGFs spielen in Verbindung mit den jeweiligen EGF-Rezeptoren eine Rolle bei der Zellproliferation, -differenzierung und dem Zellwachstum [109, 110]. Sie entwickelten sich in ähnlicher Form im gesamten Tierreich [72]. Das EGF-Sequenzmotiv findet sich als sich wiederholendes Motiv auch in weiteren Peptiden der Familie der EGF-Hormone. Der Aufbau des EGF-Sequenzmotivs besteht aus drei intramolekularen Disulfidbrückenbindungen (C1–C3, C2–C4 und C5–C6 mit C = Cystein), die einem festgelegen Schema folgen ($CX_7CX_{3\text{-}5}CX_{10\text{-}12}CXCX_5GXRC$ mit C = Cystein; G = Guanin; R = Arginin; X = beliebige Aminosäure) [110]. Die EGF-ähnlichen Toxine zeigen hier eine sehr große Strukturähnlichkeit und scheinen das EGF-Sequenzmotiv zu imitieren. Diese Toxine spielen vermutlich auch eine Rolle als Modulator bei Schmerzen. So verursachten in Pfoten injizierte EGF-ähnliche Toxine aus *Myrmecia gulosa* bei Mäusen (*Mus musculus*) über mehrere Tage anhaltende Schmerzreaktionen auf mechanische Reizung [44]. Ähnliche EGF-Sequenzmotive wurden bei weiteren Ameisenarten in Transkriptom- und Genomdaten identifiziert [44, 111, 112]. Obwohl in *M. ruginodis* lediglich zwei Sequenzen im Proteom mit Massenspektrometrie identifiziert wurden, konnten weitere ähnliche Sequenzen im Transkriptom beider untersuchten *Myrmica*-Arten mit Hilfe einer BLAST-Ähnlichkeitssuche gefunden werden. Abbildung 2.2 zeigt das Multisequenzalignment aller von mir identifizierten EGF-ähnlichen Toxine mit ihren Homologen aus *M. gulosa* und *Rhytidoponera metallica* [44, 111].

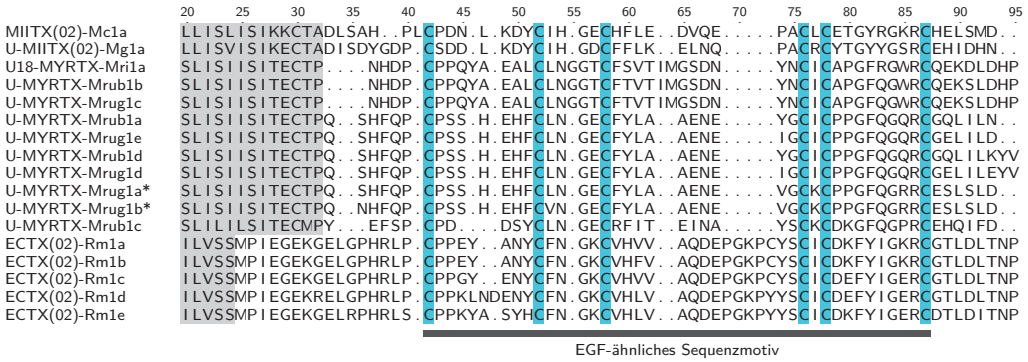


Abbildung 2.2: Ausschnitt Multisequenzalignment der EGF-ähnlichen Toxine der Arten *M. rubra*, *M. ruginodis* und ihre Homologe aus *Myrmecia gulosa* und *Rhytidoponera metallica* [44]. Die vorhergesagten Signalpeptide sind grau und die Cysteine des EGF-Sequenzmotivs blau hinterlegt. Massenspektrometrisch validierte Proteine sind mit * markiert.

Das beschriebene Sequenzmotiv mit drei Disulfidbrücken ist in allen Sequenzen stark konserviert. Weiter konnten mit einer BLAST-Ähnlichkeitssuche Rezeptortypen beziehungsweise korrespondierende EGF-Hormone zu den gefundenen Sequenzen aus dem Transkriptom von *M. rubra* und *M. ruginodis* ermittelt werden. Um die Evolutionsmechanismen der EGF-ähnlichen Toxine zu untersuchen, habe ich molekularphylogenetische Analysen auf Grundlage von *maximum-likelihood*-Kalkulationen eingesetzt. Ein ungewurzelter Baum auf Basis des erstellten Sequenzalignments (Abbildung 2.3) grenzt deutlich die EGF-ähnelnden Toxine der drei Unterfamilien Myrmicinae, Ectatomminae und Myrmeciinae voneinander ab, wobei die Sequenzen der C-Klade Ähnlichkeiten mit EGF-Hormonen aus Insekten wie der Kohlmotte (*Plutella xylostella*) und Haus-Feldwespe (*Polistes dominula*) aufweisen. Die Sequenzen der Kladen A und B deuten eher auf die Mimikry von EGF-Hormonen aus Wirbeltieren hin wie sie beispielsweise in Mausohrfledermäusen (Gattung *Myotis*), Erdkröten (*Bufo bufo*) und dem Hausschaf (*Ovis aries*) vorkommen.

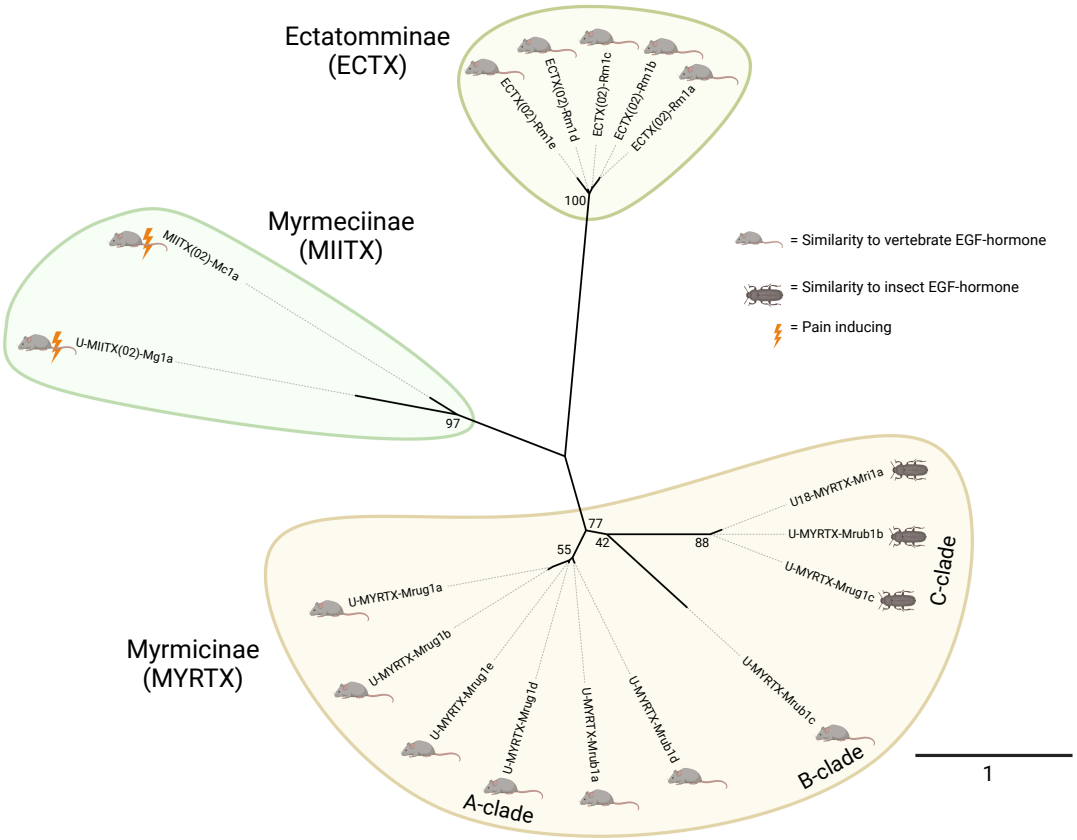


Abbildung 2.3: Ungewurzelter Baum auf Basis des Multisequenzalignments aus Abbildung 2.2. Die Unterfamilien werden klar voneinander abgegrenzt, wobei die Toxine der Myrmicinae in drei Kladen unterteilt sind. Die beiden verwendeten Symbole stehen für die Ähnlichkeiten der Toxine mit EGF-Hormonen aus Wirbeltieren beziehungsweise Insekten aus der BLAST-Ähnlichkeitssuche [99].

2.2 Anwendungspotenzial ausgewählter Toxine in *Myrmica rubra* und *Myrmica ruginodis*

In vorausgehenden Studien konnten bioaktive Peptide in den Ameisen *M. rubra* und *Manica rubida* identifiziert werden, welche Charakteristika von antimikrobiellen Peptiden (*antimicrobial peptides*, AMPs) aufweisen [79, 80]. Bei allen bekannten AMP-ähnlichen Toxinen aus diesen Ameisenarten handelt es sich um Decapeptide, welche mithilfe von *bottom-up*-Proteomik aufgrund ihrer geringen Größe nur schlecht detektiert werden können [113]. Im zweiten Teil meiner Arbeit untersuchte ich daher die Frage, ob die Giftdrüsen der in Kapitel 2.1 untersuchten Arten in der Lage sind, solche Toxine zu exprimieren und welche Funktion sie einnehmen könnten. Dazu wurden die gesamten Transkriptomdaten aus der im vorigen Kapitel untersuchten Ameisenarten für eine `BLAST`-Ähnlichkeitssuche gegen bekannte AMPs aus Giftdrüsen von Myrmicinae wiederverwendet.

Alle mit `TransDecoder` [114] vorhergesagten offenen Leseraster wurden für die Suche nach geeigneten Kandidaten verwendet. Treffer in den Transkriptomdaten wurden mit `SignalP` [115] auf das Vorhandensein eines Signalpeptids vor der vermuteten Proteindomäne überprüft und anschließend einzeln mit den Suchsequenzen aligniert. Die weitere Kandidatenauswahl erfolgte auf Basis dieser Sequenzalignments manuell unter Einbeziehung der Begrenzung auf maximal zehn Aminosäuren als mögliche Proteindomäne. In Abbildung 2.4 sind alle Kandidaten mit vollständiger Aminosäuresequenz zusammen mit den Suchsequenzen als Multisequenzalignment dargestellt und die durch `SignalP` vorhergesagten Signalpeptide sowie die vermutete Proteindomäne hervorgehoben.

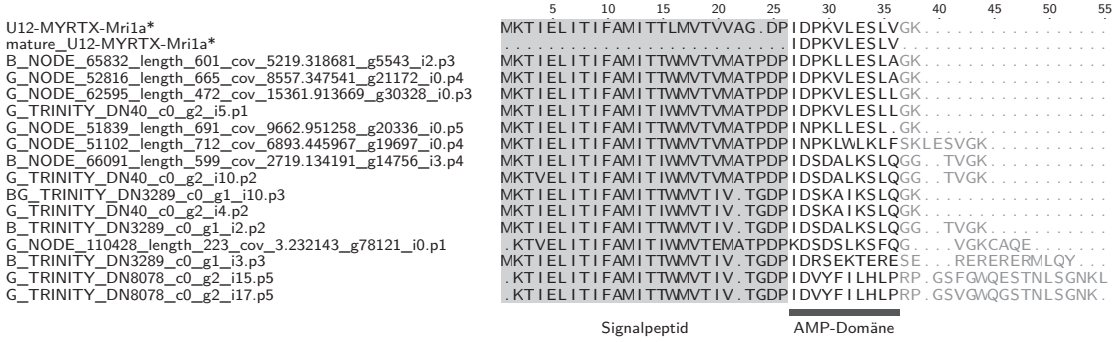


Abbildung 2.4: Multisequenzalignment mit vollständigen Aminosäuresequenzen aus der `BLAST`-Ähnlichkeitssuche mit den Suchsequenzen (mit * markiert). Die durch `SignalP` vorhergesagten Signalpeptide sind grau unterlegt, der Sequenzbereich der angenommenen AMP-Proteindomäne umfasst 9-10 Aminosäuren und ist unterhalb markiert. Die hier aufgeführten Sequenzen wurden noch nicht anhand der endgültig verwendeten Aminosäuresequenzen dedupliziert.

Für die weitere Arbeit wurden nur die Aminosäuresequenzen ohne ihre Signalpeptide weiter untersucht. Nach der manuellen Vorauswahl, Entfernung der Signalpeptide und der Eingrenzung auf die Proteindomäne konnte ich insgesamt zehn verschiedene Transkripte für AMP-ähnliche Toxine, ein Nonapeptid und neun Decapeptide, aus den Giften der beiden Arten (Tabelle 2.1) identifizieren. Dies belegt, dass beide *Myrmica*-Arten, die ich in meiner Arbeit untersuchen konnte, in der Lage sind, für AMP-ähnliche Toxine kodierende mRNAs zu synthetisieren. Um diesen Toxinen eine Funktion zuzuordnen, bedarf es jedoch eingehender Bioaktivitätsscreenings, welchen ich mich ebenfalls in diesem Teil meiner Arbeit gewidmet habe. Dazu wurden alle in *M. rubra* und *M. ruginodis* identifizierten AMP-ähnlichen Toxine bei `GenScript Biotech` (Rijswijk, Niederlande) synthetisiert und von mir in verschiedenen Bioassays charakterisiert.

Tabelle 2.1: AMP-ähnliche Toxine aus den Transkriptomdaten von *M. rubra* und *M. ruginodis*. Zusätzlich sind die Suchsequenzen aus *M. rubida* und *M. rubra* angegeben (markiert mit *).

Toxin	Ameisenart	Sequenz	# Aminosäuren
U_{12}-MYRTX-Mri1a*	*M. rubida*	IDPKLLESLA	10
U_1-MYRTX-Mr1a*	*M. rubra*	IDPKVLESLV	10
U-MYRTX-Mrub2a	*M. rubra*	IDPKLLESLA	10
U-MYRTX-Mrug2a	*M. ruginodis*	IDPKVLESLA	10
U-MYRTX-Mrug2b	*M. ruginodis*	IDPKVLESLL	10
U-MYRTX-Mrub3a	*M. rubra*	IDRSEKTERE	10
U-MYRTX-Mrub4a / Mrug7a	*M. rubra*, *M. ruginodis*	IDSDALKSLQ	10
U-MYRTX-Mrub4b / Mrug3a	*M. rubra*, *M. ruginodis*	IDSKAIKSLQ	10
U-MYRTX-Mrug4b	*M. ruginodis*	IDVYFILHLP	10
U-MYRTX-Mrug5a	*M. ruginodis*	INPKLWLKLF	10
U-MYRTX-Mrug5b	*M. ruginodis*	INPKLLESL	9
U-MYRTX-Mrug6a	*M. ruginodis*	KDSDSLKSFQ	10

Zunächst untersuchte ich, ob die gefundenen Peptide eine Rolle beim Beutefang oder der Verteidigung gegen andere Insekten spielen könnten. Dazu habe ich insektizide Effekte der Komponenten durch Injektionsexperimente in Larven der Großen Wachsmotte (*Galleria mellonella*) untersucht. Dazu wurden die Peptide mit Dimethylsulfoxid (DMSO) verdünnt, in Larven injiziert und die Sterblichkeit der Tiere über 72 Stunden überwacht. Bei drei Toxinen zeigte sich nach 72 Stunden eine schwache Wirkung mit einer Überlebensrate von 80 % (U-MYRTX-Mrub4a / Mrug7a, U-MYRTX-Mrug5b, U-MYRTX-Mrug2b). Eine etwas stärkere Wirkung, mit einer Überlebensrate von 50 % zum Ende des Versuches, zeigte lediglich U-MYRTX-Mrub2a. Die Ergebnisse dieser Tests legen nahe, dass AMP-ähnliche Toxine aus Myrmicinae durchaus einen Effekt gegen andere Insekten haben könnten. Aufgrund der geringen Mortalität und den langen Zeiträumen bis zum Eintreten tödlicher Effekte in den untersuchten Großen Wachsmottenlarven, erscheint eine wichtige Rolle in Beutefang oder Verteidigung gegen Insekten wenig plausibel. Neben der Verteidigung gegen andere Insekten, könnten die Toxine eine Rolle in der Verteidigung gegen Säugetiere spielen. Um dies zu untersuchen, setzte ich Zellviabilitätsstudien

in MDCK-II-Zellen, einer Zelllinie aus Hunden, ein. Da keine der untersuchten Komponenten einen messbaren Effekt gegen diese Zellen verursachte, lässt sich jedoch auch diese Funktion vermutlich ausschließen.

Abschließend untersuchte ich eine mögliche Funktion der AMP-ähnlichen Toxine in der Abwehr von Krankheitserregern, insbesondere Viren und Bakterien. Dabei wurden die Toxine zuerst auf eine mögliche Schutzwirkung gegen vier unterschiedliche Influenza-Virusstämme (A/Hamburg/5/09 (H1N1), A/Hessen/1/03 (H3N2), B/Malaysia/2506/04 (Victoria Linie) und B/Massachusetts/71 (Yamagata Linie)) untersucht. Keines der Toxine zeigte eine Schutzwirkung gegen die verwendeten Virusstämme. Aufgrund der großen Strukturähnlichkeit zu AMPs ist ein mikrobieller Effekt der Komponenten sehr wahrscheinlich. Entsprechend habe ich auch diese Aktivität untersucht. Die antimikrobielle Wirkung wurde gegen sieben pathogene Bakterienstämme der Risikostufe 1 und 2, darunter Stämme von *L. monocytogenes* und *Staphylococcus aureus* getestet. Eine Auflistung der einzelnen Stämme ist in Tabelle 2.2 zu finden.

Tabelle 2.2: Minimale Hemm-Konzentration (MIC) und minimalen bakterizide Konzentration (MBC) des Peptides U-MYRTX-Mrug5a gegen verschiedene Bakterienstämme. Genannt ist die Konzentration bei der mindestens 95 % weniger Wachstum im Vergleich zur Kontrolle (Medium mit Bakterien) messbar war. Die MIC für *L. monocytogenes* beruht auf dem Ergebnis der Bestimmung des MBC und der Informationen aus der dazugehörigen Wachstumskurve.

Stamm	eindeutige Kennung	MIC [µM]	MBC [µM]
Listeria monocytogenes	DSM 20600	(50)	50
Micrococcus luteus	DSM 20030	6,25	6,25
Pseudomonas aeruginosa 50071	DSM 50071	nicht nachweisbar	-
Pseudomonas aeruginosa 1117	DSM 1117	nicht nachweisbar	-
Staphylococcus aureus	DSM 2569	100	nicht bestimmbar
Staphylococcus epidermidis	ATCC 35984, DSM 28319	50	50
Escherichia coli DE3	BL21(DE3)	50	50

Für die durchgeführten Tests wurde von ausplattierten Kulturen eine Übernachtkultur und darauffolgend eine drei Stunden dauernde Tagkultur in Müller-Hinton-II-Flüssigmedium verwendet. Die finalen Experimente wurden im 96-Well-Mikrotiterplatten-Maßstab durchgeführt. Als Positivkontrolle diente Gentamicin [116]. Gemessen wurde die optische Dichte (OD_{600}) bei $\lambda = 600\,\text{nm}$ zur Validierung des Bakteriumwachstums durch Trübung des Mediums. Für einen Ansatz wurde über 60 Stunden eine Wachstumskurve mit Messungen alle 20 Minuten aufgenommen. An den flach verlaufenden Wachstumskurven ist erkennbar, dass das Toxin U-MYRTX-Mrug5a aus *M. ruginodis* bei allen, außer den *Pseudomonas*-Stämmen, eine wachstumshemmende Wirkung zeigte. Für U-MYRTX-Mrug5a konnte eine bakterizide Wirkung, teilweise auch mit einer geringen Toxinkonzentration ($<$100 µmol/l) nachgewiesen werden (Tabelle 2.2). Die Toxine haben vermutlich, wie auch bei anderen linearen Peptiden bereits beschrieben, einen biomembranschädigenden Effekt und führen damit zur Zytolyse.

3 Diskussion

3.1 Gifte heimischer Ameisen sind komplex und beinhalten bislang nicht bekannte Biomoleküle

Bisherige Forschungsarbeiten zu Ameisengiften konzentrierten sich eher auf die einfacher zugänglichen tropischen Arten. Deren Gifte haben oftmals für Menschen eine relevante Wirkung, weshalb mit großer Intensität an ihnen geforscht wird. Gleichzeitig wurden die weniger potent wirkenden und im Labor schwieriger zu handhabenden kleinen Ameisenarten, wie sie in Zentraleuropa vorkommen, oft vernachlässigt. Meine vorliegende Arbeit ermöglicht durch den Einsatz eines modernen *Venomics*-Ansatzes erstmalig einen Blick auf die Giftkomposition der beiden heimischen Ameisenarten *M. rubra* und *M. ruginodis*. Meine in Kapitel 2.1 und 2.2 dargelegten Ergebnisse zeigen, wie mit modernen *Venomics*-Experimenten bisher unbekannte Biomoleküle identifiziert werden können. Waren bisher technisch aufwendige Fraktionierungs- und Charakterisierungsschritte notwendig, können durch die Kombination und Ausnutzung der jeweiligen Stärken der einzelnen *Venomics*-Methoden sowie durch das konsequente Anwenden rezenter bioinformatischer Analysemöglichkeiten heute auch Kleinstmengen von Giften charakterisiert werden. Dadurch gelang es mir 44 respektive 113 bisher unbekannte Biomoleküle in *M. rubra* und *M. ruginodis* zu entdecken und erstmalig deren Giftcocktail aufzuschlüsseln, um so zum Gesamtverständnis dieser chemischen Systeme beizutragen.

Die Gifte der beiden *Myrmica*-Arten sind ausgesprochen hochmolekularer Natur und enthalten viele Komponenten $>$30 kDa. Die wichtigsten Komponenten in beiden Arten sind Serinproteasen und die cysteinreichen Proteine der CAP-Superfamilie. Wie für Ameisengifte zu erwarten, konnte ich weiterhin zeigen, dass Enzyme aus den Klassen der Phospholipasen und weitere Proteasen vertreten sind. In *M. ruginodis* gelang es mir die für Ameisen typische Phospholipase A1 sogar erstmalig nachzuweisen. Auch die chemisch sehr stabilen, cysteinreichen Peptide sind im Gift der beiden europäischen Ameisenarten zu finden. Darunter dem EGF-Hormon ähnelnde Toxine, eine bisher nur in drei weiteren Ameisenarten im Rohgift nachgewiesene Toxinklasse [44, 111, 112]. Zumindest auf mRNA-Ebene konnte ich auch lineare Toxine nachweisen. Zukünftige Arbeiten sollten vor allem darauf abzielen die Gifte weiterer heimischer Myrmicinae zu untersuchen um

weitere Einsichten in deren Gifte zu erlangen und um zu verifizieren, ob die von mir gemachten Beobachtungen auf die Gesamtheit aller Taxa innerhalb dieser Unterfamilie anwendbar sind. Der Kenntnisgewinn über die individuellen, in meiner Arbeit neu identifizierten Toxine ermöglicht nun wertvolle Funktionsstudien, um beispielsweise die Wirkmechanismen von einzelnen Giftpeptidklassen oder dem Gesamtgift zu untersuchen.

Eine wichtige und grundlegende Erkenntnis aus meinen hier geschilderten Arbeiten betrifft die chemische Komplexität der untersuchten Gifte. Betrachtet man kürzlich publizierte Arbeiten über die Zusammensetzung des Giftes tropischer Arten, so zeigt sich, dass deren Gifte oftmals aus vier bis acht Toxinfamilien und insgesamt aus maximal 71 Peptiden je Taxon bestehen (Tabelle 3.1). Dem gegenüber bestehen die Gifte der von mir untersuchten Arten aus drei (*M. rubra*) und acht (*M. ruginodis*) Toxinfamilien. Demnach liegt die chemische Komplexität heimischer Ameisengifte mindestens auf Augenhöhe zur Giftkomplexität der primär untersuchten tropischen Arten. Das Gift übertrifft das bisher komplexeste Ameisengift aus *R. metallica* um 42 Peptide und weist somit eine etwa 60 % größere Peptidanzahl im Gift auf. Demnach stellt das von mir in Kapitel 2.1 aufgeschlüsselte Gift aus *M. ruginodis* das bisher komplexeste bekannte Ameisengift dar.

Tabelle 3.1: Chemische Komplexität von Ameisengiften. Die Tabelle zeigt die Anzahl der Toxinfamilien und Peptide ausgewählter Ameisengifte auf Grundlage proteotranskriptomischer Analysen.

Unterfamilie	Gattung und Art	# Toxinfamilien	# Peptide	Quelle
Myrmicinae	*Myrmica rubra*	3	44	diese Arbeit
	Myrmica ruginodis	8	113	diese Arbeit
	Myrmica ruginodis	k. A.	25	[112]
	Tetramorium africanum	k. A.	41	[112]
	Pogonomyrmex californicus	k. A.	12	[112]
	Stenamma debile	k. A.	6	[112]
	Daceton armigerum	k. A.	4	[112]
	Solenopsis saevissima	k. A.	1	[112]
	Manica rubida	6	13	[111]
	Solenopsis invicta	8	47	[117]
Pseudomyrmecinae	*Tetraponera aethiops*	1	9	[60]
Myrmeciinae	*Myrmecia gulosa*	k. A.	9	[71]
Ponerinae	*Odontomachus monticola*	k. A.	19	[61]
Ectatomminae	*Rhytidoponera metallica*	5	71	[118]

Zusammengenommen zeigen meine Arbeiten, dass entsprechend meiner ersten Hypothese die heimischen Ameisengifte tatsächlich chemisch komplexe Systeme voller wertvoller, neuer Bioressourcen darstellen, welche mindestens auf Augenhöhe zu den hauptsächlich untersuchten tropischen Arten liegen. Dies unterstreicht die Sinnhaftigkeit und Bedeutung von Bioprospektionsprogrammen auch außerhalb der klassischen Biodiversitäts-Hotspots.

3.2 Giftkomponenten heimischer Ameisen unterstützen die Verteidigungsfunktion

Das Überleben eines Ameisenstaates ist stark von deren Verteidigungsstrategie gegenüber Prädatoren abhängig. Neben der Fähigkeit, durch ihre Überzahl an Individuen auch größere Fressfeinde zu überwältigen, setzen sie ihre kräftigen Mandibeln und, sofern vorhanden, ihren Giftstachel ein. Zusätzlich können Ameisen über Körperdrüsen oder ihren Giftstachel Sekrete abgeben. Die biochemisch aktiven Komponenten eines Sekrets zeigen dabei mehrheitlich eine Verteidigungsfunktion.

Ich konnte in den Giften der von mir untersuchten Arten als Hauptkomponente verschiedene Serinproteasen identifizieren, deren Wirkung als zytotoxisch oder hämolytisch beschrieben wird und eine Gewebsschädigung des Angreifers herbeiführen kann. Ebenfalls konnte ich cysteinreiche Giftproteine (CAP-Superfamilie) nachweisen, die eine hohe Ähnlichkeit zum bekannten Allergen 3 aus *Solenopsis richteri* zeigen, welches einen lebensbedrohlichen anaphylaktischen Schock bei Menschen auslösen kann [43, 106–108]. Die in den Kapiteln 1.4 und 2.1 beschriebenen EGF-ähnlichen Toxine konnte ich in beiden Ameisen im Transkriptom und im Rohgift von *M. ruginodis* nachweisen. Die bekannten EGF-ähnlichen Toxine aus *Myrmecia gulosa* verursachen langanhaltende Schmerzen durch eine molekulare Mimikry, welches zur fehlerhaften Daueraktivierung verschiedener EGF-Rezeptoren führt. Die schmerzhafte Wirkung legt nahe, dass die resultierenden Effekte einen Lerneffekt bei Prädatoren provozieren. Einmal schmerzhaft gestochen, wird ein möglicher Fressfeind die Nähe dieser Ameisen in Zukunft vermutlich meiden. EGF-ähnliche Toxine im Gift der von mir untersuchten Arten haben zum Teil große Sequenzähnlichkeiten zu den bekannten, schmerzauslösenden EGF-ähnlichen Toxinen und könnten in ähnlicher Weise eine Verteidigungsfunktion gegen Prädatoren einnehmen. Neben der Verteidigung gegen größere Angreifer, stellen Infektionen durch Mikroorganismen oder Parasiten eine zusätzliche Gefahr für einen Ameisenstaat dar. Durch die hohe Anzahl an Individuen können sich Krankheiten innerhalb des Nests durch die räumliche Nähe verbreiten. Neben ihrer Fähigkeit sich innerhalb des Staates neu zu organisieren um Infektionsketten zu unterbrechen, ist die eigene und gegenseitige Körperpflege (Grooming) bei der Eindämmung von Infektionen von großer Bedeutung [119, 120]. Meine Suche nach AMP-ähnlichen Peptiden identifizierte im Giftdrüsentranskriptom der von mir untersuchten Arten mehrere antibakteriell wirksame Peptide. Nach Synthese der zehn Komponenten konnte ich im Laborversuch eine antimikrobielle, zum Teil sogar bakterizide Wirksamkeit dieser nachweisen, darunter beispielsweise gegen den Lebensmittelkeim *Listeria monocytogenes*. Mit meiner Arbeit konnte ich zeigen, wie in Hypothese 2 formuliert, dass die Gifte heimischer Ameisen ebenfalls eine Verteidigungsfunktion einnehmen. Diese beruht auf den beiden Ebenen der Prädatorenabwehr und der Abwehr von

Mikroorganismen. Insbesondere für die im Transkriptom identifizierten linearen AMP-ähnlichen Toxine, welche zum Teil gegen Insekten wirksam sind, könnte eine Kombination der beiden defensiven Funktionsebenen eine Rolle spielen.

3.3 Ameisentoxine aus heimischen Arten haben Anwendungspotenzial

Im Abschnitt 3.1 führte ich bereits auf, dass die Gifte der von mir untersuchten Ameisenarten eine ähnliche Komplexität aufweisen wie die Gifte tropischer Ameisen (Tabelle 3.1). In den Kapiteln 2.1 und 2.2 konnte ich zeigen, dass die daraus gewonnenen Erkenntnisse direkt für eine translationale Nutzung herangezogen werden können. Eine erste, besonders nennenswerte Proteingruppe sind in diesem Zusammenhang die EGF-ähnlichen Toxine. Diese wurden zweimal im Rohgift sowie zusätzlich noch siebenmal in den Transkriptomdaten der hier untersuchten Arten gefunden. Während vorausgehende Studien australischer Kollegen und die Berichte von Stichopfern von *Myrmecia gulosa* ihre Symptome als langanhaltend und stark schmerzend beschreiben, verursachen die von mir untersuchten Arten deutlich weniger ausgeprägte Effekte. Stiche durch *M. rubra* und *M. ruginodis* werden zwar als unangenehm bis schmerzhaft beschrieben, dauern aber nur kurze Zeit an. Außer bei Insektengiftallergikern scheinen die Stiche dieser beiden Arten keine klinische Relevanz zu haben [90]. Dabei weisen einige von mir entdeckten EGF-ähnlichen Toxine aus *M. rubra* und *M. ruginodis* eine hohe Sequenzähnlichkeit zu den Vertretern aus *M. gulosa* auf. Ein tiefergehendes Verständnis hinsichtlich der Struktur-Funktionsbeziehungen und des Wirkmechanismus der weniger schmerzhaft wirkenden EGF-ähnlichen Toxine im Vergleich zu den stark wirksamen Komponenten aus *M. gulosa* könnte dazu beitragen, die Modulation von Schmerzen und seiner Signalkaskaden besser zu verstehen. Dies könnte neue Ansätze in der Wirkstoffentwicklung für innovative Schmerzmittel ermöglichen. Hervorzuheben ist weiterhin die in den Versuchen von Eagles *et al.* nachgewiesene lange Bioaktivität der *M. gulosa*-Toxine, welche sich nicht in den Effekten von *M. rubra* und *M. ruginodis* manifestiert. Das Identifizieren der Sequenzabschnitte und -motive, die für die An- oder Abwesenheit solcher verlängerten Effekte verantwortlich sind, könnte helfen, in Zukunft Biotherapeutika mit gesteigerter Wirkdauer zu entwickeln.

In zweiten Teil meiner Arbeit nutzte ich die generierten Transkriptomdaten zur Identifikation kurzer linearer Peptide, die Ähnlichkeiten zu antimikrobiellen Peptiden zeigten. Anschließende Versuche mit den synthetisch hergestellten Toxinen zeigten in MDCK-II-Zellen keine zytotoxische Schädigung sowie keine starke insektizide Wirkung in Larven von *G. mellonella*. Auch die antiviralen Screenings gegen mehrere Influenza-Virusstämme zeigten keinerlei

Schutzwirkung. Vielversprechende Aktivitäten zeigten sich jedoch im Aktivitätsscreening gegen verschiedene Bakterienstämme: Von insgesamt zehn Toxinen konnte ich in Versuchen einen Kandidaten ermitteln, der gegen fünf der sieben verwendeten Bakterienstämme eine gute hemmende, zum Teil sogar bakterizide Wirkung zeigte. Die Identifikation der Komponenten aus dem Transkriptom basierte zum damaligen Zeitpunkt auf nur zwei bekannten AMP-ähnlichen Toxinen. Aus dieser Gruppe sind seither jedoch noch weitere Vertreter identifiziert worden, sodass nun eine größere Auswahl an Ausgangssequenzen besteht und mit größerer Präzision nach weiteren AMP-ähnlichen Toxinen aus Giftdrüsentranskriptomen gesucht werden könnte. Ich würde erwarten, dass so zusätzliche antimikrobiell aktive Peptide in den Transkriptomdaten identifiziert werden können. Diese könnten anschließend synthetisiert und im Labor funktional charakterisiert werden. Dieses Beispiel unterstreicht, dass in Anlehnung meiner dritten Hypothese das Anwendungspotenzial von heimischen Ameisengiften bereits unter Anwendung von *Venomics*-Technologien sehr groß ist und durch den effizienten Ausbau bioinformatischer Ressourcen, insbesondere durch die Beschreibung neuer Ausgangssequenzen, noch weiter gesteigert werden kann. Mit diesen Ergebnissen zeigt sich zudem, dass die konsequente Weiternutzung einmal generierter Daten aufbauende Erkenntnisse ermöglicht (FAIR-Prinzip: *Findable*, *Accessible*, *Interoperable*, *Reusable*). Deshalb ist es für mich auch selbstverständlich meine Daten zur Nachnutzung zur Verfügung zu stellen (BioProject PRJNA807911 unter `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/`).

4 Ausblick

Im Laufe der Arbeit ergaben sich neue Fragestellungen, die in Folgeprojekten beantwortet werden sollten. Zum einen sollte die Analyse der wissenschaftlich vernachlässigten Ameisenarten vorangetrieben werden, um ein kohärentes Bild über Giftzusammensetzungen in der gesamten taxonomischen Breite der Formicidae zu zeichnen. Mit den in meiner Arbeit vorgestellten Methoden eines modernen *Venomics*-Ansatzes stehen damit geeignete und vor allem effiziente Techniken zur Verfügung. Das große Potenzial solcher Folgearbeiten wird durch meine hier vorgestellten Arbeiten bereits unterstrichen. Ein möglicher Folgeansatz zur methodischen Ergänzung ist die Nutzung vorhandener Genom-, Transkriptom- und Proteomdaten aus öffentlich verfügbaren Datenbanken, der einen möglichst breiten Querschnitt über verschiedene Ameisenunterfamilien gibt (*Knowledge Discovery in Databases* (KDD)). Je nach Datenlage ergeben sich daraus bereits weitere Ansatzpunkte dazu, welche Ameisenarten ein lohnendes Ziel für zukünftige Giftanalysen mit einem *Venomics*-Ansatz bieten. Ein wichtiger Beitrag meiner Arbeit ist der Nachweis von mehreren EGF-ähnlichen Toxinen in den Transkriptomdaten der beiden untersuchten Ameisenarten. Da die EGF-ähnlichen Toxine erst in wenigen Ameisenarten nachgewiesen wurden, ist ihre evolutionäre Entwicklung noch unzureichend erforscht. Um diese besser zu verstehen, sind deren Nachweis in weiteren Ameisenarten notwendig, möglichst mit Proteomdaten gestützt. Zusätzlich wäre eine genaue Charakterisierung der Bioaktivität der EGF-ähnlichen Toxine aus heimischen Arten erstrebenswert, um ein besseres Verständnis zu biologischer Funktion und translationalem Potenzial zu gewinnen. Die Überprüfung, ob die langanhaltenden Schmerzen, wie von EGF-ähnlichen Toxinen aus *M. gulosa* ausgelöst, auch durch die isolierte Gabe von Homologen heimischer Ameisen ausgelöst werden können, steht dabei genauso im Vordergrund wie die Eruierung ihrer Stabilität auf biochemischer Ebene. Um diese Toxine im Hochdurchsatz zu testen, müssen diese auch möglichst kostengünstig und in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. In der Masterarbeit von Hanna Dambeck wurde dazu bereits die heterologe Expression dreier von mir identifizierter EGF-ähnlicher Toxine aus *M. rubra* (U-MYRTX-Mrub-1a, U-MYRTX-Mrub-1b, U-MYRTX-Mrub-1c) in einer Machbarkeitsstudie durchgeführt (unveröffentlicht). Dabei konnte sie zeigen, dass zumindest die Herstellung von U-MYRTX-Mrub-1b mit dieser Methode möglich ist. Ein Fortführen ihrer Arbeit

wird angestrebt, um EGF-ähnliche Toxine demnächst in größerem Umfang herzustellen und Bioaktivitätsstudien in der Zukunft durchführen zu können.

Die von mir beschriebenen linearen Ameisentoxine zeigen im Laborversuch teilweise antimikrobielle Aktivitäten. Sie gelten allerdings in ihrer Wirkung als zu zellunspezifisch, was ihren Einsatz als Antibiotikum weitgehend ausschließt. Vorstellbar ist deren Anwendung jedoch als Mittel zur Flächendesinfektion. Durch die zunehmende Bedrohung multiresistenter Erreger [121], wie beispielsweise MRSA (methicillinresistenter *S. aureus*) [122], spielt die gründliche Oberflächenreinigung und die Eindämmung von Infektionen eine immer größere Rolle. Da dabei auch die Desinfektion von Oberflächen, die mit Haut in Kontakt kommen, notwendig ist, müssen AMP-ähnliche Toxine auf ihre Hautverträglichkeit hin überprüft werden. Der Einsatz in Kombinationsprodukten und die Nutzung linearer Toxine als *spreading factor* stellt ein zusätzliches großes Entwicklungspotenzial dar, denn durch die Verwendung synergetischer Wirkstoffe könnten sich weitere Einsatzszenarien erschließen. Dies bedingt die sorgfältige Auswahl, um keine unerwünschten Nebeneffekte zu verursachen. Einige der linearen Toxine zeigten auch Aktivität gegen Larven der Großen Wachsmotte (*G. mellonella*). Ein möglicher Einsatz als Bioinsektizid sollte in Zukunft geprüft werden. Selbstverständlich ist dabei insbesondere die Form der Applikation noch anzupassen, da in der Flächenanwendung das Injizieren einzelner Larven nicht möglich ist. Weitere Versuche sollten deshalb die orale und Kontakttoxizität der Toxine näher untersuchen. Zusätzliche Studienmöglichkeiten ergeben sich durch die Ausweitung der Sequenzähnlichkeitssuche in verfügbaren Transkriptomdaten mit bekannten AMP-ähnlichen Toxinen. Hier zeigt sich durch meine Arbeit bereits eindrucksvoll, dass die Verwendung von vorhandenen Daten zügig neues Wissen generieren kann, auch ohne neue Rohdaten produzieren zu müssen.

Literatur

[1] California Academy of Science. *Antweb v8.83.4*. URL: https://www.antweb.org/ (besucht am 02. 01. 2023).

[2] Barry Bolton. *AntCat: An Online Catalog of the Ants of the World*. URL: https://antcat.org/ (besucht am 14. 11. 2022).

[3] Marek L. Borowiec, Corrie S. Moreau und Christian Rabeling. „Ants: Phylogeny and Classification". In: *Encyclopedia of Social Insects*. Hrsg. von Christopher K. Starr. Cham: Springer International Publishing, 2020, S. 1–18. ISBN: 978-3-319-90306-4. DOI: 10.1007/978-3-319-90306-4_155-1.

[4] G. P. Camacho *et al.* „UCE Phylogenomics Resolves Major Relationships Among Ectaheteromorph Ants (Hymenoptera: Formicidae: Ectatomminae, Heteroponerinae): A New Classification For the Subfamilies and the Description of a New Genus". In: *Insect Systematics and Diversity* 6.1 (1. Jan. 2022). Hrsg. von Jeffrey Sosa-Calvo, 5:1–5:20. ISSN: 2399-3421. DOI: 10.1093/isd/ixab026.

[5] Corrie S. Moreau *et al.* „Phylogeny of the Ants: Diversification in the Age of Angiosperms". In: *Science* 312.5770 (2006), S. 101–104. ISSN: 0036-8075. DOI: 10.1126/science.1124891.

[6] Seán G. Brady *et al.* „Evaluating Alternative Hypotheses for the Early Evolution and Diversification of Ants". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.48 (28. Nov. 2006), S. 18172–18177. DOI: 10.1073/pnas.0605858103.

[7] Philip S. Ward. „Phylogeny, Classification, and Species-Level Taxonomy of Ants (Hymenoptera: Formicidae)*". In: *Zootaxa* 1668.1 (21. Dez. 2007), S. 549–563. ISSN: 1175-5334, 1175-5326. DOI: 10.11646/zootaxa.1668.1.26.

[8] Philip S. Ward. „The Phylogeny and Evolution of Ants". In: *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 45.1 (1 2014), S. 23–43. DOI: 10.1146/annurev-ecolsys-120213-091824.

[9] G. M. Dlussky. „Ants (Hymenoptera: Formicidae) from Burmese Amber". In: *Paleontological Journal* 30 (1996), S. 449–454.

[10] Phillip Barden und David Grimaldi. „Rediscovery of the Bizarre Cretaceous Ant *Haidomyrmex* Dlussky (Hymenoptera: Formicidae), with Two New Species“. In: *American Museum Novitates* 2012.3755 (Sep. 2012), S. 1–16. ISSN: 0003-0082, 1937-352X. DOI: 10.1206/3755.2.

[11] Marek L. Borowiec. „Convergent Evolution of the Army Ant Syndrome and Congruence in Big-Data Phylogenetics“. In: *Systematic Biology* 68.4 (1. Juli 2019), S. 642–656. ISSN: 1063-5157. DOI: 10.1093/sysbio/syy088.

[12] Seán G. Brady *et al.* „The Rise of Army Ants and Their Relatives: Diversification of Specialized Predatory Doryline Ants“. In: *BMC Evolutionary Biology* 14.1 (1. Mai 2014), 93:1–93:14. ISSN: 1471-2148. DOI: 10.1186/1471-2148-14-93.

[13] J. M. Cherrett, R. J. Powell und D. J. Stradling. „The Mutualism between Leaf-Cutting Ants and Their Fungus“. In: *Insect-Fungus Interactions*. Elsevier, 1989, S. 93–120. ISBN: 978-0-12-751800-8. DOI: 10.1016/B978-0-12-751800-8.50010-0.

[14] Daniel Heine *et al.* „Chemical Warfare between Leafcutter Ant Symbionts and a Co-Evolved Pathogen“. In: *Nature Communications* 9.1 (1 7. Juni 2018), 2208:1–2208:11. ISSN: 2041-1723. DOI: 10.1038/s41467-018-04520-1.

[15] Bert Hölldobler und Edward Wilson. *Der Superorganismus: Der Erfolg von Ameisen, Bienen, Wespen und Termiten*. Springer Berlin Heidelberg, 15. Sep. 2009. 604 S. ISBN: 978-3-540-93767-8.

[16] Sarah F. Worsley *et al.* „Competition-Based Screening Helps to Secure the Evolutionary Stability of a Defensive Microbiome“. In: *BMC Biology* 19.1 (15. Sep. 2021), 205:1–205:20. ISSN: 1741-7007. DOI: 10.1186/s12915-021-01142-w.

[17] Renkang K. Peng, Keith A. Christian und Karen Susanne Gibb. „Implementing Ant Technology in Commercial Cashew Plantations and Continuation of Transplanted Green Ant Colony Monitoring“. In: Bd. No W04/088. RIRDC Publication. Rural Industries Research and Development Corporation, 2004, S. 1–72. ISBN: 0642 58798 1.

[18] Renkang Peng und Keith Christian. *Integrated Pest Management for Mango Orchards Using Green Ants as a Major Component: A Manual for Conventional and Organic Mango Growers in Australia*. Darwin, N.T.: Charles Darwin University, 2005. 1-54.

[19] Renkang Peng und Keith Christian. „Do Weaver Ant (Hymenoptera: Formicidae) Marks Affect Mango Internal Quality and Storage Life?“ In: *Journal of Economic Entomology* 106.1 (1. Feb. 2013), S. 299–304. ISSN: 0022-0493. DOI: 10.1603/EC12162.

[20] J. C. Nickerson, Donny L. Harris und Thomas R. Fasulo. „Pharaoh Ant, *Monomorium pharaonis* (Linnaeus) (Insecta: Hymenoptera: Formicidae): EENY290/IN533, 6/2003“. In: *EDIS* 2004.14 (14 2004), S. 1–5. ISSN: 2576-0009. DOI: 10.32473/edis-in533-2003.

[21] Bernhard Misof *et al.* „Phylogenomics Resolves the Timing and Pattern of Insect Evolution“. In: *Science* 346.6210 (7. Nov. 2014), S. 763–767. DOI: 10.1126/science.1257570.

[22] Christian Rabeling, Jeremy M. Brown und Manfred Verhaagh. „Newly Discovered Sister Lineage Sheds Light on Early Ant Evolution“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105.39 (30. Sep. 2008), S. 14913–14917. ISSN: 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.0806187105.

[23] Laurent Cournault und Serge Aron. „Diploid Males, Diploid Sperm Production, and Triploid Females in the Ant *Tapinoma erraticum*“. In: *Naturwissenschaften* 96.12 (Dez. 2009), S. 1393–1400. ISSN: 0028-1042, 1432-1904. DOI: 10.1007/s00114-009-0590-1.

[24] Bert Hölldobler und Edward O. Wilson. *The Ants*. Cambridge, UK: Harvard University Press, 1990. 784 S. ISBN: 978-0-674-04075-5.

[25] Bert Hölldobler und Edward O. Wilson. *Auf den Spuren der Ameisen*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. ISBN: 978-3-662-48406-7. DOI: 10.1007/978-3-642-32566-3.

[26] Waring Trible und Daniel J. C. Kronauer. „Caste Development and Evolution in Ants: It's All about Size“. In: *Journal of Experimental Biology* 220.1 (1. Jan. 2017). Hrsg. von Joel D. Levine, Daniel J. C. Kronauer und Michael H. Dickinson, S. 53–62. ISSN: 1477-9145, 0022-0949. DOI: 10.1242/jeb.145292.

[27] C. P. Haskins und R. M. Whelden. „"Queenlessness", Worker Sibship, and Colony versus Population Structure in the Formicid Genus *Rhytidoponera*.“ In: *Psyche (Cambridge)* 72 (1965), S. 87–112. DOI: 10.1155/1965/40465.

[28] R. C. Morgan. „Natural History Notes and Husbandry of the Peruvian Giant Ant *Dinoponera longipes* (Hymenoptera: Formicidae)“. In: *Invertebrates in Captivity*. SASI/ITAG Conference. Tuscon, AZ, Aug. 1993. URL: https://web.archive.org/web/20121113115233/http://www.sasionline.org/antsfiles/pages/dino/Husbandry.html (besucht am 07. 12. 2022).

[29] A. F. G. Bourke. „Dominance Orders, Worker Reproduction, and Queen-Worker Conflict in the Slave-Making Ant *Harpagoxenus sublaevis*“. In: *Behavioral Ecology and Sociobiology* 23.5 (1. Nov. 1988), S. 323–333. ISSN: 1432-0762. DOI: 10.1007/BF00300579.

[30] Eörs Szathmáry und John Maynard Smith. „The Major Evolutionary Transitions“. In: *Nature* 374.6519 (6519 März 1995), S. 227–232. ISSN: 1476-4687. DOI: 10.1038/374227a0.

[31] Barbara L. Thorne. „Evolution of Eusociality in Termites“. In: *Annual Review of Ecology and Systematics* 28.1 (Nov. 1997), S. 27–54. ISSN: 0066-4162. DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.28.1.27.

[32] H. Burda *et al.* „Are Naked and Common Mole-Rats Eusocial and If so, Why?“ In: *Behavioral Ecology and Sociobiology* 47.5 (1. Apr. 2000), S. 293–303. ISSN: 1432-0762. DOI: 10.1007/s002650050669.

[33] Abderrahman Khila und Ehab Abouheif. „Reproductive Constraint Is a Developmental Mechanism That Maintains Social Harmony in Advanced Ant Societies“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.46 (18. Nov. 2008), S. 17884–17889. ISSN: 0027-8424, 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.0807351105.

[34] Abel Bernadou, Boris H. Kramer und Judith Korb. „Major Evolutionary Transitions in Social Insects, the Importance of Worker Sterility and Life History Trade-Offs“. In: *Frontiers in Ecology and Evolution* 9 (2021), 732907:1–732907:7. ISSN: 2296-701X. DOI: 10.3389/fevo.2021.732907.

[35] Richard Dawkins. *The Selfish Gene*. Oxford University Press, 1976. 248 S. ISBN: 978-0-19-857519-1.

[36] W. D. Hamilton. „The Genetical Evolution of Social Behaviour. I“. In: *Journal of Theoretical Biology* 7.1 (1. Juli 1964), S. 1–16. ISSN: 0022-5193. DOI: 10.1016/0022-5193(64)90038-4.

[37] A. T. Burchill und C. S. Moreau. „Colony Size Evolution in Ants: Macroevolutionary Trends“. In: *Insectes Sociaux* 63.2 (1. Mai 2016), S. 291–298. ISSN: 1420-9098. DOI: 10.1007/s00040-016-0465-3.

[38] Tatiana Giraud, Jes S. Pedersen und Laurent Keller. „Evolution of Supercolonies: The Argentine Ants of Southern Europe“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99.9 (30. Apr. 2002), S. 6075–6079. ISSN: 0027-8424, 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.092694199.

[39] B. Hölldobler. „Multimodal Signals in Ant Communication“. In: *Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 184.2 (3. März 1999), S. 129–141. ISSN: 0340-7594, 1432-1351. DOI: 10.1007/s003590050313.

[40] Samira R. Aili *et al.* „Diversity of Peptide Toxins from Stinging Ant Venoms“. In: *Toxicon* 92 (15. Dez. 2014), S. 166–178. ISSN: 0041-0101. DOI: 10.1016/j.toxicon.2014.10.021.

[41] Simon Tragust *et al.* „Ants Disinfect Fungus-Exposed Brood by Oral Uptake and Spread of Their Poison“. In: *Current biology: CB* 23.1 (7. Jan. 2013), S. 76–82. ISSN: 1879-0445. DOI: 10.1016/j.cub.2012.11.034.

[42] Athula B. Attygalle und E. David Morgan. „Chemicals from the Glands of Ants“. In: *Chemical Society Reviews* 13.3 (1984), S. 245–278. ISSN: 0306-0012, 1460-4744. DOI: 10.1039/cs9841300245.

[43] Axel Touchard *et al.* „The Biochemical Toxin Arsenal from Ant Venoms“. In: *Toxins* 8.1 (1 20. Jan. 2016), 30:1–30:28. ISSN: 2072-6651. DOI: 10.3390/toxins8010030.

[44] David A. Eagles *et al.* „A Peptide Toxin in Ant Venom Mimics Vertebrate EGF-like Hormones to Cause Long-Lasting Hypersensitivity in Mammals“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 119.7 (7 15. Feb. 2022), e2112630119:1–e2112630119:9. ISSN: 0027-8424, 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.2112630119.

[45] Justin Orvel Schmidt, Murray S. Blum und William L. Overal. „Hemolytic Activities of Stinging Insect Venoms“. In: *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 1.2 (1983), S. 155–160. ISSN: 0739-4462, 1520-6327. DOI: 10.1002/arch.940010205.

[46] Jérôme Orivel *et al.* „Ponericins, New Antibacterial and Insecticidal Peptides from the Venom of the Ant *Pachycondyla goeldii*“. In: *Journal of Biological Chemistry* 276.21 (25. Mai 2001), S. 17823–17829. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M100216200.

[47] John M. Brand. „Fire Ant Venom Alkaloids: Their Contribution to Chemosystematics and Biochemical Evolution“. In: *Biochemical Systematics and Ecology* 6.4 (Jan. 1978), S. 337–340. ISSN: 03051978. DOI: 10.1016/0305-1978(78)90055-8.

[48] Justin Orvel Schmidt. „Chemistry, Pharmacology, and Chemical Ecology of Ant Venoms“. In: *Venoms of the Hymenoptera: Biochemical, Pharmacological and Behavioural Aspects*. Hrsg. von Tom Piek. London: Academic Press, 1986, S. 425–508. ISBN: 978-0-12-554770-3.

[49] Eduardo Gonçalves Paterson Fox und Rachelle M.M. Adams. „On the Biological Diversity of Ant Alkaloids“. In: *Annual Review of Entomology* 67.1 (1 2022), S. 367–385. DOI: 10.1146/annurev-ento-072821-063525.

[50] Axel Touchard *et al.* „Heterodimeric Insecticidal Peptide Provides New Insights into the Molecular and Functional Diversity of Ant Venoms“. In: *ACS Pharmacology & Translational Science* 3.6 (11. Dez. 2020), S. 1211–1224. DOI: 10.1021/acsptsci.0c00119.

[51] Camila Takeno Cologna *et al.* „Peptidomic Investigation of *Neoponera villosa* Venom by High-Resolution Mass Spectrometry: Seasonal and Nesting Habitat Variations“. In: *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 24.1 (Dez. 2018), 6:1–6:11. ISSN: 1678-9199. DOI: 10.1186/s40409-018-0141-3.

[52] Edouard de Castro und Florence Jungo. *VenomZone*. 8. Juni 2021. URL: https://venomzone.expasy.org/ (besucht am 03. 02. 2023).

[53] Hidetoshi Inagaki *et al.* „Molecular Cloning and Biological Characterization of Novel Antimicrobial Peptides, Pilosulin 3 and Pilosulin 4, from a Species of the Australian Ant Genus *Myrmecia*“. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 428.2 (Aug. 2004), S. 170–178. ISSN: 00039861. DOI: 10.1016/j.abb.2004.05.013.

[54] Camila Takeno Cologna *et al.* „Peptidomic Comparison and Characterization of the Major Components of the Venom of the Giant Ant *Dinoponera quadriceps* Collected in Four Different Areas of Brazil“. In: *Journal of Proteomics* 94 (Dez. 2013), S. 413–422. ISSN: 18743919. DOI: 10.1016/j.jprot.2013.10.017.

[55] L. Kuhn-Nentwig. „Antimicrobial and Cytolytic Peptides of Venomous Arthropods“. In: *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 60.12 (1. Dez. 2003), S. 2651–2668. ISSN: 1420-682X, 1420-9071. DOI: 10.1007/s00018-003-3106-8.

[56] Kirill Pluzhnikov *et al.* „Analysis of Ectatomin Action on Cell Membranes“. In: *European Journal of Biochemistry* 262.2 (Juni 1999), S. 501–506. ISSN: 0014-2956. DOI: 10.1046/j.1432-1327.1999.00426.x.

[57] Zoltan Dekan *et al.* „Δ-Myrtoxin-Mp1a Is a Helical Heterodimer from the Venom of the Jack Jumper Ant That Has Antimicrobial, Membrane-Disrupting, and Nociceptive Activities“. In: *Angewandte Chemie International Edition* 56.29 (10. Juli 2017), S. 8495–8499. ISSN: 1433-7851. DOI: 10.1002/anie.201703360.

[58] Troy Wanandy *et al.* „Pilosulins: A Review of the Structure and Mode of Action of Venom Peptides from an Australian Ant *Myrmecia pilosula*“. In: *Toxicon* 98 (Mai 2015), S. 54–61. ISSN: 00410101. DOI: 10.1016/j.toxicon.2015.02.013.

[59] Jingzhi Pan und W. F. Hink. „Isolation and Characterization of Myrmexins, Six Isoforms of Venom Proteins with Anti-Inflammatory Activity from the Tropical Ant, *Pseudomyrmex triplarinus*“. In: *Toxicon* 38.10 (Okt. 2000), S. 1403–1413. ISSN: 00410101. DOI: 10.1016/S0041-0101(99)00233-0.

[60] Valentine Barassé *et al.* „The Peptide Venom Composition of the Fierce Stinging Ant *Tetraponera aethiops* (Formicidae: Pseudomyrmecinae)“. In: *Toxins* 11.12 (12 14. Dez. 2019), 732:1–732:14. ISSN: 2072-6651. DOI: 10.3390/toxins11120732.

[61] Kohei Kazuma *et al.* „Combined Venom Gland Transcriptomic and Venom Peptidomic Analysis of the Predatory Ant *Odontomachus monticola*“. In: *Toxins* 9.10 (13. Okt. 2017), 323:1–323:15. ISSN: 2072-6651. DOI: 10.3390/toxins9100323.

[62] Glenn F. King und Margaret C. Hardy. „Spider-Venom Peptides: Structure, Pharmacology, and Potential for Control of Insect Pests“. In: *Annual Review of Entomology* 58.1 (7. Jan. 2013), S. 475–496. ISSN: 0066-4170, 1545-4487. DOI: 10.1146/annurev-ento-120811-153650.

[63] Roy D. Altman *et al.* „The Effects of a Partially Purified Fraction of an Ant Venom in Rheumatoid Arthritis“. In: *Arthritis & Rheumatism* 27.3 (1984), S. 277–284. ISSN: 1529-0131. DOI: 10.1002/art.1780270305.

[64] Hidetoshi Inagaki *et al.* „Pilosulin 5, a Novel Histamine-Releasing Peptide of the Australian Ant, *Myrmecia pilosula* (Jack Jumper Ant)“. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 477.2 (Sep. 2008), S. 411–416. ISSN: 00039861. DOI: 10.1016/j.abb.2008.05.014.

[65] Raymond S. Norton und Paul K. Pallaghy. „The Cystine Knot Structure of Ion Channel Toxins and Related Polypeptides“. In: *Toxicon* 36.11 (Nov. 1998), S. 1573–1583. ISSN: 00410101. DOI: 10.1016/S0041-0101(98)00149-4.

[66] Paul K. Pallaghy *et al.* „A Common Structural Motif Incorporating a Cystine Knot and a Triple-Stranded β-Sheet in Toxic and Inhibitory Polypeptides“. In: *Protein Science* 3.10 (Okt. 1994), S. 1833–1839. ISSN: 0961-8368. DOI: 10.1002/pro.5560031022.

[67] David J. Craik, Norelle L. Daly und Clement Waine. „The Cystine Knot Motif in Toxins and Implications for Drug Design“. In: *Toxicon* 39.1 (Jan. 2001), S. 43–60. ISSN: 00410101. DOI: 10.1016/S0041-0101(00)00160-4.

[68] Norelle L. Daly und David J. Craik. „Bioactive Cystine Knot Proteins“. In: *Current Opinion in Chemical Biology* 15.3 (Juni 2011), S. 362–368. ISSN: 13675931. DOI: 10.1016/j.cbpa.2011.02.008.

[69] Alba F. C. Torres *et al.* „Transcriptome Analysis in Venom Gland of the Predatory Giant Ant *Dinoponera quadriceps*: Insights into the Polypeptide Toxin Arsenal of Hymenopterans“. In: *PLOS ONE* 9.1 (31. Jan. 2014), e87556:1–e87556:17. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0087556.

[70] Tomohiro Honma *et al.* „Novel Peptide Toxins from the Sea Anemone *Stichodactyla haddoni*“. In: *Peptides* 29.4 (Apr. 2008), S. 536–544. ISSN: 01969781. DOI: 10.1016/j.peptides.2007.12.010.

[71] Samuel D. Robinson *et al.* „A Comprehensive Portrait of the Venom of the Giant Red Bull Ant, *Myrmecia gulosa*, Reveals a Hyperdiverse Hymenopteran Toxin Gene Family“. In: *Science Advances* 4.9 (9 Sep. 2018), eaau4640:1–eaau4640:13. ISSN: 2375-2548. DOI: 10.1126/sciadv.aau4640.

[72] Sara Barberán, José M. Martín-Durán und Francesc Cebrià. „Evolution of the EGFR Pathway in Metazoa and Its Diversification in the Planarian *Schmidtea mediterranea*“. In: *Scientific Reports* 6.1 (1 21. Juni 2016), 28071:1–28071:14. ISSN: 2045-2322. DOI: 10.1038/srep28071.

[73] José R. A. dos Santos Pinto *et al.* „Proteomic View of the Venom from the Fire Ant *Solenopsis invicta* Buren“. In: *Journal of Proteome Research* 11.9 (7. Sep. 2012), S. 4643–4653. ISSN: 1535-3893. DOI: 10.1021/pr300451g.

[74] Suwatjanee Naephrai *et al.* „Composition and Acute Inflammatory Response from *Tetraponera rufonigra* Venom on RAW 264.7 Macrophage Cells“. In: *Toxins* 13.4 (3. Apr. 2021), 257:1–257:14. ISSN: 2072-6651. DOI: 10.3390/toxins13040257.

[75] Denise Oliveira Guimarães *et al.* „Transcriptomic and Biochemical Analysis from the Venom Gland of the Neotropical Ant *Odontomachus chelifer*“. In: *Toxicon* 223 (Feb. 2023), S. 107006. ISSN: 00410101. DOI: 10.1016/j.toxicon.2022.107006.

[76] D. Hoffman *et al.* „Allergens in Hymenoptera Venom XXI. Cross-reactivity and Multiple Reactivity between Fire Ant Venom and Bee and Wasp Venoms“. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 82.5 (Nov. 1988), S. 828–834. ISSN: 00916749. DOI: 10.1016/0091-6749(88)90085-1.

[77] B. A. Sin *et al.* „T-Cell and Antibody Responses to Phospholipase A2 from Different Species Show Distinct Cross-Reactivity Patterns“. In: *Allergy* 66.12 (Dez. 2011), S. 1513–1521. ISSN: 0105-4538. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2011.02689.x.

[78] Amilcar Perez-Riverol *et al.* „Insect Venom Phospholipases A1 and A2: Roles in the Envenoming Process and Allergy“. In: *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 105 (1. Feb. 2019), S. 10–24. ISSN: 0965-1748. DOI: 10.1016/j.ibmb.2018.12.011.

[79] John Heep *et al.* „Proteomic Analysis of the Venom from the Ruby Ant *Myrmica rubra* and the Isolation of a Novel Insecticidal Decapeptide“. In: *Insects* 10.2 (2 1. Feb. 2019), 42:1–42:17. ISSN: 2075-4450. DOI: 10.3390/insects10020042.

[80] John Heep *et al.* „Identification and Functional Characterization of a Novel Insecticidal Decapeptide from the Myrmicine Ant *Manica rubida*“. In: *Toxins* 11.10 (10 Okt. 2019), 562:1–562:17. ISSN: 2072-6651. DOI: 10.3390/toxins11100562.

[81] Axel Touchard *et al.* „Isolation and Characterization of a Structurally Unique β-Hairpin Venom Peptide from the Predatory Ant *Anochetus emarginatus*“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1860 (11, Part A 1. Nov. 2016), S. 2553–2562. ISSN: 0304-4165. DOI: 10.1016/j.bbagen.2016.07.027.

[82] Samantha A. Nixon *et al.* „Multipurpose Peptides: The Venoms of Amazonian Stinging Ants Contain Anthelmintic Ponericins with Diverse Predatory and Defensive Activities“. In: *Biochemical Pharmacology* 192 (1. Okt. 2021), 114693:1–114693:16. ISSN: 0006-2952. DOI: 10.1016/j.bcp.2021.114693.

[83] M. Lange. *Endoparasitenbefall Bei Kleinen Wiederkäuern - Der Rote Magenwurm* Haemonchus contortus *Bei Schaf Und Ziege*. Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe. 5. Nov. 2008. URL: https://www.ua-bw.de/pub/beitrag.asp?subid=2&ID=928&Thema_ID (besucht am 11. 12. 2022).

[84] C. Kersten *et al.* „Epidermal Growth Factor Receptor – Inhibition (EGFR-I) in the Treatment of Neuropathic Pain“. In: *British Journal of Anaesthesia* 115.5 (Nov. 2015), S. 761–767. ISSN: 00070912. DOI: 10.1093/bja/aev326.

[85] Jazlyn P. Borges *et al.* „Modulation of Pathological Pain by Epidermal Growth Factor Receptor“. In: *Frontiers in Pharmacology* 12 (12. Mai 2021), S. 642820. ISSN: 1663-9812. DOI: 10.3389/fphar.2021.642820.

[86] J. Jentsch. „A Procedure for Purification of Myrmica Venom: The Isolation of the Compulsive Component“. In: *VI Congress of the IUSSI*. Bern, 15. Sep. 1969, S. 69–75. URL: https://www.cataglyphis.fr/Actes-SF-UIEIS/IUSSI-Bern-1969/IUSSI-Bern-1969-Jentsh.pdf (besucht am 11. 03. 2022).

[87] Harold Baer *et al.* „Protein Components of Fire Ant Venom (*Solenopsis invicta*)“. In: *Toxicon* 17.4 (1. Jan. 1979), S. 397–405. ISSN: 0041-0101. DOI: 10.1016/0041-0101(79)90267-8.

[88] T. H. Jones *et al.* „Venom Chemistry of Ants in the Genus *Monomorium*“. In: *Journal of Chemical Ecology* 8.1 (1. Jan. 1982), S. 285–300. ISSN: 1573-1561. DOI: 10.1007/BF00984024.

[89] Pehr Edman *et al.* „Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides.“ In: *Acta Chemica Scandinavica* 4 (1950), S. 283–293. ISSN: 0904-213X. DOI: 10.3891/acta.chem.scand.04-0283.

[90] J. D. Seebach *et al.* „Ameisengift: eine seltene Ursache für allergische Reaktionen in der Schweiz“. In: *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* 130.47 (25. Nov. 2000), S. 1805–1813. ISSN: 0036-7672.

[91] H. Alejandro Arevalo und Eleanor Groden. „European Fire Ant, Red Ant (Suggested Common Names), *Myrmica rubra* Linnaeus (Insecta: Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae): EENY-410/IN746, 8/2007“. In: *EDIS* 2007.19 (19 18. Okt. 2007), S. 1–5. ISSN: 2576-0009. DOI: 10.32473/edis-in746-2007.

[92] Kris A. Wetterstrand. *DNA Sequencing Costs: Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP)*. URL: www.genome.gov/sequencingcostsdata (besucht am 26. 02. 2023).

[93] Jerzy K. Kulski. *Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and "Omic" Applications*. IntechOpen, 14. Jan. 2016. ISBN: 978-953-51-2240-1. DOI: 10.5772/61964.

[94] BingXin Lu, ZhenBing Zeng und TieLiu Shi. „Comparative Study of de Novo Assembly and Genome-Guided Assembly Strategies for Transcriptome Reconstruction Based on RNA-Seq“. In: *Science China Life Sciences* 56.2 (1. Feb. 2013), S. 143–155. ISSN: 1869-1889. DOI: 10.1007/s11427-013-4442-z.

[95] Randy Ortiz *et al.* „Pincho: A Modular Approach to High Quality De Novo Transcriptomics“. In: *Genes* 12.7 (7 Juli 2021), 953:1–953:14. ISSN: 2073-4425. DOI: 10.3390/genes12070953.

[96] Nicolas Cerveau und Daniel J. Jackson. „Combining Independent de Novo Assemblies Optimizes the Coding Transcriptome for Nonconventional Model Eukaryotic Organisms“. In: *BMC Bioinformatics* 17.1 (9. Dez. 2016), 525:1–525:13. ISSN: 1471-2105. DOI: 10.1186/s12859-016-1406-x.

[97] *Bundesartenschutzverordnung vom 16. Februar 2005 (BGBl. I S. 258, 896), die zuletzt durch Artikel 10 des Gesetzes vom 21. Januar 2013 (BGBl. I S. 95) geändert worden ist*. URL: https://www.gesetze-im-internet.de/bartschv_2005/ (besucht am 31. 05. 2022).

[98] *Bundesnaturschutzgesetz vom 29. Juli 2009 (BGBl. I S. 2542), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 18. August 2021 (BGBl. I S. 3908) geändert worden ist*. URL: https://www.gesetze-im-internet.de/bnatschg_2009/ (besucht am 31. 05. 2022).

[99] Sabine Hurka *et al.* „Venomics of the Central European Myrmicine Ants *Myrmica rubra* and *Myrmica ruginodis*“. In: *Toxins* 14.5 (2022), 14:1–14:18. DOI: 10.3390/toxins14050358.

[100] S. F. Altschul *et al.* „Basic Local Alignment Search Tool“. In: *Journal of Molecular Biology* 215.3 (3 5. Okt. 1990), S. 403–410. ISSN: 0022-2836. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

[101] The UniProt Consortium. „UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2021“. In: *Nucleic Acids Research* 49.D1 (8. Jan. 2021), S. D480–D489. ISSN: 0305-1048. DOI: 10.1093/nar/gkaa1100.

[102] Florence Jungo und Amos Bairoch. „Tox-Prot, the Toxin Protein Annotation Program of the Swiss-Prot Protein Knowledgebase“. In: *Toxicon* 45.3 (3 März 2005), S. 293–301. ISSN: 00410101. DOI: 10.1016/j.toxicon.2004.10.018.

[103] Nicola J. Mulder und Rolf Apweiler. „The InterPro Database and Tools for Protein Domain Analysis“. In: *Current Protocols in Bioinformatics* 21.1 (1 2008), S. 2.7.1–2.7.18. ISSN: 1934-340X. DOI: 10.1002/0471250953.bi0207s21.

[104] Jaina Mistry *et al.* „Pfam: The Protein Families Database in 2021“. In: *Nucleic Acids Research* 49.D1 (D1 8. Jan. 2021), S. D412–D419. ISSN: 0305-1048. DOI: 10.1093/nar/gkaa913.

[105] Simon Blank *et al.* „Antigen 5 Allergens of Hymenoptera Venoms and Their Role in Diagnosis and Therapy of Venom Allergy“. In: *Current Allergy and Asthma Reports* 20.10 (10 9. Juli 2020), 58:1–58:13. ISSN: 1534-6315. DOI: 10.1007/s11882-020-00954-0.

[106] D. R. Hoffman. „Reactions to Less Common Species of Fire Ants“. In: *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 100.5 (5 Nov. 1997), S. 679–683. ISSN: 0091-6749. DOI: 10.1016/s0091-6749(97)70173-8.

[107] D. R. Hoffman *et al.* „Allergens in Hymenoptera Venom. XXII. Comparison of Venoms from Two Species of Imported Fire Ants, *Solenopsis invicta* and *richteri*“. In: *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 85.6 (6 Juni 1990), S. 988–996. ISSN: 0091-6749. DOI: 10.1016/0091-6749(90)90042-3.

[108] Donald R. Hoffman. „Hymenoptera Venom Allergens“. In: *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 30.2 (2 Apr. 2006), S. 109–128. ISSN: 1080-0549. DOI: 10.1385/criai:30:2:109.

[109] Roy S. Herbst. „Review of Epidermal Growth Factor Receptor Biology“. In: *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics* 59 (2, Supplement 1. Juni 2004), S. 21–26. ISSN: 0360-3016. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2003.11.041.

[110] Fenghua Zeng und Raymond C. Harris. „Epidermal Growth Factor, from Gene Organization to Bedside“. In: *Seminars in Cell & Developmental Biology* 28 (Apr. 2014), S. 2–11. ISSN: 10849521. DOI: 10.1016/j.semcdb.2014.01.011.

[111] Axel Touchard *et al.* „Venom Peptide Repertoire of the European Myrmicine Ant *Manica rubida*: Identification of Insecticidal Toxins“. In: *Journal of Proteome Research* (17. März 2020). ISSN: 1535-3893. DOI: 10.1021/acs.jproteome.0c00048.

[112] Valentine Barassé *et al.* „Venomics Survey of Six Myrmicine Ants Provides Insights into the Molecular and Structural Diversity of Their Peptide Toxins“. In: *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 151 (Dez. 2022), S. 103876. ISSN: 09651748. DOI: 10.1016/j.ibmb.2022.103876.

[113] Danielle L. Swaney, Craig D. Wenger und Joshua J. Coon. „Value of Using Multiple Proteases for Large-Scale Mass Spectrometry-Based Proteomics“. In: *Journal of Proteome Research* 9.3 (5. März 2010), S. 1323–1329. ISSN: 1535-3893, 1535-3907. DOI: 10.1021/pr900863u.

[114] Brian J Haas *et al.* „*De novo* Transcript Sequence Reconstruction from RNA-seq Using the Trinity Platform for Reference Generation and Analysis“. In: *Nature Protocols* 8.8 (8 Aug. 2013), S. 1494–1512. ISSN: 1754-2189, 1750-2799. DOI: 10.1038/nprot.2013.084.

[115] Felix Teufel *et al.* „SignalP 6.0 Predicts All Five Types of Signal Peptides Using Protein Language Models“. In: *Nature Biotechnology* (3. Jan. 2022), S. 1–3. ISSN: 1546-1696. DOI: 10.1038/s41587-021-01156-3.

[116] Gelbe Liste Online. *Gentamicin - Anwendung, Wirkung, Nebenwirkungen*. Gelbe Liste Online. URL: https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Gentamicin_82 (besucht am 28. 11. 2022).

[117] Liuyang Cai *et al.* „A Combined Protein Toxin Screening Based on the Transcriptome and Proteome of *Solenopsis invicta*“. In: *Proteome Science* 20.1 (1 Dez. 2022), S. 1–12. ISSN: 1477-5956. DOI: 10.1186/s12953-022-00197-z.

[118] Samuel D. Robinson *et al.* „Intra-Colony Venom Diversity Contributes to Maintaining Eusociality in a Cooperatively Breeding Ant“. In: *BMC Biology* 21.1 (1 Dez. 2023), S. 1–19. ISSN: 1741-7007. DOI: 10.1186/s12915-022-01507-9.

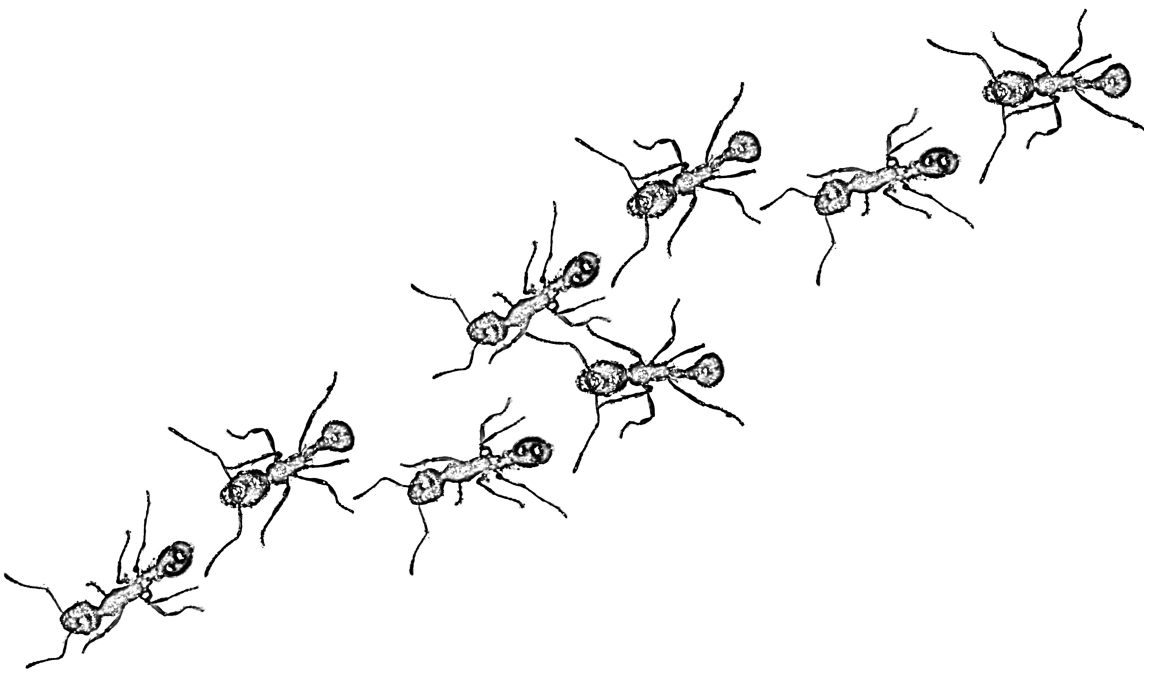
[119] Nathalie Stroeymeyt *et al.* „Social Network Plasticity Decreases Disease Transmission in a Eusocial Insect“. In: *Science* 362.6417 (23. Nov. 2018), S. 941–945. ISSN: 0036-8075, 1095-9203. DOI: 10.1126/science.aat4793.

[120] Jacobus C. De Roode und Thierry Lefèvre. „Behavioral Immunity in Insects“. In: *Insects* 3.3 (3 Sep. 2012), S. 789–820. ISSN: 2075-4450. DOI: 10.3390/insects3030789.

[121] Wanda C. Reygaert. „An Overview of the Antimicrobial Resistance Mechanisms of Bacteria“. In: *AIMS Microbiology* 4.3 (2018), S. 482–501. ISSN: 2471-1888. DOI: 10.3934/microbiol.2018.3.482.

[122] Martin Vestergaard, Dorte Frees und Hanne Ingmer. „Antibiotic Resistance and the MRSA Problem“. In: *Microbiology Spectrum* 7.2 (22. März 2019), S. 1–23. DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0057-2018.

Veröffentlichte Arbeiten



Toxins, 2022, 14(5), 385; DOI: 10.3390/toxins14050358

Venomics of the Central European Myrmicine Ants *Myrmica rubra* and *Myrmica ruginodis*

Sabine Hurka, Karina Brinkrolf, Rabia Özbek, Frank Förster, André Billion, John Heep, Thomas Timm, Günter Lochnit, Andreas Vilcinskas und Tim Lüddecke

toxins

MDPI

Article

Venomics of the Central European Myrmicine Ants *Myrmica rubra* and *Myrmica ruginodis*

Sabine Hurka [1,2], Karina Brinkrolf [3], Rabia Özbek [4], Frank Förster [3], André Billion [4], John Heep [1], Thomas Timm [5], Günter Lochnit [5], Andreas Vilcinskas [1,2,4] and Tim Lüddecke [2,4,*]

1 Institute for Insect Biotechnology, Justus Liebig University Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Giessen, Germany; sabine.hurka@innere.med.uni-giessen.de (S.H.); john.heep@web.de (J.H.); andreas.vilcinskas@ime.fraunhofer.de (A.V.)
2 LOEWE Centre for Translational Biodiversity Genomics (LOEWE-TBG), Senckenberganlage 25, 60325 Frankfurt, Germany
3 Bioinformatics and Systems Biology, Justus Liebig University Giessen, Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Giessen, Germany; karina.brinkrolf@bio.uni-giessen.de (K.B.); frank.foerster@computational.bio.uni-giessen.de (F.F.)
4 Department of Bioresources, Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology, Ohlebergsweg 12, 35392 Giessen, Germany; ozbekrabia@gmail.com (R.Ö.); andre.billion@ime.fraunhofer.de (A.B.)
5 Institute of Biochemistry, Justus Liebig University Giessen, Friedrichstraße 24, 35392 Giessen, Germany; thomas.timm@biochemie.med.uni-giessen.de (T.T.); guenter.lochnit@biochemie.med.uni-giessen.de (G.L.)
* Correspondence: tim.lueddecke@ime.fraunhofer.de

Abstract: Animal venoms are a rich source of novel biomolecules with potential applications in medicine and agriculture. Ants are one of the most species-rich lineages of venomous animals. However, only a fraction of their biodiversity has been studied so far. Here, we investigated the venom components of two myrmicine (subfamily Myrmicinae) ants: *Myrmica rubra* and *Myrmica ruginodis*. We applied a venomics workflow based on proteotranscriptomics and found that the venoms of both species are composed of several protein classes, including venom serine proteases, cysteine-rich secretory protein, antigen 5 and pathogenesis-related 1 (CAP) superfamily proteins, Kunitz-type serine protease inhibitors and venom acid phosphatases. Several of these protein classes are known venom allergens, and for the first time we detected phospholipase A1 in the venom of *M. ruginodis*. We also identified two novel epidermal growth factor (EGF) family toxins in the *M. ruginodis* venom proteome and an array of additional EGF-like toxins in the venom gland transcriptomes of both species. These are similar to known toxins from the related myrmicine ant, *Manica rubida*, and the myrmecine (subfamily Myrmeciinae) Australian red bulldog ant *Myrmecia gullosa*, and are possibly deployed as weapons in defensive scenarios or to subdue prey. Our work suggests that *M. rubra* and *M. ruginodis* venoms contain many enzymes and other high-molecular-weight proteins that cause cell damage. Nevertheless, the presence of EGF-like toxins suggests that myrmicine ants have also recruited smaller peptide components into their venom arsenal. Although little is known about the bioactivity and function of EGF-like toxins, their presence in myrmicine and myrmecine ants suggests they play a key role in the venom systems of the superfamily Formicoidea. Our work adds to the emerging picture of ant venoms as a source of novel bioactive molecules and highlights the need to incorporate such taxa in future venom bioprospecting programs.

Keywords: insect venom; proteotranscriptomics; biodiscovery; allergens; phospholipase A1; EGF-like toxins

Key Contribution: We describe the venom components of two ant species representing the overlooked subfamily Myrmicinae and have identified novel putative toxins with an EGF-like fold.

check for updates

Citation: Hurka, S.; Brinkrolf, K.; Özbek, R.; Förster, F.; Billion, A.; Heep, J.; Timm, T.; Lochnit, G.; Vilcinskas, A.; Lüddecke, T. Venomics of the Central European Myrmicine Ants *Myrmica rubra* and *Myrmica ruginodis*. *Toxins* **2022**, *14*, 358. https://doi.org/10.3390/toxins14050358

Received: 22 April 2022
Accepted: 19 May 2022
Published: 21 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Ants (Formicidae) are a species-rich family within the hyperdiverse insect order Hymenoptera. They emerged in the Cretaceous about 130 million years ago, and have diversified into more than 14,000 species distributed across 17 subfamilies [1,2]. They have conquered all continents and represent arguably one of the most successful lineages among terrestrial animals [3]. Although most ant species are found in the tropics, remarkable diversity is also present in more temperate regions [1]. For example, 108 genera are native to central Europe, most of which are members of the subfamily Myrmicinae (52% of European ant species at time of writing) [1]. The evolutionary success of ants is based upon an unprecedented array of ecological innovations, such as their eusociality, foraging strategies [3], and the venom systems present in several ant subfamilies [4].

Venoms are complex mixtures of proteins, peptides and organic molecules, and are found throughout the animal kingdom [5]. Venomous animals inject venom into other animals to disrupt important physiological processes [6]. The detrimental effects of venom mainly reflect the activities of proteins and peptides collectively described as toxins. Across all animal groups, venom serves the three major functions of predation, defense and competitor deterrence [6], as well as many secondary functions, such as sexual communication, prey tracking and maintenance of the immune system [7]. Venom toxins have been subject to millions of years of natural selection, becoming refined molecular weapons that act with unmatched selectivity and potency [5]. The venom system of ants is found at the anterior end of the abdomen and is derived from an ancient ovipositor [8]. Ants primarily use their venoms to overpower prey and defend their colony against threats [4]. Ant venoms are mainly composed of polypeptides and small organic molecules, particularly alkaloids [4,9–11].

Although there are several venomous ant lineages, only a few ant venoms have been studied in detail [12–18]. This is primarily because small arthropods deliver only miniscule amounts of venom, so it may be necessary to sample hundreds of specimens to accumulate sufficient amounts of crude venom for traditional analytical platforms [4,19,20]. This challenge has been addressed by the new research field of venomics, where modern systems biology approaches are used to disentangle venom components, often by combining proteomics and transcriptomics in an approach known as proteotranscriptomics [21]. Given the specificity and sensitivity of such modern platforms, small samples are sufficient for analysis and venoms can now be explored across the entire animal kingdom [21].

The application of venomics provides valuable insights into the chemical diversity of venoms from many underrepresented groups of venomous animals, especially arthropods, but ant venoms have still been largely overlooked [22]. Only a handful of proteotranscriptomics studies have been conducted on ant venoms, so a significant knowledge gap remains [23–27]. Furthermore, the studies conducted thus far have mostly focused on enigmatic species such as the bullet ant (*Paraponera clavata*) and the red bulldog ant (*Myrmecia gullosa*), two atypically large ant species with potent nociceptive venoms [15,22]. Proteotranscriptomics has also been applied to *Manica rubida*, one of the larger species of myrmicine ants from central Europe [14]. Beyond these prominent species, there has been little progress in the investigation of ant venoms using modern approaches.

To fill this important knowledge gap, we investigated the venoms of *Myrmica rubra* and *Myrmica ruginodis*, two smaller myrmicine ants that are ubiquitous in central Europe [1]. We applied our modern venomics workflow to identify the venom components, including novel toxins of the epidermal growth factor (EGF)-like family. We discuss our findings in relation to data available from other ant species, including *M. rubida*. This work advances our understanding of ant venoms and can be used as the basis for further studies on the venomics of ants and other arthropod lineages.

2. Results

2.1. Verification of Species Identity

We conducted initial morphological examinations to ensure that the ant specimens were correctly identified. We measured the diameter of the scapus base and the scapus length–head width ratio to distinguish *M. rubra* and *M. ruginodis* from other Myrmicinae [25]. We also considered features such as the petiolus shape, postpetiolus posture and propodeal spines to differentiate between *M. rubra* and *M. ruginodis*. As a second line of evidence, we retrieved the mitochondrial *cytochrome oxidase 1* (*CO1*) gene, a common barcoding gene for animals (Supplementary Tables S1 and S2) and compared them to available barcodes for species of Formicidae. The retrieved *CO1* sequences matched published *M. rubra* and *M. ruginodis* barcodes, thus validating our morphological examination.

2.2. Proteomic and Transcriptomic Landscapes

We used our bespoke proteotranscriptomics workflow (Figure 1) to investigate the venom components of both ant species. This generated 69,929,174 sequencing reads for *M. rubra* and 69,617,668 for *M. ruginodis* (69,645,529 and 69,318,655, respectively, after trimming and quality control). The clustered assemblies contained 512,855 (*M. rubra*) and 466,158 (*M. ruginodis*) unique contigs. We mapped the trimmed reads onto the two assemblies, revealing minimum mapping rates of 96.30%. BUSCO results showed that at least 94.2% of the expected hymenopteran genes were present (*M. rubra* C:95.5% [S:8.8%, D:86.7%], F:1.6%, M:2.9%, n:5991; *M. ruginodis* C:94.2% [S:8.8%, D:85.4%], F:2.0%, M:3.8%, n:5991).

De novo transcriptomes for venom glands are known to overestimate the diversity of toxin transcripts and produce false-positive sequences [28–30]. This phenomenon is likely to be amplified by the use of multiple assemblers. Therefore, we added proteomic verification to our analysis and used our clustered assembly as a database for peptide searches. For the peptide searches, Mascot assigned the spectra to 2085 (*M. rubra*) and 1695 (*M. ruginodis*) different open reading frames (ORFs). We removed 1797 (*M. rubra*) and 1314 (*M. ruginodis*) spectra from the dataset using our filtering protocol (Section 5.6). All remaining hits were covered by at least two peptides. When combining data from both species, the molecular weight of venom components ranged from 2.6 to 377.8 kDa, with sequence lengths of 21–3392 amino acids. We annotated 255 of the 288 candidates in *M. rubra* and 348 of the 381 candidates in *M. ruginodis* using BLAST.

2.3. Venom Composition of Myrmica rubra

We identified 44 proteins in *M. rubra* venom with similarities to known venom proteins, and these were assigned to three protein families. The vast majority (37/44 or ~84% of total protein diversity) belonged to the venom serine protease or S1 protease family (hereafter VSPs). Another four (~9%) belonged to the venom acid phosphatase family, and the remaining three (~7%) were related to the CAP superfamily (cysteine-rich secretory proteins, antigen 5 and pathogenesis-related 1 proteins). VSPs were not only the most diverse protein family among the *M. rubra* venom candidates but also the most abundant. The sum of all VSP members expressed in transcripts per million (TPM) was 76.7% of all contigs in the *M. rubra* venom gland, followed by the CAP proteins (18.5%) and the venom acid phosphatases (4.8%).

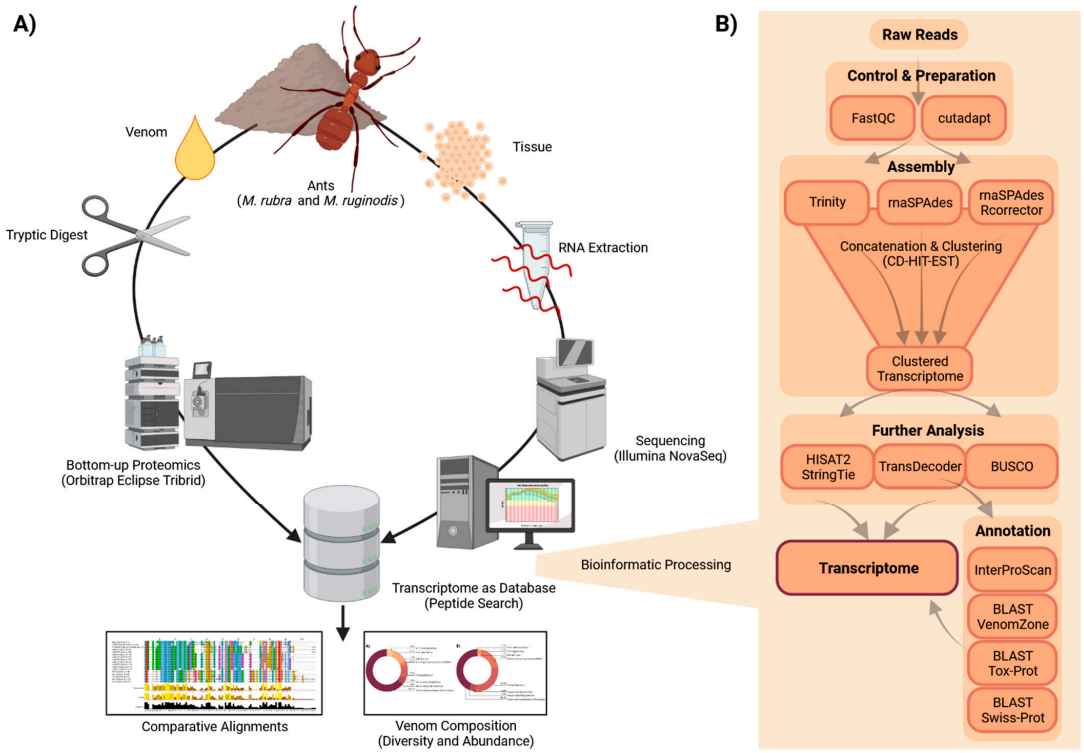


Figure 1. Overview of our proteotranscriptomics workflow. (**A**) Proteomics workflow: Crude venom was collected, digested and analyzed in a bottom–up proteomics approach using an Orbitrap Eclipse Tribrid MS and the transcriptome database. (**B**) Transcriptomics workflow: RNA was sequenced on an Illumina NovaSeq system, and the raw sequencing data were preprocessed and assembled using multiple algorithms. The concatenated dataset was further analyzed and annotated based on different sources of information. The resulting ORFs were used as a database for the proteomics experiment. Transcripts validated at the proteome level were used for the subsequent analysis of venom components in both species.

2.4. Venom Composition of Myrmica ruginodis

We identified 113 proteins in *M. ruginodis* venom with similarities to known venom proteins, and these were assigned to eight protein families (Figure 2). VSPs were again the most diverse (72/113, or ~64% of total protein diversity), followed by CAP proteins (13/113, 11.5%) and phospholipase A1 (PLA) (11/113, ~10%). Six proteins (~5%) were assigned to the M12 metalloproteases, five (~4%) to the venom acid phosphatases, and three (~3%) to the Kunitz-type serine protease inhibitors. Another two proteins (~2%) were members of the EGF-like family of toxins, and one (~1%) was a putative S9 dipeptidyl peptidase. VSPs were again the most abundant components, accounting for 43.4% of all transcripts in the *M. ruginodis* venom glad. The PLAs were next (28.5%), followed by Kunitz-type serine protease inhibitors (18.0%), and the remainder were minor components: CAP proteins (2.5%), EGF-like toxins (1.7%) and venom dipeptidyl peptidase (0.6%). The least abundant protein family was the M12 metalloprotease, accounting for 0.1% of all transcripts in the *M. ruginodis* venom gland.

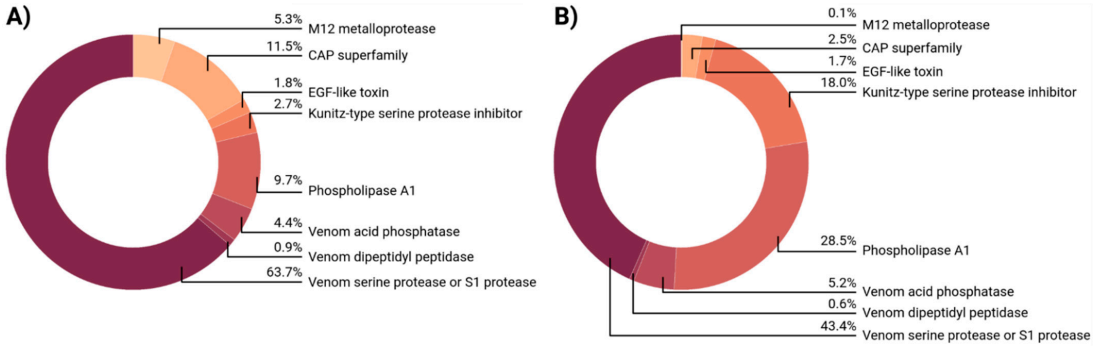


Figure 2. Venom composition of *M. ruginodis* by venom protein family. (**A**) Protein diversity based on absolute numbers of represented sequences. (**B**) Abundance based on transcripts per million (TPM).

2.5. Diversity and Characteristics of EGF-Like Toxins in Myrmicine Ants

The venom proteome of *M. ruginodis* contained two members of the EGF-like toxin family, whereas none were found in the *M. rubra* proteome. We therefore interrogated the transcriptomes of both species for additional EGF-like toxins by performing a BLAST search against the transcriptomic datasets. We identified three additional EGF-like toxin precursors in *M. ruginodis* (making five in total) and four such sequences in *M. rubra*. SignalP analysis and alignments with known ant EGF-like toxins revealed that these are secreted proteins that are expressed as prepeptides with an adjacent signal peptide but no propeptide between the EGF-like domain and the signal peptide. The predicted mature toxins were 49–56 amino acids in length with predicted molecular masses of 5.2–6.0 kDa (Table 1). All corresponding contigs showed higher TPM values or were tracked only in samples from venom gland tissue and not in body tissue samples.

Table 1. Characteristics of EGF-like toxins identified in *M. rubra* and *M. ruginodis* venom glands. The lengths of precursor and mature toxin sequences are shown in amino acids, where # denotes the number of AAs, alongside the predicted molecular weights (MW) and isoelectric points (pI) of the mature toxins. Toxins marked with * were detected by proteomic analysis.

Species	Toxin	# AA Precursor	# AA Mature Toxin	MW (kDa)	pI (pH)
M. rubra	U-MYRTX-Mrub1a	79	49	5.4	5.29
	U-MYRTX-Mrub1b	86	56	6.0	4.80
	U-MYRTX-Mrub1c	76	46	5.2	4.59
	U-MYRTX-Mrub1d	81	51	5.7	5.78
M. ruginodis	U-MYRTX-Mrug1a *	79	49	5.4	5.41
	U-MYRTX-Mrug1b *	79	49	5.4	5.41
	U-MYRTX-Mrug1c	86	56	6.0	4.80
	U-MYRTX-Mrug1d	81	51	5.6	4.72
	U-MYRTX-Mrug1e	79	49	5.3	4.76

To gain further insight into the diversity and function of ant EGF-like toxins, we analyzed their similarity to related sequences in silico. We compared the mature sequences of all putative EGF-like toxins in both species to all known EGF-like toxins from other ants. This alignment revealed an overall similar architecture, featuring a conserved six-cysteine backbone and several conserved sites, particularly within the signal peptide. The propeptide, found in plesiotypic and nontoxic EGF hormones, was not present in the EGF-like toxins. Despite the overall similarity among the sequences, we observed some differences in the inter-cysteine spacing and length.

We constructed a maximum likelihood phylogenetic tree to find unrecognized differences between the proteins and to gain insight into their evolutionary history and relationship. The tree contained three major clades of EGF-like toxins, each exclusively comprising toxins from one subfamily of ants. The MYRTX-clade contained all EGF-like toxins from Myrmicinae (taxonomically represented by *M. rubra, M. ruginodis* and *M. rubida*) and achieved 77% bootstrap support. The MIITX-clade was classified as a sister group of the myrmicine toxins and contained EGF-like toxins from Myrmeciinae (*M. gulosa* and *Myrmecia chrysogaster*). It received 97% bootstrap support. Finally, the ECTX-clade was classified as a sister group to all remaining ant EGF-like toxins, and comprised ectatommine toxins found only in *Rhytidoponera metallica*. It also received 100% bootstrap support. Although EGF-like toxins from Myrmeciinae and Ectatomminae formed a single clade and are thus similar at the sequence level, a much higher degree of sequence diversity was indicated for members of the MYRTX-clade. Here, three potential subclades were identified which we named MYRTX-clades A, B and C. MYRTX-clade A contains four EGF-like toxins identified in *M. ruginodis* and two identified in *M. rubra* (U-MYRTX-Mrub1a). MYRTX-clade B has a single member belonging to *M. rubra* (U-MYRTX-Mrub1c). MYRTX-clade C contains the remaining EGF-like toxins from *M. rubra* and *M. ruginodis*, and U18-MYRTX-Mri1a contains the remaining EGF-like toxins from *M. rubida*. However, some of these shallow clades within the MYRTX lineage received only marginal bootstrap support values and the relationships between them must be interpreted with caution.

Finally, we employed a strategy related to that of Eagles and colleagues [31] by initiating a BLAST search to identify patterns of similarity between ant EGF-like toxins and known EGF hormones across the animal kingdom (Table 2). We found that five major subgroups of EGF-like toxins exist in ants. Interestingly, the similarity subgroups revealed by this approach corresponded to clades within the EGF-like toxin phylogeny. The first similarity subgroup comprised the two peptides in the MIITX-clade, which are highly similar to vertebrate heparin-binding EGF (HBEGF) hormones. The second similarity subgroup comprised the members of the ECTX-clade, which are similar to vertebrate betacellulin and epiregulin. The remaining three similarity subgroups featured EGF-like toxins from the MYRTX-clade (myrmicine ants). The most diverse of these three groups contained EGF-like toxins resembling vertebrate transforming growth factor α (TGFα) hormones and comprised six members: two from *M. rubra* (U-MYRTX-Mrub1a and U-MYRTX-Mrub1d) and four from *M. ruginodis* (U-MYRTX-Mrug1a, 1b, 1d and 1e), representing MYRTX-clade A. The second group contained a single peptide (U-MYRTX-Mrub1c) related to vertebrate epiregulin, corresponding to MYRTX-clade B. The remaining three EGF-like toxins (U18-MYRTX-Mri1a, U-MYRTX-Mrub1b and U-MYRTX-Mrug1c) resemble insect Spitz-like proteins and mostly represent MYRTX-clade C.

Table 2. List of ant EGF-like toxins and closely related EGF hormones sorted by clade. The top BLAST hit according to our criteria is shown along with its similarity (percentage) to each toxin. Toxins marked with an * were discovered in this study.

Toxin	BLAST Result ID	Similarity (%)	Clade	EGF-Type
ECTX(02)-Rm1a	RXN00400.1	48.0	ECTX-clade	Vertebrate betacellulin-like
ECTX(02)-Rm1b	RXN00400.1	46.0	ECTX-clade	Vertebrate betacellulin-like
ECTX(02)-Rm1c	XP_032961198.1	50.0	ECTX-clade	Vertebrate betacellulin-like
ECTX(02)-Rm1d	XP_042333623.1	46.3	ECTX-clade	Vertebrate epiregulin-like
ECTX(02)-Rm1e	XP_036083747.1	41.4	ECTX-clade	Vertebrate epiregulin-like
MIITX(02)-Mc1a	XP_041957410.1	62.2	MIICTX-clade	HBEGF-like
U-MIITX(02)-Mg1a	XP_038648772.1	65.8	MIICTX-clade	HBEGF-like
U-MYRTX-Mrub1a *	XP_041634697.1	57.1	MYRTX-clade A	Vertebrate TGF-like
U-MYRTX-Mrub1d *	XP_041634697.1	57.1	MYRTX-clade A	Vertebrate TGF-like
U-MYRTX-Mrug1a *	XP_041634697.1	55.3	MYRTX-clade A	Vertebrate TGF-like
U-MYRTX-Mrug1b *	XP_041634697.1	51.1	MYRTX-clade A	Vertebrate TGF-like
U-MYRTX-Mrug1d *	XP_041634697.1	57.1	MYRTX-clade A	Vertebrate TGF-like

Table 2. *Cont.*

Toxin	BLAST Result ID	Similarity (%)	Clade	EGF-Type
U-MYRTX-Mrug1e *	XP_041634697.1	57.1	MYRTX-clade A	Vertebrate TGF-like
U-MYRTX-Mrub1c *	XP_019908008.1	58.8	MYRTX-clade B	Vertebrate epiregulin-like
U-MYRTX-Mrub1b *	XP_016916180.1	63.0	MYRTX-clade C	Insect Spitz-like
U-MYRTX-Mrug1c *	XP_016916180.1	63.0	MYRTX-clade C	Insect Spitz-like
U18-MYRTX-Mri1a	XP_016916180.1	63.0	MYRTX-clade C	Insect Spitz-like

3. Discussion

3.1. Serine Proteases and Kunitz-Type Serine Protease Inhibitors

VSPs dominated the venom profile of both *M. rubra* and *M. ruginodis* and share similarities with known members of this class from other hymenopteran genera, particularly *Apis*, *Bombus* and *Polistes*. Like other serine proteases, VSPs hydrolyze peptide bonds and cause protein degradation, often triggering cytotoxic or hemotoxic effects [32]. However, few VSPs from insect venom have been analyzed in detail. One exception is Bi-VSP from the venom of *Bombus ignites*, which is similar to several of the *M. rubra* and *M. ruginodis* VSPs. Bi-VSP is a multifunctional serine protease that activates the phenoloxidase cascade and causes lethal melanization in insects, but in mammalian blood it has coagulotoxic effects by activating prothrombin and cleaving fibrinogen [33]. Given the similarity between Bi-VSP and several VSPs in *M. rubra* and *M. ruginodis*, it is possible that at least some of the latter possess similar insecticidal and coagulotoxic activities. Interestingly, Bi-VSP acts in concert with a co-injected Kunitz-type serine protease inhibitor (Bi-KTI), which inhibits plasmin as part of a multipronged attack on the coagulation cascade [34]. Although we found no evidence for the presence of Kunitz-type serine protease inhibitors in *M. rubra* venom at the proteomic level, three members of this class were present in the venom proteome of *M. ruginodis*, and they were the third most abundant component in this sample based on transcriptome data. Sequence comparisons revealed that Kunitz-type serine protease inhibitors in myrmicine ants are closely related to those found in the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca* (UniProtKB Q8T0W4) and the bumblebee *Bombus terrestris* (Figure 3) [35]. In particular, the *B. terrestris* protein (Bt-KTI, UniProtKB D8KY58) is similar to Bi-KTI (UniProtKB G3LH89) from *Bombus ignitus* and can likewise inhibit plasmin [36]. It is therefore possible that the combinatorial mode of action between VSPs and Kunitz-type serine protease inhibitors observed in *B. ignitus* venom may also be prevalent in myrmicine ants [34]. However, the venom profiles of other myrmicine ants must be resolved and complemented with bioactivity studies to confirm whether the venom components work in this cooperative manner.



Figure 3. Sequence similarities between Kunitz-type serine protease inhibitors from *M. ruginodis* and other hymenopteran species (*Bombus terrestrix*, *Bombus ignitus* and *Pimpla hypochondriaca*). Conserved cysteine residues are shown in blue.

3.2. Venom Allergens

The CAP family is another important group of venom components in *M. rubra* and *M. ruginodis*, although particularly in the latter, where they contribute significantly to the venom profile. CAP proteins are found in most animal venoms and are functionally very diverse [6,37]. For example, cone snail CAP proteins may function as proteolytic enzymes, whereas snake CAP proteins are neurotoxins [6]. In ants and other hymenopterans, CAP proteins are clinically relevant because they are major allergens that underlie the reactions

to bee stings and ant bites [38]. We identified three CAP proteins in the venom of *M. rubra* and 13 in *M. ruginodis*. Interestingly, most were highly similar to allergen 3 from the black imported fire ant (*Solenopsis richteri*), another myrmicine species. The CAP allergens in *Solenopsis* venoms can cause severe, sometimes fatal anaphylaxis in humans and are highly cross-reactive [10,39–41].

Another important group of hymenopteran venom allergens is the PLAs, which hydrolyze phosphatidylcholine and cause inflammation as well as local tissue damage. Some PLAs are described collectively as allergen 1 and exacerbate the allergic response to ant bites. The analysis of *M. ruginodis* venom in the 1960s revealed a surprising lack of PLAs despite their presence in other hymenopteran venoms [42], leading to predictions that future studies would reveal their presence also in *M. ruginodis* [43]. As predicted, we can report for the first time that PLA is also present in *M. ruginodis* venom, and indeed this is the first ever description of PLAs in this species. We identified 11 PLAs, accounting for 18.5% of the transcripts in the venom gland and thus representing the second most abundant protein family in *M. ruginodis* venom. Some of these proteins resembled a PLA from *Dinoponera quadriceps*, a ponerine ant, but most showed greater similarity to Sol i 1, an allergen from *Solenopsis invicta*, and are therefore also likely to trigger allergic reactions.

In summary, potential venom allergens representing the CAP and PLA families are present in the venoms of *M. rubra* and *M. ruginodis*. The candidates resemble proteins from related species that induce allergic reactions and sometimes severe anaphylaxis. In Germany, neither *M. rubra* nor *M. ruginodis* are known to cause significant allergic reactions, although both species are common and synanthropic [44]. However, dangerous allergic reactions have been reported in the USA, where *M. rubra* is considered an invasive pest [45]. Therefore, although *M. rubra* and *M. ruginodis* are not dangerous per se, stings may lead to occasional emergencies and should be treated with caution by the affected individual.

3.3. EGF-Like Toxins

The 113 venom components in *M. ruginodis* included two peptides with an EGF-like motif. These form part of a diverse family of metazoan peptide hormones that are also venom components in anemones and ants [14,22,31,46,47]. EGF-like peptides therefore provide another example of the "toxipotent" nature of peptide hormones and their potential to become weaponized as venom components [48–53].

Although we identified only two EGF-like peptides in the *M. ruginodis* proteome, the transcripts were among the top 30 most abundant. Given that not all mRNAs are constantly translated into proteins, we screened the venom gland transcriptomes of *M. rubra* and *M. ruginodis* for additional EGF-like toxins that were not detected in the proteome. This revealed four *M. rubra* toxins (U-MYRTX-Mrub1a, 1b, 1c and 1d) as well as three additional toxins from *M. ruginodis* (U-MYRTX-Mrug1c, 1d and 1e). This is a key finding that supports the general but lineage-specific presence of EGF-like toxins in formicoid ant venoms. Several EGF-like toxins have recently been described in the ant subfamilies Myrmeciinae (*M. gullosa* and *M. chrysogaster*), Ectatomminae (*R. metallica*), Myrmicinae (*Myrmica sulconodus, M. rubra, M. ruginodis, M. rubida, Pogonomyrmex californicus* and *Pogonomyrmex barbatus*) and Formicinae (*Formica aquilonia*) [14,22,31]. With the exception of the three peptides from *M. gulosa, M. chrysogaster* and *M. rubida*, all the EGF-like toxins were retrieved from whole-body transcriptomes or genomes, so it is unclear if they are translated into venom proteins [31]. In our study, we found that nine EGF-like toxins were expressed in the venom gland, two of which were also detected at the proteomic level. This suggests that EGF-like toxins are important venom components in Myrmicinae, and supports their presence in other formicoid venoms. However, transcriptome data may overestimate toxin diversity [30] and only two of the nine EGF-like toxins were verified at the protein level. Therefore, we recommend that future studies investigate the presence of EGF-like toxins in the venoms of different ants at the proteome level.

3.4. Evolution and Function of Venom Proteins in Myrmicine Ants

Animal venoms have evolved to serve three main functions: predation, defense and competitor deterrence [7]. Although ants use their venom systems mainly to overpower prey and defend their colony, defensive venoms largely underpin their evolutionary success [4]. The eusocial lifestyle of many ant species, with large numbers of individuals forming a single colony, presents a conspicuous target for predators [4]. Vulnerability thus led to the evolutionary innovation of chemical defense systems in ants, with two principal forms: the spraying of formic acid and the injection of venom. Although the acid-based defense system is better known to the general public, the number of species that deploy this mechanism is limited, whereas ~75% of all ant species inject venom [22,54]. Across the animal kingdom, defensive venoms are characterized by their ability to induce pain [55–57].

In agreement with this common role of ant venoms, the functional annotation of venom components in *M. rubra* and *M. ruginodis* suggests activities that may facilitate defense. For example, several protein families are associated with proteolytic and/or tissue-damaging activities, including VSPs, M12 metalloproteases and PLAs, which contribute to the painful effect of envenomation. Furthermore, the cooperative attack on the coagulation cascade by VSPs and Kunitz-type serine protease inhibitors may cause local edema and thus additional hypersensitivity.

The most interesting components identified in the venom systems of *M. rubra* and *M. ruginodis* were the EGF-like toxins, whose biological functions remain unclear. The corresponding myrmecine peptides (MIITX-clade) were recently identified as members of this venom protein family [31]. They showed no activity against insects but induced pain in mice for several days [31]. The MIITX EGF-like toxins may therefore have evolved to mimic HBEGF hormones, resulting in their remarkable algogenic effects by activating mammalian ErbB receptors. The authors also found that the other known ant EGF-like peptides resembled either vertebrate betacellulin or insect EGF-like hormones from *R. metallica*, depending on the analysis method. In contrast, the EGF-like toxin previously described in *M. rubida* was most similar to insect Spitz-like proteins, and may therefore have evolved to target insects. Our sequence analysis was largely consistent with these results, annotating the *R. metallica* (ECTX-clade) peptides as betacellulin or epiregulin, the MYRTX-clade C peptides as insect Spitz-like proteins and the *Myrmecia* peptides (MIITX-clade) as HBEGF mimics. Phylogenetic and sequence similarity analysis for the MYRTX peptides indicated a potentially diverse evolutionary history and molecular diversification. Here, functionally divergent peptides may have emerged within the Myrmicinae that share similarity with different vertebrate and insect templates (Figure 4). However, some of the internal branches of the phylogeny were only weakly supported by bootstraps and thus must be interpreted with caution. Future studies adding more EGF-like toxins from other Formicoidea and in particular from the Myrmicinae will help to clarify the relationships and strengthen the proposed hypotheses. That said, our phylogenetic tree suggests that the EGF-like toxins resembling insect Spitz-like proteins (MYRTX-clade C) were more recently recruited to the venom system of myrmicine ants, probably as weapons against other insects given their similarity to insect hormones. MYRTX-clade A appears to be derived from weaponized TGF hormones and may therefore target the corresponding vertebrate receptors, whereas the single peptide representing MYRTX-clade B is strikingly similar to vertebrate epiregulin and is also likely to target vertebrates. It shares this similarity with two peptides from the distant ECTX-clade, suggesting that convergent evolution has resulted in the recruitment of epiregulin into ant venom systems twice, once each in the subfamilies Ectatomminae and Myrmicinae (Figure 4).

Many of the identified EGF-like toxins in the MYRTX-clade may target vertebrates and thus probably act as defensive weapons. This agrees with earlier reports of painful stings (by European standards) and significant neurotoxicity caused by *M. ruginodis*. However, some EGF-like toxins have different effects depending on the type of test [31], so additional analysis with more sophisticated software and a wider range of ant venoms is recommended before drawing firm conclusions. The ability of MYRTX-clades A and B to affect vertebrates

could also be studied by isolating or synthesizing them, followed by careful functional assays.

In addition to defense, ant venom can be used for predation and minor roles such as communication, which must be considered when assigning functions to venom components. In *M. rubra* and *M. ruginodis*, the EGF-like toxins of MYRTX-clade C that resemble insect Spitz-like proteins may be used to overpower insect prey, perhaps in cooperation with VSPs. Indeed, many ant venom components may serve multiple functions depending on the context. For example, the universal molecular function of VSPs is the hydrolysis of peptide bonds, but this may fulfil various biological roles including trophic agents when injected to insect prey, spreading factors that facilitate the rapid uptake of co-injected toxins, the decomposition of killed prey to provide nutrition, and the triggering of edema and localized pain in predators. The strict division of venom components into unique functional categories may not be possible, and it may be more valuable to interpret venom exochemistry in a context-dependent manner. Indeed, the multifunctional nature of venom components has been reported for several venomous animals, including some ants [49,58–61].

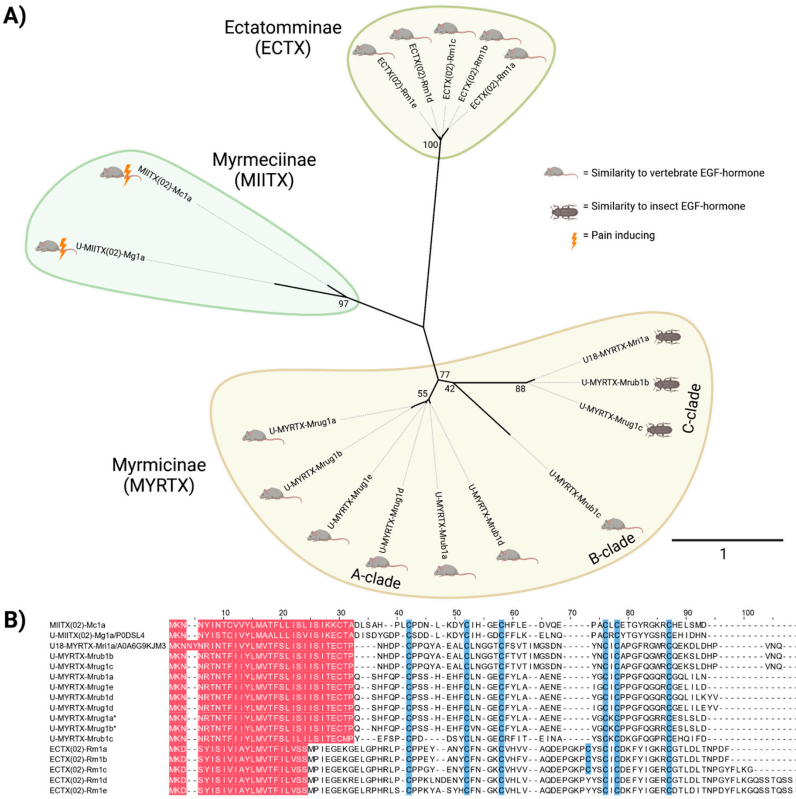


Figure 4. Relationships between all known EGF-like toxins from ants. (**A**) The unrooted phylogenetic tree includes node numbers indicating bootstrap support. The colored boxes indicate the taxonomic placement of the species in which the corresponding toxin was identified. Major clades within the myrmicine EGF-like toxins are indicated (A-clade, B-clade and C-clade). Animal images show the predicted target of each toxin. (**B**) The sequence alignment shows predicted signal peptides (adjusted SignalP prediction and information from UniProtKB) in red and conserved cysteine residues in blue. Toxins marked with an * were discovered in this study.

4. Conclusions

Venoms have contributed to the evolutionary success of many animal lineages, particularly arthropods. Ants are among the most abundant arthropod species, but many have not been studied in detail and questions remain about their evolutionary ecology and biochemistry, including the composition of their venom systems.

We applied a modern venomics workflow based on proteotranscriptomics to shed light on the venom composition of *M. rubra* and *M. ruginodis*, two common myrmicine ant species native to central Europe. We identified several protein families commonly found in ant venoms, including VSPs, Kunitz-type serine proteases, CAP superfamily protein and PLAs. Many of these components are proteolytic enzymes that may be used for predation, defense, as spreading factors, for external digestion or combinations of the above. We also identified several allergenic components in these venoms. Although neither *M. rubra* nor *M. ruginodis* is recognized as medically significant, potentially dangerous anaphylactic shock may occur following envenomation. The previous analysis of *M. ruginodis* venom revealed the conspicuous absence of phospholipases. However, by identifying several members of the PLA family, we demonstrate the presence of these important allergenic substances in *M. ruginodis* venom for the first time. We also detected previously unknown EGF-like toxins in the venom systems of *M. rubra* and *M. ruginodis,* highlighting their importance as lineage-specific ant toxins.

Our work represents a valuable contribution to the growing body of knowledge on the composition, evolutionary ecology and biochemistry of ant venom systems, and we have discussed the potential functions and interactions of the venom components. To test our hypotheses, it will be necessary to isolate or synthesize individual venom peptides and proteins for bioactivity assays. It is also important to broaden the taxonomic coverage of ant venomics, not only to include fellow species of Myrmicinae but also other subfamilies. Such studies may also lead to the discovery of novel bioactive components that can be translated into drugs and bioinsecticides.

5. Materials and Methods

5.1. Animals

Specimens were collected from two colonies each of *M. rubra* and *M. ruginodis* in Giessen (Hesse, Germany). The ants were kept in plastic containers (18 × 14 × 12 cm) filled with soil and were maintained at ~23 °C and 40% relative humidity with a 16 h photoperiod. They were fed weekly with mealworms (*Tenebrio molitor*) and 20% sucrose solution. We examined the collected ants under a VHX-5000 microscope (Keyence, Neu-Isenburg, Germany) to verify the species using an identification key [62].

5.2. Collection of Venom and Venom Glands

We developed a noninvasive venom-sampling protocol in which ants were gently lifted by the thorax using watchmakers' forceps, allowing their abdomen to be submerged in 500 µL methanol in a 1.5-mL Eppendorf tube for 30 s. This induced the animals to release venom into the solvent. The ants were then transferred to a small plastic container and their venom glands were dissected under a light microscope. The venom glands and remaining body tissue were stored separately in TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). We collected samples from 27 ants in each colony of both species. Samples from the same colony were pooled and stored at –80 °C.

5.3. RNA Extraction and Sequencing

Total RNA was extracted in TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions and was then treated with Turbo DNase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and RNA Clean and Concentrator 5 (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Transcriptome library preparation and sequencing were outsourced to Macrogen (Seoul, Korea). Libraries were prepared using the TruSeq stranded mRNA kit including poly(A) RNA selection. Samples were sequenced on an Illumina NovaSeq system to produce 151 bp

paired-end reads. The raw sequence data have been uploaded to the NCBI database (Bio Project PRJNA807911).

5.4. Transcriptome Analysis

Read quality was controlled using FastQC v0.11.9 [63]. We removed sequencing adapters and poly(G) tails, and performed quality trimming with cutadapt v2.10 [64]. All RNA-Seq data from the venom glands and remaining body tissues was used for de novo transcriptome assembly by applying a multiple assembler strategy comprising Trinity v2.11.0 [65] with HPC GridRunner v1.0.2 [66] and a minimum assembled contig length of 30, rnaSPAdes v3.14.1 [67] and one additional rnaSPAdes assembly, based on reads corrected with Rcorrector v1.0.4 [68]. Both rnaSPAdes assemblies were run with *k*-mer sizes of 21, 33 and 55. Assemblies from all three approaches were concatenated and clustered using CD-HIT-EST v4.8.1 [69] with a sequence identity of 1. Further steps were applied to the clustered de novo transcriptome. To verify the assembly, we ran BUSCO v4.1.4 [70] with lineage dataset hymenoptera_odb10 (2020-08-05). Trimmed reads were mapped with HISAT2 v2.2.1 [71] against the assembly and counted with StringTie v2.1.6 [72] to calculate TPM values. Gene expression for each species was calculated using the mean TPM value of both colonies for each species. We used TransDecoder v5.5.0 [65] to identify ORFs with a minimum protein length of 10 amino acids for the proteomics peptide search. We also used SAMtools [73] for data conversions.

A blastp v2.10.1 [74] search against UniProtKB/Swiss-Prot v2020_06 [75], VenomZone [76] (downloaded on 11 January 2021) and UniProtKB/Swiss-Prot Tox-Prot [77] (downloaded on 15 January 2021) was performed on confirmed ORFs to identify venom toxins. The E-value was set to a maximum of 1×10^{-3} and max_target_seqs was set to the size of the query database. For each BLAST hit, we calculated the coverage of query and subject, and similarity with the BLOSUM62 matrix [78] was assessed using BioPython v1.77 [79]. Results were sorted by similarity, query and subject coverage descending for each venom candidate. The resulting top BLAST hit was used for further analysis. We screened InterProScan v5.52-86.0 [80] with all included databases. Putative venom components were assigned to the corresponding venom family.

We manually verified the identity of venom components in comparative alignments for each venom protein family using MAFFT v7.490 [81], Jalview v2.11.1.4 [82], FastTree v2.1.11 [83] and iTol v6 [84] with predictions from SignalP v6.0g [85]. Comparison sequences were collected from VenomZone (release October 2021), UniProtKB/Swiss-Prot v2021_04, and UniProtKB/TrEMBL v2021_04. We also applied alignment seeds available from Pfam v35.0 [86]. Program calls with parameters used are listed in Table S5.

5.5. Species Identification by CO1 Sequence Analysis

Overrepresented sequences identified with FastQC were used to extract the corresponding reads from the raw sequence data. These were transferred to one FASTA file per species along with their corresponding mates, without preserving the mate–pair relationship of the reads. Sequences were then dereplicated using VSEARCH v2.15.1 [87] with derep_prefix and used as a query search (blastn v2.10.1) with default settings and E-value $< 1 \times 10^{-3}$ against available Formicidae *CO1* sequences in BOLD [88] (downloaded on 30 November 2020). All hits with 100% identity and 100% query coverage were kept, including multiple matches per read. Overrepresented sequences are listed in Supplementary Table S1.

5.6. Proteomics

Our bottom–up proteomics strategy involved a mass spectrometry protocol already applied to animal venoms [48,89]. Briefly, we dissolved 10 µg of sample material in 25 mM ammonium bicarbonate containing 0.6 nM ProteasMax. We added 5 mM DTT and incubated for 30 min at 50 °C to complete the disulfide reduction, followed by modification with 10 mM iodacetamide for 30 min at 24 °C. After quenching the reaction with excess

cysteine, we added a 50:1 ratio of trypsin and digested the venom for 16 h at 37 °C. After stopping the reaction by adding 1% trifluoroacetic acid, we purified the sample using a C18-ZipTip (Merck-Millipore, Burlington, MA, USA), dried it under vacuum and redissolved the material in 10 µL 0.1% trifluoroacetic acid.

We separated the peptides on an UltiMate 3000RSLCnano device (Thermo Fisher Scientific) then injected 1 µg of the sample material into a 50 cm µPAC C18 column (Pharma Fluidics, Thermo Fisher Scientific) in 0.1% formic acid at 35 °C. The peptides were eluted in a linear gradient of 3–44% acetonitrile over 240 min. The column was then washed at a flow rate of 300 nL/min with 72% acetonitrile. The separated peptides were injected into an Orbitrap Eclipse Tribrid MS (Thermo Fisher Scientific) in positive ionization mode with the spray voltage set to 1.5 kV and a source temperature of 250 °C achieved using a TriVersa NanoMate (Advion BioSciences, Ithaca, NY, USA). We scanned the samples in data-independent acquisition mode with the following settings: scanning time = 3 s, *m/z* range = 375–1500 and resolution = 120,000. Auto-gain control was set to standard with a maximum injection time of 50 ms. The most intense ions in each cycle with a threshold ion count > 50,000 and charge states of 2–7 were selected with an isolation window of 1.6 *m/z* for higher-energy collisional dissociation (normalized collision energy = 30%). Fragment ion spectra were acquired in the linear ion trap with a rapid scan rate and normal mass range. The maximum injection time was set to 100 ms and selected precursor ions were excluded for 15 s post-fragmentation.

We used Xcalibur v4.3.73.11 and Proteome Discoverer v2.4.0.305 (both from Thermo Fisher Scientific) for data acquisition and analysis. Proteins were identified using Mascot v2.6.2 [90] by searching against the transcriptome sequences using the following settings: precursor ion mass tolerance = 10 ppm, carbamidomethylation as a global modification, methionine oxidation as a variable modification, and one missed cleavage allowed. Fragment ion mass tolerance in the linear ion trap for MS^2 detection was set to 0.8 Da and the false discovery rate was limited to 0.01 using a decoy database. For qualitative analysis, we only considered proteins that were identified with a Mascot score of at least 30 and at least two verified peptides. A comprehensive list of all venom components identified with confidence, and their characteristics and annotations, are provided in the Supplementary Materials. Proteomic raw data have been uploaded to PRIDE (PXD033537).

5.7. Analysis of EGF-Like Toxins

The *M. ruginodis* EGF-like toxins were used as blastp v2.11.0 queries against the unfiltered TransDecoder output from both species (E-value < 10, word size = 3). We kept only those hits with a query coverage of 100% which led to a resulting E-value < 2.47×10^{-24}. Then, we manually dereplicated the resulting sequences and renamed the unique ones. We adopted the Touchard nomenclature [10], which is modified from the King nomenclature for arthropod venom peptides [91]. Given that both species we analyzed were myrmicine ants, we named the EGF-like toxins myrmicitoxins (MYRTX), and assigned the prefix "U", which is used to designate toxins lacking a known molecular target.

SignalP slow–sequential mode for eukarya was used to predict signal peptides. MAFFT and Jalview were used to analyze and confirm our findings compared to the known EGF-like toxins of *Manica rubida* (UniProtKB A0A6G9KJM3) and *Myrmecia gulosa* (UniProtKB P0DSL4). We adjusted the SignalP results (*M. rubra* and *M. ruginodis*) after inspecting the multiple sequence alignment to increase the signal peptide length from 28 to 30 amino acids. Molecular weights and isoelectric points (pI) were calculated using Bio Python v1.79.

For phylogenetic analysis, sequences of all known and herein identified EGF-like toxins were aligned using MAFFT v7.505 FFT-NS-2 at default parameters. We then constructed a maximum likelihood tree with ultrafast bootstrap [92] (based on 20,000 replicates) implemented in IQ-TREE v2.1.2 [93] with ModelFinder [94] enabled (FLU + G4 model). The resulting tree was visualized on iTOL. A blastp v2.11.0 search was performed against a preformatted NCBI nonredundant protein sequence database (downloaded with BLAST

script update_blastdb.pl nr on 6 March 2022) with default settings (E-value < 10, word_size = 3, max_target_seqs = 100) to recover similarities between EGF-like toxins and known EGF hormones. The top 100 hits were sorted by similarity to the query sequence and the most similar empirically verified hit with a similar sequence length was used to hypothesize similarity between the toxin and hormone (Supplementary Table S4).

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: http://www.mdpi.com/xxx/s1. Supplementary Table S1: Overrepresented sequences reported in FastQC during quality control, Supplementary Table S2: Results of CO1 sequence analysis, Supplementary Table S3: Comprehensive list of venom components, Supplementary Table S4: BLAST results of EGF-like toxins search, Supplementary Table S5: Program calls with parameters, Supplementary Data S01-S11: Resulting alignments from MAFFT runs used to validate the venom families as FASTA files, Data S12: Tree of EGF-like toxins used for Figure 4 in NEWICK format. Listing S1. Shell script to prepare the necessary GTF-file for the program call of StringTie. Listing S2. Python script to calculate molecular weights and isoelectrical points.

Author Contributions: Conceptualization, S.H., A.B., T.L., K.B. and A.V.; methodology, T.L., R.Ö., F.F. and G.L.; software, S.H., F.F., T.T. and K.B.; formal analysis, S.H.; investigation, S.H., F.F., J.H., K.B. and T.L.; data curation, S.H., F.F. and T.T.; writing—original draft preparation, S.H., K.B. and T.L.; writing—review and editing, all authors; visualization, S.H.; supervision, K.B. and A.V.; project administration, A.B.; funding acquisition, A.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The work is a result of the Animal Venomics project embedded into the Centre for Translational Biodiversity Genomics (LOEWE–TBG) and was granted to A.V. under the program "LOEWE–Landes-Offensive zur Entwicklung Wissenschaftlich-Ökonomischer Exzellenz" of the Hessian Ministry of Higher Education, Research and the Arts. We acknowledge access to resources financially supported by the BMBF grant FKZ 031A533 within the de.NBI network. The authors also acknowledge funding supporting the LOEWE Centre for Insect Biotechnology and Bioresources.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Raw proteomic and transcriptomic data are publicly available. Raw proteomic data have been uploaded to PRIDE (PXD033537). Raw transcriptomic data have been uploaded to the NCBI database (BioProject PRJNA807911).

Acknowledgments: We acknowledge Björn M. von Reumont for early discussions about the project; Alexander Goesmann, Oliver Rupp and Sebastian Jaenicke for providing their bioinformatics expertise in the field of high-throughput sequencing; and Richard M. Twyman for manuscript editing. Figures 1, 3 and 4 were created using BioRender.com (license YQ23SOTE2G, BK23SOSYG7, and QF23WF352V).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. California Academy of Science AntWeb. Version 8.69.2. Available online: https://www.antweb.org/ (accessed on 2 March 2022).
2. Ward, P.S. The Phylogeny and Evolution of Ants. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **2014**, *45*, 23–43. [CrossRef]
3. Hölldobler, B.; Wilson, E.O. *The Ants*; Harvard University Press: Cambridge, MA, USA, 1990; ISBN 978-0-674-04075-5.
4. Schmidt, J.O. Chemistry, Pharmacology, and Chemical Ecology of Ant Venoms. In *Venoms of the Hymenoptera: Biochemical, Pharmacological and Behavioural Aspects*; Piek, T., Ed.; Academic Press: London, UK, 1986; pp. 425–508. ISBN 978-0-12-554770-3.
5. Casewell, N.R.; Wüster, W.; Vonk, F.J.; Harrison, R.A.; Fry, B.G. Complex Cocktails: The Evolutionary Novelty of Venoms. *Trends Ecol. Evol.* **2013**, *28*, 219–229. [CrossRef]
6. Fry, B.G.; Roelants, K.; Champagne, D.E.; Scheib, H.; Tyndall, J.D.A.; King, G.F.; Nevalainen, T.J.; Norman, J.A.; Lewis, R.J.; Norton, R.S.; et al. The Toxicogenomic Multiverse: Convergent Recruitment of Proteins Into Animal Venoms. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* **2009**, *10*, 483–511. [CrossRef] [PubMed]
7. Schendel, V.; Rash, L.D.; Jenner, R.A.; Undheim, E.A.B. The Diversity of Venom: The Importance of Behavior and Venom System Morphology in Understanding Its Ecology and Evolution. *Toxins* **2019**, *11*, 666. [CrossRef]
8. Robertson, P.L. A Morphological and Functional Study of the Venom Apparatus in Representatives of Some Major Groups of Hymenoptera. *Aust. J. Zool.* **1968**, *16*, 133–166. [CrossRef]

9. Fox, E.G.P.; Adams, R.M.M. On the Biological Diversity of Ant Alkaloids. *Annu. Rev. Entomol.* **2022**, *67*, 367–385. [CrossRef]
10. Touchard, A.; Aili, S.; Fox, E.; Escoubas, P.; Orivel, J.; Nicholson, G.; Dejean, A. The Biochemical Toxin Arsenal from Ant Venoms. *Toxins* **2016**, *8*, 30. [CrossRef]
11. Aili, S.R.; Touchard, A.; Escoubas, P.; Padula, M.P.; Orivel, J.; Dejean, A.; Nicholson, G.M. Diversity of Peptide Toxins from Stinging Ant Venoms. *Toxicon* **2014**, *92*, 166–178. [CrossRef]
12. Barassé, V.; Touchard, A.; Téné, N.; Tindo, M.; Kenne, M.; Klopp, C.; Dejean, A.; Bonnafé, E.; Treilhou, M. The Peptide Venom Composition of the Fierce Stinging Ant *Tetraponera aethiops* (Formicidae: Pseudomyrmecinae). *Toxins* **2019**, *11*, 732. [CrossRef]
13. Touchard, A.; Téné, N.; Song, P.C.T.; Lefranc, B.; Leprince, J.; Treilhou, M.; Bonnafé, E. Deciphering the Molecular Diversity of an Ant Venom Peptidome through a Venomics Approach. *J. Proteome Res.* **2018**, *17*, 3503–3516. [CrossRef]
14. Touchard, A.; Aili, S.R.; Téné, N.; Barassé, V.; Klopp, C.; Dejean, A.; Kini, R.M.; Mrinalini, M.; Coquet, L.; Jouenne, T.; et al. Venom Peptide Repertoire of the European Myrmicine Ant *Manica rubida*: Identification of Insecticidal Toxins. *J. Proteome Res.* **2020**, *19*, 1800–1811. [CrossRef] [PubMed]
15. Aili, S.R.; Touchard, A.; Hayward, R.; Robinson, S.D.; Pineda, S.S.; Lalagüe, H.; Vetter, I.; Undheim, E.A.B.; Kini, R.M.; Escoubas, P.; et al. An Integrated Proteomic and Transcriptomic Analysis Reveals the Venom Complexity of the Bullet Ant *Paraponera clavata*. *Toxins* **2020**, *12*, 324. [CrossRef] [PubMed]
16. Touchard, A.; Labrière, N.; Roux, O.; Petitclerc, F.; Orivel, J.; Escoubas, P.; Koh, J.M.S.; Nicholson, G.M.; Dejean, A. Venom Toxicity and Composition in Three *Pseudomyrmex* Ant Species Having Different Nesting Modes. *Toxicon* **2014**, *88*, 67–76. [CrossRef] [PubMed]
17. Aili, S.R.; Touchard, A.; Petitclerc, F.; Dejean, A.; Orivel, J.; Padula, M.P.; Escoubas, P.; Nicholson, G.M. Combined Peptidomic and Proteomic Analysis of Electrically Stimulated and Manually Dissected Venom from the South American Bullet Ant *Paraponera clavata*. *J. Proteome Res.* **2017**, *16*, 1339–1351. [CrossRef]
18. Touchard, A.; Koh, J.M.S.; Aili, S.R.; Dejean, A.; Nicholson, G.M.; Orivel, J.; Escoubas, P. The Complexity and Structural Diversity of Ant Venom Peptidomes Is Revealed by Mass Spectrometry Profiling. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **2015**, *29*, 385–396. [CrossRef]
19. Herzig, V.; King, G.F.; Undheim, E.A.B. Can We Resolve the Taxonomic Bias in Spider Venom Research? *Toxicon X* **2019**, *1*, 100005. [CrossRef]
20. Lüddecke, T.; Vilcinskas, A.; Lemke, S. Phylogeny-Guided Selection of Priority Groups for Venom Bioprospecting: Harvesting Toxin Sequences in Tarantulas as a Case Study. *Toxins* **2019**, *11*, 488. [CrossRef]
21. Drukewitz, S.H.; von Reumont, B.M. The Significance of Comparative Genomics in Modern Evolutionary Venomics. *Front. Ecol. Evol.* **2019**, *7*, 163. [CrossRef]
22. Robinson, S.D.; Mueller, A.; Clayton, D.; Starobova, H.; Hamilton, B.R.; Payne, R.J.; Vetter, I.; King, G.F.; Undheim, E.A.B. A Comprehensive Portrait of the Venom of the Giant Red Bull Ant, *Myrmecia gulosa*, Reveals a Hyperdiverse Hymenopteran Toxin Gene Family. *Sci. Adv.* **2018**, *4*, eaau4640. [CrossRef]
23. Ceolin Mariano, D.O.; de Oliveira, Ú.C.; Zaharenko, A.J.; Pimenta, D.C.; Rádis-Baptista, G.; Prieto-da-Silva, Á.R.d.B. Bottom-Up Proteomic Analysis of Polypeptide Venom Components of the Giant Ant *Dinoponera quadriceps*. *Toxins* **2019**, *11*, 448. [CrossRef]
24. Santos, P.P.; Games, P.D.; Azevedo, D.O.; Barros, E.; de Oliveira, L.L.; de Oliveira Ramos, H.J.; Baracat-Pereira, M.C.; Serrão, J.E. Proteomic Analysis of the Venom of the Predatory Ant *Pachycondyla striata* (Hymenoptera: Formicidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **2017**, *96*, e21424. [CrossRef] [PubMed]
25. Heep, J.; Klaus, A.; Kessel, T.; Seip, M.; Vilcinskas, A.; Skaljac, M. Proteomic Analysis of the Venom from the Ruby Ant *Myrmica rubra* and the Isolation of a Novel Insecticidal Decapeptide. *Insects* **2019**, *10*, 42. [CrossRef] [PubMed]
26. Wanandy, T.; Wilson, R.; Gell, D.; Rose, H.E.; Gueven, N.; Davies, N.W.; Brown, S.G.A.; Wiese, M.D. Towards Complete Identification of Allergens in Jack Jumper (*Myrmecia pilosula*) Ant Venom and Their Clinical Relevance: An Immunoproteomic Approach. *Clin. Exp. Allergy* **2018**, *48*, 1222–1234. [CrossRef] [PubMed]
27. Pessoa, W.F.B.; Silva, L.C.C.; De Oliveira Dias, L.; Delabie, J.H.C.; Costa, H.; Romano, C.C. Analysis of Protein Composition and Bioactivity of *Neoponera villosa* Venom (Hymenoptera: Formicidae). *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 513. [CrossRef] [PubMed]
28. Holding, M.L.; Margres, M.J.; Mason, A.J.; Parkinson, C.L.; Rokyta, D.R. Evaluating the Performance of De Novo Assembly Methods for Venom-Gland Transcriptomics. *Toxins* **2018**, *10*, 249. [CrossRef]
29. von Reumont, B.M. Studying Smaller and Neglected Organisms in Modern Evolutionary Venomics Implementing RNASeq (Transcriptomics)—A Critical Guide. *Toxins* **2018**, *10*, 292. [CrossRef]
30. Smith, J.J.; Undheim, E.A.B. True Lies: Using Proteomics to Assess the Accuracy of Transcriptome-Based Venomics in Centipedes Uncovers False Positives and Reveals Startling Intraspecific Variation in *Scolopendra subspinipes*. *Toxins* **2018**, *10*, 96. [CrossRef]
31. Eagles, D.A.; Saez, N.J.; Krishnarjuna, B.; Bradford, J.J.; Chin, Y.K.-Y.; Starobova, H.; Mueller, A.; Reichelt, M.E.; Undheim, E.A.B.; Norton, R.S.; et al. A Peptide Toxin in Ant Venom Mimics Vertebrate EGF-like Hormones to Cause Long-Lasting Hypersensitivity in Mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2022**, *119*, e2112630119. [CrossRef]
32. Di Cera, E. Serine Proteases. *IUBMB Life* **2009**, *61*, 510–515. [CrossRef]
33. Choo, Y.M.; Lee, K.S.; Yoon, H.J.; Kim, B.Y.; Sohn, M.R.; Roh, J.Y.; Je, Y.H.; Kim, N.J.; Kim, I.; Woo, S.D.; et al. Dual Function of a Bee Venom Serine Protease: Prophenoloxidase-Activating Factor in Arthropods and Fibrin(Ogen)Olytic Enzyme in Mammals. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e10393. [CrossRef]

34. Choo, Y.M.; Lee, K.S.; Yoon, H.J.; Qiu, Y.; Wan, H.; Sohn, M.R.; Sohn, H.D.; Jin, B.R. Antifibrinolytic Role of a Bee Venom Serine Protease Inhibitor That Acts as a Plasmin Inhibitor. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32269. [CrossRef] [PubMed]
35. Parkinson, N.M.; Conyers, C.; Keen, J.; MacNicoll, A.; Smith, I.; Audsley, N.; Weaver, R. Towards a Comprehensive View of the Primary Structure of Venom Proteins from the Parasitoid Wasp *Pimpla hypochondriaca*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *34*, 565–571. [CrossRef] [PubMed]
36. Qiu, Y.; Lee, K.S.; Choo, Y.M.; Kong, D.; Yoon, H.J.; Jin, B.R. Molecular Cloning and Antifibrinolytic Activity of a Serine Protease Inhibitor from Bumblebee (*Bombus terrestris*) Venom. *Toxicon* **2013**, *63*, 1–6. [CrossRef] [PubMed]
37. Gibbs, G.M.; Roelants, K.; O'Bryan, M.K. The CAP Superfamily: Cysteine-Rich Secretory Proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-Related 1 Proteins—Roles in Reproduction, Cancer, and Immune Defense. *Endocr. Rev.* **2008**, *29*, 865–897. [CrossRef]
38. Blank, S.; Bazon, M.L.; Grosch, J.; Schmidt-Weber, C.B.; Brochetto-Braga, M.R.; Bilò, M.B.; Jakob, T. Antigen 5 Allergens of Hymenoptera Venoms and Their Role in Diagnosis and Therapy of Venom Allergy. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **2020**, *20*, 58:1–58:13. [CrossRef]
39. Hoffman, D.R. Reactions to Less Common Species of Fire Ants. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1997**, *100*, 679–683. [CrossRef]
40. Hoffman, D.R.; Smith, A.M.; Schmidt, M.; Moffitt, J.E.; Guralnick, M. Allergens in Hymenoptera Venom. XXII. Comparison of Venoms from Two Species of Imported Fire Ants, *Solenopsis invicta* and *richteri*. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1990**, *85*, 988–996. [CrossRef]
41. Hoffman, D.R. Hymenoptera Venom Allergens. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2006**, *30*, 109–128. [CrossRef]
42. Jentsch, J. A Procedure for Purification of Myrmica Venom: The Isolation of the Compulsive Component. In Proceedings of the VI Congress of the IUSSI, Bern, Switzerland, September 15 1969; pp. 69–75.
43. Piek, T. *Venoms of the Hymenoptera: Biochemical, Pharmacological and Behavioural Aspects*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2013; ISBN 978-1-4832-6370-0.
44. Mebs, D. *Gifttiere: Ein Handbuch für Biologen, Toxikologen, Ärzte, Apotheker*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart, Germany, 1992; ISBN 978-3-8047-1219-5.
45. Arevalo, H.A.; Groden, E. European Fire Ant, Red Ant (Suggested Common Names), *Myrmica rubra* Linnaeus (Insecta: Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae): EENY-410/IN746, 8/2007. *EDIS* **2007**, *2007*, 1–5. [CrossRef]
46. Shiomi, K.; Honma, T.; Ide, M.; Nagashima, Y.; Ishida, M.; Chino, M. An Epidermal Growth Factor-like Toxin and Two Sodium Channel Toxins from the Sea Anemone *Stichodactyla gigantea*. *Toxicon* **2003**, *41*, 229–236. [CrossRef]
47. Oliveira, J.S.; Fuentes-Silva, D.; King, G.F. Development of a Rational Nomenclature for Naming Peptide and Protein Toxins from Sea Anemones. *Toxicon* **2012**, *60*, 539–550. [CrossRef] [PubMed]
48. Lüddecke, T.; von Reumont, B.M.; Förster, F.; Billion, A.; Timm, T.; Lochnit, G.; Vilcinskas, A.; Lemke, S. An Economic Dilemma between Molecular Weapon Systems May Explain an Arachno-Atypical Venom in Wasp Spiders (*Argiope bruennichi*). *Biomolecules* **2020**, *10*, 978. [CrossRef] [PubMed]
49. Lüddecke, T.; Herzig, V.; von Reumont, B.M.; Vilcinskas, A. The Biology and Evolution of Spider Venoms. *Biol. Rev.* **2022**, *97*, 163–178. [CrossRef] [PubMed]
50. Undheim, E.A.B.; Grimm, L.L.; Low, C.-F.; Morgenstern, D.; Herzig, V.; Zobel-Thropp, P.; Pineda, S.S.; Habib, R.; Dziemborowicz, S.; Fry, B.G.; et al. Weaponization of a Hormone: Convergent Recruitment of Hyperglycemic Hormone into the Venom of Arthropod Predators. *Structure* **2015**, *23*, 1283–1292. [CrossRef] [PubMed]
51. Arvidson, R.; Kaiser, M.; Lee, S.S.; Urenda, J.-P.; Dail, C.; Mohammed, H.; Nolan, C.; Pan, S.; Stajich, J.E.; Libersat, F.; et al. Parasitoid Jewel Wasp Mounts Multipronged Neurochemical Attack to Hijack a Host Brain. *Mol. Cell Proteom.* **2019**, *18*, 99–114. [CrossRef]
52. Robinson, S.D.; Li, Q.; Bandyopadhyay, P.K.; Gajewiak, J.; Yandell, M.; Papenfuss, A.T.; Purcell, A.W.; Norton, R.S.; Safavi-Hemami, H. Hormone-like Peptides in the Venoms of Marine Cone Snails. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2017**, *244*, 11–18. [CrossRef]
53. Barnett, A. Exenatide. *Expert Opin. Pharmacother.* **2007**, *8*, 2593–2608. [CrossRef]
54. Osman, M.F.H.; Brander, J. Weitere Beiträge zur Kenntnis der chemischen Zusammensetzung des Giftes von Ameisen aus der Gattung *Formica*. *Z. Nat. B* **1961**, *16*, 749–753. [CrossRef]
55. Kazandjian, T.D.; Petras, D.; Robinson, S.D.; van Thiel, J.; Greene, H.W.; Arbuckle, K.; Barlow, A.; Carter, D.A.; Wouters, R.M.; Whiteley, G.; et al. Convergent Evolution of Pain-Inducing Defensive Venom Components in Spitting Cobras. *Science* **2021**, *371*, 386–390. [CrossRef]
56. Mouchbahani-Constance, S.; Lesperance, L.S.; Petitjean, H.; Davidova, A.; Macpherson, A.; Prescott, S.A.; Sharif-Naeini, R. Lionfish Venom Elicits Pain Predominantly through the Activation of Nonpeptidergic Nociceptors. *PAIN* **2018**, *159*, 2255–2266. [CrossRef]
57. Walker, A.A.; Robinson, S.D.; Paluzzi, J.-P.V.; Merritt, D.J.; Nixon, S.A.; Schroeder, C.I.; Jin, J.; Goudarzi, M.H.; Kotze, A.C.; Dekan, Z.; et al. Production, Composition, and Mode of Action of the Painful Defensive Venom Produced by a Limacodid Caterpillar, *Doratifera vulnerans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*, e2023815118. [CrossRef] [PubMed]
58. Nixon, S.A.; Robinson, S.D.; Agwa, A.J.; Walker, A.A.; Choudhary, S.; Touchard, A.; Undheim, E.A.B.; Robertson, A.; Vetter, I.; Schroeder, C.I.; et al. Multipurpose Peptides: The Venoms of Amazonian Stinging Ants Contain Anthelmintic Ponericins with Diverse Predatory and Defensive Activities. *Biochem. Pharmacol.* **2021**, *192*, 114693. [CrossRef]
59. Fischer, M.L.; Wielsch, N.; Heckel, D.G.; Vilcinskas, A.; Vogel, H. Context-Dependent Venom Deployment and Protein Composition in Two Assassin Bugs. *Ecol. Evol.* **2020**, *10*, 9932–9947. [CrossRef]

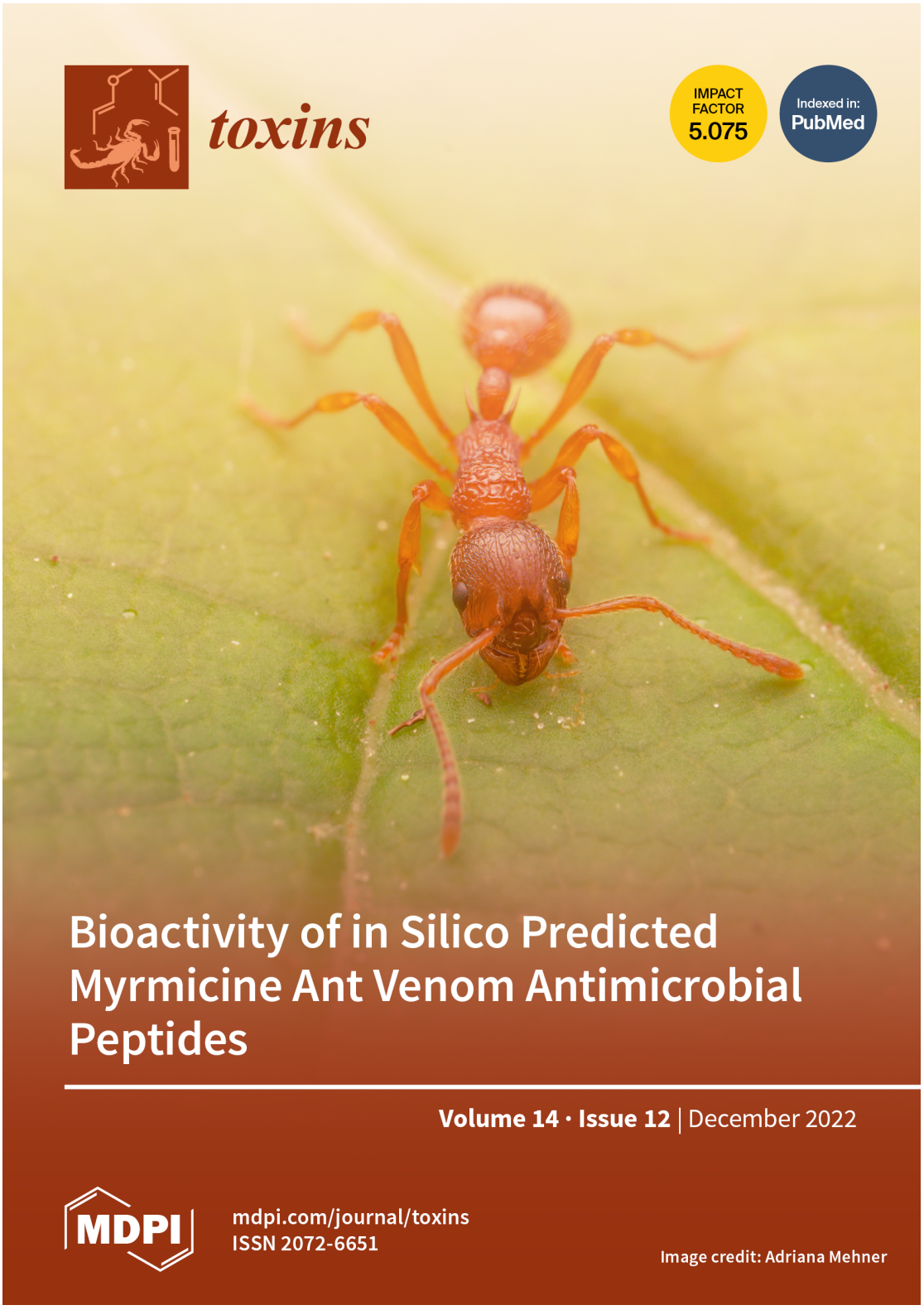
60. Walker, A.A.; Mayhew, M.L.; Jin, J.; Herzig, V.; Undheim, E.A.B.; Sombke, A.; Fry, B.G.; Meritt, D.J.; King, G.F. The Assassin Bug *Pristhesancus plagipennis* Produces Two Distinct Venoms in Separate Gland Lumens. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 755. [CrossRef]
61. Dutertre, S.; Jin, A.-H.; Vetter, I.; Hamilton, B.; Sunagar, K.; Lavergne, V.; Dutertre, V.; Fry, B.G.; Antunes, A.; Venter, D.J.; et al. Evolution of Separate Predation- and Defence-Evoked Venoms in Carnivorous Cone Snails. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3521. [CrossRef] [PubMed]
62. Seifert, B. *Die Ameisen Mittel- und Nordeuropas*; lutra Verlags- und Vertriebsgesellschaft: Görlitz/Tauer, Germany, 2007; ISBN 978-3-936412-03-1.
63. Andrews, S. Babraham Bioinformatics—FastQC A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. Available online: https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/ (accessed on 8 February 2022).
64. Martin, M. Cutadapt Removes Adapter Sequences from High-Throughput Sequencing Reads. *EMBnet J.* **2011**, *17*, 10–12. [CrossRef]
65. Haas, B.J.; Papanicolaou, A.; Yassour, M.; Grabherr, M.; Blood, P.D.; Bowden, J.; Couger, M.B.; Eccles, D.; Li, B.; Lieber, M.; et al. *De novo* Transcript Sequence Reconstruction from RNA-Seq Using the Trinity Platform for Reference Generation and Analysis. *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 1494–1512. [CrossRef]
66. Haas, B.J. HPC GridRunner. Available online: https://github.com/HpcGridRunner/HpcGridRunner (accessed on 8 February 2021).
67. Bushmanova, E.; Antipov, D.; Lapidus, A.; Prjibelski, A.D. rnaSPAdes: A de novo Transcriptome Assembler and Its Application to RNA-Seq Data. *GigaScience* **2019**, *8*, giz100. [CrossRef]
68. Song, L.; Florea, L. Rcorrector: Efficient and Accurate Error Correction for Illumina RNA-Seq Reads. *GigaScience* **2015**, *4*, 48. [CrossRef]
69. Fu, L.; Niu, B.; Zhu, Z.; Wu, S.; Li, W. CD-HIT: Accelerated for Clustering the next-Generation Sequencing Data. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 3150–3152. [CrossRef]
70. Seppey, M.; Manni, M.; Zdobnov, E.M. BUSCO: Assessing Genome Assembly and Annotation Completeness. In *Gene Prediction: Methods and Protocols*; Kollmar, M., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer: New York, NY, USA, 2019; pp. 227–245. ISBN 978-1-4939-9173-0.
71. Kim, D.; Paggi, J.M.; Park, C.; Bennett, C.; Salzberg, S.L. Graph-Based Genome Alignment and Genotyping with HISAT2 and HISAT-Genotype. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 907–915. [CrossRef] [PubMed]
72. Kovaka, S.; Zimin, A.V.; Pertea, G.M.; Razaghi, R.; Salzberg, S.L.; Pertea, M. Transcriptome Assembly from Long-Read RNA-Seq Alignments with StringTie2. *Genome Biol.* **2019**, *20*, 278. [CrossRef] [PubMed]
73. Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N.; Marth, G.; Abecasis, G.; Durbin, R. The Sequence Alignment/Map Format and SAMtools. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 2078–2079. [CrossRef] [PubMed]
74. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410. [CrossRef]
75. The UniProt Consortium UniProt: A Worldwide Hub of Protein Knowledge. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D506–D515. [CrossRef] [PubMed]
76. de Castro, E.; Jungo, F. VenomZone. Available online: https://venomzone.expasy.org/ (accessed on 11 January 2021).
77. Jungo, F.; Bairoch, A. Tox-Prot, the Toxin Protein Annotation Program of the Swiss-Prot Protein Knowledgebase. *Toxicon* **2005**, *45*, 293–301. [CrossRef] [PubMed]
78. Henikoff, S.; Henikoff, J.G. Amino Acid Substitution Matrices from Protein Blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 10915–10919. [CrossRef] [PubMed]
79. Cock, P.J.A.; Antao, T.; Chang, J.T.; Chapman, B.A.; Cox, C.J.; Dalke, A.; Friedberg, I.; Hamelryck, T.; Kauff, F.; Wilczynski, B.; et al. Biopython: Freely Available Python Tools for Computational Molecular Biology and Bioinformatics. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1422–1423. [CrossRef]
80. Mulder, N.J.; Apweiler, R. The InterPro Database and Tools for Protein Domain Analysis. *Curr. Protoc. Bioinform.* **2008**, *21*, 2.7.1–2.7.18. [CrossRef]
81. Katoh, K.; Standley, D.M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 772–780. [CrossRef]
82. Waterhouse, A.M.; Procter, J.B.; Martin, D.M.A.; Clamp, M.; Barton, G.J. Jalview Version 2—A Multiple Sequence Alignment Editor and Analysis Workbench. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1189–1191. [CrossRef] [PubMed]
83. Price, M.N.; Dehal, P.S.; Arkin, A.P. FastTree 2—Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e9490. [CrossRef]
84. Letunic, I.; Bork, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: An Online Tool for Phylogenetic Tree Display and Annotation. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, W293–W296. [CrossRef]
85. Teufel, F.; Almagro Armenteros, J.J.; Johansen, A.R.; Gíslason, M.H.; Pihl, S.I.; Tsirigos, K.D.; Winther, O.; Brunak, S.; von Heijne, G.; Nielsen, H. SignalP 6.0 Predicts All Five Types of Signal Peptides Using Protein Language Models. *Nat. Biotechnol.* **2022**, 1–3. [CrossRef] [PubMed]
86. Mistry, J.; Chuguransky, S.; Williams, L.; Qureshi, M.; Salazar, G.A.; Sonnhammer, E.L.L.; Tosatto, S.C.E.; Paladin, L.; Raj, S.; Richardson, L.J.; et al. Pfam: The Protein Families Database in 2021. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, D412–D419. [CrossRef]
87. Rognes, T.; Flouri, T.; Nichols, B.; Quince, C.; Mahé, F. VSEARCH: A Versatile Open Source Tool for Metagenomics. *PeerJ* **2016**, *4*, e2584:1–e2584:22. [CrossRef] [PubMed]

88. Ratnasingham, S.; Hebert, P.D.N. BOLD: The Barcode of Life Data System. *Mol. Ecol. Notes* **2007**, *7*, 355–364. [CrossRef]
89. von Reumont, B.M.; Lüddecke, T.; Timm, T.; Lochnit, G.; Vilcinskas, A.; von Döhren, J.; Nilsson, M.A. Proteo-Transcriptomic Analysis Identifies Potential Novel Toxins Secreted by the Predatory, Prey-Piercing Ribbon Worm *Amphiporus lactifloreus*. *Mar. Drugs* **2020**, *18*, 407. [CrossRef]
90. Perkins, D.N.; Pappin, D.J.C.; Creasy, D.M.; Cottrell, J.S. Probability-Based Protein Identification by Searching Sequence Databases Using Mass Spectrometry Data. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 3551–3567. [CrossRef]
91. King, G.F.; Gentz, M.C.; Escoubas, P.; Nicholson, G.M. A Rational Nomenclature for Naming Peptide Toxins from Spiders and Other Venomous Animals. *Toxicon* **2008**, *52*, 264–276. [CrossRef]
92. Hoang, D.T.; Chernomor, O.; von Haeseler, A.; Minh, B.Q.; Vinh, L.S. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 518–522. [CrossRef] [PubMed]
93. Nguyen, L.-T.; Schmidt, H.A.; von Haeseler, A.; Minh, B.Q. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **2015**, *32*, 268–274. [CrossRef] [PubMed]
94. Kalyaanamoorthy, S.; Minh, B.Q.; Wong, T.K.F.; von Haeseler, A.; Jermiin, L.S. ModelFinder: Fast Model Selection for Accurate Phylogenetic Estimates. *Nat. Methods* **2017**, *14*, 587–589. [CrossRef] [PubMed]

Toxins, 2022, 14(12), 846; DOI: 10.3390/toxins14120846

Bioactivity Profiling of In Silico Predicted Linear Toxins from the Ants *Myrmica rubra* and *Myrmica ruginodis*

Sabine Hurka, Tim Lüddecke, Anne Paas, Ludwig Dersch, Lennart Schulte, Johanna Eichberg, Kornelia Hardes, Karina Brinkrolf und Andreas Vilcinskas


toxins
IMPACT FACTOR 5.075
Indexed in: PubMed
Bioactivity of in Silico Predicted Myrmicine Ant Venom Antimicrobial Peptides
Volume 14 · Issue 12 | December 2022
MDPI
mdpi.com/journal/toxins
ISSN 2072-6651
Image credit: Adriana Mehner

toxins

MDPI

Article

Bioactivity Profiling of In Silico Predicted Linear Toxins from the Ants *Myrmica rubra* and *Myrmica ruginodis*

Sabine Hurka [1,2,*], Tim Lüddecke [2,3,*], Anne Paas [2,3], Ludwig Dersch [2,3], Lennart Schulte [2,3], Johanna Eichberg [3,4], Kornelia Hardes [2,3,4], Karina Brinkrolf [5] and Andreas Vilcinskas [1,2,3]

[1] Institute for Insect Biotechnology, Justus Liebig University Giessen, 35392 Giessen, Germany
[2] LOEWE Centre for Translational Biodiversity Genomics (LOEWE-TBG), 60325 Frankfurt, Germany
[3] Department of Bioresources, Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology, 35392 Giessen, Germany
[4] BMBF Junior Research Group in Infection Research "ASCRIBE", 35392 Giessen, Germany
[5] Bioinformatics and Systems Biology, Justus Liebig University Giessen, 35392 Giessen, Germany
* Correspondence: sabine.hurka@ime.fraunhofer.de (S.H.); tim.lueddecke@ime.fraunhofer.de (T.L.)

Abstract: The venoms of ants (Formicidae) are a promising source of novel bioactive molecules with potential for clinical and agricultural applications. However, despite the rich diversity of ant species, only a fraction of this vast resource has been thoroughly examined in bioprospecting programs. Previous studies focusing on the venom of Central European ants (subfamily Myrmicinae) identified a number of short linear decapeptides and nonapeptides resembling antimicrobial peptides (AMPs). Here, we describe the in silico approach and bioactivity profiling of 10 novel AMP-like peptides from the fellow Central European myrmicine ants *Myrmica rubra* and *Myrmica ruginodis*. Using the sequences of known ant venom peptides as queries, we screened the venom gland transcriptomes of both species. We found transcripts of nine novel decapeptides and one novel nonapeptide. The corresponding peptides were synthesized for bioactivity profiling in a broad panel of assays consisting of tests for cytotoxicity as well as antiviral, insecticidal, and antimicrobial activity. U-MYRTX-Mrug5a showed moderately potent antimicrobial effects against several bacteria, including clinically relevant pathogens such as *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus epidermidis*, but high concentrations showed negligible cytotoxicity. U-MYRTX-Mrug5a is, therefore, a probable lead for the development of novel peptide-based antibiotics.

Keywords: ant; venomics; biodiscovery; toxin; antibiotics; drug leads

Key Contribution: We discovered multiple decapeptides and nonapeptides in the venom gland transcriptomes of the ant species *Myrmica rubra* and *Myrmica ruginodis*. Following bioactivity profiling, we found that one of the peptides has relatively potent antimicrobial activity but no cytotoxicity.

check for updates

Citation: Hurka, S.; Lüddecke, T.; Paas, A.; Dersch, L.; Schulte, L.; Eichberg, J.; Hardes, K.; Brinkrolf, K.; Vilcinskas, A. Bioactivity Profiling of In Silico Predicted Linear Toxins from the Ants *Myrmica rubra* and *Myrmica ruginodis*. *Toxins* **2022**, *14*, 846. https://doi.org/10.3390/toxins14120846

Received: 1 November 2022
Accepted: 29 November 2022
Published: 2 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

There are more than 14,000 known species of ants (Formicidae) [1,2], which are grouped with bees, wasps, and hornets in the order Hymenoptera [3]. Like many hymenopterans, most ants carry a functional ovipositor-derived venom system that is used primarily for defense and hunting, although it has been reduced to an acid-spraying system in some non-stinging ants. Ant venoms are surprisingly potent, and several ant species cause severe pain or anaphylactic shock even in large victims, including humans [4–9].

Ant venoms are complex mixtures of proteins, peptides, and small molecules [5,6]. Some stinging ants (e.g., the genus *Solenopsis*) are known for their alkaloid-dominated venom profile, whereas others (e.g., the genus *Myrmecia*) are known for their venom polypeptide toxins that trigger nociceptive reactions [4,10]. However, ant venoms across the entire family feature relatively short, linear venom peptides [5,6]. These are potent molecules with a range of activities, including the ability to inhibit microbes, resulting

in their classification as antimicrobial peptides (AMPs). Some of these AMP-like toxins from ants have been investigated in detail, including ponericins (from *Neoponera goeldii*, *N. apicalis*, and *N. inversa*), dinoponeratoxins (from *Dinoponera australis* and *D. quadriceps*), and bicarinalins (from *Tetramorium bicarinatum*) [5,6,11–19]. The biological function of these peptides is generally to facilitate hunting and/or defense [20]. However, the antimicrobial activity of linear AMP-like ant venom peptides may also help to disinfect overpowered prey before they are brought into the colony [21]. This prevents the transfer of pathogens into the colony and protects other ants from infection. The anti-infective properties of crude ant venom and ant venom components could be exploited for the development of new drugs, especially antibiotics [13,22–24].

Despite their biological importance and promising translational potential, most ant venoms have not been characterized in any detail. In the past, this reflected the inability of researchers to identify venom components due to the minuscule venom yield of ants and other small arthropods [25,26]. Several milligrams of crude venom are needed as starting material for traditional pharmacology and biofractionation studies, requiring the collection of hundreds or even thousands of specimens [25,26]. More recently, the emerging field of modern venomics has addressed this issue by applying cutting-edge omics technologies to venom systems (particularly transcriptomics and proteomics), making even the smallest venomous animals accessible to investigation [27]. This approach can be combined with chemical synthesis, heterologous expression, or cell-free expression to produce venom components in the laboratory, bringing all venomous species within the reach of basic and translational research programs [27].

We recently investigated the venom systems of two ants from the subfamily Myrmicinae (*Myrmica rubra* and *Myrmica ruginodis*) using a workflow that combined transcriptomics and bottom-up proteomics [28]. The venoms are mixtures of enzymes (e.g., phospholipase A2, serine proteases, and CAP proteins) and potentially neurotoxic cysteine-rich peptides featuring an epidermal growth factor (EGF)-like motif [4]. Interestingly, our study did not detect any short AMP-like toxins, which are common components in many ant venoms. However, at least one such peptide has previously been identified in *M. rubra* and another in its close relative, *Manica rubida* [29,30]. It is, therefore, likely that the venoms of *M. rubra* and *M. ruginodis* contain more AMP-like toxins that were overlooked in a previous study due to their small size, making them difficult to detect using a bottom-up proteomics strategy. We therefore re-examined the venom glands of both species, searching for evidence of AMP-like toxins. Ten novel peptides were identified in silico, and we established their physicochemical properties, likely biological functions, and potential for medical applications by conducting bioactivity profiling using a broad range of assays.

2. Results

2.1. AMP-like Toxins Are Expressed in M. rubra and M. ruginodis Venom Glands

To determine whether *M. rubra* and *M. ruginodis* venoms contain hitherto unknown short AMP-like toxins, we used the known *M. rubida* peptide U_{12}-MYRTX-Mri1a and the known *M. rubra* peptide U_1-MYRTX-Mr1a as BLAST queries to screen the *M. rubra* and *M. ruginodis* venom gland transcriptomes [28]. We recovered nine additional unique transcripts with high similarity to the query sequences, six in *M. ruginodis* and three in *M. rubra*. We also recovered two additional transcripts encoding identical mature toxins present in both species. The first set of transcripts encodes the toxins named U-MYRTX-Mrub4b or U-MYRTX-Mrug3a depending on its source; therefore, we refer to the sequence hereafter as U-MYRTX-Mrub4b/Mrug3a. The other set encodes U-MYRTX-Mrub4a and U-MYRTX-Mrug7a and is, thus, referred to as U-MYRTX-Mrub4a/Mrug7a. We also found that the *M. rubra* peptide U-MYRTX-Mrub2a was identical to the *M. rubida* query sequence U_{12}-MYRTX-Mri1a. Among the 10 peptides we identified, U-MYRTX-Mrug5b was a nonapeptide and the rest were decapeptides.

SignalP revealed that all 10 peptides feature N-terminal signal peptides and are, therefore, likely to be secreted. We identified six principal structural types based on

the N-terminal amino acids. The first and most diverse group (the IDP type) features an N-terminal IDP motif and comprises U-MYRTX-Mrub2a, U-MYRTX-Mrug2a, and U-MYRTX-Mrug2b. Our query sequences U_{12}-MYRTX-Mri1a and U_1-MYRTX-Mr1a also carry this motif and were, thus, assigned to the same group. The other toxins were assigned to the IDS group (U-MYRTX-Mrub4a/Mrug7a and U-MYRTX-Mrub4b/Mrug3a), INP group (U-MYRTX-Mrug5a and U-MYRTX-Mrug5b), IDR group (U-MYRTX-Mrub3a), IDV group (U-MYRTX-Mrug4b), and KDS group (U-MYRTX-Mrug6a). These data are summarized in Table 1.

Table 1. AMP-like toxins identified in the *M. rubra* and *M. ruginodis* transcriptomes, as well as the query peptides from *M. rubra* and *M. rubida* (marked with asterisks). The peptides are categorized by formal name, source organism, sequence, structural class, and number of amino acids (#AA).

Toxin	Species	Sequence	Class	#AA
U_{12}-MYRTX-Mri1a *	*M. rubida*	IDPKLLESLA	IDP	10
U_1-MYRTX-Mr1a *	*M. rubra*	IDPKVLESLV	IDP	10
U-MYRTX-Mrub2a	*M. rubra*	IDPKLLESLA	IDP	10
U-MYRTX-Mrug2a	*M. ruginodis*	IDPKVLESLA	IDP	10
U-MYRTX-Mrug2b	*M. ruginodis*	IDPKVLESLL	IDP	10
U-MYRTX-Mrub3a	*M. rubra*	IDRSEKTERE	IDR	10
U-MYRTX-Mrub4a/Mrug7a	*M. rubra* and *M. ruginodis*	IDSDALKSLQ	IDS	10
U-MYRTX-Mrub4b/Mrug3a	*M. rubra* and *M. ruginodis*	IDSKAIKSLQ	IDS	10
U-MYRTX-Mrug4b	*M. ruginodis*	IDVYFILHLP	IDV	10
U-MYRTX-Mrug5a	*M. ruginodis*	INPKLWLKLF	INP	10
U-MYRTX-Mrug5b	*M. ruginodis*	INPKLLESL	INP	9
U-MYRTX-Mrug6a	*M. ruginodis*	KDSDSLKSFQ	KDS	10

Next, we investigated the evolutionary relationships between known myrmicine AMP-like toxins and our novel candidates by phylogenetic analysis (Figure 1). Therefore, we added the mature sequence of U_{19}-MYRTX-Mri1a (IDSAAIATLQGGTV) from *M. rubida*, plus the sequences U_{12}-MYRTX-Tb1a (LSPAVLASLA) and U_{14}-MYRTX-Tb1a (IPPNAVKSLQ) from the more distantly related myrmicine *Tetramorium bicarinatum* to our dataset [31,32]. Similarly to the other toxins assigned to structural classes based on their N-terminal sequence motif, these additional sequences could be subcharacterized. While U_{19}-MYRTX-Mri1a displays the IDS motif that we also detected in *Myrmica* toxins, the *Tetramorium* peptides featured two novel N-terminal motifs (LSP in U_{12}-MYRTX-Tb1a and IPP in U_{14}-MYRTX-Tb1a). Across our phylogeny, the myrmicine toxins formed two major monophyletic clades. The more diverse clade A contained the IDP and INP peptides, while the less diverse B-clade contained the IDR, IDS, IDV, IPP, LSP, and KDS peptides. The distinct structural types did not form monophyletic groups.

2.2. No Cytotoxicity but Partly Insecticidal Activity of Tested AMP-like Toxins

AMP-like linear ant venom peptides often interact with lipid bilayers in biological membranes. This results in the formation of cytolytic pores via three main mechanisms. To determine whether the *M. rubra* and *M. ruginodis* AMP-like toxins possess cytolytic activity, we exposed canine kidney MDCK II cells to synthetic versions of all 10 peptides. Cytotoxicity was evaluated by quantification of intracellular ATP using the CellTiter-Glo assay, in which luminescence provides an indication of cell viability. The negative control (DMSO) and untreated cells showed no loss of viability. Ionomycin was used as a negative control and showed high cytotoxicity. None of the tested peptides reduced cell viability, confirming their lack of cytotoxicity (Figure 2).

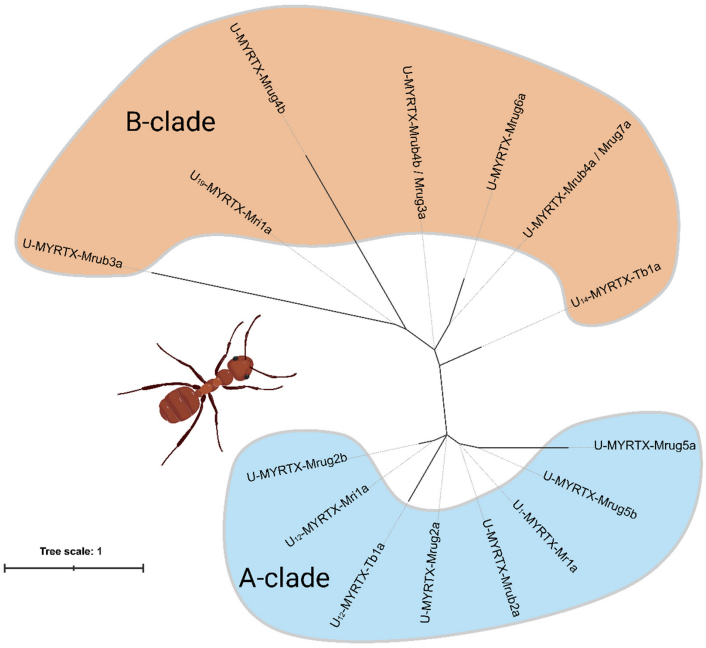


Figure 1. Unrooted phylogenetic tree based on the maximum-likelihood analysis of AMP-like toxins from Central European myrmicine ants (*Myrmica rubra*, *Myrmica ruginodis* and *Manica rubida*, tribus Myrmicini), and a tropical distantly related species (*Tetramorium bicarinatum*, tribus Crematogastrini). The sequences formed two distinct clades. The more diverse A-clade (orange) consists of the structural classes IDP and INP. The less diverse B-clade (blue) consists of the structural classes IDR, IDS, IDV, IPP, LSP, and KDS. The phylogeny is based on amino-acid sequence data from mature ant venom peptides.

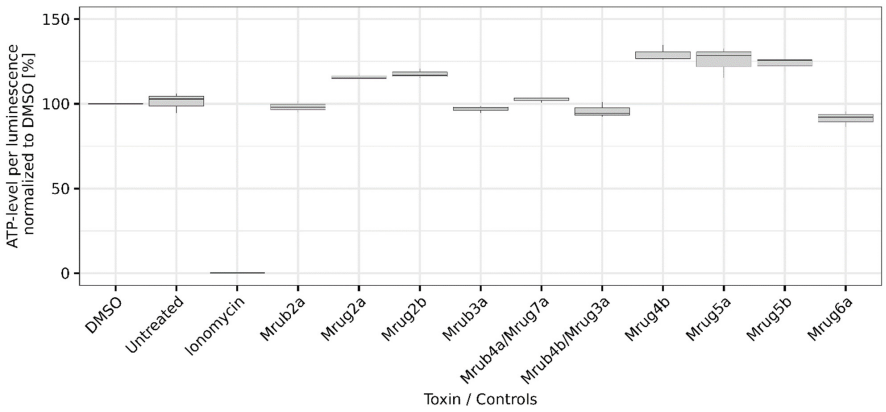


Figure 2. Cytotoxicity of linear venom peptides (100 µM in the assay) from the ants *M. rubra* and *M. ruginodis*. Cytotoxicity was measured using the CellTiter-Glo assay to determine the viability of MDCK II cells. The cytotoxicity of the 10 novel peptides (identified by their short names) was determined in triplicate and compared with untreated cells and cells treated with DMSO and ionomycin as controls. Values were normalized to the DMSO control. Boxplots indicate 0.25, 0.5, and 0.75 percentiles with 1.5 interquartile range.

We next assessed the insecticidal activity of the toxins using an injection-based assay in larvae of the greater wax moth (*Galleria mellonella*). Injection was deemed a suitable administration route because ants inject their toxins using their modified ovipositor. Four of the 10 peptides showed some degree of insecticidal activity. The effect of U-MYRTX-Mrub4a/Mrug7a, U-MYRTX-Mrug5b, and U-MYRTX-Mrug2b was weak, with 80% of the injected larvae surviving for at least 72 h. In contrast, U-MYRTX-Mrub2a killed 50% of the larvae during the same period (Figure 3). Injection of ethanol (99% purity) caused 70% mortality while the untreated and the 50% DMSO in water (*v*/*v*)-injected specimens did not die.

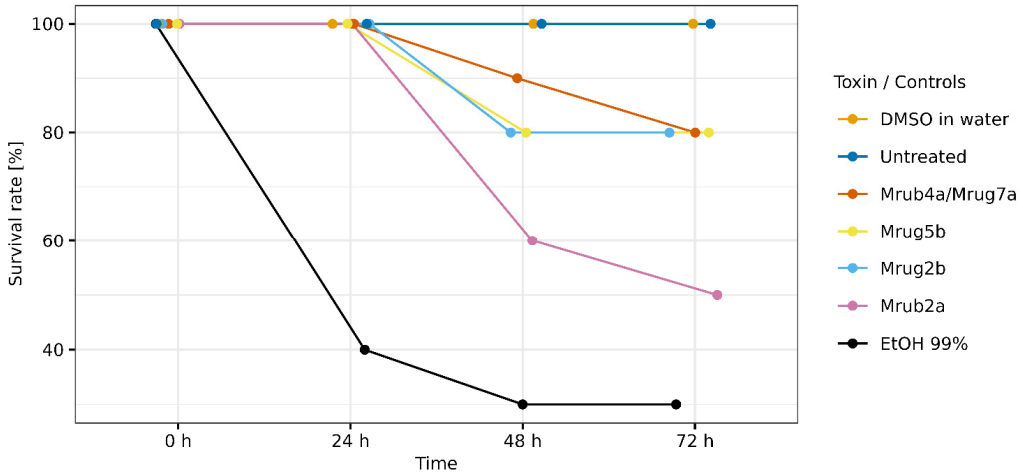


Figure 3. Insecticidal activity of linear venom peptides from the ants *M. rubra* and *M. ruginodis*. Insecticidal activity was determined by injection into larvae of the greater wax moth (*G. mellonella*). Untreated larvae, as well as those injected with 1:1 50% DMSO in water and 99% ethanol, were used as controls. Injected larvae were monitored for 72 h. Peptides are identified by their short names. The position_jitter function of ggplot2 was used to visualize overlapping data points.

2.3. AMP-like Ant Toxins Exert No Protective Effect against Influenza Virus

Some AMP-like toxins from arthropod venoms can inhibit viral infection [33]. We, therefore, tested the *M. rubra* and *M. ruginodis* peptides against four strains of influenza viruses: the influenza A viruses A/Hamburg/5/09 (H1N1) and A/Hessen/1/03 (H3N2), and the influenza B viruses B/Malaysia/2506/04 (Victoria lineage) and B/Massachusetts/71 (Yamagata lineage). The protective effects were determined using the CellTiter-Glo assay, in this case by evaluating the ability of peptides to prevent the infection-induced cytopathic effect in the presence of each virus. However, none of the peptides showed a protective effect against any of the viral strains (Figure 4).

2.4. Tested Peptides Display Broad-Spectrum Antimicrobial Effects

Lastly, we tested the 10 peptides for their activity against a panel of environmentally and/or clinically relevant bacteria: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* (strains 50071 and 1117), *Micrococcus luteus*, and *Listeria monocytogenes*. After 48 h, most of the peptides (U-MYRTX-Mrub2a, U-MYRTX-Mrub4a/Mrug7a, U-MYRTX-Mrub3a, U-MYRTX-Mrub4b/Mrug3a, U-MYRTX-Mrug6a, U-MYRTX-Mrug5b, U-MYRTX-Mrug2a, and U-MYRTX-Mrug2b) showed no significant inhibition of bacterial growth. However, U-MYRTX-Mrug4b inhibited the growth of *E. coli* by 50%, *S. epidermidis* by 48%, *M. luteus* by 62%, and *L. monocytogenes* by 52%. Furthermore, U-MYRTX-Mrug5a substantially inhibited the growth of several bacteria with an efficacy similar to or better than the gentamicin control. Only the two strains of *P. aeruginosa*

showed normal growth in the presence of this peptide. After 48 h, this peptide inhibited the growth of *E. coli* by 97%, *S. aureus* by 96%, *S. epidermidis* by 97%, *M. luteus* by 89%, and *L. monocytogenes* by 81%. These results are summarized in Figure 5.

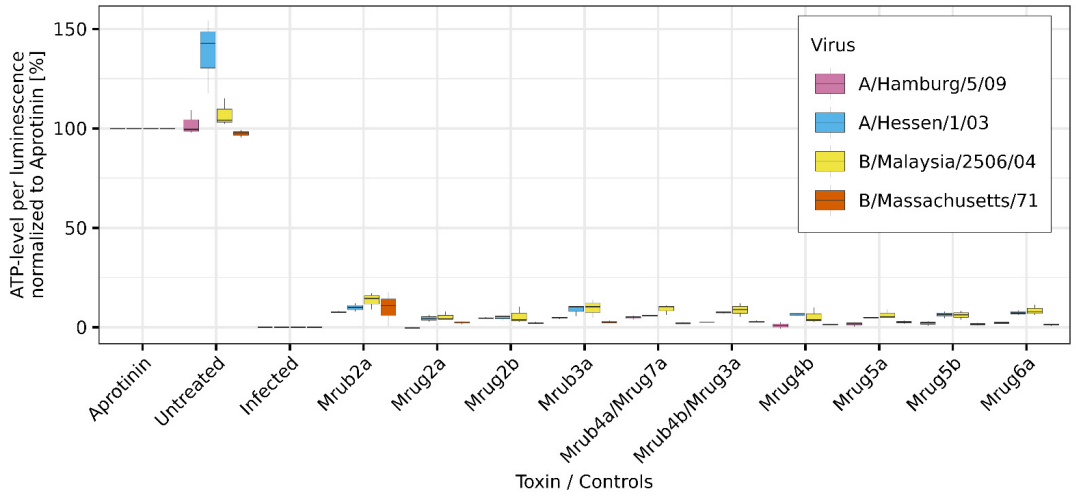


Figure 4. Antiviral screening of linear venom peptides (100 µM in the assay) from the ants *M. rubra* and *M. ruginodis* against four strains of influenza virus in MDCK II cells using the CellTiter-Glo assay. We used the strains A/Hamburg/5/09 (H1N1), A/Hessen/1/03 (H3N2), B/Malaysia/2506/04 (Victoria lineage), and B/Massachusetts/71 (Yamagata lineage). Infected, untreated cells were used as negative controls (no protective effect), and uninfected cells, as well as cells treated with aprotinin, were used as positive controls (100% protection). The peptides are identified by their short names. All measurements were performed as triplicates. Values were normalized to the aprotinin control. Boxplots indicate 0.25, 0.5, and 0.75 percentiles with 1.5 interquartile range.

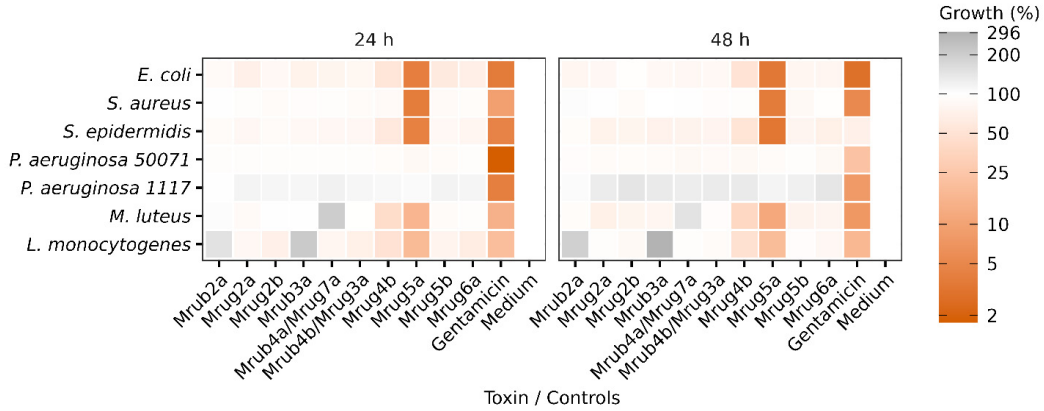


Figure 5. Heat map representing the antibacterial activity of linear venom peptides from the ants *M. rubra* and *M. ruginodis* against seven strains of bacteria. The OD_{600} of triplicate cultures was measured after 24 and 48 h and was normalized to the untreated bacterial controls (set as 100% growth and shown in white). Darker red colors indicate more potent growth inhibition. The antibiotic gentamicin was used as a positive control. The peptides are identified by their short names.

In initial experiments, we used 100 µM of each peptide to ensure unambiguous results, but this does not provide detailed information about the potency of the effects. Given the promising activity profile of U-MYRTX-Mrug5a, we tested this peptide at lower concentrations to determine its potency, and to establish whether its effect is bacteriostatic or bactericidal. The peptide was tested as a dilution series to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) using 95% inhibition as a cutoff. For *L. monocytogenes*, the MIC and MBC values were both 50 µM. The equivalent values for *M. luteus* were both 6.25 µM, and, for *S. epidermidis* and *E. coli*, they were both 50 µM. The two strains of *P. aeruginosa* remained unaffected by U-MYRTX-Mrug5a; for *S. aureus*, the MIC was 100 µM but the MBC could not be determined. U-MYRTX-Mrug5a, therefore, displays a broad spectrum of activity and shows moderately potent effects against several bacterial strains (Table 2).

Table 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of peptide U-MYRTX-Mrug5a against various strains of bacteria. The concentration required to inhibit at least 95% of growth is compared to the control. The MIC for *L. monocytogenes* was determined manually from the MBC test plus information from the MIC growth curve.

Strain	MIC [µM]	MBC [µM]
Listeria monocytogenes	(50)	50
Micrococcus luteus	6.25	6.25
Pseudomonas aeruginosa 50071	None	None
Pseudomonas aeruginosa 1117	None	None
Staphylococcus aureus	100	not to determine
Staphylococcus epidermidis	50	50
Escherichia coli DE3	50	50

3. Discussion

Ants are among the most successful groups of terrestrial venomous animals [5,6]. Their venoms offer a rich source of novel bioactive molecules with potential applications in biomedicine and agriculture [13,22–24,29,30]. However, the venoms of most ants and other small insects have not been characterized, even at a superficial level [5,6,34]. This is particularly true for members of the subfamily Myrmicinae, the dominant ant lineage in the temperate parts of Central Europe [1].

A few members of this subfamily have been studied using modern methods to determine their venom components. Examples include *M. rubra* and *M. ruginodis*, two myrmicine ants that are widely distributed in Europe. Their venom was studied by proteotranscriptomics and was found to contain several potential neurotoxins with an EGF fold, as well as many enzymes [28]. However, a bottom-up proteomics strategy was used in the original study, in which the crude venom is digested with trypsin before LC–MS analysis. This method is ideal for the detection of polypeptides >20 amino acids in length, but often fails to identify components that are significantly shorter. Therefore, although linear AMP-like toxins are widespread venom components in ants [5,6], their presence was not detected in the original study [28]. This is underlined by recent studies using a different MS-based approach, which identified and tested several AMP-like toxins from *M. rubra* and *M. rubida* [29,30]. We, therefore, screened the previously published transcriptome datasets for transcripts encoding putative AMP-like toxins. Our in silico search of venom gland transcriptomes identified 10 transcripts resembling known ant AMP-like toxins, showing that the venom glands of *M. rubra* and *M. ruginodis* do indeed express such components. This does not prove that the transcripts are translated into polypeptides, and this must be confirmed in future studies. However, the expression of such peptides is likely, given that similar peptides have already been detected in *M. rubra* and *M. rubida* [29,30]. This also underlines the need to combine different venomics technologies in order to provide a holistic picture of the chemical profile in a given venom system. The combination of transcriptomics with top-down proteomics and/or peptidomics is a particularly desirable addition

to bottom-up proteomics because these methods can identify even the smallest polypeptide toxins. Moreover, in the present study we focused on the prediction of AMP-like toxins with similarity to two known ant toxins of this type. However, several additional myrmicine AMP-like toxins have been described including U_{19}-MYRTX-Mri1a, U_{12}-MYRTX-Tb1a, and U_{14}-MYRTX-Tb1a. Nevertheless, these are either of different length (>10 amino acids) than our herein employed query sequences or stem from relatively distantly related species (Crematogastrini). Toxin length is an important factor in translational bioprospecting programs, with shorter toxins being preferably used. Furthermore, phylogenetic distance may have an impact on the accuracy of predictions thanks to different evolutionary forces and selection pressures at play. Therefore, we focused in this work on the deca- and nonapeptides from very closely related species from the same tribe. That said, a broader investigation using additional sequences from other myrmicine tribes, such as Attini or Crematogastrini, will certainly yield additional peptides. Therefore, we recommend that future studies should pursue such a taxonomically inclusive strategy. Nevertheless, purely transcriptome-based approaches tend to overestimate toxin diversity; in particular, de novo transcriptomics can be spurred by erroneous assemblies. For this reason, predicted sequences may not necessarily represent the true mature peptide, and mass spectrometry data should be used to support such future studies if possible.

Ants use venom primarily to defend their colony against threats and secondarily to overpower prey [20]. The role of AMP-like toxins in these defensive and trophic scenarios is unclear. We tested the activity of our peptides in a range of assays that could provide insights into a potential defensive function. However, they showed no toxicity toward MDCK II cells, suggesting that a defensive function against mammalian predators may be ruled out. They also showed only marginal insecticidal activity against greater wax moth larvae, with 24–48 h between injection and death. There were no immediate effects, which would typically be required in a defensive scenario to prevent further attack against the defended colony. A similar rapid onset of intoxication symptoms is required in trophic scenarios because prey that cannot be subdued immediately is more likely to escape. Although some known AMP-like toxins show insecticidal activity [21,29,30,35], they are unlikely to function as trophic weapons given the slow onset of lethal effects.

When ants have overpowered their prey, it is transferred to the colony as a source of nutrition [3]. If contaminated with pathogenic bacteria, the carcass represents a potential source of infection that could cause a massive outbreak of disease. It is, therefore, possible that antimicrobial ant venom components, including AMP-like toxins, play a semitrophic role as disinfectants, primarily to sanitize prey [21,36], in addition to during self-grooming and allogrooming [3,37] or for the sanitation of nest material and brood [38,39]. By co-injecting these components into prey, the prey microbiome could be destroyed and the prey sterilized. This would reduce the likelihood of infections arising from pathogen-rich prey carcasses, leading to a selective advantage in the colony. Our activity screen revealed that myrmicine AMP-like toxins show antimicrobial activity against several bacteria, supporting the proposed semi-trophic role to sterilize prey and to defend the colony against pathogens.

Ant venoms are a rich source of novel bioactive molecules with potential applications in medicine and agriculture [13,22–24,29,30]. We evaluated the translational potential of the 10 peptides by testing their activity against viruses, bacterial pathogens, and insect pests. The injection into *G. mellonella* larvae revealed that one of the peptides caused 50% mortality, but this effect is not potent enough to justify further development as a bio-insecticide. There was no activity against four influenza virus strains, indicating that none of the peptides are suitable as antiviral drug candidates. However, several of the peptides showed activity against pathogenic bacteria, and high concentrations (100 µM) of U-MYRTX-Mrug5a outperformed gentamicin, most significantly when tested against *L. monocytogenes*. Subsequent analysis showed that this peptide has mostly bactericidal effects and retains its activity against some bacteria even at lower concentrations. However, the MIC was at least 50 µM against all bacterial targets. The native peptide is, therefore, not outstandingly potent, but its lack of cytotoxicity paired with its broad activity spectrum

suggests it is a promising lead for further development. Future studies should investigate whether peptide engineering can increase its potency while maintaining its low cytotoxicity.

4. Conclusions

Ants are among the most successful lineages of venomous animals, but remarkably little is known about the components and activity of their venoms, particularly in the subfamily Myrmicinae. We used an in silico approach to identify and predict the primary sequence of 10 novel AMP-like toxins in the venom gland transcriptomes of the myrmicine ants *M. rubra* and *M. ruginodis*. We then synthesized all 10 peptides and assessed their bioactivity profiles using a screening pipeline that included a broad range of assays. The peptides showed no cytotoxicity or antiviral activity, but several of them showed mild effects against greater wax moth larvae. More importantly, many of the peptides showed some form of antimicrobial activity, with U-MYRTX-Mrug5a achieving the most potent bactericidal effects. We hypothesize that these toxins are not used as defensive weapons but may facilitate predator–prey interactions by helping to subdue prey and/or by sterilizing the prey before it is transferred to the colony. The bioactivity profile of U-MYRTX-Mrug5a combines low cytotoxicity with activity against clinically relevant bacteria, suggesting it could be developed as a novel antibiotic. The native peptide probably lacks sufficient potency, but peptide engineering could overcome this limitation. Our data confirm that novel bioactive molecules with translational potential can be identified in myrmicine ant venoms, highlighting the importance of neglected ants for future venom bioprospecting programs.

5. Material and Methods

5.1. Identification of Peptides

AMP-like peptides in *M. rubra* and *M. ruginodis* were identified by screening the recently published venom gland transcriptome data for both species [28] using BLASTP v2.11.0 [40] with the following settings: -evalue 10 -word_size 3 -matrix BLOSUM62 -max_target_seqs 500 -seg 'no'. We used two known AMP-like peptide sequences as queries (*M. rubida* U_{12}-MYRTX-Mri1a [30] and *M. rubra* U_1-MYRTX-Mr1a [29]) and matched them against predicted open reading frames generated from the transcriptome assemblies using TransDecoder v5.5.0 [41] as previously described [28]. Only candidates with a signal peptide predicted using SignalP v6.0g [42] in slow sequential mode were retained. We aligned the sequences using MAFFT v7.496 [43] in L-INS-I mode and used SignalP results and information from UniProtKB 2022_02 [44] to manually inspect the alignments and to select candidate peptides. We presumed a maximum of 10 amino acids per candidate peptide which is not necessarily the full mature peptide. The in vivo bioprocessed peptides may vary from our assumption. Full BLAST results and alignments are available in Supplementary Data S1–S3.

5.2. Phylogenetic Analysis

The mature amino-acid sequences of the 10 novel peptides, the query sequences U_{12}-MYRTX-Mri1a and U_1-MYRTX-Mr1a, and the additional sequences U_{19}-MYRTX-Mri1a, U_{14}-MYRTX-Tb1a and U_{12}-MYRTX-Tb1a were aligned using the online version of MAFFT v7.505 with default settings. A maximum likelihood phylogenetic tree was then built using IQtree v1.6.12 [45] with the following settings: sequence type = protein, substitution model = auto, bootstrap analysis = ultrafast, number of bootstrap alignments = 1000, maximum iterations = 10,000, minimum correlation coefficient = 0.99, single-branch test replicates = 1000, perturbation strength = 0.5, and IQ tree stopping rule = 100. The resulting consensus tree was visualized in iTOL v6.6 [46]. The evolutionary history of the peptides is unclear and no close relatives are known; hence, we did not add an outgroup and we exclusively calculated unrooted trees. The final consensus tree file is available as Supplementary Data S4.

5.3. Peptide Nomenclature

The novel peptides were named as previously described [6], based on a modification of the King nomenclature [47]. All names were given the prefix U to indicate an unknown mechanism of action. The abbreviation MYRTX (myrmicitoxin) was used to indicate their origin in myrmicine ants followed by the species descriptors Mrug (*M. ruginodis*) or Mrub (*M. rubra*).

5.4. Peptide Synthesis

The peptides were produced by solid-phase synthesis followed by lyophilization (GenScript Biotech, Rijswijk, the Netherlands). All 10 peptides were synthesized as N-terminal amides because all previously identified AMP-like ant toxins carry this modification.

5.5. Cytotoxicity Assays

Madin–Darby canine kidney II (MDCK II) cells kindly provided by Prof. Dr. Friebertshäuser (Philipps University Marburg, Institute of Virology, Marburg, Germany) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM GlutaMAX) supplemented with 1% penicillin/streptomycin and 10% fetal calf serum (all reagents from Thermo Fisher Scientific, Walthman, MA, USA) and were grown at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere. The peptides or ionomycin (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) as a positive control were dissolved in DMSO to prepare 10 mM stock solutions, which were stored at −20 °C. MDCK II cells were seeded in a 96-multiwell plate and grown to 90% confluence before treatment with 100 µM of the peptides with a final concentration of 1% DMSO or ionomycin, or with DMSO as a negative control. After incubation for 48 h as above, cell viability was determined using the CellTiter-Glo kit (Promega, Walldorf, Germany). Luminescence was measured in black 96-multiwell plates using a Synergy H4 microplate reader (BioTek/Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Relative light units (RLU) were normalized to the DMSO control set to 100% viability. Triplicate measurements were used to calculate means and standard deviations. Raw data are available in Supplementary Data S5.

5.6. Antiviral Assay

Influenza virus strains A/Hamburg/05/2009 (H1N1), A/Hessen/1/2003 (H3N2), B/Malaysia/2506/2004 (B/Mal), and B/Massachusetts (B/Mass) were kindly provided by Prof. Dr. Friebertshäuser (Philipps University Marburg, Institute of Virology, Marburg, Germany) and were propagated in MDCK II cells in infection medium (DMEM GlutaMAX supplemented with 1% penicillin/streptomycin, 0.2% bovine serum albumin (BSA), and 1 µg/mL TPCK-treated trypsin; all reagents from Thermo Fisher Scientific) using a multiplicity of infection (MOI) between 1 and 0.0001. For antiviral screening, MDCK II cells were grown to 90% confluence and inoculated at MOI = 1 for H1N1, H3N2, and B/Mal or at MOI = 0.01 for B/Mass in infection medium without trypsin. After 1 h, the cells were washed twice with PBS, followed by treatment with 100 µM peptides with a final concentration of 1% DMSO or aprotinin (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) in infection medium containing 1 µg/mL TPCK-treated trypsin. Cell viability was determined 48 h after treatment using the CellTiter-Glo kit as described above. All values were normalized to the aprotinin treatment (100% viability). Triplicate measurements were used to calculate means and standard deviations. Raw data are available in Supplementary Data S5.

5.7. Insecticidal Activity

Greater wax moth larvae were obtained from Fauna Topics Zoobedarf Zucht und Handels GmbH (Marbach am Neckar, Germany). Larvae at development stages L5/L6 (weight of about 500 mg), those with wounds, and those with low vitality were discarded. The remaining larvae were assigned to groups of five and were placed in vented Petri dishes (94 × 16 mm) lined with paper towel to absorb feces. The Petri dishes were placed on ice 5 min before injection to immobilize the insects. The peptides were dissolved in DMSO and mixed with an equal volume of deionized water to make 10 mM stocks immediately before

injection. The stock solutions were drawn into an Omnican-F (0.30 × 12 mm/G 30 × 1/2″) 1 mL syringe and adjusted for a World Precision Instruments manual microsyringe injector. We then injected 5 µL of each solution, corresponding to 50 ng of the peptide and 2.5 µL of DMSO, into the pseudopodium of the immobilized larva between two segmental plates, facilitating the spread of the injected components. Water and DMSO/water were used as negative controls (alongside untreated specimens), and 10 µL of 90% ethanol was used as a positive control. All peptide and control groups were tested in 10 specimens. After injection, the larvae were maintained in a Bindner KBWF 240 climate chamber at room temperature in the dark and monitored for survival every 24 h for 3 days.

5.8. Antimicrobial Activity

Cryo-conserved cultures (Table 3) were transferred with a sterile inoculation loop to tryptic soy agar (TSA) plates (Carl Roth) sealed with Parafilm (BEMIS, Neenah, WI, USA), and were incubated for 1–2 days at 37 °C depending on growth rates. Plates were then stored at 4 °C. For each of the three replicates, single colonies were picked with a sterile pipette tip, transferred into 2–3 mL Mueller-Hinton II (MH II) medium (BD, Heidelberg, Germany) and cultivated for ~24 h in unsealed 15 mL reaction tubes at 37 °C, shaking at 180 rpm. We then diluted 30 µL (60 µL for *M. luteus* and *L. monocytogenes*) of the bacterial suspension in 2–3 mL of MH II medium in unsealed 15 mL reaction tubes and incubated them as above for 2–3 h. We measured the optical density at 600 nm (OD_{600}) by transferring 1 mL of bacterial suspension to a polystyrene cuvette (SARSTED, Nümbrecht, Germany) in an Ultrospec 10 photometer (Biochrome, Cambridge, UK). We then diluted the cultures with MH II medium to the preferred OD_{600} (Table 3) in 2 mL reaction tubes if necessary. The peptides were dissolved in DMSO as described above and diluted with MH II medium to a concentration of 200 µM before the experiments. We used gentamicin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) as a positive control, generally at a concentration of 10 µM, but at 60 µM for *S. epidermidis*.

Table 3. Bacterial strains used to determine the antimicrobial activity of ant venom peptides. The strains are identified by name, unique identifier, starting OD_{600} value, and corresponding CFU/mL.

Name	Unique Identifier	OD_{600} for Assay	CFU/mL
Listeria monocytogenes	DSM 20600	0.000625	1.45×10^6
Micrococcus luteus	DSM 20030	0.005	2.20×10^5
Pseudomonas aeruginosa 50071	DSM 50071	0.00125	4.83×10^8
Pseudomonas aeruginosa 1117	DSM 1117	0.005	3.00×10^{13}
Staphylococcus aureus	DSM 2569	0.00125	9.00×10^6
Staphylococcus epidermidis	ATCC 35984; DSM 28319	0.000625	1.73×10^6
Escherichia coli DE3	BL21(DE3)	0.000325	2.00×10^6

The experiments were carried out in 96-multiwell plates with a final volume of 100 µL per well (50 µL of bacterial suspension; 50 µL of testing peptide with a final concentration of 1.9% DMSO). Duplicate plates were sealed carefully with Parafilm, placed in a loosely closed plastic bag, and incubated for 48 h at 37 °C, shaking at 180 rpm. The OD_{600} was measured after 0, 24, and 48 h using a BioTek Eon microplate reader and Gen5 v2.09. One experiment was carried out with automatic OD_{600} measurement every 20 min with a prior 30 s double orbital rotation at 237 rpm with overall incubation at 37 °C for 60 h in the microplate reader.

The MIC for U-MYRTX-Mrug5a was determined by testing nine $\log_2$ dilutions of all strains in triplicate using the same procedure described above (including one replicate in the microplate reader). For all 96-multiwell plate experiments, we used the following controls: MH II medium instead of peptides with each bacterial strain, medium only with each peptide, and one well with 100 µL of medium only. The MBC was determined by carefully transferring 20 µL per dilution from the 48 h MIC experiments (n = 2) to sectored dry TSA plates as previously described [48]. For each replicate, the OD_{600} value of the medium was used as a blank. The absolute value of the lowest resulting negative value

was added to gain only positive values. Wells with medium plus bacteria were set as 100% growth, and the corresponding growth rates in the peptide-treated cultures were calculated in proportion. We used Microsoft Excel and R v4.1.3 [49] with packages plater v1.0.4 [50], tidyverse v1.3.1 [51], and reshape2 v1.4.4 [52] to analyze and visualize the data. Heat maps were generated using a $\log_{10}$ transformed scale for better visualization.

To determine the number of colony-forming units (CFUs), we prepared 1:10 serial dilutions of the bacterial suspensions starting with the OD_{600} values in Table 3. The dilutions were prepared in MH II medium, and the cultures were vortexed between steps. We transferred 20 µL of each dilution onto sectored dry TSA plates as previously described [48] with three replicates per strain and dilution. After incubation for 24 h at 37 °C (both *P. aeruginosa* strains also at 30 °C), the colonies were counted. We used the highest countable concentration to calculate the mean CFU/mL for each bacterial strain. Raw data are available in Supplementary Data S6 and S7. A translation from contig to internal identifiers to toxin names is available in Supplementary Data S8.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at https://www.mdpi.com/article/10.3390/toxins14120846/s1: Supplementary Data S1 and S2. BLAST results of search in predicted ORF list with U12-MYRTX-Mri1a and U1-MYRTX-Mr1a as query; Supplementary Data S3. Resulting alignment from MAFFT run to validate selected contigs; Supplementary Data S4. The final consensus tree file in NEWICK format; Supplementary Data S5. Raw and normalized data from cytotoxicity and antiviral screening tests; Supplementary Data S6. Raw data of antimicrobial test assays; Supplementary Data S7. Raw data of minimal inhibitory concentration experiments; Supplementary Data S8. Translation from contig to internal identifiers and toxin names.

Author Contributions: Conceptualization, T.L; methodology, S.H., T.L., L.D., A.P., L.S., J.E., K.H., K.B. and A.V.; software, S.H.; validation, S.H., L.D. and J.E.; formal analysis, S.H.; investigation, S.H.; resources, A.V.; data curation, S.H.; writing—original draft preparation, S.H. and T.L.; writing—review and editing, all authors.; visualization, S.H.; supervision, T.L., K.H., K.B. and A.V.; project administration, T.L. and K.B.; funding acquisition, A.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The work is part of the Animal Venomics project embedded into the Centre for Translational Biodiversity Genomics (LOEWE–TBG) and was granted to A.V. under the program "LOEWE–Landes-Offensive zur Entwicklung Wissenschaftlich-Ökonomischer Exzellenz" of the Hessian Ministry of Higher Education, Research and the Arts. We acknowledge access to resources financially supported by BMBF grant FKZ 031A533 within the de.NBI network. The authors also acknowledge funding supporting the LOEWE Centre for Insect Biotechnology and Bioresources. Parts of this research were funded by the German Federal Ministry for Education and Research, BMBF (ASCRIBE-grant number 01KI2024).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Raw transcriptomic data are available at the NCBI database (BioProject PRJNA807911). Measured data can be found in the Supplementary Materials.

Acknowledgments: We acknowledge Richard M. Twyman for manuscript editing. We are grateful to Stephanie Schlimbach, Tanja Berghöfer, Angela Paul and Laura Horn for their help with laboratory experiments. Figure 1 was created using BioRender.com.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. California Academy of Science AntWeb. Version 8.81. Available online: https://www.antweb.org/ (accessed on 12 October 2022).
2. Bolton, B. AntCat: An Online Catalog of the Ants of the World. Available online: https://antcat.org/ (accessed on 14 November 2022).
3. Hölldobler, B.; Wilson, E.O. *The Ants*; Harvard University Press: Cambridge, UK, 1990; ISBN 978-0-674-04075-5.

4. Eagles, D.A.; Saez, N.J.; Krishnarjuna, B.; Bradford, J.J.; Chin, Y.K.-Y.; Starobova, H.; Mueller, A.; Reichelt, M.E.; Undheim, E.A.B.; Norton, R.S.; et al. A Peptide Toxin in Ant Venom Mimics Vertebrate EGF-like Hormones to Cause Long-Lasting Hypersensitivity in Mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2022**, *119*, e2112630119. [CrossRef] [PubMed]
5. Aili, S.R.; Touchard, A.; Escoubas, P.; Padula, M.P.; Orivel, J.; Dejean, A.; Nicholson, G.M. Diversity of Peptide Toxins from Stinging Ant Venoms. *Toxicon* **2014**, *92*, 166–178. [CrossRef] [PubMed]
6. Touchard, A.; Aili, S.; Fox, E.; Escoubas, P.; Orivel, J.; Nicholson, G.; Dejean, A. The Biochemical Toxin Arsenal from Ant Venoms. *Toxins* **2016**, *8*, 30. [CrossRef] [PubMed]
7. Wanandy, T.; Wilson, R.; Gell, D.; Rose, H.E.; Gueven, N.; Davies, N.W.; Brown, S.G.A.; Wiese, M.D. Towards Complete Identification of Allergens in Jack Jumper (*Myrmecia pilosula*) Ant Venom and Their Clinical Relevance: An Immunoproteomic Approach. *Clin. Exp. Allergy* **2018**, *48*, 1222–1234. [CrossRef]
8. Stafford, C.T. Hypersensitivity to Fire Ant Venom. *Ann. Allergy Asthma Immunol. Off. Publ. Am. Coll. Allergy Asthma Immunol.* **1996**, *77*, 87–95. [CrossRef]
9. Chen, S.-Q.; Yang, T.; Lan, L.-F.; Chen, X.-M.; Huang, D.-B.; Zeng, Z.-L.; Ye, X.-Y.; Wan, C.-L.; Li, L.-N. Ant Sting-Induced Whole-Body Pustules in an Inebriated Male: A Case Report. *World J. Clin. Cases* **2022**, *10*, 6695–6701. [CrossRef]
10. Aili, S.R.; Touchard, A.; Hayward, R.; Robinson, S.D.; Pineda, S.S.; Lalagüe, H.; Mrinalini; Vetter, I.; Undheim, E.A.B.; Kini, R.M.; et al. An Integrated Proteomic and Transcriptomic Analysis Reveals the Venom Complexity of the Bullet Ant *Paraponera clavata*. *Toxins* **2020**, *12*, 324. [CrossRef]
11. Dodou Lima, H.V.; de Paula Cavalcante, C.S.; Rádis-Baptista, G. Antifungal In Vitro Activity of Pilosulin- and Ponericin-Like Peptides from the Giant Ant *Dinoponera quadriceps* and Synergistic Effects with Antimycotic Drugs. *Antibiotics* **2020**, *9*, 354. [CrossRef]
12. Senetra, A.S.; Necelis, M.R.; Caputo, G.A. Investigation of the Structure-Activity Relationship in Ponericin L1 from *Neoponera goeldii*. *Pept. Sci.* **2020**, *112*, e24162. [CrossRef]
13. Nixon, S.A.; Robinson, S.D.; Agwa, A.J.; Walker, A.A.; Choudhary, S.; Touchard, A.; Undheim, E.A.B.; Robertson, A.; Vetter, I.; Schroeder, C.I.; et al. Multipurpose Peptides: The Venoms of Amazonian Stinging Ants Contain Anthelmintic Ponericins with Diverse Predatory and Defensive Activities. *Biochem. Pharmacol.* **2021**, *192*, 114693. [CrossRef]
14. Lima, D.B.; Mello, C.P.; Bandeira, I.C.J.; de Menezes, R.R.P.P.B.; Sampaio, T.L.; Falcão, C.B.; Morlighem, J.-É.R.L.; Rádis-Baptista, G.; Martins, A.M.C. The Dinoponeratoxin Peptides from the Giant Ant *Dinoponera quadriceps* Display in Vitro Antitrypanosomal Activity. *Biol. Chem.* **2018**, *399*, 187–196. [CrossRef] [PubMed]
15. Rádis-Baptista, G.; Dodou, H.V.; Prieto-da-Silva, Á.R.B.; Zaharenko, A.J.; Kazuma, K.; Nihei, K.; Inagaki, H.; Mori-Yasumoto, K.; Konno, K. Comprehensive Analysis of Peptides and Low Molecular Weight Components of the Giant Ant *Dinoponera quadriceps* Venom. *Biol. Chem.* **2020**, *401*, 945–954. [CrossRef] [PubMed]
16. Torres, A.F.C.; Huang, C.; Chong, C.-M.; Leung, S.W.; Prieto-da-Silva, Á.R.B.; Havt, A.; Quinet, Y.P.; Martins, A.M.C.; Lee, S.M.Y.; Rádis-Baptista, G. Transcriptome Analysis in Venom Gland of the Predatory Giant Ant *Dinoponera quadriceps*: Insights into the Polypeptide Toxin Arsenal of Hymenopterans. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e87556. [CrossRef] [PubMed]
17. Guzman, J.; Téné, N.; Touchard, A.; Castillo, D.; Belkhelfa, H.; Haddioui-Hbabi, L.; Treilhou, M.; Sauvain, M. Anti-*Helicobacter pylori* Properties of the Ant-Venom Peptide Bicarinalin. *Toxins* **2018**, *10*, 21. [CrossRef] [PubMed]
18. Téné, N.; Bonnafé, E.; Berger, F.; Rifflet, A.; Guilhaudis, L.; Ségalas-Milazzo, I.; Pipy, B.; Coste, A.; Leprince, J.; Treilhou, M. Biochemical and Biophysical Combined Study of Bicarinalin, an Ant Venom Antimicrobial Peptide. *Peptides* **2016**, *79*, 103–113. [CrossRef]
19. Rifflet, A.; Gavalda, S.; Téné, N.; Orivel, J.; Leprince, J.; Guilhaudis, L.; Génin, E.; Vétillard, A.; Treilhou, M. Identification and Characterization of a Novel Antimicrobial Peptide from the Venom of the Ant *Tetramorium bicarinatum*. *Peptides* **2012**, *38*, 363–370. [CrossRef]
20. Schmidt, J.O. Chemistry, Pharmacology, and Chemical Ecology of Ant Venoms. In *Venoms of the Hymenoptera: Biochemical, Pharmacological and Behavioural Aspects*; Piek, T., Ed.; Academic Press: London, UK, 1986; pp. 425–508. ISBN 978-0-12-554770-3.
21. Orivel, J.; Redeker, V.; Le Caer, J.-P.; Krier, F.; Revol-Junelles, A.-M.; Longeon, A.; Chaffotte, A.; Dejean, A.; Rossier, J. Ponericins, New Antibacterial and Insecticidal Peptides from the Venom of the Ant Pachycondyla Goeldii. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 17823–17829. [CrossRef]
22. Lima, D.B.; Sousa, P.L.; Torres, A.F.C.; Rodrigues, K.A.d.F.; Mello, C.P.; de Menezes, R.R.P.P.B.; Tessarolo, L.D.; Quinet, Y.P.; de Oliveira, M.R.; Martins, A.M.C. Antiparasitic Effect of *Dinoponera quadriceps* Giant Ant Venom. *Toxicon* **2016**, *120*, 128–132. [CrossRef]
23. De Carvalho, D.B.; Fox, E.G.P.; dos Santos, D.G.; de Sousa, J.S.; Freire, D.M.G.; Nogueira, F.C.S.; Domont, G.B.; de Castilho, L.V.A.; Machado, E.d.A. Fire Ant Venom Alkaloids Inhibit Biofilm Formation. *Toxins* **2019**, *11*, 420. [CrossRef]
24. Nixon, S.A.; Dekan, Z.; Robinson, S.D.; Guo, S.; Vetter, I.; Kotze, A.C.; Alewood, P.F.; King, G.F.; Herzig, V. It Takes Two: Dimerization Is Essential for the Broad-Spectrum Predatory and Defensive Activities of the Venom Peptide Mp1a from the Jack Jumper Ant *Myrmecia pilosula*. *Biomedicines* **2020**, *8*, 185. [CrossRef]
25. Lüddecke, T.; Vilcinskas, A.; Lemke, S. Phylogeny-Guided Selection of Priority Groups for Venom Bioprospecting: Harvesting Toxin Sequences in Tarantulas as a Case Study. *Toxins* **2019**, *11*, 488. [CrossRef] [PubMed]
26. von Reumont, B.M.; Campbell, L.I.; Jenner, R.A. Quo Vadis Venomics? A Roadmap to Neglected Venomous Invertebrates. *Toxins* **2014**, *6*, 3488–3551. [CrossRef] [PubMed]

27. von Reumont, B.M.; Anderluh, G.; Antunes, A.; Ayvazyan, N.; Beis, D.; Caliskan, F.; Crnković, A.; Damm, M.; Dutertre, S.; Ellgaard, L.; et al. Modern Venomics—Current Insights, Novel Methods, and Future Perspectives in Biological and Applied Animal Venom Research. *GigaScience* **2022**, *11*, giac048. [CrossRef]
28. Hurka, S.; Brinkrolf, K.; Özbek, R.; Förster, F.; Billion, A.; Heep, J.; Timm, T.; Lochnit, G.; Vilcinskas, A.; Lüddecke, T. Venomics of the Central European Myrmicine Ants *Myrmica rubra* and *Myrmica ruginodis*. *Toxins* **2022**, *14*, 358. [CrossRef]
29. Heep, J.; Klaus, A.; Kessel, T.; Seip, M.; Vilcinskas, A.; Skaljac, M. Proteomic Analysis of the Venom from the Ruby Ant *Myrmica rubra* and the Isolation of a Novel Insecticidal Decapeptide. *Insects* **2019**, *10*, 42. [CrossRef] [PubMed]
30. Heep, J.; Skaljac, M.; Grotmann, J.; Kessel, T.; Seip, M.; Schmidtberg, H.; Vilcinskas, A. Identification and Functional Characterization of a Novel Insecticidal Decapeptide from the Myrmicine Ant *Manica rubida*. *Toxins* **2019**, *11*, 562. [CrossRef]
31. Touchard, A.; Aili, S.R.; Téné, N.; Barassé, V.; Klopp, C.; Dejean, A.; Kini, R.M.; Mrinalini, M.; Coquet, L.; Jouenne, T.; et al. Venom Peptide Repertoire of the European Myrmicine Ant *Manica rubida*: Identification of Insecticidal Toxins. *J. Proteome Res.* **2020**, *19*, 1800–1811. [CrossRef]
32. Touchard, A.; Téné, N.; Song, P.C.T.; Lefranc, B.; Leprince, J.; Treilhou, M.; Bonnafé, E. Deciphering the Molecular Diversity of an Ant Venom Peptidome through a Venomics Approach. *J. Proteome Res.* **2018**, *17*, 3503–3516. [CrossRef]
33. Eichberg, J.; Maiworm, E.; Oberpaul, M.; Czudai-Matwich, V.; Lüddecke, T.; Vilcinskas, A.; Hardes, K. Antiviral Potential of Natural Resources against Influenza Virus Infections. *Viruses* **2022**, *14*, 2452. [CrossRef]
34. Lüddecke, T. The Venoms of Insects—Often Overlooked Chemical Arsenals. *Antenna* **2022**, *46*, 19–24.
35. Krämer, J.; Lüddecke, T.; Marner, M.; Maiworm, E.; Eichberg, J.; Hardes, K.; Schäberle, T.F.; Vilcinskas, A.; Predel, R. Antimicrobial, Insecticidal and Cytotoxic Activity of Linear Venom Peptides from the Pseudoscorpion Chelifer Cancroides. *Toxins* **2022**, *14*, 58. [CrossRef] [PubMed]
36. Tragust, S.; Herrmann, C.; Häfner, J.; Braasch, R.; Tilgen, C.; Hoock, M.; Milidakis, M.A.; Gross, R.; Feldhaar, H. Formicine Ants Swallow Their Highly Acidic Poison for Gut Microbial Selection and Control. *eLife* **2020**, *9*, e60287. [CrossRef] [PubMed]
37. Walker, T.N.; Hughes, W.O.H. Adaptive Social Immunity in Leaf-Cutting Ants. *Biol. Lett.* **2009**, *5*, 446–448. [CrossRef] [PubMed]
38. Tragust, S.; Mitteregger, B.; Barone, V.; Konrad, M.; Ugelvig, L.V.; Cremer, S. Ants Disinfect Fungus-Exposed Brood by Oral Uptake and Spread of Their Poison. *Curr. Biol. CB* **2013**, *23*, 76–82. [CrossRef] [PubMed]
39. Tranter, C.; Graystock, P.; Shaw, C.; Lopes, J.F.S.; Hughes, W.O.H. Sanitizing the Fortress: Protection of Ant Brood and Nest Material by Worker Antibiotics. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **2014**, *68*, 499–507. [CrossRef]
40. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410. [CrossRef]
41. Haas, B.J.; Papanicolaou, A.; Yassour, M.; Grabherr, M.; Blood, P.D.; Bowden, J.; Couger, M.B.; Eccles, D.; Li, B.; Lieber, M.; et al. *De novo* Transcript Sequence Reconstruction from RNA-Seq Using the Trinity Platform for Reference Generation and Analysis. *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 1494–1512. [CrossRef]
42. Teufel, F.; Almagro Armenteros, J.J.; Johansen, A.R.; Gíslason, M.H.; Pihl, S.I.; Tsirigos, K.D.; Winther, O.; Brunak, S.; von Heijne, G.; Nielsen, H. SignalP 6.0 Predicts All Five Types of Signal Peptides Using Protein Language Models. *Nat. Biotechnol.* **2022**, *40*, 1023–1025. [CrossRef]
43. Katoh, K.; Standley, D.M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 772–780. [CrossRef]
44. The UniProt Consortium UniProt: A Worldwide Hub of Protein Knowledge. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D506–D515. [CrossRef]
45. Trifinopoulos, J.; Nguyen, L.-T.; von Haeseler, A.; Minh, B.Q. W-IQ-TREE: A Fast Online Phylogenetic Tool for Maximum Likelihood Analysis. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, W232–W235. [CrossRef]
46. Letunic, I.; Bork, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: An Online Tool for Phylogenetic Tree Display and Annotation. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, W293–W296. [CrossRef] [PubMed]
47. King, G.F.; Gentz, M.C.; Escoubas, P.; Nicholson, G.M. A Rational Nomenclature for Naming Peptide Toxins from Spiders and Other Venomous Animals. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinol.* **2008**, *52*, 264–276. [CrossRef] [PubMed]
48. Miles, A.A.; Misra, S.S.; Irwin, J.O. The Estimation of the Bactericidal Power of the Blood. *Epidemiol. Infect.* **1938**, *38*, 732–749. [CrossRef] [PubMed]
49. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2022.
50. Hughes, S.M. Plater: Read, Tidy, and Display Data from Microtiter Plates. *J. Open Source Softw.* **2016**, *1*, 106. [CrossRef]
51. Wickham, H.; Averick, M.; Bryan, J.; Chang, W.; McGowan, L.; François, R.; Grolemund, G.; Hayes, A.; Henry, L.; Hester, J.; et al. Welcome to the Tidyverse. *J. Open Source Softw.* **2019**, *4*, 1686. [CrossRef]
52. Wickham, H. Reshaping Data with the reshape Package. *J. Stat. Softw.* **2007**, *21*, 1–20. [CrossRef]

Twenty years from now you will be more disappointed
by the things you didn't do than by the ones you did do.
So throw off the bowlines. Sail away from the safe harbor.
Catch the trade winds in your sails.
Explore. Dream. Discover.

Mark Twain

Die vorliegende Dissertationsschrift ist der Abschluss meines vierjährigen Promotionsstudiums mit all seinen Höhen und Tiefen. Es war eine aufreibende, spannende und lehrreiche, aber auch schöne Zeit, die ich mit meinen Betreuern, Kollegen und Freunden erleben durfte und die mich persönlich geformt hat.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Professor Dr. Andreas Vilcinskas, der mir die Möglichkeit eröffnete, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Für seine Betreuung danke ich ebenfalls Professor Dr. Alexander Goesmann. Ohne deren fachliche Unterstützung und die großzügige Bereitstellung der notwendigen Infrastruktur sowie das entgegengebrachte Vertrauen zur eigenständigen wissenschaftlichen Arbeit wäre es nicht möglich gewesen, die Promotion durchzuführen.

Für die freundliche Aufnahme in ihre jeweiligen Arbeitsgruppen danke ich Dr. Karina Brinkrolf, Dr. Dorothee Tegtmeier und Dr. Tim Lüddecke. Sie gaben mir den Raum, mich zu entwickeln und hatten stets ein offenes Ohr für alle Probleme. Ich schätze unsere wichtigen und wertvollen Diskussionen, die Denkanstöße und Aufmunterungen. In diesem Zusammenhang bedanke ich mich bei den Vorgenannten sowie bei Dr. Sebastian Jaenicke und Oliver Rupp für die hilfreichen Gespräche und wertvollen Anmerkungen während der Promotion und bei der Anfertigung der Dissertation.

Besonders danken möchte ich der Arbeitsgruppe „Animal Venomics“ am Fraunhofer IME in Gießen, die mich 2022 herzlich in ihrem Kreis aufnahmen und mich tatkräftig im Labor und bei der Verschriftlichung unterstützten.

Für die Hilfen und freundlichen Worte aus der Administration danke ich Katherine King, Claudia Wilke, Julia May und Sibylle Schmieg.

Mein Dank gilt zudem den Koautoren meiner beiden Erstautorenpublikationen, die den Grundstein für die Dissertationsschrift bilden. Besonders erwähnen möchte ich hier Dr. John Heep, Dr. André Billion, Dr. Rabia Özbek, Dr. Frank Förster, Dr. Anne Paas und Ludwig Dersch. Mein ausdrücklicher Dank geht zudem an Tanja Berghöfer und Angela Paul für deren Unterstützung im Labor.

Für die Aufmunterungen und die Teilhabe an den Erfolgen während der letzten vier Jahre möchte ich meinen Herzensmenschen Christina Pilz, Dr. Friederike Weil, Ingrid Breitenborn-Müller, Dr. Ingrid Henneke, Maike Weber, Nora Staubach, Sabrina Schick und Susanne Domke einen ganz lieben Gruß hinterlassen und hoffe, dass wir auch in Zukunft in Kontakt bleiben.

Nicht vergessen möchte ich meinen Lebenspartner Markus Hennecke, der während der letzten Jahre gemeinsam mit mir gelitten hat. Danke für Deine Geduld und Dein Verständnis, für das Auffangen in stressigen Zeiten und Deine Schubser, nicht nur auf der Tanzfläche, wenn es nötig war.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Wetzlar, November 2023