

DOI: 10.13376/j.cblls/2016009

文章编号: 1004-0374(2016)01-0070-07

· 评述与综述 ·

昆虫免疫蛋白多酚氧化酶的研究进展

苑胜垒^{1,2}, 管京敏², 杨 兵², 路岸瑞², 凌尔军², 宋红生^{1*}

(1 上海大学生命科学学院, 上海 200444; 2 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所昆虫发育与进化生物学重点实验室, 上海 200032)

摘要: 多酚氧化酶是无脊椎动物, 包括昆虫的重要免疫蛋白, 经由受体识别病原物, 通过丝氨酸蛋白酶切割激活, 数分钟之内在病原物周围发生黑化反应。多酚氧化酶的活性抑制或者基因丢失, 导致宿主对大多数病原物抵抗力下降。近年来, 随着多酚氧化酶晶体结构的解析, 对多酚氧化酶蛋白结构及其活性、抑菌等作用有了新的认识。同时, 在昆虫中发现多酚氧化酶可能具有超越免疫的功能, 显示对多酚氧化酶的研究具有一定的应用价值。

关键词: 昆虫; 多酚氧化酶; 3型含铜蛋白酶; 免疫; 黑化作用

中图分类号: Q516; Q966 **文献标志码:** A

Recent achievements on the insect important innate immunity protein prophenoloxidase

YUAN Sheng-Lei^{1,2}, GUAN Jing-Min², YANG Bing², LU An-Rui², LING Er-Jun², SONG Hong-Sheng^{1*}

(1 School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China; 2 Key Laboratory of Insect Developmental and Evolutionary Biology, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: Prophenoloxidase is an important innate immunity protein in invertebrate animals including insects. Upon detecting by receptors, most pathogens can activate serine proteases to cleave and activate prophenoloxidase into phenoloxidase that can induce melanization around pathogens within several minutes. The inhibition on this enzyme activity or deletion of prophenoloxidase genes can cause the decreasing resistance to most pathogens. The prophenoloxidase protein structure has been analyzed recently. Due to it, we can now understand the influences of protein structure on enzyme activity and bacteria inhibition. The recent works also show that insect prophenoloxidase may have new functions beyond immunity, which indicates that the study on the insect prophenoloxidase may have values of application.

Key words: insect; prophenoloxidase; type-3 copper proteins; immunity; melanization

昆虫不具有脊椎动物的获得性免疫, 依赖天然免疫抵抗细菌、真菌、病毒等病原物的侵染^[1-3]。天然免疫主要包括体液免疫和细胞免疫。体液免疫通过体液中的多酚氧化酶和抗菌肽等蛋白对病原物起免疫作用; 细胞免疫是由血细胞参与的吞噬和包裹等反应^[1-3]。昆虫免疫反应主要发生在体壁、中肠和血腔中。昆虫的多酚氧化酶是3型含铜蛋白酶^[3-4], 该家族蛋白在自然界中普遍存在, 如哺乳动物的酪氨酸酶^[5]、植物的儿茶酚氧化酶和细菌真菌的酪氨酸酶^[6]。

哺乳动物的酪氨酸酶与白化病等疾病有密切关系^[7-8], 植物中儿茶酚氧化酶通过褐化会影响食物的品质^[9], 真菌等微生物的酪氨酸酶和致病性有关系^[10-11], 而昆虫多酚氧化酶是一种非常重要的免疫蛋白^[3-4]。下面介绍昆虫多酚氧化酶的最新研究进展。

收稿日期: 2015-05-19; 修回日期: 2015-08-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(31172147, 31472043)

*通信作者: E-mail: hssong@staff.shu.edu.cn

1 多酚氧化酶的产生

昆虫多酚氧化酶是 3 型含铜蛋白 (type 3 copper protein), 此类蛋白的活性中心有两个铜结合位点, 每个铜结合位点由 3 个保守的组氨酸螯合铜离子形成^[4]。无脊椎动物的多酚氧化酶以酶原 (prophenoloxidase, PPO) 的形式存在, 其活性位点由一个保守的苯丙氨酸占据并阻挡底物进入, 不具有酶活性 (本文中多酚氧化酶是指未激活的酶原), 必须通过剪切形成活性酚氧化酶 (phenoloxidase, PO) 才能催化底物反应^[3-4], 在诸如皮肤、体腔和蚊媒肠道中形成黑化反应。通过对烟草天蛾多酚氧化酶的结构解析, 发现烟草天蛾多酚氧化酶以异源二聚体的形式存在^[12]。

家蚕多酚氧化酶一直被认为是由一类血细胞, 即拟绛色细胞 (oenocytoids) 产生的^[4]。但进一步的研究表明, 家蚕其他血细胞中也存在多酚氧化酶^[2]。双翅目昆虫果蝇幼虫的含晶细胞 (crystal cell)、蚊媒的颗粒细胞 (granulocyte) 和拟绛色细胞都有多酚氧化酶^[2]。昆虫的多酚氧化酶一般认为是组成型表达, 但个别的多酚氧化酶是诱导型表达, 如在黑腹果蝇中含晶细胞组成型表达 DmPPO1 和 DmPPO2 (本文中凡是未标注物种名称都是指果蝇的多酚氧化酶), 并依赖于 RUNX 相关转录因子 Lozenge 和 GATA 转录因子 Serpent 的调控^[13], 其 RNA 水平不受细菌或真菌感染的影响; 层状细胞 (lamellocyte) 平时并不常见, 只有当幼虫受到寄生蜂等侵染后才由原血细胞分化形成, 感染 48~72 h 后, DmPPO3 的 RNA 水平显著上升, 主要分布在层状细胞中, 因此, DmPPO3 是诱导型表达^[14-15]。

除了血细胞外, 家蚕的皮肤中也存在多酚氧化酶, 被认为是由血液转运过来^[4]。但初步的研究表明, 当昆虫受到白僵菌感染, 位于黑化部位下面的真皮层细胞中有大量的多酚氧化酶积累 (未发表数据), 由于多酚氧化酶不具有信号肽^[4], 推测这些蛋白质可能是由真皮层细胞合成。近年发现在家蚕的前肠和后肠组织^[16], 以及家蚕的翅原基组织中存在多酚氧化酶^[17], 且后肠多酚氧化酶是导致食叶昆虫粪便黑化的主要原因, 对清除粪便中可能存在的病原物, 维护昆虫生存环境洁净具有重要的意义。昆虫蜕皮液也存在多酚氧化酶^[18], 其来源不清楚。因此, 昆虫多酚氧化酶的来源比我们想象得要复杂^[3]。

2 多酚氧化酶的激活

在昆虫中, 多酚氧化酶是诱发黑化反应的主要

酶, 对于防止病原微生物入侵以及伤口愈合至关重要^[3-4]。近三四十年对多酚氧化酶激活机制研究得比较多, 多酚氧化酶常以酶原形式存在, 需要时经过特异丝氨酸蛋白酶的切割形成有活性的酚氧化酶才可以起作用^[4,19]。1986 年, Yoshida 和 Ashida^[20]提出了家蚕多酚氧化酶的激活是由丝氨酸蛋白酶 PPAE (PPO-activating enzyme) 参与的激活级联通路所调控。随后, 更多参与激活的丝氨酸蛋白酶在不同昆虫中陆续被鉴定出来, 如烟草天蛾中的 PAP (PPO-activating proteinases)^[19], 果蝇中的 MP1、MP2 和 Haysan 等^[3]。还有一类不具活性但参与激活的丝氨酸蛋白酶同类物也被鉴定出来, 如烟草天蛾的 SPHs (serine proteinase homologs)^[21]。随着研究的不断深入, 多酚氧化酶激活级联通路的一些负调控因子, 如丝氨酸蛋白酶抑制剂 (serpins) 被克隆并进行了功能研究^[19]。而 C 型凝集素 (C-type lectin)、革兰氏阴性菌结合蛋白 (GNBP)、肽聚糖识别蛋白 (PGRP)、 β -1,3-葡聚糖结合蛋白 (β GRP) 等被认为是激活通路最上游的可以结合模式识别分子的蛋白^[3-4,19]。病原微生物入侵宿主后, 血淋巴中的模式识别受体 (如 PGRP、C-type lectin、GNBP 和 β GRP 等) 会与病原微生物表面的模式识别分子 (如葡聚糖、LPS 等) 结合, 由此启动整个多酚氧化酶激活通路, 最终由通路下游的丝氨酸蛋白酶 (PPAE 和 PAP) 剪切多酚氧化酶形成活性酚氧化酶。serpin 参与通路负调控, 防止体内过度黑化反应^[3-4,19]。根据已有的报道, 多酚氧化酶的激活机制有以下 3 种形式。

机制 1 如图 1A 所示。在家蚕中, PPAE 是多酚氧化酶激活通路中最下游的酶^[20], 家蚕 BmPPO1 (相对分子质量为 78.78×10^3) 和 BmPPO2 (相对分子质量为 80.12×10^3) 被 PPAE 从 ⁵¹RF⁵² 位点剪切, 剪切后的大片段 BmPO1 (相对分子质量为 72.82×10^3) 和 BmPO2 (相对分子质量为 74.25×10^3) 直接具有酚氧化酶活性^[4,20]。但是, 依据烟草天蛾的晶体结构来看, 在剪切后的大片段中 place holder 依然存在于活性口袋中。

机制 2 如图 1B 所示。在烟草天蛾中, 多酚氧化酶的激活机制比家蚕更加复杂^[19]。目前鉴定了 3 个丝氨酸蛋白酶 PAP (PPO-activating proteinases), 与家蚕 PPAE 一样, MsPPO1 在 ⁵¹RF⁵² 位点, 而 MsPPO2 在 ⁴⁹RV⁵⁰ 位点被 PAP 剪切^[22], 剪切后的大片段 MsPO1 (相对分子质量为 72.86×10^3) 和 MsPO2 (相对分子质量为 74.14×10^3) 的酚氧化酶活性极低。但是, 如果在其中添加 SPH 后, 酚氧化酶活性得

酶共同孵育一段时间, 有一个相对分子质量为 60×10^3 的片段产生, 而这个片段具有酚氧化酶活性^[23-24]。进一步的 N 端测序表明, 这个相对分子质量为 60×10^3 的片段是在 HdPPO-I 的 ¹⁶²RA¹⁶³ 位点处剪切形成的^[23-24]。根据 MsPPO 的晶体结构分析, 第二次的切割是发生在 place holder 之后, 活性位点可以被暴露。

2014 年, Lu 等^[25] 利用 α -chymotrypsin 和重组果蝇多酚氧化酶 (His-rDmPPO1 和 rDmPPO1-His, N 端和 C 端各有一个 His-Tag, 用于确认剪切位置) 研究发现了体外多酚氧化酶激活新方式 (图 1D)。理论预测 α -chymotrypsin 是不可以切割激活 rDmPPO1 (纯化的重组果蝇 DmPPO1), 而 trypsin 是可以完美切割激活 rDmPPO1。当 α -chymotrypsin 与 rDmPPO1 孵育后在 Native gel 上分离, 得到两个条带, 其中一个条带 (后来证实相对分子质量为 60×10^3 左右) 具有直接的酚氧化酶活性, 而另一个条带 (后来证实相对分子质量为 76×10^3 左右) 必须再次激活才具有活性。进一步检测发现, α -chymotrypsin 先在 N 末端和 C 末端剪切 rDmPPO1, 形成一个不具有活性的大片段 (相对分子质量为 76×10^3), 其后 α -chymotrypsin 在这个大片段 (相对分子质量为 76×10^3) 的 place holder 之后继续剪切, 直至产生具有直接活性的相对分子质量为 60×10^3 片段。因此, PPO1 在 α -chymotrypsin 作用下, 分别位于 N 末端、C 末端以及 place holder 之后至少被切割 3 次, 才形成具有直接活性的片段。Trypsin 是一种典型的丝氨酸蛋白酶。根据 GPMW 软件预测, trypsin 理论上完全可以在 ⁵²RF⁵³ 和 ¹⁶⁴RD¹⁶⁵ 位点切割 DmPPO1, 这两个位点正好和东北大黑腮金龟 HdPPO-I 的切割位点吻合^[23-24]。不可思议的是, trypsin 切割 DmPPO1 产生的是一个不具有活性的相对分子质量为 60×10^3 片段, 该片段不可以被 α -chymotrypsin 激活, 但能够通过酒精激活。将来有必要在体内验证这种激活方式是否存在。

此外, 在埃及伊蚊中已经鉴定出两个和黑化相关的蛋白酶 IMP-1 和 IMP-2 (immune melanization protease), IMP-1 和 IMP-2 在第 162 位精氨酸或者赖氨酸的位置剪切多酚氧化酶, 产生相对分子质量约为 50×10^3 的活性酚氧化酶片段^[26]。在埃及伊蚊中, 通过纯化方法得到一个相对分子质量约为 60×10^3 的蛋白质, 可以被变性剂激活显示出酚氧化酶活性, 进一步通过 LC-MS/MS 的分析方法发现这个片段中包含 AaPPO1、AaPPO2 和 AaPPO3 的片段^[27]。

昆虫多酚氧化酶是一个非常特别的酶, 在体外能被有机溶剂, 如十二烷基硫酸钠、乙醇和甲醇等激活^[4], 具体的机制现在还不明确。

3 多酚氧化酶的功能

多酚氧化酶介导体液免疫, 同时也可以介导细胞免疫, 如吞噬和包囊等^[2]。当 DmPPO1 和 DmPPO2 被单敲除或者双敲除, 由于免疫力下降, 缺失多酚氧化酶的果蝇容易受微生物感染, 双敲除的果蝇寿命比野生型的要短很多^[28]。野生型大蜡螟对白僵菌的抵抗力比多酚氧化酶突变型强很多^[29]。在蚊媒体内, 多酚氧化酶级联反应与抗疟原虫感染密切相关, 也可以影响蚊虫抵御白僵菌侵袭的能力^[30-31]。在体外实验中, 烟草天蛾酚氧化酶和底物反应的活性组分可以对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌等革兰氏阳性菌, 大肠杆菌、假单胞菌等革兰氏阴性菌有很好的抑制作用, 虾的多酚氧化酶反应产物也具有同样的作用^[32-33]。当细菌进入昆虫体内, 在数分钟之内就可以导致黑化^[34], 依靠多酚氧化酶的免疫作用, 昆虫可以在发病前清除大部分病原体, 因此, 多酚氧化酶的免疫功能对昆虫的保护极其重要。

多酚氧化酶对于昆虫伤口愈合、表皮糙化等生理过程有重要作用^[35]。在果蝇中, 多酚氧化酶参与了结节的形成^[36]。果蝇伤口愈合最初软结节形成过程中, 多酚氧化酶并不是必需的, 但参与了之后的结节成熟过程, 并且通过交联其他组分使结节变硬, 并可以有效杀死结节处的细菌^[36]。果蝇的 hayan 蛋白酶-多酚氧化酶系统对于伤口应激反应起着重要作用, 有利于促进伤口愈合^[37]。2012 年, 研究发现家蚕后肠组织中存在多酚氧化酶, 当该酶被分泌到内容物中可以引起粪便黑化, 进一步抑制内容物中的细菌繁殖, 对调控菌群数量起关键作用^[16], 赋予了多酚氧化酶新的功能。

4 宿主和病原体对黑化的适应性

病原体入侵宿主引起多酚氧化酶激活, 可以在数分钟内完成黑化反应^[34], 这种黑化反应产生一些有毒的小分子物质^[31], 可以协助杀死大部分病原体。尽管如此, 即便在自然界中仍然有一些病原体可以成功地逃避黑化反应, 如寄生蜂 (蝇)、白 (绿) 僵菌、疟原虫、微粒子和一部分细菌等都可以忍受或适应轻微的黑化反应, 因此, 有些病原体对黑化反应存在适应性。

黑化反应产生的有毒物质可以加快对病原体的

清除,同时也可能对宿主有伤害^[3],但是种种现象表明宿主对黑化反应也存在适应性。最明显的例子莫过于食叶昆虫的后肠可以分泌多酚氧化酶,持续不断地诱导内容物在后肠中黑化,并形成黑色的粪便^[16],但是这种黑化反应并没有伤害后肠,包括个体,因此,食叶昆虫具有对黑化的适应机制。处于眠期的家蚕在体表感染白僵菌的时候会导致全身黑化,但在旧表皮被剥离后昆虫仍然可以正常生长发育^[18],显示宿主对黑化免疫反应具有一定的适应性。白僵菌在穿透昆虫皮肤后会在相应位置留下一个黑斑,表明在此过程中白僵菌激活了皮肤多酚氧化酶,带着这些黑斑,宿主也会存活很长时间,甚至有机会战胜白僵菌(未发表数据)。在烟草天蛾体内注射灭活的微球菌(*Micrococcus*)后,相当一部分个体血液会黑化,但是其后的取食、生长和发育不受影响(未发表数据)。在果蝇体内产生的肿瘤组织大都会诱导黑化^[38],Bc突变体的大部分血细胞黑化^[39],但是这些果蝇突变体的绝大多数仍然可以正常生长、发育。由此可见,昆虫宿主对黑化反应存在未知的适应机制。

5 多酚氧化酶研究存在的问题

昆虫多酚氧化酶的激活机制的研究虽然取得了很大的进展,但也表明昆虫多酚氧化酶激活的复杂性^[3,25]。目前关于昆虫血清多酚氧化酶的来源和释放还没有确切的答案。人们一直认为多酚氧化酶是血细胞在体内裂解后释放出去的^[4],但缺乏令人信服的直接证据,成为一个悬而未决的科学问题。疟原虫在穿过蚊媒中肠的时候,一部分会在肠壁里被黑化致死^[40],但中肠的多酚氧化酶来源仍然不清楚。有些实验证实昆虫的前后肠组织都可以产生并释放多酚氧化酶^[16]。多酚氧化酶的细胞免疫作用研究表明,多酚氧化酶参与的黑化反应有助于宿主对外源病原物的吞噬,但包囊和黑化反应过程中多酚氧化酶作用机制还不清楚。蚊子的基因组中有10个左右的多酚氧化酶基因,其他昆虫一般也有2~3个多酚氧化酶基因,人们推测昆虫会有数目如此之多的多酚氧化酶基因,有可能是因为在不同生命阶段中需要不同多酚氧化酶行使特异功能,是进化上的一种适应,这有待于进一步的研究。

另外一个问题仍然是多酚氧化酶的激活,如上所归纳,昆虫多酚氧化酶的激活在不同的昆虫中激活机制似乎有一些差异(图1)。但是,根据烟草天蛾的多酚氧化酶晶体结构来看^[12],占据激活区域的

苯丙氨酸(place holder)在激活时必须移除,东北大黑腮金龟多酚氧化酶的切割可以保证这个place holder从活性区域移除^[23-24],但是家蚕和烟草天蛾的多酚氧化酶在切割后对这个place holder的清除过程仍然需要进一步研究。此外,一些有机溶剂(如酒精)可以有效激活昆虫多酚氧化酶^[3-4,25],但是其具体机制仍然不是很清楚。因此,多酚氧化酶的激活机制比人们目前所认识的更复杂,该酶的激活和活性调控值得深入研究。

昆虫天然免疫的信号通路主要有Toll、Imd、JNK、p38以及多酚氧化酶激活通路^[1],多酚氧化酶是否与其他重要的信号通路有应答,目前只有有限的实验证据证实多酚氧化酶级联反应与Toll信号通路存在一定的互联^[41],与其他信号通路的关系还没有相关文献报道。

6 多酚氧化酶研究意义

多酚氧化酶研究已有一个多世纪,主要聚焦在如何剪切和激活方面^[3-4,19,22]。由于天然的多酚氧化酶纯化比较困难,限制了相关研究的普遍展开。最近,通过改善条件在体外重组表达并纯化昆虫多酚氧化酶^[42],为深入研究该蛋白奠定了基础,同时还系统地从事多酚氧化酶来源^[16-17]、结构^[43]、酶活^[44]、抑菌能力^[45]、激活^[25]和功能^[16]等方面进行了广泛研究,丰富了对多酚氧化酶的认识,为多酚氧化酶的深入研究积累了技术力量和经验。

多酚氧化酶是昆虫体内一种重要免疫蛋白,可同时介导体液和细胞免疫^[3-4]。当细菌进入昆虫体内后,在数分钟之内就可以导致黑化^[34],从而加速虫体清除病原物的进程。多酚氧化酶的活性消失或被有效抑制后,昆虫对病原物的抵抗力显著下降^[28],因此,多酚氧化酶是昆虫免疫中极其重要的一个蛋白质。微生物化学农药使用给人类生存环境带来了严重的污染,从而影响了人类的健康。属于不同病原物的生物农药的使用因为无污染、无残留而受到日益关注,但是生物农药的使用无一例外受到昆虫免疫的阻断,特别是多酚氧化酶快速介导的黑化反应使生物农药的使用效率显著降低。研究昆虫多酚氧化酶的功能及其免疫机制对人为控制昆虫的生存能力,提高昆虫生物防治成效,具有重要的理论意义和应用价值。

[参 考 文 献]

- [1] Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila*

- melanogaster*. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25: 697-743
- [2] Liu F, Xu Q, Zhang Q, et al. Hemocytes and hematopoiesis in the silkworm, *Bombyx mori*. *Invertebr Survival J*, 2013, 10: 102-9
- [3] Lu A, Zhang Q, Zhang J, et al. Insect prophenoloxidase: the view beyond immunity. *Front Physiol*, 2014, 5: 252
- [4] Brey PT, Hultmark D. Molecular mechanisms of immune responses in insects[M]. USA: Chapman and Hall, 1998: 135-72
- [5] Aguilera F, McDougall C, Degnan BM. Origin, evolution and classification of type-3 copper proteins: lineage-specific gene expansions and losses across the Metazoa. *BMC Evol Biol*, 2013, 13: 96
- [6] Cerenius L, Lee BL, Söderhäll K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol*, 2008, 29: 263-71
- [7] Kirkwood BJ. Albinism and its implications with vision. *Insight*, 2009, 34: 13-6
- [8] Oetting WS, King RA. Molecular basis of albinism: mutations and polymorphisms of pigmentation genes associated with albinism. *Hum Mutat*, 1999, 13: 99-115
- [9] Aquino-Bolaños EN, Mercado-Silva E. Effects of polyphenol oxidase and peroxidase activity, phenolics and lignin content on the browning of cut jicama. *Postharvest Biol Technol*, 2004, 33: 275-83
- [10] Mayer AM. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochemistry*, 2006, 67: 2318-31
- [11] Shang Y, Duan Z, Huang W, et al. Improving UV resistance and virulence of *Beauveria bassiana* by genetic engineering with an exogenous tyrosinase gene. *J Invertebr Pathol*, 2012, 109: 105-9
- [12] Li Y, Wang Y, Jiang H, et al. Crystal structure of *Manduca sexta* prophenoloxidase provides insights into the mechanism of type 3 copper enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 17002-6
- [13] Ferjoux G, Auge B, Boyer K, et al. A GATA/RUNX cis-regulatory module couples *Drosophila* blood cell commitment and differentiation into crystal cells. *Dev Biol*, 2007, 305: 726-34
- [14] Lavine MD, Strand MR. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Mol Biol*, 2002, 32: 1295-309
- [15] Nam HJ, Jang IH, Asano T, et al. Involvement of prophenoloxidase 3 in lamellocyte-mediated spontaneous melanization in *Drosophila*. *Mol Cells*, 2008, 26: 606-10
- [16] Shao Q, Yang B, Xu Q, et al. Hindgut innate immunity and regulation of fecal microbiota through melanization in insects. *J Biol Chem*, 2012, 287: 14270-79
- [17] Diao Y, Lu A, Yang B, et al. Existence of prophenoloxidase in wing discs: a source of plasma prophenoloxidase in the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS One*, 2012, 7: e41416
- [18] Zhang J, Lu A, Kong L, et al. Functional analysis of insect molting fluid proteins on the protection and regulation of ecdysis. *J Biol Chem*, 2014, 289: 35891-906
- [19] Jiang H, Vilcinskis A, Kanost MR. Immunity in lepidopteran insects. *Adv Exp Med Biol*, 2010, 708: 181-204
- [20] Yoshida H, Ashida M. Microbial activation of two serine enzymes and prophenoloxidase in the plasma fraction of hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem*, 1986, 16: 539-45
- [21] Yu XQ, Jiang H, Wang Y, et al. Nonproteolytic serine proteinase homologs are involved in prophenoloxidase activation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2003, 33: 197-208
- [22] Gorman MJ, Dittmer NT, Marshall JL, et al. Characterization of the multicopper oxidase gene family in *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2008, 38: 817-24
- [23] Lee SY, Kwon TH, Hyun JH, et al. *In vitro* activation of pro-phenol-oxidase by two kinds of pro-phenol-oxidase-activating factors isolated from hemolymph of coleopteran, *Holotrichia diomphalia* larvae. *Eur J Biochem*, 1998, 254: 50-57
- [24] Kim MS, Baek MJ, Lee MH, et al. A new easter-type serine protease cleaves a Masquerade-like protein during prophenoloxidase activation in *Holotrichia diomphalia* Larvae. *J Biol Chem*, 2002, 277: 39999-40004
- [25] Lu A, Li X, Hillyer JF, et al. Recombinant *Drosophila* prophenoloxidase 1 is sequentially cleaved by α -chymotrypsin during *in vitro* activation. *Biochimie*, 2014, 102: 154-65
- [26] Zou Z, Shin SW, Alvarez KS, et al. Distinct melanization pathways in the mosquito *Aedes aegypti*. *Immunity*, 2010, 32: 41-53
- [27] Li JS, Ruyl Kim S, Christensen BM, et al. Purification and primary structural characterization of prophenoloxidases from *Aedes aegypti* larvae. *Insect Biochem Mol Biol*, 2005, 35: 1269-83
- [28] Binggeli O, Neyen C, Poidevin M, et al. Prophenoloxidase activation is required for survival to microbial infections in *Drosophila*. *PLoS Pathog*, 2014, 10: e1004067
- [29] Dubovskiy IM, Whitten MM, Kryukov VY, et al. More than a colour change: insect melanism, disease resistance and fecundity. *Proc Biol Sci*, 2013, 280: 20130584
- [30] Yassine H, Kamareddine L, Osta MA. The mosquito melanization response is implicated in defense against the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *PLoS Pathog*, 2012, 8: e1003029
- [31] Ashida M, Kinoshita K, Brey PT. Studies on prophenoloxidase activation in the mosquito *Aedes aegypti* L. *Eur J Biochem*, 1990, 188: 507-15
- [32] Zhao PC, Li JJ, Wang Y, et al. Broad-spectrum antimicrobial activity of the reactive compounds generated *in vitro* by *Manduca sexta* phenoloxidase. *Insect Biochem Mol Biol*, 2007, 37: 952-59
- [33] Cerenius L, Babu R, Soderhall K, et al. *In vitro* effects on bacterial growth of phenoloxidase reaction products. *J Invertebr Pathol*, 2010, 103: 21-23
- [34] Hillyer JF, Schmidt SL, Christensen BM. The antibacterial innate immune response by the mosquito *Aedes aegypti* is mediated by hemocytes and independent of Gram type and pathogenicity. *Microbes Infect*, 2004, 6: 448-59

- [35] Cerenius L, Kawabata S, Lee BL, et al. Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. *Trends Biochem Sci*, 2010, 35: 575-83
- [36] Bidla G, Lindgren M, Theopold U, et al. Hemolymph coagulation and phenoloxidase in *Drosophila* larvae. *Dev Comp Immunol*, 2005, 29: 669-79
- [37] Nam HJ, Jang IH, You H, et al. Genetic evidence of a redox-dependent systemic wound response via Hyan protease-phenoloxidase system in *Drosophila*. *EMBO J*, 2012, 31: 1253-65
- [38] Gonzalez C. *Drosophila melanogaster*: a model and a tool to investigate malignancy and identify new therapeutics. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13: 172-83
- [39] Neyen C, Binggeli O, Roversi P, et al. The Black cells phenotype is caused by a point mutation in the *Drosophila* pro-phenoloxidase 1 gene that triggers melanization and hematopoietic defects. *Dev Comp Immunol*, 2014, 50, 166-74
- [40] Beerntsen BT, James AA, Christensen BM. Genetics of mosquito vector competence. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, 64: 115-37
- [41] Zou Z, Shin SW, Alvarez KS, et al. Mosquito RUNX4 in the immune regulation of PPO gene expression and its effect on avian malaria parasite infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 18454-59
- [42] Li X, Ma M, Liu F, et al. Properties of *Drosophila melanogaster* prophenoloxidases expressed in *Escherichia coli*. *Dev Comp Immunol*, 2012, 36: 648-56
- [43] Chen Y, Liu F, Yang B, et al. Specific amino acids affecting *Drosophila melanogaster* prophenoloxidase activity *in vitro*. *Dev Comp Immunol*, 2012, 38: 88-97
- [44] Liu F, Chen Y, Yang B, et al. *Drosophila melanogaster* prophenoloxidases respond inconsistently to Cu^{2+} and have different activity *in vitro*. *Dev Comp Immunol*, 2012, 36: 619-28
- [45] Lu A, Peng Q, Ling E. Formation of disulfide bonds in insect prophenoloxidase enhances immunity through improving enzyme activity and stability. *Dev Comp Immunol*, 2014, 44: 351-58