

*Derleme (Review)*

## **Böceklerde melanizasyon ve melanin temelli bağışıklık**

### Melanisation and melanin-based immunity in insects

**Hasan SEVGİLİ<sup>1</sup>**

#### **Abstract**

The use of color patterns with pigments, such as melanin, play a vital role for various functions in insects including sexual behavior, warning coloration, and camouflage. Cuticular melanin appears to be under some genetic and environmental selection in many species and, melanin is also a crucial component in cuticular hardening, wound healing and invertebrate immunity. Melanin and its precursors provides a protection against a wide range of pathogens (including bacteria, fungi, animals and viruses) in insects. Cuticular melanism and some innate immune responses can share common physiological pathways in insects. Phenoloxidase (PO), a key enzyme in the synthesis of melanin, is found in the haemolymph, midgut and cuticle. When an insect host is confronted with a hemocoel-bound pathogen, it encapsulates the invading organism with hemocytes (encapsulation response). The hemocytes degranulate to release a tyrosinase phenoloxidase, which converts tyrosine to L-DOPA and several other diphenol quinones. These substrates are eventually transformed into melanochrome, which non-enzymatically converts to melanin. In this review, importance of the melanisation process in insect physiology especially in melanin-based innate immunity responses is highlighted. Additionally, a special attention is given the importance of the thermal melanin hypothesis, which is tightly associated with melanin-based immune investment within the context of global climate change.

**Keywords:** Insect immunity, melanin, melanisation, phenoloxidase, thermal melanin hypothesis

#### **Öz**

Böceklerde melanin gibi bir çok pigmentin etkili olduğu renk ve desenlenmeler eşeyssel davranışlar, uyarı renklenmesi ve kamuflej gibi farklı fonksiyonlar için hayati rol oynar. Kütikular melanin bir çok türde genetik ve çevresel seçilime uğrar ve melanin kütikula sertleşmesi, yaraların iyileşmesi ve omurgasızlardaki bağışıklıkta iş gören çok önemli bir bileşendir. Melanin ve öncülleri bakteri, fungus ve virüslere kadar uzanan patojenlere karşı geniş bir yelpazede koruyuculuk sağlar. Böceklerde kütikular melanizm ve bazı doğal bağışıklık tepkileri ortak fizyolojik yolları paylaşırlar. Fenoloksidaz (PO) melanin sentezinin kilit enzimi olup hemolimf, bağırsak ve kütikulada bulunur. Bir böcek hemolimfinde patojenle karşı karşıya geldiğinde hemositlerle işgalci organizmanın etrafına birikerek etkisiz hale getirir (enkapsülasyon tepkisi). Hemositler degranüle olarak tirozini L-DOPA'ya ve ardından çeşitli difenol kinonlara dönüştüren tirozinaz fenoloksidaz salgırlar. Bu substratlar en sonunda melanokroma dönüşerek enzim içermeyen bir yolla melanine çevrilir. Bu derlemede, özellikle melanin temelli bağışıklık tepkileri açısından böcek fizyolojisinde melanizasyon süreci vurgulanmıştır. Ayrıca, küresel iklim değişimi kapsamında, melanin temelli bağışıklık sistemi ile sıkı bir şekilde ilişkisi olan termal melanin hipotezinin önemine dikkat çekilmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Böcek bağışıklığı, melanin, melanizasyon, fenoloksidaz, termal melanin hipotezi

<sup>1</sup> Ordu Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 52200, Ordu

Sorumlu yazar (Corresponding author) e-mail: hsevgili@gmail.com

Alınış (Received):05.06.2017

Kabul edilmiş (Accepted): 04.12.2017

Çevrimiçi Yayın Tarihi (Published Online):15.12.2017

## Giriş

Melanin ismi antik Yunancada kullanılmış “karanlık” anlamına gelen “melanos”dan gelen ve ilk kez İsveçli kimyacı Berzelius tarafından 1840’da göz mebranından ekstrakte edilen koyu pigment için kullanılmış bir terimdir (Borovanský, 2011). Melanin insanlarda ve diğer hayvanlarda deri, saç ve göz yapılarında bulunan çeşitli pigmentleşmelerden sorumlu temel bir pigmenttir. Melanin neredeyse tüm canlı gruplarında bulunur; bitkiler, mantarlar ve bazı bakteriler sadece tirozinden değil farklı fenolik bileşiklerin katıldığı tepkimeler sonucunda melanin sentezlerler (Sugumaran & Baker, 2016). Melaninin genel bir tanımını yapmak zor olsa da “Fenollerin oksidasyonu ve ara fenollerin bir dizi polimerizasyonundan köken alan ve kinonların oluşumuyla sonuçlanan heterojen polimerler” şeklinde açıklamak mümkündür (Solano, 2014).

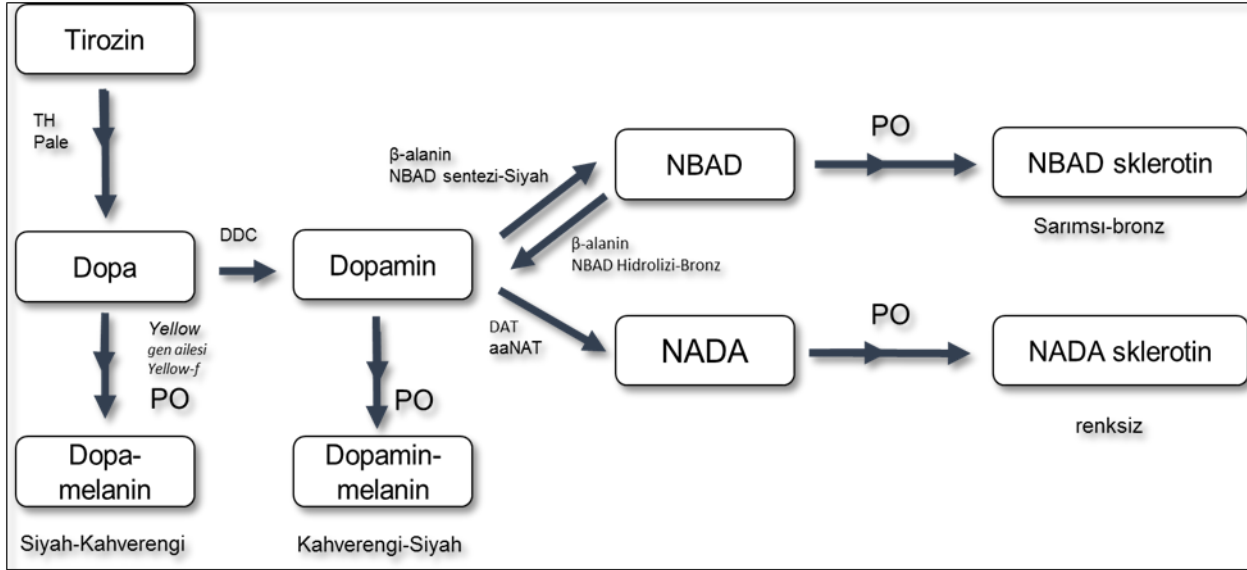
Genel olarak melanin polimerleri tüm canlı organizmalarda koruyucu bir role sahip olsa da, böceklerde melanizasyon memelilerdeki rolüne göre daha çeşitli süreçlerde rol oynar. Kütikulanın skleritizasyonu, pigmentasyon ve renklenme, mandibül gibi sert yapıların formasyonu, yumurta kabuğunun sertleşmesi, yaraların iyileşmesi ve parazitlerin melanik enkapsülasyonu gibi çeşitli süreçlere katılır (Şekil 1). Bu biyokimyasal olaylar dizisinin oldukça kısa bir zaman süresinde sonuçlandırılması gerekmektedir. Örneğin, böcekler larval/nimfal evrelerde büyümek için deri değiştirmek zorundadırlar ve her deri değişiminden sonra kısa sürede vücudu örten yeni kütikulanın sertleşmesi gerekir. Böceklerde melanin ve onunla ilişkili pigmentlerin üretimi gelişmekte olan kütikula içerisindeki epidermal hücrelerin salgılarıyla gerçekleşir (True, 2003). Böceklerde suda/yağda çözünebilen veya çözünemeyen antrakinonlar, afinler, pterinler, tetrapiroller, ommakromlar, melaninler, karetenoidler ve flavonoidler şeklinde çok çeşitli pigmentler bulunmaktadır (Shamim et al., 2014). Bu pigmentlerin özgün biyolojik fonksiyonlara sahip oldukları bilinmektedir. Örneğin, anthosiyaninler bazı kelebek türlerinde (örn. *Polyommatus icarus*, Lycaenidae) eş seçiminde yardımcı olduğu, melaninlerin Arctiidae familyasından (Lepidoptera) *Parasemia plantaginis* larvalarında uyarıcı renklenmede iş gördüğü ve renklenmenin *Leptoscelis tricolor*’un (Hemiptera: Coreidae) predatör tarafından tercih edilmesinde etkili olduğu saptanmıştır (Miller & Hollander, 2010; Lindstedt et al., 2011; Kemp & Rutowski, 2011).

Böceklerde bağışıklık özelleşmemiş doğal tepkilere dayalı süreçleri kapsar ve aynı zamanda patojen tanıma sisteminin oldukça hızlı işlediği bir sistemdir. Genel olarak humoral ve hücresele tepkilerin karışımı hali olarak da düşünülebilir. Humoral tepkiler koagülasyon ve hemolimfin melanizasyonu gibi enzimatik yollarla düzenlenen, immün genler tarafından belirlenen ürünlerin düzenlediği böcek yağ dokusunda antimikrobiyal peptidlerin üretimiyle sonuçlanan tepkilerdir. Hücresele tepkiler hemolimf içerisinde sirküle olan hemositlerin faaliyetlerini kapsar (Gillespie et al., 1997). Bu immün cevaplar patojenlerin fagositozunu (hücrenin dış ortamdaki diğer hücre veya partikülleri içine alarak etkisiz hale getirmesi), nodülasyonunu (bakterilere karşı çok hücreli bir kümeleşme ile tuzak hazırlanması) ve enkapsülasyonunu (daha büyük patojenlerin, nematod gibi, hemositlerin birbirlerine bağlanarak çok tabakalı bir kapsülle etkisiz hale getirilmesi) içerir (Tunaz, 2004; Tsakas & Marmaras, 2010).

### 1) Melanizasyon

Melanin tirozin amino asitinden köken alır ve melanin üretimi, enzimatik veya enzimatik olmayan şekilde ilerleyebilen çok sayıda aşamaya sahip oldukça karmaşık bir oksidatif işlemdir (Şekil 1) (Vavricka et al., 2010). Melanin birçok türde koruyucu olarak önemli bir rol oynasa da melanizasyon sürecinde, özellikle enzimatik olmayan basamaklarda semikinonlar, dopakinonlar ve indol-kinonlar gibi birçok toksik ara ürünler ortaya çıkar (Gonzalez-Santoyo & Cordoba-Aguilar, 2012). Oksijen molekülünün varlığında nötr tamponda L-DOPA’nın (D-Dopa) inkübasyonu ile melanin üretimi gerçekleşir. Reaksiyon, DOPA’nın moleküler oksijen oksidasyonu ile başlatılmalıdır, çünkü oksijen L-DOPA çözeltilisinden tamamen yok edilirse esasen hiç melanin üretilmez. Oksijen aynı anda iki elektronu birden kabul edemez. Sonuç olarak, oksijen tarafından (O<sub>2</sub>) L-DOPA’nın oksidasyonu ile dopa-semikinon radikali ve superoksit üretilir (Nappi et al., 1995; Vavricka et al., 2010). Semikinonun iki molekülü bozulmaya uğrayarak (dismutasyon) bir molekül dopakinon ve bir L-DOPA molekülü üretebilir. Dopa-semikinon superoksit tarafından oksidize edilebilir ve bu durumda dopakinonun formasyonu hidrojen peroksit ile sonuçlanır (Vavricka et al., 2010).

Temel pH şartları altında dopakinon leukodopakroma dönüşür ve bu L-DOPA'dan daha reaktif olduğu için O<sub>2</sub> tarafından kolayca oksidize olur. Melanizasyon yolağında L-DOPA'nın dopakroma çevrilmesindeki enzim içermeyen süreçte çok sayıda reaktif ve toksik unsurlar üretilmektedir (Vavricka et al., 2010). Melanizasyon genetik kontrol altında ilerleyen bir süreçtir (Wittkopp & Beldade, 2009; Roff & Fairbairn, 2013), *Drosophila*'da melanin-teşvik edici *yellow* ve *tan* geni ve melanin-engelliyici *ebony*, *black* ve *aaNAT* genleri bulunur (Şekil 1) (Wittkopp et al., 2002; Liu et al., 2016). Melanizasyonu, bir şekilde kütikula içerisinde birleşen pigment moleküllerine dönüştürülen öncüller (catecholamines) içerisinde gerçekleşen pigmentasyon süreci şeklinde de düşünmek gerekir (Wittkopp & Beldade, 2009).



Şekil 1. Böceklerde pigmentasyon yolları ve melanin sentezi çeşitli enzimlerin katıldığı süreçlerden geçer (Kısaltmalar; DAT, dopamine asetiltransferaz; DDC, DOPA dekarboksilaz; DOPA, dihidroksifenilalanin; NADA, N-asetil dopamin; NBAD, N-β-alanil dopamin; PO, fenoloksidaz; TH, tirozin hidroksilaz; aaNAT, airalkilamin N-asetiltransferaz) (True, 2003; Shuai et al., 2010'dan değiştirilerek).

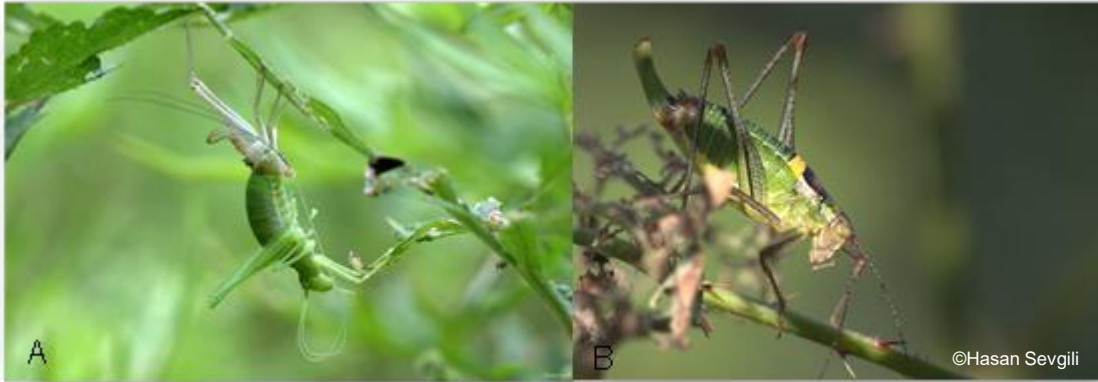
Melanizasyon yolağının en başında rol alan DOPA (dihydroxyphenylalanine) ve dopamine (dihydroxyphenylethylamine) epidermal hücreler tarafından sentez edilir ve hemolimfe salınırlar. Böceklerin enfeksiyon, parazit ve predasyona maruz kaldıkları en hassas dönemlerinden birisi skleritizasyon sırasındaki nispeten korunmasız durumda olmalarıdır. Diğer taraftan yaraların iyileştirilmesi ve melanotik parazit enkapsülasyonun, böceğin hayatta kalması için hızlı bir şekilde tamamlanması gerekmektedir. Böceklerde kütikulanın bronzlaşması ve sertleşmesi melanizasyon sayesinde gerçekleşmektedir. Bu süreçte N-asetildopamine (NADA) ve N-β-alanildopamine (NBAD) fenolik bileşikler kütikular matriks içerisinde oksidatif olarak birleşirler. Bu materyal sertleşir su içeriği azalır ve enzimlerin etkisiyle bozulmaya karşı koyacak şekilde direnci artış gösterir (Andersen, 2010). Skleritizasyona uğramış kütikula yeni oluşmuş formuna göre daha koyu tonlarda olur (Şekil 2).

### a) Eko-melanizasyon

Melanizasyon sadece vücut renklenmesindeki varyasyonu değil aynı zamanda böceğin yaşadığı çevrenin esnekliğini de yansıtan bir fizyolojik sonuçtur. Aynı zamanda melanizasyonu, böceğin abiyotik ekolojik koşullara uyumuna yardımcı olan bir strateji olarak ta değerlendirmek gerekir (Yin et al., 2016). Farklı renk morflarına sahip bireyler gelişim süreci, gelişim oranı ve vücut ağırlığı gibi unsurlar bakımından farklı yaşamsal özelliklere sahip olacaklardır. Diğer taraftan renk çeşitliliği güneş ışınları görme duyusuyla doğrudan ilişkili olduğu için birçok predatör avını bulabilmek için bu özellikten faydalanarak daha iyi kamufle olma yönünde veya av ise iyi saklanma/gizlenme yönünde işlevsellik kazanır (Arenas & Stevens, 2017).

Birçok hayvanda vücudun bir kısmı koyu karşıt tarafı ise açık renklere olur ve bu durum korunma veya gizlenme bağlamında canlıya yardımcı olan bir özelliktir. Neredeyse birçok hayvan grubunda insektivor avcı tür bulunur ve bunların önemli bir kısmı avının yerini görerek belirler (Thery & Gomez, 2010).

Ektotermik organizmalarda melanizmin rolü tek bir hipotezle açıklanamaz (Çizelge 1) (Clusella Trullas et al., 2007). Melanin omurgasız hayvanlarda birçok biyolojik işlevde rol alır. Örneğin nematod benzeri makropatojenler vücuda girdiğinde etrafları melaninle kaplanarak etkisiz hale getirilir. Veya kütikula üzerindeki herhangi bir yaralanma durumu da aynı şekilde iyileştirilir. Bu olay genel olarak melanizasyon olarak bilinmektedir (Cerenius & Söderhall, 2004; Nappi & Christensen, 2005; Gonzalez-Santoyo & Cordoba-Aguilar, 2012). Melanizmin böceklerdeki bazı biyolojik işlevleri çizelge 1'de özetlenmiştir.



Şekil 2. *Poecilimon similis* (Orthoptera: Phaneropterinae): A, Son deri değişimi sırasında çekilmiş bir fotoğraf. Henüz skleritizasyon tamamlanmadığı için kütikula koyulaşmamış ve sertleşmemiştir. B, Son deri değişiminden 5 gün sonra dışideki kütikula pigmentasyonu.

Çizelge 1. Ektotermik organizmalarda melanizmin işlevine ilişkin bazı biyolojik hipotezler

Hipotez	Literatür
Vücut ısısını düzenleme	Watt, 1968; Kettlewell, 1973; Luke, 1989; Kingsolver & Wiernasz, 1991; De Jong et al., 1996; Kutch et al., 2014
Kriptik renklenme	Kettlewell, 1973; Endler, 1984; Brakefield, 1985; Arenas & Stevens, 2017
Aposematik renklenme	Turner, 1977; Perrard et al., 2014
Ultraviyole radyasyondan korunma	Gunn, 1998; True, 2003
Patojen ve enfeksiyonlara karşı direnç	Wilson et al., 2001; Fedorka et al., 2013a,b; Prokko et al., 2013; Kutch et al., 2014
Eşeyssel seçilim	Majerus et al., 1982; Wiernasz, 1989; True, 2003; Punzalan et al., 2008; Roff & Fairbairn, 2013

Böceklerin birçok türünde melanizasyon termal düzenleme dışında, sekonder eşeyssel karakter olarak popülasyonlar arasındaki ayrışmayı etkileyen eşeyssel seçilim olarak işlev görebilmekte ve çeşitli fizyolojik süreçlerle stratejik bir dengelemeye gitme durumunda olabilmektedir (True, 2003). Örneğin, immün fonksiyonlarla ilişkili olarak bireyin sağlıklı olup olmadığına işaret eden daha melanik bireylerin dışı tarafından seçilimi melanizasyonun birçok karmaşık süreçlerden etkilenebileceğine ve fenotipik bir esnekliğe sahip olduğuna işaret eder (Siva-Jothy, 2000; Rolf & Siva-Jothy, 2003; Lawniczak et al., 2006). Ancak, bu bulgular tüm böcek grupları için geçerli olmayıp, tersi durumlar da söz konusudur (Robb et al., 2003). Bu da bize melanizasyonun sekonder eşeyssel karakter olarak eşeyssel seçilimdeki rolü ile çeşitli fizyolojik süreçler arasındaki dengelemenin zorunlu olmadığına da işaret etmektedir.

## b) Termal melanizasyon

Böcekler ektotermik (poikolotermal) canlılar olup vücut sıcaklıkları çevre sıcaklığına göre değişkenlik gösterir. Termal melanizasyon hipotezi (TMH) koyu kütikula rengine sahip böceklerde daha az güneş ışınına geriye yansıtacaklarından dolayı açık renklilere oranla vücudun daha hızlı ısınacağını ve melanik morfların soğuk iklimlerde ve kısa peryot şartları altında daha avantajlı olacaklarını öngörmektedir (Watt, 1968; Porter & Gates, 1969; Ellers & Boggs, 2004; Clusella-Trullas et al., 2008). Bunun aksine sıcak çevrelerde yaşayan böceklerde de yüksek oranda yansımaya neden olan açık vücut örtüsü de ölümcül vücut sıcaklıklarından canlıyı korumaktadır (Gibert et al., 1998). Aynı çevre şartları altında vücut örtüsü/deriye düşen güneş ışınlarının yansımaları bireysel farklılıklar göstereceğinden TMH melanizasyonun vücut ısısının düzenlenmesinde uyumsal bir işleve sahip olduğunu iddia eder (Kingsolver, 1987; De Jong et al., 1996). Ancak, vücut ısısı birçok fizyolojik sürecin etkisi altında olup, ısınma oranıyla bireylerin vücut örtüsünün az ya da çok yansıtma özelliği arasındaki sıcaklık dengesindeki farklılıklar üreme, bağışıklık, predatörden kaçınma gibi evrimsel uyum mekanizmalarını da etkileyecektir (Clusella-Trullas et al., 2008). Vücut üzerinde yer alan göz şeklindeki yapılar, taklit amaçlı renklenme desenleri renklenmelerdeki şekil ve büyüklük gibi genetik varyasyonların (Winding, 1998) yanında kütikular melanizasyon/renklenme veya kanat gibi organlardaki desenlenme süreci özellikle larval evredeki çevre sıcaklığından (Brakefield & Reitsma, 1991), fotoperiyottan (Stoehr & Wojan, 2016) ya da mevsimsel adaptasyonlardan etkilenmektedir (Jacobs & Watt, 1994; Fedorka et al., 2013a). Dolayısıyla çevresel değişikliklere maruz kalan popülasyonlarda fenotip ve bu değişikliklere uyum arasındaki ilişkiler sabit değildir. *Colias* (Kelebek) türlerinde melanizasyon termal düzenleme için olmazsa olmaz olup, daha koyu kanatlar daha fazla güneş ışığı absorbe ettiklerinden soğuk çevrelerdeki popülasyonların uçabilmeleri için gerekli vücut ısısına hızlıca gelmelerini sağlar (Ellers & Boggs, 2002, fakat bkz. Outomuro & Oucharan, 2011). Ancak, böceklerde ısı düzenlemesi sadece vücut melanizasyonuna bağlı olmayıp bireysel termal kapasite, diğer davranışsal düzenlemeler ve bağışıklık ile de ilgilidir (Forsman, 2000; Clusella-Trullas et al., 2007; Kutch et al., 2014). Böceklerde melanizasyon farklı organ ve yapılarda çevresel farklılıkların (sıcaklık ve fotoperiyot gibi) etkisinden aynı şekilde etkilenmez. Örneğin, *Pieris rapae* kelebeğinde artan sıcaklığa bağlı olarak ön kanadın dorsali, arka kenarın ventrali ve abdomen daha az melanize olurken kanat uçlarındaki yamalar ve üstündeki lekeler tersi bir durum göstermiştir (Stoehr & Wojan, 2016).

Memelilerde melanizasyon hücre altı unsurlar (melanositlerin melanozomu içerisinde) içerisinde gerçekleştiğinden böceklerdekinden daha yavaş ilerleyen bir süreçtir (örneğin insanlarda derinin bronzlaşma süreci) (Vavricka et al., 2010). Güneş altında kalan beyaz tenli insanlarda melanizasyon süreci korunma amaçlı olarak çok daha hızlı ilerler. Böcekler ve insanlar arasındaki bu fark yaşam süresi ile de ilgilidir. Bilindiği gibi böceklerde yaşam süresinin çok kısa olması nedeniyle dopakrom çeviri enzimi evrimleşmiş ve bu enzim dopakromu 5,6-dihidroksindola (5,6-dihydroxyindole-DHI) hızlı bir şekilde katalizleyerek melanizasyonun hızı ve oranı artırılmıştır (Han et al., 2002; Vavricka et al., 2010). Memelilerde dopakrom tautomeraz (dopachrome tautomerase, DCT) (Aroca et al., 1990) ve böceklerde dopakrom çevrim enzimi (DCE) (Li et al., 2007) evrimleşmesi melanizasyon yolağında fizyolojik gereksinimlere göre yapabilirlik/kapasite bağlamında böcek ve memelilerdeki farklılaşmanın ilginç bir örneğini oluşturur (Vavricka et al., 2010).

## 2) Melanizasyon ve doğal bağışıklık: Phenoloksidaz (PO) yolağı

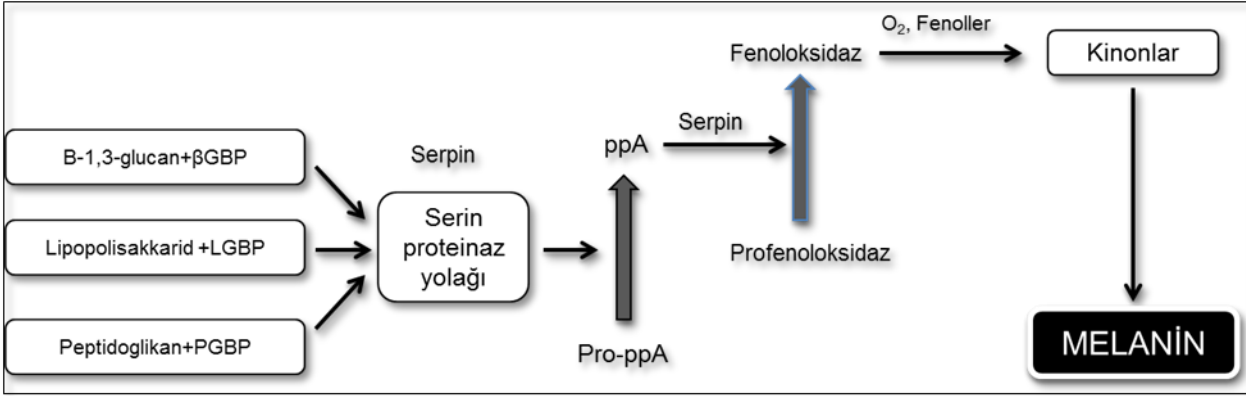
Arthropodlardaki doğal bağışıklık sistemi humoral ve hücrel tepkilerden oluşmaktadır. Humoral savunmalar antimikrobiyal peptidleri, koagülasyonu düzenleyen yolaklar ve hemolimfin melanizasyonu şeklinde özetlenebilir. Hücrel tepkiler ise hemosit aracılığıyla oluşan fagositozis, nodulasyon ve enkapsülasyondan ibarettir (Lavine & Strand, 2002; Tsakas & Marmaras, 2010). Bakteri ve funguslara karşı fenoloksidaz yolağı ve litik aktivite en önemli iki humoral savunma sistemini oluşturur. Melanizasyon ile böcek immün sistemi arasındaki bağlantı son yıllarda yoğun bir şekilde çalışılmaktadır (Wilson et al., 2001; Rolff & Siva-Jothy, 2003; Cotter et al., 2008; Bailey, 2011; Fedorka et al., 2013a). Koyu kütikula renginin oluşmasına neden olan melanin aynı zamanda eklembacaklıların immune sistemi için de hayati öneme sahiptir (Wilson et al., 2001). Birçok böcek grubunda koyu kütikula ile popülasyonlardaki melanin kaynaklı immün sistem pozitif bir ilişki göstermektedir (Barnes & Siva-Jothy, 2000; Wilson et al., 2001). Dolayısıyla böceklerdeki demografik yapı ve çevresel faktörler immün sistemi şekillendirmektedir (Rolff & Siva-Jothy, 2003). Melaninin böceklerde patojene karşı direnç bağlamında iki yönlü rolü vardır: ilki, patojenlerin işgaline karşı kütikulada fizikokimyasal bir bariyer olarak ve ikincisi, böcek vücudu içerisine girmiş işgalcilerin etrafında birikerek hareketsiz hale getirmektedir (Tunaz & Stanley, 2009; Prokko et al., 2013; Tunaz et al., 2015; Tunaz et al., 2016).

Böceklerde genel olarak, melanizasyonun yüksek derecede reaktif ara ürünlerinin, kütikular proteinlerin çapraz bağlanmasına katkıda bulunduğu ve bunun da koruyucu bir kütikül oluşturduğu kabul edilmektedir. Böceklerde diğer türlerdeki tirozinaz'a denk fenoloksidaz (PO) enzimi bulunur (Söderhall & Cerenius, 1998; Gonzalez-Santoyo & Cordoba-Aguilar, 2012). Omurgasızlarda PO'nun aktivasyon ve inhibisyonu hemositler, plasmotositler ve kristal hücreler gibi hücre tiplerini, PO zimogenleri, proPO inhibitör enzimleri (serpinler), sinyal molekülleri (peptidoglikanlar, membran lipidleri ve viral proteinleri) içeren karmaşık bir sistemdir (Cerenius & Söderhall, 2004; Gonzalez-Santoyo & Cordoba-Aguilar, 2012).

PO enzimi omurgasızların bağışıklık sisteminin anahtar bir bileşenidir (Şekil 3). PO'lar çözünebilir proteinlerdir. Böcek PO'ları hemolimf veya hemositler içinde bulunurlar. Kütikulanın oluşumu, yumurtanın koyulaşması, yaraların iyileştirilmesi ve doğal bağışıklıkla ilişkili skleritizasyon, melanizasyon reaksiyonlarında rol oynar (Li et al., 1992; Cerenius & Söderhall, 2004). Melanizasyon yolağı ile ilişkili PO aktivitesi ve kütikula renklenmesi arasındaki ilişkileri sorgulayan bazı çalışmalara ilişkin özet Çizelge 2'de verilmiştir. Böcek PO'su tirozinin DOPA'ya hidroksilasyonunu katalizler, melanizasyon yolağı boyunca dopanın oksidasyonu ile o-kinon ve DHI'nin oksidasyonu ile indol-kinona dönüşüm sağlanır. Memelilerde tek tirozinaz geni varken, diğer organizmaların çoğunda ve böceklerde genellikle çok sayıda PO geni bulunur (Waterhouse et al., 2007) ve bu genler profenoloksidaz (proPO) olarak adlandırılan öncül enzimler şeklinde ifade edilirler. PO'lar inaktif zimogenler (proPO) şeklinde ifade edilirler ve ihtiyaç duyulduğunda aktif PO'ya çevrilir (Şekil 3) (Söderhall & Cerenius, 1998; Cerenius & Söderhall, 2004). Eklembacaklılarda proPO aminoasit sekansları hemosiyanin (omurgasızlarda oksijen taşımadan sorumlu protein) ve heksamerinlere (depo proteinleri) homologtur (Gonzalez-Santoyo & Cordoba-Aguilar, 2012). Son yapılan çalışmalarda, PO'ların atasal bir enzim olduğu hemosiyaninlerin sekonder olarak evrimleştiği ve heksamerlerin de hemosiyaninlerden köken aldığı iddia edilmektedir (Burmester, 2002; Gonzalez-Santoyo & Cordoba-Aguilar, 2012). Kısaca, böceklerde immün-melanin ve kütikular-melanin yolağının fenil alanından L-DOPA'ya oradan da dopamine giden kısmı epidermal hücrelerde, dopaminden melanokrom ve melaninle sonlanan kısmı ise prokütikulada gerçekleşir (Kutch et al., 2014).

Çizelge 2. Böceklerde melanizasyonla ilgili PO aktivitesi ve kütikula renklenmesi arasındaki ilişkiyle ilgili olarak bağışıklıkla ilgili bazı literatür bulgular

Tür	Soru	İmmün parametreler	Kütikular renklenme immün sistem bulgusu	Diğer sonuçlar	Kaynak
<i>Tenebrio molitor</i> (Coleoptera)	Kütikular renklenme dirençle ilişkili midir? Populasyon yoğunluğu ile immün tepkiler arasında bir ilişki var mıdır?	PO aktivitesi soliter ve gregar gruplar arasında farklılık göstermemiştir. Populasyon yoğunluğu farkı mortalite üzerinde etkilidir.	Farklı popülasyon yoğunlukları elitra rengi üzerinde etkilidir. Mortalite yüzdesi renk morflarına göre farklılık göstermiştir.	Sonuçlar patojen direnci bu türde fenotipik esneklik göstermekte olduğuna işaret etmektedir.	Barnes & Siva-Jothy, 2000
<i>Drosophila melanogaster</i> (Diptera)	Termal düzenlemeye bağlı immün sistem yatırımı yaz ve kış popülasyonlarında değişiyor mu?	Gram-negatif patojen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ile enfekte edilmiş yaz popülasyonları patojene karşı daha yüksek duyarlılık göstermiştir.	Kütikular melanizasyon iki popülasyon arasında farklılık göstermiş, kış popülasyonunun daha melanik bireylere sahip olduğu tespit edilmiştir.	Patojenle enfekte edilmiş yaz popülasyonunun %75'i 72 saat sonra ölmüştür.	Kunt et al., 2014
<i>Spodoptera littoralis</i> (Lepidoptera)	Humoral immün aktiviteler arasında bir takas sözkonusu mudur? Gelişim hızı ile melanizm ve PO aktivitesi arasında nasıl bir ilişki vardır?	Melanizm ve PO aktivitesi arasında genetik bir uzlaşma olduğunu söylemek mümkündür.	Melanik bireyler açık kütikula bireylere göre düşük bir PO aktivitesi gösterirken bunun aksine daha yüksek bir litik aktiviteye sahiptir. Bu veriler de iki immün parametre arasında bir uzlaşma olduğunu onaylamaktadır.	Yüksek PO aktivitesine sahip hat daha yavaş gelişim oranına sahiptir. Bu da PO aktivitesi yatırımı melanizmden daha maliyetli olduğuna işaret eder.	Cotter et al., 2008
<i>Allonemobius socius</i> (Orthoptera)	Mevsimsellik melanizmi nasıl etkiler? Termal melanin hipotezi	PO ve LY aktivite birbiriyle pozitif ilişkili	Soğuk sonbaharı temsil eden bir çevrede yaşayan <i>A. socius</i> bireylerinin daha koyu renklerde olduğu, daha fazla fenoloksidaz aktivitesi gösterdikleri ve bakteriye karşı daha yüksek dirence sahip oldukları saptanmıştır. Ancak LY yaz popülasyonlarına oranla daha zayıf olarak tespit edilmiştir	Amerika'da yayılış gösteren çekirge türü <i>Allonemobius socius</i> 'un (Gryllidae) Kuzey- Güney enlemlere göre 9 farklı popülasyonu üzerinde yapılan çalışmada kısa sezon uzunluğuna sahip (soğuk) popülasyonların daha büyük fenoloksidaz aktivitesine sahip oldukları (melanin kökenli immün sistem açısından) ve her iki eşey açısından daha koyu bir kütikula renginin yaygın olduğu saptanmıştır	Fedorka et al., 2013a,b.
<i>Saccharosydne procerus</i> (Hemiptera)	Termal melanin hipotezi her türde geçerli midir?	PO aktivitesi ile sıcaklık arasında pozitif ilişki saptanmıştır.	Artan sıcaklıkla pozitif ilişkili olarak melanik formların sayısı da artmıştır.	Elde edilen sonuçlara göre; farklı sıcaklıklar altında oluşan melanik değişiklikler ve melanizm oluşumu bu tür için termal melanin hipotezinde bilinen kalıpların tam tersi bir sonuç sunmuştur	Yin et al., 2015



Şekil 3. Eklembacaklılarda (Arthropoda) Profenoloxidaz (proPO) aktivasyon sistemi (Cerenius & Söderhall, 2004'den değiştirilerek).

### a) Melanin tipleri

Trozinaz enzimleri bitki ve hayvanlar aleminde yaygın olup polifenoloksidazlar, fenoloksidazlar (PO), fenoller, difenoloksidazlar şeklinde farklı gruplar olarak temsil edilirler (Nappi & Christensen, 2005). Çoğu zaman tirozinaz PO olarak sinonimlendirilir. PO'nun temel rolü sonradan melanin formuna polimerize olan fenoller kinonlara çevirmektir (Söderhall & Cerenius, 1998). Melanizasyon yolağının en yaygın tanımı meyve sineklerinde parasitoid yumurtalarına karşı yürüyen melanizasyon sürecidir (Nappi & Vass, 1993). Melaninler bitki, hayvan ve protistalarda yaygındır. En yaygın olanı ömelanin (eumelanin) siyah ve kahverengi renklerde olup dopakinondan gelen dihidroksindol polimeri tarafından şekillendirilir. Melanin fenilalanin hidroksilaz enzimi tarafından hidroksile olup tirozine dönüşen amino asit fenilalaninden şekillenir. Tirozin aktif PO tarafından hidroksile olmasıyla DOPA oluşur. Daha sonra DOPA oksidize olarak dopakinona ve nonenzimatik yolla hızlı bir şekilde dopakroma dönüştürülür. Bu süreç Şekil 1 ve 3'te özetlendiği biçimde farklı yollar izleyerek çeşitli prekürsörlerden sonra sıklıkla en yaygın tip ömelanin ya da daha az yaygın olan feomelanin, nöromelanin veya allomelaninler şeklinde sonlanır (Gonzalez-Santoyo & Cordoba-Aguilar, 2012). Ömelaninler 5,6-dihydroxyindole (DHI) ara ürünleri vasıtasıyla L-DOPA'nın oksidatif polimerizasyonundan köken alan çözünmez siyah-kahverengi indol içeren polimer pigmentlerdir. Sıklıkla memelilerde bilinen ancak son yıllarda böceklerde de saptanan feomelaninler sülfür içeren heterosiklik oligomerler olup sarıdan kırmızımsı kahverengi veren melaninlerdir (Galván et al., 2015). Neuromelaninler ise beyin "siyah cisim" (=substantia nigra, orta beyinde bulunan hareket ve dikkatten sorumlu) olarak adlandırılan nöronlar içerisinde üretilen koyu pigmentlerdir (Sugumaran & Barek, 2016).

### 3) Melanizasyon ile ilgili araştırma konularının geleceği

Melanogenez enzimleri ile dopa/dopamin metabolizmasının böcekler ve memelilerdeki evrimsel süreci oldukça ilgi çekici görünmektedir. Enzimatik düzen memelilerdeki sistemde sıkı bir kontrol altında sürerken böceklerdeki bu yolak daha çok çeşitlenmiş ve evrimleşmiştir. Örneğin *Anopheles gambiae* (Diptera) birbirinden bağımsız en az 9 fenoloksidaz dizisi içerirken (Kim et al., 2005; Vavricka et al., 2010) büyük oranda melanik pigment senteziyle ilişkili olduğu düşünülen *Drosophila*'da 13 (Maleszka & Kucharski, 2000; Drapeau, 2001), *Bombyx mori*'de (İpek böceği) 7 (Xia et al., 2006), *Tribolium castaneum*'da (Un kurdu) 14 (Arakane et al., 2010) *yellow ailesi* protein (yellow-like genes) saptanmıştır. Böceklerde *Yellow gen ailesinin* genel bir özeti ve evrimine ilişkin kapsamlı bir çalışma Ferguson et al. (2011) tarafından yayınlanmıştır. Memeliler sadece dopa dekarboksilaz enzime sahipken, böceklerde ilave olarak dopa dekarboksilaz homologları vardır. Çünkü, böceklerde yumurtaların sertleşmesi ve kütikulanın gelişim sürecinde, kütikulanın birçok kez yıkılıp yeniden yapılması ve sertleşmesi gerekmektedir (Vavricka et al., 2010). Melanizasyon ve skleritizasyon yollarının farklılaşmasına ilişkin çalışmalar da alanla ilgilenenler için önemli konulardır.

Burada *D. melanogaster*'in ergin kütikula ve larvaların ağız parçalarında anormal yellow fenotipinin tanımlanmasıyla karakterize edilen "*yellow gen*" ve bu genin melanizasyonla olan ilişkisine de kısa değinmek gerekir. Ancak son yapılan çalışmalar bu gen ailesinin mutlak surette melanik pigmentlerin üretiminden sorumlu olmadıklarını ortaya koymuşsa da bu konu hala tartışmalıdır (Ferguson et al., 2011). Çünkü son yıllarda özellikle bal arıları ve diğer yakın akraba Hymenoptera türleri üzerinde yapılan araştırmalar *yellow* genlerinin majör arı sütü proteinleri (MRJPs) ile de ilişkili oldukları (*yellow-e3*, *yellow-h*) saptanmıştır (Buttstedt et al., 2014). Ancak *D. melanogaster*'de saptanan *yellow-f* ve *yellow-f2* genlerinin melanik pigment formasyonunda ihtiyaç duyulan enzimatik dopakrom çevrim aktivitesinden sorumlu oldukları saptanmıştır (Han et al., 2002). *Bombyx mori*'de



larvanın baş ve kuyruk spotlarındaki pigmentasyondan sorumlu *yellow-e* geninin varlığı Ito et al. (2010) tarafından bildirilmiştir. *Yellow* genleri sadece böcek ve bakterilerde tanımlanmış (Maleszka & Kucharski, 2000) ve filogenetik olarak evrimi ve çeşitlenmesinin nedenleri bazı çalışmalarda konu edilmiştir (e. g. Drapeau et al., 2006; Ferguson et al., 2011). Son bilgilere göre *yellow gen ailesi* melanizasyonun/pigmentasyonun (örneğin kelebeklerde kanat desenlerinin oluşmasında) yanı sıra davranış, eşeye özgü üreme olgunlaşması ve sosyal arılarda kast sistemi ve nöral sinyalizasyonda iş gördüğü anlaşılmıştır (Ferguson et al., 2011). *Heliconius* kelebekleri ve ipekböceklerindeki 7 *yellow* geninin yaklaşık 100 milyon yıl önce ayrılmaya başlaması ile gen ifadesinin uzamsal düzenlenmesi ve melanik pigmentlerin kelebek kanatlarındaki dağılımı arasındaki ilişkinin evrimine işaret edilmektedir (Ferguson et al., 2011).

## Sonuç

Böcekler bitkilerde tozlaşmayı sağlayarak üretimde ciddi yararlar sağlamalarının yanı sıra bir çok hastalığa vektörlük yapmaları veya doğrudan bitkiye zarar vermeleri nedeniyle tarımsal sistemin yönetiminde dikkate alınması gereken bir unsurdur. Kısa döl süreleri, büyük popülasyonlara hızla ulaşabilmeleri, aktif/pasif olarak kolay yayılış gösterebilmeleri ve biyotik kapasitelerinin yüksek olması nedeniyle özellikle tarımsal üretim ve insan sağlığı açısından tehdit olan önemli işgalci böcek türlerinin yeni ortamlara hızlıca uyum sağlamaları şaşırtıcı değildir (Hoffmann, 2017). Hastalık taşıyan vektör böceklerin yayılışlarının, değişen iklim şartlarına gösterecekleri tepkilerin, bağışıklık aktivitelerinin taşıdıkları patojenle ilişkili olarak ne şekilde değişebileceği halk sağlığı açısından öne çıkan araştırma konularıdır. Böceklerin bağışıklık sistemlerinin gelecekteki ekolojik değişimlere ne şekilde tepki verebileceği önemli araştırma konularından birisidir. Melaninin bakteri, virüs ve mantar gibi geniş yelpazedeki patojenlere karşı koruma sağlayan ve böcek bağışıklık sisteminde anahtar bir rolü olduğu bu derlemede öne çıkarılmıştır (Gillespie et al., 1997; Wilson et al., 2001; Sugumaran, 2002; Lemaitre & Hoffmann, 2007). Bir çok böcek popülasyonunda global olarak sıcaklığın artışı ile böcek bağışıklık sistemi arasında pozitif ilişki gösteren kütikular melaninin azaldığı bildirilmiştir (Wilson et al., 2001; Brakefield & de Long, 2011; Fedorka et al., 2013a, b; Zeuss et al., 2014; Kutch et al., 2014). Bu nedenle, çevresel faktörlerin değişimi böceklerde bağışıklık sisteminde önemli varyasyonlara yol açabileceğini söylemek gerekir.

Afrika için en önemli tarım zararlılarından birisi olan Çöl çekirgelerinde (*Schistocerca gregaria*) soliter çekirgeler daha iri ve kriptik renklenme (kamuflej) söz konusu iken, gregar (göç fazı) olanlar aposematik (krokutucu, aydırıcı) renklenme gösterir (Ulrich et al., 2015). Ülkemizde epidemiyolojisi potansiyeli yüksek çekirgelerde (*Anacridium aegyptium*, *Locusta migratoria*, *Dociostaurus maroccanus* gibi önemli türler) melanin temelli bağışıklık fizyolojilerinin araştırılması, sıcaklık parametreleriyle immün aktivite değişkenliğinin saptanması üzerindeki araştırmalar ekonomik açıdan önemli olacaktır.

Diğer taraftan melanizasyonla ilgili renklenme ve desenlenmeler üreme davranışlarında çok önemli bir role sahipken (Comeault et al., 2015), aynı zamanda bazı gruplar için önemli bir taksonomik karakterdir (Perrard et al., 2014; Edwards et al., 2007). Ancak sıcaklık ve farklı habitatlara uyum bir çok böcek grubu için kütikuladaki melanin birikiminde varyasyona yol açtığı bilinmektedir (True, 2003; Comeault et al., 2015; Monteiro et al., 2015). Soğuk veya sıcak çevreye uyum süreci melanin birikiminde farklılaşmalar oluşturabilir (Majerus, 1998; Clusella Trullas et al., 2007; Fedorka et al., 2013a; Kutch et al., 2014; Baxter et al., 2017). Dolayısıyla renklenmeye dayalı tanımlamalarda türün farklı çevrelere uyumundan kaynaklanan unsurların bilinmesinde melanin temelli bağışıklık unsurlarının etkili olabileceği göz ardı edilmemelidir. Önemli araştırma konularından birisi de melanizasyonun varyasyonunda biyotik faktörlerin mi yoksa abiyotik faktörlerin mi daha çok etkili olduğudur. Hornet arılarındaki coğrafi renk varyasyonunu gelişim özelliklerini etkileyen genler tarafından belirlendiği saptanmıştır. *Vespa velutina* (Hymenoptera) popülasyonları renklenmede konvergent evrim geçirerek melanizm üzerindeki abiyotik etkilerden çok aposematizm ve müller mimikrisindeki kısıtlamaların etkili olduğu belirlenmiştir (Perrard et al., 2014).

Dolayısıyla bu derleme hem ülkemizde hem de diğer coğrafyalarda yararlı ve zararlı türlerin değişen çevre koşullarına göre melanizasyon yollarında ortaya çıkan tepkilerin ve bağışıklık sistem aktivitelerinin araştırılmasının önemini ortaya koyması ve konuya ilişkin temel bilgi vermesi açısından önemlidir. Diğer taraftan melanin temelli bağışıklığın gücüne ilişkin kütikular melanizasyonun derecesinin eşeyssel seçilimdeki rolü ek-immünolojik açıdan önemli araştırma konularından birisidir. Vücut büyüklüğü ile melanizasyon arasındaki ilişki ve bağışıklık aktivitelerinin kalıtılabilirliği özellikle ekonomik değere sahip böcek gruplarında araştırılması gerekmektedir. Yukarıda değinilen konuların ülkemizde yeterince araştırma konusu olmuş olmasa da, bu derleme melanin temelli bağışıklık sistemi üzerinde planlanacak çalışmaların yaygınlaşmasına katkıda bulunacağına inanıyorum.

## Yararlanılan Kaynaklar

- Andersen, S.O., 2010. Insect cuticular sclerotization: a review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40: 166-178.
- Arakane, Y., N.T. Dittmer, Y. Tomoyasu, K.J. Kramer, S. Muthukrishnan, R.W. Beeman & M.R. Kanost, 2010. Identification, mRNA expression and functional analysis of several yellow family genes in *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40: 259-266.
- Aroca, P., J.C. Garcia-Borron, F. Solano & J.A. Lozano, 1990. Regulation of mammalian melanogenesis. I: Partial purification and characterization of a dopachrome converting factor: dopachrome tautomerase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1035: 266-275.
- Arenas, L.M. & M. Stevens, 2017. Diversity in warning coloration is easily recognized by avian predators. *Journal of Evolutionary Biology*, 30(7):1288-1302.
- Barnes, A.I. & M.T. Siva-Jothy, 2000. Density-dependent prophylaxis in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae): cuticular melanization is an indicator of investment in immunity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267: 177-182.
- Baxter, R., H.G.A. Contet & K. Krueger, 2017. Arthropod innate immune systems and vector-borne diseases. *Biochemistry*, 56: 907-918.
- Borovanský, J., 2011. History of melanosome research. 1-19. In: *Melanins and Melanosomes: Biosynthesis, biogenesis, physiological and pathological functions* (Eds. J. Borovanský & P. A. Riley), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1st edition, 407 pp.
- Brakefield, P.M., 1985. Polymorphism Mullerian mimicry and interactions with thermal melanism in ladybirds and a soldier beetle: a hypothesis. *Biological Journal of the Linnean Society*, 26: 243-267.
- Brakefield, P.M. & N. Reitsma, 1991. Phenotypic plasticity, seasonal climate and the population biology of *Bicyclus* butterflies (Satyridae) in Malawi. *Ecological Entomology*, 16: 291-303.
- Brakefield, P.M. & P.W. de Jong, 2011. A steep cline in ladybird melanism has decayed over 25 years: a genetic response to climate change? *Heredity (Edinb)*, 107: 574-578.
- Burmester, T., 2002. Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. *Journal of Comparative Physiology B*, 172: 95-107.
- Buttstedt, A., R.F.A. Moritz & S. Erler, 2014. Origin and function of the major royal jelly proteins of the honeybee (*Apis mellifera*) as members of the yellow gene family. *Biological Reviews*, 89: 255-269.
- Cerenius, L. & K. Söderhall, 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Review*, 198: 116-126.
- Clusella-Trullas, S., J.H. van Wyk & J.R. Spotila, 2007. Thermal melanism in ectotherms. *Journal of Thermal Biology*, 32: 235-245.
- Clusella-Trullas, S., J.S. Terblanche, T.M. Blackburn & S.L. Chown, 2008. Testing the thermal melanism hypothesis: a macrophysiological approach. *Functional Ecology*, 22: 232-238.
- Comeault, A.A., S.M. Flaxman, R. Riesch, E. Curran, V. Soria-Carrasco, Z. Gompert, T.E. Farkas, M. Muschick, T.L. Parchman, T. Schwander, J. Slate & P. Nosil, 2015. Selection on a genetic polymorphism counteracts ecological speciation in a stick insect. *Current Biology*, 25(15): 1975-1981.
- Drapeau, M.D., 2001. The family of yellow-related *Drosophila melanogaster* proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 281: 611-613.
- De Jong, P.W., S.W.S. Gussekloo & P.M. Brakefield, 1996. Differences in thermal balance, body temperature and activity between non-melanic and melanic two-spot ladybird beetles (*Adalia bipunctata*) under controlled conditions. *Journal of Experimental Biology*, 199: 2655-2666.
- Drapeau, M.D., S. Albert, R. Kucharski, C. Prusko & R. Maleszka, 2006. Evolution of the Yellow/Major Royal Jelly Protein family and the emergence of social behavior in honey bees. *Genome Research*, 16: 1385-1394.
- Edwards, K.A., L.T. Doescher, K.Y. Kaneshiro & D. Yamamoto, 2007. A Database of wing diversity in the Hawaiian *Drosophila*. *PLoS ONE*, 2(5): e487.
- Ellers, J. & C.L. Boggs, 2004. Functional ecological implications of intraspecific differences in wing melanization in *Colias* butterflies. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82: 79-87.
- Endler, J.A., 1984. Progressive background matching in moths, and a quantitative measure of crypsis. *Biological Journal of the Linnean Society*, 22: 187-231.

- Fedorca, K.M., E.K. Copeland & W.E. Winterhalter, 2013a. Seasonality influences cuticle melanization and immune defense in a cricket: support for a temperature-dependent immune investment hypothesis in insects. *Journal of Experimental Biology*, 216(21): 4005-4010.
- Fedorca, K.M., V. Lee & W.E. Winterhalter, 2013b. Thermal environment shapes cuticle melanism and melanin-based immunity in the ground cricket *Allonemobius socius*. *Evolutionary Ecology*, 27(3): 521-531.
- Ferguson, L.C., J. Green, A. Surridge & C.D. Jiggins, 2011. Evolution of the insect yellow gene family. *Molecular Biology and Evolution*, 28(1): 257-272.
- Forsman, A., 2000. Some like it hot: intra-population variation in behavioral thermoregulation in color-polymorphic pygmy grasshoppers. *Evolutionary Ecology*, 14: 25-38.
- Galván, I., A. Jorge, P. Edelaar & K. Wakamatsu, 2015. Insects synthesize pheomelanin. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 28: 599-602.
- Gibert, P., B. Moreteau, J.C. Moreteau, R. Parkash & J.R. David, 1998. Light body pigmentation in Indian *Drosophila melanogaster*: a likely adaptation to a hot and arid climate. *Journal of Genetics*, 77: 13-20.
- Gillespie, J. P., M.R. Kanost & T. Trenczek, 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology*, 42: 611-643.
- Gonzalez-Santoyo, I. & A. Cordoba-Aguilar, 2012. Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 142: 1-16.
- Gunn, A., 1998. The determination of larval phase coloration in the African armyworm, *Spodoptera exempta* and its consequences for thermoregulation and protection from UV light. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 86: 125-133.
- Han, Q., J. Fang, H. Ding, J.K. Johnson, B.M. Christensen & J. Li, 2002. Identification of *Drosophila melanogaster* yellow-f and yellow-f2 proteins as dopachrome-conversion enzymes. *Biochemical Journal*, 368: 333-340.
- Hofmann, A.A., 2017. Rapid adaptation of invertebrate pests to climatic stress? *Current Opinion in Insects Science*, 21: 7-13.
- Ito, K., S. Katsuma, K. Yamamoto, K. Kadono-Okuda, K. Mita & T. Shimada, 2010. Yellow-e determines the color pattern of larval head and tail spots of the silkworm *Bombyx mori*. *The Journal of Biological Chemistry*, 285: 5624-5629.
- Kemp, D.J. & R.L. Rutowski, 2011. The role of coloration in mate choice and sexual interactions in butterflies. *Advances in the Study of Behavior*, 4: 55-92.
- Kettlewell, B., 1973. *The Evolution of Melanism. The study of a recurring necessity, with special reference to industrial melanism in the Lepidoptera*. Clarendon Press: Oxford, 423 pp.
- Kingsolver, J.G., 1987. Evolution and coadaptation of thermoregulatory behavior and wing pigmentation pattern in pierid butterflies. *Evolution*, 41: 472-490.
- Kingsolver, J.G. & D.C. Wiernasz, 1991. Seasonal polyphenism in wing-melanin pattern and thermoregulatory adaptation in *Pieris* butterflies. *American Naturalist*, 137: 816-830.
- Kutch, I.C., H. Sevgili, T. Wittman & K.M. Fedorca, 2014. Thermoregulation strategy may shape immune investment in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Experimental Biology*, 217: 3664-3669.
- Jacobs, M.D. & W.B. Watt, 1994. Seasonal adaptation vs physiological constraint: Photoperiod, thermoregulation and flight in *Colias* butterflies. *Functional Ecology*, 8: 366-376.
- Lavine, M.D. & M.R. Strand, 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 1295-309.
- Lawniczak, M.K.N., A.I. Barnes, J.R. Linklater, J.M. Boone, S. Wigby & T. Chapman, 2006. Mating and immunity in invertebrates. *Trends Ecology and Evolution*, 22: 48-55.
- Lemaitre, B. & J. Hoffmann, 2007. The host defence of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, 25: 697-743.
- Li, J., J.W. Tracy & B.M. Christensen, 1992. Phenoloxidase activity in hemolymph compartments of *Aedes aegypti* during melanotic encapsulation reactions against microfilariae. *Developmental & Comparative Immunology*, 16: 41-48.
- Li, J.S., C.J. Vavricka, B.M. Christensen & J. Li, 2007. Proteomics analysis of N-glycosylation in mosquito dopachrome conversion enzyme. *Proteomics*, 7: 2557-2569.
- Lindstedt, C., H. Eager, E. Ihalainen & A. Kahilainen, 2011. Direction and strength of selection by predators for the color of the aposematic wood tiger moth. *Behavioral Ecology*, 22: 580-587.

- Liu, J., T.R. Lemonds, J.H. Marden & A. Popadic, 2016. A pathway analysis of melanin patterning in a hemimetabolous insect. *Genetics*, 203: 403-413.
- Majerus, M.E.N., 1998. *Melanism: evolution in action*. Oxford, Oxford University Press.
- Majerus, M.E.N., P. O'Donald & J. Weir, 1982. Female mating preference is genetic. *Nature*, 300: 521-523.
- Maleszka, R. & R. Kucharski, 2000. Analysis of *Drosophila* yellow-B cDNA reveals a new family of proteins related to the royal jelly proteins in the honeybee and to an orphan protein in an unusual bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 270:773-776.
- Monteiro, A., X. Tong, A. Bear, S.F. Liew, S. Bhardwaj, B.R. Waisk, A. Dinwiddie, C. Bastianelli, W.F. Cheong, M.R. Wenk, H. Cao & K.L. Prudic, 2015. Differential expression of ecdysone receptor leads to variation in phenotypic plasticity across serial homologs. *PLOS Genetics*, 11(9): e1005529.
- Miller, C.W. & S.D. Hollander, 2010. Predation on heliconia bugs, *Leptoscelis tricolor*: examining the influences of crypsis and predator color preferences. *Journal of Insect Behavior*, 88: 122-128.
- Nappi, A.J. & E. Vass, 1993. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. *Pigment Cell Research*, 6: 117-126.
- Nappi, A.J., E. Vass, F. Frey & Y. Carton, 1995. Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. *European Journal of Cell Biology*, 68: 450-456.
- Nappi, A.J. & B.M. Christensen, 2005. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 443-459.
- Otomuro, D. & F.J. Ocharan, 2011. Wing pigmentation in *Calopteryx* damselflies: a role in thermoregulation? *Biological Journal of the Linnean Society*, 103: 36-44.
- Perrard, A., M. Arca, Q. Rome, F. Muller, J. Tan, S. Bista, H. Nugroho, R. Baudoin, M. Baylac, J-F. Silvain, J.M. Carpenter & C. Villemant, 2014. Geographic variation of melanisation patterns in a hornet species: genetic differences, climatic pressures or aposematic constraints? *PLoS ONE*, 9(4): e94162.
- Perrard, A., M. Baylac, J.M. Carpenter & C. Villemant, 2014. Evolution of wing shape in hornets: why is the wing venation efficient for species identification? *Journal of Evolutionary Biology*, 27: 2665-2675.
- Porter, W.P. & D.M. Gates, 1969. Thermodynamic equilibria of animals with environment. *Ecological Monographs*, 39: 245-270.
- Prokkola, J., D. Roff, T. Kärkkäinen, I. Krams & M.J. Rantala, 2013. Genetic and phenotypic relationships between immune defense, melanism and life-history traits at different temperatures and sexes in *Tenebrio molitor*. *Heredity*, 111: 89-96.
- Punzalan, D., F.H. Rodd & L. Rowe, 2008. Sexual selection mediated by the thermoregulatory effects of male colour pattern in the ambush bug *Phymata americana*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275: 483-492.
- Robb, T., M.R. Forbes & I.G. Jamieson, 2003. Greater cuticular melanism is not associated with greater immunogenic response in adults of the polymorphic mountain stone weta, *Hemidenia maori*. *Ecological Entomology*, 28: 738-746.
- Roff, D.A. & D.J. Fairbairn, 2013. The costs of being dark: the genetic basis of melanism and its association with fitness-related traits in the sand cricket. *Journal of Evolutionary Biology*, 26: 1406-1416.
- Rolff, J. & M.T. Siva-Jothy, 2003. Invertebrate ecological immunology. *Science*, 301: 472-475.
- Shamim, G., S.K. Ranjan, D.M. Pandey & R. Ramani, 2014. Biochemistry and biosynthesis of insect pigments. *European Journal of Entomology*, 111: 149-164.
- Shevtsova, E., C. Hansson, D.H. Janzen & J. Kjaerandsen, 2011. Stable structural color patterns displayed on transparent insect wings. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(2): 668-673.
- Shuai, Z., G. Qihong, L. Minghui, L. Muwang, L. Jianyong, M. Xuexia & H. Yongping, 2010. Disruption of an N-acetyltransferase gene in the silkworm reveals a novel role in pigmentation. *Development*, 137: 4083-4090.
- Siva-Jothy, M.T., 2000. A mechanistic link between parasite resistance and expression of a sexually selected trait in a damselfly. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267: 2523-2527.
- Solano, F., 2014. Melanins: skin pigments and much more types, structural models, biological functions, and formation routes. *Hindawi New Journal of Science*, 2014: 1-28.
- Söderhall, K. & L. Cerenius, 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 10: 23-28.
- Stoehr, A.M. & E.M. Wojan, 2016. Multiple cues influence multiple traits in the phenotypically plastic melanization of the cabbage white butterfly. *Oecologia*, 182: 691-701.

- Sugumaran, M., 2002. Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Research*, 15: 2-9.
- Sugumaran, M. & H. Berek, 2016. Critical analysis of the melanogenic pathway in insects and higher animals. *International Journal of Molecular Sciences*, 17: 1753.
- They, M. & D. Gomez, 2010. Insect colours and visual appearance in the eyes of their predators. *Advances in Insect Physiology: Insect Integument and Colour*, 38: 267-353.
- True, J.R., 2003. Insect melanism: the molecules matter. *Trends in Ecology & Evolution*, 18: 640-647.
- Tsakas, S. & V.J. Marmaras, 2010. Insect immunity and its signalling: an overview. *Isj-Invertebrate Survival Journal*, 7(2): 228-238.
- Tunaz, H., 2004. Böceklerde Bağışıklık Mekanizması. *KSÜ. Fen Mühendislik Dergisi*, 7: 78-82.
- Tunaz, H. & D. Stanley, 2009. An immunological axis of biocontrol: infections in field-trapped insect. *Naturwissenschaften*, 96: 1115-1119.
- Tunaz, H., M.K. Er & A.A. Işıkber, 2015. Incidence of microbial infections revealed by assessing nodulation in field-collected insects from Adana province. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 39: 753-763
- Tunaz, H., A.A. Işıkber & M.K. Er, 2016. Natural cellular immunity in field-collected insects from Hatay province by assessing nodulation. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 40: 39-50.
- Turner, J.R.G., 1977. Butterfly mimicry: The genetical evolution of an adaptation. *Evolutionary Biology*, 10: 163-206.
- Vavricka, C.J., B.M. Christensen & J. Li, 2010. Melanization in living organisms: a perspective of species evolution. *Protein & Cell*, 9: 830-841.
- Waterhouse, R.M., E.V. Kriventseva, S. Meister, Z. Xi, K.S. Avarez, L.C. Bartholomay, C. Barillas-Mury, G. Bian, S. Blandin, B. M. Christensen, Y. Dong, H. Jiang, M. R. Kanost, A.C. Koutsos, E. A. Levashina, J. Li, P. Ligoxygakis, R.M. Maccallum, G.F. Mayhew, A. Mendes, K. Michel, M.A. Osta, S. Paskewitz, S.W. Shin, D. Vlachou, L. Wang, W. Wei, L. Zheng, Z. Zou, D. W. Severson, A. S. Raikhel, F.C. Kafatos, G. Dimopoulos, E.M. Zdobnov & G.K. Christophides, 2007. Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. *Science*, 316: 1738-1743.
- Watt, W.B., 1968. Adaptive significance of pigment polymorphisms in *Colias* butterflies. I. Variation of melanin pigment in relation to thermoregulation. *Evolution*, 22: 437-458.
- Wiernasz, D.C., 1989. Ecological and genetic correlates of range expansion in *Coenonympha tullia*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 38: 197-214.
- Wilson, K., S.C. Cotter, A.F. Reeson & J.K. Pell, 2001. Melanism and disease resistance in insects. *Ecology Letters*, 4: 637-649.
- Winding, J.J., 1998. Evolutionary genetics of fluctuating asymmetry in the peacock butterfly (*Inachis io*). *Heredity*, 80: 382-392.
- Wittkopp, P.J. & P. Beldade, 2009. Development and evolution of insect pigmentation: genetic mechanisms and the potential consequences of pleiotropy. *Seminars Cell & Developmental Biology*, 20: 65-71.
- Wittkopp, P.J., 2002. Evolution of yellow gene regulation and pigmentation in *Drosophila*. *Current Biology*, 12: 1547-1556.
- Xia, A., Q. Zhou, L. Yu, W. Li, Y. Yi, Y. Zhang & Z. Zhang, 2006. Identification and analysis of YELLOW protein family genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 7: 195.
- Yin, H.C., Q.H. Shi, M. Shakeel, J. Kuang & J.H. Li, 2016. The environmental plasticity of diverse body color caused by extremely long photoperiods and high temperature in *Saccharosydne procerus* (Homoptera: Delphacidae). *Frontiers in Physiology*, 7.