



昆虫酚氧化酶原激活酶研究*

陈晓宇 时 敏 陈学新**

(浙江大学昆虫科学研究所, 杭州 310058)

摘 要 昆虫酚氧化酶原激活酶 (Prophenoloxidase activating proteinase, PAP) 是酚氧化酶原激活过程中的一个关键酶, 是昆虫先天性体液免疫体系的重要组成部分。外界的免疫刺激能够诱导级联反应上游的蛋白对酚氧化酶原激活酶的前体进行剪切激活, 而激活后的酚氧化酶原激活酶能够将无活性的酚氧化酶原剪切激活为有活性的酚氧化酶并最终生成细胞毒素物质来消灭外源物。本文综述了昆虫酚氧化酶原激活酶的结构与特性及其在酚氧化酶原级联激活系统中的作用机制, 并探讨了寄生蜂对寄主昆虫酚氧化酶原激活酶的调控。

关键词 酚氧化酶原激活酶, 酚氧化酶原级联激活系统, 昆虫免疫, 寄生蜂

The prophenoloxidase activating proteinase in insects

CHEN Xiao-Yu SHI Min CHEN Xue-Xin**

(Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Prophenoloxidase activating proteinase (PAP) is a key proteinase in the process of activation of prophenoloxidase in several insect defense mechanisms. An immune challenge can induce proteins at the start of the prophenoloxidase activation cascade to activate the precursor of PAPs by proteolytic cleavage. The activated PAPs cause inactive prophenoloxidase to form active phenoloxidase (PO) and ultimately to produce toxic substances in order to kill foreign organisms, such as pathogens and parasites. This paper reviews the characteristics and structure of PAPs in insects, as well as their role in the prophenoloxidase-activating system, and discusses the regulation of PAPs in host insects by parasitoid wasps.

Key words prophenoloxidase activating proteinase, prophenoloxidase-activating system, parasitoid wasp, insect immunity

昆虫是动物界无脊椎动物中最大的类群, 也是所有生物中种类和数量最多的一个类群, 是世界上最繁盛的动物。虽然昆虫不具有复杂且有记忆性的获得性免疫系统, 但其先天免疫系统已经进化得非常完善而且十分有效 (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006)。昆虫的先天免疫包括细胞免疫和体液免疫。酚氧化酶原级联激活系统 (Prophenoloxidase activating system) 是昆虫最重要的体液免疫系统之一。研究表明, 有多种不同功能的丝氨酸蛋白酶 (Serine proteinases, SPs)

参与这个级联反应, 并且这个反应最终的目的为激活以无活性前体形式存在的酚氧化酶原 (Prophenoloxidase, PPO) 为有活性的酚氧化酶 (Prophenoloxidase, PO), 酚氧化酶催化醌类物质和黑色素的形成以此杀死病原物或寄生蜂 (Soderhall and Cerenius, 1998; Cerenius and Soderhall, 2004; Nappi and Christensen, 2005; Cerenius *et al.*, 2008)。在昆虫中, 酚氧化酶原级联激活反应究竟含有多少步蛋白酶水解反应还尚无定论, 但现已在许多昆虫内发现一类参与

* 资助项目 Supported projects :浙江省自然科学基金 (Z3100296); 浙江省杰出青年基金 (R3110049); 国家自然科学基金 (30971907); 国家自然科学基金创新群体项目 (31321063)

**通讯作者 Corresponding author, E-mail: xxchen@zju.edu.cn

收稿日期 Received: 2013-02-15, 接受日期 Accepted: 2013-06-15

大黑鳃金龟 *Holotrichia diomphalia* Bates 和通讯螯虾 *Pacifastacus leniusculus* (Dana) 的 PPAEs 相近 (Jiang *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2001)。烟草天蛾的 PAP-2 与 PAP-3 在氨基末端都含有两个 Clip domain (Jiang *et al.*, 2003a, 2003b), 其结构和家蚕 *Bombyx mori* L. 的 PPAE 相近 (Sato *et al.*, 1999)。

2 酚氧化酶原激活酶在酚氧化酶原级联激活系统中的作用机制

2.1 酚氧化酶原激活酶的激活及其功能

PAP 一般都是以无活性的前体形式存在, 只有将 PAP 的前体激活为有活性的 PAP, 才能使得其在级联反应中发挥作用。在对东北大黑鳃金龟的研究中发现 (图 2:A), 上游的模式识别蛋白或是蛋白酶能够将无活性的 PPAF-III 前体激活为有催化活性的 PPAF-III, 紧接着这个蛋白将会剪切 PPAF-II 的前体为有活性的 PPAF-II, 而 PPAF-II 是产生有活性的酚氧化酶的前提 (Piao *et al.*, 2005, 2007)。在对烟草天蛾酚氧化酶原激活系统的研究中发现存在两种途径 (图 2:B) 对 PAP 的前体进行剪切激活。一种是 PAP2/PAP3

途径: 在革兰氏阳性菌或是真菌存在的条件下, 以酶原形式存在的血淋巴蛋白酶 (Hemolymph proteinase, HP) HP14 能够自我激活 (Wang *et al.*, 2006; Wang and Jiang, 2010) 为有活性的 HP14, 有活性的 HP14 能够激活下游的 Clip domain 丝氨酸蛋白酶 HP21, HP21 作为一个激活剂能够激活 proPAP2 和 proPAP3 (Gorman *et al.*, 2007; Wang and Jiang, 2007); 另一种是 PAP1 途径: 在革兰氏阴性菌存在的情况下, 血浆中无活性的 proHP6 被激活为有活性的 HP6, 但是究竟是哪种血淋巴蛋白酶激活了 proHP6 尚不清楚, 而有活性的 HP6 能够激活 proPAP1 为 PAP1 (An *et al.*, 2009)。PAP1 能够直接激活 proSPH2 并且间接激活 proHP6, PAP1 与 HP6 能够形成一个积极的反馈回路, 在血淋巴中加入有活性的 PAP1 将刺激 HP6、HP8、SPH1、SPH2 的蛋白水解激活 (Wang and Jiang, 2008)。

2.2 酚氧化酶原激活酶激活酚氧化酶原的途径

不同 PAP 激活 PPO 所需要的条件是不同的, 如家蚕的 PAP 本身既可以激活 PPO 为有活性的 PO (Sato *et al.*, 1999), 而有些 PAP 则需要一些因子的辅助才能激活 PPO 为有活性的 PO。

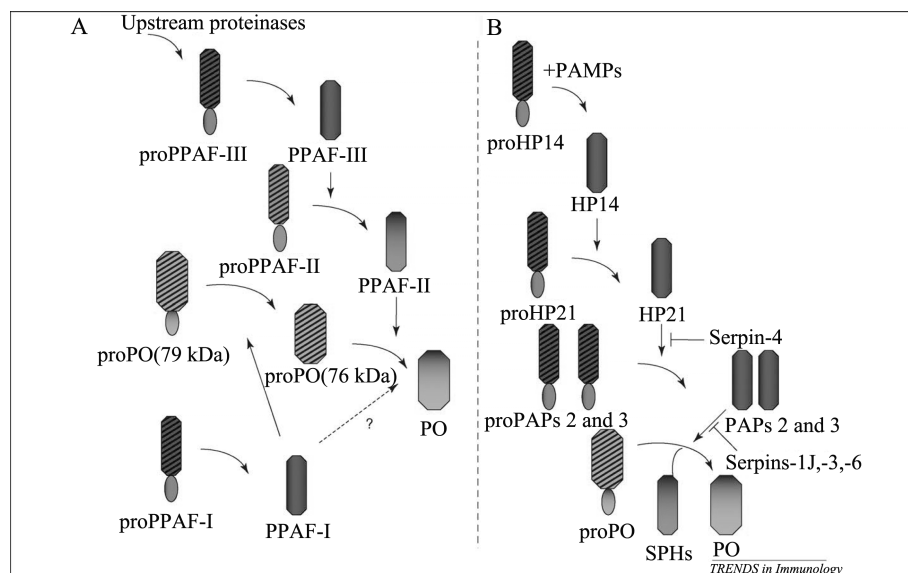


图 2 东北大黑鳃金龟 (A) 及烟草天蛾 (B) 酚氧化酶原激活系统示意图 (仿 Cerenius *et al.*, 2008; 1 kDa=1 ku)

Fig. 2 Two models of prophenoloxidase activating system in *Holotrichia diomphalia* (a) and *Manduca sexta* (b) (from Cerenius *et al.*, 2008; 1 kDa=1 ku)

烟草天蛾的 PAPs 单独剪切 PPO 时,产生的 PO 几乎没有任何活性,而烟草天蛾的 PAPs 在激活 PPO 产生有活性 PO 的过程中需要另外一个蛋白辅因子的参与 (Lu and Jiang, 2008)。当蛋白辅因子的片段和 PAPs 混合时,会产生大量有活性的 PO (Jiang *et al.*, 2003a, 2003b; Yu *et al.*, 2003)。目前的研究表明,这个辅因子为丝氨酸蛋白酶的同系物 (Serine proteinase homologs, SPHs), 包含一个氨基末端的 Clip domain 和一个类羧基末端蛋白酶结构域,但是这个羧基末端蛋白酶结构域没有蛋白水解活性,因为活性位点的丝氨酸被替换成了甘氨酸 (Kwon *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2003)。这些 SPHs 的存在显著提升了烟草天蛾 PAPs 激活 PPO 的水平 (Jiang *et al.*, 2003a, 2003b; Yu *et al.*, 2003)。如当 SPH 存在的情况下, PAP-1 激活 PPO 产生的 PO 活性提高了 20 多倍,当 PAP-3: SPHs 为 1: 1.4 时, PPO 将最大限度的被激活 (Wang and Jiang, 2004a; Gupta *et al.*, 2005)。烟草天蛾的 SPHs 能够与 PPO、PAP-1 或是一种 C 型凝集素的模式识别受体 IML-2 分别发生互作,这表明它可能作为接头将 PPO 激活复合体与病原物协同的模式分子 (Pathogen-associated molecular pattern, PAMP) 连接起来 (Jiang *et al.*, 2003a, 2003b; Yu *et al.*, 2003)。在东北大黑鳃金龟中,酚氧化酶原的激活分两步进行:第一步是 PPAF-I 蛋白水解剪切 79 ku 的 PPO 为 76 ku 的 PPO;第二步是 76 ku 的 PPO 与 PPAF-II (SPH) 结合,从而产生有活性的 PO (Piao *et al.*, 2005, 2007)。

2.3 酚氧化酶原激活酶的失活及降解

由一系列丝氨酸蛋白酶介导的酚氧化酶原级联激活反应是一个信号不断放大的过程,这有利于检测微量的病原物质。但是为了避免通路被过度激活,将免疫响应控制在一定的时间和空间范围内来防止造成自身伤害,无脊椎动物具有严密的调节机制来控制级联反应 (Jiang *et al.*, 2009)。在无脊椎动物的血浆中,存在大量的丝氨酸蛋白酶抑制因子 (Serine proteinase inhibitors, serpins) (Kanost, 1999), 它们可以通过构象的

改变从而抑制丝氨酸蛋白酶的活性,由于这种改变是不可逆的,所以可以精确调节参与酚氧化酶原激活过程中丝氨酸蛋白酶的活性 (Gettins, 2002)。在烟草天蛾中存在多种 serpins, 它们可以通过抑制 PAPs 从而抑制 PPO 的激活。sepin-1J 能够通过抑制 PAPs 从而抑制 PPO 的激活,其抑制机理可能与哺乳动物血液中凝血酶的抑制剂抗凝血酶 III 类似,同时它也能抑制 HP8 的活性,对 Toll 样受体的激活途径也有一定的调控作用 (Jiang and Kanost, 1997; Ragan *et al.*, 2010; An *et al.*, 2011)。serpin-3 含有一个与 PPO 上的蛋白水解激活位点相似的环状反应位点,它能有效的抑制重组表达后 PAPs 及血浆中 PAPs 的活性。当烟草天蛾被病原物感染后, PAPs 与 serpin-3 的表达量都将升高,这说明 serpin-3 将阻止系统性黑化,使 PPO 的激活限定在感染部位 (Zhu *et al.*, 2003)。serpin-6 能够与 PAP3 形成稳固的复合体而特异性的抑制 PAP3 (Wang and Jiang, 2004b; Zou and Jiang, 2005)。在对果蝇的研究中发现了一种丝氨酸蛋白酶的抑制剂 spn27A (serpin), 它的突变能够引起过度黑化的产生,它可能是通过直接抑制果蝇的 PAPs 而发挥作用 (De Gregorio *et al.*, 2002; Ligoxygakis *et al.*, 2002)。

3 寄生蜂寄生因子对酚氧化酶原激活系统的调控

寄生蜂是害虫的寄生性天敌,在害虫的生物防治上发挥重要作用。寄主昆虫拥有一套虽然原始却非常有效的免疫防御系统,所以当寄生蜂寄生寄主昆虫的时候,会面临寄主昆虫免疫系统的严峻考验。酚氧化酶原级联激活系统是昆虫先天免疫的重要组成部分,若寄生蜂想要成功寄生,必然要依靠其寄生因子来抑制寄主的免疫反应,这些寄生因子包括多 DNA 病毒 (Polydnavirus, PDV)、毒液 (Venom) 等,而 PAPs 往往成为其干扰的靶标,对 PAPs 结构生理生化特点的研究将为寄生蜂寄生因子对酚氧化酶原系统的调控提供依据。寄生蜂寄生因子抑制寄主的先天免疫

反应主要是利用寄生因子调控酚氧化酶激活级联反应中 PAPs 等基因的转录及表达水平, 或是通过寄生因子中含有的某些成分调控酚氧化酶原激活酶等相关蛋白的活性来达到目地。

3.1 寄生因子直接调控 PAPs 等基因的转录及表达水平

Barat-Houari 等 (2006) 发现镶鄂姬蜂 *Hyposoter didymator* (Thunberg) 所携带的 PDV (*Hyposoter didymator* ichnovirus, HdIV) 能够抑制寄主草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (Smith) PAP 的转录而直接抑制此激活级联反应, 从而抑制黑化。Doucet 等 (2008) 研究发现, 向寄主云杉芽卷蛾 *Choristoneura fumiferana* (Clemens) 中注入高浓度 (0.5 VERs) 的姬蜂 *Tranosema rostrale* (Brischke) 的 PDV 病毒 (*Tranosema rostrale* ichnovirus, TrIV) 后, PPO 的转录水平只在注射 2~3 d 后有短暂的下调作用, 这说明在这个寄生系统中, 姬蜂病毒能够抑制 PPO 的激活, 但是抑制作用持续的时间很短。Yin 等 (2001) 将 0.5 当量棉铃虫唇齿姬蜂 *Campoletis chloridae* Uchida 的毒液 (PDV) 注射到棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 幼虫后发现, 寄主昆虫血淋巴 PO 活性显著下降, 说明 PDV 可能会降低血淋巴中 PPO 的表达或是加速 PPO 的降解。Zhu 等 (2009) 通过双向电泳的方法研究蝶蛹金小蜂 *Pteromalus puparum* (L.) 寄生柑桔凤蝶 *Papilio xuthus* L. 前后蛋白表达的差异。结果显示, 被寄生后, 柑桔凤蝶血浆中 MasSPH 的表达量下调而 PPO 的表达量上调, 而 MasSPH 能够调节酚氧化酶原的激活反应 (Amparyup *et al.*, 2007), 因此, 毒液可以通过酚氧化酶原的激活反应来抑制血淋巴的黑化。Fang 等 (2010) 发现蝶蛹金小蜂的毒液可以通过下调 PAP 基因的转录水平而达到抑制菜粉蝶 *Pieris rapae* L. 蛹酚氧化酶原激活的效果, 在研究中共发现 4 条序列和其他鳞翅目昆虫 PAP 或是 PPAAE 基因序列有很高的相似性, 此外还有 3 条序列被命名为菜粉蝶血淋巴蛋白酶, 它们和烟草天蛾的 HPs 有较高的序列相似性, 还有 1 条序列和美国白蛾

Hyphantria cunea (Drury) 的 serpin 序列相似性很高, 这说明蝶蛹金小蜂的毒液可以通过调节这些基因来抑制 PPO 的激活。Kryukova 等 (2011) 发现麦蛾茧蜂 *Habrobracon hebetor* Say 的毒液能够抑制大蜡螟 *Galleria mellonella* (L.) 的 PO 活性。

3.2 寄生因子中的某些成分调控 PAPs 等相关蛋白的活性

寄生蜂抑制寄主的先天免疫反应除了通过寄生因子直接调控酚氧化酶激活级联反应中 PAP 等相关基因的转录及表达水平, 还可以通过寄生因子中含有的某些成分, 如 PDVs 的表达产物或毒液的活性组分来调控 PAPs 等相关蛋白的活性。Asgari 等 (2003) 发现菜粉蝶微红盘绒茧蜂 *Cotesia rubecula* Marshall 的毒液中存在一个分子量大约为 50 ku 的成分并将其命名为 Vn50, 它能够抑制酚氧化酶原的激活及黑色素的形成。PPO、PAP-1 和它的辅因子 (SPH-1 和 SPH-2) 能够形成一个蛋白复合体, 而 Vn50 与寄主的 SPH 有很高的序列相似性, 在复合体的形成过程中, Vn50 与寄主的 SPH 发生同源性竞争, 从而干扰了这个复合体的形成, 使得 PAPs 不能激活 PPO, 最终抑制寄主血淋巴的黑化 (Zhang *et al.*, 2004a, 2004b)。Colinet 等 (2009) 在果蝇寄生蜂——波氏匙胸瘿蜂 *Leptopilina boulardi* Barbotin Carton et Keiner-Pillault 的毒液中分离出一种 serpin, 命名为 LbSPNy。波氏匙胸瘿蜂的毒液或是此 serpin 的重组蛋白都能抑制寄主果蝇幼虫血淋巴中的酚氧化酶原级联激活反应。毁侧沟茧蜂 *Microplitis demolitor* (Fabricius) 的 PDV 病毒 (*Microplitis demolitor* bracovirus, MdBV) 编码蛋白 Egfl.0 和 Egfl.5 能够通过干扰 PAPs 来抑制寄主 PPO 的激活 (Beck and Strand, 2007; Lu *et al.*, 2008, 2010)。

4 展望

昆虫是生物中种类和数量最多的一个类群, 它们与人类的生产生活息息相关。利用寄生蜂对害虫进行生物防治已经取得一些成就, 但是随着

寄生蜂与寄主的协同进化,寄生蜂与寄主产生了有效的相互防御策略,揭示其中的奥秘对我们更好地利用寄生蜂对害虫进行生物防治意义重大。酚氧化酶原激活酶是昆虫体液免疫中酚氧化酶原级联激活过程中的一个关键酶。外界的免疫刺激能够诱导级联反应上游的蛋白对 PAP 的前体进行剪切激活,而激活后的 PAP 能够将无活性的 PPO 剪切激活为有活性的 PO,进而抑制外源物对自身造成伤害。由于其在先天免疫中的重要作用,昆虫酚氧化酶原激活酶已经成为科学家们研究的重点,但目前国内外对昆虫酚氧化酶原激活酶的研究主要以烟草天蛾、家蚕、棉铃虫及斜纹夜蛾等较大型昆虫为对象,而对其他小型昆虫特别是重要农业害虫酚氧化酶原激活酶有待进一步研究,为研究昆虫血淋巴黑化反应的作用机制奠定基础。

参考文献 (References)

- Amparyup P, Jitvaropas R, Pulsook N, Tassanakajon A, 2007. Molecular cloning, characterization and expression of a masquerade-like serine proteinase homologue from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.*, 22(5): 535–546.
- An C, Ishibashi J, Ragan EJ, Jiang H, Kanost MR, 2009. Functions of *Manduca sexta* hemolymph proteinases HP6 and HP8 in two innate immune pathways. *J. Biol. Chem.*, 284(29): 19716–19726.
- An C, Ragan EJ, Kanost MR, 2011. Serpin-1 splicing isoform J inhibits the proSpatzle-activating proteinase HP8 to regulate expression of antimicrobial hemolymph proteins in *Manduca sexta*. *Dev. Comp. Immunol.*, 35(1): 135–141.
- Arora N, Hoque ME, Rajagopal R, Sachdev B, Bhatnagar RK, 2009. Expression, purification, and characterization of prophenoloxidase-activating serine protease from *Spodoptera litura*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 72(2): 61–73.
- Asgari S, Zhang GM, Zareie R, Schmidt O, 2003. A serine proteinase homolog venom protein from an endoparasitoid wasp inhibits melanization of the host hemolymph. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33(10): 1017–1024.
- Bao Y, Yamano Y, Morishima I, 2007. Beta-1, 3-glucan inducible expression of prophenoloxidase-activating proteinase from eri-silkworm, *Samia cynthia ricini*. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.*, 147(1): 45–48.
- Barat-Houari M, Hilliou F, Jousset FX, Sofer L, Deleury E, Rocher J, Ravallec M, Galibert L, Delobel P, Feyereisen R, Fournier P, Volkoff AN, 2006. Gene expression profiling of *Spodoptera frugiperda* hemocytes and fat body using cDNA microarray reveals polydnavirus-associated variations in lepidopteran host genes transcript levels. *BMC Genomics*, 7: 160.
- Beck MH, Strand MR, 2007. A novel polydnavirus protein inhibits the insect prophenoloxidase activation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104(49): 19267–19272.
- Cerenius L, Lee BL, Soderhall K, 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.*, 29(6): 263–271.
- Cerenius L, Soderhall K, 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.*, 198(1): 116–126.
- Chosa N, Fukumitsu T, Fujimoto K, Ohnishi E, 1997. Activation of prophenoloxidase A (1) by an activating enzyme in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27(1): 61–68.
- Colinet D, Dubuffet A, Cazes D, Moreau S, Drezen JM, Poirie M, 2009. A serpin from the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* targets the *Drosophila* phenoloxidase cascade. *Dev. Comp. Immunol.*, 33(5): 681–689.
- De Gregorio E, Han SJ, Lee WJ, Baek MJ, Osaki T, Kawabata S, Lee BL, Iwanaga S, Lemaitre B, Brey PT, 2002. An immune-responsive Serpin regulates the melanization cascade in *Drosophila*. *Dev. Cell*, 3(4): 581–592.
- Doucet D, Beliveau C, Dowling A, Simard J, Feng Q, Krell PJ, Cusson M, 2008. Prophenoloxidases 1 and 2 from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*: molecular cloning and assessment of transcriptional regulation by a polydnavirus. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 67(4): 188–201.
- Fang Q, Wang L, Zhu J, Li Y, Song Q, Stanley DW, Akhtar ZR, Ye G, 2010. Expression of immune-response genes in lepidopteran host is suppressed by venom from an endoparasitoid, *Pteromalus puparum*. *BMC Genomics*, 11: 484.
- Feng CJ, Guo XL, Zhai HF, 2010. Cloning and sequence analysis of a cDNA fragment of prophenoloxidase activating proteinase from larvae of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* Guenee (Lepidoptera : Pyralidae). *Acta Entomologica Sinica*, 53(12): 1404–1409. [冯从经, 郭晓丽, 翟会峰, 2010. 亚洲玉米螟幼虫体内酚氧化酶原激活蛋白酶 cDNA 片段的克隆与序列分析. 昆虫学报, 53(12): 1404–1409.]
- Gettins PG, 2002. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem. Rev.*, 102(12): 4751–4804.
- Gorman MJ, Wang Y, Jiang HB, Kanost MR, 2007. *Manduca sexta*

- hemolymph proteinase 21 activates prophenoloxidase-activating proteinase 3 in an insect innate immune response proteinase cascade. *J. Biol. Chem.*, 282(16): 11742–11749.
- Gupta S, Wang Y, Jiang H, 2005. *Manduca sexta* prophenoloxidase (proPO) activation requires proPO-activating proteinase (PAP) and serine proteinase homologs (SPHs) simultaneously. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(3): 241–248.
- Huang R, Lu Z, Dai H, Velde DV, Prakash O, Jiang H, 2007. The solution structure of clip domains from *Manduca sexta* prophenoloxidase activating proteinase-2. *Biochemistry*, 46(41): 11431–11439.
- Jiang H, Kanost MR, 1997. Characterization and functional analysis of 12 naturally occurring reactive site variants of serpin-1 from *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.*, 272(2): 1082–1087.
- Jiang H, Kanost MR, 2000. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30(2): 95–105.
- Jiang H, Vilcinskas A, Kanost MR, 2011. Immunity in lepidopteran insects. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 708: 181–204.
- Jiang H, Wang Y, Kanost MR, 1998. Pro-phenol oxidase activating proteinase from an insect, *Manduca sexta*: a bacteria-inducible protein similar to *Drosophila* easter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95(21): 12220–12225.
- Jiang H, Wang Y, Yu XQ, Kanost MR, 2003a. Prophenoloxidase-activating proteinase-2 from hemolymph of *Manduca sexta*: a bacteria-inducible serine proteinase containing two clip domains. *J. Biol. Chem.*, 278(6): 3552–3561.
- Jiang H, Wang Y, Yu XQ, Zhu Y, Kanost M, 2003b. Prophenoloxidase-activating proteinase-3 (PAP-3) from *Manduca sexta* hemolymph: a clip-domain serine proteinase regulated by serpin-1J and serine proteinase homologs. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33(10): 1049–1060.
- Jiang R, Kim EH, Gong JH, Kwon HM, Kim CH, Ryu KH, Park JW, Kurokawa K, Zhang J, Gubb D, Lee BL, 2009. Three pairs of protease-serpin complexes cooperatively regulate the insect innate immune responses. *J. Biol. Chem.*, 284(51): 35652–35658.
- Jiravanichpaisal P, Lee BL, Soderhall K, 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, 211(4): 213–236.
- Kanost MR, 1999. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Dev. Comp. Immunol.*, 23(4/5): 291–301.
- Kanost MR, Jiang H, Yu XQ, 2004. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunol. Rev.*, 198(1): 97–105.
- Kryukova NA, Dubovskiy IM, Chertkova EA, Vorontsova YL, Slepneva IA, Glupov VV, 2011. The effect of *Habrobracon hebetor* venom on the activity of the prophenoloxidase system, the generation of reactive oxygen species and encapsulation in the haemolymph of *Galleria mellonella* larvae. *J. Insect Physiol.*, 57(6): 796–800.
- Kwon TH, Kim MS, Choi HW, Joo CH, Cho MY, Lee BL, 2000. A masquerade-like serine proteinase homologue is necessary for phenoloxidase activity in the coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia* larvae. *Eur. J. Biochem.*, 267(20): 6188–6196.
- Leclerc V, Pelte N, El Chamy L, Martinelli C, Ligoxygakis P, Hoffmann JA, Reichhart JM, 2006. Prophenoloxidase activation is not required for survival to microbial infections in *Drosophila*. *EMBO Rep.*, 7(2): 231–235.
- Lee SY, Cho MY, Hyun JH, Lee KM, Homma KI, Natori S, Kawabata SI, Iwanaga S, Lee BL, 1998. Molecular cloning of cDNA for pro-phenol-oxidase-activating factor I, a serine protease is induced by lipopolysaccharide or 1, 3-beta-glucan in coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia* larvae. *Eur. J. Biochem.*, 257(3): 615–621.
- Ligoxygakis P, Pelte N, Ji C, Leclerc V, Duvic B, Belvin M, Jiang H, Hoffmann JA, Reichhart JM, 2002. A serpin mutant links Toll activation to melanization in the host defence of *Drosophila*. *Embo J.*, 21(23): 6330–6337.
- Lu Z, Beck MH, Strand MR, 2010. Egfl.5 is a second phenoloxidase cascade inhibitor encoded by *Microplitis demolitor* bracovirus. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40(7): 497–505.
- Lu Z, Beck MH, Wang Y, Jiang H, Strand MR, 2008. The viral protein Egfl.0 is a dual activity inhibitor of prophenoloxidase-activating proteinases 1 and 3 from *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.*, 283(31): 21325–21333.
- Lu ZQ, Jiang HB, 2008. Expression of *Manduca sexta* serine proteinase homolog precursors in insect cells and their proteolytic activation. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(1): 89–98.
- Nappi AJ, Christensen BM, 2005. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(5): 443–459.
- Piao S, Kim S, Kim JH, Park JW, Lee BL, Ha NC, 2007. Crystal structure of the serine protease domain of prophenoloxidase activating factor-I. *J. Biol. Chem.*, 282(14): 10783–10791.
- Piao S, Song YL, Kim JH, Park SY, Park JW, Lee BL, Oh BH, Ha NC, 2005. Crystal structure of a clip-domain serine protease and functional roles of the clip domains. *Embo. J.*, 24(24): 5191–5200.

- 4404–4414.
- Ragan EJ, An C, Yang CT, Kanost MR, 2010. Analysis of mutually exclusive alternatively spliced Serpin-1 isoforms and identification of Serpin-1 proteinase complexes in *Manduca sexta* Hemolymph. *J. Biol. Chem.*, 285(38): 29642–29650.
- Satoh D, Horii A, Ochiai M, Ashida M, 1999. Prophenoloxidase-activating enzyme of the silkworm, *Bombyx mori*-purification, characterization, and cDNA cloning A-4372-2012. *J. Biol. Chem.*, 274(11): 7441–7453.
- Soderhall K, Cerenius L, 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 10(1): 23–28.
- Wang RG, Lee SY, Cerenius L, Soderhall K, 2001. Properties of the prophenoloxidase activating enzyme of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *Eur. J. Biochem.*, 268(4): 895–902.
- Wang Y, Jiang H, 2004a. Prophenoloxidase (proPO) activation in *Manduca sexta*: an analysis of molecular interactions among proPO, proPO-activating proteinase-3, and a cofactor. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34(8): 731–742.
- Wang Y, Jiang H, 2004b. Purification and characterization of *Manduca sexta* serpin-6: a serine proteinase inhibitor that selectively inhibits prophenoloxidase-activating proteinase-3. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34(4): 387–395.
- Wang Y, Jiang H, 2007. Reconstitution of a branch of the *Manduca sexta* prophenoloxidase activation cascade in vitro: snake-like hemolymph proteinase 21 (HP21) cleaved by HP14 activates prophenoloxidase-activating proteinase-2 precursor. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37(10): 1015–1025.
- Wang Y, Jiang H, 2008. A positive feedback mechanism in the *Manduca sexta* prophenoloxidase activation system. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(8): 763–769.
- Wang Y, Jiang H, 2010. Binding properties of the regulatory domains in *Manduca sexta* hemolymph proteinase-14, an initiation enzyme of the prophenoloxidase activation system. *Dev. Comp. Immunol.*, 34(3): 316–322.
- Wang Y, Zou Z, Jiang H, 2006. An expansion of the dual clip-domain serine proteinase family in *Manduca sexta*: gene organization, expression, and evolution of prophenoloxidase-activating proteinase-2, hemolymph proteinase 12, and other related proteinases. *Genomics*, 87(3): 399–409.
- Xu WY, Huang FS, Hao HX, Duan JH, Qiu ZW, 2006. Two serine proteases from *Anopheles dirus* haemocytes exhibit changes in transcript abundance after infection of an incompatible rodent malaria parasite, *Plasmodium yoelii*. *Vet. Parasitol.*, 139(1/3): 93–101.
- Xu WY, Huang FS, Xia LS, Duan JH, 2004. Cloning and expression of serine proteases from *Anopheles dirus* haemolymph. *Chinese Journal of Zoonoses*, 20(2): 92–95. [徐文岳, 黄复生, 夏莉莎, 段建华, 2004. 大劣按蚊丝氨酸蛋白酶 cDNA 克隆和表达. 中国人兽共患病杂志, 20(2): 92–95.]
- Yin LH, Wang CZ, Qin JD, 2001. Effect of the endoparasitoid *Campoletis chloridae* on phenoloxidase activity in *Helicoverpa armigera* hemolymph. *Chin. Sci. Bull.*, 46(21): 1797–1800.
- Yu XQ, Jiang H, Wang Y, Kanost MR, 2003. Nonproteolytic serine proteinase homologs are involved in prophenoloxidase activation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33(2): 197–208.
- Zhang G, Lu ZQ, Jiang H, Asgari S, 2004a. Negative regulation of prophenoloxidase (proPO) activation by a clip-domain serine proteinase homolog (SPH) from endoparasitoid venom. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34(5): 477–483.
- Zhang G, Schmidt O, Asgari S, 2004b. A novel venom peptide from an endoparasitoid wasp is required for expression of polydnavirus genes in host hemocytes. *J. Biol. Chem.*, 279(40): 41580–41585.
- Zhu JY, Ye GY, Fang Q, Hu C, 2009. Proteome changes in the plasma of *Papilio xuthus* (Lepidoptera: Papilionidae): effect of parasitization by the endoparasitic wasp *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Journal of Zhejiang University-Science B*, 10(6): 445–453.
- Zhu Y, Wang Y, Gorman MJ, Jiang H, Kanost MR, 2003. *Manduca sexta* serpin-3 regulates prophenoloxidase activation in response to infection by inhibiting prophenoloxidase-activating proteinases. *J. Biol. Chem.*, 278(47): 46556–46564.
- Zou Z, Jiang H, 2005. Gene structure and expression profile of *Manduca sexta* prophenoloxidase-activating proteinase-3 (PAP-3), an immune protein containing two clip domains. *Insect Mol. Biol.*, 14(4): 433–442.