

Progress of Research on Spatzle and Toll Signaling Pathway in Insects

Ji Liu¹, Jinmei Wu^{1,2,*}

¹College of Biotechnology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang, China

²The Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang, China

Email address:

1141756029@qq.com (Ji Liu), jwuus@hotmail.com (Jinmei Wu)

To cite this article:

Ji Liu, Jinmei Wu. Progress of Research on Spatzle and Toll Signaling Pathway. *American Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 3, No. 5, 2015, pp. 134-141. doi: 10.11648/j.bio.20150305.28

Abstract: Insects are the most diverse group of animals on Earth. Contrary to the vertebrates, insects have no acquired immunity, and to resist the invasion of external microbes, they can only rely on their own innate immunity. Innate immunity is the first line of defense in organisms. When microbes invade, a group of germline-encoded pattern recognition receptors (PRR) can recognize and bind to conserved pathogen-associated molecular pattern (PAMP), and then the host activates multiple signaling pathways to induce the expression of antimicrobial peptides (AMP). Toll signaling pathway is the most actively studied signaling pathway. Toll and its ligand Spatzle play an important role in Toll pathway of the immune response. The structure and function of spatzle in *Drosophila*, *Manduca sexta*, *Bombyx mori* and other insects have been reviewed in this article. The results suggested that spatzle from different insects have conserved structure and similar activation mechanism and plays an important role in the initiation of Toll signaling pathway. This provides a theoretical basis for research on spatzle and Toll signaling pathway in other insects.

Keywords: Insects, Innate Immunity, Humoral Immunity, Spatzle, Toll Pathway

昆虫Spatzle及Toll信号通路研究进展

刘霁¹, 吴金美^{1,2,*}

¹生物技术学院, 江苏科技大学, 镇江, 中国

²蚕业研究所, 中国农业科学院, 镇江, 中国

邮箱

1141756029@qq.com (刘霁), jwuus@hotmail.com (吴金美)

摘要: 昆虫是地球上种类最多的动物群体。与脊椎动物不同, 昆虫没有获得性免疫, 只能依靠自身的天然免疫抵御外界微生物的入侵。天然免疫是机体的第一道防线。微生物入侵时, 一组种系编码的模式识别受体 (PRR) 可以识别并结合到保守的病原体相关分子模式 (PAMP) 上, 通过一系列的信号传导产生抗菌肽最终消灭微生物。Toll信号通路是目前研究最多的一条信号通路, Toll和其配体Spatzle在Toll通路免疫应答中发挥重要作用。本文对果蝇、烟草天蛾、家蚕和其他昆虫的spatzle结构和功能进行系统的阐述, 发现它们具有相似的结构和激活机制并在Toll信号通路起始发挥重要作用, 这为研究其他昆虫的spatzle和Toll通路提供了理论依据。

关键词: 昆虫, 先天性免疫, 体液免疫, Spatzle, Toll通路

1. 引言

天然免疫和获得性免疫系统是多细胞生物防御系统的两个主要组成部分。天然免疫广泛存在于多细胞有机生物体,与生俱来,无需抗原预先刺激就能快速发挥其效应功能。其主要成分包括颗粒细胞、巨噬细胞、天然杀伤细胞等天然免疫细胞,补体、抗菌肽、防卫素等天然免疫分子,以及皮肤、肠道等天然防卫屏障[1]。昆虫体内缺乏高等脊椎动物所具有的获得性免疫系统,只能依赖发达的天然免疫系统抵抗细菌、真菌、病毒等外源病原物的侵袭[2]。在昆虫中,天然免疫一方面是微生物入侵后激活血细胞并参与吞噬和包埋病原体[3],另一方面是脂肪体产生并分泌一系列的抗菌肽应答微生物的入侵。天然免疫是控制免疫应答的第一道防线,它也可以深刻地影响获得性免疫应答的建立[4]。在天然免疫反应中,微生物入侵时,一组种系编码的模式识别受体(PRR)可以识别并结合到保守的病原体相关分子模式(PAMP)上,如细菌和真菌,但不能结合宿主细胞本身[5]。天然免疫系统由体液免疫和细胞免疫组成。细胞免疫应答主要包括血细胞介导的反应,如结节形成、吞噬和黑化包埋;而体液免疫反应主要包括抗菌肽(AMP)的合成和酚氧化酶原系统的激活。为了应对微生物感染,宿主激活各种信号通路以诱导免疫效应分子(各种转录因子和抗菌肽)的表达,其中主要的信号通路有JAK/STAT、Toll和IMD通路。

2. Spatzle的研究进展

2.1. 果蝇的spatzle

果蝇Spatzle家族共有5个成员(Spz2-6),这五个都是编码含有神经营养因子样胱氨酸结构域的蛋白质。此外,大多数与原型spatzle基因共享一个有特性的内含子-外显子结构,一个67个核苷酸的内含子位于半胱氨酸结构域内。这表明这五个基因由同一个古基因复制产生,基因产物可能产生结合Toll受体的活性配体。只有Spz4在幼虫和成虫强烈表达,因此可能参与由Toll-5介导的辅助抗真菌响应。与此相反,Spz6在胚胎发育后期表现出一个复杂的空间和时间上的调节表达模式。因此,spatzle家族信号分子可能在发育和免疫功能的其他方面有重要的作用[6]。此外,spatzle在细胞凋亡缺陷果蝇中应答内源性危险信号中也发挥重要作用[7]。spatzle蛋白在果蝇中是神经生长因子样配体的前体,它规定了果蝇胚胎的背腹轴而且在成体果蝇应答真菌和细菌感染的起始发挥作用,和凝固蛋白原和人的神经生长因子序列同源,两个半胱氨酸残基基序的二硫键形成环形二硫桥。成熟Spatzle连接到其受体Toll导致细胞质Toll/白介素-1受体结构域的受体二聚化和自身磷酸化。已经有研究表明,NH₂-末端结构域是天然展开的,具有对Easter的调节效果,并保持结合到下面的活化裂解的胱氨酸结构域。C端NGF样结构域又叫胱氨酸结构域,每个单体有7个半胱氨酸,可能涉及通过二硫键的二聚化[8]。

在没有信号的情况下,spatzle的前结构域掩盖了spatzle的呈疏水性的区域,是不活跃的。表明前结构域序

列是无序的,作用是阻止细胞因子和它的受体Toll相互作用。该蛋白水解导致的构象改变暴露了结合Toll受体关键区域。在Toll的前域有一个呈现出两性螺旋的保守序列可能结合到spatzle的疏水区域。这一机制的激活与蜚(4亿年来变化不大的无脊椎动物)的凝血因子coagulogen有着惊人的相似[9]。有活性的spatzle是激活Toll信号通路诱导产生抗菌肽所必需的。在果蝇中,spatzle的激活有两种途径。胚胎发育早期,Easter(一种丝氨酸蛋白酶)将前Spatzle裂解成活性的Spatzle[10];原肠胚缺陷基因snake和easter,编码丝氨酸蛋白酶,在胚胎的背腹模式中是激活spatzle必须的[11]。此外,磷酸化的管状蛋白Pipe也可以独立地激活easter[12](图1)。鞘脂样蛋白Seele活性对toll的spatzle介导激活是可有可无的,但对原肠胚缺陷基因,snake,easter在背腹分化中发挥作用是必须的。Seele的功能对easter从发育中的胚胎分泌到卵周隙和easter的激活是必需的。Seele蛋白驻留在胚盘的内质网,这表明Seele在easter分泌到围卵腔中起转移作用,是其加工和功能的前提[13]。

真菌和革兰氏阳性菌的感染也可以激活spatzle。真菌感染时,GNBP家族的GNBP-3识别到真菌细胞壁上的 β -1,3-葡聚糖,革兰氏阳性菌入侵时,PGRP-SA,PGRP-SD,GNBP-1作为识别受体来识别革兰氏阳性菌细胞壁中的赖氨酸型肽聚糖[14],然后激活模块化丝氨酸蛋白酶(ModSP),接着激活革兰氏阳性菌特异性丝氨酸蛋白酶(Grass),此外,另外三种丝氨酸蛋白酶sphinx1/2,spirit和spheroid也是激活spatzle必须的[15-17]。真菌分泌的真菌毒性因子PR1和革兰氏阳性菌毒性因子可以直接激活PSH[15][18]。接着激活Spatzle的激活酶(SPE)从而裂解前Spatzle蛋白形成活性的spatzle(如图1)。果蝇丝氨酸蛋白酶抑制剂Necrotic特异性抑制细胞外丝氨酸蛋白酶级联激活Toll配体,spatzle。Necrotic带有多聚谷氨酰胺延伸氨基末端至核心丝氨酸蛋白酶抑制剂的结构。激活Toll途径上游的任一分支后诱导丝氨酸蛋白酶抑制剂的N-末端裂解。表明,Necrotic的氨基末端延伸的裂解可能在初始免疫应答中调节spatzle的激活[19]。遗传和生化分析表明,一种新颖的UDP-半乳糖转运体Senju的宿主糖基化控制调节spatzle转化为活性形式[20]。

2.2. 烟草天蛾的spatzle

烟草天蛾的Spatzle-1由于选择性剪接形成两个不同cDNA,proSpatzle-1B的前结构域插入10个氨基酸残基,而proSpatzle-1A中则不存在。proSpatzle-1A cDNA编码一个32.7 kDa的多肽,与果蝇和家蚕Spatzle-1分别有23%和44%的同性的。重组proSpatzle-1A是一个二硫键连接的同型二聚体[22]。

烟草天蛾proSpatzle-1A的裂解激活需要丝氨酸蛋白酶的作用,已经在烟草天蛾的血淋巴中确定了超过20个的丝氨酸蛋白酶,但只有少数的功能已经知道。烟草天蛾血淋巴蛋白酶6和8(HP6和HP8)各由一个氨基末端结构域和羧基末端蛋白酶域组成。HP6是果蝇PSH的同源物,而HP8与果蝇和黄粉虫的spatzle激活酶高度相似,这些都是激活Toll途径的。proHP6和proHP8在脂肪体和血细胞中组成

型表达并分泌到血浆中发挥作用, 被蛋白水解切割激活应答微生物感染。proHP6接触革兰氏阴性或革兰氏阳性菌或 β -1, 3-葡聚糖在血浆中变为活性形式然后激活proHP8, 这反过来又激活Spatzle-1, 释放Spatzle-C108, 羧基末端108个残基的半胱氨酸结构域的二聚体。注射Spatzle-C108 (不是proSpatzle-1A) 到幼虫中, 能刺激几个抗微生物肽和蛋白质, 包括Attacin-1, Cecropins -6,

moricin, 溶菌酶以及免疫球蛋白结构域蛋白hemolin的表达。这表明Spatzle-C108二聚体可能在烟草天蛾中应答各种微生物感染作为配体激活Toll途径。SPZ结合在Toll的N末端主要诱导2: 2络合物的形成, 细胞外相互作用的两条链一条位于邻近的N末端的螺旋结构域, 另外一条位于C末端的近膜序列。此外, Toll经历了配体诱导的构象变化, 变得更加紧密地弯曲[22][23]。

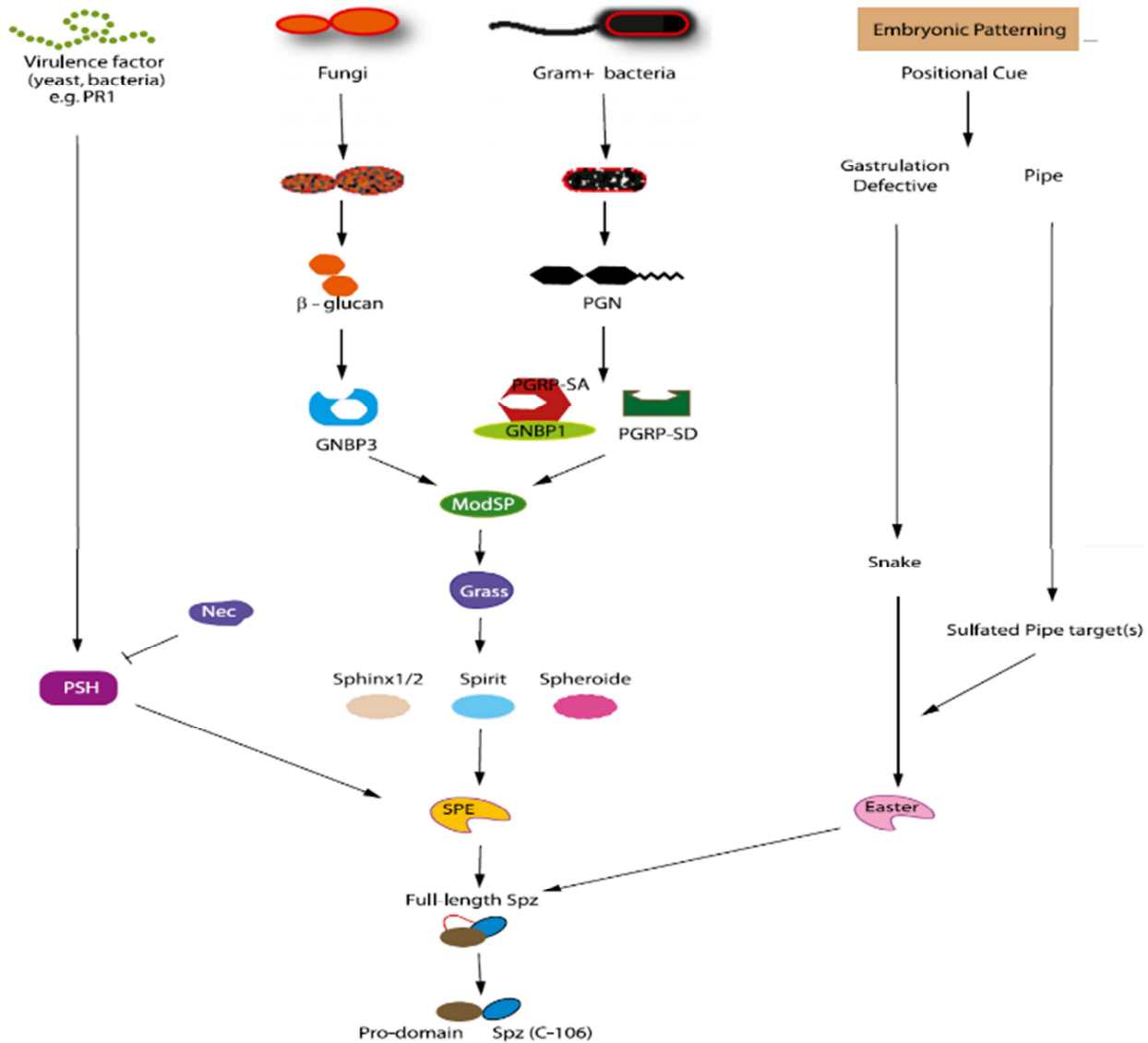


图1 果蝇spatzle的激活机制[21]。

2.3. 家蚕的spatzle

家蚕spatzle家族共有6个成员, 目前只有Bmspz1[24]和Bmspz4[26]有所研究。Bmspz1基因在家蚕中作为Toll1的配体激活Toll1信号通路, 超量表达Bmspz1可以诱导抗菌肽的表达量上调, 表明家蚕spatzle1也是作为Toll1受体的配体参与免疫应答调节抗菌肽的表达[24]。此外, Bmspz1的全长cDNA不能引起抗菌肽的表达, 而截短的Bmspz1能引起抗菌肽的表达水平大大提高, 表明家蚕的前spatzle1不具有活性, 只有裂解活化的spatzle1才能引起免疫应答[25]。Bmspz4基因的表达量能够由细菌和真菌的感染诱导

上调[26]。家蚕中的spatzle研究尚不完善, 其他spatzle在免疫上功能还有待进一步研究。

2.4. 其他昆虫的spatzle

中国卤虫的spatzle4 cDNA全长已经被克隆出, 实时荧光定量PCR和免疫组化检测显示在卤虫胚胎发育的各个阶段spatzle的表达量不同, 最高表达水平在胚胎发育的7-10天。革兰氏阳性菌感染后spatzle的转录水平逐渐增加。免疫组化检测表明, spatzle主要表达于头胸部和胚胎发育过程中消化道表面。它可能在发育早期阶段的背腹

分化以及成虫阶段感染的免疫应答中发挥重要作用。卤虫spatzle的激活机制和果蝇spatzle1相类似，两个前spatzle的半胱氨酸通过二硫键结合形成同二聚体，此二聚体通过蛋白水解裂解以形成活性配体。卤虫spatzlec末端的活性部位是由335个氨基酸组成的C-335，与而果蝇中的C-106和烟草天蛾中的C-108不同。这种差异可能是由于spatzle的mRNA的选择性剪接产生不同长度的多种亚型。卤虫的spatzle是这些亚型中的一种，这个长的C-末端片段可能不会影响其活性，因为它的功能区域含有的半胱氨酸结构域，这个功能结构域在其他物种中是保守的[27]。

埃及伊蚊三个果蝇细胞因子spatzle(Spz1A, 1B和1C)的同源物从基因组和cDNA序列数据库中被确定。Spz1A是在脂肪体中由真菌感染特异性诱导。这种转录上调由REL1介导的。Spz1C在脂肪体中组成型表达，而Spz1B主要在雌蚊卵巢组织中表达。RNA干扰敲除Spz1C导致埃及伊蚊Toll/REL1 (NF- κ B转录因子果蝇Dorsal的同源物) 通路

的缺陷，表明埃及伊蚊Spz1C的功能在脂肪体中介导真菌感染的免疫应答[28]。

在冈比亚按蚊中，六种果蝇spatzle (Spz1-6) 的同源物在基因组中被鉴定[29]。

目前已在多种生物中鉴定出spz基因，对不同物种的spz基因编码的蛋白序列进行亲缘分析，结果发现家蚕、意蜂、印度跳蚤、丽蝇蛹集金小蜂、豌豆蚜、埃及伊蚊、果蝇、冈比亚按蚊、赤拟谷盗等昆虫的spz亲缘关系较近，而与哺乳动物的spz亲缘关系相对较远(如图2)。对不同的昆虫的spz同源蛋白的氨基酸保守序列进行比对，发现赤拟谷盗、冈比亚按蚊、埃及伊蚊、果蝇、烟草天蛾、家蚕及豌豆长管蚜spz的氨基酸序列有7个相同的半胱氨酸同源结构域(如图3)。表明昆虫spz在进化上比较保守，可能具有相似的生物学功能，为以后研究新的spz提供理论依据和研究思路。

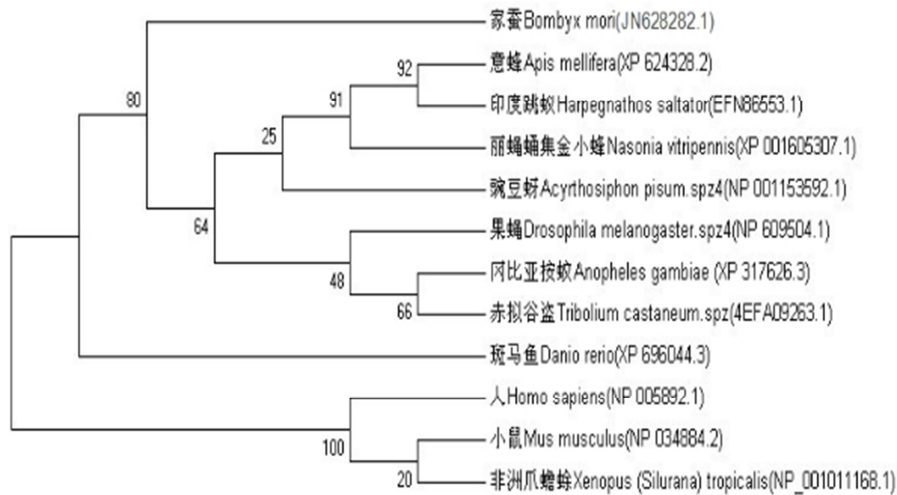


图2 不同物种spz同源蛋白序列的系统发生树。

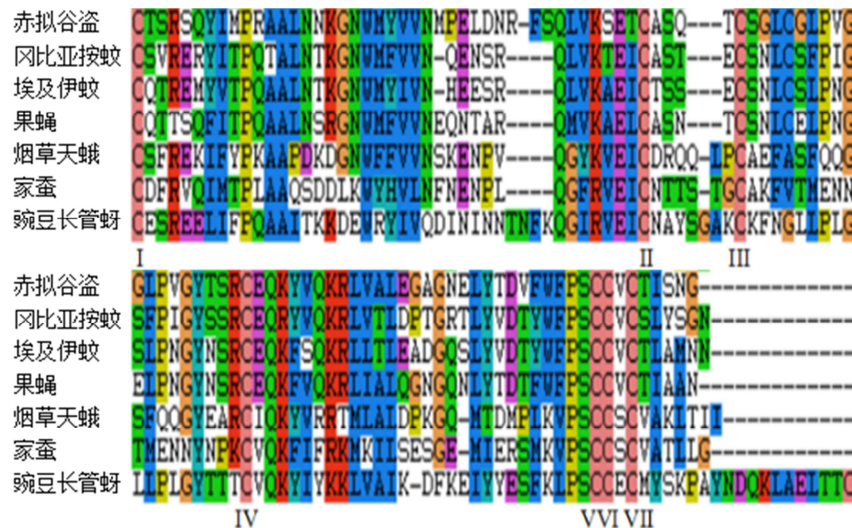


图3 不同昆虫spz同源蛋白的氨基酸保守序列比较。

Structure-guided sequence alignment of the cystine-knot domains of Spatzle homologues of insects. *Tribolium castaneum*, *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, *Drosophila melanogaster*, *Manduca sexta*, *Bombyx mori*, and *Acyrtosiphon pisum*. The core cystine-knot cystines are labelled I to VII.

3. Toll信号通路的研究进展

3.1. 果蝇的Toll信号通路

Toll信号传导通路是目前研究最多一条信号通路, 最初在果蝇胚胎发育早期被鉴定, Toll和Toll样受体(TLR)在许多种动物中已经被确定。昆虫的Toll信号传导途径与哺乳动物的TLRs信号传导途径经过长期的进化, 至今还保留着惊人的相似性, 主要表现在Toll受体和TLRs结构的相似以及相同的信号传递因子(Myd88、TRAF6、Cactus)[30]。然而, 哺乳动物的TLRs功能只作为模式识别受体, 在发育中没有发挥作用[31]。而果蝇的Toll通路参与发育[32]、免疫[33]和C-Jun N-末端激酶(JNK)介导的细胞死亡[34]三个过程。

第一个Toll受体在果蝇中发现, 它长期所知的功能是胚胎背腹轴分化。果蝇胚胎背腹极性需要spatzle-toll信号通路建立Dorsal蛋白的核梯度。这个梯度的形状在胚胎中的改变由雌性携带easter的显性等位基因产生。easter基因编码一种丝氨酸蛋白酶激活spatzle作为Toll的配体。easter的显性等位基因越多核梯度的斜率越平。在easter的显性等位基因胚胎提取物中, easter对应于自由催化结构域, 这是从未在野生型中观察到的。这些突变成显性等位基因的easter蛋白保留了蛋白酶活性, 能在胚胎和在培养的果蝇细胞中加工spatzle[35]。

此外, 果蝇Toll信号通路也参与控制革兰氏阳性细菌和真菌的感染, 并在抑制口腔病毒感染方面发挥重要作用[36]。Toll激发一个进化上保守的信号通路, 导致Rel家族转录因子DIF的激活和后续许多基因的表达, 包括编码抗真菌肽[37]。跨膜受体Toll的胞外域由结合配体的两个富亮氨酸重复结构域构成。在果蝇中, 强烈的遗传证据表明胚胎和成体中Toll的激活需要蛋白水解作用分泌的多肽spatzle(生长因子的半胱氨酸结家族)裂解形式的spatzle作为Toll的配体[38]。果蝇Toll通路是Spatzle被Spatzle加工酶(SPE)裂解后以释放出活性C-末端激活的, spatzle被加工成其活性的C端C-106域的一个过程, 涉及丝氨酸蛋白酶级联活化。spatzle的蛋白水解导致构象变化, 这暴露的C-106域是结合Toll至关重要的决定因素[39]。其然后结合至Toll受体激活信号通路调控AMP基因的表达(如图4)。在果蝇中, spatzle作为Toll的直接的细胞外配体从而激活Toll[40][41]。相关Toll样受体在脊椎动物也起免疫的作用, 而是直接由病原体相关分子, 例如细菌内毒素激活[42]。免疫反应的第一步是识别感染信号, 即模式识别受体(PRRs)识别病原相关分子模式(PAMPs)激活免疫信号通路。有活性的spatzle配体结合激活了跨膜受体Toll, 活化的二聚体SPZ结合到一个Toll胞外域包围第一个13个亮氨酸重复区域。SPZ对toll的非对称结合模式是与p75神经营养受体复合物中的神经生长因子(NGF)类似的[42][44]。该二聚体Toll复合物通过细胞内的TIR(Toll-interleukin 1 resistance)结构域

与衔接蛋白MyD88相互作用。MyD88招募Tube蛋白和细胞质中丝氨酸/苏氨酸激酶Pelle, 哺乳动物IL-1R相关激酶的同源物, 形成 MyD88-Tube-Pelle异源三聚体复合物通过死亡域介导相互作用。细胞内信号导致 Cactus (NF- κ B抑制剂I κ B家族成员)的磷酸化和降解, 释放Dorsal相关免疫因子(DIF)和Dorsal, DIF和Dorsal转移到细胞核内激活AMP基因的转录[45]。果蝇的Toll信号通路哺乳动物白介素-1(IL-1R)-NF- κ B信号通路是同源的信号通路, 来调节几种不同的生物反应。由于IL-1R-NF- κ B通路参与脊椎动物先天免疫, 且Toll通路在植物中的同源通路在植物抗病方面发挥重要作用, 该通路很有可能出现在植物和动物的分化之前来抵抗病原物的入侵[3]。

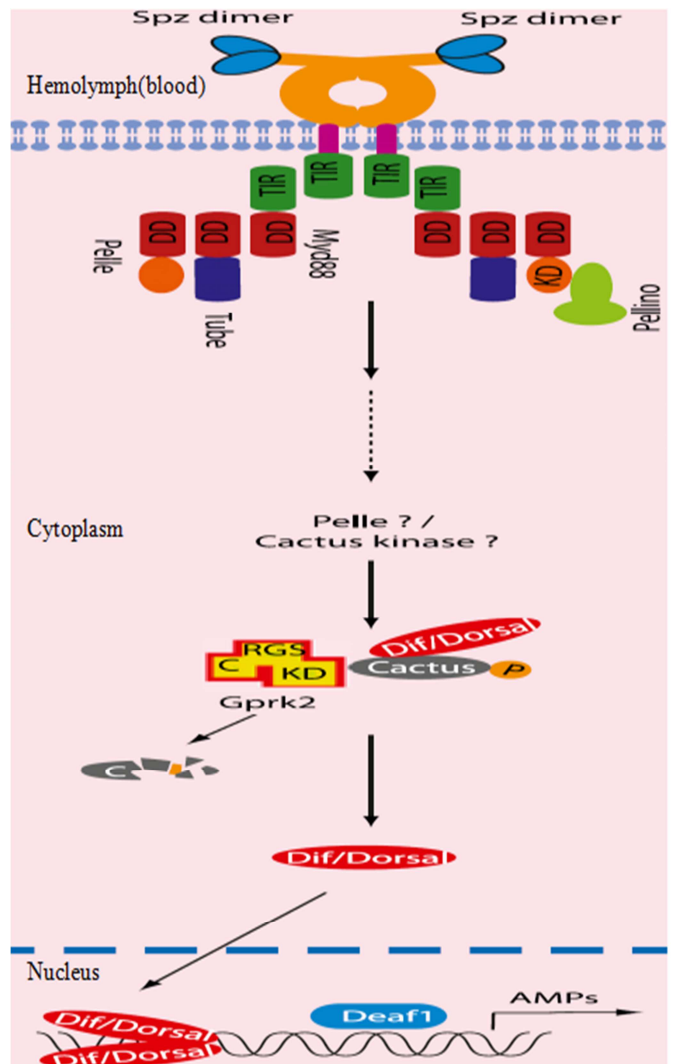


图4 果蝇Toll信号通路[21]。

新的研究发现果蝇Toll通路参与JNK介导的细胞死亡。Toll信号的缺失抑制了JNK信号诱导的细胞死亡的生理活化。Toll通路作为JNK依赖的细胞死亡的下游调节。另外, JNK信号的获得同样诱导Toll通路的激活, 表现为Drosomycin (DRS)的刺激转录、Dorsal从细胞质至细胞核易位的增加和spz家族配体的转录上调[34]。

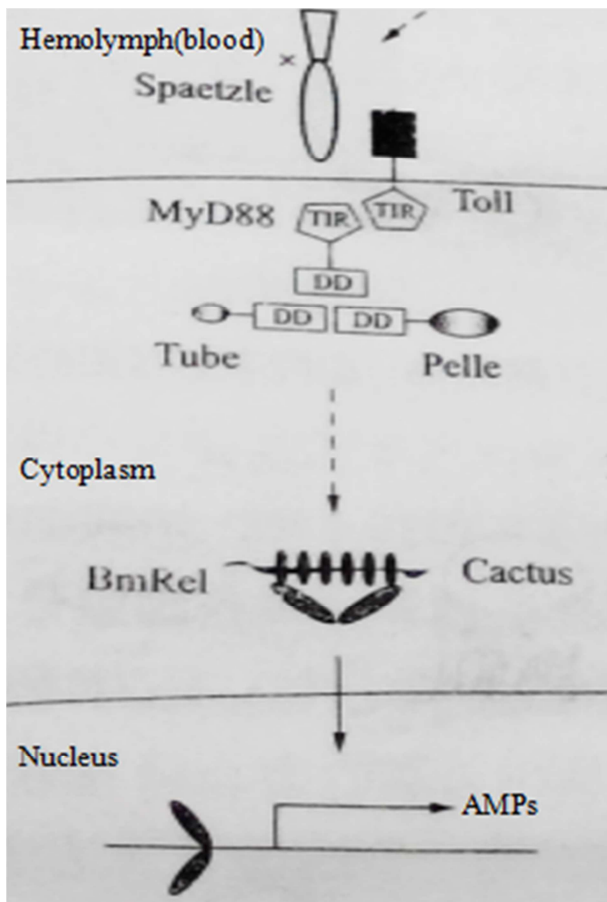


图5 家蚕Toll信号通路。

3.2. 烟草天蛾的Toll信号通路

研究表明, 烟草天蛾中也存在Toll信号通路。Toll信号通路激活途径的分子机制表明前Spatzle前结构域掩盖了非常重要的spatzle的疏水性区域和该蛋白水解导致暴露的构象变化表明是结合于Toll受体的关键。此外, 一个前结构域保守序列呈现出两亲性螺旋可能绑定在spatzle从而阻断与Toll受体的结合。Toll的组成型活性突变体的多聚体包含分子间二硫键, 这些二硫键是这些突变受体活性的关键, 这表明多聚化是组成型活性必不可少的。此外, 系统的突变分析表明, 一个保守的包含半胱氨酸的基序, 与用于分子间二硫键的半胱氨酸不同, 是作为Toll的一个自我抑制模块, 该半胱氨酸基序的删除或突变导致Toll的激活。单独的含有半胱氨酸的基序可能提供结构信息来调节该受体的多聚化及活性。这一基序位于跨膜区外, 并可以提供Toll的多聚化和激活的结构性障碍。总之, 多聚化可能是Toll受体激活的调节的必要步骤[46]。与果蝇的SPZ-Toll通路类似, 免疫共沉淀实验表明, 烟草天蛾Toll的胞外结构域能与烟草天蛾spatzle (MsSPZ)的活跃C端C108结构域(而不是全长MsSPZ)相互作用。这表明MsToll-MsSpz-C108复合物可激活Toll信号通路。体内测定表明, 通过纯化的重组MsSPZ-C108-MsToll, 使AMP基因, 包括 cecropin、Attacin, moricin和Ileobacin在烟草天蛾幼虫中的激活, 进一步确认了烟草天蛾中存在Toll-SPZ通路[44]。

3.3. 家蚕的Toll信号通路

家蚕含有与果蝇同源的Toll受体、Spatzle配体、模式识别受体PGRP、抗菌肽Cecropin和Attacin、以及NF- κ B类转录调控因子Rel和Relish等同源基因。家蚕的模式识别受体 β GRP3能特异性地识别革兰氏阳性细菌, 具有激活抗菌肽基因表达的生物学功能。对Toll信号通路相关基因的鉴定和功能研究, 发现家蚕抗菌肽基因表达调控分子机制比较保守。Spatzle1被激活后结合并激活Toll受体, 接着通过细胞内的TIR结构域与衔接蛋白MyD88相互作用, MyD88招募Tube蛋白和细胞质中丝氨酸/苏氨酸激酶Pelle形成 MyD88-Tube-Pelle异源三聚体导致 Cactus 的磷酸化和降解, 释放出Rel最终激活AMP基因的转录[26] (如图5)。

4. 结语

不同物种的spatzle具有相似的保守的半胱氨酸结构域, 在免疫应答中发挥相同的作用, 能够被微生物诱导表达并调控抗菌肽的表达。由此可见, Spatzle作为Toll受体的配体在免疫应答的起始发挥重要作用, 具有十分重要的研究意义。阐释spatzle在先天免疫应答中调控的分子机制对提高家蚕的抗病性以及增强生物杀虫剂的杀虫效率等方面有重要意义。相信Spatzle及Toll通路的深入研究将为保护益虫防治害虫、保护我们的生态环境做出贡献。

致谢

本文由中国国家自然科学基金项目(31272508)支持。

参考文献

- [1] 吕鸿声. 昆虫免疫学原理[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2008. 12:20.
- [2] 张明明, 初源, 赵章武, 安春菊. 昆虫天然免疫反应分子机制研究进展[J]. 昆虫学报, 2012, 55(10): 1221—1229.
- [3] Marcia P, Belvin, Kathryn V Anderson. A conserved signaling pathway: The Drosophila Toll-Dorsal Pathway[J]. Cell Dev Biol, 1996, 12:393 - 416.
- [4] Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways[J]. Immunol Rev, 2000, 173, 89-97.
- [5] Janeway CA Jr. Approaching the asymptote Evolution and revolution in immunology[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1989. 54: 1-13.
- [6] James S. Parker, Kenji Mizuguchi, and Nicholas J. Gay. A Family of Proteins Related to Spatzle, the Toll Receptor Ligand, Are Encoded in the Drosophila Genome [J]. PROTEINS: Structure, Function, and Genetics, 2001, 45: 71-80.

- [7] Ming M, Obata F, Kuranaga E, Miura M. Persephone/Spätzle pathogen sensors mediate the activation of Toll receptor signaling in response to endogenous danger signals in apoptosis-deficient *Drosophila* [J]. *J Biol Chem*. 2014. 289(11): 7558-68.
- [8] Hoffmann A, Funkner A, Neumann P et al. Biophysical characterization of refolded *Drosophila* Spätzle, a Cystine Knot Protein, Reveals Distinct Properties of Three Isoforms[J]. *J Biol Chem*, 2008, Nov 21; 283(47): 32598-609.
- [9] Christopher J. Arnot, Nicholas J. Gay, and Monique Gangloff. Molecular Mechanism That Induces Activation of Spätzle, the Ligand for the *Drosophila* Toll Receptor[J]. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 2010, 25, 19502-19509.
- [10] Weber AN, Tauszig-Delamasure S, Hoffmann JA et al. Binding of the *Drosophila* cytokine Spätzle to Toll is direct and establishes signaling[J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(8): 794-800.
- [11] LeMosy EK, Tan YQ, Hashimoto C. Activation of a protease cascade involved in patterning the *Drosophila* embryo[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 5055 - 5060.
- [12] Cho, Y. S., L. M. Stevens, and D. Stein. Pipe-dependent ventral processing of Easter by Snake is the defining step in *Drosophila* embryo DV axis formation[J]. *Curr. Biol*. 2010. 20: 1133 - 1137.
- [13] David Stein, Iphigenie Charatsi, Yong Suk Cho, Zhenyu Zhang, Jesse Nguyen, Robert DeLotto, Stefan Luschnig, and Bernard Moussian. Localization and Activation of the *Drosophila* Protease Easter Require the ER-Resident Saposin-like Protein Seele [J]. *Current Biology*, 2010, 20, 1953-1958.
- [14] Gobert V, Gottar M, Matskevich A. Dual activation of the *Drosophila* toll pathway by two pattern recognition receptors[J]. *Science*, 2003, 302(5653): 2126-2130.
- [15] El Chamy, L., V. Leclerc, I. Caldelari, and J. M. Reichhart. Sensing of 'danger signals' and pathogen-associated molecular patterns defines binary signaling pathways 'upstream' of Toll [J]. *Nat. Immunol*. 2008. 9: 1165 - 1170.
- [16] Kambris, Z., S. Brun, I. H. Jang, H. J. Nam, Y. Romeo, K. Takahashi, W. J. Lee, R. Ueda, and B. Lemaitre. *Drosophila* immunity: a large-scale in vivo RNAi screen identifies five serine proteases required for Toll activation[J]. *Curr. Biol*. 2006. 16: 808 - 813.
- [17] Buchon, N., M. Poidevin, H. M. Kwon, A. Guillou, V. Sottas, B. L. Lee, and B. Lemaitre. A single modular serine protease integrates signals from pattern-recognition receptors upstream of the *Drosophila* Toll pathway[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. 106: 12442 - 12447.
- [18] Gottar, M., V. Gobert, A. A. Matskevich, J. M. Reichhart, C. Wang, T. M. Butt, M. Belvin, J. A. Hoffmann, and D. Ferrandon. Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors[J]. *Cell*. 2006. 127: 1425 - 1437.
- [19] Nadège Peltea, Andrew S. Robertsonb, Zhen Zouc, Didier Belorgeyb, Timothy R. Dafforn, Haobo Jiangc, David Lomase, Jean-Marc Reichhart, and David Gubb. Immune challenge induces N-terminal cleavage of the *Drosophila* serpin Necrotic [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2006, 36(1): 37-46.
- [20] Yamamoto-Hino M, Muraoka M, Kondo S, Ueda R, Okano H, Goto S. Dynamic regulation of innate immune responses in *Drosophila* by Senju-mediated glycosylation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015. 112(18): 5809-14.
- [21] Susanna Valanne, Jing-Huan Wang and Mika Rämet. The *Drosophila* Toll Signaling Pathway[J]. *Immunol* 2011. 186: 649-656.
- [22] An C, Jiang H, Kanost MR. Proteolytic activation and function of the cytokine Spätzle in the innate immune response of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*[J]. *FEBS*, 2010, 277(1): 148-162.
- [23] Chunju An, Jun Ishibashi, Emily J. Ragan, Haobo Jiang, and Michael R. Kanost. Functions of *Manduca sexta* Hemolymph Proteinases HP6 and HP8 in Two Innate Immune Pathways[J]. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 2009, 29, 19716-19726.
- [24] Tanai K, Ishii T, Sugiyama M. Nucleotide sequence of 5' -upstream region and expression of a silkworm gene encoding a new member of the attacin family[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 220(3): 594-599.
- [25] Wang Y, Cheng T, Rayaprolu S et al. Proteolytic activation of pro-spatzle is required for the induced transcription of antimicrobial peptide genes in lepidopteran insects[J]. *Dev Comp Immunol*, 2007, 31(10): 1002-1012.
- [26] 徐颖. 家蚕新的免疫基因Spätzle克隆与功能及假单胞菌致病性研究[D]. 镇江: 江苏科技大学硕士学位论文, 2012.
- [27] Lu ping Zheng, Lin Hou, Miao Yu, Xiang Li, Xiang-yang Zou. Cloning and the expression pattern of Spätzle gene during embryonic development and bacterial challenge in *Artemia sinica*[J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39: 6035-6042.
- [28] Sang Woon Shin, Guowu Bian, and Alexander S. Raikhel. A Toll Receptor and a Cytokine, Toll5A and Spz1C, Are Involved in Toll Antifungal Immune Signaling in the Mosquito *Aedes aegypti*[J]. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 2006, 51, 39388-39395.

- [29] Christophides, G. K., Zdobnov, E., Barillas-Mury, C., Birney, E., Blandin, S., Blass, C., Brey, P. T., Collins, F. H., Danielli, A., Dimopoulos, G., Hetru, C., Hoa, N. T., Hoffmann, J. A., Kanzok, S. M., Letunic, I., Levashina, E. A., Loukeris, T. G., Lycett, G., Meister, S., Michel, K., Moita, L. F., Muller, H. M., Osta, M. A., Paskewitz, S. M., Reichhart, J. M., Rzhetsky, A., Troxler, L., Vernick, K. D., Vlachou, D., Volz, J., von Mering, C., Xu, J., Zheng, L., Bork, P., and Kafatos, F. C. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*[J]. *Science*. 2002, 298, 159-165.
- [30] 黎群英, 张涛, 张传博. 昆虫Toll受体及其研究进展[J]. *贵州农业科学*. 2008, 36(6): 67-69.
- [31] Kimbrell D.A, Beutler B. The evolution and genetics of innate immunity[J]. *Nat Rev Genet*, 2001, 2: 256-267.
- [32] Halfon M.S, Hashimoto C, Keshishian H. The *Drosophila* toll gene functions zygotically and is necessary for proper motoneuron and muscle development[J]. *Dev Biol*, 1995, 169: 151-167.
- [33] Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L et al. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults[J]. *Cell*, 1996, 86: 973-983.
- [34] Wu C, Chen C, Dai J, Zhang F, Chen Y, Li W, Pastor-Pareja JC, Xue L. Toll pathway modulates TNF-induced JNK-dependent cell death in *Drosophila* [J]. *Open Biol*. 2015. 5(7): 140171.
- [35] Andy J. Chang and Donald Morisato. Regulation of Easter activity is required for shaping the Dorsal gradient in the *Drosophila* embryo[J]. *Development*, 2002, 129, 5635-5645.
- [36] Ferreira ÁG, Naylor H, Esteves SS, Pais IS, Martins NE, Teixeira L. The Toll-dorsal pathway is required for resistance to viral oral infection in *Drosophila* [J]. *PLoS Pathog*. 2014. 10(12): e1004507.
- [37] De Gregorio E, Spellman PT, Tzou P. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*[J]. *EMBO*, 2002, 21: 2568 - 2579.
- [38] Mizuguchi K, Parker JS, Blundell TL. Getting knotted: a model for the structure and activation of Spatzle[J]. *Trends Biochem Sci*, 1998, 23: 239 - 242.
- [39] Arnot CJ, Gay NJ, Gangloff M. Molecular mechanism that induces activation of Spatzle, the ligand for the *Drosophila* toll receptor[J]. *Biol Chem*, 2010, 285: 19502-19509.
- [40] Xue Zhong, Xiao-Xia Xu. A Toll-Spätzle pathway in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 42: 514-524.
- [41] Valanne S, Wang JH, Ramet M. The *Drosophila* Toll signaling pathway[J]. *Immunol*, 2011, 186: 649-656.
- [42] Miranda Lewis, Christopher J. Arnota, Helen Beestonb, Airlie McCoy, Alison E. Ashcroftb, Nicholas J. Gaya, and Monique Gangloff. Cytokine Spätzle binds to the *Drosophila* immunoreceptor Toll with a neurotrophin-like specificity and couples receptor activation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013, 110(51): 20461-20466.
- [43] Parthier C, Stelter M, Ursel C, Fandrich U, Lilie H, Breithaupt C, Stubbs MT. Structure of the Toll-Spatzle complex, a molecular hub in *Drosophila* development and innate immunity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014. 111(17): 6281-6.
- [44] Hu X, Yagi Y, Tanji T et al. Multimerization and interaction of Toll and Spatzle in *Drosophila*[J]. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 9369-9374.
- [45] Moncrieffe MC, Grossmann JG, Gay NJ. Assembly of oligomeric death domain complexes during Toll receptor signaling[J]. *Biol Chem*, 2008, 283: 33447-33454.
- [46] Kanost MR, Jiang H, Yu XQ. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*[J]. *Immunol Rev*, 2004, 198: 97-105.