

UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA
SERIA ZOOLOGIA NR 21

ANDRZEJ LESICKI

**FOSFOFRUKTOKINAZA
I KINAZA PIROGRONIANOWA
W TKANKACH SKORUPIAKÓW
I OWADÓW**



POZNAŃ 1993

ABSTRACT: ANDRZEJ LESICKI, *Fosfofruktokinaza i kinaza pirogronianowa w tkankach skorupiaków i owadów* (Phosphofructokinase and pyruvate kinase of some crustacean and insect tissues). Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza (Adam Mickiewicz University Press), Poznań 1993, pp. 161, figs. 65, diagrams 3, tables 33, Seria Zoologia nr 21, ISBN 83-232-0508-6, ISSN 0554-8136. Polish text with a summary in English.

Molecular and kinetic properties of phosphofructokinase and pyruvate kinase of crustacean midgut gland, hypodermis, muscle and heart as well as of insect fat body and flight, body wall and heart muscles have been characterized and compared. The results suggest that the reaction catalyzed by the phosphofructokinase is the most important point for glycolysis regulation in all studied tissues. The phosphofructokinases exist in different interconvertible molecular forms and their activity is regulated by several positive and negative effectors. It is suggested that fructose-2,6-bisphosphate is the most powerful one and it plays a role of the signal which turns the glycolysis on. The pyruvate kinase is also a regulatory enzyme but only in those tissues for which gluconeogenesis is postulated, that is in the crustacean midgut gland and hypodermis as well as in the insect fat body. In these tissues, the enzyme is found in different molecular forms, which are characterized by higher or lower activity in different physiological stages of the tissue. A mechanism of interconversion between them has been explained and the existence of forms of lower activity has been connected with those stages for which gluconeogenesis operation is expected. In strictly glycolytic tissues like crustacean abdominal muscle or insect flight muscle, pyruvate kinase exists in a singular molecular form of high activity. The role of the phosphofructokinase and pyruvate kinase in the carbohydrate metabolism regulation of particular tissues is discussed.

ANDRZEJ LESICKI, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (Adam Mickiewicz University), Wydział Biologii (Faculty of Biology), Zakład Fizjologii Zwierząt (Department of Animal Physiology), ul. Fredry 10, 61-701 Poznań, Polska-Poland.

Redaktor: *Barbara Wronikowska*
Redaktor techniczny: *Michał Łysowski*

ISBN 83-232-0508-6
ISSN 0554-8136

WYDAWNICTWO NAUKOWE
UNIwersYTETU IM. ADAMA MICKIEWICZA

Wydanie I. Nakład 300+80 egz.
Ark. wyd. 13.75. Ark. druk 10.125.
Papier offset kl. III. 80 g. 70 x 100.
Podpisano do druku w listopadzie 1993 r.
Druk ukończono w grudniu 1993 r.

WYKONANO W ZAKŁADZIE GRAFICZNYM UAM
POZNAŃ, UL. H. WIENIAWSKIEGO 1

SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów stosowanych w pracy	6
Przedmowa	7
1. Glikoliza i jej kluczowe enzymy w tkankach zwierzęcych	9
1.1. Podstawowe mechanizmy regulacji aktywności enzymatycznej	9
1.2. Glikoliza	12
1.3. Fosfofruktokinaza (E.C.2.7.1.11).	13
1.4. Kinaza pirogronianowa (E.C.2.7.1.40).	16
1.5. Miejsca regulacji glikolizy w tkankach owadów i skorupiaków.	17
2. Gruczoł jelita środkowego skorupiaków	19
2.1. Fosfofruktokinaza z gruczołu jelita środkowego skorupiaków.	20
2.1.1. Wpływ pH.	21
2.1.2. Zależność aktywności od stężenia ATP.	22
2.1.3. Zależność aktywności od stężenia fruktozo-6-fosforanu	24
2.1.4. Wpływ adenozy-5-monofosforanu	28
2.1.5. Wpływ fruktozo-2,6-bisfosforanu.	29
2.2. Kinaza pirogronianowa gruczołu jelita środkowego skorupiaków.	30
2.2.1. Badania elektroforetyczne i chromatograficzne	30
2.2.2. Ciężar cząsteczkowy.	30
2.2.3. Zależność aktywności od pH.	31
2.2.4. Zależność aktywności od stężenia adenozynodifosforanu	31
2.2.5. Zależność aktywności od stężenia fosfoenolpirogronianu.	32
2.2.6. Aktywacja przez fruktozo-1,6-bisfosforan.	36
2.2.7. Zależność aktywności od stężenia ATP.	38
2.2.8. Zależność aktywności od stężenia alaniny.	39
2.2.9. Wzajemnie przemienne formy kinazy pirogronianowej gruczołu jelita środkowego skorupiaków.	40
2.3. Wspólna aktywacja fosfofruktokinazy i kinazy pirogronianowej gruczołu jelita środkowego pod wpływem fruktozo-2,6-bisfosforanu.	43
2.4. Metabolity glikolityczne w gruczole jelita środkowego skorupiaków.	44
3. Epiderma skorupiaków.	47
3.1. Kinaza pirogronianowa epidermy skorupiaków.	49
3.1.1. Własności elektroforetyczne.	49
3.1.2. Formy chromatograficzne.	49
3.1.3. Powinowactwo do ADP.	49
3.1.4. Powinowactwo do fosfoenolpirogronianu.	49
3.1.5. Aktywatory.	50
3.1.6. Inhibitory.	50
3.1.7. Wzajemnie przemienne formy kinazy pirogronianowej epidermy kraba	50
4. Mięśnie skorupiaków.	52
4.1. Fosfofruktokinaza mięśni skorupiaków.	55
4.1.1. Zależność aktywności od pH.	55
4.1.2. Zależność aktywności od stężenia ATP.	55

4.1.3. AMP jako aktywator fosfofruktokinazy mięśni skorupiaków	58
4.1.4. Fruktozo-2,6-bisfosforan jako aktywator	58
4.1.5. Zależność aktywności od stężenia fruktozo-6-fosforanu	58
4.2. Kinaza pirogronianowa mięśni skorupiaków	65
4.2.1. Badania elektroforetyczne i chromatograficzne	65
4.2.2. Ciężar cząsteczkowy	66
4.2.3. Optimum pH	66
4.2.4. Zależność aktywności od stężenia ADP	67
4.2.5. Zależność aktywności od stężenia fosfoenolpirogronianu	67
4.2.6. Wpływ fruktozo-1,6-bisfosforanu	68
4.2.7. Wpływ ATP	72
4.2.8. Wpływ fosfoargininy	74
4.2.9. Wpływ innych metabolitów	75
4.2.10. Brak fosforylacji kinazy pirogronianowej mięśni	75
4.2.11. Wpływ temperatury na właściwości kinazy pirogronianowej	76
4.3. Regulacja aktywności fosfofinktokinazy i kinazy pirogronianowej mięśni skorupiaków w warunkach <i>in vivo</i>	76
5. Inne tkanki skorupiaków	79
5.1. Fosfofruktokinaza serca skorupiaków	81
5.2. Kinaza pirogronianowa serca skorupiaków	82
6. Ciało tłuszczowe owadów	84
6.1. Fosfofruktokinaza ciała tłuszczowego owadów	84
6.1.1. Zależność aktywności od pH	84
6.1.2. Zależność aktywności od stężenia ATP	85
6.1.3. Wpływ AMP i ADP na aktywność PFK ciała tłuszczowego owadów	88
6.1.4. Wpływ fruktozo-2,6-bisfosforanu	89
6.1.5. Wpływ innych metabolitów	90
6.1.6. Zależność aktywności fosfofruktokinazy od stężenia fruktozo-6-fosforanu	90
6.2. Kinaza pirogronianowa ciała tłuszczowego owadów	99
6.2.1. Badania elektroforetyczne	100
6.2.2. Ciężar cząsteczkowy	100
6.2.3. Optimum pH	100
6.2.4. Aktywatory kinazy pirogronianowej ciała tłuszczowego	101
6.2.5. Inhibitory kinazy pirogronianowej ciała tłuszczowego	103
6.2.6. Zależność aktywności kinazy pirogronianowej od stężenia ADP	103
6.2.7. Zależność aktywności kinazy pirogronianowej od stężenia fosfoenolpirogronianu	103
6.3. Udział fosfofruktokinazy i kinazy pirogronianowej w regulacji metabolizmu ciała tłuszczowego owadów	105
7. Mięśnie skrzydłowe owadów	108
7.1. Fosfofruktokinaza mięśni skrzydłowych owadów	108
7.1.1. Ciężar cząsteczkowy	108
7.1.2. Optimum pH	109
7.1.3. Zależność aktywności od stężenia fruktozo-6-fosforanu	109
7.1.4. Wpływ ATP	111
7.1.5. Wpływ AMP	111
7.1.6. Wpływ fruktozo-2,6-bisfosforanu	111
7.1.7. Brak wpływu cytrynianu na aktywność fosfofruktokinazy mięśni skrzydłowych	112
7.1.8. Wpływ heksozo-1,6-bisfosforanów	112
7.1.9. Wpływ innych związków	113
7.2. Kinaza pirogronianowa mięśni skrzydłowych owadów	113
7.2.1. Badania elektroforetyczne	113
7.2.2. Ciężar cząsteczkowy	113
7.2.3. Optimum pH	113
7.2.4. Modulatory metaboliczne	114

7.2.5. Kinetyka reakcji kinazy pirogronianowej mięśni skrzydłowych z ADP i z fosfoenolpirogronianem jako substratami114
7.3. Udział fosfofruktokinazy i kinazy pirogronianowej w regulacji metabolizmu mięśni skrzydłowych.114
8. Inne mięśnie owadów.117
8.1. Mięśnie kończyn.117
8.2. Mięśnie powłok ciała118
8.2.1. Fosfofruktokinaza.118
8.2.1.1. Zależność aktywności fosfofruktokinazy mięśni powłok ciała owadów od pH118
8.2.1.2. Kinetyka reakcji z fruktozo-6-fosforanem jako substratem118
8.2.1.3. Wpływ ATP na aktywność fosfofruktokinazy.120
8.2.1.4. Wpływ cytrynianu na aktywność fosfofruktokinazy.121
8.2.1.5. Powinowactwo fosfofruktokinazy do fruktozo-2,6-bisfosforanu.121
8.2.2. Kinaza pirogronianowa.123
8.2.3. Rola fosfofruktokinazy i kinazy pirogronianowej w metabolizmie mięśni powłok ciała larw owadów.123
9. Serce owadów.124
9.1. Kinaza pirogronianowa serca owadów.124
9.1.1. Zależność aktywności od pH124
9.1.2. Zależność aktywności od stężenia ADP.125
9.1.3. Zależność aktywności od stężenia fosfoenolpirogronianu.126
9.1.4. Rola kinazy pirogronianowej w metabolizmie serca owadów.131
10. Jelito środkowe owadów.133
11. Wnioski i uwagi końcowe.134
12. Materiały i metody.137
12.1. Zwierzęta.137
12.2. Przygotowanie ekstraktów tkankowych.137
12.3. Pomiar aktywności enzymatycznej.138
12.4. Badania elektroforetyczne.139
12.5. Poziom metabolitów.139
Bibliografia.141
Phosphofructokinase and pyruvate kinase of some crustacean and insect tissues (Summary).160

WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

ADP	- adenzynodifosforan
AMP	- adenzynomonofosforan
ATP	- adenzynotrifosforan
Ala	- alanina
Arg	- arginina
E.Ch.	- „potencjał energetyczny” nukleotydów adenylowych
EDTA	- kwas etylenodwuaminoczwerooctowy
EGTA	- glikol-bis(β -aminoetyl eter) czteroocian etylenu
F-1,6-bP	- fruktozo-1,6-bisfosforan
F-1,6-bPaza	- fruktozo-1,6-bisfosfataza
F-2,6-bP	- fruktozo-2,6-bisfosforan
F6P	- fruktozo-6-fosforan
G6P	- glukoza-6-fosforan
Hepes	- kwas N-2-hydroksyetylpiperazyno-N'-2-etanosulfonowy
K_a	- stała aktywacji (stężenie aktywatora, w którym wywiera połowę maksymalnej aktywacji)
K_i	- stała inhibicji (stężenie inhibitora, w którym wywiera połowę maksymalnej inhibicji)
K_m	- stała Michaelisa (stężenie substratu, w którym enzym wykazuje połowę maksymalnej aktywności)
NADH	- dwunukleotyd nikotynamidoadeninowy (zredukowany)
NADP	- fosforan dwunukleotydu nikotynaminoadeninowego
PArg	- fosfoarginina
PEP	- fosfoenolpirogronian
PFK	- fosfofruktokinaza
P_j	- fosforan nieorganiczny
PK	- kinaza pirogronianowa
$S_{0.5}$	- stała substratowa (stężenie substratu, w którym enzym o kinetyce sigmoidalnej wykazuje połowę maksymalnej aktywności)
S.D.	- odchylenie standardowe
S.E.	- średni błąd wartości średniej
Tris	- trójhydroksymetyloaminometan
UDP	- urydynodifosforan

PRZEDMOWA

Otoczający nas świat materii ożywionej urzeka swym pięknem i urodą. Któż nie podziwiał motyli mieniących się wśród pól tysiącami barw, nici „babiego lata” snujących się w czasie złotej polskiej jesieni, kropel rosy perlących się w sieciach pajęczyn ponad łąkami rozświetlonymi promieniami porannego słońca, czy wreszcie raka-pustelnika przenoszącego swój muszlowy dom ozdobiony kolorowymi glonami i ukwiałami. To tylko *ad hoc* dobrane przykłady piękna, które zawdzięczamy przedstawicielom stawonogów, najliczniejszego w gatunki typu świata zwierzęcego. Dwie gromady tego typu, owady i skorupiaki, szczególnie często towarzyszą nam w życiu. Miód, jedwab to jedne z owadzych „darów”; homary, langusty i inne skorupiaki to „frutti di mare” przystrajające ekskluzywne stoły. Ale owady i skorupiaki to nie tylko radość oczu czy podniebienia. Szarańcza wędrowna, sówka choinówka, brudnica mniszka to tylko niektóre z imion groźnych szkodników pustoszących pola, lasy, spichlerze. Z drugiej strony krył, planktonowy skorupiak wód antarktycznych, rodził nadzieje na nowe źródła białka dla zagrożonej głodem ludzkości. Nic więc dziwnego, że owady i skorupiaki skupiają uwagę wielu ośrodków badawczych na całym świecie. Opisywane i klasyfikowane są nowe, nieznane gatunki tych zwierząt, badane są relacje między poszczególnymi gatunkami a środowiskiem ich życia, charakteryzowane i wyjaśniane są procesy metaboliczne i ich regulacja, poszukiwane są nowe środki i sposoby ograniczania populacji szkodników. W pracach tych często stosowaną metodą są badania porównawcze. Systematycy, porównując cechy morfologiczne, grupują gatunki w jednostki taksonomiczne, ekolodzy poprzez porównania relacji organizm-środowisko, ustalają prawidłowości rządzące stosunkami pomiędzy populacjami a zajmowanymi przez nie środowiskami, genetycy drogą porównań linii rodzicielskich i potomnych znajdują mechanizmy i prawa dziedziczenia.

Przedmiotem prac fizjologów i biochemików są procesy zachodzące wewnątrz poszczególnych osobników. Interesują ich na przykład zjawiska wzrostu, rozwoju, procesy oddychania, odżywiania, wydalania. Upraszczając, można powiedzieć, że realizacja tych wszystkich procesów życiowych jest rezultatem działania enzymów. To bowiem efektem ich aktywności są struktury komórkowe, to ich nieustanna „praca” stoi za wszystkimi reakcjami anabolicznymi i katabolicznymi organizmów. Toteż próby wyjaśniania dróg metabolizmu, próby odpowiedzenia na pytania: jakie są zależności pomiędzy poszczególnymi tkankami organizmów, dlaczego jedne organizmy wykształcają się w ten a inne w inny sposób, dlaczego w danym okresie życia w jednych tkankach pewne procesy przebiegają tak, a w innych inaczej, dlaczego jedne organizmy przeżywają w pewnych ekstremalnych warunkach, a inne nie, itd., wymagają badania enzymów, ustalania ich rodzajów, odmian, charakteryzowania ich własności i ... porównywania. Porównywania enzymów z różnych tkanek tego samego organizmu. Porównywania en-

zymów katalizujących te same reakcje u różnych gatunków zwierząt, bliskich a także coraz dalszych filogenetycznie. Porównywanie roli charakteryzowanych enzymów w procesach metabolicznych różnych tkanek różnych zwierząt. Ogólnie, to porównywanie jest istotną drogą prowadzącą do znalezienia odpowiedzi na jedno z podstawowych pytań współczesnej biologii, pytanie o mechanizmy regulacji metabolizmu komórki i organizmu. Oczywiście nie jest to droga jedyna, wystarczająca. Określenie mechanizmów regulacji aktywności enzymatycznej nie wyjaśni wszystkich problemów związanych z funkcjonowaniem całego organizmu. Ale bez opisanego sposobu regulacji aktywności enzymów odpowiedź na pytanie o zasady działania organizmu będzie niepełna.

Metodą porównawczą posłużono się w niniejszej pracy. Przedstawiono w niej wyniki własnych badań nad charakterystyką dwóch kluczowych enzymów przemian węglowodanowych, fosfofruktokinazy i kinazy pirogronianowej, w niektórych tkankach skorupiaków i owadów. Porównano własności enzymów izolowanych z różnych tkanek i gatunków, a wyniki badań własnych przedstawiono na tle prac prowadzonych przez innych badaczy. Celem przedstawionej pracy było również określenie roli, jaką pełnią fosfofruktokinaza i kinaza pirogronianowa w tkankach badanych zwierząt, a także zbadanie i opisanie mechanizmów regulacji ich aktywności oraz przedyskutowanie ich znaczenia dla regulacji metabolizmu węglowodanowego poszczególnych tkanek. Tak powstała monografia, dotycząca fosfofruktokinazy i kinazy pirogronianowej w tkankach skorupiaków i owadów.

1. GLIKOLIZA I JEJ KLUCZOWE ENZYMY W TKANKACH ZWIERZĘCYCH

Podstawową zdolnością organizmów żywych jest ich umiejętność przystosowywania się do środowiska, do warunków życia. Tylko organizmy przystosowane, zaadaptowane mogą przeżyć. Organizm jako całość sam stanowi środowisko życia poszczególnych komórek, tworzących jego organy i tkanki. Komórki przystosowują się do tego środowiska wewnętrznego organizmu. Organizm z kolei adaptuje się do środowiska zewnętrznego poprzez adaptację środowiska wewnętrznego.

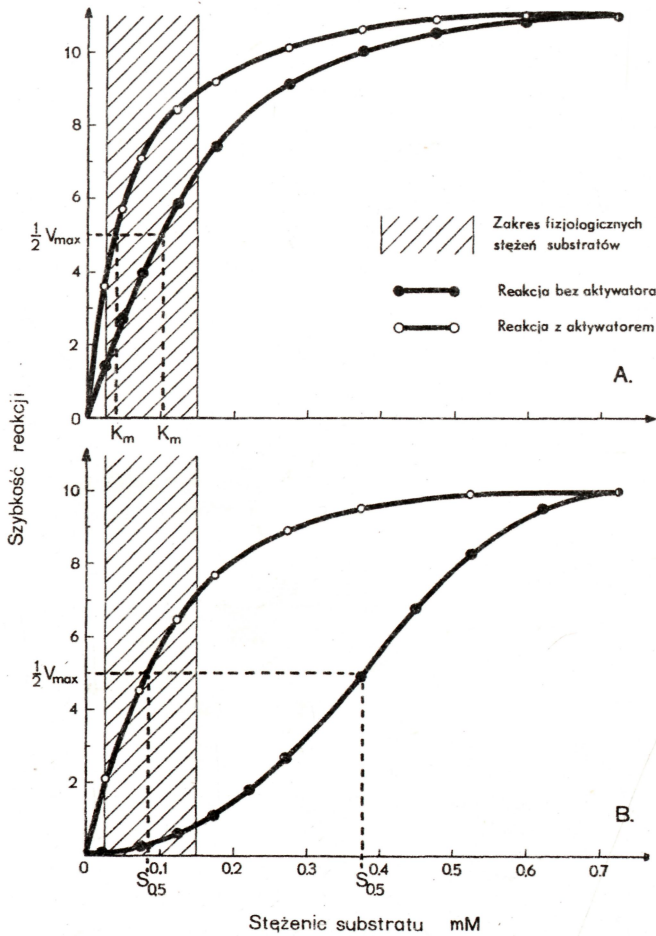
Organizmy dążą do niezależnienia środowiska wewnętrznego od zmian środowiska zewnętrznego. Im większa stałość środowiska wewnętrznego, tym lepsza, bardziej uniwersalna adaptacja do środowiska zewnętrznego. Różne organizmy stosują różne sposoby dostosowywania środowiska wewnętrznego do zewnętrznego. Na przykład jedne unikają środowiska niesprzyjającego lub też poszukują warunków korzystniejszych. Inne uruchamiają takie mechanizmy, by zmiany środowiska zewnętrznego w jak najmniejszym stopniu zmieniały ich środowisko wewnętrzne. Takie adaptacje muszą być związane ze zmianą metabolizmu. Z kolei ta zmiana realizowana jest przez zmianę aktywności enzymatycznej.

Środowisko wewnętrzne może się zmieniać także bez zmian w środowisku zewnętrznym. Co więcej, takie zmiany mogą zachodzić w sposób cykliczny i być odzwierciedleniem czynności życiowych organizmu. Przyswojenie pokarmu prowadzi do zmiany środowiska wewnętrznego, do którego dostosowują swój metabolizm tkanki (i komórki) organizmu. Procesy wzrostu, u skorupiaków i owadów związane z cyklicznym linieniem, pociągają za sobą zmiany środowiska wewnętrznego i adaptację metaboliczną wielu tkanek. I te adaptacje realizowane są poprzez zmiany aktywności enzymów.

Powyższe rozważania wskazują, iż każda zmiana metabolizmu jest wynikiem zmiany aktywności enzymatycznej. Jakże są zatem sposoby dostosowywania się organizmów do zmian środowiska na poziomie enzymatycznym? Można stwierdzić, że istnieją dwa podstawowe sposoby adaptacji aktywności enzymatycznej.

1.1. PODSTAWOWE MECHANIZMY REGULACJI AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ

Pierwszy sposób polega na zmianie rodzaju i ilości poszczególnych enzymów (w konsekwencji także proporcji pomiędzy enzymami komórki). Sposób ten może być realizowany dwojako: poprzez wzrost szybkości syntezy nowych cząsteczek danego enzymu, bądź poprzez wzrost szybkości degradacji tego enzymu. Ogólnie uważa się, iż adaptacja metaboliczna związana ze zmianą ilości enzymu ma charakter powolny i charakterystyczna jest raczej dla długotrwałych dostosowań do środowiska, czy to zewnętrznego, czy to wewnętrznego.



Rys. 1. Zależność szybkości reakcji od stężenia substratu dla: (A) enzymu o kinetyce hiperbolicznej, (B) enzymu o kinetyce sigmoidalnej.

Drugi sposób adaptacji aktywności enzymatycznej polega na modyfikacji własności katalitycznych enzymu. Związane jest to ze zmianą struktury enzymu, która to zmiana prowadzi do wzrostu (lub spadku) szybkości, z jaką enzym katalizuje reakcję dla niego charakterystyczną. Ta droga adaptacji jest szybka i może prowadzić do prawie natychmiastowych zmian aktywności enzymatycznej w odpowiedzi na wpływy środowiska.

Szybkość, z jaką enzym katalizuje sobie specyficzną reakcję, zależy w pierwszym rzędzie od stężenia substratu. Zależność szybkości reakcji od stężenia substratu opisuje zwykle hiperbola zwana krzywą Michaelisa (Rys. 1A). Ponieważ krzywa ta zbliża się asymptotycznie do pewnej maksymalnej wartości, stężenie substratu, w którym enzym pracuje z największą szybkością jest trudne do precyzyjnego ustalenia. Toteż przyjęto charakteryzować enzym wartością stężenia, w którym enzym wykazuje połowę maksy-

malnej aktywności. Jest to tzw. stała Michaelisa (K_m). Charakteryzuje ona powinowactwo enzymu do substratu. Enzym o dużym powinowactwie do substratu, a więc taki, który wykazuje wysoką szybkość reakcji już w niższych stężeniach substratu, cechuje się niską wartością stałej K_m . Enzym o powinowactwie niższym ma wyższą wartość stałej K_m , uzyskuje bowiem dużą szybkość w wyższych stężeniach substratu.

Nie wszystkie enzymy charakteryzują się hiperbolicznym kształtem krzywej opisującej zależność szybkości reakcji od stężenia substratu. Enzymy złożone, zbudowane z kilku podjednostek, z których każda zawiera centrum aktywne wiążące cząsteczkę substratu, cechuje często krzywa sigmoidalna (S-kształtna) (Rys. 1B). Obraz ten związany jest z aktywacją enzymu przez cząsteczki substratu przyłączane do kolejnych centrów aktywnych poszczególnych podjednostek. Zjawisko to, nazwane kooperacją, polega na tym, że substrat, jako tzw. pozytywny efektor homotropowy, wiążąc się z centrum aktywnym pierwszej podjednostki, wywołuje taką zmianę budowy przestrzennej (konformacji) całego enzymu, iż kolejna cząsteczka substratu przyłączana jest łatwiej przez centrum aktywne następnej podjednostki, co z kolei może wywołać dalszą pozytywną zmianę konformacji enzymu i łatwiejsze wiązanie kolejnej cząsteczki substratu. W efekcie uzyskujemy sigmoidalny wykres opisujący zależność szybkości reakcji od stężenia substratu. Dla charakteryzowania powinowactwa takich enzymów do ich substratów przyjęto również wartość stężenia substratu, w którym enzym wykazuje połowę maksymalnej szybkości reakcji, określaną jako stała $S_{0.5}$. Enzymy te charakteryzuje się również wartością tzw. współczynnika Hilla n_H , ustalanego na podstawie wykresu Hilla (Newsholme i Start, 1973). Współczynnik n_H może być wskaźnikiem liczby centrów aktywnych. Dla enzymów zbudowanych z pojedynczego łańcucha polipeptydowego, czyli takich, które cechuje hiperboliczna zależność szybkości reakcji od stężenia substratu, wynosi on 1. Natomiast dla enzymów złożonych, cechujących się kooperatywnym wiązaniem substratu, współczynnik n_H przyjmuje wartości wyższe od 1.

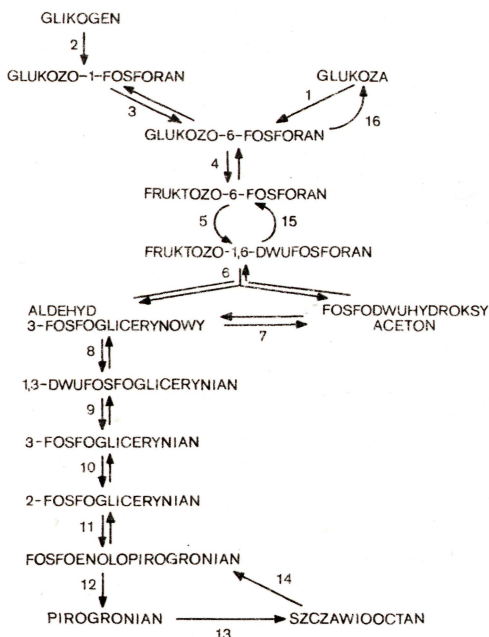
Enzymy złożone cechuje często występowanie, obok centrów aktywnych, tzw. centrów allosterycznych, tj. miejsc wiązania cząsteczek zwanych efektorami heterotropowymi. Związki te, choć nie uczestniczą bezpośrednio w reakcji katalizowanej przez enzym, wpływają w sposób istotny na przebieg samej reakcji, będąc albo jej aktywatorami albo inhibitorami. Wiążąc się z centrum (centrami) allosterycznym(i) enzymu, wymuszają na nim przyjęcie konformacji wysoce aktywnej (wtedy są efektorami pozytywnymi czyli aktywatorami), bądź stabilizują konformację o małej aktywności (wtedy są efektorami negatywnymi, inhibitorami). Aktywator allosteryczny zwiąawszy się z cząsteczką enzymu zwykle wywołuje zmianę kształtu krzywej zależności szybkości reakcji od stężenia substratu w kierunku „spłycenia” jej sigmoidalnego charakteru (aż do zamiany w wykres hiperboliczny). Natomiast inhibitor „pogłębia” sigmoidalny kształt tej krzywej. Powinowactwo enzymu wobec aktywatorów i inhibitorów również charakteryzować można stężeniami efektorów, w których przejawiają one połowę swego maksymalnego oddziaływania. Mówimy wtedy o stałej aktywacji (K_a) dla aktywatorów i o stałej inhibicji (K_i) dla inhibitorów.

Nie wglębiając się w rozważania teoretyczne nad modelami regulacji aktywności enzymów allosterycznych (Monod i wsp. 1965; Koshland i wsp. 1966), warto zastanowić się nad znaczeniem enzymów cechujących się kinetyką sigmoidalną dla regulacji metabolizmu. Trzeba zauważyć, iż stężenia substratów w warunkach fizjologicznych, tj.

w środowisku wewnątrzkomórkowym, niezmiernie rzadko są wysokie. Na ogół są niskie (Rys. 1). W zakresie stężeń fizjologicznych enzym o kinetyce hiperbolicznej wykazuje zwykle znaczną aktywność, co więcej, reaguje on w dużym stopniu na zmianę stężenia substratu. Natomiast enzym o kinetyce sigmoidalnej jest często mało aktywny w warunkach fizjologicznego stężenia substratu. Ponadto nawet znaczny wzrost stężenia substratu nic zmienia w sposób istotny jego aktywności. Ale tenże enzym aktywowany allosterycznie z wielokrotnia swoją aktywność i staje się wysoce wrażliwy na zmiany w stężeniu substratu. Nic więc dziwnego, że enzymy o sigmoidalnej charakterystyce to przeważnie te, które pełnią kluczowe role w regulacji metabolizmu. W poszczególnych torach metabolicznych, złożonych z szeregu postępujących po sobie reakcji, tylko pojedyncze reakcje, zwykle na początku lub na końcu toru, są katalizowane przez takie enzymy. Ich aktywacja (lub inhibicja) jest bowiem kluczem otwierającym (lub zamykającym) daną drogę metaboliczną.

1.2. GLIKOLIZA

Glikoliza (Schemat 1) jest drogą kataboliczną zajmującą centralną pozycję w metabolizmie komórkowym. Jej substratem jest glukoza (lub glukoza-1-fosforan pochodzący z glikogenu), wykorzystywana w sposób zależny od zapotrzebowania komórki. W warunkach beztlenowych glikoliza spełnia rolę podstawowej drogi oddechowej, zapewniającej podaż bogatego w energię ATP dla komórki. W czasie oddychania tlenowego rola glikolizy polega na wstępnej obróbce glukozy do kwasu pirogronowego, by ten po przekształceniu w acetylokoenzym A mógł być całkowicie spalony w procesach mitochon-



Schemat 1. Reakcje glikolizy katalizowane przez: 1. heksokinazę, 2. fosforylaze glikogenową, 3. fosfoglukomutazę, 4. izomerazę fosfoheksozową, 5. FOSFOFRUKTOKINAZĘ, 6. aldolazę, 7. izomerazę fosfotriozową, 8. dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego, 9. kinazę fosfoglicerynianową, 10. mutazę fosfoglicerynianową, 11. enolazę, 12. KINAZĘ PIROGRONIANOWĄ. Przedstawiono również reakcje katalizowane przez enzymy glukogenne: 13. karboksylazę pirogronianową, 14. karboksykinazę fosfoenolopirogronianową, 15. fruktozo-1,6-bis-fosfatazę, 16. glukoza-6-fosfatazę.

dralnych. Acetylokoenzym A może być również wykorzystywany do syntezy kwasów tłuszczowych, które łącząc się z glicerolem, także pochodzącym od pośrednich metabolitów glikolizy, tworzą trójglicerydy. Większość enzymów glikolizy może w warunkach fizjologicznych katalizować reakcje odwrotne i cała droga, nosząc miano glukoneogenezy, może przebiegać w kierunku syntezy glukozy ze związków niecukrowych, takich jak aminokwasy glukogenne, mleczan czy też pirogronian. Jedynie reakcje katalizowane przez heksokinazę, fosfofruktokinazę i kinazę pirogronianową (Newshoime i Start, 1973; Hers i Hue, 1983; Pilkis i Claus, 1991), a zdaniem niektórych badaczy także przez kinazę fosfoglicerynianową (Hochachka i Somero, 1973), są termodynamicznie nieodwracalne i w warunkach komórkowych katalizują sobie specyficzne reakcje tylko w kierunku glikolitycznym. Dla przebiegu glukoneogenezy konieczne są reakcje katalizowane przez enzymy charakterystyczne dla tej drogi (tj. karboksylazę pirogronianową, karboksykinazę fosfoenolpirogronianową i fruktozo-1,6-bisfosfatazę). Nic więc dziwnego, iż reakcje katalizowane przez heksokinazę, a zwłaszcza fosfofruktokinazę i kinazę pirogronianową są uważane za powszechne miejsca regulacji glikolizy w tkankach roślinnych i zwierzęcych. Regulowanie ich aktywności jest bowiem kontrolowaniem funkcjonowania całej drogi glikolitycznej.

1.3. FOSFOFRUKTOKINAZA (E.C.2.7.1.11)

Charakterystyka fosfofruktokinazy¹ była tematem szeregu opracowań monograficznych (Ramaiah, 1974; Uyeda, 1979; Dunaway, 1983; Hers i Hue, 1983; Clark i Patten, 1984; Hochachka, 1985; Pilkis i Claus, 1991). Enzym ten w tkankach ssaków występuje w formie szeregu izoenzymów. Najmniejszą formą molekularną fosfofruktokinazy, wykazującą aktywność katalityczną, jest tetramer (Paetkau i Lardy, 1967; Karadsheh i wsp. 1977; Foe i Trujillo, 1980; Dunaway, 1983; Dunaway i wsp. 1988). Klasyfikacja izoenzymatyczna PFK w tkankach szczura (Kurata i wsp. 1972; Gonzales i wsp. 1975; Dunaway i Kasten, 1985, 1986, 1987), królika (Kemp, 1971; Tsai i Kemp, 1973; Gonzales i wsp. 1975; Foe i Kemp, 1985) i kilku innych ssaków (Gonzales i wsp. 1975; de Faria i wsp. 1976, 1978; Foe i Trujillo, 1980), a także w tkankach człowieka (Cottreau i wsp. 1979; Meienhofer i wsp. 1980; Vora i wsp. 1980; Dunaway i wsp. 1988; Nakajima i wsp. 1990) wykazała, choć nie bez początkowych kontrowersji, istnienie w tkankach ssaków co najmniej trzech podstawowych podjednostek PFK:

- 1) typu wątrobowego (określonej jako typ L lub typ B), o ciężarze cząsteczkowym 76 000 - 80 000 (Cottreau i wsp. 1979; Dunaway i wsp. 1988), dominująca w wątrobie, erytrocytach, nerkach, łożysku,
- 2) typu mięśniowego (typ M lub typ A), o ciężarze cząsteczkowym 82 500 - 85 000 (Dunaway i wsp. 1988), dominująca w mięśniach, sercu, mózgu,

Termin fosfofruktokinaza używany jest obecnie dla określenia dwóch różnych enzymów: fosfofruktokinaza 1 (PFK-1, E.C.2.7.1.11) to klasyczny enzym glikolityczny katalizujący reakcję przemiany fruktozo-6-fosforanu we fruktozo-1,6-bisfosforan, natomiast fosfofruktokinaza 2 (PFK-2, E.C.2.7.1.105) to niedawno odkryty dwufunkcyjny enzym katalizujący reakcję syntezy (i hydrolizy) fruktozo-2,6-bisfosforanu (El-Maghrabi i wsp. 1981, 1982b; Furuya i Uyeda, 1981; Van Schaftingen i Hers, 1981; Van Schaftingen i wsp. 1982a). W niniejszej pracy termin fosfofruktokinaza (PFK) jest używany dla określenia fosfofruktokinazy 1.

3) typu płytkowego (nazywanego też typem mózgowym lub fibroblastowym - a podjednostkę określa się jednym z symboli: typ P, typ F lub typ C), o ciężarze 86 000 - 87 000 (Dunaway i wsp. 1988), występującego w płytkach krwi, fibroblastach, mózgu.

Podjednostki te są kodowane przez niezależne loci genowe (Weil i wsp. 1980; Vora i Francke, 1981, Vora, 1981; Vora i wsp. 1982ab, 1983).

W większości tkanek syntetyzowane są dwa lub nawet trzy typy podjednostek jednocześnie. W konsekwencji w tkankach tych, obok homotetramerów zbudowanych z czterech jednakowych podjednostek, spotyka się liczne hybrydowe formy heterotetrameryczne. Obserwuje się również zmianę dominacji podjednostek PFK w poszczególnych tkankach w trakcie rozwoju osobniczego (Kurata i wsp. 1972; de Faria i wsp. 1978; Kahn i wsp. 1980; Thrasher i wsp. 1981).

Skomplikowany układ izoenzymatyczny PFK tkanek ssaków pogłębia dodatkowo zdolność enzymu do agregacji podjednostek w formy polimeryczne o ciężarze cząsteczkowym osiągającym szereg milionów (Paetkau i Lardy, 1967; Reinhart i Lardy, 1980b; Koster i wsp. 1980; Foe i Trujillo, 1980; Hesterberg i Lee, 1982; Foe i Kemp, 1985). Znaczenie agregacji i dysagregacji podjednostek PFK dla regulacji aktywności enzymu nie jest jednoznacznie ustalone (Dunaway, 1983), zwłaszcza, że ocenę szybkości tych procesów w warunkach *in vivo* utrudnia jej zależność od procedury izolacji i oczyszczania enzymu (Luther i wsp. 1985).

Fosfofruktokinazę cechuje jeden z bardziej skomplikowanych mechanizmów regulacji aktywności (Lowry, 1965; Newsholme i Start, 1973). Pewne elementy tej regulacji są jednak wspólne dla izoenzymów PFK różnych typów, pochodzących z różnych tkanek i organizmów:

- 1) kooperatywne działanie z substratem fruktozo-6-fosforanem,
- 2) kosubstrat, ATP, jest jednocześnie allosterycznym inhibitorem,
- 3) aktywność jest modyfikowana przez liczne aktywatory,
- 4) aktywność enzymu zależy od stopnia agregacji cząsteczki.

Izoenzymy PFK izolowane z większości tkanek różnych organizmów cechuje wybitnie silnie zaznaczona sigmoidalna krzywa kinetyki reakcji z fruktozo-6-fosforanem jako substratem (Ling i wsp. 1965; Lowry, 1965; Kurganow i wsp. 1975; Bock i Frieden, 1976). Kooperacja enzymu i substratu widoczna jest zwłaszcza w pH zbliżonych do obojętnego i niższych, ulega osłabieniu (bądź zanika całkowicie) w pH wyższych od 8 (Reinhart i Lardy, 1980a). Efekt ten szczególnie zaznacza się w przypadku izoenzymów zbudowanych z podjednostek typów A i B, słabiej u tych zawierających podjednostki C (Meienhofer i wsp. 1980; Foe i Kemp, 1985).

ATP, substrat w reakcji katalizowanej przez PFK, jest jednocześnie silnym inhibitorem allosterycznym PFK, wiązany przez miejsce odmienne niż centrum aktywne enzymu (Uyeda i Racker, 1965; Lowry i Passonneau, 1966; Kühn i wsp. 1974; Dunaway i Weber, 1974; Akkerman i wsp. 1975; Meienhofer i wsp. 1980; Foe i Kemp, 1985; Dunaway i wsp. 1988).

Aktywność PFK modyfikowana jest przez liczne aktywatory allosteryczne, takie jak AMP, ADP, jony fosforanowe, fruktozo-1,6-bisfosforan i inne podwójnie ufosforylowane monocukry (Uyeda i Racker, 1965; Lowry i Passonneau, 1966; Kühn i wsp. 1974; Tornheim i Lowenstein, 1976; Uyeda, 1979; Mayr, 1989). Natomiast aktywność PFK

hamują cytrynian, fosfoenolopirogronian, fosfokreatyna, 2-fosfoglicerynian i 3-fosfoglicerynian (Uyeda i Racker, 1965; Colombo i wsp. 1975; Tornheim i Lowenstein, 1976; Uyeda, 1979). Izoenzymy PFK z różnych tkanek i zwierząt różnią się stopniem wrażliwości na poszczególne inhibitory i aktywatory (Layzer i wsp. 1969; Kemp, 1971; Dunaway i Weber, 1974; Dunaway i wsp. 1974, 1988; Dunaway, 1983; Foe i Kemp, 1985).

Szczególną rolę w aktywacji PFK odgrywa fruktozo-2,6-bisfosforan, metabolit odkryty na początku lat osiemdziesiątych przez trzy niezależne zespoły badawcze (Van Schaftingen i wsp. 1980; Hers i wsp. 1981, 1982; Hers i Van Schaftingen, 1982; Pilkis i wsp. 1981, 1982b; Claus i wsp. 1981; Furuya i Uyeda, 1980ab; Uyeda i wsp. 1981, 1982). Badania nad PFK, w których *in vitro* dobierano stężenia substratów, pozytywnych i negatywnych efektorów, a także kationów i jonów wodorowych (pH) tak, by odzwierciedlały warunki fizjologiczne, doprowadziły do stwierdzenia, że fosfofruktokinaza jest całkowicie nieaktywna *in vivo* (Reinhart i Lardy, 1980a). Po podaniu hormonów (np. glukagonu, adrenaliny) silnie modyfikujących metabolizm komórkowy nie stwierdzono takich zmian stężeń substratów i efektorów, które pozwalałyby na aktywację fosfofruktokinazy (Pilkis i wsp. 1982a; Uyeda i wsp. 1982). Z drugiej strony nasuwało się spostrzeżenie, że enzym ten musi być aktywny dla sprawnego katabolizmu glukozy drogą glikolityczną. Fruktozo-2,6-bisfosforan już w bardzo niskich stężeniach aktywuje allosterycznie fosfofruktokinazę, przekształcając sigmoidalną kinetykę z fruktozo-6-fosforanem w hiperboliczną, a także całkowicie znosząc hamujące działanie wyższych stężeń ATP. Co więcej, w tkankach stwierdza się zmiany stężeń fruktozo-2,6-bisfosforanu w odpowiedzi na bodźce metaboliczne i hormonalne, wystarczające do włączenia bądź wyłączenia PFK (Pilkis i wsp. 1983; Claus i wsp. 1984; El-Maghrabi i Pilkis, 1984; Van Schaftingen, 1987).

Stopień kooperatywnych oddziaływań substratu F6P i enzymu, a także jego wrażliwość na hamujące działanie ATP i aktywujące F-2,6-bP, zależą od stopnia agregacji cząsteczki (Reinhart i Lardy, 1980b; Reinhart, 1980; Bosca i wsp. 1985; Reinhart i Hartleip, 1987). Z drugiej strony aktywatory PFK faworyzują agregację podjednostek w struktury zbudowane z 16 i więcej protomerów, inhibitory stymulują dysocjację złożonych polimerów na podjednostki (Hesterberg i Lee, 1982; Luther i wsp. 1985).

Fosfofruktokinaza ssaków może być inaktywowana w wyniku fosforylacji katalizowanej przez kinazę białkową zależną od cAMP (Brand i Söling, 1975; Brand i wsp. 1976; Hofer i Fürst, 1976; Hussey i wsp. 1977; Kagimoto i Uyeda, 1980; Claus i wsp. 1980). Możliwość ta zdawała się tłumaczyć mechanizm obserwowanej inhibicji PFK pod wpływem glukagonu, hormonu działającego na tkanki docelowe poprzez aktywację cyklicznej adenylanowej i wzrost komórkowego stężenia cAMP (Taunton i wsp. 1974; Castaño i wsp. 1979; Pilkis i wsp. 1979; Kagimoto i Uyeda, 1980; Nieto i Castaño, 1980). Jednak okazało się, iż katalityczne własności ufosforylowanej formy PFK nie różnią się znacznie od własności formy nieufosforylowanej (Claus i wsp. 1980; Foe i Kemp, 1982) a mechanizm działania glukagonu polega prawdopodobnie na obniżaniu komórkowego poziomu fruktozo-2,6-bisfosforanu (Hue i wsp. 1982; Kuwajima i Uyeda, 1982; Richards i Uyeda, 1982), w wyniku inaktywacji syntetyzującej go kinazy i aktywacji hydrolizującej go fosfatazy pod wpływem kinazy białkowej cAMP-zależnej (El-Maghrabi i wsp. 1982bc; Furuya i wsp. 1982; Van Schaftingen i wsp. 1981, 1982a; Pilkis i Claus, 1991). Niedobór podstawowego aktywatora PFK odpowiedzialny jest za

inhibicję PFK pod wpływem glukagonu (Hers i Hue, 1983) a fosforylacja PFK jedynie wznaga ten efekt, m.in. poprzez obniżenie powinowactwa PFK do F-2,6-bP (Furuya i Uyeda, 1980a; Claus i wsp. 1982).

1.4. KINAZA PIROGRONIANOWA (E.C.2.7.1.40)

Kinaza pirogronianowa (PK) była także tematem szeregu opracowań monograficznych (Seubert i Schoner, 1971; Ibsen i wsp. 1975; Ibsen, 1977; Hall i Cottam, 1978; Munday i wsp. 1980; Hers i Hue, 1983; Pilkis i Claus, 1991). W tkankach ssaków występują cztery podstawowe izoenzymy PK (Tanaka i wsp. 1967; Bigley i wsp. 1968; Imamura i Tanaka, 1972; Van Berkel i wsp. 1972; Ibsen i Krueger, 1973; Osterman i Fritz, 1973; Osterman i wsp. 1973; Whittell i wsp. 1973; Etiemble i Boivin, 1976; Strandholm i wsp. 1976; Saheki i wsp. 1982ab):

- izoenzym typu L - występujący w komórkach parenchymatycznych wątroby i korze nerek,
- izoenzym typu K - dominujący w nerkach, jedyny w tkance tłuszczowej i w szeregu innych tkanek, występujący w komórkach siateczkowsródbłonkowych wątroby, a także w tkankach płodowych i regenerujących,
- izoenzym typu M - występujący w mięśniach szkieletowych i sercowym oraz mózgu,
- izoenzym typu R - występujący w erytrocytach.

PK w tkankach ssaków jest tetramerem a podstawowe izoenzymy są homotetramerami (Cottam i wsp. 1969; Cardenas i wsp. 1973; Cardenas i Dyson, 1973; Kutzbach i wsp. 1973; Peterson i wsp. 1974; Hall i wsp. 1978). W tkankach, w których występują jednocześnie dwa różne podstawowe izoenzymy, stwierdzono obecność form hybrydowych pomiędzy nimi, o różnej proporcji poszczególnych podjednostek typów K i M (Strandholm i wsp. 1976; Tolle i wsp. 1976; Cardenas i Dyson, 1978; Saheki i wsp. 1978a) oraz typów K i L (Imamura i Tanaka, 1972; Osterman i Fritz, 1973, 1974; Strandholm i wsp. 1976; Cardenas i Dyson, 1978; Saheki i wsp. 1978a). Do form hybrydowych zaliczono również PK erytrocytów (Imamura i Tanaka, 1972; Imamura i wsp. 1972; Whittell i wsp. 1973), choć klasyfikowano ten enzym także jako izoenzym typu L (Ibsen i wsp. 1975; Etiemble i Boivin, 1976). Ostatnio przeważa pogląd klasyfikujący PK erytrocytów jako odrębny, czwarty podstawowy izoenzym (typu R) tkanek ssaków (Chern i wsp. 1972; Lincoln i wsp. 1975, Saheki i wsp. 1978ab, 1982ab).

Cztery podstawowe podjednostki budujące izoenzymy PK ssaków są syntetyzowane na podstawie czterech różnych informacyjnych RNA (Marie i wsp. 1981; Noguchi i Tanaka 1982). Jednak badania strukturalne i immunologiczne wskazywały na duże podobieństwo pomiędzy izoenzymami typów M i K (Imamura i wsp. 1972; Harada i wsp. 1978; Ibsen i wsp. 1981; Saheki i wsp. 1982ab), a także pomiędzy izoenzymami typów L i R (Tanaka i wsp. 1967; Harada i wsp. 1978; Saheki i wsp. 1978ab, 1982ab; Simon i wsp. 1982). Analiza klonowanego komplementarnego DNA, zawierającego informację genetyczną dla syntezy podjednostek PK ssaków (Noguchi i wsp. 1983, 1984; Inoue i wsp. 1986; Lone i wsp. 1986; Marie i wsp. 1986) doprowadziła do odkrycia, iż informacja genetyczna dla izoenzymów M i K zawarta jest w jednym genie, a odrębne podjednostki powstają przez alternatywne usunięcie dwóch eksonów w trakcie składania

informacyjnego RNA (Noguchi i wsp. 1986). Z kolei jeden gen koduje informację dla podjednostek L i R współdziałając z odmiennymi promotorami (Noguchi i wsp. 1987).

Podstawowe izoenzymy kinazy pirogronianowej z tkanek ssaków różnią się własnościami kinetycznymi. Izoenzym typu L i w dużym stopniu przypominający go izoenzym typu R cechują sigmoidalna kinetyka z fosfoenolopirogronianem jako substratem, allosteryczna aktywacja pod wpływem fruktozo-1,6-bisfosforanu oraz allosteryczna inhibicja wywołwana przez ATP, alaninę, fenyloalaninę i inne aminokwasy (Tanaka i wsp. 1967; Bailey i wsp. 1968; Carminatti i wsp. 1968; Weber, 1969; Imamura i wsp. 1972; Carbonell i wsp. 1973; Kutzbach i wsp. 1973; Irving i Williams, 1973ab; Cardenas i wsp. 1975; Marie i wsp. 1976). Izoenzym typu K jest również enzymem allosterycznym, wrażliwym na kooperacyjne wpływy substratu PEP, aktywatora F-1,6-bP oraz inhibitorów ATP, alaniny, fenyloalaniny, z tym, że kinetyczne własności (charakteryzowane przez stałe Michaelisa, stałe aktywacji i inhibicji, współczynniki Hilla) różnią ten izoenzym jednoznacznie od izoenzymu typu L (Pogson, 1968a; Jimenez de Assua i wsp. 1971; Costa i wsp. 1972; Imamura i wsp. 1972; Carbonell i wsp. 1973; Van Berkel i Koster, 1973; Van Berkel i wsp. 1973; Van Berkel, 1974; Ibsen i Trippet, 1974; Irving i Williams, 1976; Corcoran i wsp. 1976). Izoenzym typu M, w przeciwieństwie do trzech poprzednich izoenzymów, wykazuje hiperboliczną kinetykę z PEP jako substratem, nie modyfikowaną przez F-1,6-bP i inne metabolity (Steinmetz i Deal, 1966; Tanaka i wsp. 1967; Cottam i wsp. 1969; Imamura i wsp. 1972; Cardenas i wsp. 1973; Ibsen i Trippet, 1973, 1974; Baranowska i Baranowski, 1975, 1977). choć wrażliwą na allosteryczną inhibicję fenyloalaniną (Oberfelder i wsp. 1984).

Kinaza pirogronianowa typu L może być fosforylowana przez kinazę białkową zależną od cyklicznego AMP (Ljungström i wsp. 1974; Humble i wsp. 1975; Titanji i wsp. 1976; Berglund i wsp. 1977; Berglund, 1978; El-Maghrabi i wsp. 1980), a także przez kinazę białkową zależną od Ca^{2+} i kalmoduliny (Schworer i wsp. 1985; Soderling i wsp. 1986). Natomiast nie wykryto fosforylowania izoenzymów PK typów K i M pod wpływem kinazy białkowej zależnej od cAMP (Humble i wsp. 1975). Wykazano istnienie w wątrobie fosfatazy specyficznie defosforylującej ufosforylowaną PK typu L (Titanji i wsp. 1976; Titanji, 1977; Jett i wsp. 1981). Fosforylacja zmienia własności kinetyczne PK typu L. Obniżeniu ulega powinowactwo do PEP i aktywatora F-1,6-bP, natomiast wzrasta wrażliwość na allosteryczne inhibitory ATP i alaninę (Feliu i wsp. 1977; Claus i wsp. 1979; El-Maghrabi i wsp. 1982a). Zmiany te prowadzą do znacznego obniżenia aktywności PK w warunkach fizjologicznych, toteż mechanizmowi fosforylacji i defosforylacji PK przypisuje się istotną rolę w regulacji jej aktywności w hepatocytach ssaków (Feliu i wsp. 1977; Hers i Hue, 1983; Pilkis i Claus, 1991).

1.5. MIEJSCA REGULACJI GLIKOLIZY W TKANKACH OWADÓW I SKORUPIAKÓW

Glikoliza jest podstawową drogą kataboliczną przemiany pośredniej. Jest też powszechna w komórkach organizmów żywych. Jej aktywność wykazano w tkankach zarówno owadów (Humphrey i Siggins, 1949; Chefurka, 1955, 1965; McGinnis i wsp. 1956; Silva i wsp. 1958; Ito i Horie, 1959; Vogell i wsp. 1959; Agosin i wsp. 1961; Friedmann 1970, 1985; Crabtree i Newsholme, 1972), jak i skorupiaków (Boyland, 1928; Hu, 1958; Meenakshi i Scheer, 1961; Hochachka i wsp. 1962; McWhinnie

i Corkill, 1964; Keller, 1965; Huggins, 1966; Huggins i Munday, 1968; Boulton i Huggins, 1970; Schatzlein i wsp. 1973; Dendinger i Schatzlein, 1973). Co więcej, wykazano w tych badaniach, że glikoliza przebiega w tkankach owadów i skorupiaków zgodnie z ogólnie przyjętym schematem. Sugerowano, iż klasyczne miejsca regulacji aktywności glikolizy, tj. reakcje katalizowane przez fosfofruktokinazę i kinazę pirogronianową, pełnią tę funkcję także w tkankach owadów (Crabtree i Newshoime, 1972; Ford i Candy, 1972) i skorupiaków (Hochachka i wsp. 1971). Prace te uzasadniały podjęcie badań nad charakterystyką fosfofruktokinazy i kinazy pirogronianowej w tkankach skorupiaków i owadów. Ustalenie bowiem mechanizmów kontroli aktywności kluczowych enzymów glikolitycznych pozwalało na przedyskutowanie ich roli w regulacji metabolizmu węglowodanowego w tych tkankach².

² Krótki przegląd metod stosowanych w badaniach przedstawiono w ostatnim rozdziale pracy. Szczegółowo opisano je w cytowanych pracach: Lesicki, 1976, 1980, 1983ab; Lesicki i Jüngst, 1984; Lesicki i Kasprzyk, 1988.

2. GRUCZOŁ JELITA ŚRODKOWEGO SKORUPIAKÓW

U skorupiaków dziesięcionogich wokół jelita środkowego znajduje się duży, złożony z kilku płatów, gruczoł. Powstaje on wokół kanalików odchodzących od jelita środkowego tuż za żołądkiem, rozdzielających się i ślepo zakończonych wśród komórek gruczołu (Dall i Moriarty, 1983; McLaughlin, 1983). Strukturę gruczołu opisano u szeregu gatunków skorupiaków (Travis, 1955; Pillai, 1960; Dall, 1967; Bunt, 1968; Stanier i wsp. 1968; Madhyastha i Rangneker, 1974; Barker i Gibson, 1977; Gibson i Barker, 1979). Gruczoł ten niewątpliwie pełni funkcję trawienną, wydzielając enzymy trawiące białka (Krüger i Graetz, 1927; Rosen, 1937; De Villez i Buschleu, 1967; Kleine i wsp. 1967ab; Brockerhoff i wsp. 1970; Kleine i Spangenberg, 1974), cukrowce (Wiersma i Van der Veen, 1928; Van Weel, 1970; Wojtowicz i Brockerhoff, 1972; Brun i Wojtowicz, 1976; Dall i Moriarty, 1983) oraz tłuszcze (Kruger i Graetz, 1928; Brockerhoff i wsp. 1967, 1970; Loizzi i Paterson, 1971), a także produkując substancje emulsyfikujące tłuszcze (Van den Oord, 1966; Holwerda i Vonk, 1973). Trawienie pokarmu odbywa się przede wszystkim w świetle kanalików gruczołu, którego komórki wchłaniają produkty trawienia (Speck i Urich, 1970; Dall i Moriarty, 1983). Zaledwie 9% wchłanianej glukozy trafia w niezmienionej postaci do hemolimfy, reszta przekształcana jest przez komórki gruczołu w glikogen, maltozę, galaktozę, trehalozę, kwasy organiczne i aminokwasy. Podobnie intensywnie metabolizowane są wchłaniane aminokwasy i kwasy tłuszczowe (Speck i Urich, 1972a; Urich i wsp. 1973). Komórki gruczołu zdolne są do akumulowania tłuszczowców (Stanier i wsp. 1968; Loizzi, 1971; Momin i Rangneker, 1975) i glikogenu (Loizzi, 1971; Rangneker i Momin, 1974). Zawartość magazynowanych tłuszczowców, białek i glikogenu ulega istotnym zmianom w różnych stanach metabolicznych skorupiaków (Renaud, 1949; Heath i Barnes, 1970; Madhyastha i Rangneker, 1974; Spindler-Barth, 1976; Chang i O'Connor, 1983) i jest ona kontrolowana hormonalnie (Kincaid i Scheer, 1952; Neiland i Scheer, 1953; Parvathy, 1971, 1972; Madhyastha i Rangneker, 1976). Zapasy glikogenu miałyby służyć stabilizowaniu poziomu glukozy w hemolimfie skorupiaków (Heath i Barnes, 1970; Spindler-Barth, 1976) oraz do uzupełniania puli glukozy, niezbędnej do syntezy nowego szkieletu zewnętrznego po linieniu (Renaud, 1949; Madhyastha i Rangneker, 1974). Sugestie te zgodne były z tezą, iż gruczoł jelita środkowego łączy trawienne funkcje trzustki i metaboliczne funkcje wątroby kręgowców (Vonk, 1960), którą to tezę przyjmowano już wcześniej, posługując się terminem wątrobotrzustka dla określenia tego organu. Podobieństwa funkcji tego gruczołu skorupiaków do funkcji wątroby ssaków zostały jednak zanegowane (Van Weel, 1970, 1974; Dall i Moriarty, 1983), w konsekwencji czego zalecono używanie nazwy gruczoł jelita środkowego zamiast nieadekwatnego terminu wątrobotrzustka (Van Weel, 1974). To zalecenie oparto co najmniej na trzech przesłan-

kach. Po pierwsze, stwierdzano trudności z wykazaniem aktywności kluczowych enzymów przemiany pośredniej (Schatzlein i wsp. 1973), typowej dla metabolizmu wątroby (Newsholme i Leech, 1983). Po drugie, kwas mlekowy powstający po wysiłku w mięśniach skorupiaków przekształcany jest z powrotem w glukozę przy niewielkim udziale tego gruczołu (Phillips i wsp. 1977), podczas gdy przemiana taka jest charakterystyczną funkcją wątroby ssaków (Newsholme i Start, 1973). Po trzecie wreszcie, początkowe wyniki wskazywały, że glikogen zawarty w gruczole jelita środkowego nie jest źródłem podwyższonego poziomu glukozy w hemolimfie w odpowiedzi na iniekcję hormonu hiperglikemicznego (Keller i Andrew, 1973; Telford, 1975), podczas gdy glikogen wątrobowy zużywany jest dla podwyższenia poziomu glukozy we krwi ssaków (Newsholme i Start, 1973; Newsholme i Leech, 1983). Sugerowano także, że zapasy glikogenu gromadzone w hemocytach hemolimfy mogą spełniać rolę rezerwy glukozy dla stabilizowania jej poziomu w hemolimfie, jak również dla cyklicznej syntezy chityny w epidermie (Johnston i wsp. 1971, 1973; Johnston i Davies, 1972; Williams i Lutz, 1975ab; Bauchau i Mingeot, 1978). Zalecona nazwa gruczoł jelita środkowego nie została jednak powszechnie zaakceptowana. Termin wątrobotrzuska jest nadal używany, co więcej, ponownie uzasadniano jego adekwatność i celowość stosowania (Gibson i Baker, 1979). Enzymy katalizujące reakcje glukoneogenezy (drogi metabolicznej charakterystycznej dla wątroby ssaków) są aktywne w omawianym gruczole (Munday i Poat, 1971; Van Marrewijk i wsp. 1973; Giles i wsp. 1976b; Phillips i wsp. 1977). Ponowne badania, z zastosowaniem bardziej czułych technik, wykazały, że gruczoł jelita środkowego jest tkanką docelową dla hormonu hiperglikemicznego skorupiaków (Sedlmeier i Keller, 1981), zdolną do uwalniania glukozy do hemolimfy (Sedlmeier, 1985, 1987).

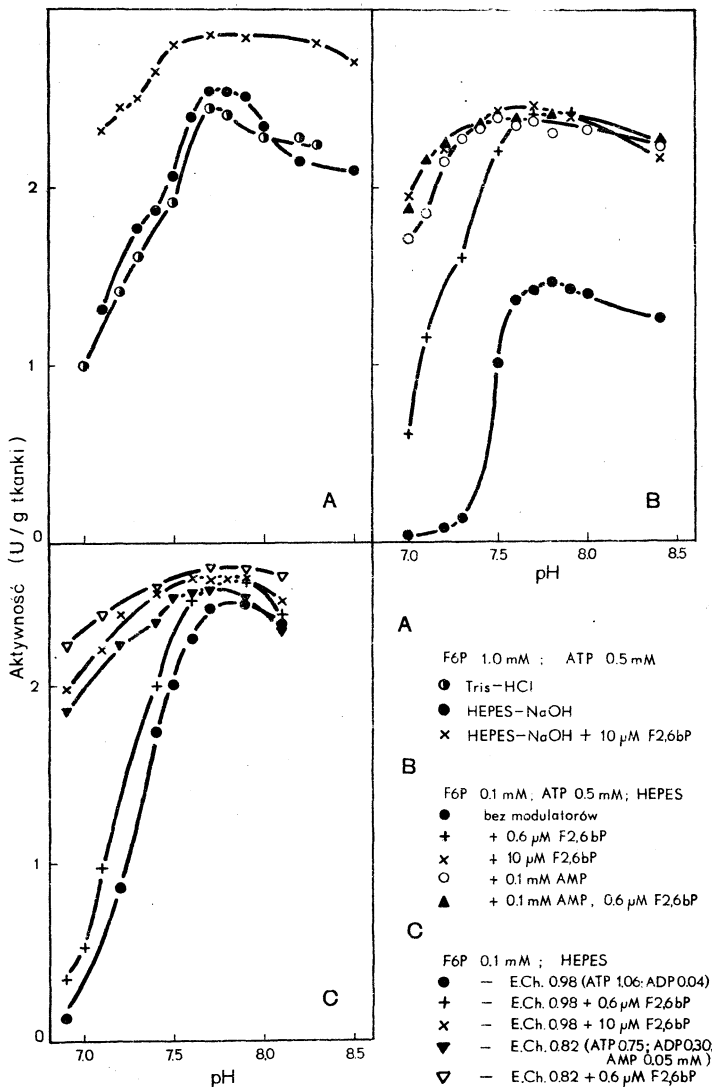
Gruczoł jelita środkowego nie pełni funkcji wyłącznie trawiennych w organizmie skorupiaków. Jest tkanką gromadzącą zapasy węglowodanowe, tłuszczowcowe i białkowe. Ponieważ w jego obrębie zachodzi prawie całkowicie wchłanianie strawionego pokarmu, można przypuszczać, iż komórki gruczołu pełnią funkcje spichrzowe nie tylko dla zaspokajania swoich potrzeb, ale zgromadzone w nich zapasy stanowią rezerwę dla wszystkich tkanek skorupiaaka. Można doszukiwać się podobieństw funkcji tego gruczołu do wątroby czy tkanki tłuszczowej ssaków, czy też wreszcie do ciała tłuszczowego owadów, pamiętając jednocześnie, że komórki gruczołu jelita środkowego nie są hepatocytami, toteż podobieństwa pomiędzy nimi w pewnych aspektach, na przykład metabolizmu węglowodanowego, nie muszą wykluczać różnic w innych procesach. Znajdując takie podobieństwa nie można jednak przenosić na gruczoł jelita skorupiaków całej charakterystyki metabolizmu wątroby ssaków. Konieczne są więc dalsze badania nad metabolizmem tej tkanki, które w pełni wytłumaczą jej rolę w organizmie skorupiaków.

2.1. FOSFOFRUKTOKINAZA Z GRUCZOŁU JELITA ŚRODKOWEGO SKORUPIAKÓW

Po trudnościach z wykryciem aktywności fosfofruktokinazy w gruczole jelita środkowego kraba *Pachygrapsus crassipes* (Schatzlein i wsp. 1973), enzym ten stwierdzono w gruczole raka *O. limosus* i wstępnie go scharakteryzowano (Lesicki, 1980, 1983d).

2.1.1. Wpływ pH

Fosfofruktokinaza gruczołu jelita środkowego raka *O. limosus* funkcjonuje z maksymalną szybkością w zakresie pH od 7,7 do 7,9 (Rys. 2A). Ten wierzchołek aktywności nie zależy od bufora w środowisku reakcji, choć w buforze HEPES-NaOH aktywność en-



Rys. 2. Wpływ pH na aktywność fosfofruktokinazy gruczołu jelita środkowego raka *O. limosus*. (A) Zależność mierzono w optymalnych stężeniach substratów (F6P 1 mM, ATP 0,5 mM) w dwóch buforach: Tris-HCl lub HEPES-NaOH. (B) Zależność mierzono w niskim stężeniu F6P (0,1 mM) oraz w różnych stężeniach aktywatorów F-2,6-bP i AMP. (C) Wpływ „potencjału energetycznego” nukleotydów adenylowych (E.Ch.) na badaną zależność.

zymu jest nieco wyższa niż w pozostałych buforach. Optimum pH dla fosfofruktokinazy jest takie samo przy wysokim (Rys. 2A) i niskim (Rys. 2B) stężeniu substratu F6P. Aktywność enzymu gwałtownie spada poniżej pH 7,5. Przy niskim stężeniu substratu aktywność maleje tak znacznie, że w pH 7,0 - 7,2 jest praktycznie niezmiernalna (Rys. 2B).

Fruktozo-2,6-bisfosforan aktywuje fosfofruktokinazę gruczołu jelita środkowego *O.limosus* w szerokim zakresie pH (Rys. 2AB). Szczególnie silnie przejawia się ta aktywacja w pH niższych od 7,5, zwłaszcza przy niskim stężeniu substratu.

Fruktozo-2,6-bisfosforan współdziała z AMP w aktywowaniu PFK gruczołu jelita środkowego (Rys. 2B). F-2,6-bP w stężeniu 0,6 μM nie wystarcza do pełnej aktywacji PFK w pH niższym od 7,5. Ale to stężenie F-2,6-bP, podane w obecności 0,1 mM AMP, aktywuje enzym w takim samym stopniu jak 10 μM F-2,6-bP. Wspólna aktywacja PFK przez 0,6 μM F-2,6-bP i 0,1 mM AMP przewyższa aktywujące działanie samego AMP.

Współdziałanie fruktozo-2,6-bisfosforanu i AMP w aktywacji PFK gruczołu jelita środkowego potwierdzają krzywe zależności aktywności enzymu od pH wyznaczone w obecności różnego „potencjału energetycznego” nukleotydów adenylowych³ (Rys. 2C). Przy „potencjale” równym 0,98 (a więc, gdy pułk nukleotydów adenylowych stanowił przede wszystkim ATP), wierzchołek aktywności wypada przy pH 7,7 - 7,9, a poniżej pH 7,5 aktywność gwałtownie maleje. Dodanie do płynu inkubacyjnego fruktozo-2,6-bisfosforanu w stężeniu końcowym 0,6 μM w niewielkim stopniu modyfikowało tę zależność. Natomiast gdy F-2,6-bP jest znacznie bardziej stężony (10 μM), obserwuje się silną aktywację enzymu w pH poniżej 7,5. Gdy „potencjał energetyczny” maleje do 0,82 (tzn. w medium inkubacyjnym wzrasta stężenie AMP), optimum pH nie ulega zmianie, ale obniżenie aktywności PFK w niższych pH jest znacznie mniejsze. Jest jeszcze mniejsze, gdy w środowisku reakcji o „potencjale” 0,82 pojawia się 0,6 μM F-2,6-bP.

2.1.2. Zależność aktywności od stężenia ATP

PFK gruczołu jelita środkowego *O.limosus* cechuje hiperboliczna kinetyka z ATP jako substratem (Lesicki, 1980). Powinowactwo enzymu do substratu zależy od stężenia F6P (Tablica 1). W wysycających enzym stężeniach F6P, a także w obecności 0,1 mM AMP lub 10 μM F-2,6-bP, stwierdzano znacznie niższą wartość $S_{0,5}$ wobec ATP niż w stężeniu fizjologicznym (F6P= 0,1 mM). Wskazuje to, że kosubstrat (F6P) i aktywatory (AMP, F-2,6-bP) zwiększają powinowactwo enzymu do ATP.

ATP, jak w stosunku do fosfofruktokinaz z innych źródeł, jest dla PFK raka *O.limosus* nie tylko substratem, ale i inhibitorem (Lesicki, 1980). Stężenia ATP powyżej 1 mM gwałtownie hamują aktywność enzymu, a częściowo przeciwdziałają temu wzrost stężenia jonów Mg^{2+} (Lesicki, 1980). Szczególną rolę w przywracaniu aktywności PFK

³ „Potencjał energetyczny” (energy charge, E.Ch.) nukleotydów adenylowych określa wzajemny stosunek ATP, ADP i AMP w puli nukleotydów adenylowych. Wyznaczany jest na podstawie równania „potencjału energetycznego” (Atkinson i Walton, 1967):

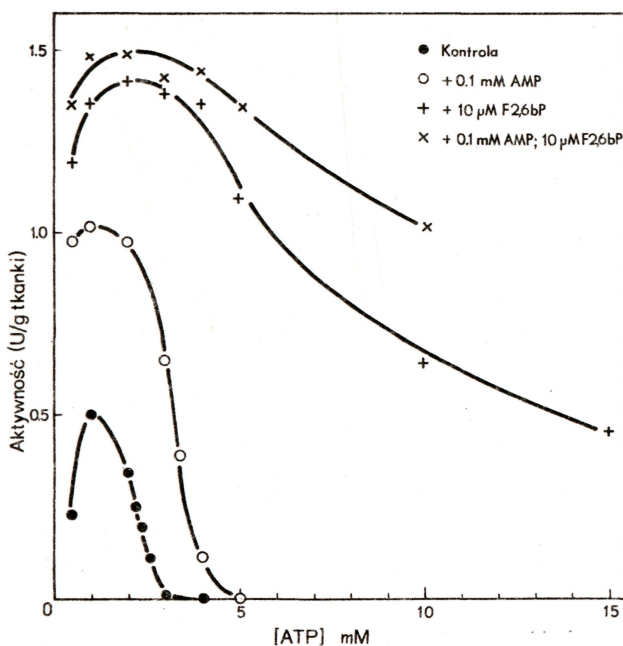
$$\frac{[\text{ATP}] + 1/2 [\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]} = \text{E.Ch.}$$

Tablica 1. Powinowactwo fosfofruktokinazy gruczołu jelita środkowego raka *O. limosus* do ATP jako substratu.

F6P mM	AMP mM	F-2,6-bP mM		$S_{0,5}$	n_H
0,1	0	0	(5)	185 ± 5	$0,98 \pm 0,01$
0,1	0,1	0	(4)	45 ± 6	$1,00 \pm 0,01$
0,1	0	0,01	(3)	43 ± 9	$1,01 \pm 0,01$
1,0	0	0	(4)	52 ± 8	$0,98 \pm 0,01$

Podano wartości średnie \pm S.E. Pomiary prowadzono w pH 7,6. Wartości $S_{0,5}$ wyrażono w μ M. W nawiasach podano liczbę eksperymentów.

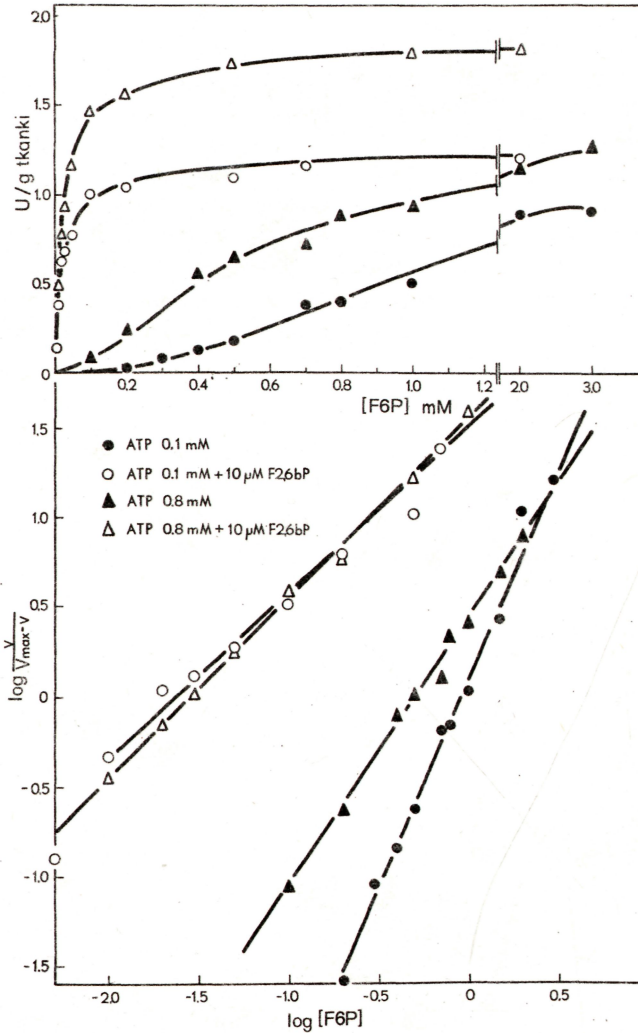
pełnią jednak aktywatory AMP i F-2,6-bP (Rys. 3). W niskim fizjologicznym stężeniu F6P (0,04 mM) aktywność PFK jest niewielka i przy wzroście stężenia ATP powyżej 1 - 2 mM raptownie spada do zera. AMP aktywuje enzym i przesuwa hamujące działanie ATP w wyższe stężenia: np. PFK jest całkowicie nieaktywna przy 3 mM ATP i bez AMP w środowisku reakcji, natomiast w obecności 0,1 mM AMP aktywność PFK przewyższa najwyższą aktywność osiąganą bez aktywatora. 10 μ M F-2,6-bP zwiększa aktywność PFK wielokrotnie i w jego obecności enzym jest aktywny nawet w stężeniach 10-15 mM ATP. AMP i F-2,6-bP współdziałają przeciwko inhibicji enzymu przez ATP. W ich wspólnej obecności PFK jest lepiej chroniona przed hamującym działaniem wyższych stężeń ATP.



Rys.3. Hamowanie aktywności fosfofruktokinazy gruczołu jelita środkowego raka *O. limosus* przez wyższe stężenia ATP. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,6 w obecności 0,04 mM F6P oraz przy braku lub w obecności 0,1 mM AMP i 10 μ M F-2,6-bP.

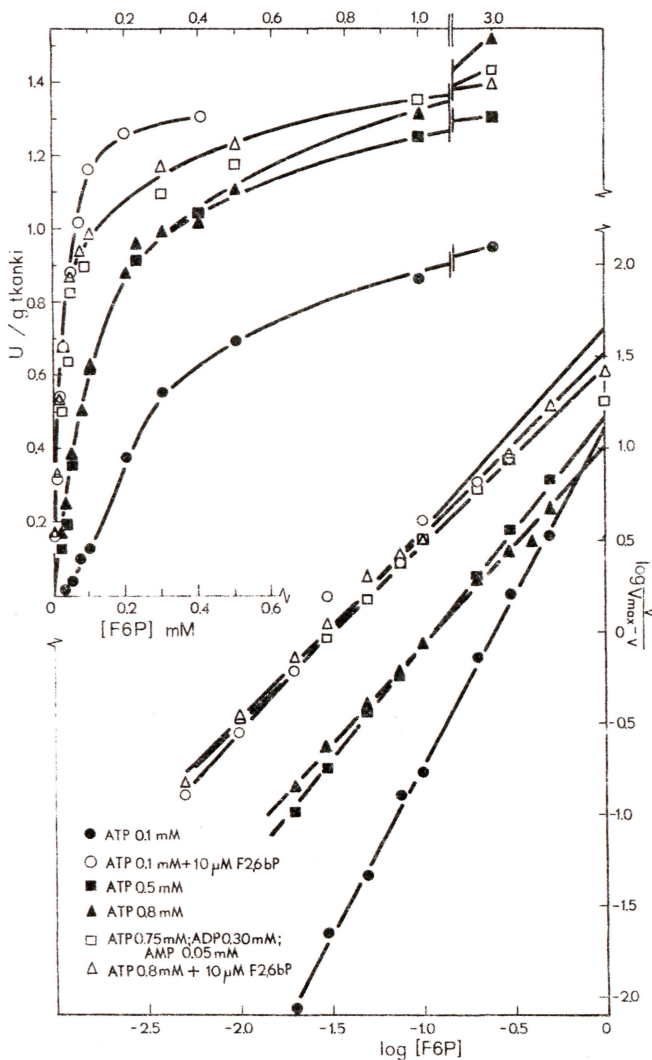
2.1.3. Zależność aktywności od stężenia fruktozo-6-fosforanu

PFK gruczołu jelita środkowego raka *O. limosus* cechuje sigmoidalna krzywa kinetyki reakcji z fruktozo-6-fosforanem jako substratem (Lesicki, 1980). Stopień współdziałania enzymu z substratem zależy od pH środowiska reakcji, od stężeń drugiego substratu (a zarazem inhibitora) ATP, oraz od stężeń aktywatorów AMP i F-2,6-bP



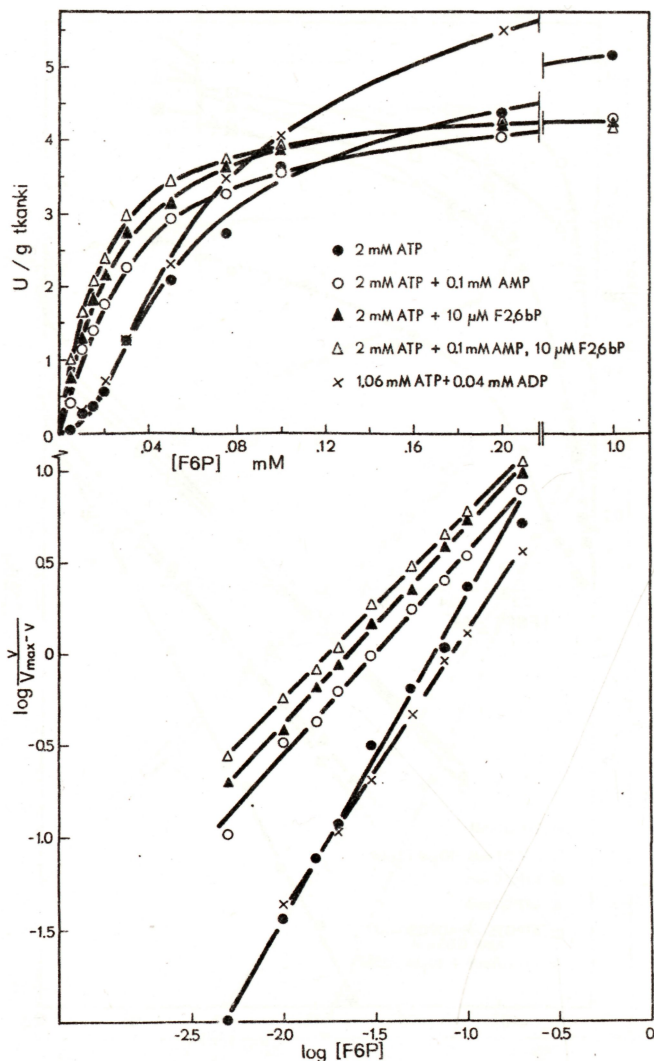
Rys.4. Zależność aktywności fosfofruktokinazy gruczołu jelita środkowego raka *O. limosus* od stężenia substratu fruktozo-6-fosforanu. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,0 w obecności 0,1 lub 0,8 mM ATP oraz przy braku lub w obecności 10 μ M F-2,6-bP. W dolnej części rysunku przedstawiono zależność w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tabelcy 2.

(Rys. 4 - 6). W niższym pH (7,0) oraz przy niższym stężeniu ATP (0,1 mM) enzym cechuje najmniejsze powinowactwo do substratu, wyrażane wysoką wartością stałej $S_{0,5}$ (907 μM ; Tablica 2) oraz wysokim współczynnikiem Hilla n_H (2,4; Tablica 2). Powinowactwo PFK do F6P wzrasta wraz ze stężeniem ATP i pH środowiska. Przy optymalnym stężeniu ATP, równym 0,8 mM (Lesicki, 1980), i pH 7,0 enzym nadal cechuje



Rys. 5. Zależność aktywności fosfofruktokinazy gruczołu jelita środkowego raka *O. limosus* od stężenia substratu fruktozo-6-fosforanu. Pomiarzy prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,6 w obecności 0,1; 0,5; 0,75 lub 0,8 mM ATP oraz przy braku lub w obecności 10 μM F-2,6-bP, 0,05 mM AMP i 0,3 mM ADP. W dolnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tabelcy 2.

sigmoidalna kinetyka z F6P (Rys. 4, Tablica 2), natomiast w pH 7,6 sigmoidalny kształt krzywej kinetyki ledwie zaznacza się (współczynnik Hilla bliski 1; Rys. 5, Tablica 2). Wzrost stężenia ATP do 2 mM (Rys. 6) zwiększa jeszcze bardziej powinowactwo do substratu ($S_{0,5}=66 \mu\text{M}$; Tablica 2), lecz hamujące działanie ATP przejawia się w powrocie do sigmoidalnego kształtu krzywej kinetyki reakcji ($n_H=1,73$).



Rys. 6. Zależność aktywności fosfofruktokinazy gruczołu jelita środkowego raka *O.limosus* od stężenia substratu fruktozo-6-fosforanu. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,6 w obecności 1,06 lub 2 mM ATP oraz przy braku lub w obecności 0,01 mM F-2,6-bP, 0,1 mM AMP i 0,04 mM ADP. W dolnej części rysunku zależność przedstawiono w postaci wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tablicy 2.

F-2,6-bP silnie aktywuje PFK gruczołu jelita środkowego raka (Rys. 4-6; Tablica 2). W jego obecności kształt krzywej kinetyki z F6P jako substratem zmienia się w hiperboliczny (współczynnik Hilla bliski lub równy 1; Tablica 2) i wielokrotnemu obniżeniu ulega stała $S_{0,5}$, co obserwowano we wszystkich badanych warunkach reakcji. W obecności 10 MMF-2,6-bP stwierdzano pełną aktywację enzymu i niezależność obu parametrów kinetycznych ($S_{0,5}$ i n_H) od pH i stężenia ATP (Tablica 2).

Tablica 2. Powinowactwo fosfofruktokinazy gruczołu jelita środkowego raka *O. limosus* do substratu fruktozo-6-fosforanu

pH	ATP mM	F-2,6-bP mM	AMP mM	ADP mM		$S_{0,5}$	n_H
7,0	0,1	0	0	0	(1)	907	2,40
	1,0	0,01	0	0	(1)	26	0,96
	0,8	0	0	0	(1)	507	1,53
	0,8	0,01	0	0	(i)	28	1,01
7,6	0,1	0	0	0	(5)	247 ± 14	1,77 ± 0,07
	0,1	0,01	0	0	(3)	32 ± 10	1,09 ± 0,03
	0,5	0	0	0	(4)	116 ± 18	1,28 ± 0,08
	0,75	0	0,05	0,3	(4)	33 ± 4	1,00 ± 0,01
	0,8	0	0	0	(3)	116 ± 13	1,08 ± 0,04
	0,8	0,01	0	0	(3)	29 ± 6	1,00 ± 0,04
	1,06	0	0	0,04	(1)	81	1,51
	2,0	0	0	0	(1)	66	1,73
	2,0	0,01	0	0	(1)	22	1,08
	2,0	0	0,1	0	(1)	30	1,08
	2,0	0,01	0,1	0	(1)	17	1,01

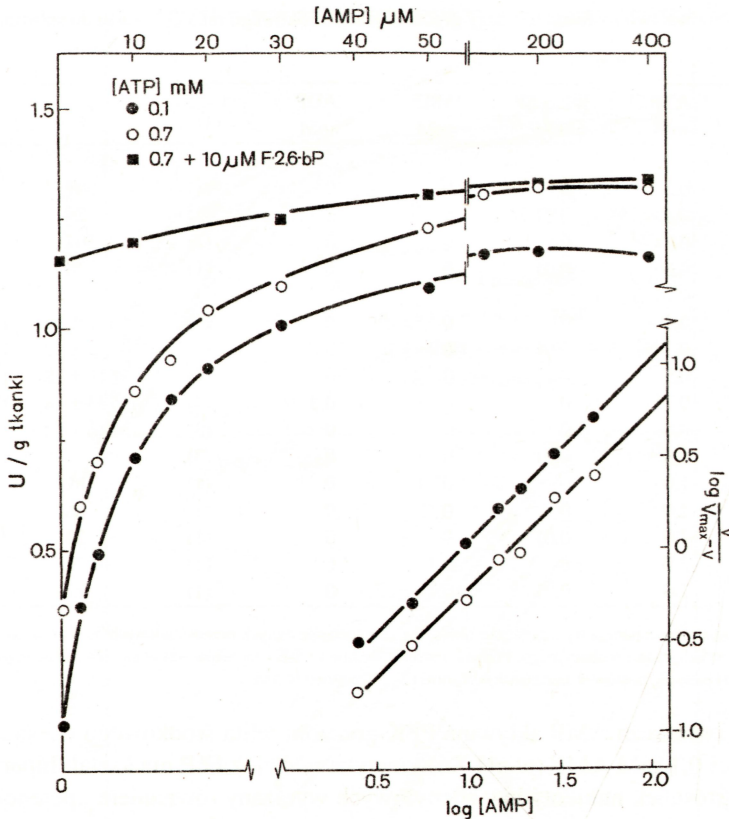
W tablicy zestawiono parametry kinetyczne obliczone na podstawie danych przedstawionych na Rys. 4 - 6, w podpisach których opisano skład płynu inkubacyjnego. Podano wartości średnie (\pm S.E.) wyników uzyskanych w poszczególnych eksperymentach (liczba eksperymentów w nawiasach). Wartości $S_{0,5}$ wyrażono w μ M.

ADP a zwłaszcza AMP aktywują PFK gruczołu jelita środkowego (Lesicki, 1980). W obecności 0,1 mM AMP (w pH 7,6) kinetyka reakcji z F6P ma kształt hiperboliczny. Wzajemny stosunek nukleotydów adenylowych wyrażany równaniem „potencjału energetycznego” istotnie wpływa na reakcję z F6P (Lesicki, 1980). Krzywa kinetyki jest sigmoidalna, gdy „potencjał energetyczny” jest bliski 1 (pułk nukleotydów adenylowych stanowi prawie w całości ATP). Natomiast staje się ona hiperboliczna z równoczesnym wzrostem powinowactwa PFK do F6P (obniżenie wartości $S_{0,5}$), gdy „potencjał energetyczny” ma wartość 0,82, która jest wartością fizjologiczną dla gruczołu jelita środkowego skorupiaków (Giles i wsp. 1976b).

Porównano aktywujące działanie ADP, AMP i F-2,6-bP na reakcję z F6P jako substratem mierzoną w pH 7,6 i w obecności 2 mM ATP (Rys. 6). W warunkach tych bez aktywatorów, PFK cechuje się stosunkowo dużym powinowactwem do substratu, mimo to sigmoidalny kształt krzywej kinetyki reakcji jest wyraźnie widoczny. ADP w stężeniu 0,04 mM nieznacznie zwiększa aktywność enzymu, a jego wpływ na parametry kinetyczne jest niewielki. Natomiast AMP i F-2,6-bP zmieniają kinetykę w jednoznacznie hiperboliczną, zwiększając jednocześnie powinowactwo do F6P (obniżenie stałej $S_{0,5}$).

2.1.4. Wpływ adenozy-5-monofosforanu

AMP aktywuje PFK gruczołu jelita środkowego w niskich stężeniach F6P i ATP (Rys. 7; Lesicki, 1980). Krzywa wysycenia enzymu aktywatorem ma kształt hiperboliczny, a połowę maksymalnej aktywacji (K_a) obserwuje się w zakresie stężeń 10-16 μM

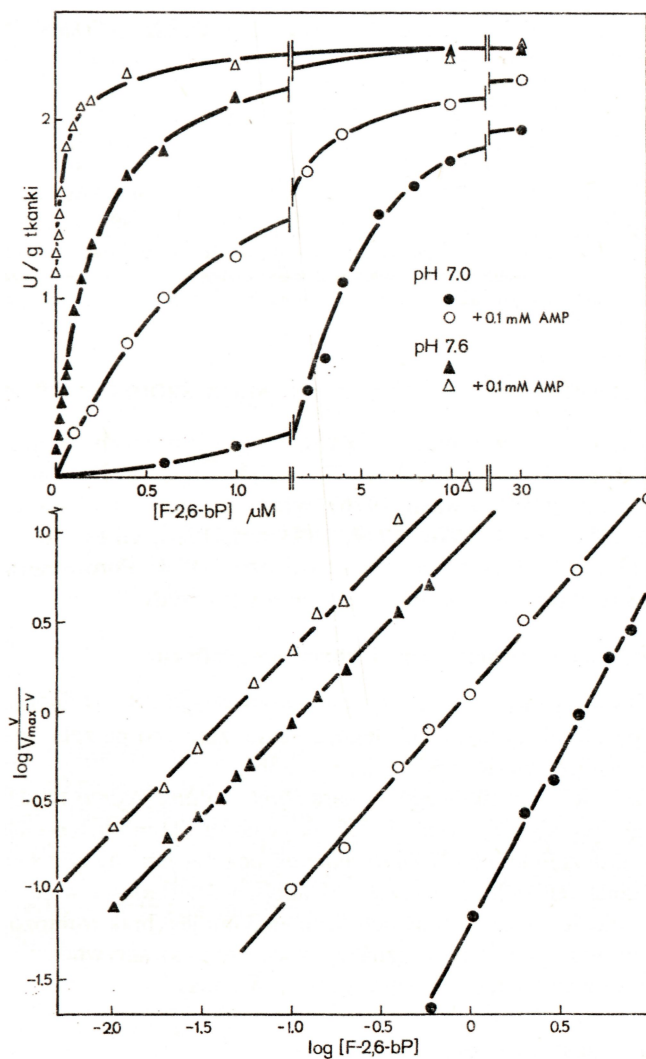


Rys. 7. Aktywacja fosfofruktokinazy gruczołu jelita środkowego raka *O. limosus* pod wpływem AMP. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,6 w obecności 0,1 mM F6P, 0,1 lub 0,7 mM ATP oraz przy braku lub w obecności 0,01 mM F-2,6-bP. Zależność przedstawiono również w postaci wykresu Hilla.

AMP. W pH 7,6 enzym aktywowany przez F-2,6-bP ulega tylko nieznacznej aktywacji przez AMP (Rys. 2C, 7). W niższych pH współdziałanie obu aktywatorów jest wyraźniejsze (Rys. 2C) i pozwala na pełną aktywację enzymu już przez takie stężenia aktywatorów, które samodzielnie nie wystarczają do całkowitej aktywacji.

2.1.5. Wpływ fruktozo-2,6-bisfosforanu

Fruktozo-2,6-bisfosforan jest bardzo silnym aktywatorem PFK gruczołu jelita środkowego raka *O. limosus*, przejawiającym działanie już w nanomolarnych stężeniach (Rys. 8). Powinowactwo PFK do F-2,6-bP zależy od pH (Tablica 3). W pH 7,6 jest ono znacznie większe niż w pH 7,0; wartość K_a jest w tym pH ponad trzydziestokrotnie niż-



Rys. 8. Zależność aktywności fosfofruktokinazy gruczołu jelita środkowego raka *O. limosus* od stężenia aktywatora fruktozo-2,6-bisfosforanu. Pomiarzy prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,0 lub 7,6 w obecności 0,04 mM F6P i 3 mM ATP oraz przy braku lub w obecności 0,1 mM AMP. W dolnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tablicy 3.

sza: Co więcej, krzywa aktywacji PFK ma kształt w przybliżeniu hiperboliczny ($n_H = 1,12$), natomiast w pH 7,0 wyraźny jest sigmoidalny charakter zależności ($n_H = 1,79$; Rys. 8, Tablica 3).

AMP ułatwia aktywujące działanie F-2,6-bP. W obecności tego nukleotydu powinowactwo PFK do F-2,6-bP zwiększa się (obniżenie wartości K_a), co szczególnie widoczne jest w pH 7,0. W obecności 0,1 mM AMP wartość stałej K_a jest ponad pięciokrotnie niższa a krzywa aktywacji traci swój sigmoidalny kształt (Rys. 8; Tablica 3).

Tablica 3. Powinowactwo fosfofruktokinazy gruczołu jelita środkowego raka *O. limosus* do aktywatora fruktozo-2,6-bisfosforanu.

pH	AMP		K_a	n_H
7,0	-	(3)	4480 ± 22	1,79 ± 0,02
	+	(3)	839 ± 31	1,17 ± 0,04
7,6	-	(3)	136 ± 68	1,12 ± 0,07
	+	(2)	49	1,10

W tablicy zestawiono parametry kinetyczne obliczone na podstawie danych przedstawionych na Rys. 8, w podpisie którego opisano skład płynu inkubacyjnego. Podano wartości średnie (\pm S.E.) wyników uzyskanych w poszczególnych eksperymentach (liczba eksperymentów w nawiasach). Znakiem „+” oznaczono dodanie 0,1 mM AMP, znakiem „-” brak AMP. Wartości K_a wyrażono w nM.

2.2. KINAZA PIROGRONIANOWA GRUCZOŁU JELITA ŚRODKOWEGO SKORUPIAKÓW

Aktywność kinazy pirogronianowej wykryto w ekstraktach z gruczołu jelita środkowego szeregu gatunków skorupiaków (Schatzlein i wsp. 1973; Van Marrewijk i wsp. 1973; Van Marrewijk i De Zwaan, 1976). Własności enzymu scharakteryzowano w szeregu prac (Lesicki, 1974, 1976, 1977, 1983abc, 1988; Giles i wsp. 1975, 1976abc, 1977; Giles i Poat, 1980; Trausch i Bauchau, 1980, 1984). Porównaniu wyników przedstawionych w tych pracach poświęcono niniejszy rozdział.

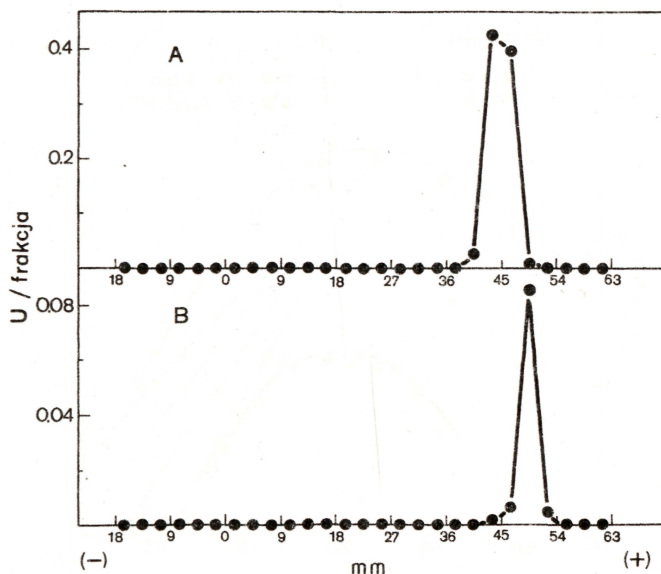
2.2.1. Badania elektroforetyczne i chromatograficzne

Kinaza pirogronianowa gruczołu jelita środkowego raka *O. limosus* występuje jako pojedyncze pasmo aktywności po elektroforezie, zarówno na żelu agarowym (Lesicki, 1976), jak i skrobiowym (Rys. 9; Lesicki, 1983b).

PK gruczołu jelita środkowego homara *Homarus americanus* rozdzielana na DEAE-celulozie daje pojedynczy wierzchołek aktywności (Trausch i Bauchau, 1984), natomiast enzym gruczołu kraba *Carcinus maenas*, oczyszczany na tym samym nośniku, daje dwa wyraźnie oddzielone wierzchołki aktywności (Giles i wsp. 1986a). Ponieważ warunkiem pojawienia się tych dwóch form enzymu jest brak fruktozo-1,6-bisfosforanu w buforze chromatograficznym, uznano, iż wierzchołki aktywności reprezentują dwie odmiany konformacyjne tego samego enzymu (Munday i wsp. 1980).

2.2.2. Ciężar cząsteczkowy

Ciężar cząsteczkowy podjednostki oczyszczonej PK gruczołu jelita środkowego, wyznaczony w elektroforezie na żelu poliakrylamidowym w obecności siarczanu dodecyłu, wynosi 55 000 dla *C. maenas* (Giles i wsp. 1976a) oraz 65 000 dla *H. americanus* (Trausch i Bauchau, 1984).



Rys. 9. Rozdział elektroforetyczny na żelu skrobiowym ekstraktów tkankowych z: (A) mięśnia odwłokowego, (B) gruczołu jelita środkowego raka *O. limosus*. Po rozdziale żel cięto na 3 mm odcinki, z których ekstrakt testowano na obecność kinazy pirogronianowej w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,0 w obecności 1,5 mM PEP i 1 mM ADP. (Cytowano za: Lesicki, 1983b (zmodyfikowane)).

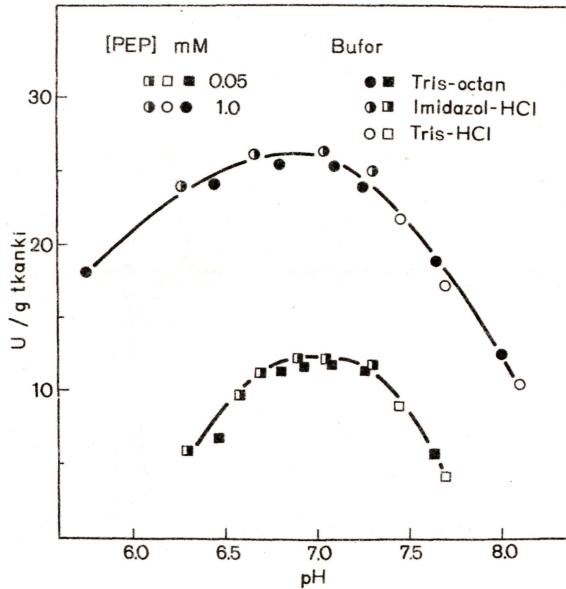
Ciężar cząsteczkowy enzymu kraba *C. maenas* określany na żelu Sephadex G-200 wahał się od 170 000 do 247 000, co sugeruje, iż struktura natywnego enzymu może ulegać zmianom, od trimerycznej do pentamerycznej (Giles i wsp. 1976a; Munday i wsp. 1980).

2.2.3. Zależność aktywności od pH

PK gruczołu jelita środkowego *O. limosus* wykazuje maksymalną aktywność w stosunkowo szerokim zakresie pH 6,7 - 7,4 (Rys. 10), typowym dla PK tkanek zwierzęcych (Hall i Cottam, 1978). PK z gruczołów kraba *C. maenas* (Giles i wsp. 1976abc) i homara *H. americanus* (Trausch i Bauchau, 1984) charakteryzowano w pH 7,4, co pozwala przypuszczać, choć w pracach tych nie zaprezentowano dokładniejszych wyników, iż także te enzymy działają maksymalnie w zakresie pH podobnym do optymalnego dla *O. limosus*.

2.2.4. Zależność aktywności od stężenia adenozyndifosforanu

Podobnie jak w przypadku PK szeregu tkanek ssaków (Tanaka i wsp. 1967; Imamura i wsp. 1972; Carbonell i wsp. 1973), zależność aktywności PK gruczołu jelita środkowego skorupiaków od stężenia ADP opisuje krzywa hiperboliczna (Lesicki, 1976; Giles i wsp. 1976b). W przeciwieństwie do enzymów z innych źródeł (Hall i Cottam, 1978), powinowactwo PK gruczołu jelita środkowego skorupiaków zależy od stężenia drugiego



Rys. 10. Zależność aktywności kinazy pirogronianowej gruczołu jelita środkowego raka *O. limosus* od pH. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym w obecności 1 mM ADP, 0,05 lub 1,0 PEP, w jednym z trzech buforów: Tris-octan, Tris-HCl lub imidazol-HCl.

substratu, tj. fosfoenolpirogronianu, którego wzrost powoduje zwiększenie powinowactwa enzymu do ADP, wyrażany obniżeniem stałej $S_{0,5}$ wobec ADP (Tablica 4; Giles i wsp. 1976b).

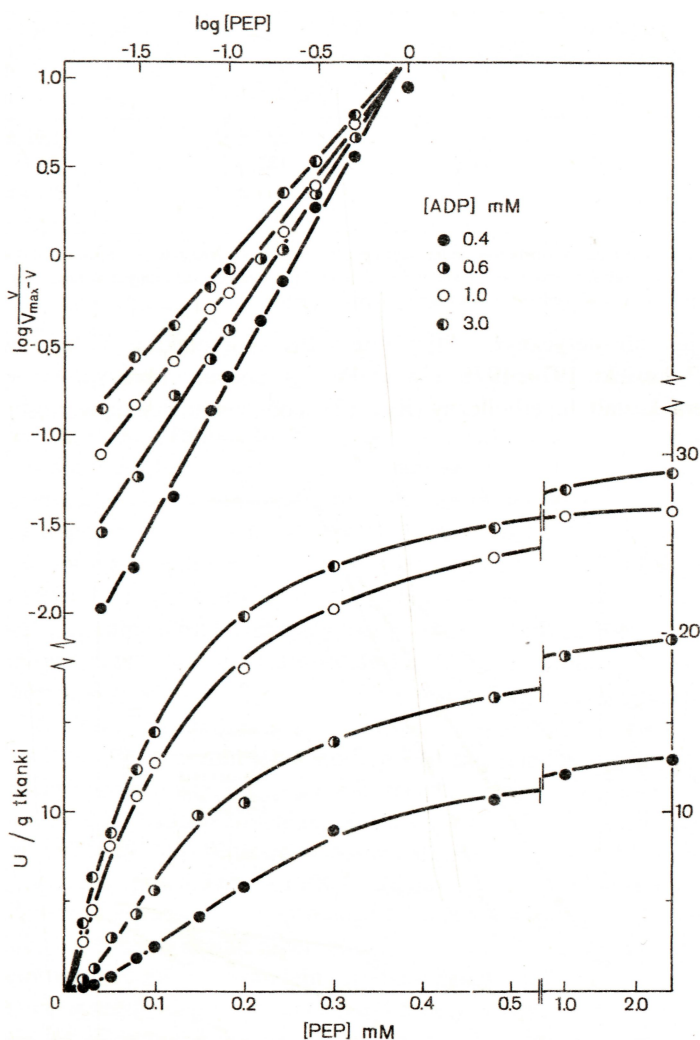
Tablica 4. Powinowactwo kinazy pirogronianowej gruczołu jelita środkowego raka *O. limosus* do ADP jako substratu.

PEP mM		$S_{0,5}$ mM	n_H
0,1	(3)	$0,89 \pm 0,03$	$1,01 \pm 0,01$
0,5	(2)	0,62	1,00
1,0	(3)	$0,30 \pm 0,02$	$0,99 \pm 0,01$

Podano wartości średnie \pm S.E. W nawiasach podano liczbę eksperymentów. Pomiary prowadzono w pH 7,0 w obecności trzech różnych stężeń PEP: 0,1, 0,5 i 1,0 mM.

2.2.5. Zależność aktywności od stężenia fosfoenolpirogronianu

Krzywa kinetyki reakcji z fosfoenolpirogronianem jako substratem, charakteryzująca PK gruczołu jelita środkowego skorupiaków, ma kształt sigmoidalny (Giles i wsp. 1975, 1976b; Lesicki, 1974, 1976; Trausch i Bauchau, 1984). Wskazuje to na pozytywny efekt homotropowy wywołany w strukturze enzymu poprzez wiązanie tego substratu. Powinowactwo PK do PEP zależy od stężenia drugiego substratu, tj. ADP, (Rys. 11, Tablica 5; Giles i wsp. 1976b). Obniżenie stężenia ADP powoduje spadek po-



Rys. 11. Zależność aktywności kinazy pirogronianowej gruczołu jelita środkowego raka *O. limosus* od stężenia substratu fosfoenolpirogonianu. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,0 w obecności 0,4; 0,6; 1,0 lub 3,0 mM ADP. W górnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tabelicy 5.

winowactwa PK do PEP (wzrost wartości stałych $S_{0,5}$) i jednoczesny wzrost kooperatywnego oddziaływania substratu i enzymu (wzrost wartości współczynników Hilla) zarówno w przypadku raka *O. limosus* jak i kraba *C. maenas*. Powinowactwo PK gruczołu jelita środkowego skorupiaków do PEP zależy również od:

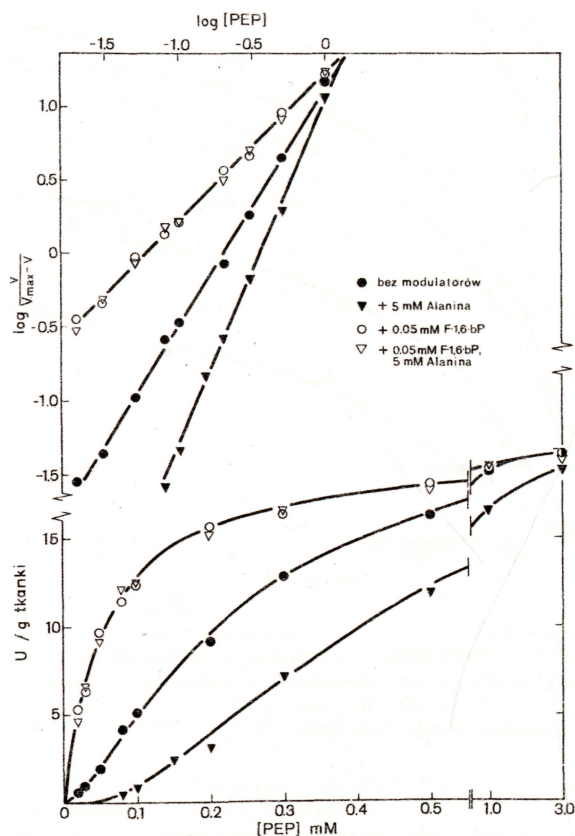
- 1) stężenia fruktozo-1,6-bisfosforanu, 2) stężenia alaniny, 3) stężenia ATP, 4) fosforylacji cząsteczki enzymu przez kinazę białkową zależną od cyklicznego AMP.

Tablica 5. Powinowactwo kinazy pirogronianowej gruczołu jelita środkowego raka *O. limosus* do fosfoenolpirogonianu jako substratu.

ADP mM		$S_{0,5}$	n_H
0,4	(3)	237 ± 43	$1,92 \pm 0,11$
0,6	(1)	182	1,59
1,0	(7)	144 ± 3	$1,26 \pm 0,02$
3,0	(1)	102	1,18

W tablicy zestawiono parametry kinetyczne obliczone na podstawie danych przedstawionych na Rys. 11, w podpisie którego opisano skład płynu inkubacyjnego. Podano wartości średnie (\pm S.E.) wyników uzyskanych w poszczególnych eksperymentach (liczba eksperymentów w nawiasach). Wartości $S_{0,5}$ wyrażono w μ M.

F-1,6-bP jest allosterycznym aktywatorem PK skorupiaków (Giles i wsp. 1975, 1976abc, 1977; Lesicki, 1974, 1976, 1983a). W jego obecności krzywa kinetyki reakcji z PEP przybiera kształt hiperboliczny (Rys. 12), a obniżeniu ulegają wartości stałej $S_{0,5}$



Rys. 12. Wpływ fruktozo-1,6-bisfosforanu i alaniny na zależność aktywności kinazy pirogronianowej gruczołu jelita środkowego raka *O. limosus* od stężenia fosfoenolpirogonianu. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,0 w obecności 0,5 mM ADP oraz 0,05 mM F-1,6-bP lub/i 5 mM alaniny. W górnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tablicy 6.

Tablica 6. Zestawienie parametrów kinetycznych charakteryzujących wpływ fruktozo-1,6-bisfosforanu, alaniny i ATP na kinetykę reakcji kinazy pirogronianowej gruczołu jelita środkowego raka *O.limosus* wobec fosfoenolpirogronianu jako substratu.

F-1,6-bP mM	Alanina mM	ATP mM		$S_{0,5}$	n_H
0	0	0	(3)	199 ± 23	$1,60 \pm 0,12$
0,05	0	0	(3)	60 ± 8	$1,00 \pm 0,01$
0	5	0	(3)	355 ± 35	$2,27 \pm 0,08$
0,05	5	0	(2)	63	1,01
0	0	1	(2)	269	1,96
0	0	5	(3)	380 ± 31	$2,57 \pm 0,14$
0,05	0	5	(1)	65	1,03

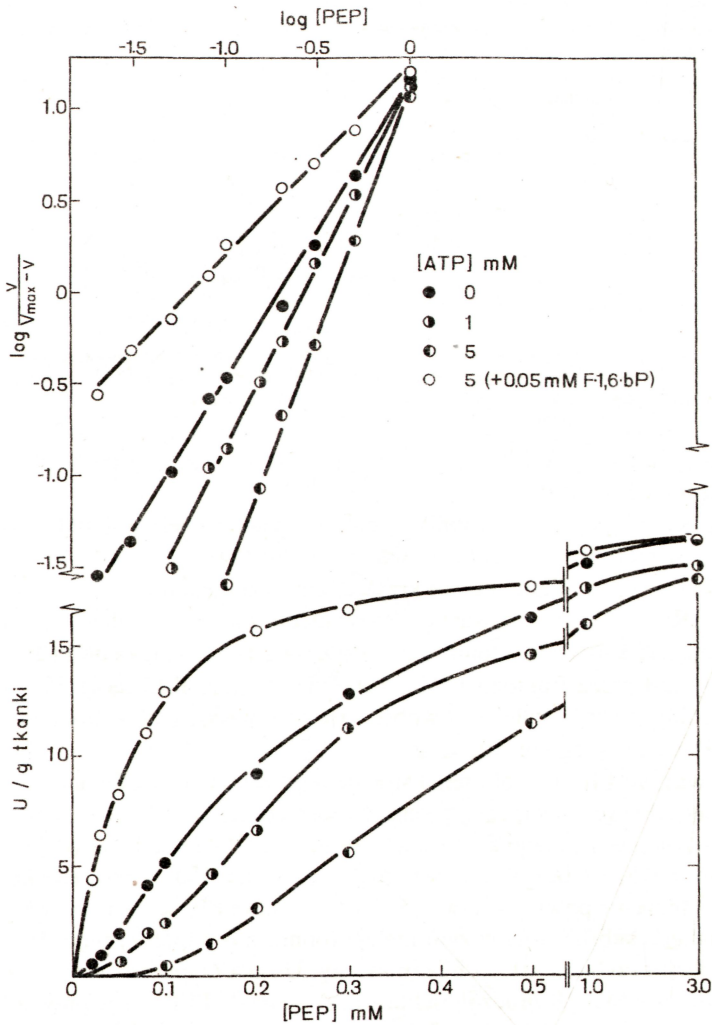
W tablicy zestawiono parametry kinetyczne obliczone na podstawie danych przedstawionych na Rys. 12 i 13, w podpisach których opisano skład płynu inkubacyjnego. Podano wartości średnie (\pm S.E.) wyników uzyskanych w poszczególnych eksperymentach (liczba eksperymentów w nawiasach). Wartości $S_{0,5}$ wyrażono w μ M.

oraz współczynnika n_H (Tablica 6). Wskazuje to na silny wzrost powinowactwa PK do PEP w obecności F-1,6-bP.

Alanina jest allosterycznym inhibitorem PK gruczołu jelita środkowego skorupiaków (Giles i wsp. 1976bc; Lesicki, 1983a; Trausch i Bauchau, 1984). W obecności alaniny pogłębia się sigmoidalny kształt krzywej kinetyki reakcji PK *O.limosus* z PEP jako substratem (Rys. 12). Powinowactwo enzymu do substratu maleje (na co wskazuje wzrost stałej $S_{0,5}$; Tablica 6). Obniżający powinowactwo PK raka do PEP wpływ alaniny osłabiany jest przez fruktozo-1,6-bisfosforan (Rys. 12, Tablica 6). Przy określonym stężeniu alaniny wartość stałej $S_{0,5}$ wobec PEP jest niższa, gdy w środowisku znajduje się F-1,6-bP, niż przy jego braku.

Powinowactwo PK gruczołu jelita środkowego zależy od wzajemnego stosunku nukleotydów adenylowych, a więc od „potencjału energetycznego”. Oczyszczony enzym z gruczołu kraba *C.maenas* badano zmieniając stosunek ATP/ADP od wartości 0 : 1 do 19 : 1 (Giles i wsp. 1975, 1976c). Wraz ze wzrostem stężenia ATP w środowisku reakcji obserwuje się obniżenie powinowactwa PK *C.maenas* do PEP (wzrost stałej $S_{0,5}$), a kooperacyjne działanie substratu na enzym maleje (obniżenie współczynnika Hilla) i krzywa kinetyki reakcji przybiera kształt hiperboliczny. U raka *O.limosus* wzrost stężenia ATP obniża powinowactwo PK gruczołu jelita środkowego do PEP, ale w przypadku tego enzymu pogłębia się sigmoidalny kształt krzywej kinetyki reakcji (Rys. 13, Tablica 6).

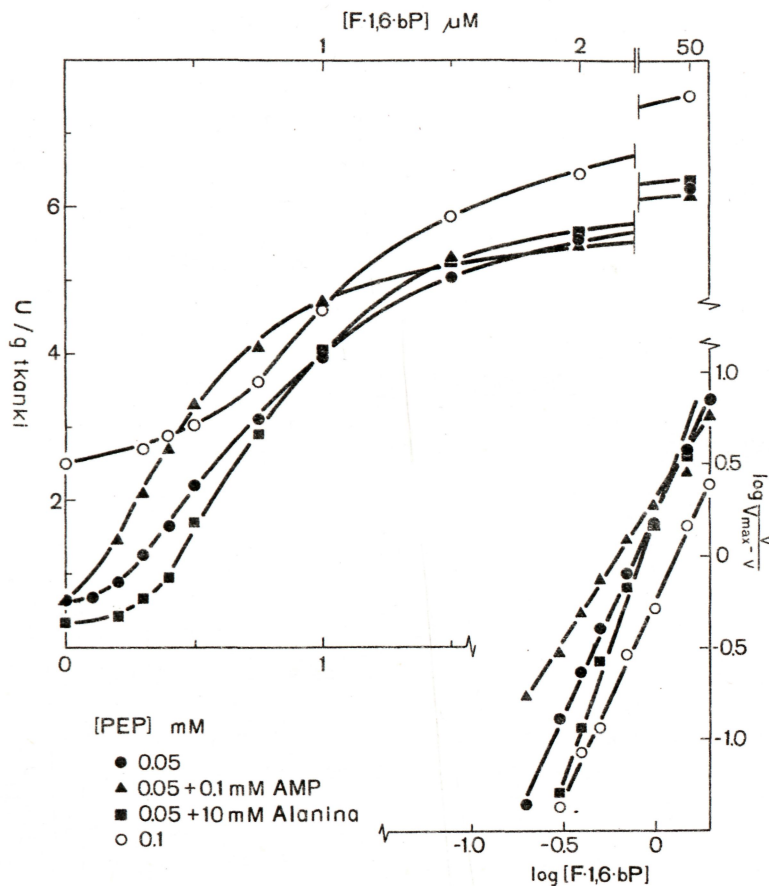
Podobnie jak wątrobowy izoenzym PK ssaków (Ljungström i wsp. 1974; Humble i wsp. 1975; Titanji i wsp. 1976; Berglund i wsp. 1977; Berglund, 1978; Engström, 1978), kinaza pirogronianowa gruczołu jelita środkowego homara *H.americanus* ulega fosforylacji pod wpływem kinazy białkowej zależnej od cAMP (Trausch i Bauchau, 1980, 1984). Forma ufosforylowana enzymu cechuje się obniżonym powinowactwem do fosfoenolpirogronianu, co objawia się pogłębioną sigmoidalnością krzywej kinetyki reakcji (wzrost współczynnika Hilla z 1,64 dla formy nieufosforylowanej do 2,60 dla formy ufosforylowanej). Fosforylację utrudniają zarówno PEP, jak i F-1,6-bP, natomiast przyspiesza ją alanina. Podobnie proces defosforylacji: utrudniają PEP i F-1,6-bP, zaś alanina ułatwia. Ufosforylowana PK gruczołu jelita środkowego homara podatna jest na aktywację pod wpływem F-1,6-bP i w obecności aktywatora nie obserwuje się różnic w kinetyce reakcji z PEP pomiędzy formą ufosforylowaną i defosforylowaną.



Rys. 13. Wpływ ATP na zależność aktywności kinazy pirogronianowej gruczołu jelita środkowego raka *O. limosus* od stężenia fosfoenolpirogonianu. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,0 w obecności 0,5 mM ADP oraz 1 lub 5 mM ATP. W górnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tabelicy 6.

2.2.6. Aktywacja przez fruktozo-1,6-bisfosforan

Fruktozo-1,6-bisfosforan aktywuje PK skorupiaków w niskich stężeniach substratu, fosfoenolpirogonianu. Nie wpływa natomiast na aktywność enzymu przy wysokich, wysycających PK, stężeniach PEP (Lesicki, 1976, 1983a; Giles i wsp. 1976ab, 1977; Trausch i Bauchau, 1984). Krzywa wysycania enzymu aktywatorem ma kształt sigmoi-



Rys. 14. Zależność aktywności kinazy pirogronianowej gruczołu jelita środkowego raka *O. limosus* od stężenia aktywatora fruktozo-1,6-bisfosforanu. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,0 w obecności 0,4 mM ADP, 0,05 lub 0,1 mM PEP oraz przy braku lub w obecności 0,1 mM AMP i 10 mM alaniny. W dolnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tablicy 7.

dalny (Rys. 14; Giles i wsp. 1976c; Lesicki, 1983a), choć dla wysoce oczyszczonego enzymu z gruczołu kraba *C. maenas* uzyskano wykres hiperboliczny (Giles i wsp. 1977). Sugerowano, że w toku oczyszczania enzymu może następować zmiana własności PK (Giles i wsp. 1977; Giles i Poat, 1980). Wydaje się jednak, że rywalizacja o F-1,6-bP pomiędzy kinazą pirogronianową a innymi enzymami, obecnymi w nieoczyszczonej wyciągu tkankowym (jak aldolaza i fosfataza fruktozo-1,6-bisfosforanu, których obecność stwierdzono w wyciągach z gruczołu jelita środkowego raka *O. limosus* (Lesicki, 1983a)), znajduje swe odbicie w pozornie kooperatywnej aktywacji PK (Lesicki, 1983a). Powinowactwo PK gruczołu jelita środkowego skorupiaków do fruktozo-1,6-bisfosforanu zależy od stężeń:

Tablica 7. Zestawienie parametrów kinetycznych charakteryzujących powinowactwo kinazy pirogronianowej jelita środkowego raka *O.limosus* do aktywatora fruktozo-1,6-bisfosforanu.

PEP mM	AMP mM	Ala mM		K_a	n_H
0,05	0	0	(5)	$0,81 \pm 0,04$	$2,36 \pm 0,11$
0,05	0,1	0	(3)	$0,62 \pm 0,08$	$1,53 \pm 0,06$
0,05	0	10	(3)	$0,84 \pm 0,06$	$2,79 \pm 0,12$
0,10	0	0	(4)	$1,32 \pm 0,08$	$2,15 \pm 0,15$

W tablicy zestawiono parametry kinetyczne obliczone na podstawie danych przedstawionych na Rys. 14, w podpisie którego opisano skład płynu inkubacyjnego. Podano wartości średnie (\pm S.E.) wyników uzyskanych w poszczególnych eksperymentach (liczba eksperymentów w nawiasach). Wartości K_a wyrażono w μ M.

- 1) fosfoenolopirogronianu,
- 2) ATP i pozostałych nukleotydów adenylowych,
- 3) alaniny.

F-1,6-bP aktywuje PK skorupiaków tylko w niskich stężeniach PEP. W tych warunkach powinowactwo PK do F-1,6-bP jest największe (Tablica 7). Wraz ze wzrostem stężenia PEP aktywujące działanie F-1,6-bP maleje, maleje też powinowactwo do F-1,6-bP, na co wskazuje wzrost wartości stałej K_a .

PK gruczołu jelita środkowego kraba *C.maenas* cechuje podobna wartość K_a wobec F-1,6-bP przy braku lub w obecności ATP (Giles i wsp. 1977). ATP powoduje jednak wzrost kooperatywnego wiązania aktywatora (wzrost n_H). Z drugiej strony, allosteryczna aktywacja PK *C.maenas* pod wpływem F-1,6-bP maleje, gdy stosunek ATP : ADP wzrasta (Giles i wsp. 1977).

Chociaż sam AMP pozostaje bez wpływu na PK *O.limosus*, to jednak w jego obecności stwierdza się wzrost powinowactwa do F-1,6-bP, gdyż maleją wtedy parametry K_a i n_H wobec F-1,6-bP (Rys. 14, Tablica 7).

Wydaje się, że powinowactwo PK gruczołu jelita środkowego skorupiaków do F-1,6-bP uzależnione jest od stosunku stężeń nukleotydów adenylowych („potencjału energetycznego”). Wyższy „potencjał energetyczny” (tj. wyższe stężenia ATP przy niższych ADP i AMP) wywołuje obniżenie powinowactwa PK do aktywatora; przeciwnie, niższy „potencjał energetyczny” (wzrost stężenia AMP i ADP) sprzyja aktywacji PK przez F-1,6-bP, gdyż enzym cechuje się wtedy znacznie większą zdolnością wiązania aktywatora.

Alanina obniża powinowactwo PK gruczołu jelita środkowego raka *O.limosus* do aktywatora F-1,6-bP (Rys. 14, Tablica 7; Lesicki, 1983a). W jej obecności wartości K_a i n_H wzrastają. Podobnie wpływa alanina na PK kraba *C.maenas* (Giles i wsp. 1977). W tym przypadku wykazano także, że alanina potęguje wpływ ATP na powinowactwo enzymu do F-1,6-bP i w obecności obu inhibitorów działanie F-1,6-bP jest znacznie utrudnione.

2.2.7. Zależność aktywności od stężenia ATP

5mM ATP hamuje aktywność PK gruczołu jelita środkowego raka *O.limosus*, choć efekt hamujący zależy od stężenia PEP, a także od stężenia jonów Mg^{2+} (Lesicki, 1976). U kraba *C.maenas* działanie ATP jest dwufazowe. Niższe stężenia ATP (do 2 mM) sty-

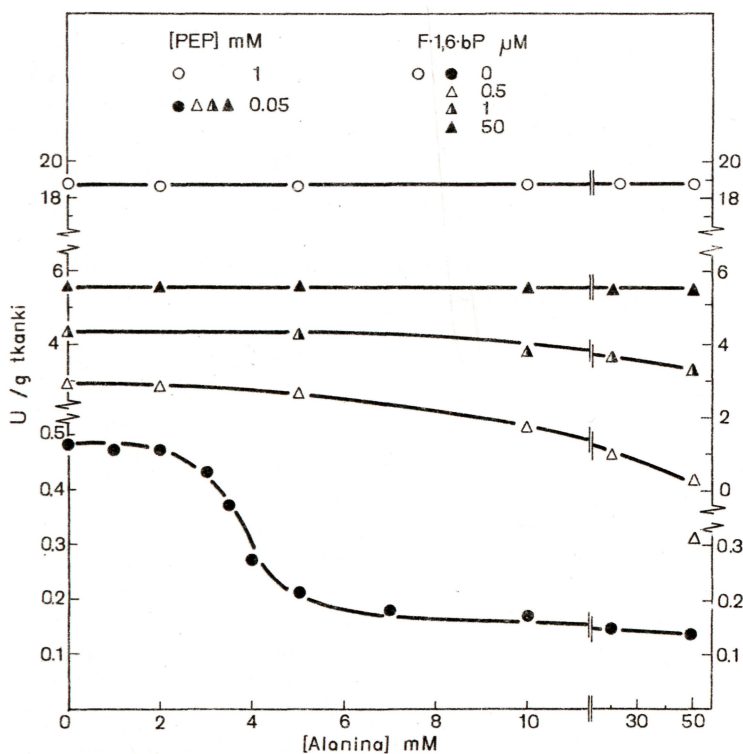
mulują PK, wyższe hamują. Dwufazowy efekt znika, gdy tę samą zależność wyznacza się w obecności alaniny lub F-1,6-bP (Giles i wsp. 1977). W tych warunkach ATP wyłącznie hamuje aktywność PK kraba.

Wydaje się, że istota działania ATP na PK gruczołu jelita środkowego skorupiaków polega, jak opisano powyżej, na obniżaniu powinowactwa PK do:

- 1) substratu PEP, oraz
- 2) aktywatora F-1,6-bP.

2.2.8. Zależność aktywności od stężenia alaniny

Alanina jest allosterycznym inhibitorem kinazy pirogronianowej izolowanej z gruczołu jelita środkowego skorupiaków (Giles i wsp. 1975, 1976ab, 1977; Lesicki, 1983a). Hamujący efekt wywierany przez alaninę na aktywność PK zależy przede wszystkim od stężenia substratu, fosfoenolopirogronianu. Występuje bowiem tylko w niskich, dalece niewysycających enzym, stężeniach PEP (Rys. 15; Giles i wsp. 1977), choć trzeba podkreślić, iż są to stężenia fizjologiczne. W wysokich stężeniach PEP, wysycających i w pełni aktywujących enzym, alanina pozostaje bez wpływu na aktywność PK skoru-



Rys. 15. Wpływ alaniny na aktywność kinazy pirogronianowej gruczołu jelita środkowego raka *O. limosus*. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,0 w obecności 0,4 mM ADP, 0,05 lub 1,0 mM PEP oraz 0; 0,5; 1,0 lub 50,0 μM F-1,6-bP.

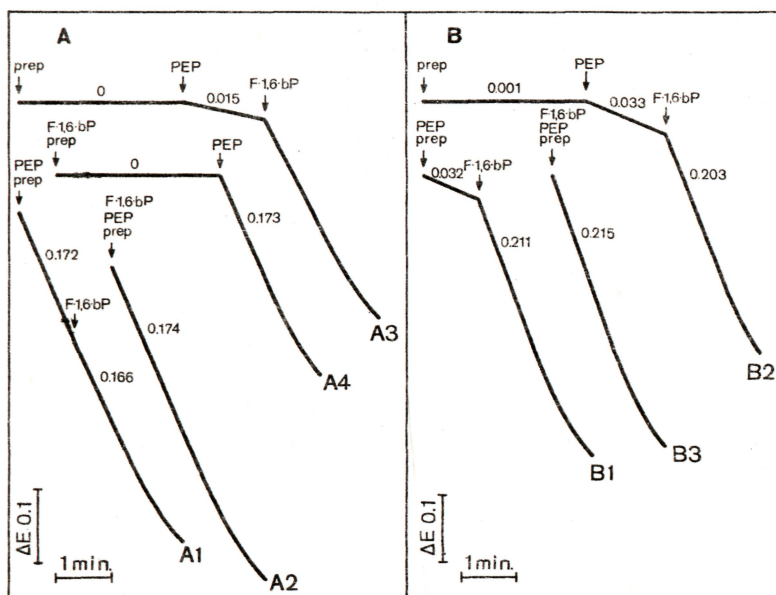
piaków (Giles i wsp. 1977). Te obserwacje wskazują, że alanina wpływa hamująco przede wszystkim na powinowactwo PK do PEP (Rys. 12, Tablica 6).

Alanina jako negatywny efektor allosteryczny PK gruczolu jelita środkowego kraba *C.maenas* działa w zależności od stężenia aktywatora F-1,6-bP (Giles i wsp. 1975, 1977). Także u raka *O.limosus* działanie alaniny przejawia się w niskich stężeniach PEP pod nieobecność F-1,6-bP. Allosteryczny aktywator, jakim jest F-1,6-bP, chroni enzym przed hamującym wpływem alaniny (Rys. 15). Ze wzrostem stężenia F-1,6-bP konieczne są coraz wyższe stężenia alaniny dla hamowania PK (Rys. 15), aż wreszcie wysycające stężenia aktywatora przywracają pełną aktywność PK mimo wysokich stężeń alaniny (Lesicki, 1983a). W taki sam sposób zależy aktywność nieoczyszczonej PK kraba *C.maenas* od stężenia alaniny i F-1,6-bP (Giles i wsp. 1977). Podkreślić trzeba, iż u obu skorupiaków wysycenie PK inhibitorem (alaniną) nie jest w stanie przeszkodzić aktywacji enzymu przez F-1,6-bP. Natomiast przeciwnie, wysycenie enzymu aktywatorem F-1,6-bP całkowicie uniemożliwia inhibicję alaniną.

Krzywa opisująca zależność aktywności oczyszczonej PK z gruczolu jelita środkowego kraba *C.maenas* od stężenia alaniny jest odmienna od krzywej charakteryzującej nieoczyszczonej PK (Giles i wsp. 1977). Enzym wysoce oczyszczony nie wykazuje negatywnego efektu kooperacyjnego. Ochronne działanie F-1,6-bP jest w tym przypadku słabsze. Natomiast dla PK w nieoczyszczonym wyciągu, alanina jest typowym negatywnym efektem allosterycznym, wykazującym efekt kooperacji, wzmacniany obecnością allosterycznego aktywatora (Giles i wsp. 1977). Rozbieżność tę tłumaczono utratą w procesie oczyszczania właściwości charakterystycznych dla natywnego enzymu (Giles i wsp. 1977). W tej sytuacji jednak wyjaśnianie mechanizmów regulacji aktywności PK z gruczolu jelita środkowego w warunkach *in vivo* tylko w oparciu o charakterystykę wysoce oczyszczonego enzymu wydaje się dyskusyjne.

2.2.9. Wzajemnie przemienne formy kinazy pirogronianowej gruczolu jelita środkowego skorupiaków

Wyniki badań nad kinazą pirogronianową gruczolu jelita środkowego, przedstawione w podrozdziałach 2.2.1. - 2.2.8. wskazują, że enzym ten jest białkiem występującym we wzajemnie przemiennych formach o różnych własnościach kinetycznych (Giles i wsp. 1976a; Lesicki, 1983a). Formy enzymu z gruczolu kraba *C.maenas* udało się rozdzielić chromatograficznie na DEAE-celulozie (Giles i wsp. 1976a). W profilu elucji są dwa wyraźnie oddzielone wierzchołki aktywności, przy czym PK wierzchołka pierwszego jest silnie aktywowana przez F-1,6-bP w niskich stężeniach PEP, z kolei PK wierzchołka drugiego cechuje duże powinowactwo do PEP i niewielka podatność na aktywujące działanie F-1,6-bP. Ponowna chromatografia frakcji obejmujących pierwszy wierzchołek aktywności PK na kolumnie z DEAE-celulozą, ale w buforze zawierającym F-1,6-bP, daje w wyniku całkowite przekształcenie enzymu. PK wymywana jest teraz z kolumny we frakcjach typowych dla drugiego wierzchołka aktywności i cechuje ją duże powinowactwo do PEP. Próby znalezienia liganda, który w odwrotny sposób przekształcałby PK wierzchołka drugiego w PK wierzchołka pierwszego nie powiodły się (alanina nie wpływa na własności chromatograficzne PK kraba *C.maenas*). Wystarczy jednak ponowną chromatografię na DEAE-celulozie frakcji zawierających drugi wierz-



Rys. 16. Szybkość reakcji katalizowanej przez wzajemnie przemienne formy kinazy pirogronianowej gruczołu jelita środkowego raka *O. limosus*: (A) forma o dużym powinowactwie do substratu PEP, (B) forma o niskim powinowactwie do substratu PEP. Reakcje w kuwecie spektrofotometru rozpoczynano podaniem preparatu enzymatycznego (A1, A2, B1, B3) lub substratu PEP po trzyminutowej inkubacji preparatu w kuwecie (A3, A4, B2). Aktywność mierzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,0 i w obecności 0,4 mM ADP. Strzałkami oznaczono moment podania preparatu PK, PEP (w końcowym stężeniu 0,05 mM) i F-1,6-bP (0,1 mM). Liczby oznaczają zmianę absorbancji (ΔE) na minutę. Rysunek opracowano na podstawie pracy Lesicki, 1983a.

chołek przeprowadzać w buforze bez F-1,6-bP. Uzyskuje się wtedy ponownie oba wierzchołki aktywności PK. Dowodzi to, iż przy braku aktywatora PK gruczołu jelita środkowego kraba *C. maenas* przekształca się w formę o małym powinowactwie do PEP (Giles i wsp. 1977; Munday i wsp. 1980).

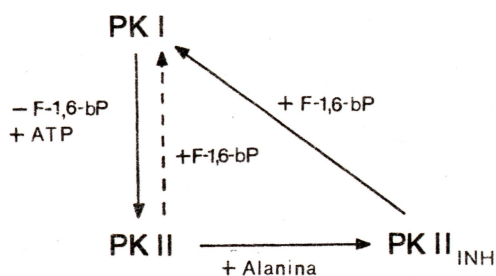
Badania kinetyczne nad enzymem z gruczołu jelita środkowego raka *O. limosus* wskazują na występowanie tego enzymu w podobnej parze konformerów (Lesicki, 1976). Jedna z form, cechująca się dużym powinowactwem do PEP, jest wysoce aktywna w niskich stężeniach tego substratu. Druga forma wykazuje w niskim stężeniu PEP małą aktywność - jest to forma o małym powinowactwie do PEP. Formy te wydają się odgrywać rolę w regulacji metabolizmu węglowodanowego, gdyż izolowano z gruczołu jelita środkowego różne formy, w zależności od pory roku (Lesicki, 1976, 1977), fazy cyklu linieniowego (Lesicki, 1977), usunięcia słupków ocznych (Lesicki, 1983c) czy iniekcji hormonu linienia (Lesicki, 1983e).

Wzajemną przemienność form PK gruczołu jelita środkowego wykazano również spektrofotometrycznie (Rys. 16). Latem z gruczołu raków *O. limosus* w fazie międzylinieniowej izoluje się formę o dużym powinowactwie do PEP (Lesicki, 1977, 1983a). Reakcja w kuwecie spektrofotometru rozpoczynana podaniem tego preparatu przebiega z dużą prędkością początkową, mimo niskiego stężenia PEP (Rys. 16A1). Prędkości tej

nie zmienia dodanie F-1,6-bP (Rys. 16A2). Jeśli jednak reakcję rozpocząć podaniem substratu po trzech minutach inkubacji preparatu w kuwecie, rejestruje się niską prędkość początkową reakcji, a dodanie F-1,6-bP przywraca początkową wysoką prędkość (Rys. 16A3). Obecność F-1,6-bP w medium, w którym prowadzi się trzyminutową inkubację preparatu, uniemożliwia przekształcenie się enzymu w formę o małym powinowactwie do substratu (Rys. 16A4).

PK izolowana z gruczołu jelita środkowego raków we wczesnych stadiach rzedlinieniowych, czy to naturalnych (Lesicki, 1977, 1983a), czy stymulowanych usunięciem słupków ocznych (Lesicki, 1983c) lub iniekcją hormonu linienia (ekdysteronu, Lesicki, 1983e), cechuje się niskim powinowactwem wobec fosfoenolopirogronianu. Stąd, po rozpoczęciu reakcji preparatem w medium inkubacyjnym o niskim stężeniu PEP, rejestruje się małą prędkość początkową reakcji (Rys. 16B1). Rozpoczęcie reakcji substratem po trzech minutach inkubacji preparatu w kuwecie daje podobną, niską prędkość początkową reakcji (Rys. 16B2). F-1,6-bP, dodany do płynu reakcyjnego zarówno przed (Rys. 16B3) jak i w trakcie reakcji (Rys. 16B1, 16B2), silnie aktywuje enzym.

Wydaje się, że forma o dużym powinowactwie do PEP stabilizowana jest przez fruktozo-1,6-bisfosforan. Gdy forma ta dodana zostaje do płynu w kuwecie, to w warunkach silnego rozcieńczenia enzymu i wysokiej siły jonowej medium inkubacyjnego dochodzi do oddysocjowania F-1,6-bP od cząsteczek enzymu. Ten oddysocjowany F-1,6-bP jest metabolizowany przez inne enzymy, np. aldolazę lub/i fosfatazę, obecne w ekstrakcie tkankowym (Lesicki, 1983a). Brak aktywatora powoduje przekształcenie enzymu w formę o małym powinowactwie do substratu, tj. mało aktywną w jego niskich (fizjologicznych) stężeniach. Wysokie powinowactwo (a więc i duża aktywność w niskich stężeniach substratu) utrzymywana może być tylko dodaniem egzogenego F-1,6-bP.



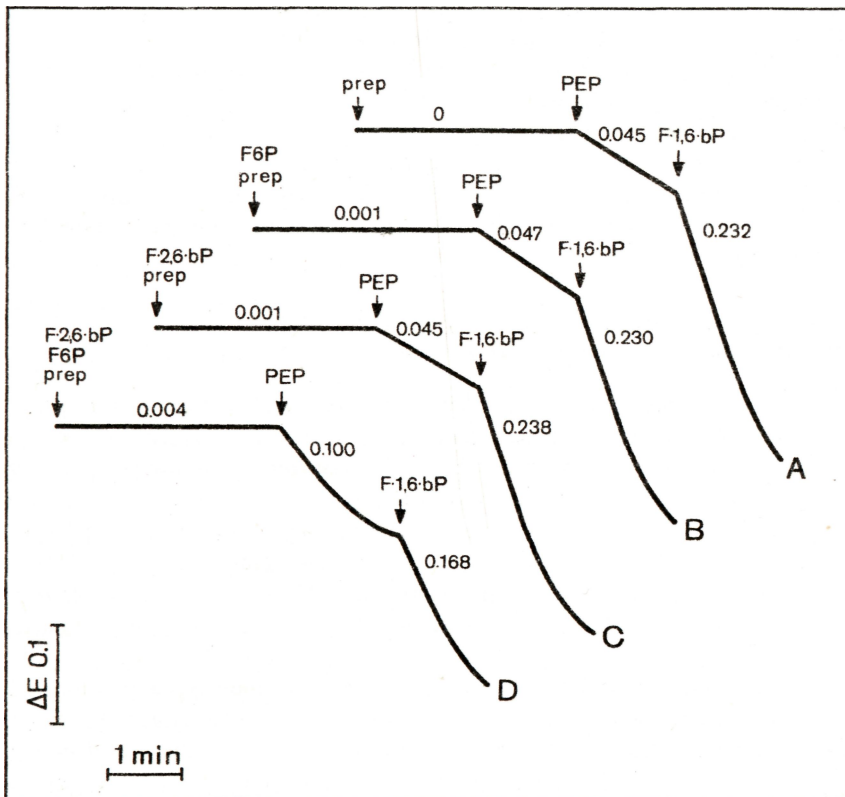
Schemat 2. Wzajemnie przemienne formy kinazy pirogronianowej gruczołu jelita środkowego raka *O. limosus* (za: Lesicki, 1983a).

Podsumowując przedstawione wyniki można stwierdzić, że PK gruczołu jelita środkowego raka *O. limosus* oraz kraba *C. maenas* występuje w dwóch formach konformacyjnych o dużym lub małym powinowactwie do PEP. Zależności pomiędzy tymi formami zilustrowano Schematem 2. Forma o dużym powinowactwie do PEP (PK-I) powstaje po związaniu aktywatora F-1,6-bP. Forma ta niewrażliwa jest na oddziaływanie alaniny. Oddysocjowanie F-1,6-bP od cząsteczki enzymu powoduje zmianę jego konformacji w charakterystyczną dla formy o małym powinowactwie do PEP (PK-II). Temu przekształceniu sprzyja wzrost stężenia ATP. Forma o małym powinowactwie do PEP może

ulegać dalszej inhibicji pod wpływem alaniny ($PK-II_{inh}$). Wzrost stężenia F-1,6-bP przywraca aktywność formie zahamowanej przez alaninę, a więc stymuluje transformację $PK-II_{inh}$ w $PK-I$.

2.3. WSPÓLNA AKTYWACJA FOSFOFRUKTOKINAZY I KINAZY PIROGRONIANOWEJ GRUCZOŁU JELITA ŚRODKOWEGO POD WPLYWEM FRUKTOZO-2,6-BISFOSFORANU

W celu wykazania wpływu fruktozo-2,6-bisfosforanu na aktywność PK gruczołu jelita środkowego raka *O. limosus* przeprowadzono eksperyment, w trakcie którego w kuwecie spektrofotometru symulowano fizjologiczne stężenia substratów fosfofruktokinazy i kinazy pirogronianowej. Mierzono aktywność kinazy pirogronianowej. Ekstrakt



Rys. 17. Szybkość reakcji katalizowanej przez kinazę pirogronianową gruczołu jelita środkowego raka *O. limosus*. Preparat inkubowano przez 3 minuty w kuwecie spektrofotometru w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,0 zawierającym 0,4 mM ADP, 0,7 mM ATP oraz: (A) żadnych dodatkowych metabolitów, (B) 0,1 mM F6P, (C) 10 μM F-2,6-bP, (D) 0,1 mM F6P i 10 μM F-2,6-bP. Po inkubacji reakcję rozpoczęto podaniem substratu PEP (w stężeniu końcowym 0,05 mM). Po 1,5 min reakcji dodawano F-1,6-bP (0,1 mM). Liczby oznaczają rejestrowaną zmianę absorbancji (ΔE) na minutę.

tkankowy inkubowano przez trzy minuty w kuwecie, po czym rozpoczynano reakcję podaniem PEP. W tych warunkach rejestruje się niską początkową prędkość reakcji (Rys. 17A). Dodanie F-1,6-bP aktywuje enzym (Rys. 17A). Dodanie w niskim stężeniu fruktozo-6-fosforanu do płynu inkubacyjnego nie wpływa zasadniczo na aktywność PK (Rys. 17B). Niska aktywność PFK w tych warunkach nie zapewnia pojawienia się znaczących ilości produktu reakcji przez nią katalizowanej, tj. F-1,6-bP. Dodanie samego aktywatora PFK, tj. fruktozo-2,6-bisfosforanu bez F6P, także nie zmienia rejestrowanej szybkości reakcji (Rys. 17C). A więc F-2,6-bP nie wpływa na PK gruczolu jelita środkowego raka *O. limosus*, przynajmniej w niskich stężeniach (choć w tych stężeniach jest silnym aktywatorem PFK). Jeśli jednak do kuwety dodano jednocześnie F6P i F-2,6-bP, to po rozpoczęciu reakcji podaniem PEP zarejestrowano przyspieszenie reakcji (Rys. 17D). Wydaje się, iż F-2,6-bP aktywuje w tych warunkach PFK, która z kolei zużywa dodany F6P. Z jednej strony może wtedy dochodzić do uruchomienia kolejnych enzymów glikolitycznych pomiędzy PFK a PK, a w konsekwencji do podwyższenia stężenia PEP w kuwecie. Wydaje się jednak bardziej prawdopodobne, że powstały produkt reakcji katalizowanej przez PFK, tj. F-1,6-bP, stymulował bezpośrednio PK, przywracając konformację o dużym powinowactwie do PEP.

Powyższy eksperyment pozwala przypuszczać, iż w gruczole jelita środkowego raka *O. limosus* podwyższony poziom fruktozo-2,6-bisfosforanu jest sygnałem uruchamiającym kluczowe enzymy glikolityczne. Bezpośrednio aktywuje on fosfofruktokinazę, a pośrednio, poprzez produkt działania fosfofruktokinazy, tj. fruktozo-1,6-bisfosforan, aktywuje także kinazę pirogronianową.

2.4. METABOLITY GLIKOLITYCZNE W GRUCZOLE JELITA ŚRODKOWEGO SKORUPIAKÓW

Badano zawartość niektórych metabolitów glikolitycznych w tkance gruczolu jelita środkowego raka *O. limosus* (Tablica 8). Podkreślić należy, iż, po pierwsze, podstawą obliczeń stężeń metabolitów było arbitralnie przyjęte założenie 50% uwodnienia tkanki, a po drugie, wyniki te mogą nie uwzględniać możliwej kompartmentacji stężeń w komórkach gruczolu jelita środkowego. Toteż do interpretacji regulacji aktywności fosfofruktokinazy i kinazy pirogronianowej w warunkach fizjologicznych stężeń substratów i modulatorów trzeba podchodzić z dużą ostrożnością. Niemniej można stwierdzić, że dla fosfofruktokinazy gruczolu jelita środkowego raka *O. limosus* mają miejsce następujące fakty:

- 1) fizjologiczne stężenia F6P (0,05 - 0,09 mM) są wysoce niewysycające enzym;
- 2) stężenia drugiego substratu, ATP (0,8 - 1,1 mM), wysycają enzym;
- 3) pula nukleotydów adenylowych nie zmienia się w różnych stadiach życiowych raka. Obserwuje się natomiast zmiany proporcji poszczególnych nukleotydów względem siebie. Wyrazem tego są zmiany „potencjału energetycznego” w zakresie 0,80-0,92;
- 4) zmiany stężeń aktywatorów PFK, tj. AMP i F-2,6-bP przypadają w zakresie ich regulacyjnych oddziaływań na enzym.

Podobnie kinaza pirogronianowa natrafia w warunkach fizjologicznych na:

- 1) niewysycające stężenia substratów PEP i ADP;
- 2) zmiany stężeń najistotniejszego modulatora aktywności, tj. F-1,6-bP, przypadające w zakresie jego regulacyjnych oddziaływań na własności kinetyczne enzymu.

Tablica 8. Metabolity uczestniczące w reakcjach katalizowanych przez fosfofruktokinazę i kinazę pirogronianową w gruczole jelita środkowego skorupiaków.

	<i>O. limosus</i>				<i>C. maenas</i> *
	stadia cyklu linieniowego				
	C ₄	D ₀₋₁	D ₃₋₄	A-B	
G6P	(5) 298 ± 42 [0,60]	(7) 275 ± 24 [0,55]	(7) 228 ± 10 [0,45]	(3) 205 ± 20 [0,41]	
F6P	(5) 45 ± 8 [0,09]	(7) 33 ± 4 [0,07]	(5) 47 ± 3 [0,09]	(3) 46 ± 3 [0,09]	
F-1,6-bP	(5) 15 ± 3 [0,03]	(10) 8 ± 3 [0,02]	(5) 34 ± 9 [0,07]	(3) 18 ± 2 [0,04]	0,8 [0,002]
PEP	(5) 42 ± 5 [0,08]	(10) 11 ± 1 [0,02]	(5) 11 ± 2 [0,02]	(3) 33 ± 4 [0,07]	(6) 82 ± 9 [0,16]
ATP	(2) 410 [0,82]	(2) 560 [1,12]	(3) 450 ± 50 [0,90]	(2) 440 [0,88]	(5) 376 ± 126 [0,75]
ADP	(2) 185 [0,37]	(2) 85 [0,17]	(3) 170 ± 45 [0,34]	(2) 160 [0,32]	(5) 162 ± 52 [0,32]
AMP	(2) 30 [0,06]	(2) 10 [0,02]	(3) 28 ± 7 [0,06]	(2) 25 [0,05]	(3) 18 ± 6 [0,04]
E.Ch.	0,80	0,92	0,83	0,83	0,82
F-2,6-bP	0,7 [0,0014]	0,05 [0,0001]	0,8 [0,0016]		

Stężenia metabolitów wyrażono w nmolach/g tkanki (w nawiasach kwadratowych podano stężenia wyrażone w mM przy założeniu 50% uwodnienia tkanki), podając wartości średnie ± S.D.

* Cytowano za Giles i wsp. (1976b).

Wydaje się, że warunki fizjologiczne w okresie międzyliniowym, a także późnym przedliniowym i poliniowym, sprzyjają aktywności glikolitycznej w gruczole jelita środkowego *O. limosus*. Przy:

1) stężeniach nukleotydów adenylowych, wyrażających się „potencjałem energetycznym” 0,80 - 0,82;

2) stężeniu F-2,6-bP ok. 1,4 μM;

3) optymalnym stężeniu ATP (0,82 - 0,90 mM) - nie hamującym aktywności enzymu, zwłaszcza w obecności AMP i F-2,6-bP;

PFK gruczolu jelita środkowego cechuje zwiększone powinowactwo do substratu F6P i nawet w tak niskich jego stężeniach jak 0,05 - 0,09 mM wykazuje 60 - 75% maksymalnej aktywności.

Wysoka aktywność PFK w tych stadiach cyklu linieniowego prowadzi do podwyższenia komórkowego stężenia produktu reakcji przezeń katalizowanej, tj, F-1,6-bP. W stężeniach F-1,6-bP 0,04 - 0,07 mM oraz przy „potencjale energetycznym” 0,80 - 0,82, PK występuje w formie o dużym powinowactwie do substratu PEP. W obecności 0,07 - 0,08 mM PEP i 0,32 - 0,37 mM ADP, enzym ten wykazuje 50 - 60% aktywności maksymalnej.

We wczesnych stadiach przedliniowych (D₀ i D₁) obserwuje się istotny:

1) wzrost stężenia ATP w puli nukleotydów adenylowych (wzrost „potencjału energetycznego” do 0,92),

2) obniżenie stężenia F6P oraz PEP i ADP, odpowiednio substratów PFK i PK,

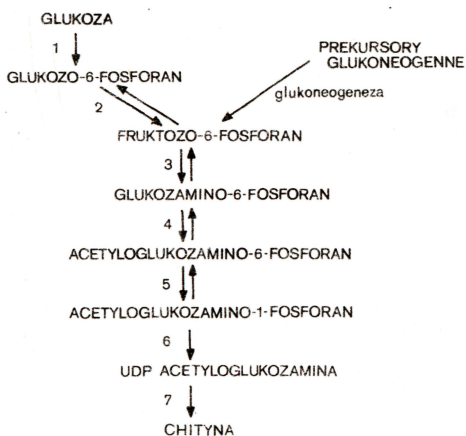
3) obniżenie stężenia AMP, F-2,6-bP oraz F-1,6-bP, a więc aktywatorów obu enzymów.

Sprzyja to pojawieniu się form o małym powinowactwie do substratów. Formy takie izolowano z gruczolu jelita środkowego raków w początkowych stadiach naturalnego cyklu linieniowego (Lesicki, 1977, 1983a) lub wywołanych sztucznie usunięciem słupków ocznych (Lesicki, 1983cd). W tych warunkach aktywność obu enzymów drastycznie maleje. Sugeruje to obniżenie aktywności całej glikolizy w tych stadiach cyklu linieniowego. Temu zwolnieniu glikolizy może towarzyszyć podjęcie syntezy glukozy drogą glukogenną. Pozwala to na włączanie większej ilości glukozy do syntezy glikogenu. Wyjaśnienie to pozostaje w zgodzie z obserwowanym w początkowych stadiach przedlinieniowych wzrostem akumulacji glikogenu w gruczole jelita środkowego (Renaud, 1949; Travis, 1955; Parvathy, 1972), a także wzrostem aktywności syntetazy glikogenu (Ramamurthi i wsp. 1968). Jednocześnie obserwowany wzrost wykorzystywania tłuszczów (O'Connor i Gilbert 1968, 1969; Speck i Urich, 1969b) zapewnia podaż materiału energetycznego.

3. EPIDERMA SKORUPIAKÓW

Ciało skorupiaków otacza szkielet zewnętrzny. Podstawowym jego składnikiem jest chityna, trwale związana z białkami, dodatkowo wzmocniona odłożonymi w niej solami wapnia. Szkielet zewnętrzny jest wytworem epidermy, pojedynczej warstwy komórek nabłonkowych, leżących bezpośrednio pod nim (Dennell, 1960).

Zewnętrzny szkielet uniemożliwia jednostajny wzrost skorupiaków. Jest on możliwy tylko okresowo, w momencie linienia (ekdyzji), tj. zrzucania starego pancerza szkieletu zewnętrznego. Powstały nowy szkielet zewnętrzny, początkowo miękki, niesklerotyzowany i niezwapniały, pozwala na powiększenie rozmiarów skorupiak. Toteż cykliczne linienia stanowią jeden z najistotniejszych procesów w ich życiu. Cykl linienia obejmuje okres przedlinieniowy, tj. fazę przygotowań do zrzucenia starego pancerza, właściwe linienie (ekdyzę), okres przemian polinieniowych oraz stosunkowo najdłuższy okres międzylinieniowy (Drach, 1939; Passano, 1960). W okresie przedlinieniowym epiderma oddziela się od starego szkieletu zewnętrznego (zjawisko to zwane jest apolizą) i rozpoczyna syntezę nowego. Właściwie epiderma syntetyzuje chitynę przez cały cykl linienia, ale tempo tej syntezy gwałtownie wzrasta w okresie przedlinieniowym i utrzymuje się na wysokim poziomie do późnych etapów okresu polinieniowego (Hornung i Stevenson, 1971).

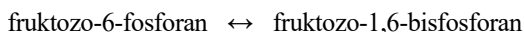


Schemat 3. Synteza chityny w epidermie skorupiaków przy udziale: 1. heksokinazy, 2. izomerazy fosfoheksozowej, 3. transaminazy glutaminowej, 4. transacetylazy fosfoglukozaminowej, 5. mutazy fosfoacetyloglukozaminy, 6. pirofosforylasy UDP-acetyloglukozaminy, 7. syntetazy chityny, (za: Guderley i Hochachka, 1977; Pahlic i Stevenson, 1978).

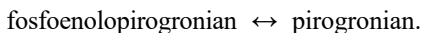
Synteza chityny przebiega według Schematu 3. Centralnym metabolitem w syntezie chityny jest glukozamino-6-fosforan. Kolejno ulega on acetylacji, izomeryzacji w acetylo---

czkę chityny. W okresie przedlinieniowym źródłem glukozaminy jest stary szkielet zewnętrzny, którego chityna i jony wapnia są w tej fazie resorbowane (Travis, 1955; Skinner, 1962). Stara chityna jest więc wykorzystywana do syntezy nowej (Gwinn i Stevenson, 1973; Speck i Ulrich, 1971, 1972b), przy czym acetyloglukozamina resorbowana ze starego pancerza musi być deacylowana przed ponowną zamianą w chitynę (Wolter, 1968). W okresie przedlinieniowym ma miejsce szybkie wbudowywanie znakowanej N-acetyloglukozaminy do chityny, w przeciwieństwie do słabo wbudowywanej znakowanej glukozy. Dowodzi to, iż glukozamina pochodząca ze starego szkieletu jest preferowanym substratem w tym okresie (Gwinn i Stevenson, 1973; Herz-Hübner i Ulrich, 1973; Herz-Hübner i wsp. 1973). Po linieniu, gdy zrzuty stary szkielet przestaje być źródłem glukozaminy dla syntezy chityny, raptownie wzrasta tempo wbudowywania do chityny znakowanej glukozy (Hu, 1958; Meenakshi i Scheer, 1961; Hornung i Stevenson, 1971; Lang, 1971; Speck i wsp. 1972). Sugeruje to zmianę prekursora glukozaminy, którym staje się fruktozo-6-fosforan. Syntezę glukozamino-6-fosforanu katalizuje prawdopodobnie transaminaza glutamina : fruktozo-6-fosforan (Speck i wsp. 1972; Pahlic i Stevenson, 1978), choć możliwy jest udział izomerazy (Lang, 1971).

Jest kilka dróg syntezy fruktozo-6-fosforanu. Może on powstawać z glikogenu, który jest gromadzony w stosunkowo dużych ilościach w komórkach epidermy (Speck, 1969) lub też z glukozy i mannozy wychwytywanych przez tę tkankę z hemolimfy (Herz-Hübner i wsp. 1973; Guderley i Hochachka, 1977). Epiderma wychwytuje z hemolimfy także stosunkowo dużą ilość mleczanu (Speck i Ulrich, 1969a; Herz-Hübner i wsp. 1973), a to sugeruje możliwość glukoneogenego pozyskiwania fruktozo-6-fosforanu (Guderley i Hochachka, 1977). Ta droga wymaga jednak precyzyjnej kontroli kluczowych etapów glikolizy i glukoneogenezy:



oraz



Niestety, niewiele wiadomo o fosfofruktokinazie epidermy skorupiaków, choć scharakteryzowano fruktozo-1,6-bisfosfatazę (Hochachka, 1972), katalizującą reakcję odwrotną w pierwszym z powyższych etapów. Enzym ten występuje w dwóch elektroforetycznie rozróżnialnych formach, z których obie hamowane są przez AMP, lecz tylko jedna przez UDP-N-acetylglukozaminę lub UDP-glukozę. Postulowano (Hochachka, 1972), iż dzięki tym cechom formy fruktozo-1,6-bisfosfatazy alternatywnie pozwalają na produkcję fruktozo-6-fosforanu: dla syntezy glikogenu (np. w okresie międzylinieniowym i początkowym okresie przedlinieniowym) lub dla syntezy chityny (w późnym okresie przedlinieniowym i po linieniu). Natomiast niemożliwe jest jednoczesne wykorzystanie F6P w obu kierunkach.

W drugim z kluczowych miejsc kontroli kierunku działania dróg glikoliza/glukoneogeneza w epidermie scharakteryzowano kinazę pirogonianową kraba *Cancer magister* (Guderley, 1976; Guderley i Hochachka, 1977).

3.1. KINAZA PIROGRONIANOWA EPIDERMY SKORUPIAKÓW

3.1.1. Własności elektroforetyczne

W epidermie kraba *C.magister* występuje pojedyncza forma kinazy pirogronianowej, co wykazano zarówno metodą elektroforezy na żelu skrobiowym, jak i metodą ogniskowania izoelektrycznego. Enzym ten różni się ruchliwością elektroforetyczną i punktem izoelektrycznym od mięśniowej formy PK kraba *C.magister* (Guderley i Hochachka, 1977).

3.1.2. Formy chromatograficzne

Wstępne oczyszczanie PK epidermy kraba pozwoliło wyróżnić dwie formy enzymu (Guderley, 1976; Guderley i Hochachka, 1977). Forma PK-I stabilizowana jest obecnością EDTA w płynach izolacyjnych i otrzymywana jest po chromatografii na żelu DEAE-Sephadex. Brak EDTA lub chromatografia na kolumnie celulozo-fosforanowej pozwala uzyskać formę PK-II. Formy te różnią się własnościami kinetycznymi, lecz wykazano, iż możliwe jest wzajemne przekształcanie się jednej w drugą. Stanowią więc one parę konformacyjnych form tej samej cząsteczki enzymu (Guderley, 1976; Guderley i Hochachka, 1977).

3.1.3. Powinowactwo do ADP

Obie formy PK epidermy kraba cechuje podobne powinowactwo do ADP jako substratu. Wartość $S_{0,5}$ przypada w zakresie 0,2 - 0,3 mM i nie zależy od stężenia drugiego substratu, fosfoenolpirogronianu. PK epidermy katalizuje reakcję z urydynodifosforanem, guanozynodifosforanem lub inozynodifosforanem podstawionymi w miejsce ADP, lecz powinowactwo do tych nukleotydów jest znacznie niższe (Guderley i Hochachka, 1977).

3.1.4. Powinowactwo do fosfoenolpirogronianu

Obie formy PK epidermy kraba *C.magister* cechuje hiperboliczna krzywa kinetyki reakcji z fosfoenolpirogronianem jako substratem (Guderley, 1976; Guderley i Hochachka, 1977). PK-I wykazuje znacznie wyższe powinowactwo do PEP. Dla tej formy wartości stałej $S_{0,5}$ przypadają w zakresie 0,09 - 0,18 mM. Dla PK-II parametr ten przybiera wartości 0,4 - 0,8 mM. Powinowactwo obu form do PEP nie zależy od stężenia ADP w płynie inkubacyjnym. Zależność aktywności PK epidermy od stężenia PEP modyfikują natomiast:

- 1) fruktozo-1,6-fosforan,
- 2) ATP.

Obie formy PK są aktywowane przez F-1,6-bP, przede wszystkim wzrasta ich powinowactwo do PEP. W przypadku PK-I, F-1,6-bP powoduje obniżenie wartości $S_{0,5}$ z 0,09 mM do 0,045 mM; a w przypadku PK-II z 0,7 mM do 0,15 mM. Efekt ten jest

więc silniejszy dla PK-II, która w obecności F-1,6-bP wykazuje powinowactwo do PEP zbliżone do powinowactwa PK-I do tego substratu.

ATP obniża powinowactwo obu form PK epidermy do PEP.

3.1.5. Aktywatory

Nieoczyszczony enzym epidermy kraba *C.magister* jest w jednakowym stopniu aktywowany przez F-1,6-bP, UDP-glukozaminę i glukozamino-6-fosforan. Po oczyszczeniu, PK pozostaje silnie wrażliwa tylko na F-1,6-bP, natomiast aktywacja pod wpływem pozostałych dwóch metabolitów stanowi ok. 25% efektu wywoływanego przez F-1,6-bP. PK-II stukrotnie silniej wiąże F-1,6-bP. Stała aktywacji K_a dla tej formy wynosi 0,09 μM F-1,6-bP, podczas gdy dla PK-I parametr ten wynosi 13 μM (Guderley i Hochachka, 1977).

3.1.6. Inhibitory

Obie formy kinazy pirogronianowej epidermy kraba *C.magister* są wrażliwe na szereg inhibitorów, z których najefektywniej działa MgATP (Guderley i Hochachka, 1977). Metabolit ten hamuje kompetycyjnie enzym, zwłaszcza wobec fosfoenolopirogronianu jako substratu. 50% hamowania (K_i) przypada w zakresie stężeń 0,95 - 1,8 mM ATP. F-1,6-bP dla obu form PK znosi hamujący wpływ ATP wobec PEP, nie wpływa natomiast na reakcję z ADP.

Do innych inhibitorów PK epidermy kraba należą:

1) alanina, seryna i walina (wartości K_i dla wszystkich aminokwasów są wysokie, w granicach 30 - 45 mM),

2) cytrynian, α -ketoglutaran, α -glicerofosforan i jabłczan (metabolity te działają w wysokich, нефizjologicznych stężeniach), oraz

3) przypuszczalnie fosfoarginina (choć nie wykluczono współzawodnictwa o ADP pomiędzy PK a kinazą argininową, potencjalnego źródła błędów w ocenie oddziaływań fosfoargininy na PK (De Zwaan i Ebberink, 1978; Poat i wsp. 1980)).

3.1.7. Wzajemnie przemienne formy kinazy pirogronianowej epidermy kraba

Wyniki badań z zastosowaniem technik elektroforetycznych i ogniskowania izoelektrycznego, wykazujące istnienie jednego białka o aktywności kinazy pirogronianowej w epidermie kraba *C.magister*, sugerują jednocześnie, iż kinetyczne formy PK-I i PK-II są wzajemnie przemienialnymi formami tego samego enzymu. Badania kinetyczne wskazują z kolei, że F-1,6-bP stabilizuje konformację PK-I kinazy pirogronianowej epidermy, zapewniającą znacznie wyższą aktywność w niskich stężeniach substratu PEP (Guderley i Hochachka, 1977). Dla potwierdzenia tej hipotezy, inkubowano PK-II w obecności F-1,6-bP. Już dwuminutowa inkubacja prowadzi do 75% przemiany w formę PK-I, po 30 minutach przekształcenie jest prawie kompletne (95%). Stopień przekształcenia PK-II w PK-I zależy od stężenia F-1,6-bP, natomiast alanina i ATP urudniają przejście w PK-I (Guderley i Hochachka, 1977).

Nie znaleziono efektora zdolnego do przekształcenia formy PK-I w PK-II, nawet w czasie długotrwałej inkubacji. Jednak dializa PK-I w buforze pozbawionym F-1,6-bP powoduje znaczne przekształcenie enzymu w formę o małym powinowactwie do PEP, tj. PK-II (Guderley i Hochachka, 1977).

Niewiele wiadomo o stężeniach poszczególnych metabolitów w cytoplazmie epidermy skorupiaków. U kraba *C. magister* stężenie ATP waha się w granicach 2-3 mM, stężenia alaniny i seryny w przybliżeniu wynoszą 20 i 5 mM (Guderley i Hochachka, 1977). Niestety nie badano, jakie są stężenia PEP i F1,6-bP. Przyjmując za Guderley i Hochachka (1977), że stężenia PEP nie przekraczają 0,2 mM, można przypuszczać, iż PK-I (cechująca się stałą $S_{0,5}$ poniżej 0,1 mM) jest w tych warunkach wysoce aktywna (ok. 80% aktywności maksymalnej). Z kolei PK-II (o $S_{0,5}$ równej 0,5 mM i więcej) wykazuje w stężeniach PEP poniżej 0,2 mM co najwyżej 15% aktywności maksymalnej (Guderley i Hochachka, 1977), ponadto addytywne działania ATP, alaniny, seryny, a ewentualnie także cytrynianu obniżają aktywność do poziomu poniżej 1% aktywności maksymalnej. Jeżeli w warunkach wzmoczonej syntezy chityny aktywna fruktozo-1,6-bisfosfataza (Hochachka, 1972) zużywa w dużym stopniu F-1,6-bP, to brak tego metabolitu powoduje przekształcenie większości cząsteczek PK w formę o małym powinowactwie do PEP, praktycznie nieaktywną. W warunkach tych aktywności karboksykinazy pirogronianowej i karboksylazy pirogronianowej (choć niskie w porównaniu z aktywnością maksymalną PK) mogą zacząć przewyższać aktywność PK, a tym samym możliwy jest ciąg reakcji prowadzących do syntezy fosfoenolpirogronianu z niecukrowych prekursorów, a dalej skierowanie go w kierunku fruktozo-6-fosforanu. Uruchomiona zostałaby tym samym droga glukoneogenna. Synteza chityny z glukozaminy pochodzącej z glukozy lub ewentualnych glukogennych prekursorów zachodzi przede wszystkim po linii (Hornung i Stevenson, 1971; Speck i wsp. 1972), a więc w tym samym czasie, gdy obserwowano intensywne utlenianie cukrowców (Herz-Hübner i wsp. 1973). Temu intensywnemu utlenianiu winna towarzyszyć aktywacja fosfofruktokinazy, a ta z kolei winna podnosić poziom F-1,6-bP. Sprzyjałoby to stabilizacji formy PK-I, a cała droga glikolityczna mogłaby być wysoce efektywna. Odpowiadałoby to dużej szybkości utleniania węglowodanów w okresie polinieniowym (Herz-Hübner i wsp. 1973). Jednoczesne zachodzenie reakcji glikolitycznych i glukogennych w jednym przedziale komórkowym jest trudne do przyjęcia, tak więc można oczekiwać albo oscylacyjnych zmian aktywności obu torów albo też kwestionować znaczenie glukoneogenezy jako drogi syntezy prekursorów chityny. Dla pełnego wyjaśnienia mechanizmów regulacji glikolizy i glukoneogenezy w epidermie skorupiaków niezbędne są jednak dalsze badania, zwłaszcza nad regulacją aktywności fosfofruktokinazy w tej tkance.

4. MIĘŚNIE SKORUPIAKÓW

Mięśnie skorupiaków są silnie zróżnicowane w budowie i w funkcjach (Govind i Atwood, 1982; Chappie, 1982). Mięśnie lokomocyjne, a więc mięśnie kończyn i odwłoka, pod wieloma względami budowy i funkcji odpowiadają mięśniom szkieletowym białym kręgowców (Hochachka i wsp. 1971; Guderley i Hochachka, 1980). Dotyczy to przede wszystkim mięśni zginaczy odwłoka raków (Kennedy i Takeda, 1965ab) i homarów (Jahromi i Atwood, 1969; Newsholme i Leech, 1983), które całkowicie zbudowane są z jednorodnych włókien szybkiego skurczu (typu IIB wg klasyfikacji Newsholme'a i Leecha (1983)). Są to włókna o wysokiej aktywności glikolitycznej, małej ilości mitochondriów i tłuszczowców, których metabolizm energetyczny skurczu oparty jest prawie całkowicie na anaerobowej produkcji ATP przy wykorzystaniu rezerw glikogenu (Keller, 1965; Hochachka, 1976; Guderley i Hochachka, 1980; Newsholme i Leech, 1983). Mięśnie te są zdolne do bardzo szybkich, gwałtownych („wybuchowych”) skurczów, które zapewniają zwierzęciu szybką ucieczkę dzięki silnemu odrzutowi kurczącego się odwłoka (Webb, 1979; Newsholme i Leech, 1983; Onnen i Zebe, 1983).

Budowa innych mięśni skorupiaków jest przykładem adaptacyjnej korelacji ich struktury i funkcji. Są wśród nich mięśnie kurczące się szybko, tężcowo, lecz są też mięśnie o powoli, stopniowo narastającym napięciu (Govind i Atwood, 1982). Znajduje to odbicie w zróżnicowanym układzie włókien mięśniowych budujących poszczególne mięśnie (Chapple, 1982). Na przykład mięsień kruszącego szczyzca homara *Homarus americanus* jest zbudowany w większości z włókien wolno kurczących się, co związane jest z powolną, miazdżącą funkcją tej kończyny. Natomiast szczypce przecinające, szybko tnące schwytny pokarm, pracują w ten sposób dzięki mięśniowi zbudowanemu w 65-75% z włókien szybkiego skurczu (Jahromi i Atwood, 1971; Goudey i Lang, 1974; Lang i wsp. 1977). Mięśnie kończyn kroczynek wykazują z kolei pośrednią liczbę włókien szybkiego i wolnego skurczu, stąd ruchy ich cechuje pośrednia intensywność (Govind i Atwood, 1982).

Dla skurczu mięśni skorupiaków (typu IIB) w warunkach beztlenowych, wywołanych czy to intensywną pracą mięśnia (np. mięśnia odwłokowego w czasie gwałtownej ucieczki zwierzęcia), czy też w wyniku niedotlenienia środowiskowego u zwierząt żyjących w zamulonych, przybrzeżnych wodach stawów i jezior (np. raka *O. limosus*), niezbędne jest zapewnienie dostatecznej ilości ATP. Mięśnie skorupiaków cechuje wysoka aktywność glikolityczna (Hu, 1958; Huggins, 1966; Huggins i Munday, 1968; Boulton i Huggins, 1970; Hochachka i wsp. 1971; Schatzlein i wsp. 1973), natomiast stosunkowo niską aktywność mają enzymy utleniania kwasów tłuszczowych (Graszynski, 1968). Mięśnie skorupiaków zawierają sprawny komplet enzymów niezbędnych do syntezy glikogenu (Wang i Scheer, 1962, 1963; Keller, 1965; Ramamurthi i wsp. 1968) oraz jego degradacji (Cowgill, 1959; Sagardia, 1969; Assaf i Graves, 1969; Santiago i wsp.

1974ab; Benzonana, 1976; Hergenhahn, 1983). Mięśniowe zapasy glikogenu (Speck, 1969; Gäde i Zebe, 1973; Keller i Andrew, 1973; Spindler-Barth, 1976; Gäde, 1983) są katabolizowane glikolitycznie w czasie pracy mięśni skorupiaków (Zebe, 1982; Onnen i Zebe, 1983, Gäde, 1984), co zapewnia wystarczającą podaż ATP dla włókienek aparatu kurczliwego. Fosfagen, jakim jest w mięśniach skorupiaków fosfoarginina (Meyerhof i Lohmann, 1928; Beis i Newsholme, 1975), uzupełnia poziom ATP w pracującym mięśniu (Onnen i Zebe, 1983; Gäde, 1984).

Końcowym produktem glikolizy w mięśniu skorupiaków jest L-mleczan (Boyland, 1928; Dendinger i Schatzlein, 1973; Trausch, 1976a; Onnen i Zebe, 1983; Gäde, 1984). Dalsze losy mleczanu nie są jednoznacznie ustalone. U niektórych gatunków (Phillips i wsp. 1977; Onnen i Zebe, 1983) poziom mleczanu w hemolimfie, choć wzrasta po wysiłku mięśnia, zawsze jest jednak niski w porównaniu ze stężeniami mleczanu w mięśniu. Wysokie stężenie mleczanu po pracy mięśnia bardzo powoli wraca do poziomu spoczynkowego. Toteż wydaje się, iż mleczan powstający w czasie pracy mięśnia tych gatunków tylko w niewielkim stopniu jest usuwany do hemolimfy a metabolizowany jest przede wszystkim w obrębie samego mięśnia. Natomiast u raka *O. limosus* (Gäde, 1984) i kilku innych gatunków (Burke, 1979; Booth i wsp. 1982; Gäde, 1984) po wzmożonej pracy mięśnia stężenie mleczanu w hemolimfie znacznie wzrasta, co sugeruje dyfuzję metabolitu z tkanek prowadzących metabolizm anaerobowy. Wysoki poziom mleczanu w hemolimfie utrzymuje się długo (Bridges i Brand, 1980; Gäde, 1984), wydaje się więc, iż brak skorupiakom tkanki intensywnie metabolizującej mleczan. Nie jest też jasne, czy u zwierząt tych ma miejsce droga przemian odpowiadająca charakterystycznemu dla ssaków cyklowi Corich, w którym mleczan powstający w pracującym anaerobowo mięśniu przekazywany jest z krwią do hepatocytów, gdzie drogą glukoneogenezy odnawiana jest z niego glukoza, wracająca z krwią do mięśnia.

Niezależnie od wielkości dyfuzji mleczanu do hemolimfy po intensywnej pracy mięśni skorupiaków, w czasie odpoczynku część tego metabolitu jest wykorzystywana

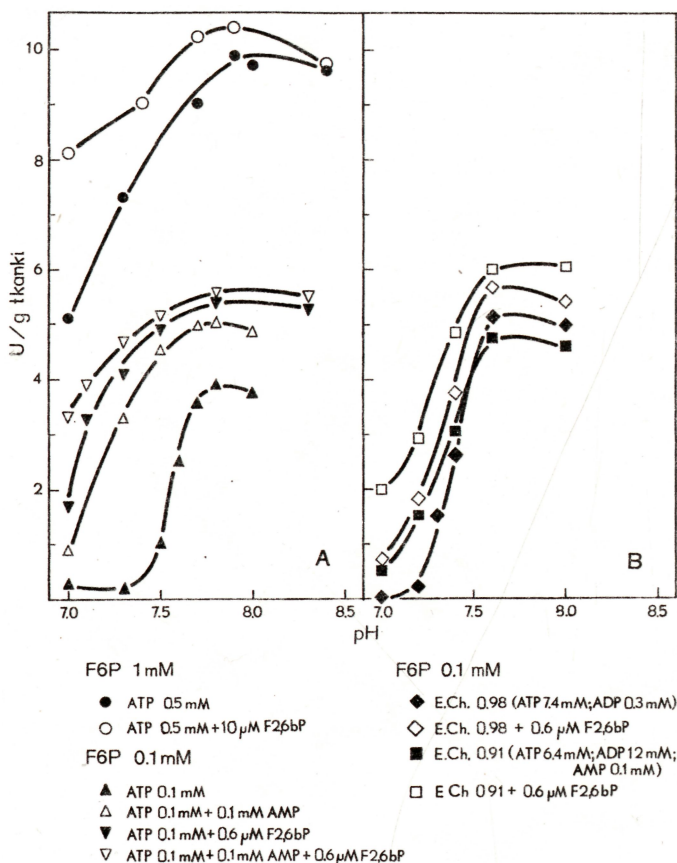
Tablica 9. Aktywność enzymów glukoneogennych w mięśniach skorupiaków.

	Karboksylaza pirogonianowa	Karboksykinaza fosfoenolpirogonianowa	Fruktozo-1,6-bisfosfataza
<i>Astacus leptodactylus</i>	0,045 1)	0,005 1)	
<i>Cancer magister</i>	0,05 2)	0,105 2)	47 3)
<i>Cherax destructor</i>	0 4)	0 4)	
<i>Chionocetes bairdi</i>	12,6 3)	16 3)	55 3)
<i>Crangon allmanni</i>		< 0,01 5)	
<i>Galathea squamifera</i>		0,3 5)	
<i>Homarus vulgaris</i>		0,6 - 1,3 5)	
		1,4 6)	
<i>Pandalus hypsinotus</i>	11 3)	17,5 3)	35 3)
<i>Paralithodes camtschatica</i>	15 3)	9 3)	45 3)
			60 - 65 7)
<i>Portunus puber</i>		< 0,01 5)	

Aktywność enzymatyczna wyrażono w $\mu\text{molach}/\text{min}/\text{g}$ tkanki. Cytowano z prac: 1) Van Marrewijk i wsp. 1973; Van Marrewijk i de Zwaan, 1976; 2) Guderley i Hochachka, 1980; 3) Behrisch, 1972; 4) Phillips i wsp. 1977; 5) Zammit i Newsholme, 1976; 6) Zammit i Newsholme, 1978; 7) Behrisch, 1975.

w obrębie samego mięśnia. Czy mleczan jest tylko spalany w odpoczywającym mięśniu skorupiaków, czy też może być jednocześnie substratem glukogennym tej tkanki? Pytanie to nabiera znaczenia w świetle wyników sugerujących, iż mięsień skorupiaków jest jedną z tkanek uwalniających glukozę do hemolimfy w odpowiedzi na hormon hiperglikemiczny (Keller i Andrew, 1973; Telford, 1975). W Tabelicy 9 zestawiono aktywność enzymów glukoneogennych, stwierdzaną w mięśniach skorupiaków. Choć poszczególne źródła podają mocno zróżnicowane wyniki, potencjalna możliwość uruchamiania glukoneogenezy w mięśniu skorupiaków istnieje (Behrisch, 1972).

Gwałtowne, „wybuchowe” uruchamianie drogi glikolitycznej w czasie pracy mięśnia, a z drugiej strony ewentualne wyłączenie niektórych enzymów glikolitycznych dla umożliwienia syntezy glukozy z mleczanu drogą glukoneogenną wymagają ścisłej kontroli aktywności enzymów glikolitycznych. Sugerowano, że miejscem regulacji aktyw-



Rys. 18. Zależność aktywności fosfofruktokinazy odwłokowego mięśnia raka *O. limosus* od pH i: (A) stężenia fruktozo-6-fosforanu, (B) „potencjału energetycznego” nukleotydów adenylowych. Pomiarzy prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym w obecności 0,1 lub 1,0 mM F6P; 0,1 lub 0,5 mM ATP; 0,1 mM AMP; 0,6 lub 10 μ M F-2,6-bP oraz przy „potencjale energetycznym” 0,91 lub 0,98.

ności glikolizy są w mięśni skorupiaków reakcje katalizowane przez fosfofruktokinazę i kinazę pirogronianową (Hochachka i wsp. 1971). Przyjęcie tej sugestii uzasadniało podjęcie badań nad własnościami obu enzymów.

4.1. FOSFOFRUKTOKINAZA MIĘŚNI SKORUPIAKÓW

Aktywność fosfofruktokinazy wykryto w mięśniach skorupiaków (Boulton i Huggins, 1970; Hochachka i wsp. 1971; Crabtree i Newsholme, 1972; Schatzlein i wsp. 1973) i wstępnie scharakteryzowano ten enzym (Freed, 1971; Sugden i Newsholme, 1975; Freed i Kirk, 1976; Lesicki, 1980). Wynikom dalszych badań nad fosfofruktokinazą z mięśni skorupiaków poświęcono następane podrozdziały pracy.

4.1.1. Zależność aktywności od pH

Stężenie jonów wodorowych jest czynnikiem regulującym aktywność PFK mięśnia odwłokowego raka *O. limosus* (Rys. 18). Optimum pH przypada w zakresie pH 7,8 - 8,0. W pH poniżej 7,7 aktywność gwałtownie maleje, zwłaszcza gdy w środowisku reakcji brak jest AMP i F-2,6-bP, a stężenia substratów F6P (0,1 mM) i ATP (0,1 mM) są niskie. AMP i F-2,6-bP modulują zależność aktywności PFK mięśnia raka od pH. W ich obecności, szczególnie przy niskim stężeniu substratów, optimum pH dla maksymalnej aktywności enzymu jest znacznie szersze (7,6 - 8,3), a aktywność PFK jest także zachowana w pH 7,0, tj. w pH, w którym bez AMP i F-2,6-bP enzym jest nieaktywny.

Zależność aktywności PFK mięśnia raka od pH badano również przy zmiennym „potencjale energetycznym” nukleotydów adenylowych (Rys. 18B). Wyniki potwierdzają wyżej przytoczone obserwacje. Pojawienie się AMP w środowisku reakcji (a więc obniżenie „potencjału energetycznego” z 0,98 do 0,91) zwiększa aktywność enzymu, a dodanie F-2,6-bP wzmacnia ten efekt, zwłaszcza w pH poniżej 7,5.

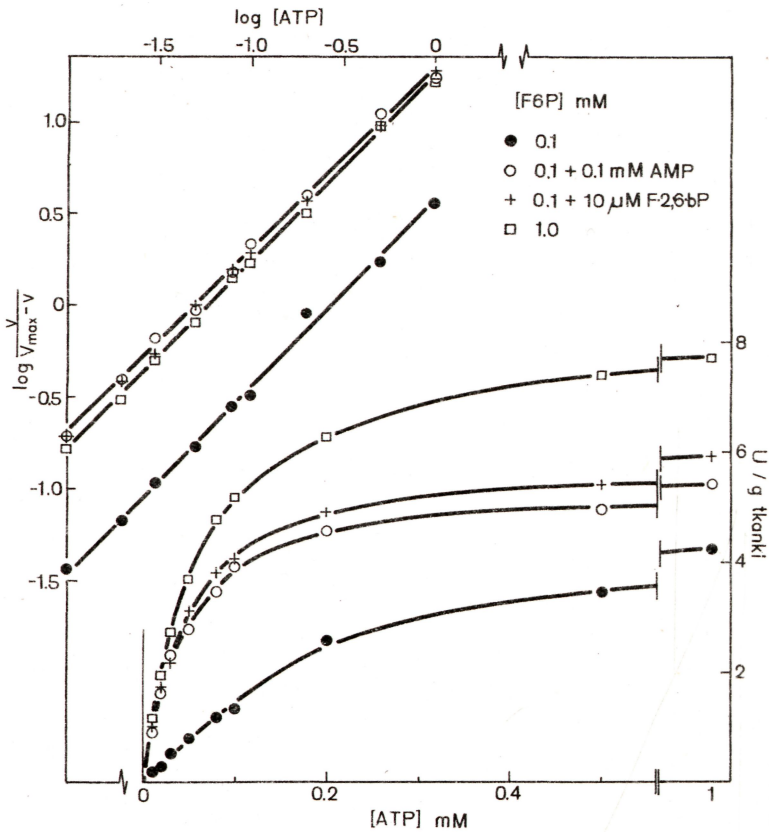
4.1.2. Zależność aktywności od stężenia ATP

Scharakteryzowano zależność aktywności PFK mięśnia raka *O. limosus* od stężenia ATP (Rys. 19, 20). Aktywność enzymu rośnie wraz ze wzrostem stężenia ATP do wartości ok. 0,8 - 1,0 mM. Powinowactwo enzymu do ATP w niewielkim stopniu zależy od pH, natomiast wpływają na nie stężenia: 1) kosubstratu, F6P; 2) AMP; 3) F-2,6-bP.

Tablica 10. Powinowactwo fosfofruktokinazy mięśnia odwłokowego raka *O. limosus* do ATP jako substratu.

F6P mM	F-2,6-bP mM	AMP mM		$S_{0,5}$	n_H
0,1	0	0	(4)	278 ± 34	1,02 ± 0,01
0,1	0	0,1	(5)	46 ± 8	0,99 ± 0,01
0,1	0,01	0	(3)	50 ± 6	1,00 ± 0,01
0,1	0,01	0,1	(1)	48	1,01
1,0	0	0	(5)	56 ± 2	1,01 ± 0,03
1,0	0,01	0	(1)	50	1,02

W tablicy zestawiono parametry kinetyczne obliczone na podstawie danych przedstawionych na Rys. 19, w podpisie którego opisano skład płynu inkubacyjnego. Podano wartości średnie (± S.E.) wyników uzyskanych w poszczególnych eksperymentach (liczba eksperymentów w nawiasach). Wartości $S_{0,5}$ wyrażono w μM .



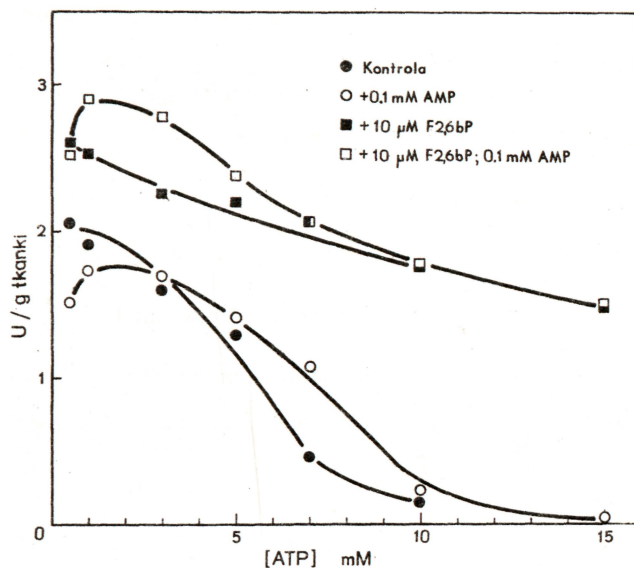
Rys. 19. Zależność aktywności fosfofinktokinazy odwłokowego mięśnia raka *O. limosus* od stężenia ATP. Pomiarzy prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,6 w obecności 0,1 lub 1,0 mM F6P oraz przy braku lub w obecności 0,1 mM AMP lub 0,01 mM F-2,6-bP. W górnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tablicy 10.

W obecności wysycającego enzym 1 mM stężenia F6P powinowactwo PFK do ATP jest większe, co wskazuje pięciokrotnie niższa wartość stałej $S_{0,5}$ w porównaniu z wartością tego parametru, wyznaczoną w niskim 0,1 mM stężeniu F6P (Tablica 10).

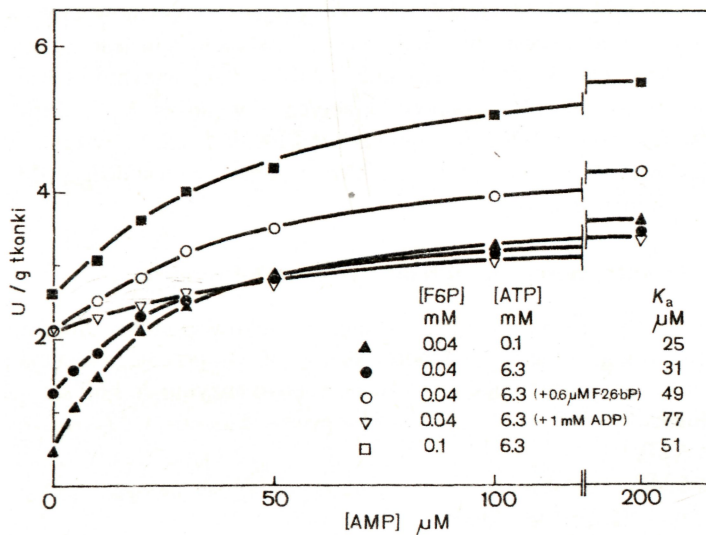
W niskich stężeniach F6P powinowactwo do ATP może być takie samo jak w stężeniach wysycających, gdy w środowisku reakcji znajduje się 0,1 mM AMP (Rys. 19, Tablica 10).

Również F-2,6-bP zwiększa powinowactwo PFK mięśnia raka do ATP (Rys. 19, Tablica 10).

ATP w stężeniach powyżej 1 mM działa jako inhibitor PFK mięśnia homara *Homarus vulgaris* (Sugden i Newsholme, 1975) i raka *O. limosus* (Lesicki, 1980; Rys. 20). W fizjologicznych stężeniach F6P już 2 mM ATP prawie całkowicie hamuje aktywność PFK. Inhibicji tej przeciwdziała wzrost stężenia F6P i jonów Mg^{2+} (Lesicki, 1980), a przede wszystkim obecność aktywatorów AMP i F-2,6-bP (Rys. 20). Oba aktywatory współdziałają ze sobą i najsilniej efekt ochronny wywierają wspólnie.



Rys. 20. Hamujący wpływ wyższych stężeń ATP na aktywność fosfofruktokinazy mięśnia odwłokowego raka *O. limosus*. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,6 w obecności 0,1 mM F6P oraz przy braku lub w obecności 0,1 mM AMP lub/i 0,01 mM F-2,6-bP.



Rys. 21. Zależność aktywności fosfofruktokinazy odwłokowego mięśnia raka *O. limosus* od stężenia aktywatora AMP. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,6 w obecności 0,04 lub 0,1 mM F6P; 0,1 lub 6,3 mM ATP oraz przy braku lub w obecności 0,6 μ M F-2,6-bP lub 1,0 mM ADP.

4.1.3. AMP jako aktywator fosfofruktokinazy mięśni skorupiaków

Aktywność PFK mięśnia raka *O. limosus* zależy od stężenia AMP (Rys. 21). Powinowactwo enzymu do aktywatora jest największe w niskich stężeniach F6P i ATP. Obecność innych aktywatorów (ADP, F-2,6-bP) zmniejsza powinowactwo PFK do AMP.

4.1.4. Fruktozo-2,6-bisfosforan jako aktywator

F-2,6-bP jest silnym aktywatorem PFK mięśnia raka *O. limosus* (Rys. 22). PFK wykazuje zdolność do wiązania F-2,6-bP przede wszystkim w niskim stężeniu substratu F6P (0,05 mM), zarówno przy niskim (0,2 mM) jak i wysokim, hamującym (7 mM) stę-

Tablica 11. Powinowactwo fosfofruktokinazy mięśnia odwołkowego raka *O. limosus* do aktywatora fruktozo-2,6-bisfosforanu.

pH	AMP		K_a	n_H
7,0	-	(4)	4611 ± 349	$1,41 \pm 0,06$
	+	(3)	1349 ± 51	$1,02 \pm 0,02$
7,6	-	(5)	218 ± 64	$0,91 \pm 0,09$
	+	(1)	59	0,98
*	-	(0)	105	1,01

W tablicy zestawiono parametry kinetyczne obliczone na podstawie danych przedstawionych na Rys. 22. Aktywność PFK mierzono w obecności 0,04 mM F6P i 0,2 mM ATP (* 7 mM ATP). Znakiem „+” oznaczono dodanie 0,1 mM AMP, znakiem „-” brak AMP. Podano wartości średnie (\pm S.E.) wyników uzyskanych w poszczególnych eksperymentach (liczba eksperymentów w nawiasach). Wartości K_a wyrażono w nM.

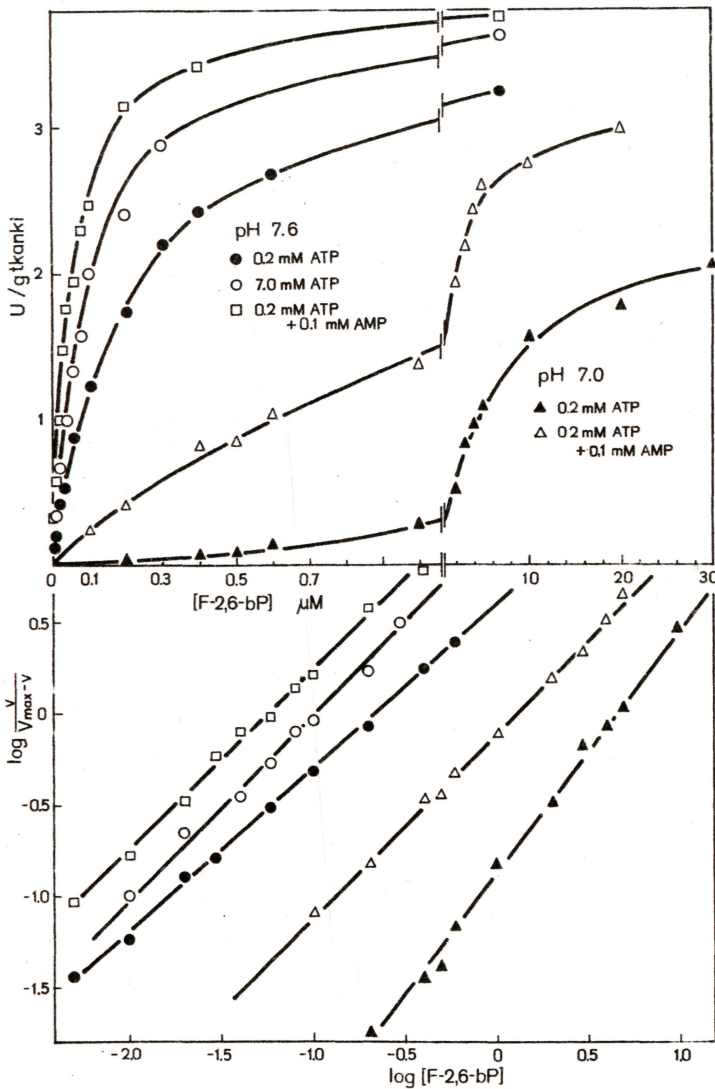
żeniu ATP. Natomiast powinowactwo PFK mięśnia do F-2,6-bP silnie zmieniane jest przez pH środowiska. W pH 7,0 stała K_a charakteryzująca to powinowactwo wynosi ok. 4,5 μ M (Tablica 11), a krzywa wysycania enzymu aktywatorem jest sigmoidalna (n_H 1,4; Tablica 11, Rys. 22). W pH 7,0 wiązanie F-2,6-bP przez enzym jest więc trudniejsze niż w pH 7,6 (w tym pH parametry kinetyczne wynoszą K_a 0,22 μ M i n_H 0,91 (krzywa hiperboliczna)). To niższe powinowactwo PFK do F-2,6-bP w pH 7,0 pozytywnie modyfikuje AMP. W obecności 0,1 mM AMP K_a obniżona jest do 1,3 μ M, a krzywa kinetyki ma kształt hiperboliczny.

4.1.5. Zależność aktywności od stężenia fruktozo-6-fosforanu

Wykazano, że powinowactwo PFK mięśnia odwołkowego raka *O. limosus* do F6P zależne jest od szeregu czynników środowiska, w którym przebiega reakcja (Rys. 23 - 26). I tak, czynnikami modyfikującymi powinowactwo enzymu do F6P są:

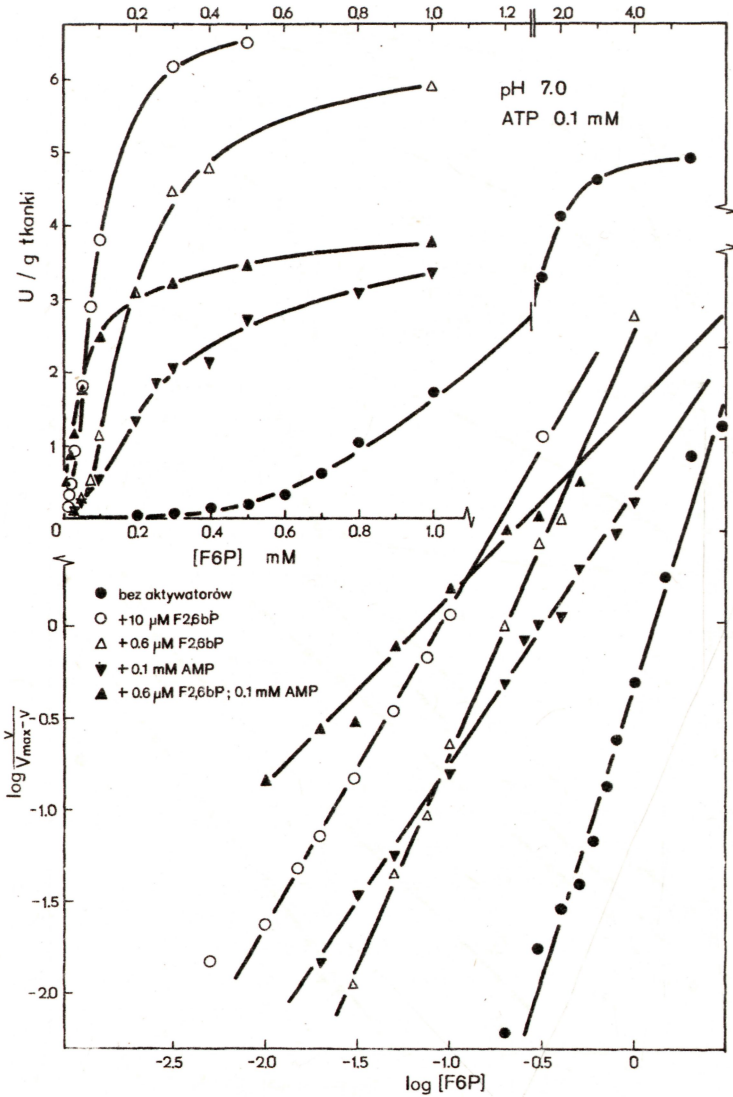
- 1) pH środowiska,
- 2) stężenie ATP,
- 3) stężenie AMP,
- 4) „potencjał energetyczny” nukleotydów adenylowych,
- 5) stężenie fruktozo-2,6-bisfosforanu,
- 6) temperatura.

W pH 7,0 (Rys. 23, 24) PFK mięśnia raka *O. limosus* cechuje się znacznie niższym powinowactwem do F6P niż w pH 7,6 (Rys. 25, 26). Wartość stałej $S_{0,5}$, wyznaczana



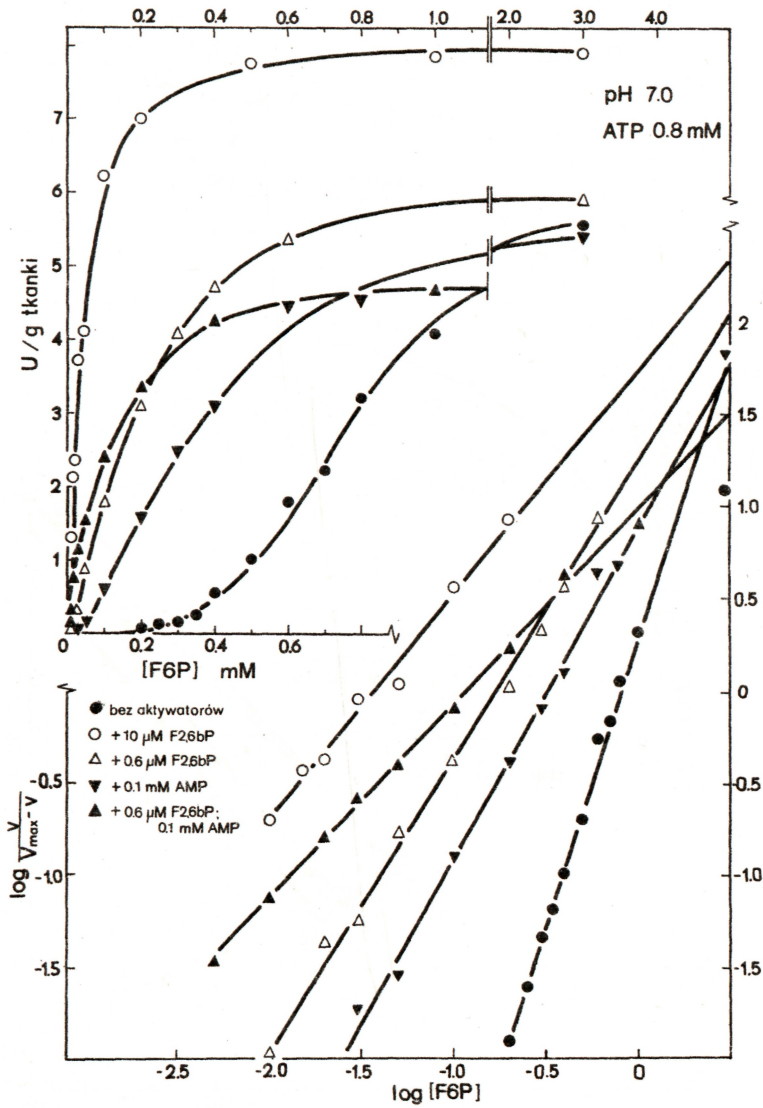
Rys. 22. Zależność aktywności fosfofruktokinazy odwołokowego mięśnia raka *O. limosus* od stężenia aktywatora fruktozo-2,6-bisfosforanu. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,0 lub 7,6 w obecności 0,05 mM F6P; 0,2 lub 7,0 mM ATP oraz przy braku lub w obecności 0,1 mM AMP. W dolnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tabelicy 11.

przy braku aktywatorów (F-2,6-bP, AMP) jest dziesięciokrotnie wyższa w pH 7,0 niż pH 7,6 (Tabelica 12). Sigmoidalny kształt krzywej wysycenia enzymu przez F6P jest wyraźny w pH 7,0 (współczynnik Hilla n_H większy od 3), podczas gdy w pH 7,6 kształt krzywych kinetyki reakcji jest nieznacznie sigmoidalny ($n_H=1,23 - 1,50$), a więc i kooperatywne oddziaływania enzymu i substratu są mniejsze.



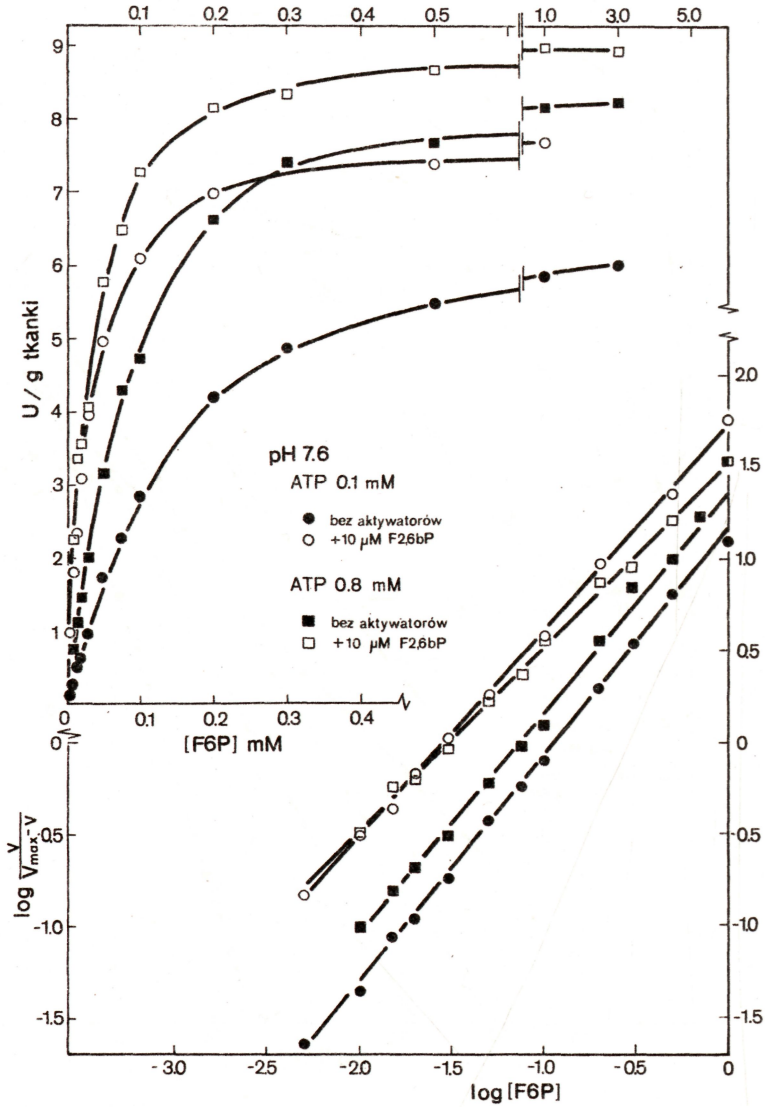
Rys. 23. Zależność aktywności fosfofruktokinazy odwłokowego mięśnia raka *O. limosus* od stężenia substratu fruktozo-6-fosforanu w pH 7,0 i w obecności 0,1 mM ATP. Badano wpływ 0,6 lub 10 μM F-2,6-bP oraz 0,1 mM AMP na zależność. W dolnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tabelcy 12.

Zarówno w pH 7,0 (Rys. 23, 24) jak i 7,6 (Rys. 25, 26) obserwowano wzrost aktywności PFK po zwiększeniu stężenia kosubstratu ATP z 0,1 mM do 0,8 mM. Wynika to z faktu, że stężenie 0,1 mM ATP jest stężeniem dalece niewysycającym PFK, natomiast 0,8 mM ATP jest stężeniem optymalnym dla reakcji (Rys. 19, 20;



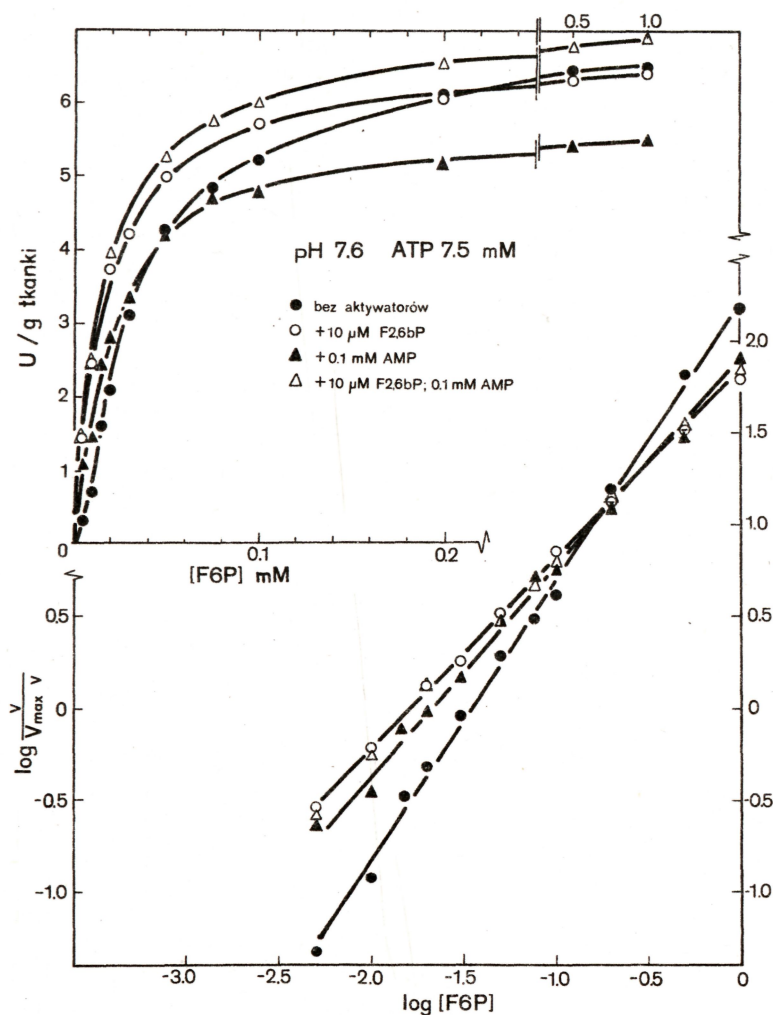
Rys. 24. Zależność aktywności fosfofruktokinazy odwołkowego mięśnia raka *O.limosus* od stężenia substratu fruktozo-6-fosforanu w pH 7,0 i w obecności 0,8 mM ATP. Badano wpływ 0,6 lub 10 μ M F-2,6-bP oraz 0,1 mM AMP na zależność. W dolnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tablicy 12.

Lesicki, 1980). Choć wzrost stężenia ATP nie modyfikuje wartości współczynnika n_H (Tablica 12), to jednak w wyższym stężeniu ATP powinowactwo enzymu do substratu jest większe. Wartość stałej $S_{0.5}$ ulega obniżeniu, szczególnie istotnie w pH 7,0 (Rys. 24; Tablica 12).



Rys. 25. Zależność aktywności fosfofruktokinazy odłokowego mięśnia raka *O. limosus* od stężenia substratu fruktozo-6-fosforanu w pH 7,6 i w obecności 0,1 lub 0,8 mM ATP. Badano wpływ 10 μ M F-2,6-bP na zależność. W dolnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tabelicy 12.

AMP jest aktywatorem PFK mięśnia odłokowego skorupiaków (Freed, 1971; Freed i Kirk, 1976; Lesicki, 1980). Aktywujące działanie tego nukleotydu przejawia się zwiększaniem powinowactwa PFK do F6P. W obecności 0,1 mM AMP obniżeniu ulegają stałe $S_{0.5}$ i n_H (Tabelica 12), w znacznie większym stopniu w pH 7,0 (Rys. 23, 24;



Rys. 26. Zależność aktywności fosfofruktokinazy odwłokowego mięśnia raka *O. limosus* od stężenia substratu fruktozo-6-fosforanu w pH 7,6 i w obecności 7,5 mM ATP. Badano wpływ 10 μM F-2,6-bP i 0,1 mM AMP na zależność. W lewej dolnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tablicy 12.

Tablica 12). Krzywe kinetyki reakcji przesunięte są w lewo (obniżenie współczynnika n_H z wartości ok. 3 do ok. 1,5), co oznacza, że enzym jest bardziej aktywny w fizjologicznych stężeniach F6P. Ale dla PFK mięśnia skorupiaków charakterystyczne jest także hamowanie przez AMP maksymalnej szybkości reakcji, a więc reakcji przebiegającej w wysycających enzym stężeniach F6P (Rys. 24, 26; Lesicki, 1980). Podobne hamujące działanie AMP obserwowano w przypadku PFK mięśnia kraba *Paralithodes camtschatica* (Freed, 1971) oraz PFK mięśnia raka *Orconectes virilis* (Freed i Kirk, 1976). Znaczenie tego hamowania wydaje się problematyczne, gdyż pojawia się dopiero w wysokich,

niefizjologicznych stężeniach F6P. Istotne dla mechanizmu reakcji katalizowanej przez PFK jest przede wszystkim aktywujące działanie AMP w niskich stężeniach F6P.

Wykazano (Lesicki, 1980), że także ADP aktywuje w pewnym stopniu PFK mięśnia raka *O. limosus*. Krzywa kinetyki reakcji z F6P jako substratem zależy więc od wzajemnego stosunku wszystkich nukleotydów adenylowych, wyrażanego równaniem „potencjału energetycznego” (Atkinson i Walton, 1967). Wartość „potencjału” zbliżona do jedności odpowiada warunkom, gdy niemal całą pulę nukleotydów adenylowych zajmuje ATP. W warunkach tych PFK mięśnia cechuje sigmoidalna kinetyka reakcji (Lesicki, 1980). Obniżenie „potencjału energetycznego” (a więc pojawienie się wśród nukleotydów adenylowych ADP i AMP) zwiększa powinowactwo enzymu do substratu, a krzywa kinetyki staje się hiperboliczna.

Tablica 12. Powinowactwo fosfofruktokinazy mięśnia odwłokowego raka *O. limosus* do substratu fruktozo-6-fosforanu.

pH	ATP mM	F-2,6-bP	AMP mM		$S_{0,5}$	n_H	
7,0	0,1	0	0	(3)	1278 ± 103	3,19 ± 0,34	
	0,1	10,0	0	(3)	95 ± 3	1,65 ± 0,11	
	0,1	0,6	0	(1)	200	2,32	
	0,1	0	0,1	(1)	316	1,47	
	0,1	0,6	0,1	(2)	65	1,02	
	0,8	0	0	(3)	837 ± 38	3,28 ± 0,09	
	0,8	10,0	0	(1)	36	1,19	
	0,8	0,6	0	(3)	168 ± 25	1,62 ± 0,20	
	0,8	0	0,1	(1)	320	1,80	
	0,8	0,6	0,1	(3)	112 ± 10	1,02 ± 0,03	
	7,6	0,1	0	0	(3)	111 ± 4	1,24 ± 0,01
		0,1	10,0	0	(3)	29 ± 1	1,09 ± 0,01
0,1		0	0,1	(3)	84 ± 4	1,00 ± 0,01	
0,8		0	0	(3)	75 ± 1	1,23 ± 0,10	
0,8		10,0	0	(3)	30 ± 5	1,01 ± 0,05	
7,5		0	0	(1)	34	1,50	
7,5		10,0	0	(1)	16	1,03	
7,5		0	0,1	(1)	20	1,13	
7,5		10,0	0,1	(1)	16	1,01	

W tablicy zestawiono parametry kinetyczne obliczone na podstawie danych przedstawionych na Rys. 23 - 26, w podpisach których opisano skład płynu inkubacyjnego. Podano wartości średnie (± S.E.) wyników uzyskanych w poszczególnych eksperymentach (liczba eksperymentów w nawiasach). Wartości $S_{0,5}$ wyrażono w μM .

Czynnikiem najsilniej modyfikującym powinowactwo PFK mięśnia raka do F6P jest F-2,6-bP. Związek ten we wszystkich badanych stężeniach zwiększał aktywność PFK i jej powinowactwo do F6P oraz niwelował kooperacyjne oddziaływania enzym-substrat (Rys. 23 - 26). W jego obecności notowano więc znaczne obniżenie stałych $S_{0,5}$ i n_H (Tablica 12). Dla podkreślenia aktywującego działania F-2,6-bP można przytoczyć obniżenie $S_{0,5}$ z 1278 μM do 95 μM , a n_H z 3,19 do 1,65, stwierdzone w pH 7,0 (przy $[\text{ATP}] = 0,1 \text{ mM}$).

Zauważyć należy, że maksymalna aktywacja PFK wywołana przez wysycające enzym stężenie AMP (0,1 mM) była niższa niż osiągnięta przez 10 μM F-2,6-bP (Rys. 23, 24; Tablica 12). Już 0,6 μM F-2,6-bP aktywuje PFK mięśnia w pH 7,0, ale stężenie to

nie wystarcza dla uzyskania efektu maksymalnego, zarówno przy stężeniu ATP 0,1 mM (Rys. 23, Tablica 12) jak i 0,8 mM (Rys. 24; Tablica 12). Natomiast 0,6 μ M F-2,6-bP w obecności 0,1 mM AMP daje pełną aktywację enzymu, zbliżoną do uzyskiwanej w obecności stężeń F-2,6-bP wysycających PFK. Wskazuje to na współdziałanie obu aktywatorów w mechanizmie aktywacji PFK.

Czynnikiem modyfikującym powinowactwo PFK mięśnia skorupiaków do F6P jest, przynajmniej dla niektórych gatunków, temperatura (Freed, 1971). PFK z mięśni kraba z Alaski, *P.camtschatica*, wykazuje obniżenie powinowactwa enzymu do F6P (wzrost stałych $S_{0,5}$ i n_H) wraz ze wzrostem temperatury z 5°C do 25°C. Jednak dalsze badania (Freed i Kirk, 1976) nad PFK mięśnia raka *O.virilis* nie wykazały różnic maksymalnej aktywności enzymu, powinowactwa do F6P ($S_{0,5}$) i wrażliwości na AMP u raków aklimowanych do trzech temperatur 5°, 10° i 25°C.

4.2. KINAZA PIROGRONIANOWA MIĘŚNI SKORUPIAKÓW

W mięśniach skorupiaków obserwuje się wysoką aktywność kinazy pirogronianowej (Boulton i Huggins, 1970; Hochachka i wsp. 1971; Schatzlein i wsp. 1973; Gäde i Zebe, 1973; Van Marrewijk i wsp. 1973; Trausch, 1976b). Charakterystykę enzymu przedstawiono w szeregu prac (Somero, 1969; Guderley i wsp. 1976a; Lesicki, 1974, 1976, 1977, 1983c, 1988; Newton i wsp. 1976ab; Trausch, 1976c; Zammit i Newsholme, 1978; Zammit i wsp. 1978; Guderley i Hochachka, 1980; Lesicki i Obuchowicz, 1980; Poat i wsp. 1980), a porównanie prezentowanych w nich wyników oraz rezultatów dalszych prac własnych nad PK mięśnia raka *O.limosus* jest treścią kolejnych podrozdziałów.

4.2.1. Badania elektroforetyczne i chromatograficzne

W mięśniach skorupiaków kinaza pirogronianowa występuje jako pojedyncze białko. Wykazano to metodami elektroforetycznymi (Somero, 1969; Lesicki, 1976; Newton i wsp. 1976a; Lesicki i Obuchowicz, 1980; Guderley i Hochachka, 1980) i chromatograficznymi (Trausch, 1976c; Trausch i Bauchau, 1980), a także metodą ogniskowania izoelektrycznego (Somero, 1969; Guderley i Hochachka, 1980).

Rozdział elektroforetyczny wyciągu z mięśnia odwłokowego raka *O.limosus*, zarówno na żelu agarowym (Lesicki, 1976), jak i skrobiowym (Lesicki i Obuchowicz, 1980), wykazuje obecność pojedynczej formy kinazy pirogronianowej w tej tkance. Ruchliwość elektroforetyczną PK mięśnia raka jest zbliżona, choć niejednakowa, do ruchliwości elektroforetycznej PK z gruczołu jelita środkowego raka (Rys. 9). Pojedynczą elektroforetyczną formę PK wykazano również w mięśniach krabów *Cancer magister* (elektroforeza na żelu skrobiowym, Guderley i Hochachka, 1980) i *Paralithodes camtschatica* (elektroforeza na żelu octanu celulozy, Somero 1969). Natomiast po elektroforezie na żelu poliakrylamidowym wyciągu z mięśni odnóży kraba *Carcinus maenas* wywołano dwa pasma aktywności PK, jedno znacznie intensywniejsze od drugiego (Newton i wsp. 1976a).

Ogniskowanie izoelektryczne wykazało pojedynczą formę PK w mięśniach krabów *C.magister* (Guderley i Hochachka, 1980) i *P.camtschatica* (Somero, 1969). Punkt izoelektryczny (pI) dla PK z mięśnia *C.magister* ustalono w pH 6,4, natomiast PK mięśnia *P.camtschatica* ma nieco niższy pI, równy 5,62.

Istnienie w mięśniach homara *Homarus americanus* pojedynczego białka o aktywności PK wykazano na kolumnach chromatograficznych z żelu DEAE-celulozy i Sephadexu G-200, choć jednocześnie stwierdzono różnice chromatograficzne dla PK z mięśnia odwłokowego i szczypiec (Trausch, 1976c). Enzym z mięśnia homara zachowuje się w czasie chromatografii jonowymiennej odmiennie niż enzym z gruczołu jelita środkowego (Trausch i Bauchau, 1980).

4.2.2. Ciężar cząsteczkowy

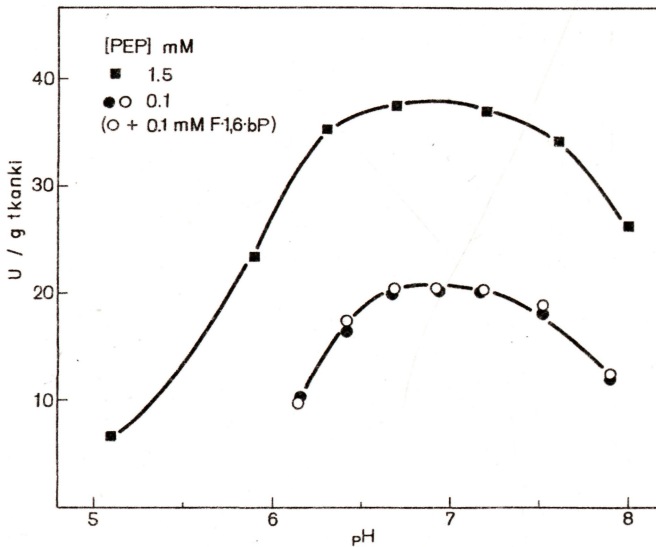
Ciężar cząsteczkowy PK mięśni skorupiaków ustalono dla następujących enzymów:

- PK mięśnia odwłokowego homara *H.americanus* 254 000 ± 10% (Trausch, 1976c),
- PK mięśnia szczypiec homara *H.americanus* 266 000 ± 10% (Trausch, 1976c),
- PK mięśnia odnóży kraba *C.maenas* 240 000 (Munday i wsp. 1980).

Chromatografia z dodatkiem siarczanu dodecyłu pozwoliła na ustalenie ciężaru cząsteczkowego identycznych podjednostek, ocenianego na 65 000 (± 105) dla PK homara (Trausch, 1976c) lub 53 000 dla enzymu kraba (Munday i wsp. 1980). Wyniki te sugerują tetrameryczną strukturę PK mięśni skorupiaków.

4.2.3. Optimum pH

PK mięśni skorupiaków wykazuje najwyższą aktywność w obojętnym pH. Enzym z mięśnia odwłokowego raka *O.limosus* cechuje względnie szeroki zakres optymalnego pH (6,7-7,3; Rys. 27), nie modyfikowany obecnością fruktozo-1,6-bisfosforanu. Podobnie szerokie obojętne optimum pH, nie ulegające zmianie pod wpływem F-1,6-bP, cechuje PK z mięśni krewetki *Oplophorus gracilirostris* (Guderley i wsp. 1976a), homara *Homarus vulgaris* (Zammit i Newsholme, 1978) i kraba *Cancer magister* (Guderley i Hochachka, 1980).



Rys. 27. Zależność aktywności kinazy pirogronianowej mięśnia odwłokowego raka *O.limosus* od pH. Pomiarzy prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym zawierającym 1 mM ADP oraz 0,1 lub 1,5 mM PEP.

4.2.4. Zależność aktywności od stężenia ADP

Kinaza pirogronianowa mięśni skorupiaków cechuje się hiperboliczną krzywą kinetyki reakcji z ADP jako substratem (Lesicki, 1976; Trausch, 1976c; Guderley i wsp. 1976a; Zammit i Newsholme, 1978; Guderley i Hochachka, 1980). Wartości stałych $S_{0,5}$ wobec ADP jako substratu wahają się w stosunkowo niedużym zakresie dla enzymów z różnych skorupiaków (Tablica 13). W przeciwieństwie do PK gruczołu jelita środkowego, powinowactwo PK mięśnia do ADP nie zależy od stężenia PEP (Guderley i wsp. 1976a; Guderley i Hochachka, 1980). U raka *O. limosus* (Tablica 13) obserwuje się pewien wzrost powinowactwa do ADP wraz ze wzrostem stężenia PEP (podobne niewielkie zmiany powinowactwa notowano w przypadku homara *H. vulgaris* (Trausch 1976c)), jest on jednak na tyle niewielki, iż przypuszczalnie nie odgrywa roli w regulacji aktywności enzymu w warunkach *in vivo*.

Tablica 13. Powinowactwo kinazy pirogronianowej mięśni skorupiaków do ADP.

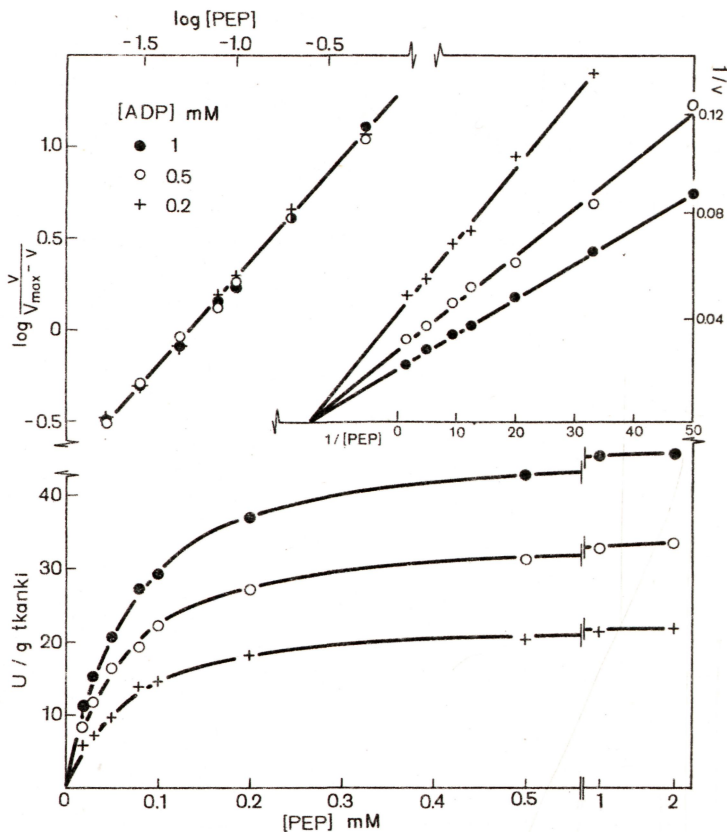
	PEP mM	$S_{0,5}$ mM
<i>Orconectes limosus</i>	2,0	0,25
	1,0	0,30 1)
	0,5	0,31
	0,1	0,34
<i>Cancer magister</i>	2,0	0,23 - 0,29 2)
<i>Homarus vulgaris</i>	2,0	0,15 3)
	1,0	0,10 4)
	0,2	0,143 4)
<i>Oplophorus gracilirostris</i>	2,0	0,27 5)

Cytowano z prac: 1) Lesicki, 1976; 2) Guderley i Hochachka, 1980; 3) Zammit i Newsholme, 1978; 4) Trausch, 1976c; 5) Guderley i wsp. 1976a.

Urydynodifosforan (Guderley i Hochachka, 1980; Lesicki 1988), a także guanozynodifosforan i inozynodifosforan (Guderley i Hochachka, 1980) mogą być alternatywnymi substratami w miejsce ADP dla PK mięśni skorupiaków. Powinowactwo enzymu jest jednak do tych nukleotydów znacznie niższe niż wobec ADP (Guderley i Hochachka, 1980; Lesicki, 1988).

4.2.5. Zależność aktywności od stężenia fosfoenolpirogronianu

Kinaza pirogronianowa z mięśni skorupiaków (Lesicki, 1976; Guderley i wsp. 1976a; Trausch, 1976c; Guderley i Hochachka, 1980) przypomina swymi właściwościami PK mięśni ssaków (Tanaka i wsp. 1967; Cottam i wsp. 1969; Imamura i wsp. 1972; Cardenas i wsp. 1973; Munday i wsp. 1980). Kształt krzywej kinetyki wysycenia enzymu substratem fosfoenolpirogronianem jest hiperboliczny (Rys. 28) i enzym cechuje duże powinowactwo do PEP. Stałe $S_{0,5}$ wobec tego substratu wynoszą 40 μ M dla PK mięśnia odwłokowego krewetki *O. gracilirostris* (Guderley i wsp. 1976a), 67 μ M dla PK mięśnia odwłokowego raka *O. limosus* (Lesicki, 1976), 80-110 μ M dla PK mięśnia kraba

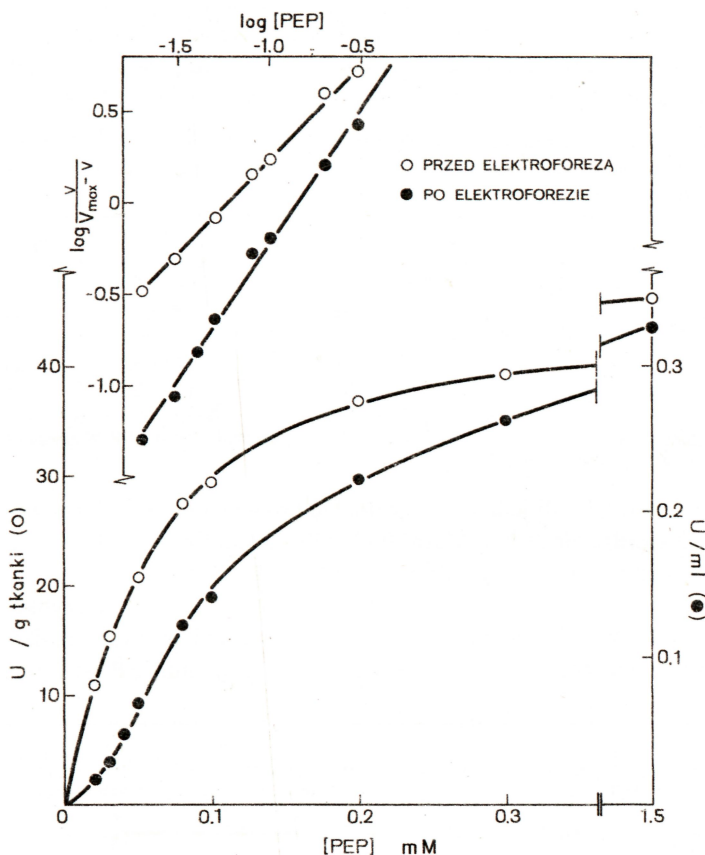


Rys. 28. Zależność aktywności kinazy pirogronianowej mięśnia odwłokowego raka *O. limosus* od stężenia substratu fosfoenolpirogonianu. Pomiarzy prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,0 w obecności 0,2; 0,5 lub 1,0 mM ADP. W górnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresów Hilla (po lewej) i Lineweavera-Burka (po prawej).

C. magister (Guderley i Hochachka, 1980), 118-123 μM dla PK mięśni odwłokowego i szczypiec homara *H. vulgaris* (Trausch, 1976c). Powinowactwo do PEP nie jest modyfikowane stężeniami kosubstratu ADP (Rys. 28; Guderley i wsp. 1976a; Guderley i Hochachka, 1980).

4.2.6. Wpływ fruktozo-1,6-bisfosforanu

Początkowe badania wykazywały, że PK mięśnia odwłokowego raka *O. limosus* (Lesicki, 1974, 1976) nie jest aktywowana przez fruktozo-1,6-bisfosforan, podobnie jak PK z mięśni krewetki *O. gracilirostris* (Guderley i wsp. 1976a), homara *H. vulgaris* (Trausch, 1976c) i kraba *C. maenas* (Munday i wsp. 1980). W powyższych pracach sugerowano, że metabolit ten nie modyfikuje kinetyki PK mięśnia odwłokowego z PEP i ADP jako substratami.



Rys. 29. Porównanie zależności aktywności od stężenia substratu fosfoenolopirogronianu dla kinazy pirogronianowej mięśnia raka *O. limosus* w ekstraktach przed i po elektroforezie na żelu skrobiowym. Pomiarzy prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,0 w obecności 1 mM ADP. W górnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tabelicy 14.

Natomiast PK mięśnia kraba *C. magister* (Guderley i Hochachka, 1980) jest aktywowana przez F-1,6-bP w niskich stężeniach PEP. W przypadku tego enzymu F-1,6-bP ułatwia wiązanie PEP. Powinowactwo PK do PEP wzrasta, bowiem wartość $S_{0,5}$ maleje z 85 μM przy braku F-1,6-bP do 45 μM w obecności aktywatora. Podobny aktywujący wpływ F-1,6-bP wykazano w ponownych badaniach nad PK mięśni homara (Zammit i wsp. 1978; Zammit i Newsholme, 1978). Stała $S_{0,5}$ przy braku aktywatora wynosi dla PK homara 150 - 200 μM , natomiast w obecności F-1,6-bP maleje do 70 μM , a to wskazuje, iż również w przypadku PK mięśnia homara, F-1,6-bP aktywuje enzym poprzez zwiększenie jego powinowactwa do PEP.

Porównanie własności kinetycznych PK mięśnia raka *O. limosus* przed i po elektroforezie na żelu skrobiowym (Lesicki i Obuchowicz, 1980) sugerowało zmianę własności kinetycznych enzymu ekstrahowanego z żelu po elektroforezie (Rys. 29). Wysokie po-

winowactwo do PEP, jakim cechuje się enzym przed elektroforezą, ulega po elektroforezie obniżeniu, a stała $S_{0,5}$ wzrasta blisko trzykrotnie (Tablica 14). PK wyekstrahowana z żelu po elektroforezie jest, w przeciwieństwie do enzymu przed rozdzieleniem, aktywowana przez F-1,6-bP i cechuje ją bardzo wysokie powinowactwo do tego aktywatora

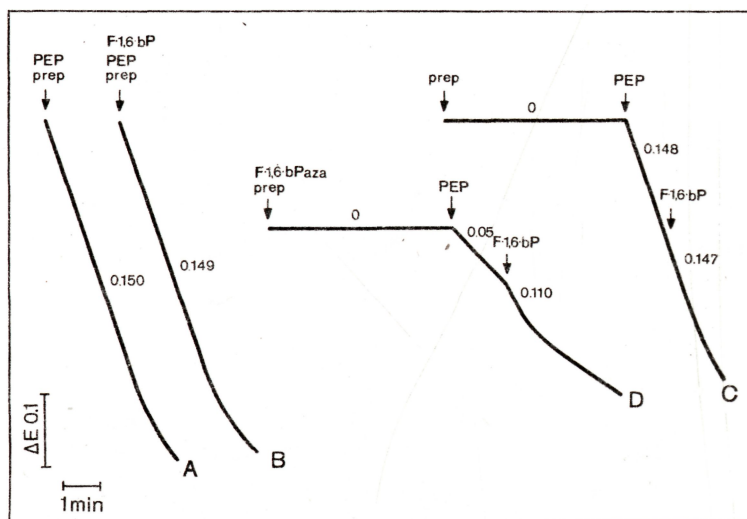
Tablica 14. Zestawienie parametrów kinetycznych charakteryzujących powinowactwo do fosfoenolopirogronianu kinazy pirogronianowej mięśnia odwłokowego raka *O.limosus* wyznaczanych przed i po elektroforezie na żelu skrobiowym oraz przed i po wysoleniu siarczanem amonu.

		$S_{0,5}$	n_H
PK w surowym ekstrakcie tkankowym przed elektroforezą lub wysoleniem	(8)	54 ± 7	$1,01 \pm 0,01$
PK ekstrahowana z żelu skrobiowego po elektroforezie	(5)	149 ± 42	$1,43 \pm 0,06$
PK wysolona 40 - 60% $(NH_4)_2SO_4$	(3)	138 ± 25	$1,52 \pm 0,05$

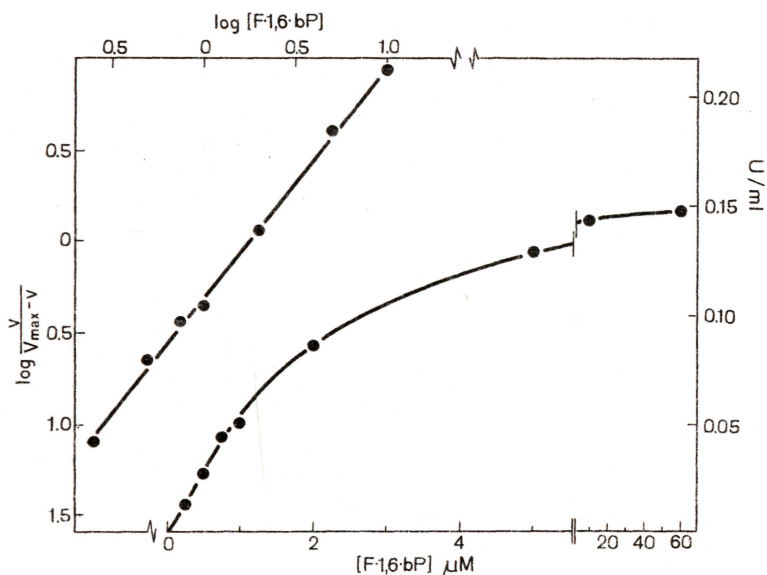
Podano wartości średnie \pm S.E. Aktywność PK mierzono w pH 7,4 w obecności 2 mM ADP. W nawiasach podano liczbę eksperymentów. Wartości $S_{0,5}$ wyrażono w μ M.

($K_a=1,8 \mu$ M F-1,6-bP). Jeśli jednak elektroforezę prowadzi się w buforze zawierającym F-1,6-bP, nie stwierdza się zmian własności kinetycznych PK po elektroforezie i enzym pozostaje niewrażliwy na F-1,6-bP (Lesicki i Obuchowicz, 1980).

W badaniach spektrofotometrycznych nie stwierdzano różnicy w szybkości początkowej reakcji w zależności od tego, czy reakcję w kuwecie inicjowano podaniem preparatu PK mięśnia raka *O.limosus*, czy też podaniem substratu PEP po kilkuminutowej



Rys. 30. Szybkość początkowa reakcji katalizowanej przez kinazę pirogronianową mięśnia odwłokowego raka *O.limosus*. Reakcję w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,0 zawierającym 1 mM ADP rozpoczynano podaniem preparatu (A, B) lub substratu PEP (w końcowym stężeniu 0,05 mM) po 5-cio minutowej inkubacji preparatu w kuwecie (C, D). W reakcji D inkubację prowadzono w obecności komercyjnej fruktozo-1,6-bisfosfatazy. Strzałkami oznaczono moment podania preparatu, PEP, F-1,6-bP i F-1,6-bPazy. Liczby oznaczają zmiany absorbancji (ΔE) na minutę.



Rys. 31. Zależność aktywności kinazy pirogronianowej mięśnia raka *O. limosus* w ekstrakcie po elektroforezie na żelu skrobiowym od stężenia aktywatora fruktozo-1,6-bisfosforanu. Pomiary prowadzono w pH 7,0 w obecności 0,05 mM PEP i 1 mM ADP. W prawej górnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla.

inkubacji PK w kuwecie (Rys. 30ABC), która to różnica była tak charakterystyczna dla PK gruczołu jelita środkowego raka (Rys. 16). Nawet po wydłużeniu czasu inkubacji PK w kuwecie do 1 godziny, nie obserwowano zmian szybkości początkowej. Natomiast, jeśli inkubację w kuwecie prowadzono z dodaniem egzogennej fruktozo-1,6-bisfosfatazy (Rys. 30D), stwierdzono spadek szybkości początkowej reakcji. Może to sugerować pojawienie się formy PK o niższym powinowactwie do PEP w wyniku zhydrolizowania F-1,6-bP przez dodaną fosfatazę.

PK mięśnia raka wysolona siarczanem amonu z ekstraktu tkankowego ma nieco niższe powinowactwo do substratu niż enzym surowy (Tablica 14), a wysokie powinowactwo przywraca dodanie F-1,6-bP do środowiska reakcji.

Powyższe wyniki sugerują, że PK mięśnia raka *O. limosus* może również występować w konformacyjnych odmianach o różnym powinowactwie do PEP, przy czym formę o wysokim powinowactwie stabilizuje F-1,6-bP. Wydaje się, że forma ta jest szczególnie trwała, na co zapewne wpływa wysokie stężenie F-1,6-bP w mięśniu raka (Tablica 17) i prawdopodobnie bardzo niska aktywność fruktozo-1,6-bisfosfatazy (co sugerowały wstępne pomiary). W tych warunkach forma o dużym powinowactwie zdecydowanie dominuje w mięśniu raka.

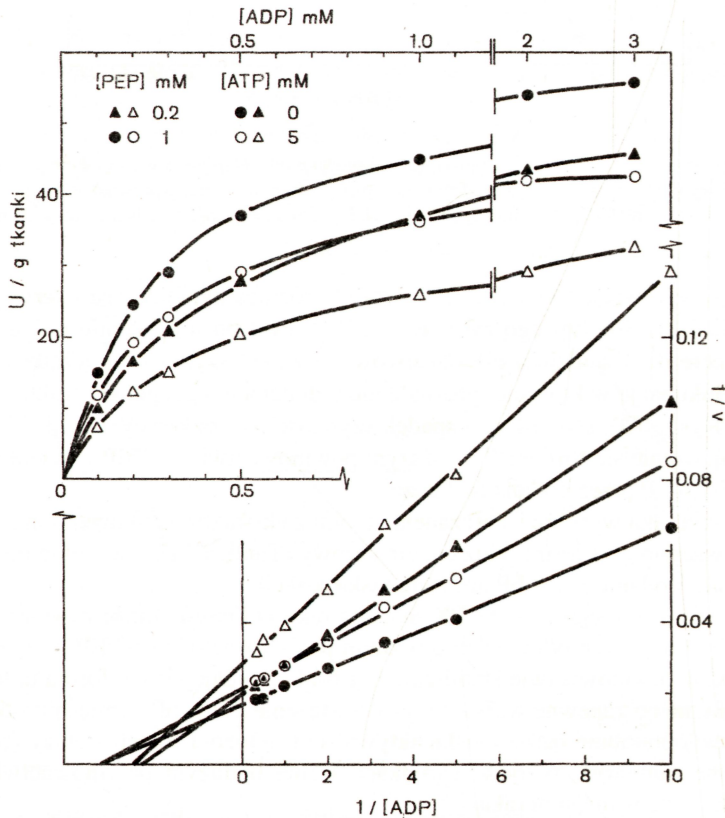
Czy PK mięśni wszystkich skorupiaków jest aktywowana przez F-1,6-bP, czy też poszczególne gatunki różnią się pod tym względem? Znalezienie odpowiedzi na te pytania wymaga dalszych badań. Podkreślić należy, iż kinazy z mięśni krewetki *O. gracilirostris* (Guderley i wsp. 1976a) i kraba *C. maenas* (Munday i wsp. 1980) były przynajmniej częściowo oczyszczone, toteż przypuszczalnie nie były związane z endo-

gennym F-1,6-bP, uniemożliwiającym wykazanie wpływu tego metabolitu na aktywność enzymu. Nie można jednak wykluczyć, że F-1,6-bP jest szczególnie silnie wiązany przez PK i nie jest łatwo go usunąć w trakcie oczyszczania enzymu.

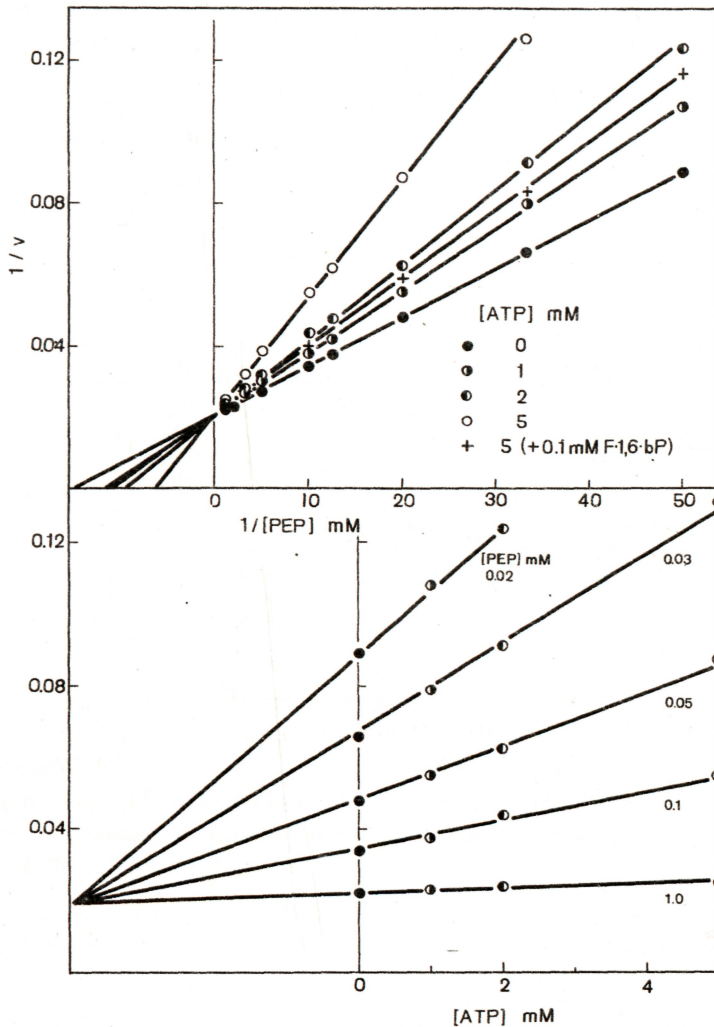
Krzywa wysycenia PK fruktozo-1,6-bisfosforanem ma kształt hiperboliczny dla enzymu wysolonego z mięśni homara *H.vulgaris* (Zammit i Newsholme, 1978) i nieznacznie sigmoidalny dla PK mięśnia raka *O.limosus* po elektroforezie skrobiowej ($n_H=1,3$; Rys. 31). Stężenie aktywatora potrzebne do wywołania 50% stymulacji jest zbliżone dla obu enzymów ($K_a = 1 \mu\text{M}$ dla *H.vulgaris*, a dla *O.limosus* $K_a = 1,8 \mu\text{M}$).

4.2.7. Wpływ ATP

ATP hamuje aktywność PK mięśnia raka *O.limosus* (Lesicki, 1976) i homara *H.vulgaris* (Trausch, 1976c). Wzrost stężenia jonów Mg^{2+} chroni enzym przed inhibicją pod wpływem ATP, lecz, zwłaszcza w niskich stężeniach substratu PEP, hamujące działanie



Rys. 32. ATP jako inhibitor niekompetycyjny kinazy pirogronianowej mięśnia raka *O.limosus* wobec ADP. Zależność badano w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,0 w obecności 0,2 lub 1,0 mM PEP oraz przy braku lub w obecności 5 mM ATP. W dolnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Lineweavera-Burka.



Rys. 33. ATP jako inhibitor kompetycyjny kinazy pirogronianowej mięśnia raka *O. limosus* wobec fosfoenolpirogronianu. Zależność badano w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,0 w obecności 1,0 mM ADP oraz w obecności ATP w stężeniach: 0, 1, 2 lub 5 mM. Zależność przedstawiono w formie wykresów Lineweavera-Burka i Dixona. Parametry kinetyczne zestawiono w Tabelcy 15.

ATP przejawia się mimo wzrostu stężenia jonów magnezowych (Lesicki, 1976). Wydaje się więc, iż hamujące działanie ATP wynika tylko częściowo z chelatujących jony Mg^{2+} właściwości tego metabolitu. Hiperboliczny kształt krzywych hamowania (Lesicki, 1976, Trausch, 1976c) sugeruje brak allosterycznych oddziaływań ATP na konformację PK mięśni skorupiaków.

ATP jest inhibitorem niekompetycyjnym wobec ADP dla PK mięśni skorupiaków (Rys. 32; Guderley i wsp. 1976a; Guderley i Hochachka, 1980). Nie wpływa na powinowactwo PK mięśni żadnych z badanych dotąd gatunków do ADP. Obniża natomiast szybkość maksymalną reakcji. Stałe inhibicji (K_i) wynoszą 7 mM dla *O. limosus*, 7,03 mM dla *O. gracilirostris* (Guderley i wsp. 1976a) i 5 mM dla *C. magister* (Guderley i Hochachka, 1980).

Tablica 15. Zmiany powinowactwa do fosfoenolopirogronianu kinazy pirogronianowej odwłokowego mięśnia raka *O. limosus* pod wpływem wzrastającego stężenia ATP.

ATP mM		$S_{0,5}$
0	(5)	67 ± 5
1	(2)	83
2	(2)	101
5	(3)	160 ± 8
5 (+ 0,1 mM F-1,6-bP)	(1)	92

W tablicy zestawiono parametry kinetyczne obliczone na podstawie danych przedstawionych na Rys. 33, w podpisie którego opisano skład płynu inkubacyjnego. Podano wartości średnie (± S.E.) wyników uzyskanych w poszczególnych eksperymentach (liczba eksperymentów w nawiasach). Wartości $S_{0,5}$ wyrażono w μM .

W stosunku do PEP, ATP jest inhibitorem kompetycyjnym dla PK mięśni raka *O. limosus* ($K_i = 4$ mM; Rys. 33), krewetki *O. gracilirostris* ($K_i = 3,15$ mM; Guderley i wsp. 1976a) i kraba *C. magister* ($K_i = 1,8$ mM; Guderley i Hochachka, 1980). Wzrost stężenia ATP w środowisku reakcji obniża powinowactwo do PEP (Rys. 33) i powoduje wzrost stałej $S_{0,5}$ (Tablica 15), choć kształt krzywych kinetyki reakcji pozostaje hiperboliczny (Rys. 33). Hamujące działanie ATP jest częściowo znoszone przez F-1,6-bP (Rys. 33 dla *O. limosus*; Guderley i Hochachka, 1980 dla *C. magister*).

4.2.8. Wpływ fosfoargininy

Aktywność PK mięśni ssaków jest hamowana przez fosfokreatynę (Kemp, 1973). Pojawiły się doniesienia o podobnym wpływie na PK mięśni bezkręgowców fosfoargininy, tj. fosfagenu charakterystycznego dla tych zwierząt (Guderley i wsp. 1976b; Wieser, 1977; Wieser i Lachner, 1977). Sugerowano, iż fosfoarginina jest inhibitorem także PK mięśni skorupiaków, gdyż metabolit ten hamował kompetycyjnie w stosunku do PEP i ADP enzym z mięśnia odwłoka *O. gracilirostris* (Guderley i wsp. 1976a). Sugestie, że zanieczyszczenia kinazą argininową, która katalizując reakcję $\text{ADP} + \text{PArg} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{Arg}$ obniża stężenie ADP w medium inkubacyjnym, są przyczyną pozornej inhibicji PK mięśni bezkręgowców przez fosfoargininę (De Zwaan i Ebberink, 1978), zostały potwierdzone w przypadku PK mięśni kraba *C. maenas* (Poat i wsp. 1980). Oczyszczona PK z mięśnia kraba nie zmienia swej aktywności nawet w bardzo wysokich (do 70 mM) stężeniach fosfoargininy. Co więcej, w badaniach tych wykazano, iż zanieczyszczenie kinazą argininową może pojawiać się nie tylko wskutek niedokładnego oczyszczenia ki-

nazy pirogronianowej. Kinazą argininową może być zanieczyszczona komercyjna fosfoarginina. W świetle tych badań udział fosfoargininy w regulacji aktywności PK mięśni skorupiaków wydaje się mało prawdopodobny.

4.2.9. Wpływ innych metabolitów

Poszukiwania modulatorów aktywności PK mięśni krewetki *O.gracilirostris* (Guderley i wsp. 1976a) i kraba *C.magister* (Guderley i Hochachka, 1980) wykazały, że inhibitorami są również jabłczan, cytrynian, α -ketoglutaran i tryptofan. Działanie ich było zwykle kompetycyjne wobec obu substratów PK. Żaden z powyższych inhibitorów nie był tak efektywny jak ATP. Wszystkie zaś wznagały addytywnie hamowanie wywołane wzrostem stężenia ATP. Wysokie stałe inhibicji K_i dla poszczególnych inhibitorów (3 - 40 mM) sugerują, że efektywne stężenia cytrynianu, jabłczanu, α -ketoglutaranu i tryptofanu znacznie przewyższają ich spodziewane stężenia w cytoplazmie (Williamson i wsp. 1969; Guderley i Hochachka, 1980), toteż ich znaczenie w regulacji aktywności PK *in vivo* jest niewielkie.

Tablica 16. Wpływ alaniny na aktywność kinazy pirogronianowej odwłokowego mięśnia raka *O.limosus*.

Alanina mM	U/g tkanki
0	16,2
2	16,2
5	16,1
10	16,1

Aktywność mierzono w pH 7,0 w obecności 0,05 mM PEP i 1,0 mM ADP.

Alanina jedynie w minimalnym stopniu hamuje aktywność PK mięśnia odwłokowego raka *O.limosus* (Tablica 16), jak również PK z mięśni krewetki *O.gracilirostris* (Guderley i wsp. 1976a) i kraba *C.magister* (Guderley i Hochachka, 1980). Niejednoznaczne wyniki uzyskano dla PK z mięśni homara *H.vulgaris*. Z jednej strony wykazano brak wpływu alaniny w stężeniach do 20 mM, w różnych pH i w różnych stężeniach PEP, na oczyszczone PK z mięśni odwłoka lub szczypiec (Trausch, 1976c). Z drugiej strony, enzym nieoczyszczony z mięśnia odwłokowego hamowany był przez 5 mM alaninę i efekt ten tylko częściowo był znoszony przez fruktozo-1,6-bP (Zammit i News-holme, 1978).

4.2.10. Brak fosforylacji kinazy pirogronianowej mięśni

PK mięśnia odwłokowego homara *H.americanus*, w przeciwieństwie do PK z gruczołu jelita środkowego tego gatunku, nie ulega fosforylacji pod wpływem kinazy białkowej zależnej od cAMP (Trausch i Bauchau, 1980). Podobnie PK mięśni ssaków nie ulega fosforylacji pod wpływem zależnej od cAMP kinazy białkowej (Humble i wsp.

1975). Ewentualna rola fosforylacji enzymu w mechanizmie regulacji aktywności PK mięśni skorupiaków wydaje się wątpliwa, choć powyższa obserwacja wymaga potwierdzenia w dalszych badaniach.

4.2.11. Wpływ temperatury na właściwości kinazy pirogronianowej

Powinowactwo PK mięśni kraba *C.maenas* do fosfoenolpirogronianu jako substratu jest największe w temperaturach od 10°C do 30°C. W niższych i wyższych temperaturach ulega ono znacznemu obniżeniu (Hoffman, 1976). W mięśniu kraba *P.camtschatica* wykryto dwie wzajemnie przemienne formy PK, o różnej kinetyce z fosfoenolpirogronianem w zależności od temperatury (Somero, 1969). Jedna z form enzymu wykazuje hiperboliczną zależność od stężenia PEP i ma najwyższe powinowactwo do substratu w temp. 5°C. Druga forma, działająca w wyższych temperaturach, cechuje się sigmoidalną kinetyką, a najwyższe powinowactwo do PEP osiąga w temp. ok. 12°C. Wydaje się, że PK mięśnia kraba może poprzez wzajemną przemienność tych form adaptować swe własności do temperatury otoczenia, pozwalając na względną niezależność aktywności PK od temperatury środowiska (Somero, 1969).

4.3. REGULACJA AKTYWNOŚCI FOSFOFRUKTOKINAZY I KINAZY PIROGRONIANOWEJ MIĘŚNI SKORUPIAKÓW W WARUNKACH *IN VIVO*

Określano stężenia metabolitów uczestniczących w regulacji aktywności PFK i PK w mięśniach skorupiaków (Tablica 17). Podobne zastrzeżenia jak w przypadku gruczołu jelita środkowego, a więc arbitralne założenie 50% uwodnienia tkanki oraz brak danych o możliwej kompartmentacji stężeń metabolitów w komórce, powodują, iż rozważania nad aktywnością PFK i PK w warunkach fizjologicznych powinny być prowadzone z dużą ostrożnością. Wydaje się jednak, że w pH 7,0 w stężeniach F6P stwierdzanych w mięśniach skorupiaków (0,18 - 0,30 mM) i przy braku aktywatorów, fosfofruktokinaza jest nieaktywna. W pH 7,6 w powyższych stężeniach F6P aktywność PFK byłaby możliwa tylko przy niskim stężeniu ATP. Wysokie fizjologiczne stężenia ATP obserwowane w mięśniach skorupiaków wyłączają aktywność PFK także w pH 7,6. Jedynie więc wzrost cytoplazmatycznego stężenia aktywatorów, AMP a zwłaszcza F-2,6-bP, umożliwia zniesienie hamowania enzymu i rozpoczęcie katalizowania reakcji fosforylacji F6P do F-1,6-bP. Tak więc tylko w obecności wyższych stężeń F-2,6-bP i AMP możliwa jest aktywacja PFK, a w konsekwencji całej drogi glikolitycznej.

Choć przedstawione w Tablicy 17 stężenia PEP różnią raka *O.limosus* od kraba *P.camtschatica* i homara *H.vulgaris*, to wysokie powinowactwo PK mięśni skorupiaków do tego substratu zapewnia wysoką aktywność enzymu (dla *O.limosus* bliską 70 - 80% aktywności maksymalnej) nawet w niskich fizjologicznych stężeniach PEP. Mięśniowe stężenia F-1,6-bP (0,03 - 0,22 mM) wielokrotnie przewyższają stałą K_a wobec tego aktywatora (1,0 - 1,8 μ M) i całkowicie wysycają enzym. Stabilizują formę o dużym powinowactwie do PEP, niewrażliwą na wysokie stężenia ATP panujące w mięśniu. Wydaje się więc, że reakcja katalizowana przez PK jest wysoce wydajna w mięśniu skorupiaków i nie jest miejscem regulacji, tj. włączania i wyłączania, glikolizy.

Tablica 17. Stężenia metabolitów uczestniczących w regulacji aktywności fosfofruktokinazy i kinazy pirogronianowej w mięśniu skorupiaków.

	<i>Orconectes limosus</i> (C ₄)	<i>Paralithodes camtschatica</i>	<i>Homarus vulgaris</i> mięsień odpoczywający	<i>Homarus americanus</i> mięsień pracujący
	(1)	(2)	(3)	(4)
F6P	(5) 9 0 ± 5 [0,18]	(13) 93 ± 11 [0,18]	(5) 1 5 0 ± 30 [0,30]	
F-1,6-bP	(5) 8 9 ± 18 [0,18]	(8) 16 ± 3 [0,03]	(5) 1 1 0 ± 50 [0,22]	
PEP	(5) 128 ± 19 [0,26]	(8) 22 ± 5 [0,04]	(5) 30 ± 4 [0,06]	
ATP		(5) 3220 ± 2 8 0 [6,44]	(9) 6950 ± 2 4 0 [13,91]	(6) 7440 ± 5 2 0 [14,88]
ADP		(5) 598 ± 45 [1,19]	(10) 560 ± 70 [1,12]	(6) 960 ± 1 3 0 [1,92]
AMP		(5) 30 ± 7 [0,06]	(9) 20 ± 1 [0,04]	(6) 130 ± 40 [0,26]
E.Ch.		0,91	0,96	0,93

Podano średnie wartości stężeń wyrażonych w nanomolach/g tkanki ± S.D. (W nawiasach kwadratowych stężenia metabolitów wyrażono w mM). W nawiasach podano liczbę eksperymentów. Wyniki cytowano za: (1) niepublikowane badania własne; (2) Freed, 1971; (3) Beis i Newsholme, 1975; (4) Dehn i wsp. 1985.

Stosunek nukleotydów adenyłowych wyrażany „potencjałem energetycznym adenyłanów”, różni mięsień pracujący i odpoczywający skorupiaków (Tablica 17). Może on ulegać zmianom sezonowym (Dickson, 1980; Dickson i Giesy, 1982a), choć nie zależy od środowiska życia (Dickson i Giesy, 1981) i warunków pokarmowych (Dickson i Giesy, 1982b). Stwierdzono duże różnice gatunkowe „potencjału energetycznego” nukleotydów adenyłowych (Dickson i Giesy, 1981; Giesy i wsp. 1981). Przy „potencjale energetycznym” 0,91 (Freed, 1971) i niższym, także stwierdzanym w mięśniach skorupiaków (Dickson i Giesy, 1981, 1982a) w puli nukleotydów adenyłowych wzrasta stężenie AMP, co sprzyja aktywacji PFK mięśnia (Rys. 18B, 19, 22 - 24, 26). Wstępne badania wskazują na początkowy wzrost stężenia F-2,6-bP w pracującym mięśniu raka *O. limosus*, co wraz z podwyższeniem stężenia AMP zwiększa powinowactwo PFK do F6P (Rys. 23 - 26) i znosi hamujące działanie ATP (Rys. 20, 22). Stabilizuje aktywną formę PFK i możliwa jest glikolityczna droga odbudowywania rezerw ATP wyczerpanych w pracującym mięśniu. W wyniku intensywnej pracy mięśnia raka *O. limosus* drastycznie wzrasta cytoplazmatyczne stężenie mleczanu (Gäde, 1984), czemu prawdopodobnie towarzyszy obniżenie pH. W warunkach tych powinowactwo PFK do F6P maleje (Rys. 24 - 26), nawet w obecności aktywatorów. Co więcej, drastycznie spada wtedy także wrażliwość na aktywujące działanie F-2,6-bP (Rys. 22). Stężenia ATP pozostają na tyle wysokie, by hamować aktywność PFK. Wszystko to sprzyja obniżeniu fizjologicznej aktywności PFK (i całej glikolizy).

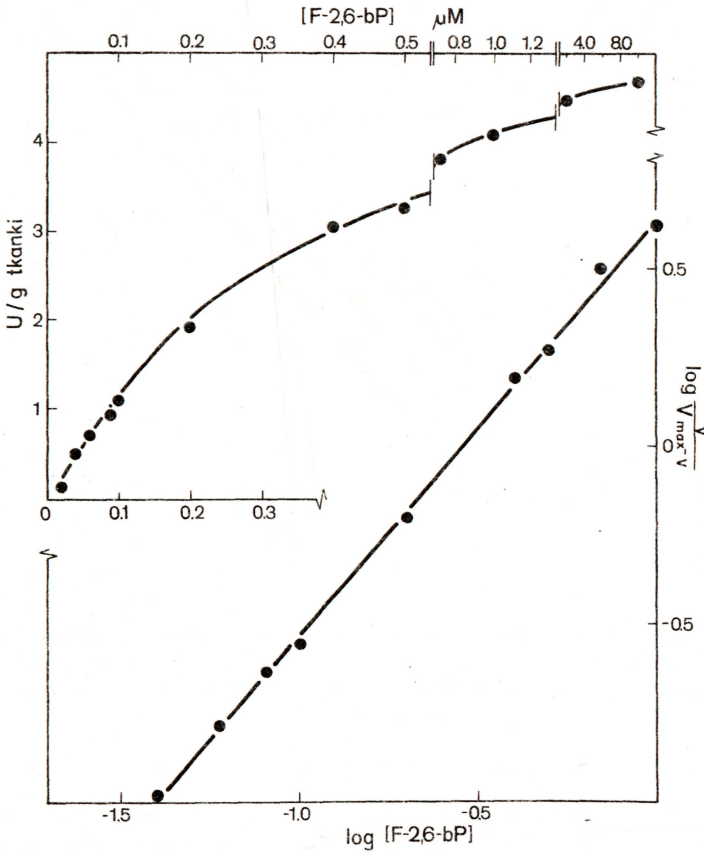
Czy zgromadzony mleczan w mięśniu raka *O. limosus* może być wykorzystany do glukoneogennej resyntezy glukozy bezpośrednio w mięśniu? Choć zakwaszenie, spadek zawartości F-2,6-bP i wysokie stężenia ATP mogą spowodować wyłączenie glikolizy na etapie reakcji katalizowanej przez PFK, to wymagane są dalsze badania nad regulacją

aktywności fruktozo-1,6-bisfosfatazy, by móc odpowiedzieć na pytanie, czy w warunkach tych wzrasta (pojawia się) jej aktywność. Problemem dla ewentualnej glukoneogenezy w mięśniu raka *O. limosus* byłoby też obejście reakcji katalizowanej przez PK. Warunki fizjologiczne zdają się stabilizować wyłącznie wysoce aktywną formę PK o aktywności znacznie przewyższającej aktywności karboksylazy pirogronianowej i karboksykinazy fosfoenolpirogronianowej w mięśniach skorupiaków (Tablica 9). Wysoki wzrost stężenia mleczanu w hemolimfie (Gäde, 1984) sugeruje przekazywanie go do innych tkanek (np. gruczołu jelita środkowego lub epidermy), a mleczan pozostały w odpoczywającym mięśniu spalany byłby aerobowo w mitochondriach.

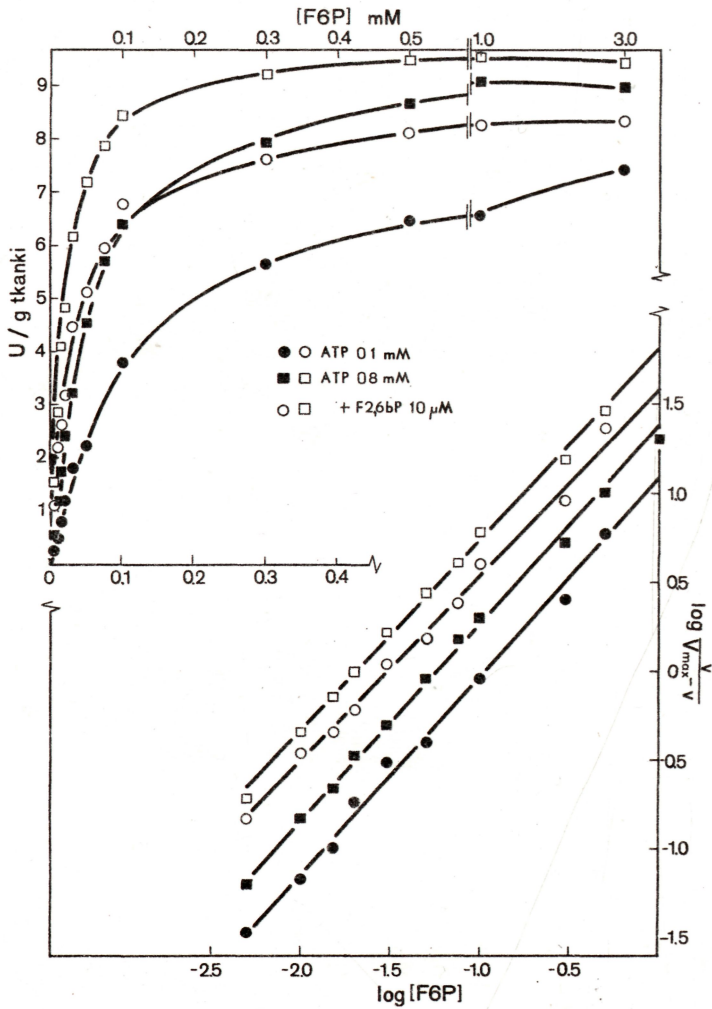
5. INNE TKANKI SKORUPIAKÓW

Jak dotąd, przeprowadzono jedynie nieliczne badania nad fosfofruktokinazą i kinazą pirogronianową w pozostałych tkankach skorupiaków. Uniemożliwia to dyskusję nad rolą tych enzymów w metabolizmie węglowodanowym.

Aktywność PK wykryto w skrzelach skorupiaków (Hochachka i wsp. 1970; Thabrew i wsp. 1971), ale dotąd nie scharakteryzowano jej własności. Charakte-



Rys. 34. Zależność aktywności fosfofruktokinazy serca raka *O. limosus* od stężenia aktywatora fruktozo-2,6-bis-fosforanu. Pomiar prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,6 w obecności 0,04 mM F6P i 5 mM ATP. W dolnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla.



Rys. 35. Zależność aktywności fosfofruktokinazy serca raka *O. limosus* od stężenia substratu fruktozo-6-fosforanu. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,6 w obecności 0,1 lub 0,8 mM ATP oraz przy braku lub obecności 10 μ M F-2,6-bP. W dolnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tabelicy 18.

rystyka regulacji glikolizy w skrzelach jest niezbędna w świetle sugerowanej możliwości katalizowania reakcji glukogennych w tej tkance (Hochachka, 1972). Aktywność PK wykazano również w gruczole antenowym (Van Marrewijk i De Zwaan, 1976).

Serce skorupiaków cechuje wysoka aktywność PFK i PK (Schatzlein i wsp. 1973; Van Marrewijk i De Zwaan, 1976; Lesicki, 1976, 1977).

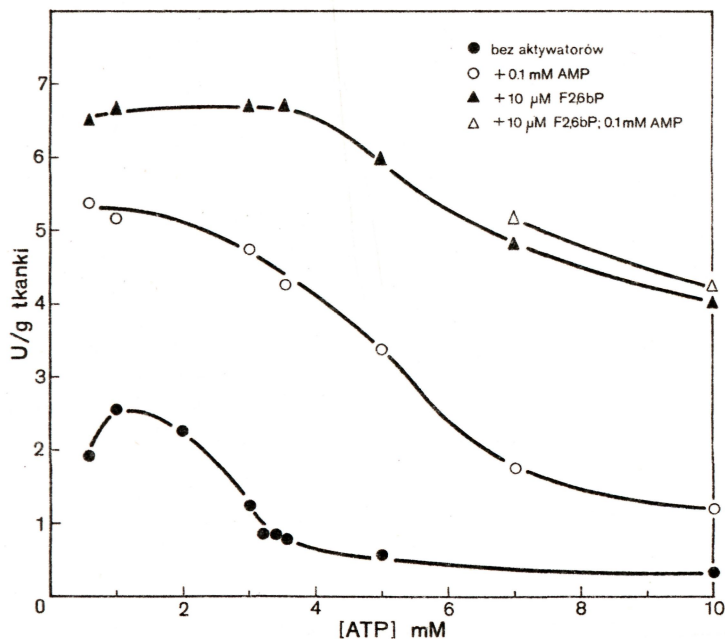
5.1. FOSFOFRUKTOKINAZA SERCA SKORUPIAKÓW

W przypadku PFK mięśnia sercowego raka *O.limosus* ograniczono się do zbadania wpływu F-2,6-bP na aktywność enzymu w pH 7,6. F-2,6-bP jest aktywatorem PFK (Rys. 34). Stała aktywacji K_a (288 nM) wskazuje na podobieństwa powinowactwa do aktywatora PFK serca i PFK mięśnia odłokowego raka, choć krzywa wysycenia enzymu serca aktywatorem ma kształt lekko sigmoidalny ($n_H=1,17$), charakterystyczny dla PFK mięśnia w niższych pH.

Tablica 18. Powinowactwo fosfofruktokinazy serca raka *O.limosus* do substratu fruktozo-6-fosforanu.

ATP mM	F-2,6-bP μM		$S_{0,5}$	n_H
0,1	0	(3)	$114 \pm 1,4$	$1,09 \pm 0,05$
0,1	10,0	(3)	$3,0 \pm 5$	$1,04 \pm 0,02$
0,8	0	(3)	57 ± 9	$1,11 \pm 0,04$
0,8	10,0	(3)	20 ± 9	$1,07 \pm 0,03$

W tablicy zestawiono parametry kinetyczne obliczone na podstawie danych przedstawionych na Rys. 35, w podpisie którego opisano skład płynu inkubacyjnego. Podano wartości średnie (\pm S.E.) wyników uzyskanych w poszczególnych eksperymentach (liczba eksperymentów w nawiasach). Wartości $S_{0,5}$ wyrażono w μM .



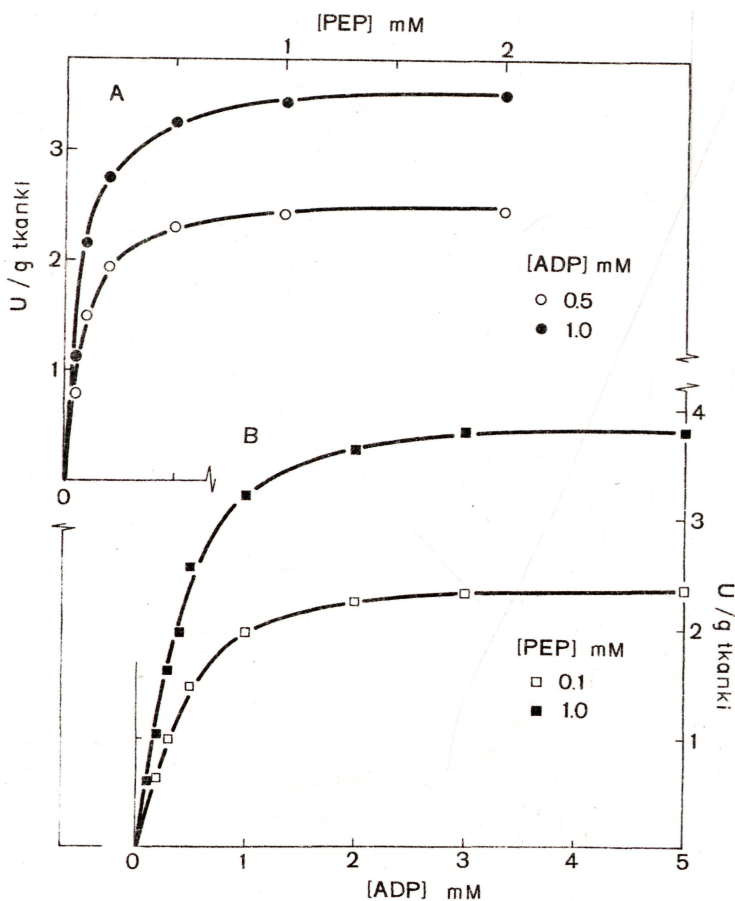
Rys. 36. Wpływ fruktozo-2,6-bisfosforanu na hamowanie aktywności fosfofruktokinazy serca raka *O.limosus* przez wyższe stężenia ATP. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,6 w obecności 0,04 mM F6P oraz przy braku lub w obecności 0,1 mM AMP lub/i 0,01 mM F-2,6-bP.

PFK serca w pH 7,6 charakteryzuje hiperboliczna kinetyka z F6P jako substratem. Powinowactwo do F6P zależy od stężenia ATP, jest dwukrotnie większe w 0,8 mM stężeniu ATP niż w 0,1 mM (Rys. 35, Tablica 18). Powinowactwo ulega zwiększeniu w obecności F-2,6-bP, o czym świadczy znaczne obniżenie wartości stałych $S_{0,5}$.

Również w przypadku PFK serca raka aktywujące działanie F-2,6-bP polega na ochronie aktywności enzymu przed wysokimi stężeniami ATP. Ochrona ta jest efektem współdziałania F-2,6-bP z AMP (Rys. 36).

5.2. KINAZA PIROGRONIANOWA SERCA SKORUPIAKÓW

PK serca raka *O.limosus* występuje w pojedynczej formie elektroforetycznej (Lesicki, 1976). Maksymalną aktywność enzymu stwierdza się w pH 6,9 - 7,2, a więc w zakresie optymalnym dla PK wątrobotrzustki i mięśnia tego gatunku. PK wykazuje duże



Rys. 37. Zależność aktywności kinazy pirogronianowej serca raka *O.limosus* od stężenia substratów: (A) fosfoenolopirogronianu, (B) ADP. Pomiarzy prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,0 w obecności 0,5 lub 1,0 mM ADP (A) oraz 0,1 lub 1,0 mM PEP (B). Parametry kinetyczne zestawiono w Tablicy 19.

Tablica 19. Powinowactwo kinazy pirogronianowej serca raka *O. limosus* do substratów fosfoenolopirogronianu i ADP.

PEP mM	ADP mM		$S_{0,5}(\text{PEP})$ μM	$S_{0,5}(\text{ADP})$ mM	n_H
0,1	~	(2)		0,30	1,00
1,0	~	(3)		$0,31 \pm 0,02$	$1,00 \pm 0,02$
~	0,5	(2)	69		1,03
~	1,0	(4)	70 ± 5		$1,05 \pm 0,03$

W tablicy zestawiono parametry kinetyczne obliczone na podstawie danych przedstawionych na Rys. 37, w podpisie którego opisano skład płynu inkubacyjnego. Podano wartości średnie (\pm S.E.) wyników uzyskanych w poszczególnych eksperymentach (liczba eksperymentów w nawiasach).

powinowactwo do obu substratów: PEP (Rys. 37A) i ADP (Rys. 37B). Nie jest ono modyfikowane stężeniami drugiego substratu (Tablica 19). Nie wykazano wpływu fruktozo-1,6-bisfosforanu i alaniny na aktywność PK serca *O. limosus*. Natomiast ATP hamuje aktywność enzymu (Lesicki, 1976). PK serca raka przypomina PK z mięśnia, choć dokładniejsze porównanie obu enzymów oraz określenie roli PK w metabolizmie węglowodanowym serca skorupiaków wymaga dalszych badań.

6. CIAŁO TŁUSZCZOWE OWADÓW

Ciało tłuszczowe owadów jest tkanką spełniającą kluczową rolę w integracji metabolizmu pośredniego w organizmie owada (Kilby, 1963; Keeley, 1978, 1985; Dean i wsp. 1985). Funkcje ciała tłuszczowego, jako centralnego miejsca koordynacji metabolizmu owadów, można porównać do funkcji wątroby i tkanki tłuszczowej ssaków (Kilby, 1963). Ciało tłuszczowe wypełnia jamę ciała owada, otaczając przewód pokarmowy (część wisceralna) i docierając wokół mięśni do powłok ciała (część peryferyczna) (Dean i wsp. 1985). Luźna struktura płatów tkanki tworzy dużą powierzchnię kontaktu z hemolimfą. Ciało tłuszczowe syntetyzuje i wydziela liczne białka do hemolimfy. Magazynuje białka w postaci granul zapasowych. Gromadzi zapasy glikogenu a zarazem syntetyzuje trehalozę - podstawowy cukrowiec hemolimfy owadów. Wreszcie ciało tłuszczowe odkłada zapasowe triglicerydy i produkuje diglicerydy, które uwalnia do hemolimfy. Będąc źródłem podstawowych metabolitów hemolimfy, ciało tłuszczowe determinuje aktywność fizjologiczną pozostałych tkanek owada. Przemiany metaboliczne w ciele tłuszczowym przebiegają pod kontrolą hormonalną i są ściśle skorelowane z takimi fazami życia owadów, jak rozwój i linienia larwalne, przeobrażenie, diapauza, cykle rozrodcze (Keeley, 1985).

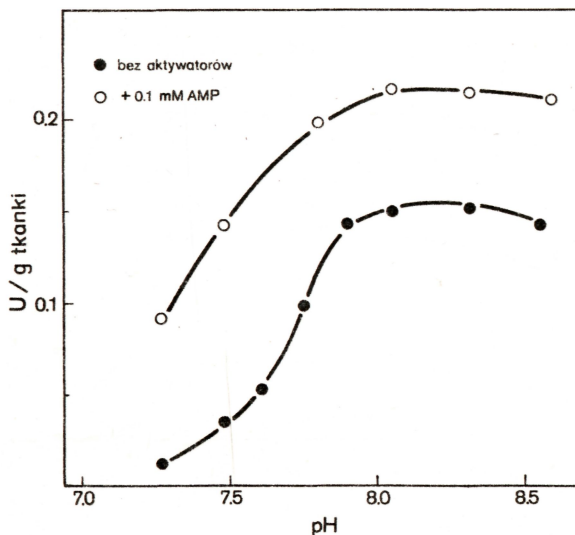
Realizacja tych różnorodnych funkcji metabolicznych wymaga selektywnej i dokładnej kontroli aktywności enzymatycznej, w tym kluczowych enzymów metabolizmu węglowodanów, jakimi są fosfofruktokinaza i kinaza pirogronianowa.

6.1. FOSFOFRUKTOKINAZA CIAŁA TŁUSZCZOWEGO OWADÓW

Wstępne badania przeprowadzane u szarańczy *S.gregaria* (Walker i Bailey, 1969) i chrząszcza mącznika młynarka *T.molitor* (Lesicki i Kasprzyk, 1988) to nieliczne opublikowane dotąd prace nad PFK ciała tłuszczowego owadów. Dalszej charakterystyce PFK z tej tkanki owadów poświęcono kolejne podrozdziały pracy.

6.1.1. Zależność aktywności od pH

Optimum działania PFK ciała tłuszczowego larw motyla *Celerio euphorbiae* przypada w zakresie pH 7,9 - 8,3 (Rys. 38). pH 8,0 jest optymalne również dla PFK ciała tłuszczowego karaczana *Periplaneta americana* (Storey i Bailey, 1978a), natomiast najwyższą aktywność PFK larw chrząszcza *Tenebrio molitor* stwierdzano w pH 8,2 - 8,5 (Lesicki i Kasprzyk, 1988). W pH niższym, zwłaszcza poniżej pH 7,8, aktywność enzymu maleje, spadając do wartości bliskich zeru w pH ok. 7,3. Obecność AMP w płynie inkubacyjnym nie zmienia zakresu pH, w którym aktywność PFK larw motyla *C.euphorbiae*



Rys. 38. Zależność aktywności fosfofruktokinazy ciała tłuszczowego larw motyla *C.euphorbiae* od pH. Pomiar prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym w obecności 0,25 mM F6P i 1 mM ATP oraz przy braku lub w obecności 0,1 mM AMP.

jest maksymalna (Rys. 38), jednak przeciwdziała gwałtownej inhibicji PFK przez wzrost stężenia jonów wodorowych. Toteż spadek aktywności PFK wraz z obniżaniem pH przebiega łagodniej, gdy w środowisku reakcji znajduje się AMP.

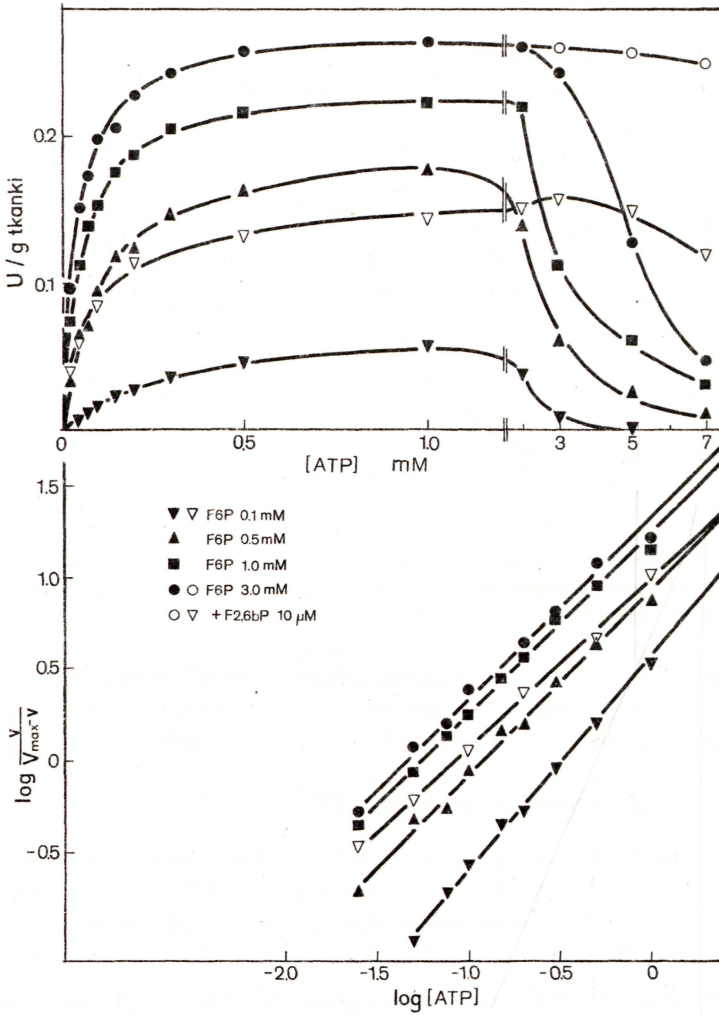
6.1.2. Zależność aktywności od stężenia ATP

ATP jest substratem w stężeniach do 0,5 mM dla PFK ciała tłuszczowego szarańczy *Schistocerca gregaria* (Walker i Bailey, 1969) oraz do 1 mM dla enzymu z larw *T.molitor* (Lesicki i Kasprzyk, 1988) i *C.euphorbiae* (Rys. 39). Wzrost aktywności obserwowany wraz ze wzrostem stężenia ATP opisują krzywe hiperboliczne. Przebieg krzywych,

Tablica 20. Powinowactwo fosfofruktokinazy ciała tłuszczowego larw *T.molitor* i *C.euphorbiae* do ATP jako substratu.

F6P mM	F-2,6-bP		$S_{0,5}$	n_H
<i>C. euphorbiae</i>				
0,1	0	(3)	$321 \pm 2,2$	$1,11 \pm 0,02$
0,1	10	(1)	87	0,93
0,5	0	(1)	120	1,00
1,0	0	(4)	58 ± 7	$1,01 \pm 0,04$
3,0	0	(i)	45	1,00
3,0	10	(1)	38	1,00
<i>T.molitor</i> (*)				
1,0	0	(3)	$58 \pm 1,3$	$1,00 \pm 0,00$

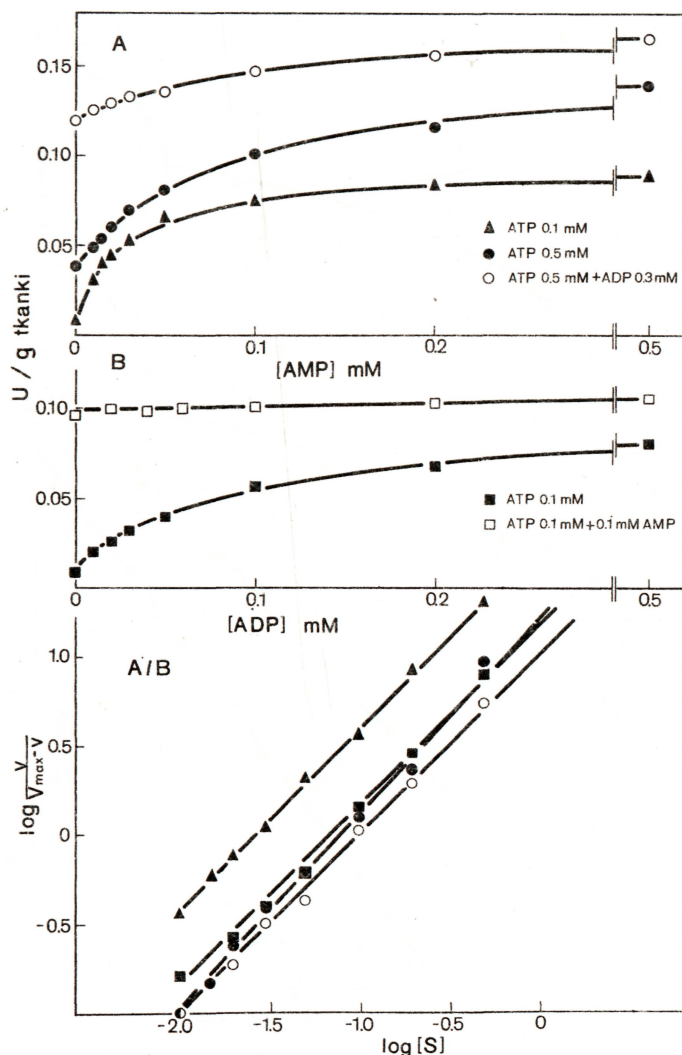
W tablicy zestawiono parametry kinetyczne obliczone na podstawie danych przedstawionych na Rys. 39, w podpisie którego opisano skład płynu inkubacyjnego. Podano wartości średnie (\pm S.E.) wyników uzyskanych w poszczególnych eksperymentach (liczba eksperymentów w nawiasach). Wartości $S_{0,5}$ wyrażono w μ M. (*) Cytowano za Lesicki i Kasprzyk (1988).



Rys. 39. Zależność aktywności fosfofruktokinazy ciała tłuszczowego larw motyla *C.euphorbiae* od stężenia ATP. Pomiarzy prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 8,0 w obecności 0,1; 0,5; 1,0 lub 3,0 mM F6P. Określano wpływ 10 μ M F-2,6-bP na badaną zależność. W dolnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tablicy 20.

a tym samym powinowactwo PFK do ATP, zależy od stężenia drugiego substratu F6P (Rys. 39; Tablica 20). Jest ono największe w stężeniach F6P wysycających enzym (3 mM) i w warunkach tych stała $S_{0,5}$ jest zbliżona dla enzymów z *T.molitor* (58 μ M; Lesicki i Kasprzyk, 1988) i *C.euphorbiae* (45 μ M). Powinowactwo PFK ciała tłuszczowego do ATP stopniowo maleje wraz z obniżaniem stężenia F6P w środowisku reakcji (Rys. 39; Tablica 20). Wzrasta natomiast w obecności fruktozo-2,6-bisfosforanu (Rys. 39; Tablica 20).

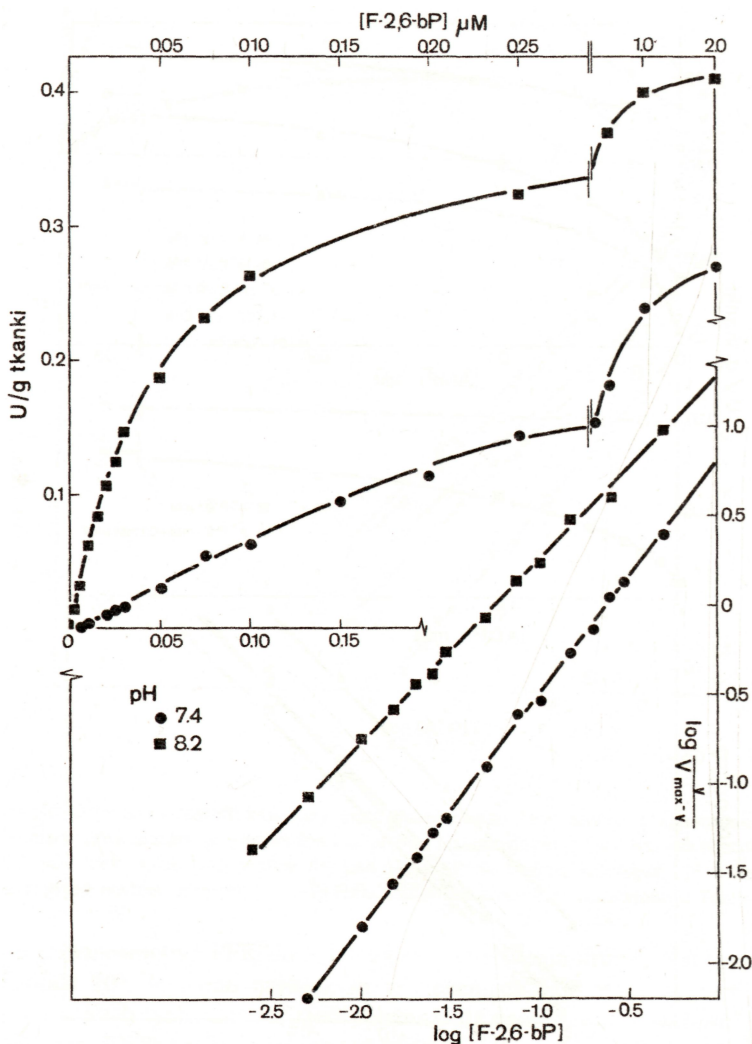
Dla PFK z ciała tłuszczowego owadów (Walker i Bailey, 1969; Lesicki i Kasprzyk, 1988; Rys. 39) obserwuje się zjawisko typowe dla PFK z różnych źródeł, tj. silną inhibicję enzymu w wyższych stężeniach ATP. U *C.euphorbiae* przy niskim (zbliżonym do fizjologicznego) 0,1 mM stężeniu F6P i stężeniu ATP ok. 3 mM, enzym jest całkowicie nieaktywny. Wyższe stężenia F6P chronią aktywność enzymu przed hamującym działaniem nadmiaru ATP (Rys. 39). Również AMP (Walker i Bailey, 1969) oraz F-2,6-bP (Rys. 39) przesuwają inhibicję pod wpływem ATP w znacznie wyższy zakres stężeń tego nukleotydu.



Rys. 40. Zależność aktywności fosfofruktokinazy ciała tłuszczowego larw motyla *C.euphorbiae* od stężenia: (A) AMP, (B) ADP, (A/B) zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla. Pomiaru prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 8,0 zawierającym 0,1 mM F6P, 0,1 lub 0,5 mM ATP oraz 0,1 mM AMP lub 0,3 mM ADP.

6.1.3. Wpływ AMP i ADP na aktywność PFK ciała tłuszczowego owadów

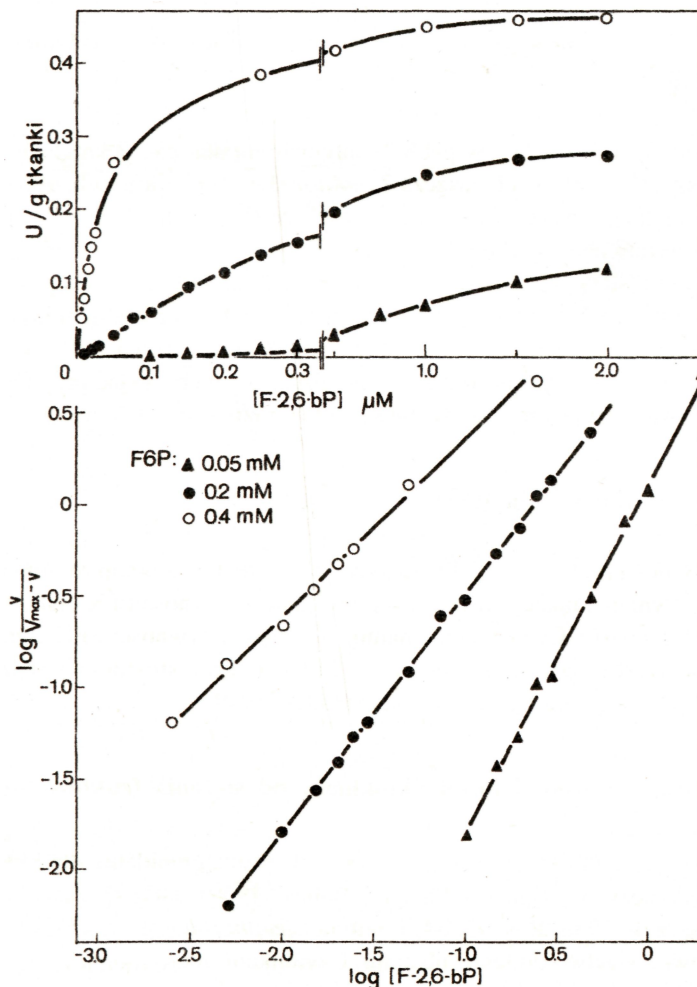
AMP (Rys. 40A) i ADP (Rys. 40B) aktywują PFK ciała tłuszczowego *C.euphorbiae* w niskich stężeniach F6P i ATP. Powinowactwo enzymu do AMP jest większe niż do ADP. Już 0,1 mM AMP powoduje pełną aktywację i enzym przestaje być podatny na dalszą aktywację pod wpływem ADP (Rys. 40B). Przeciwnie, aktywność enzymu zaktywowanego przez ADP może być zwiększona przez AMP (Rys. 40A).



Rys. 41. Zależność aktywności fosfofruktokinazy ciała tłuszczowego larw chrząszcza *T.molitor* od stężenia aktywatora fruktozo-2,6-bisfosforanu w różnych pH. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,4 lub 8,2 zawierającym 0,2 mM F6P i 2 mM ATP. W dolnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tabelcy 21.

6.1.4. Wpływ fruktozo-2,6-bisfosforanu

F-2,6-bP aktywuje PFK ciała tłuszczowego *T.molitor* i *C.euphorbiae*. W jego obecności wzrasta powinowactwo obu enzymów do ATP (Rys. 39; Tablica 20), a także do F6P (Rys. 43 - 46, 48, 49; Tablice 22, 23). F-2,6-bP chroni również aktywność PFK ciała tłuszczowego przed inhibicją pod wpływem ATP (Rys. 39). Wrażliwość PFK *T.molitor* na F-2,6-bP zależy od:



Rys. 42. Zależność aktywności fosfofruktokinazy ciała tłuszczowego larw chrząszcza *T.molitor* od stężenia aktywatora fruktozo-2,6-bisfosforanu w różnych stężeniach substratu fruktozo-6-fosforanu. Pomiarzy prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,4 zawierającym 2 mM ATP oraz 0,05; 0,2 lub 0,4 mM F6P. W dolnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tablicy 21.

Tablica 21. Powinowactwo fosfofruktokinazy ciała tłuszczowego larw *T.molitor* do aktywatora fruktozo-2,6-bisfosforanu.

PH	F6P mM		K_a	n_H
7,4	0,05	(1)	908	1,82
	0,20	(3)	240 ± 2	$1,25 \pm 0,07$
	0,40	(3)	45 ± 8	$1,06 \pm 0,02$
8,2	0,20	(4)	56 ± 1	$1,02 \pm 0,02$

W tablicy zestawiono parametry kinetyczne obliczone na podstawie danych przedstawionych na Rys. 41 i 42. w podpisach których opisano skład płynu inkubacyjnego. Podano wartości średnie (\pm S.E.) wyników uzyskanych w poszczególnych eksperymentach (liczba eksperymentów w nawiasach). Wartości K_a wyrażono w nM.

1) pH (Rys. 41; Tablica 21). W pH 8,2, optymalnym dla reakcji katalizowanej przez PFK ciała tłuszczowego larw chrząszcza *T.molitor* (Lesicki i Kasprzyk, 1988), powinowactwo enzymu do aktywatora jest znacznie większe niż w pH 7,4. Kształt krzywej wysycenia aktywatorem jest hiperboliczny w pH 8,2 i lekko sigmoidalny w pH 7,4.

2) stężenia F6P (Rys. 42; Tablica 21). Wzrost stężenia F6P zwiększa powinowactwo PFK do aktywatora i już w znacznie niższych stężeniach F-2,6-bP enzym jest całkowicie aktywny. Zwraća uwagę fakt, iż w fizjologicznym zakresie stężeń F6P (ok. 0,05 mM) powinowactwo PFK do F-2,6-bP jest znacznie niższe niż na przykład przy F6P równym 0,4 mM, a krzywa opisująca zależność ma kształt wyraźnie sigmoidalny.

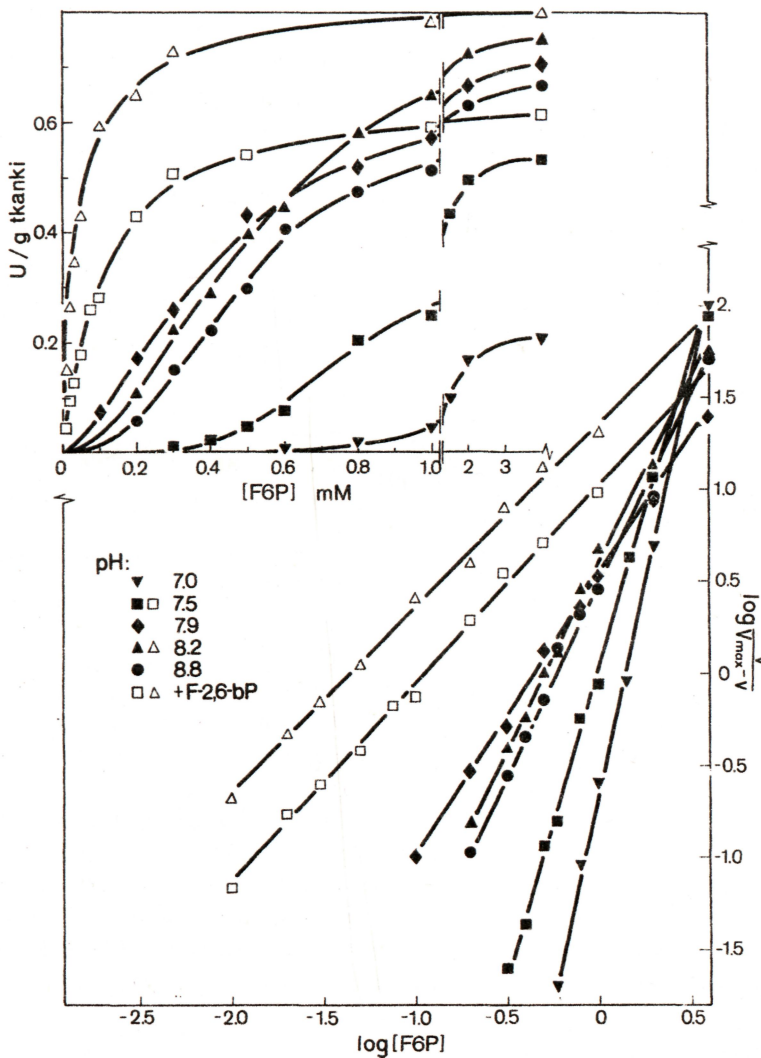
6.1.5. Wpływ innych metabolitów

Walker i Bailey (1969) stwierdzili, że jony amonowe, fosfoenolopirogronian, glicero-3-fosforan, cytrynian a także cAMP nie wpływają na aktywność PFK ciała tłuszczowego szarańczy *S.gregaria*. Cytrynian nie hamuje również aktywności PFK ciała tłuszczowego larw motyla *C.euphorbiae*. Natomiast fruktozo-1,6-bisfosforan jest inhibitorem PFK ciała tłuszczowego *S.gregaria* (Walker i Bailey, 1969).

6.1.6. Zależność aktywności fosfofruktokinazy od stężenia fruktozo-6-fosforanu

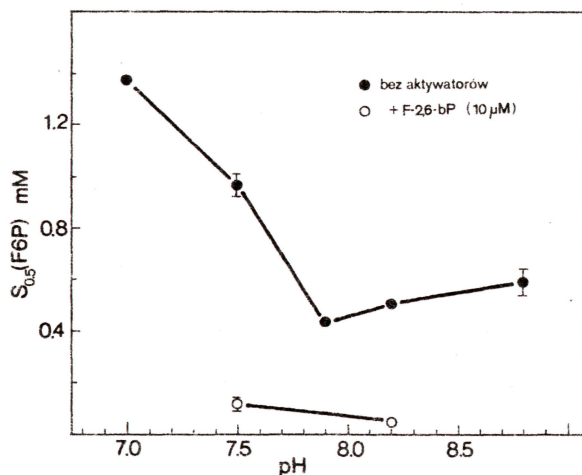
Krzywa wysycania fruktozo-6-fosforanem ma kształt sigmoidalny dla PFK ciała tłuszczowego szarańczy *S.gregaria* (Walker i Bailey, 1969), larw chrząszcza *T.molitor* (Lesicki i Kasprzyk, 1988; Rys. 43, 44) i motyla *C.euphorbiae* (Rys. 45). Enzym wykazuje niskie powinowactwo do tego substratu. Czynniki modyfikującymi powinowactwo do F6P są:

- 1) pH środowiska reakcji,
- 2) stężenie ATP,
- 3) stężenie AMP,
- 4) „potencjał energetyczny” nukleotydów adenylowych,
- 5) stężenie fruktozo-2,6-bisfosforanu.



Rys. 43. Zależność aktywności fosfofruktokinazy ciała tłuszczowego larw chrząszcza *T.molitor* od stężenia substratu fruktozo-6-fosforanu w różnych pH. Pomiarzy prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,0; 7,5; 7,9; 8,2 lub 8,8 zawierającym 1 mM ATP. Określano wpływ 10 μ M F-2,6-bP na badaną zależność. W dolnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono na Rys. 44 oraz w Tablicy 22.

Największe powinowactwo do F6P (najniższą wartość stałej $S_{0,5}$) wykazują fosfofruktokinazy ciała tłuszczowego larw *T.molitor* (Rys. 43, 44, 48, 49; Tablice 22, 23) i *C.euphorbiae* (Rys. 45, 46; Tablica 23) w pH optymalnym, a więc w granicach 7,9 - 8,2. Powinowactwo PFK larw *C.euphorbiae* do F6P jest większe w pH 8,0 (Rys. 45, 46), a wartość stałej $S_{0,5}$ jest w tym pH blisko 2,5 raza niższa (Tablica 23) niż w pH 7,5.



Rys. 44. Zależność powinowactwa do substratu fruktozo-6-fosforanu fosfofruktokinazy ciała tłuszczowego larw *T.molitor* od pH. Opis pomiarów zamieszczono w legendzie do Rys. 43.

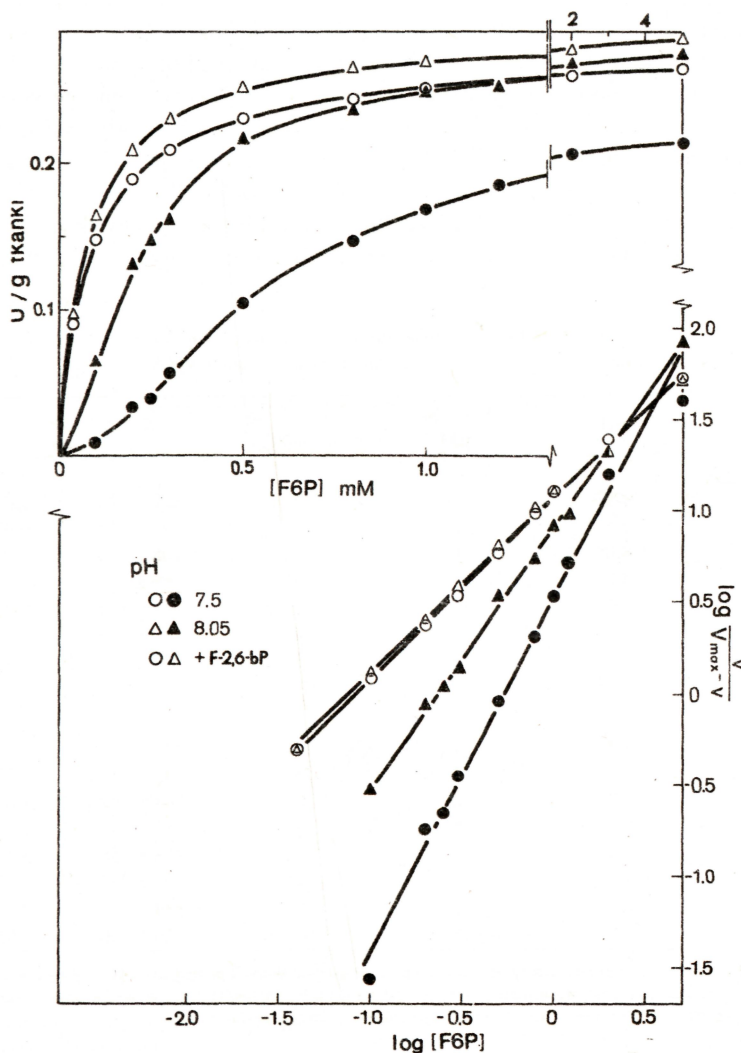
Znacznie niższy jest też współczynnik Hilla (Tablica 23). Również w przypadku PFK *T.molitor* powinowactwo do F6P maleje poza optymalnym zakresem pH (wartość stałej $S_{0,5}$ rośnie), jest to szczególnie wyraźne w pH niższym od optymalnego (Rys. 43, 44; Tablica 22). W pH 7,0 wartość stałej $S_{0,5}$ (1380 μM) jest trzykrotnie wyższa od wartości $S_{0,5}$ w pH 7,9 (447 μM).

Powinowactwo PFK ciała tłuszczowego owadów do F6P jest największe przy optymalnym stężeniu kosubstratu (ATP). U szarańczy *S.gregaria* (Walker i Bailey, 1969) przy 2 mM ATP obserwuje się znaczne przesunięcie w prawo sigmoidalnej kinetyki reakcji (a więc znaczne obniżenie powinowactwa) w stosunku do krzywej uzyskiwanej w 1 mM ATP. U motyla *C.euphorbiae* najwyższe powinowactwo do F6P PFK wykazuje w 1 mM ATP (Rys. 47; Tablica 24), optymalnym dla reakcji (Rys. 39). Zarówno obniże-

Tablica 22. Powinowactwo fosfofruktokinazy ciała tłuszczowego larw *T.molitor* do substratu fruktozo-6-fosforanu w różnych pH.

pH	ATP mM	F-2,6-bP		$S_{0,5}$	n_H
7,0	1,0	0	(1)	1380	4,21
7,5	1,0	0	(3)	972 \pm 30	3,41 \pm 0,23
7,5	1,0	10	(3)	1 15 \pm 9	1,08 \pm 0,01
7,9	1,0	0	(1)	447	1,56
8,2	1,0	0	(1)	507	2,07
8,2	1,0	10	(1)	43	1,01
8,8	1,0	0	(3)	597 \pm 32	2,29 \pm 0,14

W tablicy zestawiono parametry kinetyczne obliczone na podstawie danych przedstawionych na Rys. 43 i 44, w podpisach których opisano skład płynu inkubacyjnego. Podano wartości średnie (\pm SE.) wyników uzyskanych w poszczególnych eksperymentach (liczba eksperymentów w nawiasach). Wartości $S_{0,5}$ wyrażono w μM .



Rys. 45. Zależność aktywności fosfofruktokinazy ciała tłuszczowego larw motyla *C.euphorbiae* od stężenia substratu fruktozo-6-fosforanu przy „potencjale energetycznym” nukleotydów adenylowych 0,98. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,5 lub 8,05. Badano wpływ 5 μ M F-2,6-bP na zależność. W dolnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tablicy 23.

nie jak i zwiększenie stężenia ATP zmniejszają powinowactwo PFK do ATP (wzrost wartości stałej $S_{0.5}$).

AMP jest aktywatorem PFK ciała tłuszczowego owadów. Zarówno u *S.gregaria* (Walker i Bailey, 1969) jak i *C.euphorbiae* (Rys. 47; Tablica 24) w jego obecności kinetyka jest hiperboliczna przy jednoczesnym obniżeniu stałej $S_{0.5}$.

Badania nad zależnością aktywności PFK ciała tłuszczowego larw motyla *C.euphorbiae* od stężeń ATP, ADP i AMP sugerują, iż aktywność enzymu zależy od wzajemnego stosunku tych nukleotydów. Toteż badano kinetykę reakcji z F6P w warunkach, gdy prawie całą pulę nukleotydów adenylowych stanowił ATP („potencjał energetyczny" 0,98) oraz w obecności AMP i ADP („potencjał energetyczny" 0,80). Gdy wśród nukleotydów adenylowych dominuje ATP, PFK *C.euphorbiae* cechuje sigmoidalna kinetyka z F6P i niskie powinowactwo do tego substratu (Rys. 45, Tablica 23). W obecności aktywatorów AMP i ADP kształt krzywej kinetyki jest hiperboliczny (Rys. 46) a znacznie niższe wartości stałych $S_{0,5}$ (Tablica 23) wskazują na znaczny wzrost powinowactwa

Tablica 23. Powinowactwo fosfofruktokinazy ciała tłuszczowego larw *C.euphorbiae* i *T.molitor* do substratu fruktozo-6-fosforanu w zależności od proporcji stężeń nukleotydów adeninowych.

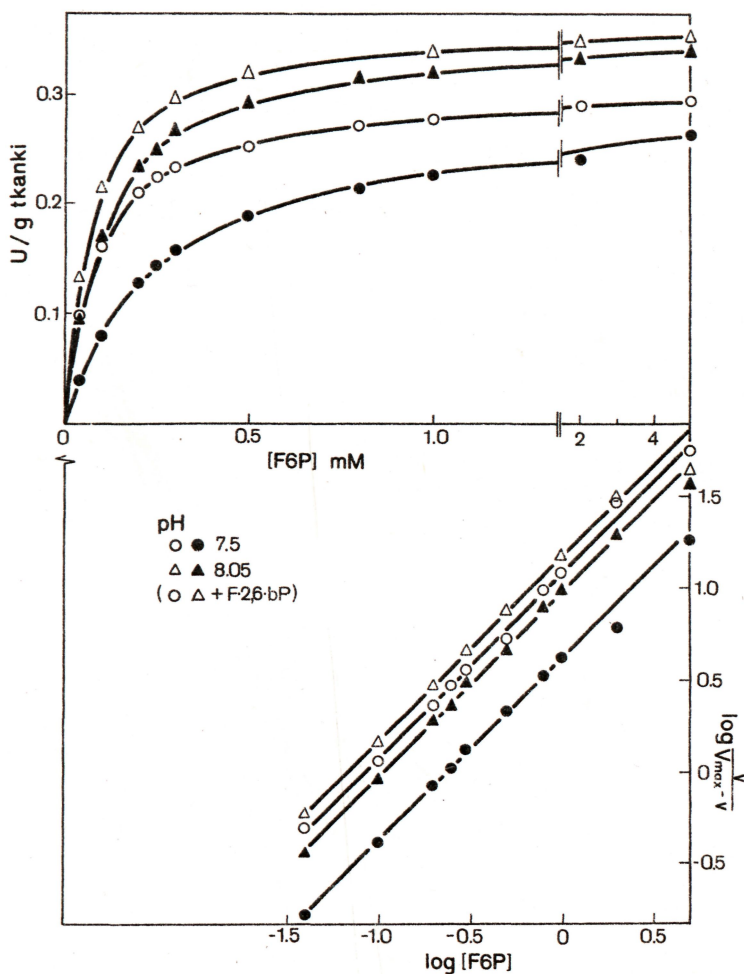
E.Ch.	pH	F-2,6-bP μM		$S_{0,5}$	n_H
<i>C.euphorbiae</i>					
0,80	7,5	0	(3)	232 ± 13	1,02 ± 0,04
0,80	7,5	5	(3)	88 ± 15	0,99 ± 0,02
0,80	8,05	0	(3)	108 ± 4	1,02 ± 0,01
0,80	8,05	5	(3)	69 ± 6	1,01 ± 0,01
0,98	7,5	0	(4)	574 ± 134	2,28 ± 0,30
0,98	7,5	5	(4)	88 ± 32	1,03 ± 0,04
0,98	8,05	0	(3)	231 ± 31	1,46 ± 0,10
0,98	8,05	5	(3)	80 ± 4	0,99 ± 0,04
<i>T.molitor</i>					
0,80	7,4	0	(4)	143 ± 25	1,49 ± 0,19
0,80	7,4	5	(3)	42 ± 11	1,03 ± 0,01
0,80	8,2	0	(3)	241 ± 62	1,09 ± 0,03
0,80	8,2	5	(3)	53 ± 15	1,02 ± 0,02
0,98	7,4	0	(4)	858 ± 56	3,39 ± 0,37
0,98	7,4	5	(4)	91 ± 37	1,07 ± 0,06
0,98	8,2	0	(5)	534 ± 40	2,22 ± 0,11
0,98	8,2	5	(4)	126 ± 50	0,95 ± 0,02

W tablicy zestawiono parametry kinetyczne obliczone na podstawie danych przedstawionych na Rys. 45, 46, 48 i 49, w podpisach których opisano skład płynu inkubacyjnego. Podano wartości średnie (± S.E.) wyników uzyskanych w poszczególnych eksperymentach (liczba eksperymentów w nawiasach). Wartości $S_{0,5}$ wyrażono w μM.

Tablica 24. Powinowactwo fosfofruktokinazy ciała tłuszczowego larw *C.euphorbiae* do substratu fruktozo-6-fosforanu w zależności od stężenia ATP.

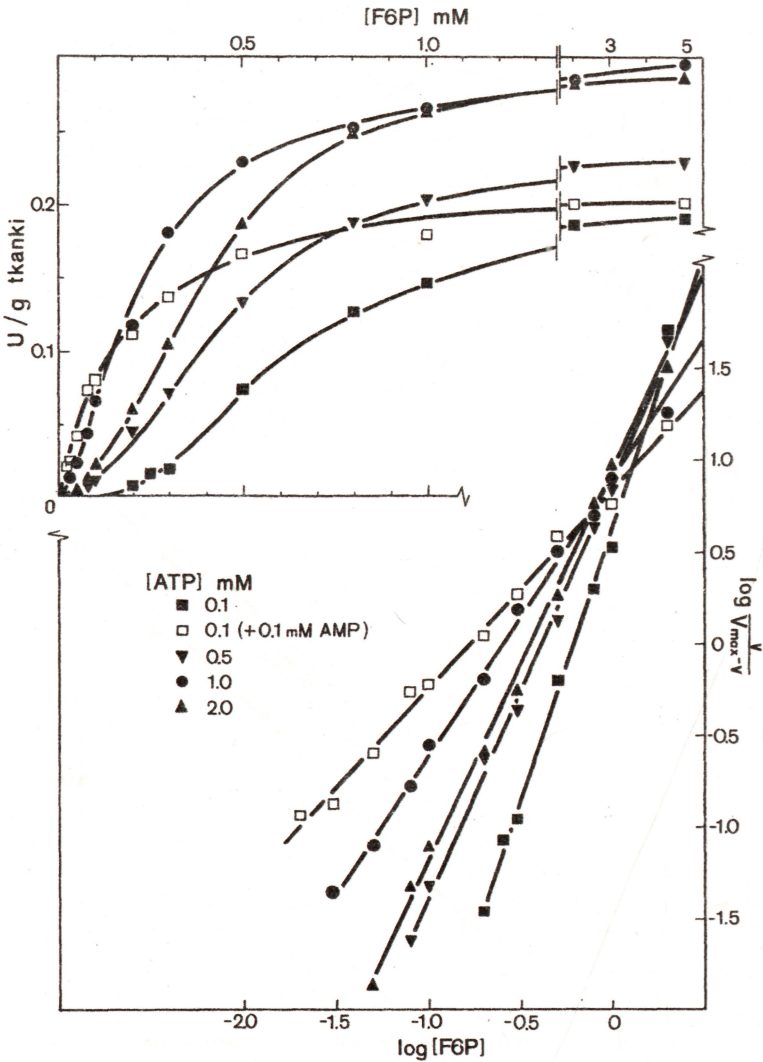
ATP mM	AMP mM		$S_{0,5}$	n_H
0,1	0	(1)	603	2,86
0,1	0,1	(3)	170 ± 7	1,06 ± 0,02
0,5	0	(3)	420 ± 18	2,13 ± 0,05
1,0	0	(1)	252	1,50
2,0	0	(1)	361	2,19

W tablicy zestawiono parametry kinetyczne obliczone na podstawie danych przedstawionych na Rys. 47, w podpisie którego opisano skład płynu inkubacyjnego. Podano wartości średnie (± S.E.) wyników uzyskanych w poszczególnych eksperymentach (liczba eksperymentów w nawiasach). Wartości $S_{0,5}$ wyrażono w μM.



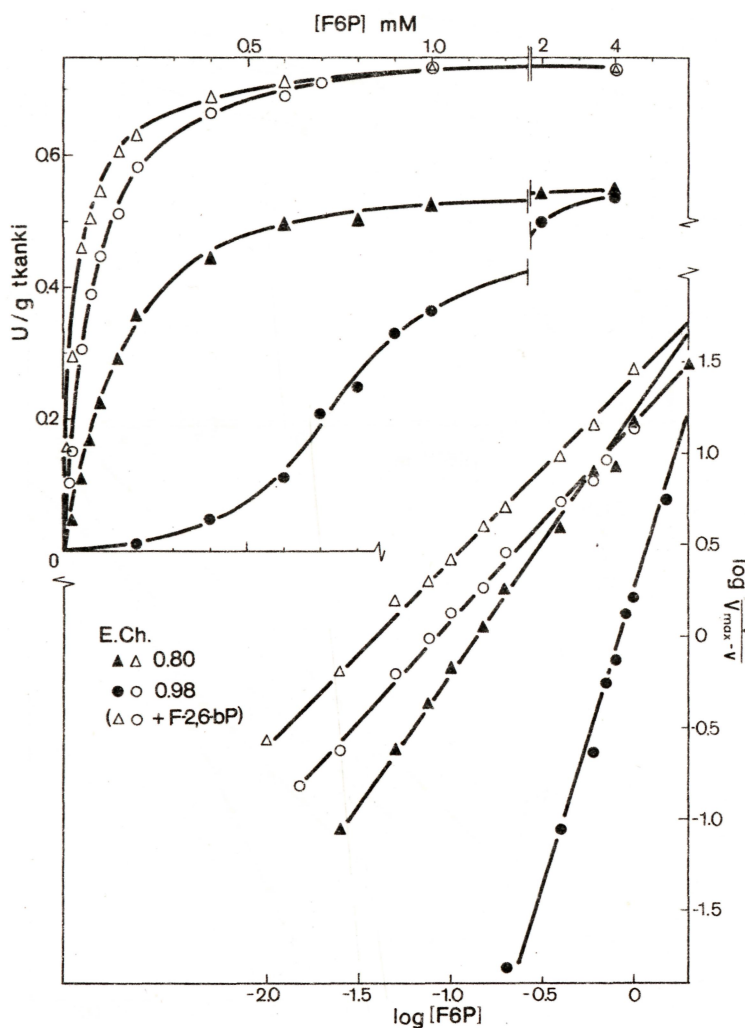
Rys. 46. Zależność aktywności fosfofruktokinazy ciała tłuszczowego larw motyla *C.euphorbiae* od stężenia substratu fruktozo-6-fosforanu przy „potencjale energetycznym” nukleotydów adenyłowych 0,80. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,5 lub 8,05. Badano wpływ 5 μ M F-2,6-bP. W dolnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tablicy 23.

do F6P. Sugestię, że aktywność PFK ciała tłuszczowego zależy od „potencjału energetycznego” nukleotydów adenyłowych potwierdzają obserwacje nad enzymem *T.molitor* (Rys. 48, 49). Gdy ATP wypełnia prawie w całości pulę tych nukleotydów (E.Ch.=0,98), PFK wykazuje znacznie niższe powinowactwo do F6P niż w warunkach, w których w puli nukleotydów adenyłowych pojawia się AMP (E.Ch.=0,80). Efekt ten u obu owadów jest widoczny zarówno w pH 7,4 - 7,5 (Rys. 45, 46, 48; Tablica 23) jak i w pH 8,0 - 8,2 (Rys. 45, 46, 49; Tablica 23). Jednak o ile u *C.euphorbiae* w obu pH przy niższym „potencjale energetycznym” (0,80) powinowactwo do F6P wyrażane wartością



Rys. 47. Zależność aktywności fosfofruktokinazy ciała tłuszczowego larw motyla *C.euphorbiae* od stężenia substratu fruktozo-6-fosforanu w różnych stężeniach ATP. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 8,05 w obecności 0,1; 0,5; 1,0 lub 2,0 mM ATP. W dolnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tabelicy 24.

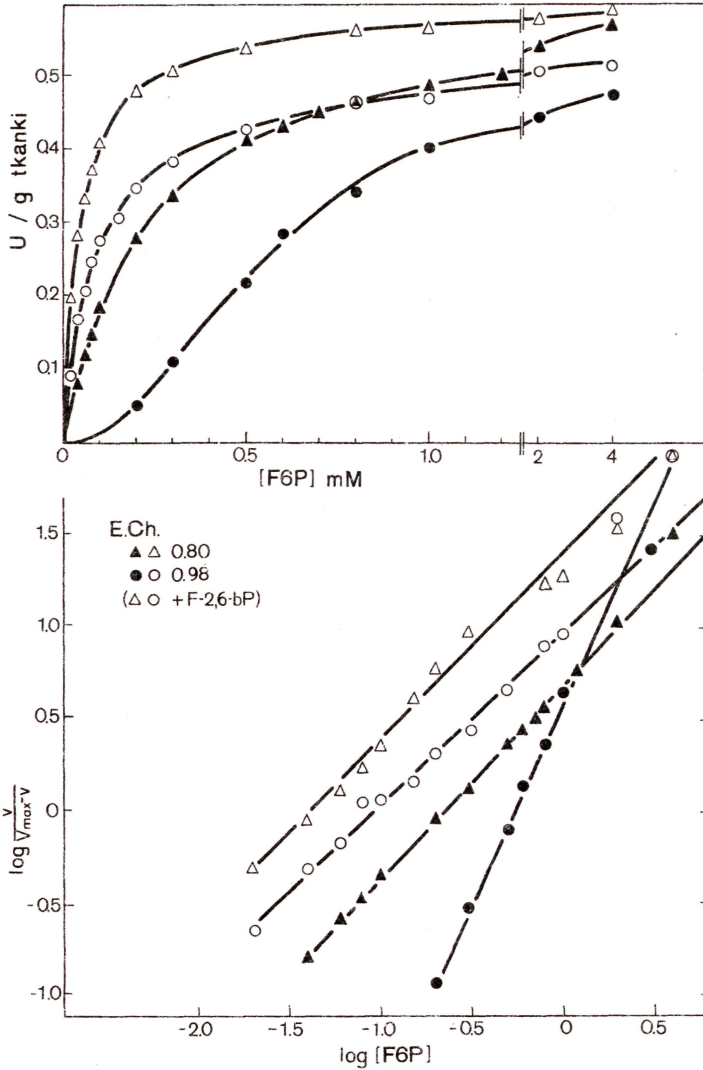
stałej $S_{0.5}$ jest ok. dwukrotnie większe niż przy „potencjale energetycznym” bliskim 1 (Tabelica 23), to u *T.molitor* w pH 7,4 obniżenie „potencjału energetycznego” z 0,98 do 0,80 zwiększa powinowactwo PFK do F6P ponad pięciokrotnie (pięciokrotne obniżenie wartości stałej $S_{0.5}$; Tabelica 23), natomiast w pH 8,2 wzrost powinowactwa jest jedynie dwukrotny (Tabelica 23). Może być to różnicą gatunkową, ale trzeba podkreślić, co wy-



Rys. 48. Zależność aktywności fosfofruktokinazy ciała tłuszczowego larw chrząszcza *T.molitor* od stężenia substratu fruktozo-6-fosforanu w pH 7,4. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym przy „potencjale energetycznym” nukleotydów adenylowych 0,80 lub 0,98. Badano wpływ 5 μ M F-2,6-bP na zależność. W dolnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tabelicy 23.

kazano wcześniej (Rys. 38), że PFK ciała tłuszczowego jest bardzo wrażliwa na zmiany pH, zwłaszcza poniżej 7,6. Stąd powyższe różnice mogą być spowodowane bardziej ekstremalnymi wartościami pH dobranymi w badaniach nad enzymem *T.molitor*.

Fruktozo-2,6-bisfosforan aktywuje PFK ciała tłuszczowego *C.euphorbiae* i *T.molitor*. W jego obecności krzywe kinetyki reakcji przybierają kształt hiperboliczny (Rys. 43, 45, 46, 48, 49), a stałe $S_{0,5}$ ulegają wielokrotnemu obniżeniu (Tabelle 22, 23).



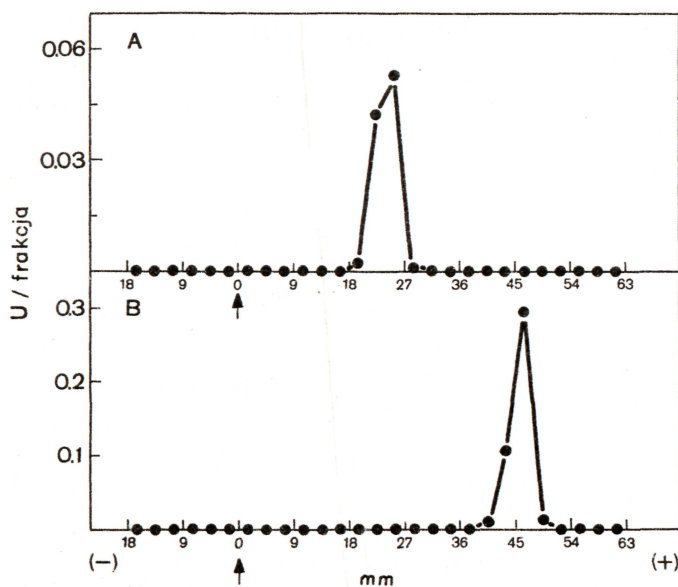
Rys. 49. Zależność aktywności fosfofruktokinazy ciała tłuszczowego larw chrząszcza *T. molitor* od stężenia substratu fruktozo-6-fosforanu w pH 8,2. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym przy „potencjale energetycznym” nukleotydów adenylowych 0,80 lub 0,98. Badano wpływ 5 μ M F-2,6-bP na zależność. W dolnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tabelcy 23.

Wzrost powinowactwa do F6P pod wpływem F-2,6-bP jest szczególnie silny w pH 7,4 - 7,5 i przy „potencjale energetycznym” 0,98 (Rys. 45, 48). Co więcej, w obecności F-2,6-bP pH (przynajmniej w badanym zakresie) w niewielkim stopniu modyfikuje powinowactwo PFK do F6P i w obecności aktywatora w pH 7,4 - 7,5 i 8,0 - 8,2 wartości stałych $S_{0,5}$ są zbliżone (Rys. 45, 46, 48, 49; Tablica 23).

F-2,6-bP współdziała też z AMP. Zarówno w pH 7,4 (Rys. 46, 48) jak i pH 8,2 (Rys. 46, 49) powinowactwo PFK do F6P rośnie po dodaniu AMP do środowiska reakcji („potencjał energetyczny” 0,80) a przyrost ten jest potęgowany, gdy w środowisku tym pojawia się F-2,6-bP.

6.2. KINAZA PIROGRONIANOWA CIAŁA TŁUSZCZOWEGO OWADÓW

Scharakteryzowano kinazę pirogronianową izolowaną z ciała tłuszczowego kilku gatunków owadów: dorosłych form szarańczy *S.gregaria* (Bailey i Walker, 1969; Walker i Bailey, 1970ab) i karaczana *P.americana* (Storey, 1985a), a także larw chrząszcza *T.molitor* (Lesicki i Jüngst, 1984). Porównanie charakterystyki powyższych enzymów



Rys. 50. Rozdział elektroforetyczny w żelu skrobiowym ekstraktów z: (A) ciała tłuszczowego, (B) mięśni powłok ciała larw *T.molitor*. Po elektroforezie żel cięto na 3 mm odcinki, z których ekstrakt testowano na aktywność kinazy pirogronianowej w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,0 zawierającym 1,5 mM PEP i 1 mM ADP.

z PK ciała tłuszczowego kilku gatunków świerszczy: *Acheta domesticus* (Hoffmann, 1975, 1976; Hoffmann i Marstatt, 1977; Hoffmann i Rädke, 1978) oraz *Gryllus campestris* i *Gryllus bimaculatus* (Hoffmann i Marstatt, 1977) utrudnia fakt, iż u tych świerszczy PK izolowano jednocześnie z ciała tłuszczowego i mięśni. W cytowanych pracach uzyskano jednorodne preparaty PK, co może wskazywać na występowanie w ciele tłuszczowym i mięśniach świerszczy jednej i tej samej formy PK. Różniłoby to jednak te owady od innych gatunków badanych w różnych laboratoriach (Bailey i Walker, 1969; Lesicki i Jüngst, 1984; Storey, 1985a).

6.2.1. Badania elektroforetyczne

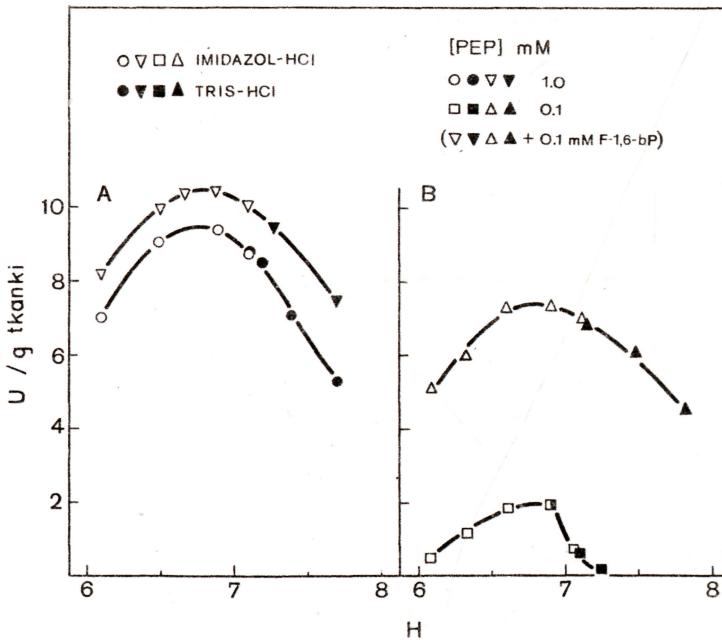
Rozdział elektroforetyczny na żelu skrobiowym preparatów kinazy pirogronianowej z ciała tłuszczowego owadów daje pojedyncze pasmo aktywności enzymatycznej. Zarówno u karaczana *P.americana* (Storey, 1985a) jak i larw chrząszcza *T.molitor* (Rys. 50) enzym z ciała tłuszczowego różni się ruchliwością elektroforetyczną od enzymu z mięśni tych owadów. Ogniskowanie izoelektryczne PK ciała tłuszczowego karaczana *P.americana* (Storey, 1985a) wykazuje punkt izoelektryczny w pH 6,15 ($\pm 0,15$), odmienny od punktu izoelektrycznego, charakterystycznego dla PK mięśni tego owada.

6.2.2. Ciężar cząsteczkowy

PK ciała tłuszczowego *P.americana* oczyszczona do homogenności potwierdzonej elektroforetycznie na żelu akrylamidowym ma ciężar cząsteczkowy $235\ 000 \pm 20\ 000$ (Storey, 1985a).

6.2.3. Optimum pH

PK ciała tłuszczowego larw *T.molitor* wykazuje najwyższą aktywność w pH 6,6 - 6,9, zarówno w wysokim (Rys. 51A) jak i niskim (Rys. 51B) stężeniu PEP. W niskim stężeniu PEP obserwuje się gwałtowny spadek aktywności enzymu w pH wyższych od

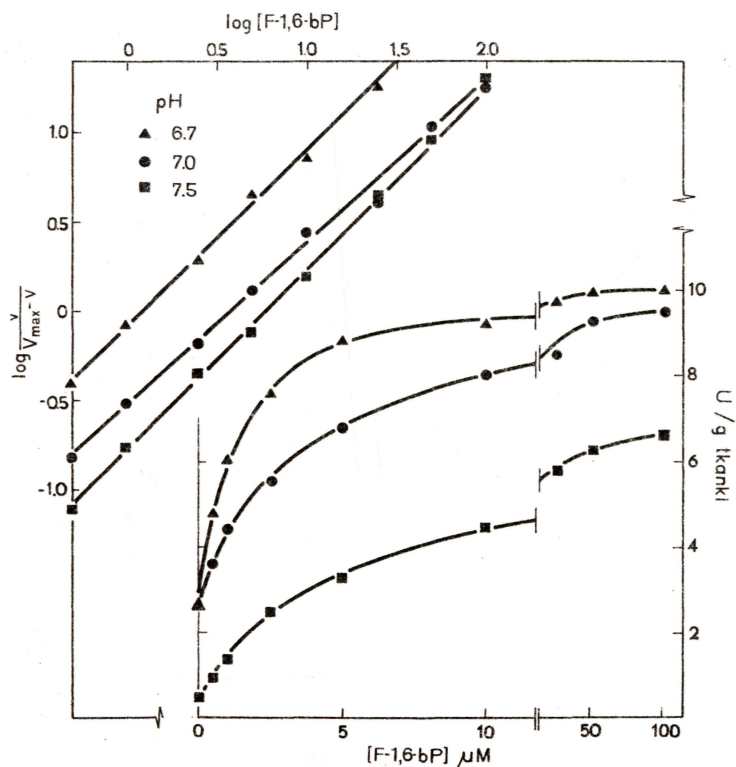


Rys. 51. Zależność aktywności kinazy pirogronianowej ciała tłuszczowego larw *T.molitor* od pH: (A) w obecności 1,0 mM PEP, (B) w obecności 0,1 mM PEP. Określano wpływ buforów imidazol-HCl i Tris-HCl na badaną zależność. Pomiaru prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym zawierającym 1 mM ADP.

6,9. PK ciała tłuszczowego *P.americana* wykazuje wierzchołek aktywności w podobnym zakresie pH buforu imidazol-HCl (Storey, 1985a), choć wykazano przesunięcie optimum pH w kierunku bardziej alkalicznym w buforach Tris-HCl, fosforanowym i weronalowym (Bailey i Walker, 1969; Storey, 1985a). Fruktozo-1,6-bisfosforan nie modyfikuje kształtu krzywej zależności aktywności PK od pH wyznaczonej w wysokim stężeniu PEP (Rys. 51A). Przy niskim stężeniu substratu, zarówno u *T.molitor* (Rys. 51B) jak i *S.gregaria* (Bailey i Walker, 1969) oraz *P.americana* (Storey, 1985a), w obecności fruktozo-1,6-bisfosforanu, po pierwsze, we wszystkich pH aktywność enzymu jest znacznie wyższa, po drugie, spadek aktywności w pH wyższym od 6,9 jest łagodny i enzym zachowuje stosunkowo wysoką aktywność.

6.2.4. Aktywatory kinazy pirogronianowej ciała tłuszczowego

PK z ciała tłuszczowego szarańczy *S.gregaria* (Bailey i Walker, 1969), chrząszcza *T.molitor* (Lesicki i Jüngst, 1984), karaczana *P.americana* (Storey, 1985a), a także z tkanek świerszcza *A.domesticus* (Hoffmann, 1975) jest aktywowana przez fruktozo-



Rys. 52. Zależność aktywności kinazy pirogronianowej ciała tłuszczowego larw *T.molitor* od stężenia aktywatora fruktozo-1,6-bisfosforanu w różnych pH. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 6,7; 7,0 lub 7,5 zawierającym 0,2 mM PEP i 0,5 mM ADP. W górnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tablicy 25.

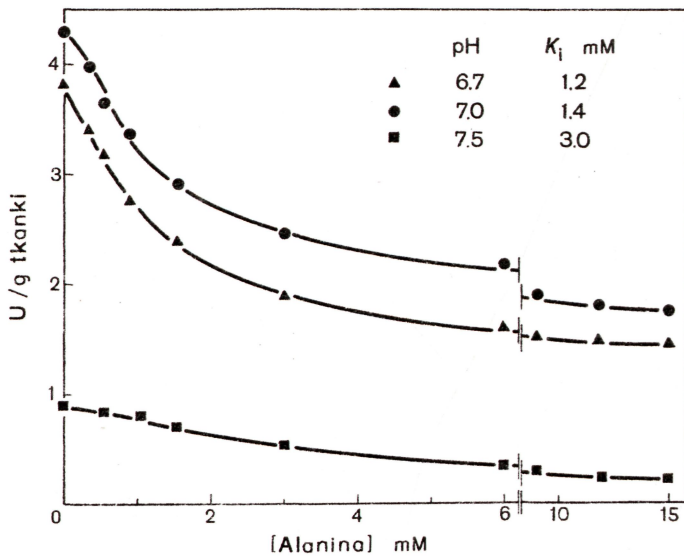
-1,6-bisfosforan. Krzywa wysycenia aktywatorem enzymu larw *T.molitor* ma kształt hiperboliczny (Rys. 52), a powinowactwo do F-1,6-bP wyrażane stałą K_a zmienia się od wartości 1,2 do 5,8 μM w zależności od pH (Tablica 25). Podobnie wysokie powinowactwo cechuje enzym z *S.gregaria* ($K_a = 1 \mu\text{M}$; Bailey i Walker, 1969) i *P.americana* ($K_a = 1,5 \mu\text{M}$; Storey, 1985a).

Tablica 25. Wpływ pH na powinowactwo kinazy pirogronianowej ciała tłuszczowego larw *T.molitor* do substratu fosfoenolopirogronianu i aktywatora fruktozo-1,6-bisfosforanu.

pH		$S_{0,5}(\text{PEP})$ mM	$K_a(\text{F1,6bP})$	n_H
6,7	(3)	$0,45 \pm 0,02$	1,2	$1,40 \pm 0,04$
	(1)			1,00
7,0	(5)	$0,35 \pm 0,06$	$3,4 \pm 0,9$	$1,24 \pm 0,02$
	(4)			$0,96 \pm 0,02$
7,5	(2)	0,73	5,8	1,66
	(2)			1,00

W tablicy zestawiono parametry kinetyczne obliczone na podstawie danych przedstawionych na Rys. 52 i 54, w podpisach których opisano skład płynu inkubacyjnego. Podano wartości średnie (\pm S.E.) wyników uzyskanych w poszczególnych eksperymentach (liczba eksperymentów w nawiasach).

PK ciała tłuszczowego karaczana *P.americana* (Storey, 1985a) aktywowana jest przez aniony fosforanowe (P_i), a połowę maksymalnej aktywacji obserwowano w stężeniu 7 mM P_i .



Rys. 53. Zależność aktywności kinazy pirogronianowej ciała tłuszczowego larw *T.molitor* od stężenia inhibitora alaniny w różnych pH. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 6,7; 7,0 lub 7,5 zawierającym 0,3 mM PEP i 0,5 mM ADP.

6.2.5. Inhibitory kinazy pirogronianowej ciała tłuszczowego

Silnym inhibitorem PK ciała tłuszczowego larw *T.molitor* (Lesicki i Jüngst, 1984) i dorosłych osobników *P.americana* (Storey, 1985a) jest alanina. Krzywa wiązania inhibitora (Rys. 53) ma kształt lekko sigmoidalny, a połowiczną inhibicję obserwuje się w stężeniach 1,2 do 3 mM, w zależności od pH.

Inhibitorem PK ciała tłuszczowego owadów jest również ATP (Bailey i Walker, 1969; Storey, 1985a). Połowę maksymalnego hamowania uzyskiwano w stężeniu 5 mM ATP (Bailey i Walker, 1969). Działanie obu inhibitorów, alaniny i ATP, sumuje się (Storey, 1985a).

Cytrynian, fosfoarginina, glutaminian, walina, fenyloalanina (Storey, 1985a) oraz AMP i cykliczny AMP (Bailey i Walker, 1969) to metabolity, których wpływu na aktywność PK ciała tłuszczowego nie stwierdzono.

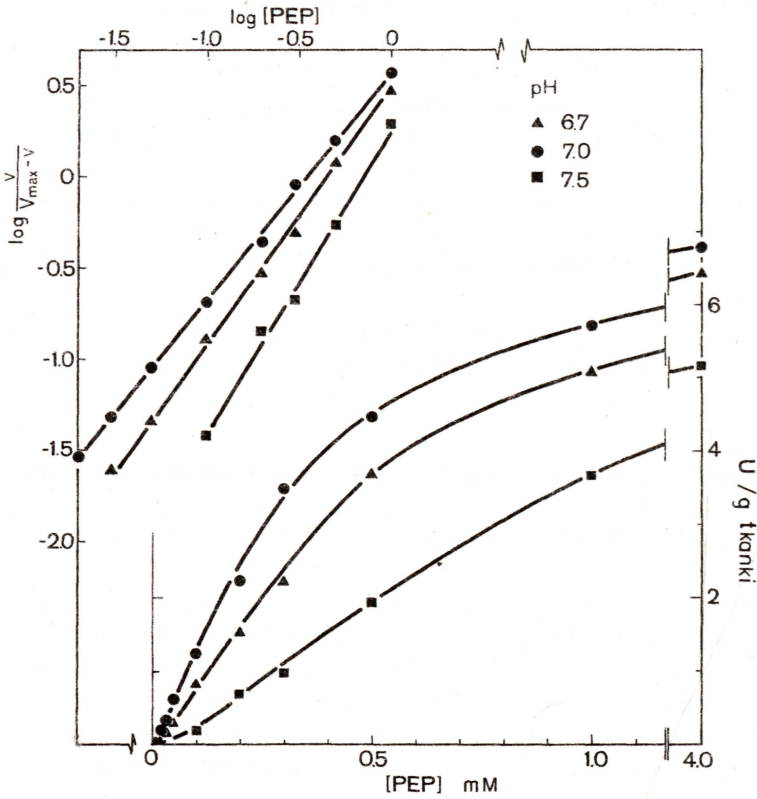
6.2.6. Zależność aktywności kinazy pirogronianowej od stężenia ADP

Kinetykę reakcji PK ciała tłuszczowego owadów z ADP jako substratem opisuje zależność hiperboliczna (Bailey i Walker, 1969; Hoffmann, 1975; Lesicki i Jüngst, 1984; Storey, 1985a). Stała $S_{0,5}$ wynosi 0,42 mM dla *A.domesticus* (Hoffmann, 1975), 0,30 mM dla *P.americana* (Storey, 1985a) i 0,17 - 0,26 mM dla *T.molitor* (Lesicki i Jüngst, 1984). Powinowactwo do ADP zmienia się w niewielkim stopniu wraz ze zmianą stężenia ko-substratu PEP (Lesicki i Jüngst, 1984), natomiast nie wpływa nań fruktozo-1,6-bis-fosforan (Lesicki i Jüngst, 1984). F-1,6-bP może chronić enzym przed inhibicją powodowaną nadmiarem substratu ADP (Bailey i Walker, 1969; Hoffmann, 1975).

6.2.7. Zależność aktywności kinazy pirogronianowej od stężenia fosfoenolopirogronianu

Zależność aktywności PK ciała tłuszczowego owadów od stężenia PEP opisuje krzywa sigmoidalna (Bailey i Walker, 1969; Hoffmann, 1975; Lesicki i Jüngst, 1984; Storey, 1985a). Powinowactwo PK do PEP jest podobne w niższym (0,5 mM) i wyższym (2 mM) stężeniu ADP (Lesicki i Jüngst, 1984). Natomiast zależy ono od pH środowiska reakcji (Rys. 54). Powinowactwo do PEP jest najwyższe w optymalnym pH ok. 7,0. W warunkach tych najslabiej zaznacza się sigmoidalny kształt krzywej kinetyki reakcji (najniższa wartość współczynnika n_H , Tablica 25). Charakteryzująca enzym z ciała tłuszczowego larw *T.molitor* wartość stałej $S_{0,5}$ równa 0,35 mM i współczynnik Hilla n_H wynoszący 1,24 przypominają odpowiednie wartości tych parametrów dla kinaz pirogronianowych z ciała tłuszczowego *A.domesticus* (0,398 mM, 1,25 - Hoffmann, 1975) i *P.americana* (0,32 mM, 1,43 - Storey, 1985a) (Tablica 26).

Aktywujące działanie F-1,6-bP na PK ciała tłuszczowego przejawia się w niskich stężeniach PEP. Polega więc ono na zmianie powinowactwa enzymu do substratu. W obecności 0,05 - 0,1 mM F-1,6-bP kształt krzywej kinetyki z PEP ulega przemianie w hiperboliczny (Bailey i Walker, 1969; Hoffmann, 1975; Lesicki i Jüngst, 1984; Storey, 1985a) a powinowactwo do PEP wzrasta od 6- do 12-krotnie (Hoffmann, 1975; Lesicki

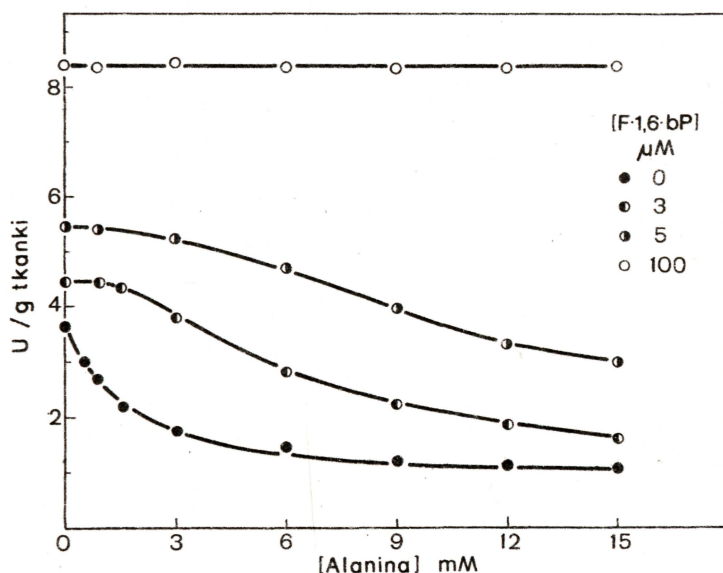


Rys. 54. Zależność aktywności kinazy pirogronianowej ciała tłuszczowego larw *T. molitor* od stężenia substratu fosfoenolopirogronianu w różnych pH. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 6,7; 7,0 lub 7,5 zawierającym 0,5 mM ADP. W górnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tabelcy 25.

Tablica 26. Porównanie parametrów kinetycznych cechujących kinazy pirogronianowe z ciała tłuszczowego owadów.

Warunki pomiaru	<i>T. molitor</i> [1]		<i>P. americana</i> [2]		<i>A. domesticus</i> [3]	
	$S_{0.5}$	n_H	$S_{0.5}$	n_H	$S_{0.5}$	n_H
Kontrola	0,35	1,24	0,32	1,43	0,398	1,25
+0,1 mM F1,6bP	0,04	1,01	0,05	1,02	0,031	0,96
+2 mM ATP			0,48	1,51		
+3 mM Ala			0,84	1,82		
+ 12 mM Ala	0,88	1,24				
+ 12 mM Ala, 0,1 mM F1,6bP	0,05	1,00				

Wartości stałych $S_{0.5}$ wyrażono w mM PEP. Cytowano z: [1] Lesicki i Jüngst, 1984; [2] Storey, 1985a; [3] Hoffmann, 1975.



Rys. 55. Wpływ aktywatora fruktozo-1,6-bisfosforanu na zależność aktywności kinazy pirogronianowej ciała tłuszczowego larw *T.molitor* od stężenia alaniny. Pomiarzy prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,0 zawierającym 03 mM PEP i 0,5 mM ADP oraz F-1,6-bP w stężeniach 0, 3, 5 lub 100 μ M.

i Jüngst, 1984; Storey, 1985a; Tablica 26). Natomiast zarówno alanina jak i ATP obniżają powinowactwo PK ciała tłuszczowego do PEP (Lesicki i Jüngst, 1984; Storey, 1985a). W ich obecności pogłębia się sigmoidalny kształt krzywej kinetyki a wartość stałych $S_{0,5}$ jest znacznie wyższa (Tablica 26). F-1,6-bP stopniowo znosi hamujące działanie alaniny (Rys. 55) i przy 0,1 mM stężeniu F-1,6-bP alanina nie hamuje aktywności PK. Podobnie F-1,6-bP chroni PK ciała tłuszczowego *P.americana* przed hamującym działaniem alaniny i ATP (Storey, 1985a).

6.3. UDZIAŁ FOSFOFRUKTOKINAZY I KINAZY PIROGRONIANOWEJ W REGULACJI METABOLIZMU CIAŁA TŁUSZCZOWEGO OWADÓW

Ciało tłuszczowe jest tym organem owadów, w którym zachodzą syntezy, przemiany i spichrzanie węglowodanowych, lipidowych i białkowych rezerw organizmu (Bailey, 1975; Keeley, 1985).

Podstawowym węglowodanem zapasowym jest glikogen (Wiens i Glibert, 1967; Wimer, 1969). Natomiast podstawowym węglowodanem transportowanym przez hemolimfę owadów jest trehaloza (Wyatt i Kalf, 1957), a jedynym miejscem jej uwalniania do hemolimfy jest ciało tłuszczowe (Candy i Kilby, 1961; Keeley, 1985). Uzupełnianie poziomu trehalozy w hemolimfie jest konieczne na przykład w początkowej fazie lotu szarańczy *Locusta migratoria*, gdy cukier ten intensywnie wykorzystywany jest przez mięśnie skrzydłowe (Van der Horst i wsp. 1978; Van Marrewijk i wsp. 1980). Glikogen magazynowany w komórkach ciała tłuszczowego może być źródłem reszt glukozy do syntezy trehalozy w tej tkance (Steele, 1963, 1982; Gäde, 1991; Sevala i Steele, 1991).

Wzrostowi syntezy trehalozy z glukozy-6-fosforanu towarzyszy obniżenie aktywności glikolitycznej (McDougall i Steele, 1988; Sevala i Steele, 1991). Trehaloza może być również produktem reakcji glukoneogennych, co wykazano u *T.molitor* (Gourdoux i wsp. 1980, 1983). Wszystkie enzymy niezbędne do katalizowania glukoneogenezy obecne są także w komórkach ciała tłuszczowego *P.americana* (Storey i Bailey, 1978ab).

Trójglicerydy są główną formą tłuszczu zapasowego w ciele tłuszczowym owadów (Keeley, 1985). Komórki tej tkanki zdolne są do przemiany cukrowców w kwasy tłuszczowe, a dalej w tłuszcz zapasowy (Chino i Gilbert, 1965), a wykazano to m.in. u *S.gregaria* (Walker i Bailey, 1970ab) i u *P.americana* (Storey i Bailey, 1978b). Przemiana cukrowców w kwasy tłuszczowe odbywać się może tylko przy udziale aktywnej drogi glikolitycznej.

Dla niektórych owadów głównym substratem energetycznym w czasie lotu jest prolina (Bursell, 1963, 1977, 1978; Mordue i De Kort, 1978; Weeda i wsp. 1979). Mięśnie skrzydłowe wykorzystują wtedy ten aminokwas dostarczany przez hemolimfę z ciała tłuszczowego, bowiem w tej tkance odbywa się jego intensywne syntezy (Khan i De Kort, 1978; Weeda i wsp. 1979, 1980). W procesie tym wykorzystywane są alanina i acetylo-CoA. Alanina jest wracającym z mięśni skrzydłowych produktem utleniania proliny (Brouwers i De Kort 1979; Weeda i wsp. 1979, 1980). Acetylo-CoA pochodzi z przemian tłuszczowców bądź węglowodanów. I w tym ostatnim przypadku dla syntezy proliny w ciele tłuszczowym uruchamiana powinna więc być glikoliza.

Odrębnym zagadnieniem metabolizmu węglowodanowego ciała tłuszczowego owadów przechodzących w swym cyklu życiowym okres diapauzy jest zamiana glikogenu w glicerol względnie sorbitol (Chino, 1957, 1958; Wyatt i Meyer, 1959; Asahina, 1969; Ziegler i Wyatt, 1975) lub też w trehalozę (Asahina i Tanno, 1964; Hayakawa i Chino, 1981). Wydaje się, iż miejscem determinującym, który z powyższych metabolitów powstaje w czasie diapauzy, jest reakcja katalizowana przez fosfofruktokinazę, aktywna u akumulujących glicerol a nieaktywna u gromadzących trehalozę (Hayakawa i Chino, 1982).

Przedstawione powyżej przemiany w ciele tłuszczowym owadów związane są z aktywnością drogi glikolitycznej (pełnej w czasie lipogenezy i ewentualnie syntezy proliny, lub częściowej u diapauzujących owadów akumulujących glicerol) bądź z aktywnością glukoneogenezy (w trakcie resyntezy glukozy i trehalozy). Ponieważ większość reakcji obu tych dróg katalizowana jest przez te same enzymy w jednym lub w drugim kierunku, niezbędne są miejsca regulacji aktywności. A więc miejsca, w których następuje przełączanie reakcji bądź w kierunku glikolitycznym bądź glukoneogenym.

Przedstawione w poprzednich rozdziałach wyniki wskazują, że miejscem regulacji mogą być reakcje katalizowane przez fosfofruktokinazę i kinazę pirogronianową. Oba enzymy izolowane z ciała tłuszczowego owadów różnych gatunków cechują własności regulacyjne. Są one podatne na allosteryczne aktywatory i inhibitory. W obecności wysokiego „potencjału energetycznego” nukleotydów adenylowych i w obecności inhibitorów występują one w formach o małym powinowactwie do swych substratów, a więc są mało aktywne w warunkach fizjologicznych. Spełnione zostają warunki wyłączenia drogi glikolitycznej. Allosteryczne aktywatory przekształcają PFK i PK w formy o wysokim powinowactwie do substratów, a tym samym formy wysoce aktywne. Dzięki nim glikoliza zostaje włączona. Czy kluczowe enzymy glukogenne, obecne w komórkach ciała tłuszczowego (Storey i Bailey, 1978b), są w tych momentach odpowiednio akty-

wowane lub hamowane? Prawdopodobnie tak, choć ta hipoteza wymaga potwierdzenia eksperymentalnego.

W ciele tłuszczowym owadów wykryto wahania poziomu fruktozo-2,6-bisfosforanu (Kasprzyk i Lesicki, 1988). Wykazano też aktywność enzymu syntetyzującego ten podstawowy aktywator fosfofruktokinazy (Kasprzyk i Lesicki, 1988; Schubert i Kasprzyk, 1989). Badania nad własnościami tego enzymu trwają (Kasprzyk, niepublikowane). U ssaków jest to dwufunkcyjna fruktozo-6-fosfo-2-kinaza/fruktozo-2,6-bisfosfataza, której aktywność kinazy bądź fosfatazy zależy od stopnia ufosforylowania (Pilkis i wsp. 1983; El-Maghrabi i Pilkis, 1984). Proces fosforylacji odbywa się przede wszystkim przy udziale kinazy białkowej zależnej od cAMP (El-Maghrabi i wsp. 1982bc; Furuya i wsp. 1982; Van Schaftingen i Hers, 1981). Aktywność cyklicznej adenylanowej wykryto w ciele tłuszczowym różnych gatunków owadów, w tym u *P.americana* (Hanaoka i Takahashi, 1977; Filburn i Wyatt, 1976; Morishima, 1978, 1979). Poziom cyklicznego AMP zmienia się w odpowiedzi na sygnały hormonalne docierające do ciała tłuszczowego (Gäde, 1977, 1979; Gäde i Holwerda, 1976; Gäde i Beenackers, 1977; Hanaoka i Takahashi, 1977; Orchard i wsp. 1982). Wzrost stężenia cyklicznego AMP stymuluje kinazy białkowe ciała tłuszczowego *P.americana* (Takahashi i Hanaoka, 1977) i *L.migratoria* (Pines i Applebaum, 1978; Van Marrewijk i Beenackers, 1979; Van Marrewijk i wsp. 1980; Pines i wsp. 1981).

Powyższe obserwacje sugerują istnienie w ciele tłuszczowym owadów podobnego mechanizmu regulacji stężenia fruktozo-2,6-bisfosforanu jak w hepatocytach wątroby ssaków (Lesicki i Kasprzyk, 1984). Przy niskim stężeniu cAMP dwufunkcyjna fruktozo-6-fosfo-2-kinaza/fruktozo-2,6-bisfosfataza występuje w formie defosforylowanej, cechującej się aktywnością kinazy (aktywność fosfatazy jest zahamowana). Katalizuje wtedy syntezę fruktozo-2,6-bisfosforanu, którego stężenie rośnie. Wzrost stężenia F-2,6-bP aktywuje fosfofruktokinazę ciała tłuszczowego owadów, po pierwsze, zwiększając powinowactwo PFK do fruktozo-6-fosforanu i po drugie, znosząc inhibicję PFK wywołowaną poprzez wysokie stężenia ATP. Aktywacji PFK sprzyjać może obniżenie stężenia ATP i wzrost stężenia AMP (czyli obniżenie „potencjału energetycznego” nukleotydów adenylowych). Takie zmiany poziomu tych nukleotydów obserwowano po inkubacji ciała tłuszczowego owadów z ekstraktami hormonalnymi z *corpora cardiaca* i jednocześnie rejestrowano wzrost aktywności PFK (Sevala i Steele, 1991). Aktywna PFK katalizuje reakcję fosforylacji fruktozo-6-fosforanu, prowadzącą do wzrostu stężenia fruktozo-1,6-bisfosforanu. Z kolei metabolit ten aktywuje kinazę pirogronianową. Aktywacja obu kluczowych enzymów glikolitycznych zapewnia kataboliczną degradację glukozy drogą glikolityczną.

Wzrost stężenia cAMP i aktywacja kinazy białkowej zależnej od cAMP prowadzi do fosforylacji fruktozo-6-fosfo-2-kinazy/fruktozo-2,6-bisfosfatazy i pobudzenia fosfatazowej aktywności enzymu. Hydrolizowany fruktozo-2,6-bisfosforan znika z cytoplazmy komórek ciała tłuszczowego. Brak podstawowego aktywatora PFK jest przyczyną przekształcenia enzymu w mało aktywną formę o niskim powinowactwie do substratu. Wtórnie przekształceniu w formę o małym powinowactwie do substratu ulega także PK (wobec obniżenia stężenia F-1,6-bP). Przekształcenie obu kluczowych enzymów glikolitycznych w mało aktywne formy umożliwia wyłączenie glikolizy i rozpoczęcie katalizowania reakcji glukoneogenezy.

7. MIĘŚNIE SKRZYDŁOWE OWADÓW

O intensywności pracy mięśni skrzydłowych świadczy blisko 100-krotny wzrost szybkości ich oddychania po rozpoczęciu lotu (Crabtree i Newsholme, 1975; Beenackers i wsp. 1984). Dla utrzymania tej najwyższej w świecie zwierzęcym aktywności metabolicznej (Beenackers i wsp. 1985) owady spalają różne substraty. Błonkówki, dwuskrzydłe, pluskwiaki wykorzystują wyłącznie węglowodany (Beenackers i wsp. 1985), toteż w ich mięśniach skrzydłowych po rozpoczęciu lotu wymagana jest szybka aktywacja glikolizy (Crabtree i Newsholme, 1975; Storey, 1983, 1985b). Inne owady (tęgopokrywe, prostoskrzydłe, łuskoskrzydłe) spalają węglowodany tylko w początkowej fazie lotu. W czasie dłuższego lotu ich mięśnie skrzydłowe stopniowo przestawiają swój metabolizm energetyczny na koszt utlenianych tłuszczowców (Krogh i Weis-Fogh, 1951; Mayer i Candy, 1969; Beenackers i wsp. 1985). Tak więc rozpoczęcie lotu u tych owadów związane jest z kilkudziesięciokrotnym wzrostem katabolizmu węglowodanów tj. glikolizy, która w następnej fazie lotu ulega zahamowaniu, a energii do pracy mięśni dostarcza wtedy intensywne utlenianie kwasów tłuszczowych. Wreszcie u niektórych owadów, jak np. muchy *Phormia regina*, tse-tse *Glossina morsitans* i stonki ziemniaczanej *Leptinotarsa decemlineata* (Sacktor i Childress, 1967; Hargrove, 1976; Mordue i De Kort, 1978; Bursell, 1981), początek lotu związany jest z intensywnym spalaniem aminokwasu proliny. Przedstawione powyżej gwałtowne i radykalne zmiany aktywności torów metabolizmu energetycznego mięśni skrzydłowych po rozpoczęciu lotu wymagają precyzyjnej regulacji aktywności enzymatycznej przede wszystkim kluczowych enzymów glikolitycznych: fosfofruktokinazy i kinazy pirogronianowej.

7.1. FOSFOFRUKTOKINAZA MIĘŚNI SKRZYDŁOWYCH OWADÓW

Pierwsze doniesienie o własnościach fosfofruktokinazy z mięśni skrzydłowych, dotyczące szarańczy *Schistocerca gregaria* (Walker i Bailey, 1969) uzupełnione zostało badaniami nad PFK mięśni skrzydłowych szarańczy wędrowniej *Locusta migratoria* (Wegener i wsp. 1986a, 1987), karaczana *Periplaneta americana* (Storey, 1983, 1985b), pszczoły *Apis mellifica* (Wegener i wsp. 1986b), trzmieła *Bombus atratus* (Leite i wsp. 1988) i konika polnego *Poekilocerus bufonius* (Khoja, 1991).

7.1.1. Ciężar cząsteczkowy

Badania nad oczyszczoną PFK mięśni skrzydłowych owadów wykazują, że jest ona tetramerem o ciężarze cząsteczkowym 320 000 (*A.mellifica*), 340 000 (*L.migratoria*) lub 360 000 (*B.atratus*), a ciężar podjednostki wynosi ok. 80 000 - 82 000 (Wegener i wsp. 1986b, 1987; Leite i wsp. 1988).

7.1.2. Optimum pH

Optimum w zakresie ok. pH 8,0 cechuje PFK mięśni skrzydłowych szarańczy *L.migratoria* (Wegener i wsp. 1987). Natomiast PFK karaczana *P.americana* wykazuje maksymalną aktywność w pH 7,5 (Storey, 1985b) przy wysycających stężeniach F6P. W niższych stężeniach substratu, pH optymalne dla aktywności enzymu wzrasta do 7,8 - 8,35. Dodatek pozytywnych efektorów przywraca optimum w pH 7,5.

7.1.3. Zależność aktywności od stężenia fruktozo-6-fosforanu

PFK mięśni skrzydłowych prostoskrzydłych *S.gregaria* (Walker i Bailey, 1969), *L.migratoria* (Wegener i wsp. 1986a, 1987), *P.bufonius* (Khoja, 1991), trzmiela *B.atratus* (Leite i wsp. 1988) oraz karaczana *P.americana* (Storey, 1983, 1985b) wykazuje niskie powinowactwo do substratu F6P, a kształt krzywej kinetyki reakcji jest wyraźnie sigmoidalny. Przy braku pozytywnych efektorów w środowisku reakcji wartości stałych $S_{0,5}$, wyznaczanych w pH bliskim 7,0, są bardzo wysokie (do 16 mM), a więc dalece wykraczają poza zakres fizjologicznych stężeń F6P. Powinowactwo PFK mięśni skrzydłowych do F6P modyfikują (Tablica 27) stężenia:

- 1) jonów wodorowych,
- 2) kosubstratu ATP,
- 3) anionów fosforanowych (P_i),
- 4) AMP,
- 5) fruktozo-2,6-bisfosforanu,
- 6) oraz współdziałanie aktywatorów.

W pH 8,0 - 8,4 PFK mięśni skrzydłowych karaczana *P.americana* (Storey, 1985b), szarańczy *L.migratoria* (Wegener i wsp. 1987) i trzmiela *B.atratus* (Leite i wsp. 1988) wykazują większe powinowactwo do F6P niż w pH 7,0 - 7,1.

Wzrost stężenia ATP powoduje znaczne pogłębienie sigmoidalnego kształtu krzywej kinetyki reakcji i wzrost wartości $S_{0,5}$ u *S.gregaria* (Walker i Bailey, 1969), *L.migratoria* (Wegener i wsp. 1987) i *B.atratus* (Leite i wsp. 1988).

10 mM stężenie P_i obniża dziesięciokrotnie wartość $S_{0,5}$ dla PFK mięśni karaczana *P.americana*, choć wzrasta wtedy kooperatywna aktywacja enzymu przez substrat (wzrost współczynnika n_H).

AMP aktywuje PFK mięśni skrzydłowych owadów (Walker i Bailey, 1969; Storey, 1985b; Wegener i wsp. 1987; Leite i wsp. 1988). Jego obecność powoduje wzrost powinowactwa enzymu do F6P. Kształt krzywej kinetyki reakcji dla PFK *S.gregaria* ulega zmianie w hiperboliczny w obecności 1 mM AMP w płynie inkubacyjnym (Walker i Bailey, 1969). Natomiast PFK mięśni karaczana *P.americana* (Storey, 1985b) i szarańczy *L.migratoria* (Wegener i wsp. 1987) aktywowana przez AMP w stężeniach 6 - 400 μ M zachowuje sigmoidalny kształt krzywej kinetyki, ale wartość $S_{0,5}$ ulega znacznemu obniżeniu.

F-2,6-bP jest silnym aktywatorem PFK mięśni skrzydłowych. W jego obecności wzrasta powinowactwo PFK do F6P i znacznemu obniżeniu ulega wartość $S_{0,5}$ (Storey, 1985b; Wegener i wsp. 1987; Leite i wsp. 1988).

Tablica 27. Powinowactwo fosfofruktokinaz mięśni skrzydłowych owadów do substratu fruktozo-6-fosforanu.

Warunki pomiaru	pH 7,0 - 7,4		pH 8,0 - 8,4	
	$S_{0,5}$	n_H	$S_{0,5}$	n_H
<i>Periplaneta americana</i> [1]				
ATP = 0,2 mM				
bez modulatorów	16,0	2,3	9,4	1,5
+ 1 mM NH_4	15,0	2,0	6,9	
+ 10 mM P_1	1,3	3,2	0,38	
+ 0,16 mM AMP	2,3	2,1	2,25	
+ 0,1 μ M F2,6bP	9,3	2,1		
+ 1 μ M F2,6bP	1,2	2,7	0,54	
+ 1 mM NH_4 , 10 mM P_1				
0,16 mM AMP	0,072	1,2		
+ 1 mM NH_4 , 10 mM P_1				
0,16 mM AMP,	0,031	1,2		
0,1 μ M F2,6bP				
+ 0,4 mM AMP,		>		
0,1 μ M F2,6bP	0,038	1,5		
<i>Schistocerca gregaria</i> [2]				
ATP = 1 mM				
bez modulatorów	3	>1		
+ 1 mM AMP	1,5	\equiv 1		
ATP = 2 mM				
bez modulatorów	>3	>1		
<i>Locusta migratoria</i> [3]				
ATP = 0,1 mM				
bez modulatorów	0,29			
ATP = 7,5 mM				
bez modulatorów	23			
+ 3,5 μ M F2,6bP	1,7			
+ 6 μ M AMP,				
3,5 μ M F2,6bP	0,15			
+ 40 μ M AMP, 4 mM P_1	1,25	3,8	0,08	1,4
<i>Poecilocus bufonius</i> [4]				
ATP = 1 mM				
bez modulatorów	0,82	>1		\equiv 1
<i>Bambus atratus</i> [5]				
ATP = 5 mM				
bez modulatorów	2,5	\equiv 2	0,039	\equiv 1
+ 0,2 mM AMP	0,6	\equiv 1		
+ 4 μ M F2,6bP	0,28	\equiv 1		
+ 4 μ M F2,6bP,				
0,2 mM AMP	0,06	\equiv 1		

Wartości $S_{0,5}$ wyrażono w mM. Cytowano z prac: [1] Storey, 1985b; [2] Walker i Bailey, 1969; [3] Wegener i wsp. 1987; [4] Khoja, 1991; [5] Leite i wsp. 1988.

Najsilniejsza aktywacja PFK mięśni skrzydłowych owadów zachodzi w warunkach, gdy w środowisku reakcji znajdują się jednocześnie wszystkie aktywatory enzymu. Wydaje się, iż aktywacja ta nie jest prostym efektem sumowania pozytywnego oddziaływa-

nia poszczególnych aktywatorów. W przypadku AMP i F-2,6-bP aktywacja PFK jest wynikiem synergistycznego współdziałania obu efektorów (Storey, 1985b; Wegener i wsp. 1987; Leite i wsp. 1988).

7.1.4. Wpływ ATP

PFK mięśni skrzydłowych cechuje hiperboliczna kinetyka z ATP jako substratem (Walker i Bailey, 1969; Storey, 1985b). Wyższe stężenia ATP hamują enzym, choć dla poszczególnych gatunków stwierdzono odmienne stężenia ATP wywołujące efekt hamowania. I tak, dla *P.americana* (Storey, 1985b) ATP już w stężeniu wyższym od 0,2 mM hamował PFK. U *P.bufo*nus (Khoja, 1991) hamowanie pojawiało się powyżej 0,5 mM ATP, u *S.gregaria* (Walker i Bailey, 1969) powyżej 1 mM, a u *A.mellifica* (Wegener i wsp. 1986b) dopiero powyżej 4 mM. Różnice te mogą wynikać ze specyficzności gatunkowej enzymów, lecz również z różnego stopnia oczyszczenia enzymów i odmiennych warunków pomiaru aktywności. Hamujący efekt wyższych stężeń ATP jest obniżany przez:

- 1) wzrost pH,
- 2) wzrost stężenia F6P,
- 3) obecność aktywatorów.

Hamujący wpływ ATP na PFK mięśni skrzydłowych *P.americana* przejawia się silniej w pH 7,0 niż pH 8,0 (Storey, 1985b).

W obecności 5 mM F6P potrzebne są znacznie wyższe stężenia ATP by hamować aktywność PFK mięśni skrzydłowych niż w obecności 2 mM F6P (u *S.gregaria* (Walker i Bailey, 1969)) i 0,2 mM F6P (u *P.americana* (Storey, 1985b)).

AMP chroni PFK szarańczy *S.gregaria* (Walker i Bailey, 1969) i karaczana *P.americana* (Storey, 1985b) przed hamującym działaniem wysokich stężeń ATP. Aktywność PFK *P.americana* zahamowaną przez ATP szczególnie silnie przywraca fruktozo-2,6-bisfosforan, zwłaszcza, gdy działa wspólnie z AMP i innymi aktywatorami (Storey, 1985b).

7.1.5. Wpływ AMP

Krzywa aktywacji PFK mięśni skrzydłowych szarańczy *S.gregaria* pod wpływem AMP ma kształt hiperboliczny (Walker i Bailey, 1969; Storey, 1985b; Khoja, 1991). Połowę maksymalnej aktywacji obserwowano w zbliżonych stężeniach AMP, 10 μ M u *S.gregaria* (Walker i Bailey, 1969), 8 μ M u *P.americana* (Storey, 1985b). Aktywujące działanie AMP polega na (Tablica 27):

- 1) wzroście powinowactwa PFK do substratu,
- 2) ochronie przed hamującym wpływem wysokich stężeń ATP.

7.1.6. Wpływ fruktozo-2,6-bisfosforanu

F-2,6-bP jest silnym aktywatorem PFK mięśni skrzydłowych owadów (Storey, 1983, 1985b; Wegener i wsp. 1986ab, 1987; Leite i wsp. 1988; Khoja, 1991). Powinowactwo PFK do aktywatora w dużym stopniu zależy od stężeń substratów i innych efektorów w środowisku reakcji (Tablica 28). Jest bowiem większe:

Tablica 28. Powinowactwo fosfofruktokinaz mięśni skrzydłowych owadów do aktywatora fruktozo-2,6-bisfosforanu.

	pH	F6P mM	ATP mM	AMP mM	F1,6bP mM	K_a nM
<i>P.americana</i> [1]	7,0	10	0,2	0	0	100
	7,0	0,2	0,2	0	0	970
	7,0	0,2	0,2	0,16	0	19
	7,0	0,2	0,2	0,4	0	4,5
<i>L.migratoria</i> [2]	7,3	0,05	7,5	0,09	0	1050
	7,3	0,05	7,5	0,04	0,05	1200
	7,3	0,05	7,5	1,40	0	350

Cytowano z prac: [1] Storey, 1985b; [2] Wegener i wsp. 1986a.

1) w wyższych stężeniach substratu F6P,

2) w obecności AMP.

Aktywujące działanie F-2,6-bP na PFK mięśni skrzydłowych polega na:

1) zwiększaniu powinowactwa PFK do substratu F6P (Storey, 1985b; Wegener i wsp. 1986a, 1987; Leite i wsp. 1988),

2) ochronie przed hamującym wpływem wysokich stężeń ATP (Storey, 1985b; Wegener i wsp. 1986a; Leite i wsp. 1988),

3) ochronie przed hamującym działaniem F-1,6-bP (Wegener i wsp. 1986b).

7.1.7. Brak wpływu cytrynianu na aktywność fosfofruktokinazy mięśni skrzydłowych

Cytrynian jest silnym inhibitorem PFK ssaków. Natomiast nie wykazano wpływu tego metabolitu na aktywność PFK mięśni skrzydłowych całego szeregu owadów:

1) szarańczy *S.gregaria* (Walker i Bailey, 1969; Newsholme i wsp. 1977) i *L.migratoria* (Wegener i wsp. 1987),

2) karaczana *P.americana* (Storey, 1985b),

3) pszczoły *A.mellifica* (Wegener i wsp. 1986b),

4) trzmieli *Bombus lucorum* i *B.terrestris* (Newsholme i wsp. 1977),

5) osy *Vespa vulgaris* (Newsholme i wsp. 1977),

6) chrząszczy *Pachnoda ephippiata* i *Heliocoprissp.* (Newsholme i wsp. 1977),

7) motyli *Noctua pronuba* i *Plusia gamma* (Newsholme i wsp. 1977).

Natomiast aktywność PFK mięśni skrzydłowych konika polnego *P.bufonius* była hamowana nieznacznie przez 2 mM cytrynian (Khoja, 1991).

7.1.8. Wpływ heksozo-1,6-bisfosforanów

Kontrowersyjny jest wpływ fruktozo-1,6-bisfosforanu na aktywność PFK mięśni skrzydłowych. Nie wpływa on bowiem (w stężeniach do 1 mM) na aktywność PFK *P.americana* (Storey, 1985b). U *L.migratoria* F-1,6-bP aktywuje PFK tylko pod nieobecność AMP i F-2,6-bP, a w obecności tych aktywatorów F-1,6-bP hamuje PFK (Wegener i wsp. 1987). Natomiast u *S.gregaria* (Walker i Bailey, 1969) i u *P.bufonius*

(Khoja, 1991) fruktozo-1,6-bisfosforan a u *A.mellifica* fruktozo-1,6-bisfosforan i glukozo-1,6-bisfosforan (Wegener i wsp. 1986b) hamują aktywność PFK mięśni skrzydłowych⁴. Hamujący efekt heksozobisfosforanów wzrasta w wyższych stężeniach ATP. Co więcej, w ich obecności pogłębia się hamujący wpływ wysokich stężeń ATP (Walker i Bailey, 1969). AMP nie chroni PFK przed inhibicją pod wpływem heksozo-1,6-bisfosforanów (Wegener i wsp. 1986b). Natomiast F-2,6-bP przywraca aktywność PFK mięśni *A.mellifica* zahamowaną przez F-1,6-bP.

7.1.9. Wpływ innych związków

ADP nie wywiera wpływu na aktywność PFK mięśni skrzydłowych *P.americana* (Storey, 1985b), natomiast aktywuje PFK mięśni *P.bufo*nus (Khoja, 1991). Jony amonowe nieznacznie aktywują enzym *P.americana* (Storey, 1985b), natomiast pozostają bez wpływu na PFK mięśni *S.gregaria* (Walker i Bailey, 1969). Aktywność enzymów wzmagają aniony fosforanu nieorganicznego (Walker i Bailey, 1969; Storey, 1985b; Khoja, 1991). Aktywność PFK *P.bufo*nus jest hamowana przez fosfoargininę i fosfoenolpirogonian (Khoja, 1991).

7.2. KINAZA PIROGRONIANOWA MIĘŚNI SKRZYDŁOWYCH OWADÓW

Kinaza pirogronianowa jest drugim kluczowym enzymem glikolitycznym mięśni skrzydłowych owadów, którego aktywność winna być regulowana w czasie zmian kierunku torów metabolicznych na przykład po rozpoczęciu lotu. Scharakteryzowano dotąd własności tego enzymu izolowanego z mięśni skrzydłowych szarańczy *S.gregaria* (Bailey i Walker, 1969) i karaczana *P.americana* (Storey, 1985a).

7.2.1. Badania elektroforetyczne

PK z mięśni skrzydłowych karaczana *P.americana* jest pojedynczym elektroforetycznie izoenzymem, różniącym się znacznie ruchliwością elektroforetyczną na żelu skrobiowym od formy enzymu z ciała tłuszczowego (Storey, 1985a). Od PK ciała tłuszczowego różni PK mięśni także punkt izoelektryczny (w pH 5,75), stwierdzony w trakcie ogniskowania izoelektrycznego (Storey, 1985a).

7.2.2. Ciężar cząsteczkowy

PK mięśni skrzydłowych karaczana *P.americana*, choć różni się własnościami elektroforetycznymi i kinetycznymi od enzymu z ciała tłuszczowego, ma ten sam (ok. 235 000) ciężar cząsteczkowy (Storey, 1985a).

7.2.3. Optimum pH

Wartość pH, w którym stwierdza się najwyższą aktywność PK mięśni skrzydłowych, waha się od 7,0 do 7,5, a wierzchołek aktywności przesuwają się w zależności od buforu w medium inkubacyjnym (Bailey i Walker, 1969; Storey, 1985a).

⁴ PFK szeregu tkanek ssaków jest aktywowana przez fruktozo-1,6-bisfosforan.

7.2.4. Modulatory metaboliczne

Aktywność PK mięśni skrzydłowych w niewielkim stopniu regulowana jest przez modulatory metaboliczne (Bailey i Walker, 1969; Storey, 1985a). Słabymi inhibitorami kompetycyjnymi wobec fosfoenolpirogronianu są ATP i fosfoarginina (stałe K_i wynoszą odpowiednio 3,5 i 15 mM), natomiast alanina ($K_i = 20$ mM) i cytrynian ($K_i = 24$ mM) są słabymi inhibitorami niekompetycyjnymi wobec PEP (Storey, 1985a). Fruktozo-1,6-bisfosforan, choć nie wpływa na kinetykę reakcji z PEP, efektywnie przywraca aktywność PK mięśni skrzydłowych *P.americana*, zahamowaną przez ATP lub fosfoargininę. Efektu tego nie obserwowano u *S.gregaria* (Bailey i Walker, 1969).

7.2.5. Kinetyka reakcji kinazy pirogronianowej mięśni skrzydłowych z ADP i z fosfoenolpirogronianem jako substratami

PK mięśni skrzydłowych cechuje hiperboliczna kinetyka z ADP jako substratem (Bailey i Walker, 1969; Storey, 1985a).

Także krzywa zależności aktywności PK mięśni skrzydłowych od stężenia PEP ma kształt hiperboliczny (Bailey i Walker, 1969; Storey, 1985a). Enzym z mięśni karaczana *P.americana* cechuje wysokie powinowactwo do PEP ($S_{0,5} = 0,04$ mM), niemodyfikowane przez F-1,6-bP (Storey, 1985a). Inhibitory kompetycyjne, ATP i fosfoarginina, obniżają powinowactwo do PEP.

7.3. UDZIAŁ FOSFOFRUKTOKINAZY I KINAZY PIROGRONIANOWEJ W REGULACJI METABOLIZMU MIĘŚNI SKRZYDŁOWYCH

System tchawkowy zapewnia mięśniom skrzydłowym owadów doskonale zaopatrzenie w tlen. Toteż mięśnie te nie zaciągają długu tlenowego i uzupełniają ATP, niezbędny dla skurczów, oddychając tlenowo (Beenackers i wsp. 1985). Jak już wspomniano, karaczan *P.americana* reprezentuje te owady, które zużywają węglowodany jako podstawowy substrat oddechowy w ciągu lotu. Szarańczaki (*S.gregaria* i *L.migratoria*) to przedstawiciele grupy owadów, które wykorzystują węglowodany tylko w pierwszych kilkudziesięciu sekundach lotu, później zaś spalają tłuszczowce.

Mięśnie skrzydłowe karaczana *P.americana* wykorzystują w locie przede wszystkim glikogen zmagazynowany w samych mięśniach (Downer i Parker, 1979; Elliott i wsp. 1984), a tylko 9% glikogenu zużywanego w locie dostarczane jest z ciała tłuszczowego przez hemolimfę w postaci trehalozy (Downer i Parker, 1979). Wydajna glikogenoliza po rozpoczęciu lotu wymaga aktywacji kluczowych enzymów, którymi w mięśniach skrzydłowych karaczana wydają się być fosforylaza glikogenu i fosfofruktokinaza. Regulacja aktywności fosforylasy glikogenu u owadów przypomina mechanizmy charakterystyczne dla ssaków. Enzym występuje zasadniczo w dwóch formach: w formie ufosforylowanej, wysoce aktywnej i niewrażliwej na AMP, zwanej fosforylazą a oraz jako fosforylaza b, tj. w formie defosforylowanej, nieaktywnej przy braku AMP, a w obecności AMP osiągającej 80% aktywności formy a (Steele, 1982; Vaandrager i wsp. 1986, 1987; Sprang i wsp. 1987; Van Marrewijk i wsp. 1989). W aktywną fosforylazę a przekształcana jest fosforylaza b w procesie fosforylacji katalizowanej przez specyficzną kinazę fosforylasy b (Steele, 1982). Aktywatorem kinazy fosforylasy b mogą

być jony Ca^{2+} , których wzrost cytoplazmatycznego stężenia jest efektem pobudzenia nerwowego (Steele, 1982). Ten niezależny od cyklicznego AMP sposób aktywacji kinazy fosforylasy b, a w konsekwencji fosforylasy jest charakterystyczny dla mięśni owadów (Sacktor i wsp. 1974; Friedman, 1985).

Przedstawione wcześniej wyniki prac nad fosfofruktokinazą mięśni skrzydłowych karaczana *P.americana* (Storey, 1983, 1985b) wskazują na regulacyjne właściwości tego enzymu i stwarzają możliwość wypełniania przez PFK funkcji włącznika/wyłącznika glikolizy w mięśniach skrzydłowych. Szczególną rolę w regulacji aktywności PFK odgrywa fruktozo-2,6-bisfosforan, aktywator, wspólnie z AMP wielokrotnie zwiększający powinowactwo do F6P i odblokowujący hamowanie pod wpływem ATP. F-2,6-bP może być sygnałem włączającym glikolizę poprzez aktywację PFK. Zestawione w Tablicy 29 stężenia metabolitów w mięśniach skrzydłowych *P.americana* wskazują, iż w trakcie lotu wzrastają stężenia F-2,6-bP, a także AMP. Maleje stężenie ATP (i „potencjał energetyczny adenylanów”). Warunki te sprzyjają pełnej aktywacji PFK i tym samym intensywnej katalizie fosforylacji F6P przez PFK, nawet w warunkach pewnego obniżenia stężenia substratu. Niestety, nie badano dotąd dróg regulacji syntezy F-2,6-bP w mięśniach skrzydłowych *P.americana*. Można jedynie przypuszczać, że podobnie jak w ciele tłuszczowym owadów (Kasprzyk i Lesicki, 1988), F-2,6-bP syntetyzuje specyficzna fruktozo-6-fosfo-2-kinaza. Wzrost stężenia F-2,6-bP w czasie lotu *P.americana* może jedynie sugerować wzrost aktywności tego enzymu.

Tablica 29. Stężenia metabolitów uczestniczących w reakcji katalizowanej przez fosfofruktokinazę w mięśniach skrzydłowych owadów.

Metabolit	<i>Periplaneta americana</i>		<i>Locusta migratoria</i>	
	mięsień odpoczywający	mięsień pracujący	początek lotu	15 min lotu
	[1]		[2]	
ATP	5,10 ± 0,20	4,20 ± 0,39		
ADP	1,50 ± 0,09	1,85 ± 0,17		
AMP	0,17 ± 0,03	0,45 ± 0,05		
E.Ch.	0,86	0,79		
F6P	0,11 ± 0,01	0,04 ± 0,006		
F-1,6-bP	0,10 ± 0,01	0,25 ± 0,03		
F-2,6-bP	0,0012 ± 0,00008	0,0027 ± 0,0003	0,0022 ± 0,0005	0,0005 ± 0,0000

Podano wartości średnie ± S.E. Stężenia wyrażono w $\mu\text{molach/g}$ tkanki. Wyniki cytowano z prac: [1] Storey, 1983; [2] Wegener i wsp. 1986a.

Lot szarańczaków wymaga innego mechanizmu regulacji aktywności glikogenolizy. W przeciwieństwie do *P.americana*, szarańczaki wykorzystują glikogen jako substrat energetyczny jedynie w początkowej fazie lotu (Beenackers i wsp. 1985), co więcej, w dużym stopniu wykorzystywany jest glikogen ciała tłuszczowego (Van Marrewijk i Beenackers, 1979, 1980; Van Marrewijk i wsp. 1980, 1983, 1989), który w postaci trehalozy transportowany jest przez hemolimfę do pracującego intensywnie mięśnia (Van der Horst i wsp. 1978; Rowan i Newsholme, 1979). Początkowa faza lotu wymaga aktywnej glikolizy, ale po ok. 15 minutach lotu szarańczaków następuje przełączenie metabolizmu energetycznego na spalanie tłuszczowców (Beenackers i wsp. 1985).

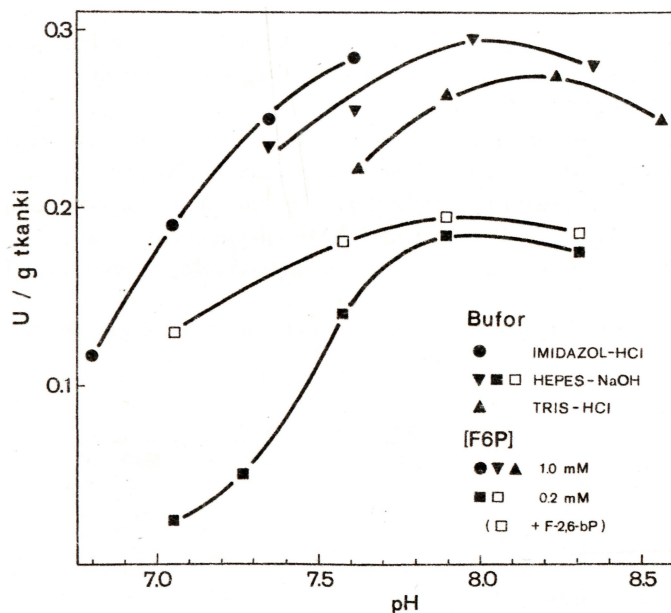
W tym momencie istotne staje się wyłączenie drogi glikolitycznej. Włączanie i wyłączenie glikolizy mięśni skrzydłowych szarańczaków związane jest z aktywacją bądź inhibicją kluczowych enzymów: fosforylasy glikogenu, heksokinazy i fosfofruktokinazy, a także zapewne aldolazy (Storey, 1980ab). W przypadku pierwszego enzymu regulacja aktywności polega na opisanym już wzajemnym przekształcaniu się form fosforylasy a i b (Vaandrager i wsp. 1986, 1987). Po 10 sekundach lotu zostaje wyczerpany zapas glikogenu mięśni skrzydłowych szarańczaków (Rowan i Newsholme, 1979) i wtedy dla włączenia glukozy, pochodzącej z trehalozy dostarczanej hemolimfą (Van der Horst i wsp. 1978; Rowan i Newsholme, 1979), do drogi glikolitycznej niezbędna staje się aktywacja heksokinazy. Regulacyjne właściwości tego enzymu z mięśni skrzydłowych *Schistocerca americana gregaria* sugerują możliwość jego aktywacji w początkowej fazie lotu (Storey, 1980a). Aktywność fosfofruktokinazy zależy przede wszystkim od poziomu aktywatora F-2,6-bP (Walker i Bailey, 1969; Wegener i wsp. 1986a, 1987). Wysokie stężenie tego metabolitu w początkowej fazie lotu sprzyja aktywacji PFK i aktywności glikolizy. Po 15 minutach stężenie F-2,6-bP gwałtownie maleje (Tablica 29), toteż brak F-2,6-bP może być sygnałem wyłączającym glikolizę poprzez inaktywację PFK w tej fazie lotu szarańczaków (Wegener i wsp. 1986a, 1987). Także w przypadku tych owadów konieczne są dalsze badania nad regulacją syntezy i degradacji fruktozo-2,6-bisfosforanu. Kluczową rolę w wyłączeniu glikolizy przy przełączeniu metabolizmu energetycznego szarańczaków na spalanie tłuszczów postulowano również dla aldolazy (Storey, 1980b). Enzym ten wrażliwy jest na inhibicję pod wpływem wzrastającego w tym czasie stężenia cytrynianu. Cytrynian, klasyczny inhibitor fosfofruktokinazy ssaków, nie wpływa na PFK mięśni skrzydłowych (Walker i Bailey, 1969; Newsholme i wsp. 1977; Wegener i wsp. 1986b, 1987). Inhibicja aldolazy miałaby zastępować w tej sytuacji hamowanie PFK (Storey, 1980b). Ponadto inhibicja aldolazy może prowadzić do gromadzenia się fruktozo-1,6-bisfosforanu, który, znowu przeciwnie niż w przypadku tkanek ssaków, jest inhibitorem fosfofruktokinazy mięśni skrzydłowych niektórych owadów (Walker i Bailey, 1969; Wegener i wsp. 1986b; Khoja, 1991). W ten sposób inaktywacja glikolizy na etapie kolejnych reakcji katalizowanych przez fosfofruktokinazę i aldolazę byłaby intensyfikowana (Storey, 1980b).

Zarówno u karaczanów (Storey, 1985a) jak i szarańczaków (Bailey i Walker, 1969) kinaza pirogronianowa mięśni skrzydłowych nie wykazuje własności regulacyjnych i zdaje się nie brać udziału w mechanizmach włączania/wyłączenia glikolizy tej tkanki. Aktywność enzymu zależy tylko od stężenia substratów. Niewykluczone, że PK mięśni skrzydłowych owadów współpracuje ze stosunkowo wysoko aktywną karboksylazą pirogronianową (Crabtree i wsp. 1972) dla produkcji dodatkowego szczawiooctanu, niezbędnego dla wielokrotnej aktywacji cyklu kwasu cytrynowego w trakcie lotu owadów (Crabtree i wsp. 1972; Worm i Beenackers, 1980; Candy, 1985). Brak karboksykinazy fosfoenolpirogronianowej w mięśniach skrzydłowych owadów (Crabtree i wsp. 1972) wyklucza możliwość reakcji glukogennych i stąd nie ma konieczności wyłączenia aktywności kinazy pirogronianowej.

8. INNE MIĘSNIE OWADÓW

8.1. MIĘSNIE KOŃCZYN

Poruszanie się owadów związane jest nie tylko z lotem, ale także z chodzeniem, realizowanym przez przemieszczające się kończyny, wprawiane w ruch poprzez kurczące się mięśnie kończyn. Metabolizm tych mięśni poznano w znacznie mniejszym stopniu niż metabolizm mięśni skrzydłowych. Opublikowano wstępne charakterystyki fosfofruktokinaz z mięśnia udowego karaczana *Periplaneta americana* (Grasso i Migliori-Natalizi, 1968) oraz mięśni kończyn konika polnego *Poekilocerus bufonius* (Khoja, 1991). Enzymy te wykazują maksymalną aktywność w pH 7,0 - 7,5. PFK *P.americana* cechuje duże powinowactwo do F6P ($S_{0,5} = 0,069$ mM; Grasso i Migliori-Natalizi, 1968), PFK *P.bufonius* wykazuje znacznie niższe powinowactwo do substratu ($S_{0,5} = 1,4$ mM; Khoja, 1991). Jak inne fosfofruktokinazy, PFK mięśni kończyn owadów hamowana jest



Rys. 56. Zależność aktywności fosfofruktokinazy mięśni powłok ciała larw *T. molitor* od pH. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym zawierającym bufor Imidazol-HCl; HEPES-NaOH lub Tris-HCl; 1 mM ATP oraz 0,2 lub 1,0 mM F6P. Określano wpływ F-2,6-bP na badaną zależność.

przez wyższe stężenia ATP (Grasso i Migliori-Natalizi, 1968; Khoja, 1991) a także przez fosfoargininę i fosfoenolopirogronian (Khoja, 1991). Aktywatorami są F-2,6-bP, AMP, ADP i P_i (Khoja, 1991).

8.2. MIĘŚNIE POWŁOK CIAŁA

U owadów o przeobrażeniu zupełnym larwa zwykle nie przypomina dorosłego owada a w poruszaniu uczestniczą nie tylko mięśnie kończyn, lecz także mięśnie powłok ciała. Badano własności fosfofruktokinazy i kinazy pirogronianowej tych mięśni u larw mącznika młynarka *Tenebrio molitor*.

8.2.1. Fosfofruktokinaza

8.2.1.1. Zależność aktywności fosfofruktokinazy mięśni powłok ciała owadów od pH

PFK mięśni powłok ciała *T.molitor* działa optymalnie w zakresie stężeń jonów wodorowych wyrażanych pH 7,8 - 8,2 (Rys. 56). Przy 0,2 mM stężeniu F6P aktywność PFK gwałtownie maleje, gdy pH jest niższe niż 7,5. W wyższym stężeniu F6P (1 mM) lub po dodaniu F-2,6-bP spadek aktywności PFK wraz z obniżaniem pH jest łagodniejszy.

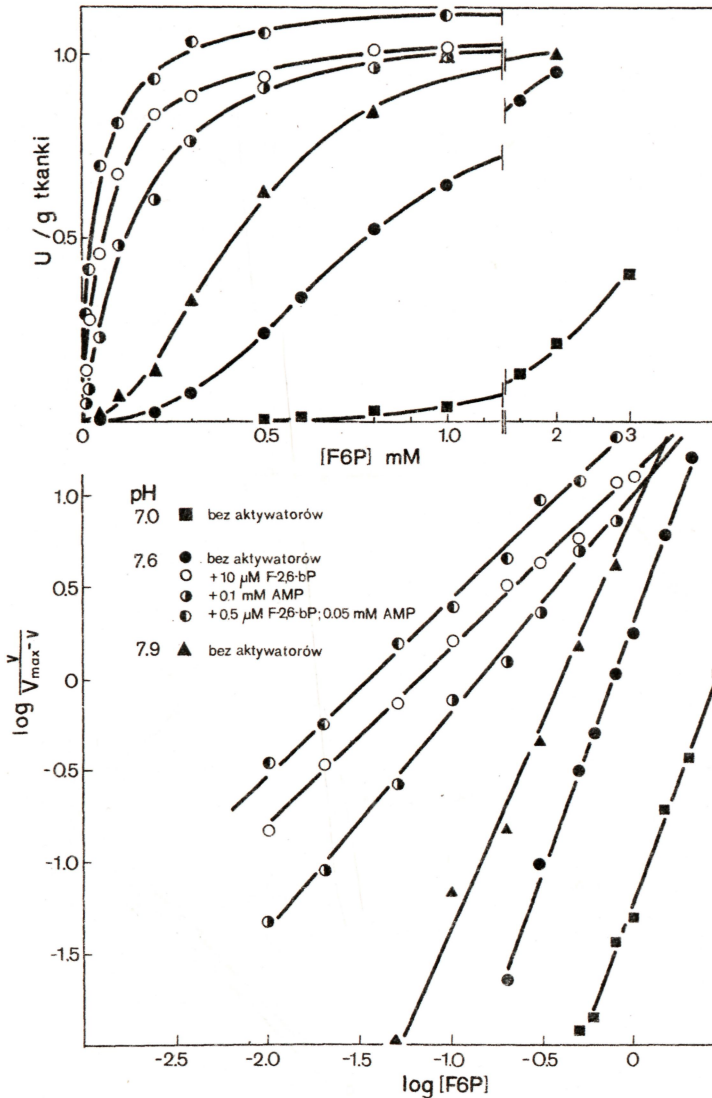
8.2.1.2. Kinetyka reakcji z fruktozo-6-fosforanem jako substratem

PFK mięśni larw *T.molitor* cechuje sigmoidalna kinetyka z F6P jako substratem (Rys. 57; Tablica 30). Powinowactwo enzymu do tego substratu zależy od pH. Jest ono znacznie niższe w pH 7,0 ($S_{0,5} = 2,88$ mM) niż w pH 7,6 ($S_{0,5} = 0,74$ mM), a także w pH 7,9, optymalnym dla reakcji ($S_{0,5} = 0,39$ mM). We wszystkich pH kooperatywne oddziaływanie substratu na enzym, charakteryzowane wielkością współczynnika Hilla, są zbliżone. Powinowactwo PFK mięśni larw *T.molitor* do F6P modyfikują aktywatory. W obecności 10 μ M F-2,6-bP lub 0,1 mM AMP enzym cechuje hiperboliczna kinetyka z F6P (Rys. 57), a stała $S_{0,5}$ ulega obniżeniu do 0,06 mM w obecności F-2,6-bP i do

Tablica 30. Powinowactwo fosfofruktokinazy mięśni powłok ciała larw *T.molitor* do substratu fruktozo-6-fosforanu.

pH	AMP mM	F-2,6-bP μ M		$S_{0,5}$	n_H
7,0	0	0	(1)	2880	2,65
	0	10	(1)	64	1,01
7,6	0	0	(4)	742 ± 7	$3,21 \pm 0,25$
	0,1	0	(1)	138	1,16
	0	10	(4)	62 ± 2	$0,98 \pm 0,01$
	0,05	0,5	(1)	35	0,96
7,9	0	0	(3)	391 ± 2	$2,55 \pm 0,24$

W tablicy zestawiono parametry kinetyczne obliczone na podstawie danych przedstawionych na Rys. 57, w podpisie którego opisano skład płynu inkubacyjnego. Podano wartości średnie (\pm S.E.) wyników uzyskanych w poszczególnych eksperymentach (liczba eksperymentów w nawiasach). Wartości $S_{0,5}$ wyrażono w μ M.

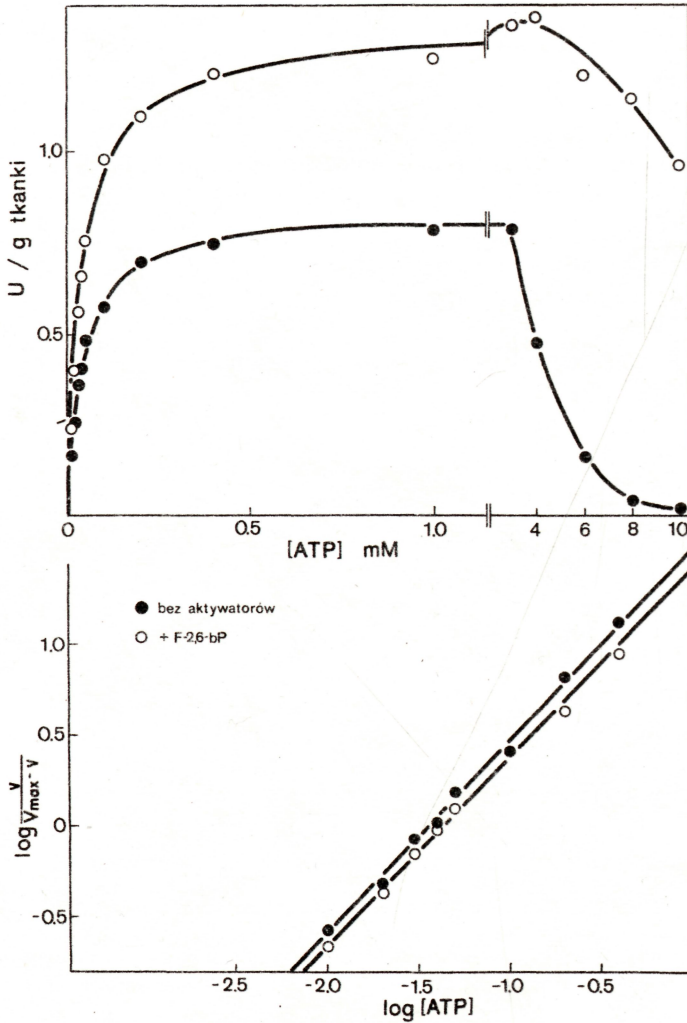


Rys. 57. Zależność aktywności fosfofruktokinazy mięśni powłok ciała larw *T.molitor* od stężenia substratu fruktozo-6-fosforanu. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,0; 7,7 lub 7,9 w obecności 1 mM ATP. W pH 7,6 określano wpływ 0,1 mM AMP; 10 μ M F-2,6-bP lub łącznie 0,05 mM AMP i 0,5 μ M F-2,6-bP na badaną zależność. W dolnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tabelicy 30.

0,138 mM w obecności AMP (Tabelica 30). Oba aktywatory współdziałają w aktywacji PFK. W jednoczesnej obecności 0,5 μ M F-2,6-bP i 0,05 mM AMP stała $S_{0,5}$ obniżona jest aż do 0,035 mM, a więc stymulacja aktywności PFK jest większa niż wynikałoby to z prostego sumowania działania obu aktywatorów osobno.

8.2.1.3. Wpływ ATP na aktywność fosfofruktokinazy

PFK larw *T.molitor* odpowiada wzrostem aktywności na wzrost stężenia ATP w zakresie od 0 do 2 mM, przy czym zależność tę opisuje hiperboliczna krzywa reakcji (Rys. 58; Tablica 31). F-2,6-bP nie zmienia tej zależności, choć we wszystkich badanych stężeniach ATP obserwowano wyższą aktywność PFK w obecności F-2,6-bP. ATP powyżej 3 mM hamuje aktywność PFK mięśni larw *T.molitor*, w sposób charakterystyczny



Rys. 58. Zależność aktywności fosfofruktokinazy mięśni powłok ciała larw *T.molitor* od stężenia substratu ATP. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,9 w obecności 1 mM F6P. W dolnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tablicy 31.

Tablica 31. Powinowactwo fosfofruktokinazy mięśni powłok ciała larw *T.molitor* do ATP jako substratu.

F-2,6-bP μM		$S_{0,5}$	n_H
0	(4)	37 + 3	1,04 ± 0,05
10	(3)	40 ± 8	1,03 ± 0,02

W tablicy zestawiono parametry kinetyczne obliczone na podstawie danych przedstawionych na Rys. 58, w podpisie którego opisano skład płynu inkubacyjnego. Podano wartości średnie (\pm S.E.) wyników uzyskanych w poszczególnych eksperymentach (liczba eksperymentów w nawiasach). Wartości $S_{0,5}$ wyrażono w μM.

tyczny dla PFK z innych źródeł. F-2,6-bP przeciwdziała temu hamowaniu, na przykład w stężeniu 10 mM ATP i w obecności tego metabolitu PFK wykazuje wysoką aktywność, podczas gdy przy braku F-2,6-bP inhibicja jest niemal całkowita.

8.2.1.4. Wpływ cytrynianu na aktywność fosfofruktokinazy

Podobnie jak w przypadku PFK z innych tkanek owadzych, cytrynian w stężeniach do 2,5 mM nie wpływa na aktywność PFK mięśni powłok ciała larw *T.molitor*.

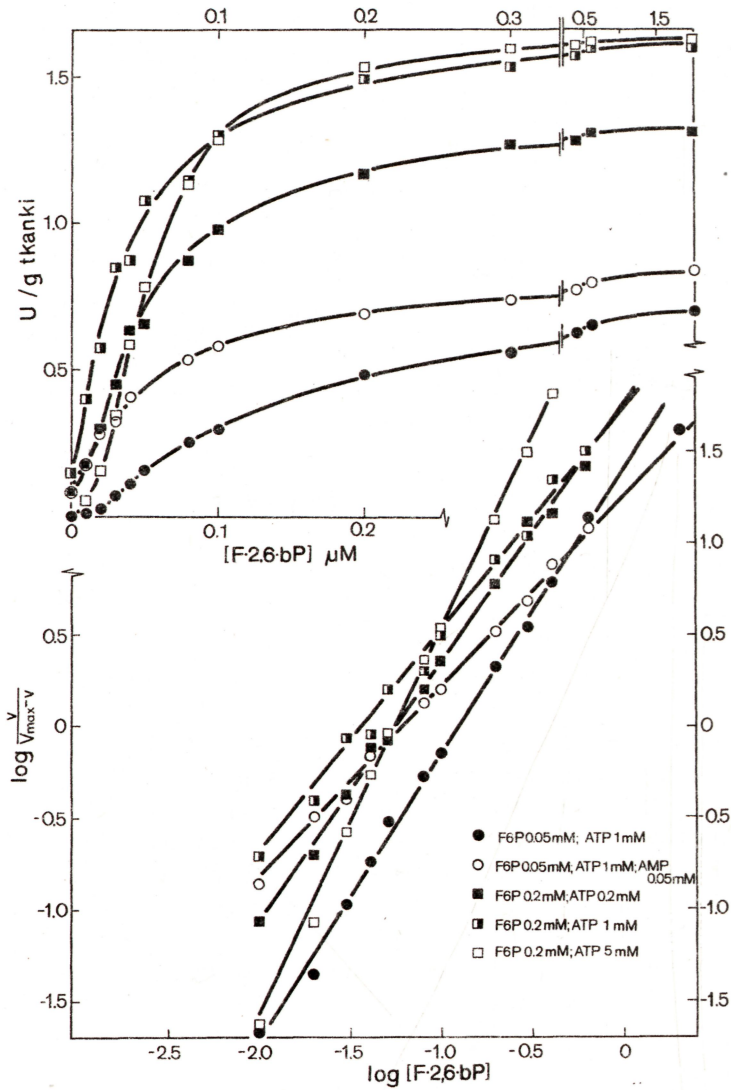
8.2.1.5. Powinowactwo fosfofruktokinazy do fruktozo-2,6-bisfosforanu

Zestawiono wyniki opisujące zależność aktywności PFK od stężenia F-2,6-bP jako aktywatora, wyznaczaną w pH optymalnym dla reakcji (tj. 7,9) (Rys. 59, Tablica 32). Współczynnik Hilla w zakresie od 1,25 do 2,03 wskazuje na sigmoidalny charakter zależności. Powinowactwo PFK do aktywatora zależy od stężenia substratu F6P. Powinowactwo PFK do F-2,6-bP w obecności 0,05 mM F6P jest bowiem trzykrotnie niższe niż w 0,2 mM F6P. Natomiast powinowactwo do F-2,6-bP nie zależy od stężenia drugiego substratu i w każdym z badanych stężeń ATP (niewysycającym enzym stężeniu 0,2 mM, w optymalnym dla reakcji 1 mM i hamującym aktywność PFK 5 mM) było podobne, co sugeruje zbliżoną wartość stałej $S_{0,5}$. W stężeniu ATP niewysycającym PFK a także

Tablica 32. Powinowactwo fosfofruktokinazy mięśni powłok ciała larw *T.molitor* do aktywatora fruktozo-2,6-bisfosforanu.

F6P mM	ATP mM	AMP mM		K_a	n_H
0,05	1,0	0	(3)	125 ± 15	1,57 ± 0,04
0,05	1,0	0,05	(1)	63	1,03
0,2	0,2	0	(1)	55	1,45
0,2	1,0	0	(3)	39 ± 10	1,25 ± 0,03
0,2	5,0	0	(1)	54	2,03

W tablicy zestawiono parametry kinetyczne obliczone na podstawie danych przedstawionych na Rys. 59, w podpisie którego opisano skład płynu inkubacyjnego. Podano wartości średnie (\pm S.E.) wyników uzyskanych w poszczególnych eksperymentach (liczba eksperymentów w nawiasach). Wartości K_a wyrażono w nM.



Rys. 59. Zależność aktywności fosfofruktokinazy mięśni powłok ciała larw *T.molitor* od stężenia aktywatora fruktozo-2,6-bisfosforanu. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 7,9 zawierającym 0,05 lub 0,2 mM F6P oraz 0,2; 1,0 lub 5,0 mM ATP. W dolnej części rysunku zależność przedstawiono w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tabelicy 32.

w stężeniu inhibującym wzrastają kooperatywne oddziaływania F-2,6-bP i PFK (pogłębia się sigmoidalny charakter zależności). AMP zwiększa powinowactwo PFK do F-2,6-bP i w jego obecności krzywa wysycenia enzymu fruktozo-2,6-bisfosforanem ma kształt hiperboliczny.

8.2.2. Kinaza pirogronianowa

Scharakteryzowano także kinazę pirogronianową z mięśni powłok ciała larw chrząszcza *T.molitor* (Hoffmann, 1977; Hoffmann i Rådeke, 1978). Enzym ten różni się ruchliwością elektroforetyczną na żelu skrobiowym od PK ciała tłuszczowego larw *T.molitor* (Rys. 50).

Krzywa zależności aktywności PK z mięśni larw *T.molitor* od pH (Hoffmann, 1977) posiada wierzchołek w pH 7,0, a więc optimum pH jest zbliżone do charakterystycznego dla PK ciała tłuszczowego (Rys. 51). Jednak w przypadku enzymu mięśniowego zależności tej nie modyfikuje obecność F-1,6-bP. Enzym z mięśni cechuje hiperboliczna kinetyka z ADP jako substratem a powinowactwo do ADP jest podobne jak PK z ciała tłuszczowego (Hoffmann, 1977; Lesicki i Jüngst, 1984).

Natomiast w przeciwieństwie do formy PK z ciała tłuszczowego *T.molitor*, PK mięśni cechuje hiperboliczna kinetyka i wysokie powinowactwo wobec PEP jako substratu (Hoffmann, 1977). Stałe $S_{0,5}$ wobec PEP, mieszczące się w zakresie 0,03 - 0,04 mM i współczynniki Hilla równe 1, niezależnie od stężeń ADP, ATP, F-1,6-bP i alaniny, wskazują na brak kooperatywnego wiązania substratu oraz na podobieństwo PK z mięśni powłok *T.molitor* (Hoffmann, 1977; Hoffmann i Rådeke, 1978) do PK z mięśni skrzydłowych owadów (Bailey i Walker, 1969; Storey, 1985a).

8.2.3. Rola fosfofruktokinazy i kinazy pirogronianowej w metabolizmie mięśni powłok ciała larw owadów

Niestety nie prowadzono dotąd szerszych badań nad metabolizmem mięśni powłok ciała owadów. Nieznane są więc kierunki metabolizmu pośredniego, preferowane substraty oddechowe, poziom metabolitów w różnych stanach metabolicznych tkanki itp. Aktywność enzymów glikolitycznych wskazuje, iż droga glikolityczna spełnia swą typową rolę w metabolizmie energetycznym tkanki. Regulacyjne własności fosfofruktokinazy z mięśni powłok larw *T.molitor* sugerują, że enzym ten spełnia istotną rolę w regulacji glikolizy. Podobnie jak w innych tkankach owadów, jego aktywność zależy od poziomu aktywatorów, tj. przede wszystkim fruktozo-2,6-bisfosforanu i AMP, które z jednej strony znoszą hamujące działanie wyższych stężeń ATP, z drugiej zwiększają powinowactwo PFK do F6P. Kinaza pirogronianowa mięśni powłok ciała larw *T.molitor* przypomina własnościami PK mięśni skrzydłowych owadów. Własności te wskazują, iż aktywność enzymu jest regulowana jedynie poziomem substratów i można sugerować, że reakcja katalizowana przez PK mięśni owadów nie jest miejscem regulacji aktywności drogi glikolitycznej.

9. SERCE OWADÓW

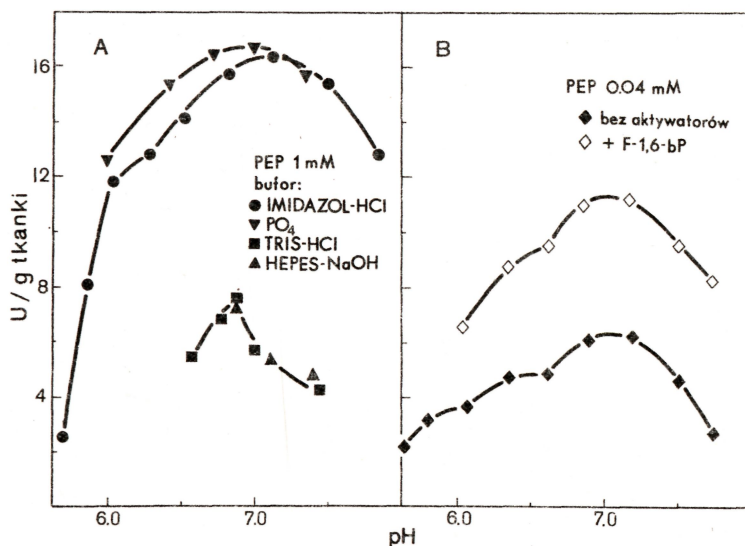
Układ krwionośny owadów jest systemem otwartym, tzn. płyn ustrojowy, hemolimfa, krąży nie tylko w naczyniach układu krwionośnego, lecz również wylewa się z nich, swobodnie przemieszcza się pomiędzy tkankami i wypełnia jamę ciała owadów. Hemolimfa spełnia u owadów podstawowe funkcje płynów ustrojowych z wyjątkiem funkcji transportu gazów oddechowych, które to gazy docierają do poszczególnych tkanek i komórek owada bezpośrednio poprzez system tchawkowy. Pozostałe zadania transportowe hemolimfy, a więc na przykład transport wchłanianych pokarmów z jelit do tkanek, transport uwalnianych zapasów węglowodanowych i tłuszczowych z ciała tłuszczowego do mięśni (i innych tkanek), transport hormonów i neurohormonów z miejsc ich wydzielania do tkanek docelowych, wypełniane są wtedy, gdy hemolimfa cyrkuluje pomiędzy poszczególnymi częściami organizmu. Ten ruch hemolimfy, stały przepływ pomiędzy tkankami owada, wymuszany jest z jednej strony przez ruch ciała, z drugiej przez pracę narządów pulsujących, które pompując hemolimfę nadają jej strumieniowi ukierunkowany przepływ. Owe pulsujące pompy zlokalizowane są w różnych miejscach ciała owadów (Jones, 1977), a najistotniejszym z nich jest naczynie grzbietowe tłoczące hemolimfę od końca odwłoka do głowy owada (Miller, 1985). Części odwłokowej naczynia grzbietowego przypisuje się nazwę (i funkcję) serca owadów (Jones, 1964, 1977), choć jego zasięg i budowa mogą być zróżnicowane u różnych gatunków (Miller, 1985).

Serce owadów zbudowane jest zwykle z pojedynczej warstwy komórek mięśniowych (Gerould, 1938; Miller, 1985), a mięśnie te są mięśniami prążkowanymi (Miller, 1975). Mięśnie serca pracują w sposób ciągły, a częstotliwość skurczów może być regulowana. Ostatnie badania zdają się przychylić ku poglądom przypisującym mięśniowi serca owadów własności miogenne, co oznacza, że mięsień ten sam inicjuje swe skurcze, a układ nerwowy i hormonalny jedynie kontrolują ich częstotliwość (Miller, 1985). Choć stosunkowo dużo prac poświęcono badaniom nad mechanizmami nerwowej i humoralnej regulacji pracy serca owadów (Miller, 1985; Mullins, 1985), niewiele wiadomo o metabolizmie mięśnia sercowego owadów, źródłach substratów energetycznych, regulacji aktywności kluczowych enzymów. Toteż podjęto badania nad aktywnością glikolizy w sercu karaczana *Periplaneta americana*, rozpoczynając je od charakterystyki kinazy pirogronianowej, potencjalnego miejsca regulacji tego toru metabolicznego.

9.1. KINAZA PIROGRONIANOWA SERCA OWADÓW

9.1.1. Zależność aktywności od pH

Aktywność PK izolowanej z serca karaczana *P.americana* zależy od buforu stabilizującego pH środowiska inkubacyjnego (Rys. 60). Podobnie jak PK z ciała tłuszczowego i mięśni skrzydłowych karaczana *P.americana* (Storey, 1985a), PK serca osiąga

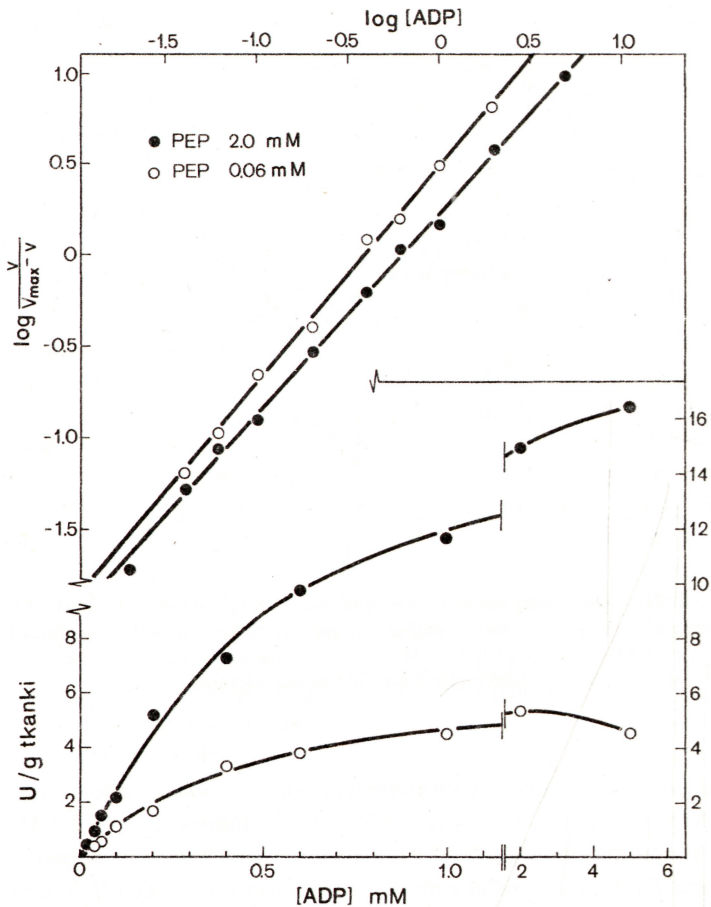


Rys. 60. Zależność aktywności kinazy pirogronianowej serca karaczana *P.americana* od pH: (A) wpływ rodzaju buforu, (B) wpływ fruktozo-1,6-bisfosforanu. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym zawierającym 0,5 mM ADP oraz 0,04 lub 1,0 mM PEP. Określano wpływ buforów imidazol-HCl, fosforanowego, Tris-HCl i Hepses-NaOH oraz 0,05 mM F-1,6-bP na badaną zależność.

najwyższą aktywność w buforze fosforanowym, nieco niższą w buforze imidazol-HCl, natomiast zdecydowanie hamują aktywność enzymu bufor Tris-HCl i Hepses-NaOH (Rys. 60A). W buforze imidazol-HCl i przy wysycających enzym stężeniach PEP, PK serca karaczana *P.americana* osiąga maksymalną aktywność przy pH środowiska w zakresie 6,9 - 7,2; a więc i zakres optymalnego pH jest dla PK serca zbliżony do zakresu optymalnego dla ciała tłuszczowego i mięśni (Storey, 1985a). Wierzchołek krzywej zależności aktywności PK serca od pH jest przesunięty w nieco niższe pH (6,7 - 7,1) w buforze fosforanowym (Rys. 60A). Optymalny zakres pH nie zmienia się, gdy zależność wyznacza się w niskim stężeniu PEP lub w obecności F-1,6-bP, choć w tym drugim przypadku aktywność PK wzrasta we wszystkich pH (Rys. 60B).

9.1.2. Zależność aktywności od stężenia ADP

Krzywa kinetyki reakcji z ADP jako substratem ma dla PK serca kształt bliski hiperboli zarówno w wysokim (2 mM) jak i niskim (0,06 mM) stężeniu PEP (Rys. 61). Wartości stałej $S_{0,5}$ wobec ADP wahają się w granicach 0,39 - 0,62 mM (w zależności od stężenia PEP; Tablica 33). Są więc nieco wyższe od wartości wyznaczonych dla PK innych tkanek karaczana *P.americana* (0,27 - 0,30; Storey, 1985a), mieszczą się jednak w zakresie stwierdzanym u różnych gatunków owadów (Hoffmann, 1975; Lesicki i Jüngst, 1984).



Rys. 61. Zależność aktywności kinazy pirogronianowej serca karaczana *P.americana* od stężenia ADP. Pomiarzy prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 6,9 zawierającym 0,06 lub 2 mM PEP. W górnej części rysunku przedstawiono zależność w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tabelicy 33.

9.1.3. Zależność aktywności od stężenia fosfoenolopirogronianu

Brak jest kooperatywnego oddziaływania PEP jako substratu na kinazę pirogronianową serca karaczana *P.americana*. Kształt krzywej kinetyki reakcji jest zawsze hiperboliczny (Rys. 62 - 64), niezależnie od stężenia kosubstratu ADP (Rys. 62), pH (Rys. 63) i obecności efektorów (Rys. 64). Te własności PK serca *P.americana* przypominają PK z serca karaczana *Gromphadorrhina coquereliana* (Rys. 65) oraz enzymy izolowane z innych mięśni owadów (Bailey i Walker, 1969; Hoffmann, 1977; Storey, 1985a). Wartość stałej $S_{0.5}$, a więc powinowactwo PK serca *P.americana* do PEP zmienia się w zależności od stężeń:

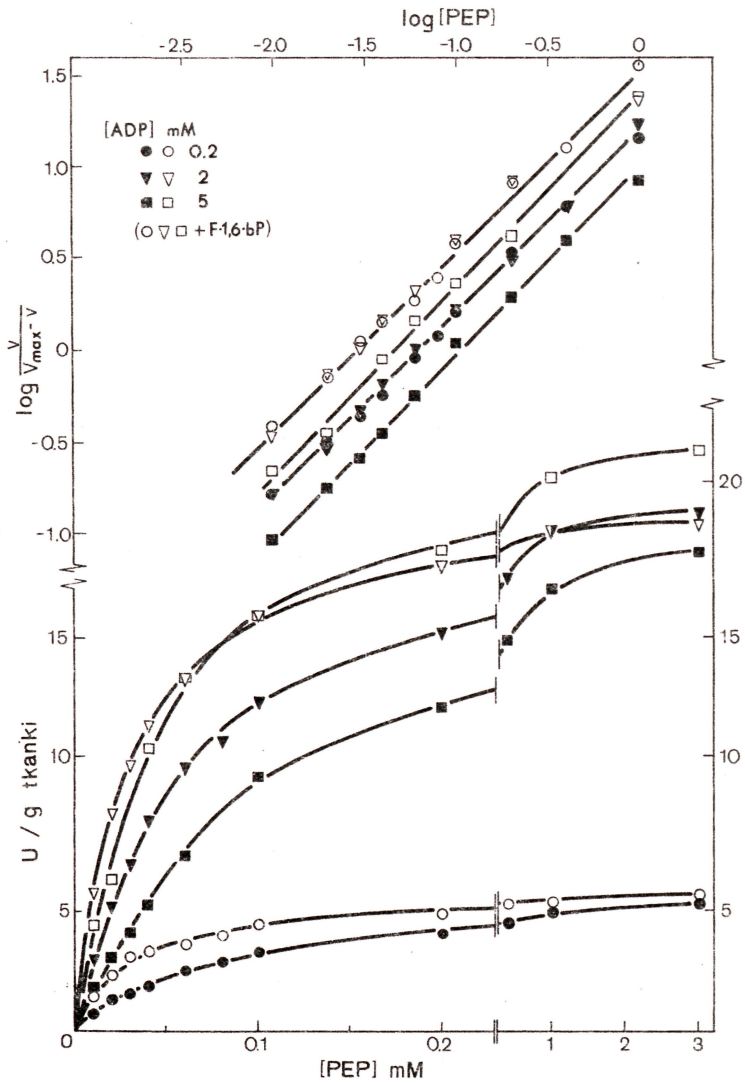
1) ADP (Rys. 62; Tablica 33). Powinowactwo do PEP nie zmienia się w dość szerokim zakresie stężeń ADP (w stężeniu ADP 0,2 mM stała $S_{0,5}$ wynosi 67 μM PEP, a w stężeniu 2 mM wynosi 69 μM), jednak w wyższych stężeniach ulega obniżeniu (przy 5 mM ADP $S_{0,5}$ wynosi 109 μM).

Tablica 33. Powinowactwo kinazy pirogronianowej serc *P.americana* i *G.coquereiana* do substratów: ADP i fosfoenolpirogronianu.

PEP mM	ADP mM	ATP mM	Ala mM	F-1,6-bP mM	pH	$S_{0,5}$ [PEP]	$S_{0,5}$ [ADP]	n_H
<i>P.americana</i>								
0,06	~	0	0	0	6,9 (3)		390 + 46	1,19 ± 0,15
2,0	~	0	0	0	6,9 (3)		620 ± 7 9	1,04 ± 0, 0 4
~	0,2	0	0	0	6,9 (4)	67 ± 10		1,01 ± 0, 0 2
~	0,2	0	0	0,05	6,9 (3)	3 1 ± 3		0,98 ± 0, 0 1
~	0,2	3	0	0	6,9 (1)	85		1,04
~	0,2	10	0	0	6,9 (1)	135		1,11
~	0,2	10	0	0,05	6,9 (1)	46		0,99
~	0,2	0	5	0	6,9 (1)	72		0,98
~	2,0	0	0	0	6,2 (1)	85		0,94
~	2,0	0	0	0,05	6,2 (1)	36		0,98
~	2,0	0	0	0	6,9 (4)	69 ± 1 5		1,04 ± 0, 0 4
~	2,0	0	0	0,05	6,9 (3)	35 ± 7		1,02 ± 0, 0 3
~	2,0	0	0	0	7,1 (1)	74		1,01
~	2,0	0	0	0,05	7,1 (1)	31		1,02
~	2,0	0	0	0	7,8 (1)	229		0,86
~	2,0	0	0	0,05	7,8 (1)	35		1,01
~	5,0	0	0	0	6,9 (3)	109 ± 6		1,06 ± 0, 0 2
~	5,0	0	0	0,05	6,9 (1)	47		1,04
<i>G.coquereiana</i>								
~	2,0	0	0	0	6,9 (3)	60+ 8		1,04 ± 0, 0 2
~	2,0	0	0	0,05	6,9 (1)	48		1,01
~	2,0	0	0	0	8,4 (3)	174 ± 11		1,08 ± 0, 0 3
~	2,0	0	0	0,05	8,4 (1)	52		1,01

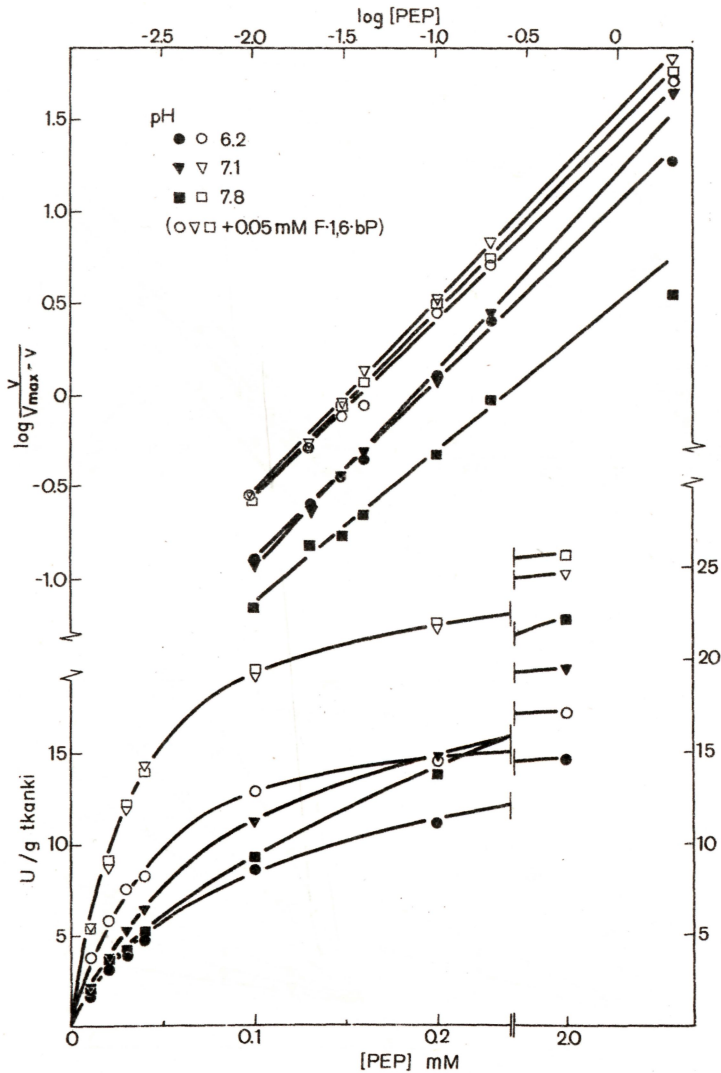
W tablicy zestawiono parametry kinetyczne obliczone na podstawie danych przedstawionych na Rys. 61 - 65. w podpisach których opisano skład płynu inkubacyjnego. Podano wartości średnie (\pm S.E.) wyników uzyskanych w poszczególnych eksperymentach (liczba eksperymentów w nawiasach). Wartości $S_{0,5}$ wyrażono w μM .

2) jonów wodorowych (Rys. 63; Tablica 33). PK serca karaczana *P.americana* wykazuje najwyższe powinowactwo do PEP w pH optymalnym dla reakcji. Wzrost stężenia jonów wodorowych (do pH 6,2) w niewielkim stopniu obniża powinowactwo do PEP. Znacznie większy spadek powinowactwa obserwuje się w wyższym pH (w tych warunkach wartość stałej $S_{0,5}$ wzrasta co najmniej trzykrotnie). Podobne trzykrotne obniżenie powinowactwa PK wobec PEP występuje w przypadku PK z serca *G.coquereiana* (Rys. 65; Tablica 33). W przypadku enzymów z serc obu gatunków karaczanów obecność F-1,6-bP znosi wpływ pH na powinowactwo PK do PEP. Pozostaje ono wysokie i niezmiennie we wszystkich badanych pH (Rys. 63, 65; Tablica 33).



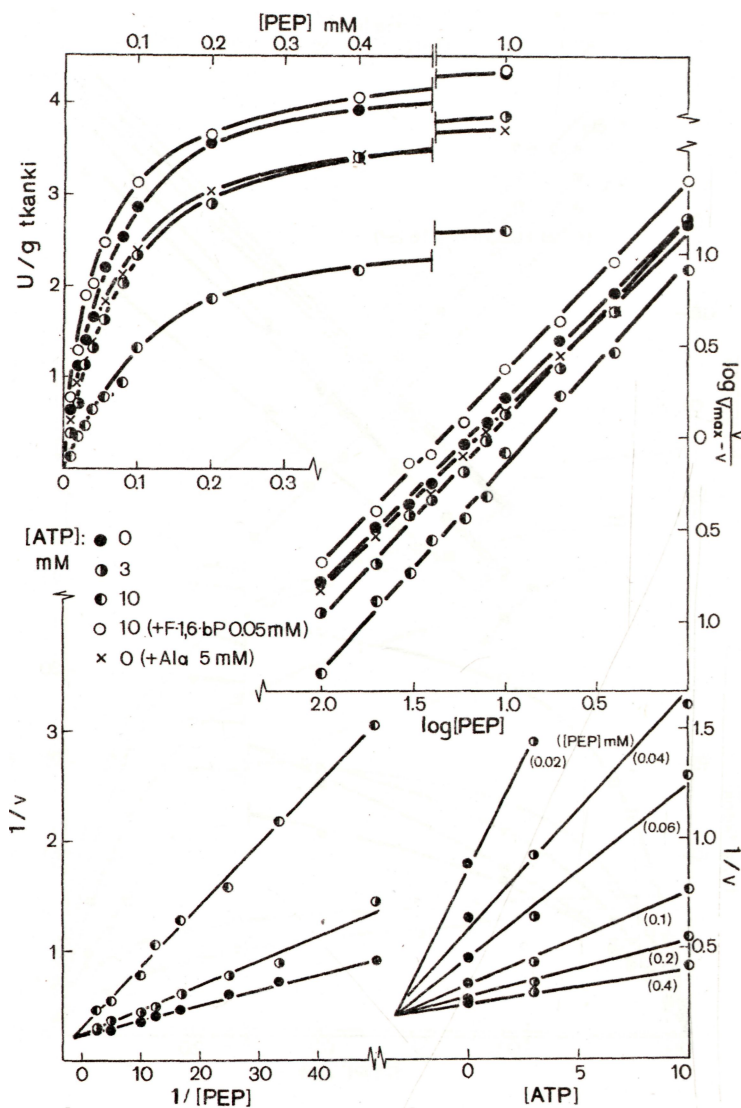
Rys. 62. Zależność aktywności kinazy pirogronianowej serca karaczana *P.americana* od stężenia substratu fosfoenolopirogronianu w różnych stężeniach ADP. Pomiar prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 6,9 zawierającym 0,2; 2,0 lub 5,0 mM ADP. Określano wpływ 0,05 mM F-1,6-bP na badaną zależność. W górnej części rysunku przedstawiono zależność w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tabelicy 33.

3) fruktozo-1,6-bisfosforanu (Rys. 62, 63; Tablica 33). F-1,6-bP jest aktywatorem PK. W jego obecności powinowactwo enzymu do PEP wzrasta mniej więcej dwukrotnie.



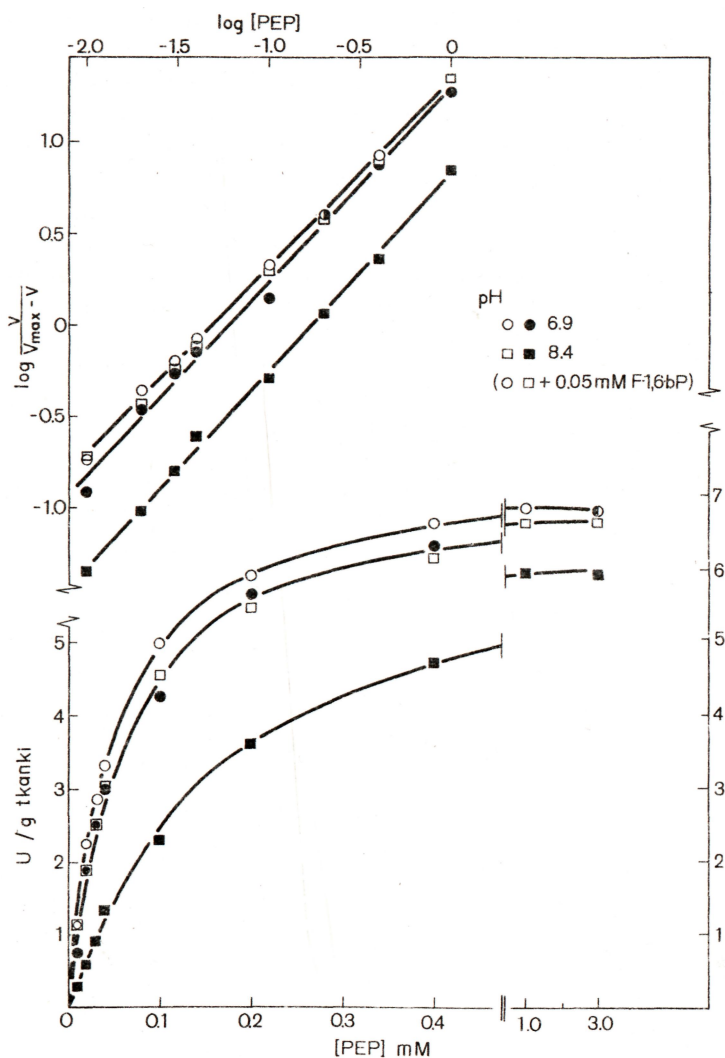
Rys. 63. Zależność aktywności kinazy pirogronianowej serca karaczana *P.americana* od stężenia substratu fosfoenolopirogronianu w różnych pH. Pomiaru prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 6,2; 7,1 lub 7,8 zawierającym 2 mM ADP. Określano wpływ F-1,6-bP na badaną zależność. W górnej części rysunku przedstawiono zależność w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tabelicy 33.

4) ATP (Rys. 64; Tablica 33). ATP kompetycyjnie hamuje aktywność PK serca. Wzrastające stężenia ATP powodują obniżenie powinowactwa enzymu do PEP. Obecność F-1,6-bP całkowicie chroni enzym przed działaniem ATP.



Rys. 64. Wpływ ATP i alaniny na zależność aktywności kinazy pirogronianowej serca karaczana *P.americana* od stężenia fosfoenolopirogronianu. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 6,9 zawierającym 0,2 mM ADP oraz ATP w stężeniach 0, 3 lub 10 mM lub też alaninę 5 mM. W dolnej części rysunku przedstawiono wpływ ATP na zależność wyrażoną w formie wykresów Linneaweavera-Burka (po lewej) i Dixona (po prawej). Parametry kinetyczne zestawiono w Tabelicy 33.

5) i alaniny (Rys. 64; Tablica 33). Alanina w bardzo niewielkim stopniu hamuje aktywność PK serca, a wpływ 5 mM stężenia alaniny na powinowactwo PK do PEP można uznać za nieistotny.



Rys. 65. Zależność aktywności kinazy pirogronianowej serca karaczana *G.coquereliana* od stężenia substratu fosfoenolpirogonianu w różnych pH. Pomiary prowadzono w standardowym płynie inkubacyjnym o pH 6,9 lub 8,4 zawierającym 2 mM ADP. Określano wpływ F-1,6-bP na badaną zależność. W górnej części rysunku przedstawiono zależność w formie wykresu Hilla. Parametry kinetyczne zestawiono w Tabelicy 33.

9.1.4. Rola kinazy pirogronianowej w metabolizmie serca owadów

Chociaż serce owadów zbudowane jest z tkanki mięśniowej (Gerould, 1938; Miller, 1975), kinaza pirogronianowa różni się właściwościami kinetycznymi od enzymów z mięśni skrzydłowych i mięśni powłok ciała owadów. Choć wszystkie formy molekulu-

larne PK z różnych mięśni owadów cechuje hiperboliczna kinetyka z PEP jako substratem, to powinowactwo do PEP wzrasta w obecności F-1,6-bP tylko w przypadku PK serca owadów, w przeciwieństwie do PK mięśni skrzydłowych i powłok ciała, których powinowactwo do PEP nie jest modyfikowane przez F-1,6-bP. PK serca jest znacznie silniej hamowana przez ATP, a F-1,6-bP przeciwdziała tej inhibicji. Powyższe fakty sugerują, iż reakcja katalizowana przez PK może być w mięśniu sercowym owadów dodatkowym miejscem regulacji aktywności glikolizy. Nie badano dotąd własności PFK, można jedynie przypuszczać, że enzym ten, analogicznie do innych tkanek, jest miejscem pierwszoplanowym w regulacji glikolizy. Ale ustalenie mechanizmów współdziałania, względnie współregulacji aktywności PFK i PK, a także wyjaśnienie ich roli w metabolizmie mięśnia sercowego owadów wymaga dalszych badań.

10. JELITO ŚRODKOWE OWADÓW

Jelito środkowe owadów to część przewodu pokarmowego owadów odpowiedzialna za procesy trawienia i wchłaniania pokarmu (Wigglesworth, 1972; Romoser, 1981). Jelito środkowe tworzy pojedynczą warstwę komórek nabłonkowych, wśród których wyróżnia się przede wszystkim podstawowe komórki nabłonkowe (Chapman, 1985a), wydzielające enzymy trawienne do światła jelita (Chapman, 1985b) i wchłaniające produkty trawienia (Turunen, 1985). Obok komórek podstawowych w nabłonku jelita środkowego występują pojedynczo lub grupami komórki regeneracyjne oraz komórki w kształcie pucharu (Chapman, 1985a). Warstwę nabłonka otaczają mięśnie: warstwy podłużne, wewnętrzna i zewnętrzna, rozdzielone warstwą mięśni okrężnych, wszystkie zatopione w tkance łącznej (Chapman, 1985a).

Zbadano własności fosfofruktokinazy z jelita środkowego, jak również z jelita tylnego konika polnego *Poekilocerus bufonius* (Khoja i wsp. 1990; Khoja, 1991). PFK z obu odcinków jelita tworzą pojedyncze pasma elektroforetyczne w żelu octanu celulozy o jednakowej ruchliwości, nieco bardziej anodowej niż PFK mięśnia odnóży kroczonego (Khoja i wsp. 1990). Własnościami enzymy jelita środkowego i tylnego *P. bufonius* przypominają PFK z innych tkanek owadów. W pH 7,0 wykazują silnie sigmoidalną kinetykę z F6P jako substratem ($S_{0,5}$ wynoszą 0,7 mM dla PFK jelita środkowego oraz 1,3 mM dla jelita tylnego; Khoja, 1991). Aktywność enzymów silnie hamowana jest przez ATP w stężeniach wyższych od 0,5 mM. Aktywatorami są AMP, ADP, cAMP, a przede wszystkim F-2,6-bP, który już w 1 mM stężeniu przekształca sigmoidalną krzywą kinetyki z F6P w hiperboliczną ($S_{0,5} = 0,2$ mM) i chroni PFK przed hamującym działaniem ATP (Khoja i wsp. 1990; Khoja, 1991). Podobnie jak w przypadku PFK mięśni konika polnego *P. bufonius*, aktywność PFK jelit hamowana jest przez fosfoargininę i fosfoenolpirogrońian (Khoja, 1991). Na PFK jelita środkowego nie wpływają jony amonowe, glukozy-1,6-bisfosforan i cytrynian (Khoja i wsp. 1990).

Powyższe wyniki wskazują na regulacyjne własności fosfofruktokinazy jelita środkowego i tylnego *P. bufonius*, toteż enzym ten może spełniać funkcje kluczowe w regulacji glikolizy w jelicie. Zakładano (Khoja i wsp. 1990), że intensywne procesy wydzielania i wchłaniania, zachodzące w komórkach nabłonka jelita wymagają dużego nakładu energetycznego i stąd istotny jest mechanizm aktywacji glikolizy. Zwraca jednak uwagę fakt, iż PFK izolowano z całego jelita, więc nie tylko z komórek nabłonka, lecz także z otaczającej jelito warstwy mięśni. Choć charakterystyki kinetyczne PFK z obu odcinków jelita konika polnego *P. bufonius* różnią się w pewnym stopniu, dotychczasowe wyniki nie pozwalają na stwierdzenie, czy w obu odcinkach jelita funkcjonują odmienne izoenzymy PFK. Badania elektroforetyczne sugerują identyczność strukturalną, a różnice kinetyczne mogą być wynikiem zmian w warunkach pomiarów aktywności PFK obu odcinków jelita. Wydaje się również, iż metabolizm nabłonka jelitowego owadów poznano dotąd w stopniu zbyt ograniczonym, by prowadzić dalszą dyskusję nad rolą PFK w tej tkance.

11. WNIOSKI I UWAGI KOŃCOWE

Fosfofruktokinaza i kinaza pirogronianowa pełnią kluczowe role w regulacji metabolizmu tkanek skorupiaków i owadów. Wydaje się, że reakcja katalizowana przez fosfofruktokinazę jest u tych zwierząt powszechnym miejscem regulacji. Ze wszystkich badanych dotąd tkanek skorupiaków i owadów izolowano fosfofruktokinazy, które wykazują własności charakterystyczne dla enzymów regulacyjnych. Są to:

1) kooperatywne oddziaływania z substratem, fruktozo-6-fosforanem, przejawiające się sigmoidalnym kształtem krzywej wysycenia enzymu tym substratem,

2) hamowanie aktywności pod wpływem wyższych od mniej więcej 1 mM stężeń drugiego substratu, ATP,

3) allosteryczna aktywacja pod wpływem AMP i fruktozo-2,6-bisfosforanu; w obecności aktywatorów wielokrotnie wzrasta powinowactwo PFK do substratu fruktozo-6-fosforanu (krzywa wysycenia przybiera kształt hiperboliczny), a jednocześnie znoszone jest hamowanie pod wpływem wyższych stężeń ATP; oba aktywatory AMP i F-2,6-bP współdziałają ze sobą w aktywacji enzymu, a ich wspólne działanie jest znacznie silniejsze niż proste sumowanie efektów indywidualnych,

4) aktywność PFK zależy od stosunku nukleotydów adenyłowych (wyrażanego np. równaniem „potencjału energetycznego”) w środowisku reakcji; przewaga ATP w stosunku do ADP i AMP obniża aktywność enzymu, zwłaszcza w niskich, fizjologicznych stężeniach F6P; pojawienie się AMP aktywuje enzym.

5) duża wrażliwość aktywności enzymu na zmiany pH; stężenie jonów wodorowych modyfikuje wyraźnie powinowactwo do substratów, aktywatorów i inhibitorów.

Na podkreślenie zasługuje szczególna rola fruktozo-2,6-bisfosforanu w regulacji aktywności fosfofruktokinaz z tkanek skorupiaków i owadów. Powinowactwo enzymu do aktywatora jest bardzo wysokie, wyrażane wartością stałej aktywacji przypada na nanomolarne stężenia aktywatora. Wydaje się, że w świetle tego celowe jest badanie poziomu fruktozo-2,6-bisfosforanu w poszczególnych tkankach w różnych stanach metabolicznych. Na podstawie tkankowych stężeń tego metabolitu można wyciągać wnioski o aktywności fosfofruktokinazy, a dalej o aktywności całej drogi glikolitycznej w tych stanach metabolicznych.

Charakterystyka fosfofruktokinaz z tkanek skorupiaków i owadów wskazuje na podobieństwa do ogólnej charakterystyki enzymu, opracowanej na podstawie badań nad enzymami izolowanymi z tkanek ssaków. Jedynymi istotniejszymi różnicami są stwierdzone dla PFK owadów: brak hamującego działania cytrynianu oraz hamujące działanie produktu reakcji fruktozo-1,6-bisfosforanu (aktywatora PFK ssaków). Wyniki prezentowane w tym opracowaniu wskazują także na podobieństwa do siebie charakterystyk PFK z różnych tkanek skorupiaków i owadów, zarówno podobieństwa w obrębie tkanek przedstawicieli jednego gatunku, jak i duże podobieństwa międzygatunkowe. Różnice

dotyczą wielkości poszczególnych parametrów kinetycznych, ale charakterystyka enzymów w swym podstawowym zarysie jest jednakowa. Wskazuje to z jednej strony na dużą konserwatywność enzymu w trakcie ewolucji, z drugiej na konieczność badań strukturalnych białka PFK, by odpowiedzieć na pytanie, czy w tkankach poszczególnych gatunków funkcjonują molekularnie różne izoenzymy PFK o zbliżonej charakterystyce kinetycznej, czy też zbliżona charakterystyka jest rezultatem braku strukturalnych różnic enzymów z różnych tkanek.

W przeciwieństwie do fosfofruktokinazy, własności kinazy pirogronianowej z niektórych tylko tkanek skorupiaków i owadów pozwalają zaklasyfikować ten enzym jako enzym regulacyjny, a katalizowaną przezeń reakcję uznać za miejsce regulacji metabolizmu. Własności regulacyjne wykazują kinazy pirogronianowe izolowane z tkanek potencjalnie glukoneogennych, takich jak gruczoł jelita środkowego i epiderma skorupiaków oraz ciało tłuszczowe owadów. Własności te to:

1) kooperatywna aktywacja enzymu przez substrat fosfoenolpirogronian, znajdująca swe odzwierciedlenie w sigmoidalnym kształcie krzywej wysycenia enzymu fosfoenolpirogronianem,

2) allosteryczna aktywacja enzymu przez fruktozo-1,6-bisfosforan, stabilizujący formy PK o wysokim powinowactwie do PEP,

3) allosteryczna inhibicja enzymu przez alaninę i ATP, obniżająca powinowactwo do PEP i stabilizująca formy o małym powinowactwie do tego substratu.

W przeciwieństwie do kinaz pirogronianowych z tkanek glukoneogennych, enzymy izolowane z tkanek, w których glukoneogeneza zapewne nie funkcjonuje, a więc przede wszystkim z mięśni skrzydłowych, kończyn i powłok ciała owadów, nie wykazują własności regulacyjnych. Wydaje się więc, że w tkankach tych, w których regulacja glikolizy sprowadza się do włączania wysoce aktywnego toru, bądź do jego wyłączenia, najistotniejszym miejscem regulacji jest reakcja katalizowana przez fosfofruktokinazę. Tkanki glukoneogenne, w których glikoliza jest nie tylko włączana i wyłączana, lecz również zastępowana biegnącymi w odwrotnym kierunku reakcjami glukoneogennymi, aktywność toru jest regulowana dodatkowo w miejscu katalizowanym przez kinazę pirogronianową. Mięsień odwłokowy skorupiaków, tkanka w zasadzie wybitnie glikolityczna, posiada kinazę pirogronianową ujawniającą własności regulacyjne przy braku fruktozo-1,6-bisfosforanu. Wysokie cytoplazmatyczne stężenia tego metabolitu sprawiają, iż mało prawdopodobne wydaje się wykorzystywanie tych własności PK mięśni skorupiaków w regulacji metabolizmu węglowodanowego *in vivo*. Jednak sugerowane niekiedy zdolności glukoneogenne mięśni skorupiaków mogłyby znaleźć dodatkowe poparcie w tych, przynajmniej potencjalnie, regulacyjnych własnościach PK.

W przypadku kinazy pirogronianowej z tkanek skorupiaków i owadów, zróżnicowane własności kinetyczne są odzwierciedleniem zróżnicowania molekularnego tych enzymów. Przedstawione w pracy wyniki badań elektroforetycznych i chromatograficznych wskazują na obecność w tkankach stawonogów różnych form molekularnych kinazy pirogronianowej. Uzyskane dotychczas dane wskazują na dwa typy tych form: typ „mięśniowy”, występujący w różnego rodzaju mięśniach oraz typ „glukoneogenny”, występujący w takich tkankach jak gruczoł jelita środkowego i epiderma skorupiaków oraz ciało tłuszczowe owadów. Wciąż brak jednak wyników, które pozwoliłyby rozstrzygnąć czy na przykład w gruczole jelita środkowego i epidermie skorupiaków funk-

cjonuje ta sama forma molekularna PK o nieco różnych własnościach kinetycznych czy też tzw. „glukoneogenenny” typ PK jest zróżnicowany przynajmniej na formę z gruczołu jelita środkowego i formę z epidermy.

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań nad fosfofruktokinazami i kinazami pirogronianowymi izolowanymi z tkanek raka *Orconectes limosus* oraz larw owadów chrząszcza *Tenebrio molitor*, motyla *Celerio euphorbiae* i karaczana *Periplaneta americana*. W badaniach tych scharakteryzowano podstawowe własności kinetyczne enzymów, wobec ich substratów wyznaczono parametry kinetyczne reakcji w różnych warunkach pomiarów, określono i scharakteryzowano podstawowe aktywatory i inhibitory oraz ich wpływ na własności enzymów. Wyniki te zestawiono i porównano z badaniami innych badaczy. Na tej podstawie spróbowano wyjaśnić rolę fosfofruktokinazy i kinazy pirogronianowej w regulacji metabolizmu węglowodanowego w tkankach skorupiaków i owadów. Wydaje się jednak, że badania nad PFK i PK w tkankach tych zwierząt muszą być kontynuowane. Biorąc pod uwagę liczebność gatunków tych gromad stawonogów (zwłaszcza owadów), a także ich znaczne zróżnicowanie w obrębie gromad, trzeba zauważyć, że dotychczas scharakteryzowano enzymy pochodzące z nielicznych gatunków. Co więcej, nawet u tych nielicznych gatunków zbadano i scharakteryzowano enzymy z tylko niektórych tkanek. To nasuwa wątpliwości, czy charakterystyki enzymów i budowane w ich oparciu hipotezy odnośnie regulacji metabolizmu węglowodanowego mogą być uogólniane i przenoszone na innych przedstawicieli nawet bliżej spokrewnionych, a cóż dopiero na tych bardziej odległych filogenetycznie. Tu rysują się kierunki dalszych badań nad PFK i PK skorupiaków i owadów. Z jednej strony winny one pogłębiać poznanie już scharakteryzowanych enzymów, ale z drugiej strony powinny być poszerzone o badania nad enzymami innych tkanek (a wymaga to często pokonania barier technicznych możliwości ich izolowania). Wreszcie badania porównawcze muszą być prowadzone na kolejnych przedstawicielach obu gromad stawonogów, zwłaszcza tych żyjących w innych środowiskach, o skrajnie różnych warunkach życia.

12. MATERIAŁY I METODY

12.1. ZWIERZĘTA

Samce raków *Orconectes limosus* Raf., łowione w okolicach Poznania, przechowywano w zbiornikach o stałym przepływie wody wodociągowej o temp. $10 \pm 2^\circ\text{C}$. Do eksperymentów wybierano osobniki zdrowe, o nieuszkodzonym pancerzu i wszystkich odnóżach. Długość carapaxu *O. limosus* wahała się w granicach 37 - 45 mm. Raki wyselekcjonowane do badań umieszczano w niewielkim zagęszczeniu w oddzielnych zbiornikach o stałym poziomie przewietrzanej wody o temp. $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Karmiono je regularnie 2 - 3 razy w tygodniu mięsem wołowym, rybami, ziemniakami i marchwią, sporadycznie dżdżownicami i larwami owadów. Przez dwa dni przed eksperymentem rakom nie podawano pokarmu. Stadia cyklu linieniowego ustalano na podstawie kryteriów Dracha (1939), z modyfikacjami dla *O. limosus* (Lang, 1971; Willig i Keller, 1973).

Larwy mącznika młynarka *Tenebrio molitor* L. hodowano w komorach o temp. $27 \pm 1^\circ$ i wilgotności $75 \pm 5\%$. Larwy karmiono płatkami zbożowymi, uzupełniając dietę drożdżami i świeżą marchwią. Do badań wybierano larwy o ciężarze 120 - 140 mg.

Karaczany *Periplaneta americana* L. i *Gromphadorrhina coquereliana* hodowano w pojemnikach, przechowywanych w komorach o temp. $27 \pm 1^\circ\text{C}$ i wilgotności $60 \pm 5\%$. Owadom dostarczano bez ograniczeń zróżnicowany pokarm i wodę. Do badań wybierano ostatnie stadium larwalne (nimfy).

Gąsienice zmrocznika wilczomlecza *Celerio euphorbiae* L. łowiono w okolicach Poznania i przetrzymywano w warunkach pokojowych przez kilka dni przed eksperymentem. Karmiono je wilczomleczem, zbieranym z tych samych stanowisk co owady.

12.2. PRZYGOTOWANIE EKSTRAKTÓW TKANKOWYCH

Z raków wypreparowywano gruczoły jelita środkowego, serca oraz fragmenty mięśnia odwłokowego. Tkanki płukano w płynie izolacyjnym zawierającym bufor potasowo-fosforanowy, 40 mM, pH 7,4; 2-merkaptetanol, 2 mM; EDTA, 1 mM. Osuszano na bibule, ważono i sporządzano 20% homogenat we wspomnianym płynie izolacyjnym (w przypadku badań nad PFK gruczołu jelita środkowego płyn uzupełniano inhibitorem tripsyny z soi, 0,1 mg/ml) stosując homogenizator szklany z tłoczkiem teflonowym. Homogenaty odwirowywano, w początkowych badaniach w wirówce Janetzki K-70 (przyspieszenie 16 000 g/30 min), w następnych w ultrawirówce Beckman L2-65B (rotor 65, przyspieszenie 105 000 g/60 min). Osad odrzucano, a supernatanty służyły jako preparaty enzymatyczne. Preparaty uzyskane po wirowaniu w ultrawirówce cechowały się wyższą aktywnością specyficzną badanych enzymów (ze względu na niższą zawartość białka), natomiast aktywność enzymów przeliczana na 1 g wypreparowanej tkanki nie

różniła się od aktywności w preparatach otrzymanych po wirowaniu w wirówce K-70. Nie stwierdzono też żadnych różnic własności kinetycznych pomiędzy enzymami w preparatach uzyskanych w obu procedurach wirowania.

Larwy mącznika i gąsienice zmrocznika poddawano przed preparacją krótkiej narkozie poprzez zanurzenie pod wodą. Następnie larwom mącznika odcinano głowy i tylne segmenty ciała, usuwano przewód pokarmowy i delikatnie wyciskano ciało tłuszczowe, które starannie oczyszczano z cewek Malpighiego. Z kolei przecinano larwy wzdłuż, dokładnie wypłukiwano resztki ciała tłuszczowego, a następnie skalpelem zeskrobywano fragmenty mięśni powłok ciała. Uśpione gąsienice zmrocznika przecinano wzdłuż i delikatnie wypreparowywano fragmenty ciała tłuszczowego. Wyizolowane tkanki obu owadów płukano w płynie izolacyjnym zawierającym: sacharozę, 60 mM; mannitol, 240 mM; EGTA, 0,2 mM; bufor Tris-HCl, 10 mM, pH 7,4 (Medium 4, wg Storey i Bailey, 1978a). Tkanki zbierano następnie na gazie młynarskiej, ważono i ponownie zawieszano w płynie izolacyjnym dodanym w takiej ilości, by uzyskać 20% stężenie tkanki. Homogenaty, otrzymane po rozraniu tkanek w homogenizatorze teflonowo-szklanym, odwirowywano w ultrawirówce Beckmana z przyspieszeniem 105 000 g/60 min. Osad odrzucano, a supernatanty używano jako preparaty enzymatyczne. PK w preparatach z ciała tłuszczowego *T.molitor* izolowanego początkowo w 250 mM sacharozie z dodatkiem 1 mM EDTA i 1 mM 2-merkaptetanolu (Lesicki i Jüngst, 1984) nie różniła się własnościami od PK w preparatach przygotowanych według standardowej procedury.

Nimfy karaczanów *P.americana* i *G.coquereliana* przed preparacją umieszczano w pokoju-chłodni o temp. ok. 4°C. Odrętwiałym owadom odcinano odwłoki, przecinano je wzdłuż bocznych krawędzi i usuwano trzewia. Pod lupą binokularną wycinano narzędziami mikrochirurgicznymi kapilarne serca, znajdujące się po grzbietowej stronie odwłoka. Serca osuszano na bibule, ważono i umieszczano w płynie izolacyjnym Medium 4 (jak wyżej, wg Storey i Bailey, 1978a) zachowując stałą proporcję 20 µg tkanki/µl płynu. Tkanki rozcierano w mikroprobówkach wirówkowych przy pomocy dopasowanego tłoczka teflonowego. Wirowano przez 30 min w mikrowirówce laboratoryjnej, typ 320 (Mechanika Precyzyjna, Warszawa) z przyspieszeniem 14 000 g i supernatanty używano do badań nad aktywnością enzymatyczną.

W trakcie wszystkich powyższych etapów przygotowań wszelkich preparatów tkankowych (izolacja, homogenizowanie, wirowanie) utrzymywano temperaturę 0°C.

12.3. POMIAR AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ

Aktywność fosfofruktokinazy i kinazy pirogronianowej mierzono przy pomocy spektrofotometrów Specord UV-VIS i Specord M-40. Pomiary prowadzono przy długości fali 340 nm i w temperaturze 25°C. Stosowano kuwety kwarcowe o długości drogi świetlnej 1 cm. Zasada pomiaru aktywności obu enzymów opierała się na określaniu szybkości spadku ekstynkcji w trakcie prowadzonej w kuvecie reakcji, w czasie której utlenianiu ulegał NADH. Na podstawie współczynnika ekstynkcji NADH oraz stechiometrycznych zależności w prowadzonej reakcji obliczano aktywność enzymu, wyrażaną jako liczbę mikromoli substratu zużywanego w ciągu 1 min.

Aktywność PFK mierzono metodą Linga i wsp. (1966) w płynie inkubacyjnym zawierającym w 1 ml: bufor HEPES-NaOH 50 mM; KCl, 25 mM; MgSO₄ 4 mM; (NH₄)₂SO₄, 10 mM; ditiotreitol, 1 mM; NADH, 0,18 mM; nadmiar aldolazy, izomerazy triozofosforanowej i dehydrogenazy α-glicerofosforanowej. Stężenia substratów (F6P, ATP), efektorów (ADP, AMP, F-2,6-bP) oraz pH podano w odpowiednich opisach tablic i rysunków.

Aktywność PK mierzono metodą Büchera i Pfeleiderera (1955) w płynie izolacyjnym zawierającym w 1 ml: bufor imidazol-HCl, 50 mM; KCl, 74 mM; KCN, 1 mM; MgSO₄, 8 mM; NADH, 0,18 mM oraz nadmiar dehydrogenazy mleczanowej. Również w tym przypadku stężenia substratów (PEP, ADP), efektorów (ATP, F-1,6-bP, alanina) oraz pH podano w legendach wykresów i tablic.

Białko oznaczano metodami Lowry'ego i wsp. (1951) oraz Bradforda (1976).

12.4. BADANIA ELEKTROFORETYCZNE

Ekstrakty tkankowe rozdzielano elektroforetycznie w 15% żelu skrobiowym w buforze elektroforetycznym o następującym składzie: Tris-HCl pH 8,4, 75 mM; sacharoza, 250 mM; MgSO₄, 2,5 mM; ditiotreitol, 0,5 mM. Elektroforezę prowadzono przez 24 godziny w temperaturze 4°C przy różnicy potencjałów 300 V. Po elektroforezie żel cięto na 3 mm odcinki, które homogenizowano w standardowym płynie izolacyjnym, Homogenaty odwirowywano, a uzyskane supernatanty poszczególnych frakcji testowano spektrofotometrycznie na obecność kinazy pirogronianowej w płynie inkubacyjnym zawierającym bufor Tris-HCl, 50 mM, pH 7,4; KCl, 74 mM; MgSO₄, 8 mM; ADP, 2 mM; PEP, 1,5 mM; NADH, 0,2 mM; nadmiar dehydrogenazy mleczanowej.

12.5. POZIOM METABOLITÓW

Osobnikom raków *O. limosus* wyselekcjonowanym do badań nad poziomem metabolitów glikolitycznych w gruczole jelita środkowego i mięśni odwłokowym odcinano odwłoki, które wrzucano do zlewki z ciekłym azotem. Do odrębnej zlewki z ciekłym azotem preparowano z głowotułowia tkankę gruczołu jelita środkowego. Preparacja obu tkanek do ciekłego azotu trwała nie dłużej niż 5 sekund. Zamrożone odwłoki kruszono młotkiem i wśród rozbitych fragmentów wybierano kawałki zawierające sam mięsień odwłokowy, które ponownie wrzucano do zlewki z ciekłym azotem. Zamrożone tkanki gruczołu jelita środkowego i mięśnia odwłokowego miażdżono w schłodzonym ciekłym azocie, proszek szybko ważono i homogenizowano w 6% kwasie nadchlorowym o temp. 0°C, dodawanym w ilości utrzymującej proporcję wagi tkanki do objętości kwasu wynoszącą 2 : 3. Wytracone białko odwirowywano, a supernatant neutralizowano 5 M K₂CO₃. Stężenia poszczególnych metabolitów w uzyskanym ekstrakcie określano spektrofotometrycznie, prowadząc reakcje sprzężone z redukcją NADP bądź utlenianiem NADH. Ilość zużytego koenzymu pozwalała obliczać stężenia metabolitów w ekstrakcie. Pomiar zawartości glukozy-6-fosforanu i fruktozy-6-fosforanu prowadzono w reakcjach katalizowanych przez dehydrogenazę i izomerazę glukozy-6-fosforanu (Hohorst, 1970), zawartość fruktozy-1,6-bisfosforanu mierzono w ciągu reakcji katalizowanych przez dehydrogenazę α-glicerofosforanową, izomerazę triozofosforanową i al-

dolazę (Bücher i Hohorst, 1970), natomiast stężenia fosfoenolpirogonianu ustalano w reakcjach katalizowanych kolejno przez dehydrogenazę mleczanową i kinazę pirogrogonianową (Czok i Lamprecht, 1970). Stężenia nukleotydów adenyłowych (ATP, ADP, AMP) określano przy pomocy reakcji katalizowanych przez dehydrogenazę glukozy-6-fosforanu oraz odpowiednio heksokinazę lub kinazę pirogrogonianową lub kinazę adenyłową (Jaworek i wsp. 1974; Lamprecht i Trautschold, 1974).

Dla określenia poziomu fruktozo-2,6-bisfosforanu skruszone i zważone fragmenty zamrożonych tkanek raka homogenizowano w dwóch objętościach 0,05 N NaOH. Homogenat odwirowywano i uzyskany supernatant doprowadzano 0,1 M buforem Hepes do pH 8,0. Otrzymany ekstrakt badano na zawartość F-2,6-bP metodą opartą na pomiarze aktywacji ziemniaczanej fosfotransferazy fruktozo-6-fosforanu współdziałającej z pirofosforanem (Van Schaftingen i wsp. 1982b).

BIBLIOGRAFIA

- Akkerman J.W.N., Gorter G., Over J., Sixma J.J., Staal G.E.J., 1975; Human platelet 6-phosphofructokinase. Relation between inhibition by Mg-ATP and co-operativity towards fructose-6-phosphate and investigations on the formation of a ternary complex; *Biochim.Biophys.Acta* 397: 395-404.
- Agosin M., Scammelli N., Neghme A., 1961; Intermediary carbohydrate metabolism of *Triatoma infestans* (*Insecta, Hemiptera*). 1. Glycolytic and penthose phosphate pathway enzymes and the effect of DDT. *Comp.Biochem.Physiol.* 2: 143-159.
- Asahina E., 1969; Frost resistance in insects. *Adv.Insect Physiol.* 6: 26-34.
- Asahina E., Tanno K., 1964; A large amount of trehalose in a frost resistant insect. *Nature (London)* 204: 1222.
- Assaf S.A., Graves D.J., 1969; Structural and catalytical properties of lobster muscle glycogen Phosphorylase. *J.biol.Chem.* 244: 5544-5555.
- Atkinson D.E., Walton G.M., 1967; Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. Rat liver cleavage enzyme. *J.biol.Chem.* 242: 3239-3241.
- Bailey E., 1975; Biochemistry of insect flight. Fuel supply. W: *Insect Biochemistry and Function* (red. Candy D.J., Kilby B.A.), pp.89-176, Chapman and Hall, London.
- Bailey E., Stirpe F., Taylor C.B., 1968; Regulation of rat liver pyruvate kinase. *Biochem.J.* 108: 427-436.
- Bailey E., Walker P.R., 1969; A comparison of the properties of the pyruvate kinases of the fat body and flight muscle of the adult male desert locust. *Biochem.J.* 111: 359-364.
- Baranowska B., Baranowski T., 1975; Pyruvate kinase from human skeletal muscle. *Molec.Cell.Biochemistry* 6: 197-201.
- Baranowska B., Baranowski T., 1977; Conformers of pyruvate kinase from human skeletal muscle. *Bull.Acad.Pol.Sci.* 25: 495-497.
- Barker P.L., Gibson R., 1977; Observations on the feeding mechanism, structure of the gut and digestive physiology of the European lobster *Homarus gammarus* L. (*Decapoda, Nephropidae*). *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.* 26: 297-394.
- Bauchau A.G., Mengeot J.C., 1978; Structure et fonction des hemocytes chez les crustaces. *Arch.Zool.exp.gén.* 119: 227-248.
- Beenackers A.M.Th., Van der Horst D.J., Van Marrewijk W.J.A., 1984; Insect flight muscle metabolism. *Insect Biochem.* 14: 243-260.
- Beenackers A.M.Th., Van der Horst D.J., Van Marrewijk W.J.A., 1985; Biochemical processes directed to flight muscle metabolism. W: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (red. Kerkut G.A., Gilbert L.I.), vol.10, pp.451-485, Pergamon Press, Oxford & New York.
- Behrlich H.W., 1972; Regulation by phosphoenolpyruvate of fructose-1,6-diphosphatase in skeletal muscle: evidence for an allosteric activator of the enzyme. *Can.J.Biochem.* 50: 710-713.
- Behrlich H.W., 1975; On the subunit structure of seasonal isoenzymes of fructose-1,6-diphosphatase from muscle of the Alaskan king crab *Paralithodes camtschatica*. *Comp.Biochem. Physiol.* 51B: 317-321.
- Beis I., Newsholme E.A., 1975; The contents of adenine nucleotides, Phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem.J.* 152: 23-32.
- Benzonana G., 1976; Affinity chromatography of glycogen Phosphorylase from crayfish tail muscle and properties of the pure enzyme. *Experientia* 34: 765.
- Berglund L., 1978; Phosphorylation of rat kidney pyruvate kinase type L by cyclic 3'5'-AMP-dependent kinase. *Biochim.Biophys. Acta* 524: 68-77.
- Berglund L., Ljungström O., Engström L., 1977; Studies on the cyclic 3'5'-AMP-stimulated pig liver protein kinase reaction with pyruvate kinase as substrate. *J.biol.Chem.* 252: 613-619.
- Bigley R.H., Stenzel P., Jones R.T., Campos J.O., Koler R.D., 1968; Tissue distribution of human pyruvate kinase isoenzymes. *Enzymol.Biol.Clin.* 9: 10-20
- Bock P.E., Frieden C., 1976; Phosphofructokinase II. Role of ligands in pH-dependent structural changes of the rabbit muscle enzyme. *J.biol.Chem.* 251: 5637-5643.

- Dall W., 1967; The functional anatomy of the digestive tract of a shrimp *Metapenaeus bennettiae* Racek&Dall (*Crustacea, Decapoda, Penaeidae*). *Aust.J.Zool.* 15: 699-714.
- Dall W., Moriarty D.J.W., 1983; Functional aspects of nutrition and digestion. W: *The Biology of Crustacea Vol.5: Internal Anatomy and Physiological Regulation* (red. Mantel L.H.), pp.215-261, Academic Press, New York & London.
- Dean R.L., Collins J.V., Locke M., 1985; Structure of the fat body. W: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (red. Kerkut G.A., Gilbert L.I.), vol.3, pp. 155-210, Pergamon Press, Oxford & New York.
- De Faria J.B., Crivellaro O., Bacilla M., 1976; Multiple forms of phosphofructokinase in animals from the phylum *Chordata*. *Comp.Biochem.Physiol.* 55B: 323-329.
- De Faria J.B., El-Dorry J.A., Bacilla M., 1978; Multiple forms of phosphofructokinase in developing rabbit and guinea pig tissues. *Developmental Biol.* 65: 547-552.
- Dehn P.F., Haya K., Aiken D.E., 1985; Adenylate energy charge, arginine phosphate and ATPase activity in juvenile *Homarus americanus* during the molt cycle. *Comp.Biochem.Physiol.* 81B: 629-633.
- Dendinger J.E., Schatzlein F.C., 1973; Carbohydrate metabolism in the striped shore crab *Pachygrapsus crasipes*: II. Glycolytic rates of muscle, gill and hepatopancreas. *Comp.Biochem.Physiol.* 46B: 699-708.
- Dennell R., 1960; Integument and exoskeleton. W: *The Physiology of Crustacea Vol.1: Metabolism and Growth* (red. Waterman T.H.), pp.449-472, Academic Press, New York & London.
- De Villez E.J., Buschlen K., 1967; Survey of a tryptic digestive enzyme in various species of Crustacea. *Comp.Biochem.Physiol.* 21: 541-546.
- De Zwaan A., Ebberink R.H.M., 1978; Apparent inhibition of pyruvate kinase by arginine phosphate, a problem of kinetic studies on partially purified extracts. *FEBS Lett.* 89: 301-303.
- Dickson G.W., 1980; Seasonal variation of phosphoadenylate concentrations and adenylate energy charge in freshwater crayfish (*Decapoda, Astacidae*). *Am.Zool.* 20: 799.
- Dickson G.W., Giesy J.P., 1981; Variation of phosphoadenylates and adenylate energy charge in crayfish (*Decapoda, Astacidae*) tail muscle due to habitat differences. *Comp.Biochem.Physiol.* 70A: 421-425.
- Dickson G.W., Giesy J.P., 1982a; Seasonal variation of phosphoadenylate concentrations and adenylate energy charge in dorsal tail muscle of the crayfish *Procambarus acutus acutus* (*Decapoda, Astacidae*). *Comp.Biochem.Physiol.* 72A: 295-299.
- Dickson G.W., Giesy J.P., 1982b; The effects of starvation on muscle phosphoadenylate concentrations and adenylate energy charge of surface and cave crayfish. *Comp.Biochem.Physiol.* 71A: 357-361.
- Downer R.G.H., Parker G.H., 1979; Glycogen utilization during flight in the American cockroach *Periplaneta americana* L. *Comp.Biochem. Physiol.* 64A: 29-32.
- Drach P., 1939; Mue et cycle d'intermue chez les crustacés décapodes. *Ann.Inst.Océanog.(Paris)* 19: 103-391.
- Dunaway G.A., 1983; A review of animal phosphofructokinase isozymes with an emphasis on their physiological role. *Mol.Cell. Biochem.* 52: 75-91.
- Dunaway G.A., Kasten T.P., 1985; Nature of the rat brain 6-phosphofructo-1-kinase isozymes. *J.biol.Chem.* 260: 4180-4185.
- Dunaway G.A., Kasten T.P., 1986; Are the rat tissue/organ proportions of 6-phosphofructo-1-kinase subunits strain specific? *Biochem.J.* 237: 157-161.
- Dunaway G.A., Kasten T.P., 1987; Nature of the subunits of the 6-phosphofructo-1-kinase isoenzymes from rat tissues. *Biochem.J.* 242: 667-671.
- Dunaway G.A., Kasten T.P., Sebo T., Trapp R., 1988; Analysis of the phosphofructokinase subunits and isoenzymes in human tissues. *Biochem.J.* 251: 677-683.
- Dunavay G.A., Morris H.P., Weber G., 1974; A comparative study of rat liver, muscle and hepatoma 3924A phosphofructokinase isozymes. *Cancer Res.* 34: 2209-2216.
- Dunaway G.A., Weber G., 1974; Rat liver phosphofructokinase isozymes. *Archs Biochem. Biophys.* 162: 620-628.
- Elliot J., Hill L., Bailey E., 1984; Changes in tissues carbohydrate content during flight of the fed and starved cockroach *Periplaneta americana* L. *Comp.Biochem.Physiol.* 78A: 163-165.
- El-Maghrabi M.R., Claus T.H., Pilkis S.J., 1981; Partial purification of a rat liver enzyme that catalyzes the formation of fructose 2,6-bisphosphate. *Biochem.biophys.Res.Comm.* 101: 1071-1077.
- El-Maghrabi M.R., Claus T.H., McGrane M.M., Pilkis S.J., 1982a; Influence of phosphorylation on the interaction of effectors with rat liver pyruvate kinase. *J.biol.Chem.* 257: 233-240.
- El-Maghrabi M.R., Claus T.H., Pilkis J., Fox E., Pilkis S.J., 1982b; Regulation of rat liver fructose-2,6-bisphosphatase. *J.biol.Chem.* 257: 7603-7607.

- El-Maghrabi M.R., Fox E., Pilkis J., Pilkis S.J., 1982c; Cyclic AMP-dependent phosphorylation of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase. *Biochem.biophys.Res.Comm.* 106: 794-802.
- El-Maghrabi M.R., Haston W.S., Flockhart D.A., Claus T.H., Pilkis S.J., 1980; Studies on the phosphorylation and dephosphorylation of L-type pyruvate kinase by the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase. *J.biol.Chem.* 255: 668-675.
- El-Maghrabi M.R., Pilkis S.J., 1984; Rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase: a review of relationships between the two activities of the enzyme. *J.Cell.Biochem.* 26: 1-17.
- Engström L., 1978; The regulation of liver pyruvate kinase by phosphorylation-dephosphorylation. *Curr.Top.Cell.Reg.* 13: 29-51.
- Etiemble J., Boivin P., 1976; Pyruvate kinase isoenzymes among human organs and blood cells. *Enzyme* 21: 296-303.
- Feliu J.E., Hue L., Hers H.G., 1977; Regulation *in vivo* and *in vitro* of adenosine 3'5'-monophosphate-dependent inactivation of rat liver pyruvate kinase type L. *Eur.J.Biochem.* 81: 609-617.
- Filburn C.R., Wyatt G.R., 1976; Adenylate and guanylate cyclases of cecropia silmoth fat body. *J.Insect Physiol.* 22: 1635-1640.
- Foe L.G., Kemp R.G., 1982; Properties of phospho and dephospho forms of muscle phosphofructokinase. *J.biol.Chem.* 257: 6368-6372.
- Foe L.G., Kemp R.G., 1985; Isolation and characterization of phosphofructokinase C from rabbit brain. *J.biol.Chem.* 260: 726-730.
- Foe L.G., Trujillo J.L., 1980; Quarternary structure of pig liver phosphofructokinase. *J.biol.Chem.* 255: 10537-10541.
- Ford W.C.L., Candy D.J., 1972; The regulation of glycolysis in perfused locust flight muscle. *Biochem.J.* 130: 1101-1112.
- Freed J.M., 1971; Temperature effects on muscle phosphofructokinase of the Alaskan king crab *Paralithodes camtschatica*. *Comp.Biochem.Physiol.* 39B: 765-774.
- Freed J.M., Kirk C.R., 1976; Phosphofructokinase activity of temperature-acclimated crayfish. *Comp.Biochem.Physiol.* 54B: 515-517.
- Friedman S., 1970; Metabolism of carbohydrates. W: *Chemical Zoology* (red. Florkin M., Scheer B.T.), vol.5, pp.167-197, Academic Press, New York.
- Friedman S., 1985; Carbohydrate metabolism. W: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (red. Kerkut G.A., Gilbert L.I.), vol.10, pp.43-76, Pergamon Press, Oxford, New York.
- Furuya E., Uyeda K., 1980a; Regulation of phosphofructokinase by a new mechanism: an activation factor binding to phosphorylated enzyme. *J.biol.Chem.* 255: 11656-11659.
- Furuya E., Uyeda K., 1980b; An activation factor of liver phosphofructokinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77: 5861-5864.
- Furuya E., Uyeda K., 1981; A novel enzyme catalyzes the synthesis of activation factor from ATP and D-fructose-6-P. *J.biol.Chem.* 256: 7109-7112.
- Furuya E., Yokoyama M., Uyeda K., 1982; An enzyme that catalyzes hydrolysis of fructose 2,6-bisphosphate. *Biochem.biophys.Res.Comm.* 105: 264-270.
- Gäde G., 1977; Effect of corpus cardiacum extract on cyclic AMP concentration in the fat body of *Periplaneta americana*. *Zool.Jb.Physiol.* 81: 245-249.
- Gäde G., 1979; Studies on the influence of synthetic adipokinetic hormone and some analogs on cyclic AMP levels in different arthropod systems. *Gen.Comp.Endocr.* 37: 122-130.
- Gäde G., 1983; Energy metabolism of arthropods and molluscs during environmental and functional anaerobiosis. *J.exp.Zool.* 228: 415-429.
- Gäde G., 1984; Effects of oxygen deprivation during anoxia and muscular work on the energy metabolism of the crayfish *Orconectes limosus*. *Comp.Biochem.Physiol.* 77A: 495-502.
- Gäde G., 1991; Glycogen Phosphorylase in the fat body of two cockroach species *Periplaneta americana* and *Nauphoeta cinerea*: Isolation, partial characterization of three forms and activation by hypertrehalosemic hormone. *Z.Naturforsch.* 46c: 149-162.
- Gäde G., Beenackers A.M.Th., 1977; Adipokinetic hormone-induced lipid mobilization and cyclic AMP accumulation in the fat body of *Locusta migratoria* during development. *Gen.comp.Endocr.* 32: 481-487.
- Gäde G., Holwerda D.A., 1976; Involvement of adenosine 3'5'-cyclic monophosphate in lipid mobilization in *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* 6: 535-540.
- Gäde G., Zebe E., 1973; Über den Anaerobiosestoffwechsel von Molluskenmuskeln. *J.comp.Physiol.* 85: 291-301.

- Gerould J.H., 1938; Structure and action of the heart of *Bombyx mori* and other insects. *Acta Zool.* 19: 297-352.
- Giesy J.P., Denzer S.R., Duke C.S., Dickson G.W., 1981; Phosphoadenylate concentration and energy charge in two freshwater crustaceans: responses to physical and chemical stressors. *Verh.Internat.Verein.Limnol.* 21: 205-220.
- Gibson R., Barker T.L., 1979; The decapod hepatopancreas. *Oceanogr.Mar.Biol.* 17: 285-346.
- Giles I.G., Poat P.C., 1980; A steady-state kinetic analysis of the fructose 1,6-bisphosphate-activated pyruvate kinase from *Carcinus maenas* hepatopancreas. *Biochem.J.* 185: 289-299.
- Giles I.G., Poat P.C., Munday K.A., 1975; Regulation of pyruvate kinase from the hepatopancreas of the crab *Carcinus maenas*. *Biochem.Soc.Trans.* 3: 400-402.
- Giles I.G., Poat P.C., Munday K.A., 1976a; Purification and properties of pyruvate kinase from the hepatopancreas of *Carcinus maenas*. *Biochem.J.* 153: 127-134.
- Giles I.G., Poat P.C., Munday K.A., 1976b; The regulation of pyruvate kinase in the hepatopancreas of *Carcinus maenas*. *Comp.Biochem. Physiol.* 55B: 423-427.
- Giles I.G., Poat P.C., Munday K.A., 1976c; Abortive enzyme-substrate ternary complexes formed by the fructose 1,6-diphosphate-activated pyruvate kinase from the hepatopancreas of *Carcinus maenas*. *Biochem. Soc.Trans.* 4: 481-484.
- Giles I.G., Poat P.C., Munday K.A., 1977; An investigation of the interactions of the allosteric modifiers of pyruvate kinase with the enzyme from *Carcinus maenas* hepatopancreas. *Biochem.J.* 165: 97-105.
- Gonzales F., Tsai M.Y., Kemp R.G., 1975; Distribution of phosphofructokinase isozymes in rabbit, mouse, Guinea pig and rat. *Comp.Biochem. Physiol.* 52B: 315-319.
- Goudey L.R., Lang F., 1974; Growth of crustacean muscle: asymmetric development of the claw muscles in the lobster *Homarus americanus*. *J.exp.Zool.* 189: 421-427.
- Gourdoux L., Lequellec Y., Moreau R., Dutrieu J., 1980; Mise en évidence de la gluconéogenèse à partir de l'alanine chez le ver de farine *Tenebrio molitor* L. *C.r.Acad.Sci.Paris Ser.D.* 291: 645-648.
- Gourdoux L., Lequellec Y., Moreau R., Dutrieu J., 1983; Gluconeogenesis from some amino acids and its endocrine modification in *Tenebrio molitor* L. (*Coleoptera*). *Comp.Biochem.Physiol.* 74B: 273-276.
- Govind C.K., Atwood H.L., 1982; Organization of neuromuscular systems. W: *The Biology of Crustacea Vol.3: Neurobiology, structure and function.* (red. Atwood H.L., Sandeman D.C.), pp.63-104, Academic Press, New York.
- Grasso A., Migliori-Natalizi G., 1968; Studies on insect (*Periplaneta americana*) phosphofructokinase. *Comp.Biochem.Physiol.* 26: 979-984.
- Graszynski K., 1968; Enzyme des Feetsäureabbans in den Organen des Flußkrebses *Orconectes limosus* Raf. *Z.vergl.Physiol.* 60: 427-439.
- Guderley H., 1976; Pyruvate kinase from crustacean hypodermis, an allosteric enzyme with low and high affinity states. *Fed.Proc.* 35: 1655.
- Guderley H., Hochachka P.W., 1977; Gluconeogenic control adaptations in *Cancer magister*: hypodermal pyruvate kinase, an enzyme with high- and low-affinity states. *Archs Biochem.Biophys.* 182: 465-477.
- Guderley H., Hochachka P.W., 1980; Catalytic and regulatory properties of muscle pyruvate kinase from *Cancer magister*. *J.exp.Zool.* 212: 461-469.
- Guderley H., Storey K.B., Fields J.H.A., Hochachka P.W., 1976a; Pyruvate kinase from *Oplophorus gracilirostris* muscle. *Comp.Biochem.Physiol.* 55B: 475-478.
- Guderley H., Storey K.B., Fields J.H.A., Hochachka P.W., 1976b; Catalytic and regulatory properties of pyruvate kinase isozymes from octopus mantle muscle and liver. *Can.J. Zool.* 54: 863-870
- Gwinn J.F., Stevenson J.R., 1973; Role of acetylglucosamine in chitin synthesis in crayfish I. Correlation of ¹⁴C-acetylglucosamine incorporation with stages of the molting cycle *Comp. Biochem.Physiol.* 45B: 769-776.
- Hall E.R., Kohl E.A., Cottam G.L., 1978; The subunit structure of rat liver pyruvate kinase. *Biochem.biophys.Res.Comm.* 80: 586-592.
- Hall E.R., Cottam G.L., 1978; Isozymes of pyruvate kinase in vertebrates: their physical, chemical, kinetic and immunological properties. *Int.J.Biochem.* 9: 785-793.
- Hanaoka K., Takahashi S.Y., 1977; Adenylate cyclase system and the hyperglycaemic factor in the cockroach *Periplaneta americana*. *Insect Biochem.* 7: 95-99.
- Harada K., Saheki S., Wada K., Tanaka T., 1978; Purification of four pyruvate kinase isozymes of rats by affinity elution chromatography. *Biochim.Biophys. Acta* 524: 327-339.
- Hargrove J.W., 1976; Amino acid metabolism during flight in tsetse flies. *J.Insect Physiol.* 22: 309-313.

- Hayakawa Y., Chino H., 1981; Temperature-dependent interconversion between glycogen and trehalose in diapausing pupae of *Philosamia cynthia ricini* and *pryeri*. *Insect Biochem.* 11: 43-47.
- Hayakawa Y., Chino H., 1982; Phosphofructokinase as a possible key enzyme regulating glycerol or trehalose accumulation in diapausing insects. *Insect Biochem.* 12: 639-642.
- Heath J.R., Barnes H., 1970; Some changes in biochemical composition with season and during the moulting cycle of the common shore crab *Carcinus maenas* L. *J.exp.mar.Biol.Ecol.* 5: 199-233.
- Hergenhahn H.-G., 1983; Purification and characterization of glycogen Phosphorylase from abdominal muscle, heart and integument of the crayfish *Orconectes limosus*. *Comp. Biochem.Physiol.* 74B: 473-479.
- Hers H.G., Hue L., 1983; Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Ann.Rev.Biochem.* 52: 617-653.
- Hers H.G., Hue L., Van Schaftingen E., 1982; Fructose-2,6-bisphosphate. *Trends Biochem.Sci.* 7: 329-331
- Hers H.G., Van Schaftingen E., 1982; Fructose-2,6-bisphosphate: 2 years after its discovery. *Biochem.J.* 206: 1-12.
- Hers H.G., Van Schaftingen E., Hue L., 1981; The control of liver phosphofructokinase by fructose 2,6-bisphosphate. W: *Metabolic Interconversion of Enzymes 1980* (red. Holzer H.), pp.100-107, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Herz-Hübner U., Urich K., 1973; Resorption des alten Panzers vor der Häutung bei dem Flußkreb *Orconectes limosus* II. Unterschiede im Schicksal von N-Acetylglucosamin und Glucose bei Vorhäutungstieren. *J.comp.Physiol.* 86: 159-169.
- Herz-Hübner U., Urich K., Speck U., 1973; Das Schicksal der Nährstoffe bei dem Flußkreb *Orconectes limosus* IV. Turnover und Organverteilung der Zucker, Aminosäuren und organischen Säuren der Hämolymphe. *J.comp.Physiol.* 86: 171-185.
- Hesterberg L.K., Lee J.C., 1982; Self-association of rabbit muscle phosphofructokinase: effects of ligands. *Biochemistry* 21: 216-222.
- Hochachka P.W., 1972; The functional significance of variants of fructose 1,6-diphosphatase in the gill and hypodermis of a marine crustacean. *Biochem.J.* 127: 781-793.
- Hochachka P.W., 1976; Design of metabolic and enzymatic machinery to fit lifestyle and environment. *Biochem.Soc.Symp.* 41: 3-31.
- Hochachka P.W., 1985; Fuels and pathways as designated systems for support of muscular work. *J.exp.Biol.* 115: 149-164.
- Hochachka P.W., Freed J.M., Somero G.N., Prosser C.L., 1971; Control sites in glycolysis of crustacean muscle. *Int.J.Biochem.* 2: 125-130.
- Hochachka P.W., Somero G.N., 1973; *Strategies of Biochemical Adaptations*, wyd. polskie Strategie adaptacji biochemicznych (tłum. Makarewicz W., Żelewski L., Żydowo M.), PWN Warszawa, 1978.
- Hochachka P.W., Somero G.N., Schneider D.E., Freed J.M., 1970; The organization and control of metabolism in the crustacean gill. *Comp.Biochem.Physiol.* 33: 529-548.
- Hochachka P.W., Teal J.M., Telford M., 1962; Pathway of carbohydrate metabolism in lobster hepatopancreas. *Can.J.Biochem.Physiol.* 40: 1043-1050.
- Hofer H.W., Fürst M., 1976; Isolation of a phosphorylated form of phosphofructokinase from skeletal muscle. *FEBS Lett* 62: 118-122.
- Hoffmann K.-H., 1975; Pyruvate kinase from muscle and fat body of the house cricket *Acheta domestica* L.: purification and catalytic studies. *J.comp.Physiol.* 104: 59-69.
- Hoffmann K.-H., 1976; Catalytic efficiency and structural properties of invertebrates muscle pyruvate kinases: correlation with body temperature and oxygen consumption rates. *J.comp.Physiol.* 110: 185-195.
- Hoffmann K.-H., 1977; The regulatory role of muscle pyruvate kinase in carbohydrate metabolism of invertebrates: a comparative study in catalytic properties of enzymes isolated from *Tubifex tubifex* (*Oligochaeta*) and *Tenebrio molitor* (*Coleoptera*). *Physiol.Zool.* 50: 142-155.
- Hoffmann K.-H., Marstatt H., 1977; The influence of temperature on catalytic efficiency of pyruvate kinase of crickets (*Orthoptera: Gryllidae*) *J.Thermal.Biol.* 2: 203-207.
- Hoffmann K.-H., Rädke U., 1978; Stability of invertebrate muscle pyruvate kinases: correlation with enzymes regulatory properties. *Comp. Biochem.Physiol.* 61B: 321-325.
- Hohorst H.-J., 1970; D-Glucose-6-phosphat und D-Fructose-6-phosphat. W: *Methoden der enzymatischen Analyse* (red. Bergmeyer H.U.), vol.11, pp.1200-1204, Academic Verlag, Berlin.
- Holwerda D.A., Vonk H.J., 1973; Emulsifiers in the intestinal juice of Crustacea, isolation and nature of surface-active substances from *Astacus leptodactylus* Esch. and *Homarus vulgaris* L. *Comp.Biochem.Physiol.* 45B: 51-58.
- Hornung D.E., Stevenson J.R., 1971; Changes in the rate of chitin synthesis during the crayfish molting cycle. *Comp.Biochem.Physiol.* 40B: 341-346.

- Hu A.S.L., 1958; Glucose metabolism in the crab *Hemigrapsus nudus*. *Archs Biochem.Biophys.* 75: 387-395.
- Hue L., Blackmore P.F., Shikama H., Robinson-Steiner A., Exton J.H., 1982; Regulation of fructose 2,6-bisphosphate content in rat hepatocytes, perfused heart and perfused hindlimbs. *J.biol.Chem.* 257: 4308-4313.
- Huggins A.K., 1966; Intermediary metabolism in *Carcinus maenas*. *Comp.Biochem.Physiol.* 29: 439-445.
- Huggins A.K., Munday K.A., 1968; Crustacean metabolism. *Adv.Comp.Physiol.Biochem.* 3: 271-378.
- Humble E., Berglund L., Titanji V., Ljungström O., Edlund B., Zetterquist C., Engström L., 1975; Non-dependence of native structure of pig liver pyruvate kinase when used as a substrate for cyclic 3'5'-AMP-stimulated protein kinase. *Biochem.biophys.Res.Comm.* 66: 614-621.
- Humphrey G.F., Siggins L., 1949; Glycolysis in the wing muscle of the grasshopper *Locusta migratoria*. *Aust.J.Exp.Biol.Med.Sci.* 27: 353-359.
- Hussey C.R., Liddle P.F., Ardron D., Kellet G.L., 1977; The isolation and characterization of differentially phosphorylated fractions of phosphofructokinase from rabbit skeletal muscle. *Eur.J.Biochem.* 80: 497-506.
- Ibsen K.H., 1977; Interrelationships and functions of pyruvate kinase isozymes and their variant forms: a review. *Cancer Res.* 37: 341-353.
- Ibsen K.H., Chin R.H.C., Park H.R., Sanders D.A., Roy S., Garratt K.N., Mueller M.K., 1981; Purification and properties of mouse pyruvate kinases K and M and of a modified K subunit. *Biochemistry* 20: 1947-1506.
- Ibsen K.H., Krueger E., 1973; Distribution of pyruvate kinase isozymes among rat organs. *Archs Biochem.Biophys.* 157: 509-513.
- Ibsen K.H., Trippet P., 1973; A comparison of kinetic parameters obtained with three major noninterconvertible isoenzymes of rat pyruvate kinase. *Archs Biochem.Biophys.* 156: 730-744.
- Ibsen K.H., Trippet P., 1974; Effects of aminoacid on the kinetic properties of three non interconvertible rat pyruvate kinase. *Archs Biochem.Biophys.* 163: 570-580.
- Ibsen K.H., Trippet P., Basabe J., 1975; Properties of rat pyruvate kinase isozymes. W: *Isozymes* (red. Markert C.L.), vol.1, pp.543-559, Academic Press, New York.
- Imamura K., Tanaka T., 1972; Multimolecular forms of pyruvate kinase from rat and other mammalian tissues: I. Electrophoretic studies. *J.Biochem.(Tokyo)* 71: 1043-1051.
- Imamura K., Taniuchi K., Tanaka T., 1972; Multimolecular forms of pyruvate kinase: II. Purification of M₂-type pyruvate kinase from Yoshida ascites hepatoma 130 cells and comparative studies on the enzymoiogical and immunological properties of the three types of pyruvate kinase L, M₁ and M₂. *J.Biochem.(Tokyo)* 72: 1001-1015.
- Inoue H., Noguchi T., Tanaka T., 1986; Complete amino acid sequence of rat L-type pyruvate kinase deduced from the cDNA sequence. *Eur.J.Biochem.* 154: 465-469.
- Irving M.G., Williams J.F., 1973a; Kinetic studies on the regulation of rabbit liver pyruvate kinase. *Biochem.J.* 131: 287-301.
- Irving M.G., Williams J.F., 1973b; Studies on the interaction between rabbit liver pyruvate kinase and its allosteric effector fructose 1,6-diphosphate. *Biochem.J.* 131: 303-313.
- Irving M.G., Williams J.F., 1976; Kinetic properties of pyruvate kinase isolated from rat hepatic tumors. *Biochem.biophys.Res.Comm.* 68: 284-291.
- Ito T., Horie Y., 1959; Carbohydrate metabolism of the mid-gut of the silkworm *Bombyx mori*. *Archs Biochem.Biophys.* 80: 174-186.
- Jahromi S.S., Atwood H.L., 1969; Correlation of structure, speed of contraction, and total tension in fast and slow abdominal fibers of the lobster (*Homarus americanus*). *J.exp.Zool.* 171: 25-38.
- Jahromi S.S., Atwood H.L., 1971; Structural and contractile properties of lobster leg muscle fibers. *J.exp.Zool.* 176: 475-486.
- Jaworek D., Gruber W., Bergmeyer H.U., 1974; Adenosine-5-diphosphate and adenosine-5-monophosphate. W: *Methods of Enzymatic Analysis* (red. Bergmeyer H.U.), pp.2127-2131, Academic Press, New York.
- Jett M.F., Hue L., Hers H.G., 1981; Pyruvate kinase phosphatase. *FEBS Lett.* 132: 183-186.
- Jimenez de Asua L., Rozengurt E., Carminatti H., 1971; Two different forms of pyruvate kinase in rat kidney cortex. *FEBS Lett.* 14: 22-24.
- Johnston M.A., Davies P.S., 1972; Carbohydrates of the hepatopancreas and blood tissues of *Carcinus*. *Comp.Biochem.Physiol.* 41B: 433-443.
- Johnston M.A., Davies P.S., Elder H.Y., 1971; Possible hepatic function for crustacean blood cells. *Nature (London)* 230: 471-472.
- Johnston M.A., Elder H.Y., Davies P.S., 1973; Cytology of *Carcinus* hemocytes and their function in carbohydrate metabolism. *Comp.Biochem.Physiol.* 46A: 569-581.

- Jones J.C., 1964; The circulatory system of insects. W: The Physiology of Insecta (red. Rockstein M.), vol.3, pp.1-107, Academic Press, New York.
- Jones J.C., 1977; The Circulatory System of Insects. Charles C.Thomas Publishing Co., Springfield.
- Kagimoto T., Uyeda K., 1980; Regulation of rat liver phosphofructokinase by glucagon-induced phosphorylation. *Archs Biochem. Biophys.* 203: 792-799.
- Kahn A., Cottreau D., Dreyfus J.C., 1980; Phosphofructokinase in human fetus. *Pediatr.Res.* 14: 1162-1167.
- Karadsheh N.S., Uyeda K., Oliver R.M., 1977; Studies on structure of human erythrocyte phosphofructokinase. *J.biol.Chem.* 252: 3515-3524.
- Kasprzyk A., Lesicki A., 1988; Fructose-2,6-bisphosphate in insect tissues. 14th International Congress of Biochemistry, Prague,
- Keeley L.L., 1978; Endocrine regulation of fat body development and function. *Ann.Rev.Entomol.* 23: 329-352.
- Keeley L.L., 1985; Physiology and biochemistry of fat body. W: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology (red. Kerkut G.A., Gilbert L.I.), vol.3, pp.211-248, Pergamon Press, Oxford, New York.
- Keller R., 1965; Die Aktivitäten von Enzymen der Glycolyse und des Citroninsäurezyklus in den Organen von *Cambarus affinis* Say (*Crustacea, Decapoda*). *Z.vergl.Physiol.* 50: 119-136.
- Keller R., Andrew E.M., 1973; The site of action of crustacean hyperglycemic hormone. *Gen.Comp.Endocr.* 20: 572-578.
- Kemp R.G., 1971; Rabbit liver phosphofructokinase. Comparison of some properties with those of muscle phosphofructokinase. *J.biol.Chem.* 246: 245-252.
- Kemp R.G., 1973; Inhibition of muscle pyruvate kinase by creatine phosphate. *J.biol.Chem.* 248: 3963-3967.
- Kennedy D., Takeda K., 1965a; Reflex control of abdominal flexor muscles in the crayfish. I. The twitch system. *J.Exp.Biol.* 43: 211-227.
- Kennedy D., Takeda K., 1965b; Reflex control of abdominal flexor muscles in the crayfish. II. The tonic system. *J.Exp.Biol.* 43: 229-246.
- Khan M.A., De Kort C.A.D., 1978; Further evidence for the significance of proline as a substrate for flight in the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. *Comp.Biochem.Physiol.* 60B: 407-411.
- Khoja S.M., 1991; A comparison of the allosteric properties of 6-phosphofructo-1-kinase from the flight muscle, leg muscle, mid-gut and hind-gut of the grasshopper, *Poekilocerus bufonius*. *Comp.Biochem.Physiol.* 99B: 833-837.
- Khoja S.M., Al-Robai A.A., Al-Fifi Z.I., 1990; Regulatory properties of 6-phosphofructo-1-kinase of the mid-gut of the grasshopper *Poekilocerus bufonius*. *Insect Biochem.* 20: 443-449.
- Kilby B.A., 1963; The biochemistry of the insect fat body. *Adv.Insect Physiol.* 1: 112-174.
- Kincaid F.D., Scheer B.T., 1952; Hormonal control of metabolism in crustaceans: IV. Relation of tissue composition of *Hemigrapsus nudus* to intermolt cycle and sinus gland. *Physiol.Zoöl.* 25: 372-380.
- Kleine R., 1967a; Vorkommen und Eigenschaften der Proteolytischen Enzyme des Magensaftes und der Mittelarmdrüse des Flußkrebse *Astacus astacus* L. und *Cambarus affinis* Say - II. *Endopeptidasen.* *Z.vergl.Physiol.* 55: 51-69.
- Kleine R., 1967b; Das unterschiedliche Verhalten der Exopeptidasen des Hepatopankreas und Magensaftes vom Flußkrebse *Astacus astacus* L. und *Cambarus affinis* Say bei der Gelfiltration auf Sephadex sowie gegenüber Effektoren. *Z.vergl.Physiol.* 56: 142-153.
- Kleine R., Spangenberg P., 1974; Isolierung und Charakterisierung der beiden Trypsin-Isoenzyme des amerikanischen Flußkrebse *Cambarus affinis* Say. *Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.* 355: 114-124.
- Koshland D.E., Nemethy G., Filmer P., 1966; Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* 5: 365-385.
- Koster J.F., Slee R.G., Van Berkel T.J.C., 1980; Isoenzymes of human phosphofructokinase. *Clin.Chim. Acta* 103: 169-173.
- Krogh A., Weis-Fogh T., 1951; The respiratory exchange of the desert locust (*Schistocerca gregaria*) before, during and after flight. *J.exp.Biol.* 28: 344-357.
- Kruger P., Graetz E., 1927; Über die Eiweißfermente des Flußkrebse. *Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.* 166: 128-134.
- Krüger P., Graetz E., 1928; Die Fermente des Flußkrebsmagensaftes. *Zool.Jahrb. Abt.Allgem.Zool.Physiol.Tiere* 45: 463-514.
- Kurata N., Matsushima T., Sugimura T., 1972; Multiple forms of phosphofructokinase in rat tissues and rat tumors. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 48: 473-479.

- Kurganow B.I., Wenzel K.W., Zimmerman G., Jakowlew W.A., Hofmann E., 1975; Kinetičieskije swojstwa fosfofruktokinazy iz eritrocitow czielowieka. *Bioorg.Chim.* 1: 632-645.
- Kutzbach C., Bischofberger H., Hess B., Zimmerman-Telschow H., 1973; Pyruvate kinase from pig liver. *Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.* 354: 1473-1489.
- Kuwajima M., Uyeda K., 1982; The tissue distribution of fructose-2,6-P₂ and fructose 6-P,2-kinase in rats and the effect of starvation, diabetes and hypoglycemia on hepatic fructose-2,6-P₂ and fructose 6-P,2-kinase. *Biochem. biophys.Res.Communic.* 104: 84-88.
- Kühn B., Jacobasch G., Gerth C., Rapoport M., 1974; Kinetic properties of phosphofruktokinase from erythrocytes of rats and rabbits: 2. The influence of effectors under nearing cellular conditions. *Eur.J.Biochem.* 43: 443-450.
- Lamprecht W., Trautschold I., 1974; Adenosine-5-triphosphate, determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. W: *Methods of Enzymatic Analysis* (red. Bergmeyer H.U.), pp.2101-2110, Academic Press, New York.
- Lang F., Costello W.J., Govind G.K., 1977; Development of the dimorphic claw closer muscles of the lobster, *Homarus americanus*: I. Regional distribution of muscle fiber types in adults. *Biol.Bull.(Woods Hole)* 152: 75-83.
- Lang R., 1971; Chitinsynthese bei dem Flußkrebis *Orconectes limosus*: Aktivität der Phosphoglucosaminomerase und Einbau von Glucose-U-¹⁴C in Chitin. *Z.vergl.Physiol.* 73: 305-316.
- Layzer R.B., Rowland L.P., Bank W.J., 1969; Physical and kinetic properties of human phosphofruktokinase from skeletal muscle and erythrocytes. *J.biol.Chem.* 244: 3823-3831.
- Leite A., Neto J.A., Leyton J.F., Crivellaro O., El-Dorry H.A., 1988; Phosphofruktokinase from bumblebee flight muscle: molecular and catalytic properties and role of the enzyme in regulation of the fructose 6-phosphate/fructose 1,6-bisphosphate cycle. *J.biol.Chem.* 263: 17527-17533.
- Lesicki A., 1974; Biochemiczne właściwości kinazy pirogronianowej niektórych tkanek raka *Orconectes limosus* Raf. (*Crustacea*). XII Zjazd P.T.Biochem., Warszawa 1974, streszcz.D-24, str.101-102.
- Lesicki A., 1976; Characteristic of isoenzymes of pyruvate kinase isolated from some crayfish *Orconectes limosus* Raf. (*Crustacea: Decapoda*) tissues. *Comp.Biochem.Physiol.* 55B: 273-277.
- Lesicki A., 1977; Activity and kinetic properties of pyruvate kinase from some tissues of the crayfish *Orconectes limosus* Raf. (*Crustacea: Decapoda*) in different stages of the moult cycle. *Comp.Biochem.Physiol.* 56B: 15-18.
- Lesicki A., 1980; The regulation of phosphofruktokinase activity in hepatopancreas and abdominal muscle of the crayfish *Orconectes limosus* Raf. (*Crustacea: Decapoda*). *Comp. Biochem.Physiol.* 66B: 291-296.
- Lesicki A., 1983a; Interconvertible forms of pyruvate kinase from the hepatopancreas of the crayfish *Orconectes limosus* Raf. *Mol.Physiol.* 3: 207-215.
- Lesicki A., 1983b; Electrophoretic studies on pyruvate kinase from the hepatopancreas of the crayfish *Orconectes limosus* Raf. (*Crustacea: Decapoda*). *Bull.Soc.Amis Sci.Lett.Poznań ser.D.biol.* 23: 5-10.
- Lesicki A., 1983c; Properties of pyruvate kinase from the hepatopancreas and abdominal muscle of the crayfish *Orconectes limosus* Raf. (*Crustacea: Decapoda*) after eyestalk removal. *Bull.Soc.Amis Sci.Lett. Poznań ser.D.biol.* 23: 11-18.
- Lesicki A., 1983d; Properties of phosphofruktokinase from the hepatopancreas and abdominal muscle of the crayfish *Orconectes limosus* Raf. (*Crustacea: Decapoda*) after eyestalk removal. *Bull.Soc.Amis Sci.Lett.Poznań ser.D. biol.* 23: 19-23.
- Lesicki A., 1983e; Usunięcie słupków ocznych oraz iniekcja ekdysteronu hamują aktywność fosfofruktokinazy i kinazy pirogronianowej w wątrobotrzustce raka *Orconectes limosus* Raf. (*Crustacea*). XIX Zjazd P.T.Biochem., Szczecin 1983, streszcz. str. 367.
- Lesicki A., 1988; Uridinediphosphate as an alternative substrate for pyruvate kinase of the crayfish *Orconectes limosus* Raf. tissues. *Bull.Soc.Amis Sci.Lett.Poznań ser.D. biol.* 26: 37-43.
- Lesicki A., Jüngst M., 1984; Properties of pyruvate kinase from fat body of *Tenebrio molitor* L. (*Insecta: Coleoptera*) larvae. *Bull.Soc.Amis Sci.Lett.Poznań ser.D.biol.* 24: 31-38.
- Lesicki A., Kasprzyk A., 1984; Regulacja metabolizmu węglowodanowego w hepatocytach przy udziale fruktozo-2,6-bisfosforanu, nowo odkrytego metabolitu. *Post.Biol.Kom.* 11: 1-16.
- Lesicki A., Kasprzyk A., 1988; Glycolytic enzymes in the fat body of *Tenebrio molitor* L. larvae. *Bull.Soc.Amis Sci.Lett.Poznań ser.D.biol.* 26: 45-58.
- Lesicki A., Obuchowicz L., 1980; Regulatory properties of pyruvate kinase from muscle of the crayfish *Orconectes limosus* Raf. *Comp.Biochem. Physiol.* 66B: 297-299.

- Lincoln D.R., Black J.A., Rittenberg M.B., 1975; The immunological properties of pyruvate kinase: II. The relationship of the human erythrocyte isozyme to the human liver isozymes. *Biochim.Biophys.Acta* 410: 279-284.
- Ling K.H., Marcus F., Lardy H.A., 1965; Purification and some properties of rabbit skeletal muscle phosphofructokinase. *J.biol.Chem.* 240: 1893-1899.
- Ling K.H., Paetkau V., Marcus F., Lardy H.A., 1966; Phosphofructokinase: Skeletal muscle. W: *Methods in Enzymology* (red. Colowick S.P., Kaplan N.O.), vol.IX, pp.425-429, Academic Press, New York.
- Ljungström O., Hjemquist G., Engström L., 1974; Phosphorylation of purified rat liver pyruvate kinase by cyclic 3'5'-AMP-stimulated protein kinase. *Biochim. Biophys.Acta* 358: 289-298.
- Loizzi R.F., 1971; Interpretation of crayfish hepatopancreas function based on fine structural analysis of epithelial cell lines and muscle network. *Z.Zellforsch.Mikrosk.Anat.* 113: 420-440.
- Loizzi R.F., Paterson D.R., 1971; Lipolytic sites in crayfish hepatopancreas and correlation with fine structure. *Comp.Biochem.Physiol.* 39B: 227-236.
- Lone Y.Ch., Simon M.P., Kahn A., Marie J., 1986; Complete nucleotide and deduced amino acid sequences of rat L-type pyruvate kinase. *FEBS Lett.* 195: 97-100.
- Lowry O.H., 1965; Phosphofructokinase. W: *Control of Energy Metabolism* (red. Chance B., Estabrook R.W., Williamson J.R.), pp.63-64, Academic Press, New York.
- Lowry O.H., Passonneau J.V., 1966; Kinetic evidence for multiple binding sites of phosphofructokinase. *J.biol.Chem.* 241: 2268-2279.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951; Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J.biol.Chem.* 193: 265-275.
- Luther M.A., Hesterberg L.K., Lee J.C., 1985; Subunit interaction of rabbit muscle phosphofructokinase: effects of purification procedures. *Biochemistry* 24: 2463-2470.
- Madhyastha M.N., Rangneker P.V., 1974; Observation on the moult cycle of the prawn *Metapanaeus monoceiros* (Fabricius): Part II. Cyclic histological and histochemical changes in the hepatopancreas. *Broteria ser.Ciencias Naturais* 43: 135-149.
- Madhyastha M.N., Rangneker P.V., 1976; Metabolic effects of eyestalk removal in the crab *Varana litterata* (Fabricius). *Hydrobiologia* 48: 25-31.
- Marie J., Kahn A., Boivin P., 1976; L-type pyruvate kinase from human liver. Purification by double affinity elution, electrofocusing and immunological studies. *Biochim.Biophys.Acta* 438: 393-406.
- Marie J., Simon M.P., Dreyfus J.C., Kahn A., 1981; One gene but two messenger RNAs encode liver L and red cell L' pyruvate kinase subunits. *Nature (London)* 292: 70-72.
- Marie J., Simon M.P., Lone Y.Ch., Coguet M., Kahn A., 1986; Tissue specific heterogeneity of the 3'-untranslated region of L-type pyruvate kinase mRNAs. *Eur.J.Biochem.* 158: 33-41.
- Mayer R.J., Candy D.J., 1969; Changes in energy reserves during flight of the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Comp.Biochem.Physiol.* 31: 409-418.
- Mayr G.W., 1989; Inositol 1,4-bisphosphate is an allosteric activator of muscle-type 6-phosphofructo-1-kinase. *Biochem.J.* 259: 463-470.
- McDougall G.E., Steele J.E., 1988; Free fatty acids as a source of energy for trehalose synthesis in the fat body of the American cockroach (*Periplaneta americana*). *Insect Biochem.* 18: 591-597.
- McGinnis A.J., Cheldelin V.H., Newburgh R.W., 1956; Enzyme studies of various stages of the blowfly *Phormia regina* (Meig). *Archs Biochem.Biophys.* 63: 427-436.
- McLaughlin P.A., 1983; Internal Anatomy. W: *The Biology of Crustacea vol.5: Internal Anatomy and Physiological Regulation* (red. Mantel L.H.), pp. 1-52, Academic Press, New York, London.
- McWhinnie M.A., Corkill A.J., 1964; The hexosemonophosphate pathway and its variation in the intermoult cycle in crayfish. *Comp.Biochem. Physiol.* 12: 81-93.
- Meenakshi V.R., Scheer B.T., 1961; Metabolism of glucose in the crabs *Cancer magister* and *Hemigrapsus nudus*. *Comp.Biochem.Physiol.* 3: 30-41.
- Meienhofer M.C., Cottreau D., Dreyfus J.C., Kahn A., 1980; Kinetic properties of human F₄ phosphofructokinase: a poor regulatory enzyme. *FEBS Lett.* 110: 219-222.
- Meyerhof O., Lohmann K., 1928; Über die natürlichen Guanidinophosphosäuren (Phosphagene) in der quergestreiften Muskulatur: I. Mitteilung: das physiologische Verhalten der Phosphagene. *Biochem.Zeitschr.* 196: 22-48.
- Miller T.A., 1975; Insect visceral muscle. W: *Insect Muscle* (red. Usherwood P.N.R.), pp.545-606, Academic Press, London.

- Miller T.A., 1985; Structure and physiology of the circulatory system. W: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology (red. Kerkut G.A., Gilbert L.I.), vol.3, pp.289-353, Pergamon Press, Oxford, New York.
- Momin M.A., Rangneker P.V., 1975; Valiants in the histochemical patterns of lipids in the hepatopancreas of *Scylla serrata* (Forsk.) (*Brachyura, Decapoda*). Z.Mikrosk.Anat.Forsch. 89: 170-182.
- Monod J., Wyman J., Changeaux J.P., 1965; On the nature of allosteric transition: a plausible model. J.molec. Biol. 12: 88-118.
- Mordue W., De Kort C.A.D., 1978; Energy substrates for flight in the Colorado beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say. J.Insect Physiol. 24: 221-224.
- Morishima I., 1978; Adenylate cyclase in silkworm: properties of the enzyme in pupal fat body. J.Biochem.(Tokyo) 84: 1495-1500.
- Morishima I., 1979; Adenylate cyclase in silkworm: regulation by calcium and a calcium binding protein. Agric.Biol.Chem. 43: 1127-1131.
- Mullins D.E., 1985; Chemistry and physiology of the hemolymph. W: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology (red. Kerkut G.A., Gilbert L.I.), vol.3, pp.355-400, Pergamon Press, Oxford, New York.
- Munday K.A., Giles I.A., Poat P.C., 1980; Review of the comparative biochemistry of pyruvate kinase. Comp.Biochem.Physiol. 67B: 403-411.
- Munday K.A., Poat P.C., 1971; Respiration and energy metabolism in Crustacea. W: Chemical Zoology (red. Florkin M., Scheer B.T.), vol.VI, pp.191-211, Academic Press, New York.
- Nakajima H., Yamaseki T., Noguchi T., Tanaka T., Kono N., Tarni S., 1990; Evidence for alternative RNA splicing and possible alternative promoters in the human muscle phosphofructokinase gene at the 5' untranslated region. Biochem.biophys.Res.Comm. 166: 637-641.
- Neiland K.A., Scheer B.T., 1953; The influence of fasting and of sinus gland removal on body composition of *Hemigrapsus nudus*. Physiol.Comp. Oecol. 3: 321-326.
- Newsholme E.A., Leech A.R., 1983; Catabolism of carbohydrates. W: Biochemistry for the Medical Sciences, pp. 167-245, John Wiley & Sons, Chichester, New York.
- Newsholme E.A., Start C., 1973; Regulation in Metabolism. John Wiley & Sons, London, New York.
- Newsholme E.A., Sugden P.H., Williams T., 1977; Effect of citrate on the activities of 6-phosphofructokinase from nervous and muscle tissues from different animals and its relationship to the regulation of glycolysis. Biochem.J. 166: 123-129.
- Newton C.J., Poat P.C., Munday K.A., 1976a; A kinetic study of muscle pyruvate kinase isolated from the leg muscle of *Carcinus maenas*. Biochem.Soc. Trans. 4: 479-481.
- Newton C.J., Poat P.C., Munday K.A., 1976b; Substrate inhibition of pyruvate kinase isolated from the leg muscle of *Carcinus maenas*. Biochem.Soc.Trans. 4: 1158-1160.
- Nieto A., Castaño J., 1980; Control *in vivo* of rat liver phosphofructokinase by glucagon and nutritional changes. Biochem.J. 186: 953-957.
- Noguchi T., Inoue H., Chen H.L., Matsubara K., Tanaka T., 1983; Molecular cloning of DNA complementary to rat L-type pyruvate kinase mRNA: nutritional and hormonal regulation of L-type pyruvate kinase mRNA concentration. J.biol.Chem. 258: 15220-15223.
- Noguchi T., Inoue H., Nakamura Y., Chen H.L., Matsubara K., Tanaka T., 1984; Molecular cloning of cDNA sequences for rat M₂-type pyruvate kinase and regulation of its mRNA. J.biol.Chem. 259: 2651-2655.
- Noguchi T., Inoue H., Tanaka T., 1986; The M₁- and M₂-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing. J.biol.Chem. 261: 13807-13812.
- Noguchi T., Yamada K., Inoue H., Matsuda T., Tanaka T., 1987; The L- and R-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from a single gene by use of different promoters. J.biol.Chem. 262: 14366-14371.
- Noguchi T., Tanaka T., 1982; The M₁ and M₂ subunits of rat pyruvate kinase are encoded by different messenger RNAs. J.biol.Chem. 257: 1110-1113.
- Oberfelder R.W., Lee L.L.Y., Lee J.C., 1984; Thermodynamic linkages in rabbit muscle pyruvate kinase: kinetic, equilibrium and structural studies. Biochemistry 23: 3813-3821.
- O'Connor J.D., Gilbert L.I., 1968; Aspects of lipid metabolism in crustaceans. Am.Zool. 8: 529-539.
- O'Connor J.D., Gilbert L.I., 1969; Alteration in lipid metabolism associated with premolt activity in a land crab and freshwater crayfish. Comp. Biochem.Physiol. 29: 889-904.
- Onnen T., Zebe E., 1983; Energy metabolism in the tail muscles of the shrimp *Crangon crangon* during work and subsequent recovery. Comp.Biochem.Physiol. 74A: 833-838.

- Orchard I., Carlisle i.A., Laughton B.G., Gole J.W.D., Downer R.G.H., 1982; *In vitro* studies on the effects of octopamine on locust fat body. *Gen.Comp.Endocr.* 48: 7-13.
- Osterman J., Fritz P.J., 1973; Pyruvate kinase isozymes: a comparative study in tissue of various mammalian species. *Comp.Biochem. Physiol.* 44B: 1077-1085.
- Osterman J., Fritz P.J., 1974; Pyruvate kinase isozymes from rat intestinal mucosa: characterization and the effect of fasting and refeeding. *Biochemistry* 13: 1731-1736.
- Osterman J., Fritz P.J., Wuntch T., 1973; Pyruvate kinase isozymes from rat tissues: developmental studies. *J.biol.Chem.* 248: 1011-1018.
- Paetkau V., Lardy H.A., 1967; Phosphofructokinase - correlation of physical and enzymatic properties. *J.biol.Chem.* 242: 2035-2042.
- Pahlic M., Stevenson R., 1978; Glucosamine-6-phosphate synthesis in the crayfish epidermis. *Comp.Biochem.Physiol.* 60B: 281-285.
- Parvathy K., 1971 ; Glycogen storage in relation to the moult cycle in the two crustaceans *Emirita asiatica* and *Ligia exotica*. *Mar.Biol.* 10: 82-86.
- Parvathy K., 1972; Endocrine regulation of carbohydrate metabolism during the moult cycle in crustaceans: I. Effect of eyestalk removal in *Ocypoda platytarsis*. *Mar.Biol.* 14: 58-62.
- Passano L.M., 1960; Molting and its control, W: *The Physiology of Crustacea* (red. Waterman T.H.), vol.1, pp.473-536, Academic Press, New York, London.
- Peterson J.S., Chern J.C., Harkins R.N., Black J.A., 1974; The subunit structure of human muscle and human erythrocyte pyruvate kinase isoenzymes. *FEBS Lett.* 49: 73-77.
- Pilkis S.J., Chrisman T., Burgess B., McGrane M.M., Colosia A., Pilkis J., Claus T.H., El-Maghrabi M.P., 1983; Rat hepatic 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase: a unique bifunctional enzyme, *Adv.Enzyme Regul.* 21: 147-173.
- Pilkis S.J., Claus T.H., 1991; Hepatic gluconeogenesis/glycolysis regulation and structure/function relationships of substrate cycle enzymes. *Annu.Rev.Nutr.* 11: 465-515.
- Pilkis S.J., El-Maghrabi M.R., McGrane M., Pilkis J., Claus T.H., 1982a; Regulation by glucagon of hepatic pyruvate kinase, 6-phosphofructo-1-kinase and fructose 1,6-bisphosphatase. *Fed.Proc.* 41: 2623-2628.
- Pilkis S.J., El-Maghrabi M.R., McGrane M., Pilkis J., Fox E., Claus T.H., 1982b; Fructose 2,6-bisphosphate: a mediator of hormone action of the fructose-6-phosphate /fructose-1,6-bisphosphate cycle. *Moll.Cell. Endocr.* 25: 245-266.
- Pilkis S.J., El-Maghrabi M.R., Pilkis J., Claus T.H., Cumming P.D., 1981; Fructose 2,6-bisphosphate: a new activator of phosphofructokinase. *J.biol.Chem.* 256: 3171-3174.
- Pilkis S.J., Schlumpf J., Pilkis J., Claus T.H., 1979; Regulation of phosphofructokinase activity by glucagon in isolated rat hepatocytes. *Biochem.biophys.Res.Comm.* 88: 960-967.
- Pillai R.S., 1960; Studies on the shrimp *Caridina laevis*: I. The digestive system. *J.Mar.Biol.Assoc.India* 2: 57-74.
- Pines M., Applebaum S.W., 1978; Cyclic nucleotide-dependent protein kinase activity of adult female locust fat body. *Insect Biochem.* 8: 183-187.
- Pines M., Tietz A., Weintraub H., Applebaum S.W., Josefsson L., 1981 ; Hormonal activation of protein kinase and lipid mobilization in the locust fat body *in vitro*. *Gen.Comp.Endocr.* 43: 427-431.
- Phillips J.W., McKinney R.J.W., Hird F.J.R., Macmillan D.L., 1977; Lactic acid formation in crustaceans and the liver function of the midgut gland questioned. *Comp. Biochem.Physiol.* 56B: 427-433.
- Poat P.C., Giles I.G., Munday K.A., 1980; An investigation into the apparent inhibition by arginine phosphate of the activity of *Carcinus maenas* type-M pyruvate kinase. *Biochim.Biophys.Acta* 613: 410-419.
- Pogson C.I., 1968a; Adipose tissue pyruvate kinase. Properties and interconversion of two active forms. *Biochem.J.* 110: 67-77.
- Pogson C.I., 1968b; Two interconvertible forms of pyruvate kinase in adipose tissue. *Biochem. biophys.Res.Comm.* 30: 297-302.
- Ramaiah A., 1974; Pasteur effect and phosphofructokinase. *Curr.Top.Cell. Regul.* 8: 297-345.
- Ramamurthi R., Mumbach M.W., Scheer B.T., 1968; Endocrine control of glycogen synthesis in crabs. *Comp.Biochem.Physiol.* 26: 311-319.
- Rangneker P.V., Momin M.A., 1974; Histochemical studies on the distribution and hormonal regulation of carbohydrates in the hepatopancreas of the crab *Scylla serrata* (Forsk.). *Z.Mikrosk.Anat. Forsch.* 88: 871-883.
- Reinhart G.D., 1980; Influence of polyethylene glycols on the kinetics of rat liver phosphofructokinase. *J.biol.Chem.* 255: 10576-10578.

- Reinhart G.D., Lardy H.A., 1980a; Rat liver phosphofructokinase: kinetic activity under near physiological conditions. *Biochemistry* 19: 1477-1484.
- Reinhart G.D., Lardy H.A., 1980b; Rat liver phosphofructokinase: kinetic and physiological ramifications of the aggregation behavior. *Biochemistry* 19: 1491-1495.
- Reinhart G.D., Hartleip S.B., 1987; Perturbation of the quaternary structure and allosteric behavior of rat liver phosphofructokinase by polyethylene glycol. *Archs Biochem.Biophys.* 258: 65-76.
- Renaud L., 1949; Le cycle des reserves organiques chez les Crustaces Decapodes. *Ann.Inst.Oceanogr.(Paris)* 24: 259-357.
- Richards C.S., Uyeda K., 1982; Hormonal regulation of fructose-6P,2-kinase and fructose 2,6-P₂ by two mechanisms. *J.biol.Chem.* 257: 8854-8861.
- Romoser W.S., 1981; *The Science of Entomology*. 6th edition, Chapman & Hall, London.
- Rosen B., 1937; Vergleichende Studien über die Proteinase von gastropoden und decapoden Crustaceen. *Z.vergl. Physiol.* 24: 602-612.
- Rowan A., Newsholme E.A., 1979; Changes in the contents of adenine nucleotides and intermediates of glycolysis and the citric acid cycle in flight muscle of the locust upon flight and their relationship to the control of the cycle. *Biochem.J.* 178: 209-216.
- Sacktor B., Childress C.C., 1967; Metabolism of proline in insect flight muscle and its significance in stimulating the oxidation of pyruvate. *Archs Biochem.Biophys.* 120: 583-588.
- Sacktor B., Wu N., Lescure O., Reed W.D., 1974; Regulation of muscle Phosphorylase b kinase activity by inorganic phosphate and calcium ions. *Biochem.J.* 137: 535-542.
- Sagardia F., 1969; The glycogen Phosphorylase system from the muscle of the blue crab *Callinectes danae*. *Comp.Biochem.Physiol.* 28: 1377-1385.
- Saheki S., Harada K., Sanno Y., Tanaka T., 1978a; Hybrid isozymes of rat pyruvate kinase: their subunit structure and developmental changes in the liver. *Biochim.Biophys. Acta* 526: 1 i 6-128.
- Saheki S., Saheki K., Tanaka T., 1978b; Peptide mapping by limited proteolysis of four pyruvate kinase isozymes. *FEBS Lett.* 93: 25-28.
- Saheki S., Saheki K., Tanaka T., 1982a; Peptide structures of pyruvate kinase isozymes: 1. Comparison of the four pyruvate kinase isozymes of the rat. *Biochim.Biophys.Acta* 704: 484-493.
- Saheki S., Saheki K., Tanaka T., Tanaka T., 1982b; Peptide structures of pyruvate kinase isozymes: 2. Origins of types M₁ and M₂ isozymes suggested from species-variations in their peptide maps. *Biochim. Biophys.Acta* 704: 494-502.
- Santiago D., Santiago P.A., Block A.M., Sagardia F., 1974a; Purification and properties of glycogen Phosphorylase a from muscle of the blue crab *Callinectes sapidus*. *Archs Biochem.Biophys.* 163: 679-687,
- Santiago P.A., Santiago D., Block A.M., Sagardia F., 1974b; Kinetics of glycogen Phosphorylase a from the muscle of the blue crab *Callinectes sapidus*. *Archs Biochem. Biophys.* 163: 688-698.
- Schatzlein F.C., Carpenter H.M., Rogers M.R., Sutko J.L., 1973; Carbohydrate metabolism in the striped shore crab *Pachygrapsus crassipes*: I. The glycolytic enzymes of gill, hepatopancreas, heart and leg muscles. *Comp. Biochem.Physiol.* 45B: 393-405.
- Schubert C., Kasprzyk A., 1989; PFK-2 from the fat body of the *Tenebrio molitor* larvae. Abstracts of GDR Biochemical Society Congress, Erfurt.
- Schworer C., El-Maghrabi M.R., Pilakis S.J., Soderling T.R., 1985; Phosphorylation of L-type pyruvate kinase by a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. *J.biol.Chem.* 260: 13018-13022.
- Sedlmeier D., 1985; Mode of action of the crustacean hyperglycemic hormone. *Am.Zool.* 25: 223-232.
- Sedlmeier D., 1987; The role of hepatopancreatic glycogen in the action of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH). *Comp.Biochem.Physiol.* 87A: 423-425.
- Sedlmeier D., Keller R., 1981; The mode of action of the crustacean neurosecretory hyperglycemic hormone: I. Involvement of cyclic nucleotides. *Gen.Comp.Endocr.* 45: 82-90.
- Seubert W., Schoner W., 1971; The regulation of pyruvate kinase. *Curr.Top.Cell. Regul.* 3: 237-267.
- Sevala V.L., Steele J.E., 1991; Regulation of glycolytic intermediates in cockroach fat body by the corpus cardiacum. *J.Comp.Physiol* 161B: 349-355.
- Silva G.M., Doyle W.P., Wang C.H., 1958; Glucose catabolism in the American cockroach. *Nature (London)* 182: 102-104.
- Simon M.P., Marie J., Bertrand O., Kahn A., 1982; Molecular organization of human L' and L pyruvate kinase. *Biochim.Biophys.Acta* 709: 1-8.
- Skinner D.M., 1962; The structure and metabolism of a crustacean integumentary tissue during the molt cycle. *Biol.Bull. (Woods Hole)* 123: 635-647.

- Soderling T.R., Schworer C.M., El-Maghrabi M.R., Pilkis S.J., 1986; Phosphorylation of liver pyruvate kinase by Ca^{++} /calmodulin-dependent protein kinase: characterization of two phosphorylation sites. *Biochem.biophys.Res.Comm.* 139: 1017-1023.
- Somero G.N., 1969; Pyruvate kinase variants of the Alaskan king crab: evidence for a temperature-dependent interconversion between two forms having distinct and adaptive kinetic properties. *Biochem.J.* 114: 237-241.
- Speck U., 1969; Das Kohlenhydratspektrum in den Organen des Flußkrebse *Orconectes limosus* und seine Veränderungen im Jahresablauf. *Z.vergl.Physiol.* 65: 51-69.
- Speck U., Urich K., 1969a; Das Schicksal der Nährstoffe bei dem Flußkrebs *Orconectes limosus* Einbau von Glucose-U- ^{14}C , Glutamat-U- ^{14}C and Palmitat-U- ^{14}C in die verschiedenen Stoffklassen. *Z.vergl.Physiol.* 63: 395-404.
- Speck U., Urich K., 1969b; Der Abbau körpereigener Substanzen in den Flußkrebs *Orconectes limosus* während des Hungerus. *Z.vergl. Physiol.* 63: 410-414.
- Speck U., Urich K., 1970; Das Schicksal der Nährstoffe bei dem Flußkrebs *Orconectes limosus*: II. Resorption U- ^{14}C -markierter Nährstoffe und ihre Verteilung auf die Organe. *Z.vergl.Physiol.* 68: 318-333.
- Speck U., Urich K., 1971; Quantitative Bedeutung der Reservestoffe für Chitinsynthese, Energiestoffwechsel und osmotische Vorgänge während der Häutung des Flußkrebse *Orconectes limosus*. *Z.vergl.Physiol.* 71 : 286-294.
- Speck U., Urich K., 1972a; Das Schicksal der Nährstoffe bei dem Flußkrebs *Orconectes limosus*: III. Chemische Umwandlung U- ^{14}C -markierter Nährstoffe in den resorbierenden Geweben. *J.comp.Physiol.* 77: 278-286.
- Speck U., Urich K., 1972b; Resorption des alten Panzers vor der Häutung bei dem Flußkrebs *Orconectes limosus*: Schicksal des freigesetzten N-Acetyl-glucosamins. *J.comp.Physiol.* 78: 210-220.
- Speck U., Urich K., Herz-Hübner U., 1972; Nachweis einer Regulation der Glucosaminbildung bei dem Flußkrebs *Orconectes limosus* zur Zeit der Häutung. *Z.vergl.Physiol.* 71: 286-294.
- Spindler-Barth M., 1976; Changes in the chemical composition of the common shore crab *Carcinus maenas* during the molting cycle. *J.comp.Physiol.* 105: 197-205.
- Sprang S., Goldsmith E., Fletterick R., 1987; Structure of the nucleotide activation switch in glycogen Phosphorylase a. *Science* 237: 1012-1019.
- Stanier J.E., Woodhouse M.A., Griffin R.I., 1968; The fine structure of the hepatopancreas of *Carcinus maenas* L. (*Decapoda, Brachyura*). *Crustaceana* 14: 56-66.
- Steele J.E., 1963; The site of action of insect hyperglycemic hormone. *Gen.Comp.Endocr.* 3: 46-52.
- Steele J.E., 1982; Glycogen Phosphorylase in insects. *Insect Biochem.* 12: 131-147.
- Steinmetz M.A., Deal W.C.Jr, 1966; Metabolic control and structure of glycolytic enzymes: III. Dissociation and subunit structure of rabbit muscle pyruvate kinase. *Biochemistry* 5: 1399-1405.
- Storey K.B., 1980a; Regulatory properties of hexokinase from flight muscle of *Schistocerca americana gregaria*: a role of the enzyme in control of glycolysis during the rest-to-flight transition. *Insect.Biochem.* 10: 637-645.
- Storey K.B., 1980b; Kinetic properties of purified aldolase from flight muscle of *Schistocerca americana gregaria*: role of the enzyme in the transition from carbohydrate to lipid fueled flight. *Insect Biochem.* 10: 647-655.
- Storey K.B., 1983; Regulation of cockroach flight muscle phosphofructokinase by fructose 2,6-bisphosphate: role in the activation of muscle metabolism during flight. *FEBS Lett.* 161: 265-268.
- Storey K.B., 1985a; Kinetic and regulatory properties of pyruvate kinase isozymes from flight muscle and fat body of the cockroach *Periplaneta americana*. *J.comp.Physiol.* 155: 339 345.
- Storey K.B., 1985b; Phosphofructokinase from flight muscle of the cockroach *Periplaneta americana*: control of enzyme activation during flight. *Insect Biochem.* 15: 663-666.
- Storey K.B., Bailey E., 1978a; The intracellular distribution of enzymes of carbohydrate degradation in the fat body of the adult male cockroach. *Insect Biochem.* 8: 73-79.
- Storey K.B., Bailey E., 1978b; Intracellular distribution of enzymes associated with lipogenesis and gluconeogenesis in fat body of the adult cockroach. *Insect Biochem.* 8: 125-131.
- Strandholm J.J., Dyson R.D., Cardenas J.M., 1976; Bovine pyruvate kinase isozymes and hybrid isozymes: electrophoretic studies and tissue distribution. *Archs Biochem.Biophys.* 173: 125-131.
- Sugden P.H., Newsholme E.A., 1975; The effect of ammonium, inorganic phosphate and potassium ions on the activity of phosphofructokinases from muscle and nervous tissues of vertebrates and invertebrates. *Biochem.J.* 150: 113-122.

- Takahashi S.Y., Hanaoka K., 1977; Multiple protein kinases in the American cockroach *Periplaneta americana*. *Insect Biochem.* 7: 133-139.
- Tanaka T., Harano Y., Sue F., Morimura H., 1967; Crystallization, characterization and metabolic regulation of two types of pyruvate kinase isolated from rat tissues. *J.Biochem.(Tokyo)* 62: 71-91.
- Taunton O.D., Stifel F.B., Greene H.L., Herman R.H., 1974; Rapid reciprocal changes in rat hepatic glycolytic enzyme and fructose diphosphatase activities following insulin and glucagon injection. *J.biol.Chem.* 249: 7228-7239.
- Telford M., 1975; Blood glucose in crayfish: III. The source of glucose and role of the eyestalk factor in hyperglycemia of *Cambarus robustus*. *Comp.Biochem.Physiol.* 51B: 69-73.
- Thabrew M.I., Poat P.C., Munday K.A., 1971; Carbohydrate metabolism in *Carcinus maenas* gill tissue. *Comp.Biochem.Physiol.* 40B: 531-541.
- Thrasher J.R., Cooper M.D., Dunaway G.A., 1981; Developmental changes in heart and muscle phosphofructokinase isozymes. *J.biol.Chem.* 256: 7844-7848.
- Titanji V.P., 1977; Purification and properties of a phosphoprotein phosphatase from rat liver. *Biochim. Biophys.Acta* 481: 140-151.
- Titanji V.P., Zetterquist O., Engström L., 1976; Regulation *in vitro* of rat liver pyruvate kinase by phosphorylation-dephosphorylation reactions, catalyzed by cyclic-AMP dependent protein kinases and a histone phosphatase. *Biochim.Biophys.Acta* 422: 92-108.
- Tolle S.W., Dyson R.D., Newburgh R.W., Cardenas J.M., 1976; Pyruvate kinase isoenzymes in neurons, glia, neuroblastoma and glioblastoma. *J.Neurochem.* 27: 1355-1360.
- Tornheim K., Lowenstein J.M., 1976; Control of phosphofructokinase from rat skeletal muscle. Effects of fructose diphosphate, AMP, ATP and citrate. *J.biol.Chem.* 251: 7322-7328.
- Trausch G., 1976a; Glycolytic activity of the claw and tail muscle homogenates of the lobster *Homarus vulgaris*. *Biochem. Syst.Ecol.* 4: 51-54.
- Trausch G., 1976b; Comparison of glycolytic and associated enzyme activities in the claw and tail muscles of the lobster with those of the mantle of *Mytilus edulis*. *Biochem. Syst.Ecol.* 4: 55-57.
- Trausch G., 1976c; Properties of pyruvate kinase in the lobster. *Biochem. Syst.Ecol.* 4: 59-64.
- Trausch G., Bauchau A., 1980; Phosphorylation of purified lobster pyruvate kinase by cyclic 3',5'-AMP-stimulated protein kinase. *Gen.Comp. Endocr.* 40: 365.
- Trausch G., Bauchau A., 1984; Phosphorylation and dephosphorylation of purified pyruvate kinase isolated from the hepatopancreas of the lobster (*Homarus americanus*). *Mol.Physiol.* 5: 333-343.
- Travis D.F., 1955; The moulting cycle of the spiny lobster *Panulirus argus* Latreille: II. Pre-ecdysial histological and histochemical changes in the hepatopancreas and integumental tissues. *Biol.Bull.(Woods Hole)* 108: 88-112.
- Tsai M.M., Kemp R.G., 1973; Isozymes of rabbit phosphofructokinase: electrophoretic and immunological studies. *J.biol. Chem.* 248: 785-792.
- Turunen S., 1985; Absorption. W: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (red. Kerkut G.A., Gilbert L.I.), vol.4, pp.241-278, Pergamon Press, Oxford, New York.
- Urich K., Herz-Hübner U., Speck U., 1973; The metabolic fate of nutrients in the crayfish *Orconectes limosus*: V. Chemical conversion of glucose within the absorbing tissues. *J.comp.Physiol.* 86: 187-191.
- Uyeda K., 1979; Phosphofructokinase. *Adv.Enzymoi.Rel.Ar.Mol.Biol.* 48: 193-244.
- Uyeda K., Furuya E., Richards C.S., Yokoyama M., 1982; Fructose-2,6-P₂ chemistry and biological function. *Mol.Cell.Biochem.* 48: 97-120.
- Uyeda K., Furuya E., Sherry A.D., 1981; The structure of "activation factor" for phosphofructokinase. *J.biol.Chem.* 256: 8679-8684.
- Uyeda K., Racker E., 1965; Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism: IV. Hexokinase and phosphofructokinase, *J.biol.Chem.* 240: 4682-4688.
- Vaandrager S.H., Van Marrewijk W.J.A., Beenackers A.M.Th., 1986; Glycogen Phosphorylase activity in flight muscles of *Locusta migratoria* at rest and during flight - Isolation of three forms of the muscle enzyme. *Insect Biochem.* 16: 749-756.
- Vaandrager S.H., Van Marrewijk W.J.A., Beenackers A.M.Th., 1987; Kinetic properties of glycogen phosphorylases a, ab and b from flight muscles of the locust, *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* 17: 695-700.
- Van Berkel T.J.C., 1974; Some kinetic properties of M₂-type pyruvate kinase from rat liver at physiological Mg²⁺ concentration. *Biochim.Biophys.Acta* 370: 140-152.
- Van Berkel T.J.C., Koster J.F., 1973; M-type pyruvate kinase of leukocytes: an allosteric enzyme. *Biochim.Biophys.Acta* 293: 134-139.

- Van Berkel T.J.C., Koster J.F., Hülsmann W.C., 1972; Distribution of L- and M-type pyruvate kinase between parenchymal and Kupffer cells of rat liver. *Biochim.Biophys.Acta* 276: 425-429.
- Van Berkel T.J.C., Koster J.F., Hülsmann W.C., 1973; Some kinetic properties of allosteric M-type pyruvate kinase from rat liver: Influence of pH and the nature of amino acid inhibition. *Biochim.Biophys.Acta* 321: 171-180.
- Van den Oord A.H.A., 1966; The biosynthesis of the emulsifiers of the crab *Cancer pagurus* L. *Comp.Biochem.Physiol.* 17: 715-718.
- Van der Horst D.J., Van Doorn J.M., Beenackers A.M.Th., 1978; Dynamics in the hemolymph trehalose pool during flight of the locust, *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* 8: 413-416.
- Van Marrewijk W.J.A., Beenackers A.M.Th., 1979; Regulation of substrate mobilization for flight in locusts. *J.Endocr.* 80: 67P-68P.
- Van Marrewijk W.J.A., Beenackers A.M.Th., 1980; Effects of corpus cardiacum hormones on fat body metabolism directed to substrate mobilization during locust flight. *Gen.Comp.Endocr.* 40: 366.
- Van Marrewijk W.J.A., De Zwaan A., 1976; Amino acid metabolism of *Astacus leptodactylus* Esch. - IV. Role of carbon dioxide fixation and acetyl-CoA pathway in the biosynthesis of amino acid precursors. *Comp.Biochem.Physiol.* 53B: 361-365.
- Van Marrewijk W.J.A., Molwerda D.A., De Zwaan A., 1973; A comparative study of the enzyme activity of CO₂-fixing enzymes, pyruvate kinase and lactate dehydrogenase in the mussel *Mytilus edulis* L., the crayfish *Astacus leptodactylus* Esch. and the rat *Rattus sp.* *Neth.J.Zool.* 23: 229-231.
- Van Marrewijk W.J.A., Van den Broek A.Th.M., Beenackers A.M.Th., 1980; Regulation of glycogenolysis in the locust fat body during flight. *Insect Biochem.* 10: 675-679.
- Van Marrewijk W.J.A., Van den Broek A.Th.M., Beenackers A.M.Th., 1983; Regulation of glycogen Phosphorylase activity in fat body of *Locusta migratoria* and *Periplaneta americana*. *Gen.Comp.Endocr.* 50: 226-234.
- Van Marrewijk W.J.A., Van den Broek A.Th.M., Beenackers A.M.Th., 1989; Occurrence of three forms of glycogen Phosphorylase and flight-induced enzyme activation in fat body of the American cockroach *Periplaneta americana*. *Comp.Biochem.Physiol.* 94B: 165-169.
- Van Schaftingen E., 1987; Fructose 2,6-bisphosphate. *Adv.Enzymol.Rel.Ar.Mol. Biol.* 59: 315-395.
- Van Schaftingen E., Davies D., Hers H.G., 1982a; Fructose 2,6-bisphosphatase from rat liver. *Eur.J.Biochem.* 124: 143-149.
- Van Schaftingen E., Hers H.G., 1981 ; Phosphofructokinase 2: the enzyme that forms fructose 2,6-bisphosphate from fructose-6-phosphate and ATP. *Biochem.biophys.Res.Comm.* 101: 1078-1084.
- Van Schaftingen E., Hue L., Hers H.G., 1980; Fructose-2,6-bisphosphate, the probably structure of the glucose- and glucagon-sensitive stimulator phosphofructokinase. *Biochem.J.* 192: 897-901.
- Van Schaftingen E., Lederer B., Bartrons R., Hers H.G., 1982b; A kinetic study of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase from potato tubers. Application to a microassay of fructose-2,6-bisphosphate. *Eur.J. Biochem.* 129: 191-195.
- Van Weel P.B., 1970; Digestion in Crustacea. W: *Chemical Zoology* (red. Florkin M., Scheer B.T.), vol.5, pp.97-115, Academic Press, New York.
- Van Weel P.B., 1974; Hepatopancreas. *Comp.Biochem.Physiol.* 47A: 1-9.
- Vogell W., Bishai F.R., Bücher Th., Klingenberg M., Pette D., Zebe E., 1959; Über strukturelle und enzymatische Muster in Muskeln von *Locusta migratoria*. *Biochem.Z.* 332: 81-117.
- Vonk H.J., 1960; Digestion and metabolism. W: *The Physiology of Crustacea* (red. Waterman T.H.), vol.I, pp.291-316, Academic Press, New York and London.
- Vora S., 1981; Isozymes of human phosphofructokinase in blood cells and cultured cell lines: molecular and genetic evidence for a trigenic system. *Blood* 57: 724-731.
- Vora S., Francke V., 1981; Assignment of the human gene for liver-type 6-phosphofructokinase isozyme (PFKL) to chromosome 21 by using somatic cell hybrids and monoclonal anti-L antibody. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 78: 3738-3742.
- Vora S., Durham S., De Martinville B., George D.L., Francke V., 1982a; Assignment of the human gene for muscle type phosphofructokinase (PFKM) to chromosome 1 (region cen → q32) using somatic cells hybrids and monoclonal anti-M antibody. *Somat.Cell.Genet.* 8: 95-104.
- Vora S., Miranda A., Francke V., 1982b; Assignment of the human gene for platelet-type phosphofructokinase to chromosome 10 using somatic cell hybrids and specific immunoprecipitation. *Am.J.Hum.Genet.* 34: 176A.

- Vora S., Miranda A., Hernandez E., Francke V., 1983; Regional assignment of the human gene for platelet-type phosphofructokinase (PFKP) to chromosome 10p: novel use of polyspecific rodent antisera to localize human enzyme genes. *Human Genetics* 63: 374-379.
- Vora S., Seaman C., Durham S., Piomelli S., 1980; Isozymes of human phosphofructokinase: identification and subunit structural characterization of a new system. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77: 62-66.
- Walker P.R., Bailey E., 1969; A comparison of the properties of the phosphofructokinase of the fat body and flight muscle of the adult male desert locust. *Biochem.J.* 111: 365-369.
- Walker P.R., Bailey E., 1970a; Metabolism of glucose, trehalose, citrate, acetate and palmitate by the male desert locust during adult development. *J.Insect Physiol.* 16: 499-509.
- Walker P.R., Bailey E., 1970b; Changes in enzymes associated with lipogenesis during development of the adult male desert locust. *J.Insect Physiol.* 16: 679-690.
- Wang D.H., Scheer B.T., 1962; Effect of eyestalk extract on UDPG-glycogen transglucosylase in crab muscle. *Life Sci.* 5: 209-211.
- Wang D.H., Scheer B.T., 1963; UDPG-glycogen transglucosylase and a natural inhibitor in crustacean tissues. *Comp.Biochem.Physiol.* 9: 264-274.
- Webb P.W., 1979; Mechanics of escape responses in crayfish (*Orconectes virilis*). *J.exp.Biol.* 92: 125-141.
- Weber G., 1969; Regulation of pyruvate kinase. *Adv.Enzyme Regul.* 7: 15-40.
- Weeda A., De Kort C.A.D., Beenackers A.M.Th., 1979; Fuels for energy metabolism in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say. *J.Insect Physiol.* 25: 951-955.
- Weeda A., Koopmanschap A.B., De Kort C.A.D., Beenackers A.M.Th., 1980; Proline synthesis in fat body of *Leptinotarsa decemlineata*. *Insect Biochem.* 10: 631-636.
- Wegener G., Beinbauer I., Klee A., Newsholme E.A., 1987; Properties of locust muscle 6-phosphofructokinase and their importance in the regulation of glycolytic flux during prolonged flight. *J.Comp.Physiol.* 157: 315-326.
- Wegener G., Michel R., Newsholme E.A., 1986a, Fructose 2,6-bisphosphate as a signal for changing from sugar to lipid oxidation during flight in locust. *FEBS Lett.* 201: 129-132.
- Wegener G., Schmidt H., Leech A.R., Newsholme E.A., 1986b; Antagonistic effects of hexose 1,6-bisphosphate and fructose 2,6-bisphosphate on the activity of 6-phosphofructokinase purified from honey-bee flight muscle. *Biochem.J.* 236: 925-928.
- Weil D., Cottreau D., Von Cong N., Rebourcet R., Foubert C., Gross M.S., Dreyfus J.C., Kahn A., 1980; Assignment of the gene for F-type phosphofructokinase to human chromosome 10 by somatic cell hybridization and specific immunoprecipitation. *Ann.Hum.Genet.(Lond)* 44: 11-16.
- Whittell N.M., Ng D.O., Prabhakararao K., Holmes R.S., 1973; A comparative electrophoretic analysis of mammalian pyruvate kinase isozymes. *Comp.Biochem.Physiol.* 46: 71-80.
- Wiens A.W., Gilbert L.I., 1967; Variations in the glycogen of fat body, ovary, and embryo during the reproductive cycle of *Leucophaea maderae*. *J.Insect Physiol.* 13: 587-594.
- Wiersma C.A.G., Van der Veen R., 1928; Die Kohlenhydratverdauung bei *Astacus fluviatilis*. *Z.vergl.Physiol.* 7: 269-278.
- Wieser W., 1977; Slow, fast and medium fast responses of ectoterms to temperature changes: a new mechanism of metabolic compensation in *Helix pomatia*. *J.therm.Biol.* 2: 197-202.
- Wieser W., Lackner R., 1977; Inhibition of the pyruvate kinase of *Helix pomatia* by phospho-L-arginine. *FEBS Lett.* 80: 299-302.
- Wigglesworth V.B., 1972; *The Principles of Insect Physiology*, 7th edition, Chapman & Hall, London.
- Williams A.J., Lutz P.L., 1975a; The role of the haemolymph in the carbohydrate metabolism of *Carcinus maenas*. *J.mar.biol.Ass.U.K.* 55: 667-670.
- Williams A.J., Lutz P.L., 1975b; Blood cell types in *Carcinus maenas* and their physiological role. *J.mar.biol.Ass.U.K.* 55: 671-674.
- Williamson J.R., Scholtz R., Browning E.T., 1969; Control mechanisms of gluconeogenesis and ketogenesis: II. Interactions between fatty acids oxidation and the citric acid cycle in perfused rat liver. *J.biol.Chem.* 244: 4617-4627.
- Willig A., Keller R., 1973; Molting hormone content, cuticle growth and gastrolith growth in the molt cycle of the crayfish *Orconectes limosus*. *J.comp.Physiol.* 86: 377-388.
- Wimer L.T., 1969; A comparison of the carbohydrate composition of the hemolymph and fat body of *Phormia regina* during larval development. *Comp.Biochem.Physiol.* 29: 1055-1062.
- Wojtowicz M.B., Brockerhoff H., 1972; Isolation and some properties of the digestive amylase of the American lobster (*Homarus americanus*). *Comp. Biochem.Physiol.* 42B: 295-302.

- Wolter S., 1968; Isolierung und Charakterisierung von zwei Hexokinasen unterschiedlicher Spezifität aus dem Flußkrebis *Orconectes limosus* (Rafinesque). Z.Naturforsch. 236: 839-845.
- Worm R.A.A., Beenackers A.M.Th., 1980; Regulation of substrate utilization in the flight muscle of the locust *Locusta migratoria* during flight. Insect Biochem. 10: 53-59.
- Wyatt G.R., Kalf G.F., 1957; The chemistry of insect hemolymph: II. Trehalose and other carbohydrates. J.Gen.Physiol. 40: 833-847.
- Wyatt G.R., Meyer W.L., 1959; The chemistry of insect hemolymph: III. Glycerol. J.Gen.Physiol. 42: 1005-1011.
- Zammit V.A., Beis I., Newsholme E.A., 1978; Maximum activities and effects of fructose bisphosphate on pyruvate kinase from muscles of vertebrates and invertebrates in relation to the control of glycolysis. Biochem.J. 174: 989-998.
- Zammit V.A., Newsholme E.A., 1976; The maximum activities of hexokinase, Phosphorylase, phosphofruktokinase, glycerol-phosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, octopine dehydrogenase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, nucleoside diphosphatekinase, glutamate-oxaloacetate transaminase and arginine kinase in relation to carbohydrate utilization in muscles from marine invertebrates. Biochem.J. 160: 447-462.
- Zammit V.A., Newsholme E.A., 1978; Properties of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in relation to the direction and regulation of phosphoenolpyruvate metabolism in muscles of the frog and marine invertebrates. Biochem.J. 174: 979-987.
- Zebe E., 1982; Anaerobic metabolism in *Upogebia pugattensis* and *Calianassa californiens is* (Crustacea, Thalassanidea). Comp.Biochem.Physiol. 72B: 613-617.
- Ziegler R., Wyatt G.R., 1975; Phosphorylase and glycerol production activated by cold in diapausing silkmoth pupae. Nature (London) 254: 622-623.

PHOSPHOFRUCTOKINASE AND PYRUVATE KINASE OF SOME CRUSTACEAN AND INSECT TISSUES

Summary

Reactions catalyzed by phosphofructokinase (PFK) and pyruvate kinase (PK) are known as sites of glycolysis regulation in different mammalian and other animal tissues. Therefore studies on molecular and kinetic properties of these enzymes in crustacean and insect tissues were carried out. Phosphofructokinases and pyruvate kinases were isolated from the midgut gland, abdominal muscle and heart of the crayfish *Orconectes limosus* as well as from the fat body, body wall muscle and heart of the beetle *Tenebrio molitor* larvae, butterfly *Celerio euphorbiae* caterpillars and cockroach *Periplaneta americana* nymphs. In these studies, kinetic properties of the particular tissue enzymes were characterized, kinetic parameters were calculated for reactions of the enzymes with their substrates in different conditions of measurements, enzyme activators and inhibitors were designated and their effects on enzyme kinetic characteristics were established. These results were compared with results of other authors' studies on PFKs and PKs of different crustacean and insect tissues. On this basis, a role of PFK and PK in the regulation of the carbohydrate metabolism in crustacean and insect tissues was explained. It seems that the reaction catalyzed by the phosphofructokinase is a common site of glycolysis regulation. PFKs of all studied crustacean and insect tissues were characterized by the following regulatory properties:

1) co-operative interactions with a substrate, fructose-6-phosphate (F6P), illustrated by the sigmoidal shape of the reaction kinetic curve;

2) an activity inhibition under the influence of the second substrate, adenosinetriphosphate (ATP) in concentrations higher than approximately 1 mM;

3) allosteric activations by the adenosinemonophosphate (AMP) and fructose-2,6-bisphosphate (F-2,6-bP); there is a multiplied increase of PFK affinity to the substrate F6P (kinetic curve becomes hyperbolic in shape) in the presence of activators and simultaneously the inhibitory effect of higher ATP concentrations is demolished; both activators co-operate in the activation effect on the PFK and their common influence is much stronger (synergistic) than simple addition of their individual effects;

4) PFK activity depends on the adenine nucleotide concentration ratio (expressed as "energy charge" equation); predominance of ATP concentrations over the concentrations of ADP and AMP inhibits the enzyme activity, especially in lower, physiological F6P concentrations; AMP appearance activates the enzyme;

5) the enzyme is strongly sensitive to pH changes; hydrogen ion concentration modifies the enzyme affinities for substrates, activators and inhibitors.

A special role of the fructose-2,6-bisphosphate in the regulation of the PFK activity in crustacean and insect tissues should be stressed. The PFK affinity for this activator is very high, expressed by nanomolar values of the activation constant. Therefore it seems reasonable to measure concentrations of F-2,6-bP in individual tissues in different metabolic stages. Having such tissue F-2,6-bP concentrations, it is possible to create conclusions about the PFK activity and further on the activity of the whole glycolysis in those metabolic stages.

Characteristics of the phosphofructokinases of crustacean and insect tissues suggest that there is a similarity with the characteristics of PFKs from other sources, among them from mammalian tissues. The only significant differences, which were found in the insect PFK properties, were: the lack of citrate inhibitory effect and the inhibitory effect of the reaction product fructose-1,6-bisphosphate (known as an activator of the mammalian PFK). Results presented in this paper also show the similarities between characteristics of PFKs from different crustacean and insect tissues as well as large similarities between different animal species. There are differences in the values of particular kinetic parameters but general characteristics of the enzymes from different sources are similar. It suggests a great evolutionary conservatism of the enzyme but it also points out that further studies on molecular structure of the PFK are indispensable to answer the questions if

there are PFK isoenzymes of different molecular structure in different crustacean and insect tissues or if the similar kinetic characteristics is a result of the lack of structural differences between PFKs of the different tissues.

Contrary to the phosphofruktokinase, regulatory properties are characteristic only for some crustacean and insect pyruvate kinases. The reaction catalyzed by this enzyme may be a site of metabolism regulation only in those tissues in which gluconeogenesis is postulated, that is in the crustacean midgut gland and hypodermis as well as in the insect fat body. In these tissues, PK is characterized by:

1) a co-operative activation of the enzyme by its substrate phosphoenolpyruvate (PEP), which is illustrated by a sigmoidal shape of the curve of the enzyme saturation with this substrate;

2) an allosteric activation by fructose-1,6-bisphosphate, which stabilizes the PK forms of high affinity to substrate PEP;

3) allosteric inhibitions by alanine and ATP, which decrease the affinity for PEP and stabilize the forms of the lower affinity to this substrate.

PKs isolated from the glycolytic tissues like insect flight, leg, body wall and heart muscles do not show any regulatory properties. It seems that in these tissues in which glycolysis regulation relies on the turning on the high flow or its turning off, the reaction catalyzed by PFK is the most important site of the regulation. In the glucogenic tissues, that is in tissues in which glycolysis is not only turned off but also it is changed into the gluconeogenesis, a pathway in the opposite direction, the activity of the glycolysis is controlled at an additional site, *i.e.* at the pyruvate kinase reaction. The crustacean abdominal muscle, a tissue of rather high glycolytic capacity, contains a pyruvate kinase with some regulatory properties expressed only when fructose-1,6-bisphosphate is lacked. The high cell concentrations of this metabolite, found in crustacean muscle, suggest that those regulatory properties are not used in the metabolism regulation *in vivo*. Nevertheless, glucogenic abilities, suggested for crustacean muscle from time to time, could be confirmed by those, at least potential, regulatory properties of PK.

Differences of kinetic properties between pyruvate kinases of crustacean and insect tissues are reflected in differences in molecular properties of these enzymes. Results of electrophoretic and chromatographic studies strongly suggest that there are different molecular forms of PK in different tissues of these animals. The results show the existence of at least two types of these molecular forms: a "muscle" type, present in different crustacean and insect muscles and a "glucogenic" type, present in the tissues with some activity of the gluconeogenesis like crustacean midgut gland and hypodermis as well as insect fat body. However, it should be explained if there is the same molecular PK form in crustacean midgut gland and hypodermis or if so called "glucogenic" type has some variant forms in crustacean tissues.

