

***Galleria mellonella*'NIN BAĞIŞIKLIĞI İLE İLGİLİ PROTEİNLER VE PEPTİTLER**

Meltem Erdem Küçük^{1,a,*}, Ayşe Kaplan^{1,b}

¹Ahmet Erdoğan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi,
Zonguldak, Türkiye

²Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zonguldak,
Türkiye

*Sorumlu Yazar:

E-mail: meltemerdem1927@hotmail.com

(Geliş 14th Ocak 2020; Kabul 06th Nisan 2020)

a:  ORCID xxxx-xxxx-xxxx-xxxx, b:  ORCID xxxx-xxxx-xxxx-xxxx

ÖZET. Tıp ve biyolojinin çeşitli çalışma alanlarında model organizma olarak kullanılan, Lepidoptera takımına ait büyük bal mumu güvesi *Galleria mellonella*'nın özellikle bağışıklık sistemi ile ilgili çalışmaları son yıllarda oldukça artış göstermektedir. Bu çalışmaların çoğu böcek bağışıklık sisteminde görev alan proteinler ve peptidler ile ilgilidir. Bu derleme makalede, özellikle enfeksiyon çalışmalarında kullanılan *G. mellonella*'nın immün yanıtında ortaya çıkan ve en iyi bilinen savunma proteinlerinin peptidlerin özelliklerinden söz edilmektedir.

Anahtar kelimeler: Savunma proteinleri ve peptidleri, *Galleria mellonella*

GİRİŞ

Savunma proteinleri ve peptidleri, omurgalılarda ve omurgasızlarda bakteri ve mantarlara karşı doğal bağışıklıkta görev almaktadır. Özellikle, edinilmiş bağışıklık sistemine sahip olmayan böceklerde, antimikrobiyal peptidler istilacı patojenlere karşı mücadelede çok önemli bir rol oynar. Bu savunma proteinleri ve peptidleri, mikrobiyal enfeksiyona ya da vücut yaralanmasına yanıt olarak böcekteki bazı kan hücrelerinden ve memeli karaciğerinin işlevsel eşdeğeri olan yağ dokudan sentezlenirler ve hemolenf halinde mikroorganizmalara karşı salınırlar [1].

Lepidoptera takımına ait tarım zararlısı büyük bal mumu güvesi *Galleria mellonella*'nın bağışıklık sistemi ile ilgili çalışmalar son yıllarda oldukça artış göstermektedir. Bu çalışmalar böcek bağışıklık sisteminde görev alan proteinler ve peptidler ile ilgilidir. *G. mellonella*'da immün yanıt humoral ve hücrel olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir. Humoral bağışıklıkta bakteri, mantar, parazit ve virüslere karşı geniş bir aktivite gösteren antimikrobiyal proteinler (AMP) ve katyonik küçük peptidler bulunmaktadır [2, 3]. Bu derleme içerisinde özellikle *G. mellonella*'nın humoral bağışıklık sisteminde görev alan Antimikrobiyal peptidler (AMP), Apolipophorin III, böcek metalloproteinaz inhibitörleri (IMPI), Lizozimler ve Profenoloksidazdan kısaca bahsedeceğiz.

1. Antimikrobiyal peptidler (AMP'ler)

Böcek AMP'leri yapılarına göre dört gruba ayrılır bunlar sırasıyla; α -heliks peptidler (sekrepin ve morisin), sistein bakımından zengin peptidler (böcek defensin ve

drosomisin), prolin bakımından zengin peptitler (apidaesin, drososin ve lebosin) ve glisin bakımından zengin peptitler / proteinler (attasin ve gloverin)'dir [4].

Sekropinler

Alfahelikal yapıya sahip lineer, amfipatik peptitlerdir. Sekropin benzeri peptidler, immün sistemi uyarılmış *G. mellonella* larvalarının hemolenfinden saflaştırılarak elde edilmiştir. Bu peptidler *Hyalophora cecropia*, *Hyphantria cunea* ve *Bombyx mori*'den elde edilen A ve B sekropinlerine benzerlik gösterir [5]. Bu katyonik peptit, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı aktiftir. *Galleria traskriptom* veri kümesinde dört farklı sekropin tespit edilmiştir. Bunlar ayrıca *G. mellonella* hemolenfinden saflaştırılan D-tipi sekropini de içermektedir. Bu 4.2-kDa'luk peptitler, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere ve filamentöz mantar *Aspergillus niger*'e karşı aktiftir [6,7].

Gallerimisin

Defensin benzeri sisteince zengin bir peptid olarak 2003 yılında tanımlanmıştır. *Drosophila melanogaster*'den elde edilen drosomisin ve *Heliothis virescens*'den elde edilen heliomisin antifungal peptid olup gallerimisin ile benzer amino asit sekanslarını göstermektedir [7,8]. Rekombinant protein, 76 amino aside sahip ve bir v-5 epitop ile birleştiğinde ve saflaştırıldığında 11.6 kDa'luk bir moleküler ağırlığa sahiptir. Bu rekombinant protein, entomopatojenik mantar olan *M. anisopliae*'ye karşı bir aktivite gösterirken, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* gibi bakterilere ve bir maya olan *Saccharomyces cerevisiae* karşı aktif değildir [9].

Galiomisin

İlk olarak *G. mellonella* 'da defensin olarak tanımlanmış olup cDNA'sı 622 nükleotide sahiptir. Olgun bir protein 43 rezidü içerir ve moleküler ağırlığı 4.7 kDa'dur. Tipik olarak böcek defensinleri 3 tane intramoleküler disülfür bağı yapan 6 tane sistein rezidüsü içerir. Heliomisine %90,7 benzerlik gösterir. Bu savunma peptidi; filamentli mantar ve mayaya karşı aktivite gösterirken, antibakteriyel aktivite göstermez [30].

Morisinler ve Gloverinler

Morisin benzeri peptidler ve gloverinler ile ilgili bilgiler, sadece Lepidoptera takımı ile sınırlı kalmış olup, ilk olarak *Bombyx mori*'de tanımlanmıştır [3]. *G. mellonella*'da, 7 farklı morisin benzeri peptidi kodlayan 8 gen bölgesi vardır. Filamentöz mantarlara karşı özellikle etkilidirler, aynı zamanda mayaya, Gram Pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı da belirli bir dereceye kadar aktiftirler [11]. Morisinler, amfipatik alfa helikal antimikrobiyal peptitlerdir. Gloverinler, glisin rezidüleri ile zenginleştirilmiş, ısıya dayanıklı ve bazik bir protein olmasına karşı sisteinlere sahip değildirler. Bakterilerde LPS'ye bağlanarak dış membranın oluşmasını engeller. Gloverinler, ilk olarak ipek güvesi *Hyalophora gloveri*'de bulunmuştur. İmmün uyarılmış *G. mellonella* transkriptleri arasında gloverin ailesinin 5 üyesi tanımlanmıştır [3].

Kobatoksinler

Bu katyonik peptid bakteriyel enfeksiyona karşı *G. mellonella*'da güçlü bir şekilde indüklenir. Antimikrobiyal aktivitesi henüz bilinmemektedir. Ancak Sekropin-A dışındaki AMP'lerle etkileştiğinde böcek immün yanıtta katkıda bulunabilir [12].

Diğer Peptid ve Proteinler

Birçok antimikrobiyal peptit, bağışıklık sistemi harekete geçirilmiş olan *G. mellonella* hemolenfinden elde edilmiştir. İn vitro aktiviteleri, maya ve filamentöz mantarların yanı sıra Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı da test edilmiştir. Savunma moleküllerinin çeşitliliği, farklı mikroorganizma türlerine karşı antimikrobiyal peptit sentezinin özgülüğünü gösteren bağışıklık düzenleyicinin türüne bağlıdır. Bu peptitlerin çoğu, sadece peptit düzetinde bilinir ve transkriptlerinin tanımlanması gerekmektedir. Bunlar, apolipoforsin, anyonik peptit-1, sekropin D-benzeri peptid ve heliosin benzeri peptidleri içermektedir [10, 13].

2. Apolipophorin III

Apolipophorin III (apoLp-III), *G. mellonella* 'da hem gen hem de protein düzeyinde tanımlanmış olan bir hemolenf proteinidir [14, 15]. apoLp-III, apolipophorin I ve II' yi içeren, ısıya dayanıklı, moleküler kütlesi 18-kDa olan ve uçuş kaslarına lipid taşınmasında görev alan lipophorin bileşenidir. apoLp-III, birden fazla biyokimyasal veya biyofiziksel işlevi yerine getiren çok fonksiyonlu proteinler sınıfına aittir [16]. Lipid bağlanabilme yeteneğine sahip bu protein, lipid taşınmasında ve *G. mellonella*'nın bağışıklık sisteminde diğer bağışıklıkla ilişkili proteinler (lizozim) ile birlikte görev yapar [17, 18]. Ayrıca böcekte savunma sisteminde rol oynayan apoLp-III'ün, muramidaz ve profenolooksidaz enzim aktivitesini düzenlediği de daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir [10, 19].

Bu çalışmalara ek olarak apoLp-III, mikrobiyal patojenler veya hücrel stresle ilgili molekülleri tanımak için bağışıklık sistemi hücrelerince üretilen protein kalıp tanıma reseptörü olarak da (PRR) bilinmektedir. ApoLp-III, bakteriyel hücre duvarı bileşenine yani Gram negatif bakterilerin hücre duvarındaki lipopolisakkarit (LPS), Gram pozitif bakterilerin hücre duvarındaki lipoteikoik asitlerine bağlanır. Bu özellik, böcek immün sistemindeki opsonizasyon ve detoksifikasyon sürecine katılımı sağlamaktadır [20].

3. Böcek metalloproteinaz inhibitörü (IMPI)

G. mellonella'da böcek metalloproteinaz inhibitörü (IMPI), mikrobiyal metalloproteinazların tek hayvansal spesifik inhibitörü olarak bulunmuştur. IMPI geni, biri mikrobik metalloproteinazları inhibe eden, diğeri metamorfoz sırasında (sırasıyla IMPI-1 ve IMPI-2) matriks metalloproteinazlarını (MMP'ler) inhibe eden iki protein ürününü kodlamaktadır. *G. mellonella* hemolenfinden izole edilen IMPI-1, moleküler ağırlığı 8.6 kDa olan ve moleküller arası beş disülfid bağı içeren, ısıya dayanıklı bir peptiddir. Bakteri veya mantarla enfekte olmuş hemolenfte cevap olarak ortaya çıkarlar ve çinko içeren metalloproteinazları inhibe ederler [21-23]. Termolizin benzeri çinko metalloproteinazlar, bilinen böcek patojenlerinin bütün grupları tarafından virülans faktörleri olarak üretilirler. *G. mellonella* larvalarında güçlü virülans seviyeleri, larva başına 1 µg miktarında termolisin enjeksiyon edildiğinde ortaya çıkabilir [24]. Bu inhibitör, mikroorganizmalar tarafından salgılanan metalloproteinazlarca sindirilmeye karşı korunmak için antimikrobiyal peptitlerle (AMP'ler) birlikte sentezlenir. Ayrıca *G. mellonella* hemosol hücrelerine termolisin enjeksiyonu, IMPI geninin ekspresyonunun pozitif olarak düzenlenmesine neden olur. IMPI ekspresyonunun düzenlenmesi, konak ve istilacı patojen arasındaki karşılıklı etkileşimin iyi bir örneğidir. Enfekte olmuş böceklerin vücudundaki saldırgan tarafından salgılanan termolizine benzer proteazlar, konakçının çok sayıda hemolenf proteinini bozmakta, böylelikle böcek bağışıklık yanıtını

uyaran, proteazları oluşturmaktadır. Bu mekanizma kendi kendine ya da kendi başına gerçekleşmeyen ve enfeksiyonu tanıyan bir tehlike sinyali olarak düşünülebilir [24-26].

Diğer proteaz inhibitörleri

G. mellonella transkriptomları, ISPI-1, 2 ve 3 gibi serin proteaz inhibitörlerini içerir (27Fröblius et al. 2000). *G. mellonella* hemolenfinden saflaştırılmış olup sırasıyla moleküler kütlesi ISPI-1 9.2 kDa, ISPI-2 6.3 kDa ve ISPI-3 8.2 kDa arasındadır. Entomopatojenik mantar *Metarhisiium anisopliae*'nin Pr1 ve Pr2 proteazlarını inhibe ederler. ISPI- 2 ise, Kunitz tipi inhibitörüdür [27, 28].

4. Lizozim

Lizozimler (EC 3.2.1.17) birçok böcekte (*Hyalophora cecropia*, *Manduca sexta*, *Drosophila melanogaster*, *Galleria mellonella*) tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. *G. mellonella*'da bulunan lizozim enzimlerinin görevi, bağırsaktaki sindirim işlevini yerine getirmek ve böceğin immün savunmasında görev almaktır [29]. Bakteri hücre duvarı peptidoglikan tabakasındaki, C1-N-asetilmuramik asit ve N-asetilglukozaminin C4'ü arasında bulunan β -1,4-glikosidik bağına kesen bir muramidazdır. Ayrıca, katyonik savunma peptidi olarak nonenzimatik bir şekilde de etki edebilir. Buna ek olarak etki mekanizmasının tam olarak bilinmemesine rağmen, antifungal özellikleri bildirilmiştir [30-33]. Uyarılmamış larvalarda bulunan lizozim, hümmoral savunmanın ilk sırasını oluşturur ve bu da, mikroorganizmalara karşı düşmanca bir ortam yaratır. Bağışıklık mücadelesinden sonra miktarının da arttığı gösterilmiştir [34, 35].

5. Profenoloksidaz

Profenoloksidaz, *G. mellonella*'da bulunan ilk bağışıklık ile ilişkili moleküllerden biridir ve 1995 yılında bu böcekte saflaştırılmıştır [36]. *G. mellonella* hemositlerinde özellikle önositlerde bulunan bir proenzimdir [37]. Enfeksiyonun tanınmasından sonra bu enzim, oenositoidlerden salınır ve serin proteazların kaskadları tarafından proteoliz ile aktive edilir. Profenoloksidaz kompleksi de serin proteaz inhibitörlerini (Serpinerler, enzimin hiperaktivasyonunu engeller) içerir. Fenoloksidaz aktivitesinin kontrolü, konakçı hücrelere zarar verebilen dihidroksifenilalanin (DOPA), kinonlar ve serbest radikaller gibi ara ürünlerin yüksek sitotoksitesinden dolayı çok önemlidir. Bakır içeren aktif fenoloksidaz, tirozini daha önce sözü edilen DOPA'ya, kinonlara ve ayrıca melanine dönüştüren bir enzimdir [38, 39]. Bu reaksiyon, proteinlerin çapraz bağlanmasına neden olur ve kendiliğinden mikroorganizmalar için toksik olan, fakat aynı zamanda diğer antimikrobiyal moleküllerin savunma aktivitesini uyaran ürünler üretir [40]. Diğer taraftan *G. mellonella*'daki savunma moleküllerinin fenol oksidaz aktivitesini düzenleyebileceği de gösterilmiştir. Melanizasyon; yara iyileşmesi, sklerolizasyon ve kütikül sertleşmesi sırasında görev alır. Hemolenfte meydana gelen pıhtı oluşumunda, profenol aktive edici kaskadların ve koagülasyon sisteminin işbirliği yaptığı gösterilmiştir [38]. Melanizasyon, genellikle parazitler ve mikropların kapsüller veya nodüller içinde yakalanmasıyla hüccresel immün yanıtın bir parçası olarak işlev görür. Profenoloksidaz sistemi ve melanizasyon reaksiyonu, *G. mellonella* immünitesinin hümmoral ve hüccresel savunma sistemleri arasındaki işbirliğinin iyi bir örneğidir. Fenoloksidaz aktivitesini kontrol eden enzimler gibi hümmoral faktörler de melanin sentezini etkiler. Fenol oksidaz aktivasyonu, sadece kendi kendine ait olmayan bileşenlerin tanınmasından sonra

gerçekleşmez. Termolizin benzeri metalloproteinazlar gibi patojenik organizmalar tarafından salgılanan virülens faktörleri böcek hemolenf proteinlerini parçalar. Bu peptitler, sözü edilen IMPI ve savunma peptidlerinin ekspresyonunu uyarabilirler, fakat aynı zamanda profenoloksiidaz sisteminin aktivasyonuna da neden olurlar [41,42].

SONUÇ

Bu derleme makalede, model organizma *G. mellonella*'nın bağışıklık sistemi tarafından cevap olarak üretilen bazı proteinler ve peptidler açıklanmıştır. Bu model organizmadaki savunma proteinlerinin ve peptidlerinin görevlerinin anlaşılması tıp ve biyolojinin çeşitli alanlarında gerçekleştirilecek olan bağışıklık sistemi ile ilgili çalışmalara (konak-patojen ilişkisi, enfeksiyon tedavisi için memeli modellerine alternatif gibi) katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Cytrynskaa, M., Makb, P., Zdybicka-Barabasa, A., Suderc, P., Jakubowicz, T. (2017): Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph, *Peptides*, 28 (2007) 533-546.
- [2] Browne, N., Heelan, M., Kavanagh, K. (2013): An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes, *Virulence*, 4, 597-603.
- [3] Yi, H-Y., Chowdhury, M., Huang, Y-D., Yu, X-Q. (2014): Insect Antimicrobial Peptides and Their Applications, *Appl Microbiol Biotechnol*, 98(13): 5807–5822. doi:10.1007/s00253-014-5792-6.
- [4] Bulet, P., Stocklin, R., (2005): Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation, *Protein Pept Lett.*; 12:3-11. [PubMed: 15638797].
- [5] Jozefiak, A., Engberg, R.M. (2017): Insect proteins as a potential source of antimicrobial peptidesw in livestock production, A review. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 26: 87-99.
- [6] Wen, L.F., He, J.G. (2012): Dose-response effects of an antimicrobial peptide, a cecropin hybrid, on growth performance, nutrient utilisation, bacterial counts in the digesta and intestinal morphology in broilers, *Br. J. Nutr.* 108, 1756–1763, <https://doi.org/10.1017/S0007114511007240>.
- [7] Żyłowska, M., Wszyńska, A., Jagusztyn-Krynica, E.K. (2011): Antimicrobial peptides – defensins (in Polish)” *Post. Mikrobiol.* 50, 223-234.
- [8] Aerts, A.M., François, I.E.J.A., Cammue, B.P.A., Thevissen, K. (2008): The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins, *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2069-2079, <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8035-0>.
- [9] Schuhmann, B., Seitz, V., Vilcinskas, A., Podsiadlowski, L. (2003): Cloning and expression of gallerimycin, an antifungal peptide expressed in immune response of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*, *Archives in Insect Biochemistry and Physiology*, 53, 125-133.

- [10] Wojda, I. (2017): Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*, *Insect Science* 24, 342–357, DOI 10.1111/1744-7917.12325.
- [11] Dai, H., Rayaprolu, S., Gong, Y., Huang, R., Prakash, O., Jiang, H. (2008): Solution structure, antibacterial activity, and expression profile of *Manduca sexta* moricin” *Journal of peptide science: an official publication of the European Peptide Society.*; 14:855-863.
- [12] Bolouri Moghaddam, M.R., Tonk, M., Schreiber, C., Salzig, D., Czermak, P., Vilcinskas, A., Rahnamaeian, M. (2016): The potential of the *Galleria mellonella* innate immune system is maximized by the co-presentation of diverse antimicrobial peptides, *Biol. Chem.* 2016, 397, 939–945.
- [13] Yamada, K., Natori, S. (1993): Purification, sequence and antibacterial activity of two novel sapecin homologues from *Sarcophaga* embryonic cells: similarity of sapecin B to charybdotoxin, *Biochem J.* 291(Pt 1):275-279.
- [14] Weers, P.M.M., Ryan, R.O. (2006): Apolipophorin III: role model apolipoprotein, *Insect Biochem Mol Biol.*; 36:231-240.
- [15] Kang, Y-J., Kim, H-J. (2007): Insect Immune Activation by Recombinant Apolipophorin-III and Its Application to Pest Control in *Hyphantria cunea*, *Entomological Research* 33(4):205-213 DOI: 10.1111/j.1748-5967.2003.tb00071.x.
- [16] Smolenaars, M.M.W., Kasperaitis, M.A.M., Richardson, P.E., Rodenburg, K.W., Horst, D.J.V. (2005): Biosynthesis and secretion of insect lipoprotein: involvement of furin in cleavage of the apoB homolog, apolipophorin-II/I, *Journal of Lipid Research* Volume 46, DOI 10.1194/jlr.M400374-JLR200.
- [17] Dettloff, M., Kaiser, B., Wiesner, A. (2001): Localization of injected apolipophorin III in vivo – new insights into the immune activation process directed by this protein, *J Insect Physiol*;47:789-97.
- [18] Trevijano-Contador, N., Zaragoza, O. (2019): Immune Response of *Galleria mellonella* against Human Fungal Pathogens, *J. Fungi* , 5(1), 3; <https://doi.org/10.3390/jof5010003>.
- [19] Zdybicka-Barabas, A., Sowa-Jasiłek, A., Staczek, S., Jakubowicz, T., Cytrynska, M. (2015): Different forms of apolipophorin III in *Galleria mellonella* larvae challenged with bacteria and fungi, *Peptides*, 68 105-112.
- [20] Pratt, C.C., Weers, P.M.M. (2004): Lipopolysaccharide binding of an exchangeable apolipoprotein, apolipophorin III, from *Galleria mellonella*, *Biol Chem.*; 385:1113-1119.
- [21] Pohar, N., Godenschwege, T.A., Buchner, E. (1999): Invertebrate tissue inhibitor of metalloproteinase: structure and nested gene organization within the synapsin locus is conserved from *Drosophila* to human, *Genomics.* 1999 Apr 15; 57(2):293-6.
- [22] Wedde, M., Weise, C., Kopacek, P., Franke, P., Vilcinskas, A. (1998): Purification and characterization of an inducible metalloprotease inhibitor from the hemolymph of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*, *Eur J Biochem.* Aug 1; 255(3):535-43.
- [23] Vertyporokh, L., Wojda, I. (2017): Expression of the insect metalloproteinase inhibitor IMPI in the fat body of *Galleria mellonella* exposed to infection with *Beauveria bassiana*, *Acta ABP Biochimica Polonica* Vol. 64, No 2/2017 273-278 https://doi.org/10.18388/abp.2016_1376.

- [24] Joopand, G., Vilcinskas, A. (2017): Coevolution of parasitic fungi and insect hosts, *Zoology*, 119: 350-358.
- [25] Jiang, H., Vilcinskas, A., Kanost, M.R. (2010): Immunity in Lepidopteran Insects *Invertebrate, Immunity*, pp 181-204.
- [26] Altincicek, B., Stotzel, S., Wygrecka, M., Preissner, K.T., Vilcinskas, A. (2008): Host-derived extracellular nucleic acids enhance innate immune responses, induce coagulation, and prolong survival upon infection in insects, *Journal of Immunology*, 181, 2705-2712.
- [27] Fröblius, A.C., Kanost, M., Götz, P., Vilcinskas, A. (2000): Isolation and characterization of novel inducible serine protease inhibitors from larval hemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella*, *European Journal of Biochemistry* 267(7):2046-53 DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01207.x.
- [28] Gilliespie, J.P., Kanost, M.R., Trenczek, T. (1997): Biological mediators of insect immunity, *Ann. Rev. Entomol.* 42, 611-643.
- [29] Hultmark, D. (1996): Insect lysozymes. *Lysozymes: Model Enzymes in Biochemistry and Biology*, (ed. P. Jollès), pp. 87–102. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- [30] Strand, M.R. (2008): The insect cellular immune response, *Insect Sci.* 15: 1-14.
- [31] Sowa-Jasilek, A., Zdybicka-Barabas, A., Stączek, S., Wydrych, J., Mak, P., Jakubowicz, T. (2014): Studies on the role of insect hemolymph polypeptides: *Galleria mellonella* anionic peptide 2 and lysozyme, *Peptides* 53: 194-201.
- [32] Ragland, S.A., Criss, A.K. (2017): From bacterial killing to immune modulation: recent insights into the functions of lysozyme, *PLoS Pathog.*; 21;13(9):e1006512.
- [33] Sheehan, G., Garvey, A., Croke, M., Kavanagh, K. (2018): Innate humoral immune defences in mammals and insects: The same, with differences?, *Virulence*, 9:1, 1625-1639, DOI: 10.1080/21505594.2018.1526531.
- [34] Fujita, A. (2004): Lysozymes in insects: what role do they play in nitrogen metabolism?, *Physiological Entomology* 29, 305-310.
- [35] Zdybicka-Barabas, A., Bulak, P., Polakowski, C., Bieganski, A., Waśko, A., Cytryńska, M. (2017): Immune response in the larvae of the black soldier fly *Hermetia illucens*, *ISJ* 14: 9-17.
- [36] Hartzer, K.L., Zhu, K.Y., Baker, J.E. (2005): Phenoloxidase in Larvae of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae): Molecular Cloning of the Proenzyme cDNA and Enzyme Activity in Larvae Paralyzed and Parasitized by *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae), *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 59:67-79.
- [37] Pereira, T.C., Patrícia Pimentel de Barros, Luciana Ruano de Oliveira Fugisaki, Rodnei Dennis Rossoni, Felipe de Camargo Ribeiro, Raquel Teles de Menezes, Juliana Campos Junqueira Liliana Scorzoni (2018): Recent Advances in the Use of *Galleria mellonella* Model to Study Immune Responses against Human Pathogens.
- [38] Ashida, M., Brey, P. (1997): Recent advances on the research of the insect prophenoloxidase cascade, in *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*, eds Brey P., Hultmark D., editors. (London: Chapman & Hall), 135-172.

- [39] Cerenius, L.B.L., Söderhäll, K. (2008): The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity, *Trends Immunol. Jun*; 29(6): 263-71.
- [40] Lu, A., Zhang, Q., Zhang, J., Yang, B., Wu, K., Xie, W., Luan, Y-X., Ling, E. (2014): Insect prophenoloxidase: the view beyond immunity, *Front Physiol.*; 5: 252.
- [41] Wang, Z., Lu, A., Li, X., Shao, Q., Beerntsen, B.T., Liu, C., Ma, Y., Huang, Y., Zhu, H., Ling, E. (2011): A systematic study on hemocyte identification and plasma prophenoloxidase from *Culex pipiens quinquefasciatus* at different developmental stages, *Exp Parasitol. 2011 Jan*; 127(1):135-41.
- [42] Lavine, M.D., Strand, M.R. (2002): Insect hemocytes and their role in immunity, *Insect Biochem Mol Biol. Oct*; 32(10):1295-309.