

EFECTO DE FRUCTOSA 2,6-BIFOSFATO SOBRE FOSFOFRUCTOKINASA Y FRUCTOSA 1,6-BIFOSFATASA DE *Dictyostelium discoideum* EN FASE DE CRECIMIENTO Y DE DIFERENCIACION

Blanca Lucía Ospina G.*

COMPENDIO

Se determinaron los parámetros cinéticos y el efecto de fructosa 2,6-bifosfato sobre fosfofructokinasa (PFK) y fructosa 1,6-bifosfatasa (FBP-asa) parcialmente purificadas, obtenidas de homogenados de células vegetativas y diferenciadas de *Dictyostelium discoideum*. La cinética de la PFK fue michaeliana frente a ambos sustratos, con valores de Km de 22-23 μM para fructosa 6-fosfato y de 6-7 μM para ATP. La PFK no se afectó por ninguno de los efectores conocidos ni por fructosa 2,6-bifosfato, aún a concentraciones superiores a los niveles endógenos. La cinética de la FBP-asa fue michaeliana, con un Km para fructosa 1,6-bifosfato de 1,2 μM . El fructosa 2,6-bifosfato inhibió fuertemente a la FBP-asa, aún en el rango nanomolar ($K_i = 1.0 \text{ nM}$), pero no se registró sinergismo entre su acción y la del AMP. Lo anterior sugiere que en *Dictyostelium discoideum* el fructosa 2,6-bifosfato puede ejercer un papel regulador de la vía gluconeogénica, pero parece no tener valor como regulador de la glucólisis.

ABSTRACT

Possible effect of fructose 2,6-bisphosphate over phosphofructokinase (PFK) and fructose 1,6-bisphosphatase (FBPase) has been measured on vegetative and differentiated phase cells of *Dictyostelium discoideum*. Partially purified PFK from *D. discoideum* was demonstrated to have Michaelian kinetics for its substrates fructose 6-phosphate and ATP (Km values: 22-23 μM and 6-7 μM for fructose 6-phosphate and ATP respectively). PFK has shown to be nonsensitive to all known positive and negative effectors and to fructose 2,6-bisphosphate despite concentrations used, exceeding 1000-fold endogenous range. Partially purified FBPase from *D. discoideum* exhibited Michaelian kinetic regarding to fructose 1,6-bisphosphate, with Km: 1.2 μM . FBPase was inhibited by fructose 2,6-bisphosphate in nanomolar range ($K_i: 1 \text{ nM}$), without synergistic effects with AMP. These results suggest that in *Dictyostelium discoideum*, fructose 2,6-bisphosphate could exert a regulator role in the gluconeogenic pathway but not in glycolytic one.

1. INTRODUCCION

La etapa limitante en la gluconeogénesis es la hidrólisis de fructosa 1,6-bifosfato hasta fructosa 6-fosfato, catalizada por la fructosa 1,6-bifosfatasa (D-fructosa 1,6-bifosfato 1-fosfohidrolasa, EC 3.1.3.11). La cinética de la FBP-asa es Michaeliana, con una ligera inhibición por exceso de sustrato. Hasta la década anterior se consideraba que el AMP era el inhibidor más potente (Hers y Hue, 1985).

La fosfofructokinasa (ATP-D-fructosa 6-fosfato 1-fosfotransferasa, EC 2.7.1.11), es la enzima que controla la vía glucolítica y cataliza la fosforilación de fructosa 6-fosfato hasta

fructosa 1,6-bifosfato. La PFK de diversas fuentes se ha descrito como una enzima alostérica compleja, con propiedades fisicoquímicas y catalíticas similares (Sols y col., 1981). La PFK presenta cinética sigmoideal para fructosa 6-fosfato y se inhibe por ATP, el otro de sus sustratos. Además, la activan el NH_4^+ , fosfato inorgánico, fructosa 1,6-bifosfato y AMP; por el contrario, la inhiben citrato y fosfoenolpiruvato (Sols y col., 1981).

En 1980, se descubrió un nuevo efector positivo de la PFK, el fructosa 2,6-bifosfato (Hers y Van Schaftingen, 1982; Uyeda y col., 1982), éster difosfórico, de peso molecular similar al del fructosa 1,6-bifosfato, derivado del

* Ph.D. Profesora Asociada. Universidad Nacional de Colombia. A.A. 237 Palmira.

anómero β de la fructosa (Figura 1). Se ha encontrado fructosa 2,6-bifosfato tanto en tejido animal (hígado, corazón, cerebro de rata) (Hers y Van Schaftingen, 1982), como vegetal (Stitt y col., 1983). Su concentración se halla en el rango micromolar (Hers y Van Schaftingen, 1982), aunque en el eucariote inferior *Dictyostelium discoideum*, es del rango nanomolar (Observación personal). También se ha sintetizado en el laboratorio (Van Schaftingen y Hers, 1980).

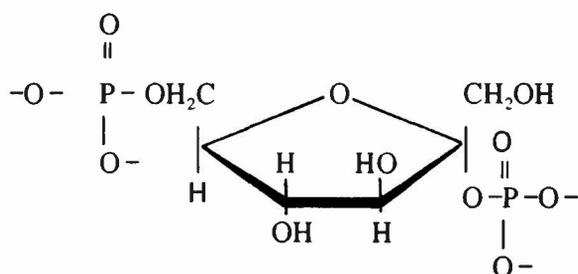


Figura 1. Estructura cíclica del fructosa 2,6-bifosfato

Inicialmente el fructosa 2,6-bifosfato se descubrió como potente activador de la PFK de hígado (Van Schaftingen y Hers, 1981a; Uyeda y col., 1981). Concentraciones en el rango micromolar revierten la inhibición por ATP e incrementan la afinidad de la PFK por su sustrato, el fructosa 6-fosfato. El efecto activador también se ha encontrado en la PFK proveniente de músculo esquelético (Uyeda y col., 1981; Van Schaftingen y Hers, 1981a) e islotes pancreáticos (Malaisse y col., 1981). Aún la PFK de levadura puede ser activada por fructosa 2,6-bifosfato (Van Schaftingen y Hers, 1981a). En espinaca (hojas), el fructosa 2,6-bifosfato podría desempeñar papel similar al encontrado en hígado (Stitt y col., 1983). No se ha encontrado efecto alguno en frijol mungo (Sabularse y Anderson, 1981) ni en *Chlorella pyrenoidosa* (Kelly y col., 1985).

El fructosa 2,6-bifosfato también inhibe la FBP-asa (Van Schaftingen y Hers, 1981b; Pilkis y col., 1981), efecto que es sinérgico con la inhibición del AMP (Van Schaftingen y Hers, 1981b).

Los hallazgos anteriores indican que el fructo-

sa 2,6-bifosfato puede considerarse una "señal fisiológica" importante y sus niveles celulares podrían ejercer un efecto regulador de los procesos de glucólisis y gluconeogénesis.

Se plantean varias hipótesis para tratar de explicar los efectos del fructosa 2,6-bifosfato sobre la PFK y la FBP-asa. En el caso de la PFK, podría tratarse de un modulador alostérico, cuya unión con alta afinidad al sitio alostérico, tendría como función la disminución de la inhibición por ATP y el incremento de la afinidad por fructosa 6-fosfato. Además, existe marcado sinergismo con la acción activadora del AMP, otro conocido activador alostérico de la PFK (Hers y Van Schaftingen, 1982).

En cuanto a su papel sobre la FBP-asa quedan abiertas dos posibilidades: dada su analogía estructural con el sustrato (fructosa 1,6-bifosfato), el fructosa 2,6-bifosfato podría actuar como un inhibidor competitivo (Pilkis y col., 1982) ó unirse a un sitio alostérico específico y diferente del sitio de unión del AMP, lo que traería como consecuencia una acción sinérgica de ambos inhibidores (François y col., 1983).

Dictyostelium discoideum, es un eucariote inferior cuyo hábitat natural es el suelo, humus y estiércol animal; se alimenta de bacterias, pero puede crecer también en condiciones axénicas en el laboratorio (Bonner, 1982). Se caracteriza por tener separadas sus fases de crecimiento y de diferenciación o estado multiagregado. En la fase vegetativa o de crecimiento existe como ameba individual, sin comunicación con otras células y se multiplica en aproximadamente 8 horas. La fase de diferenciación se inicia como respuesta al ayuno y culmina con la formación de un cuerpo fructífero o esporocarpio con dos tipos celulares distintos: esporas y células tallo (Gerisch, 1987).

Tanto la FPK como la FBP-asa de *D. discoideum* han sido identificadas y se conocen algunos parámetros cinéticos (Baumann y Wright, 1968; Baumann y Wright, 1969). Sin embargo, hasta la fecha de realización de esta investigación no se había estudiado el efecto de fructo-

sa 2,6-bifosfato sobre dichas enzimas, ni se habían estimado otros parámetros cinéticos.

Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto del fructosa 2,6-bifosfato sobre las dos enzimas mencionadas, formulando los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar los comportamientos cinéticos de la fosfofructokinasa y de la fructosa 1,6-bifosfatasa de *D. discoideum*, en fase de crecimiento y después de cinco horas de diferenciación.
2. Determinar el papel que ejerce el fructosa 2,6-bifosfato sobre cada enzima.
3. Determinar si existe algún sinergismo entre la acción de los efectores conocidos y el fructosa 2,6-bifosfato.

2. METODOS

2.1. Material biológico y extractos celulares

El material biológico usado en esta investigación fue la cepa AX-2 de *Dictyostelium discoideum*, procedente de la cepa salvaje NC₄, capaz de crecer en el medio axénico HL-5 (Watts y Ashworth, 1970). Las células en crecimiento de *D. discoideum* se recogieron a una densidad de $2-4 \times 10^6$ células/ml y se lavaron 2 veces con NaCl 0.2%. Las células diferenciadas se resuspendieron a una densidad de 1×10^7 células/ml en un tampón de fosfato de sodio y potasio 17 mM, pH 6.0 (Boto y col., 1987) y, en cada caso, las células se incubaron a 22°C con agitación a 150 rpm. La lisis se realizó mediante ultrasonido a 3 micrones durante 1 minuto. El sobrenadante obtenido después de centrifugar ($30\ 000 \times g$ durante 30 minutos), se utilizó como material de partida. Todos los procedimientos de ruptura celular y fraccionamiento se realizaron a 4°C.

2.2. Precipitación de PFK y de FBP-asa

La PFK se precipitó con sulfato amónico entre el 35 y el 50% de saturación. Después de agitar

30 minutos en frío, se centrifugó a $30\ 000 \times g$ durante 30 minutos y el precipitado se resuspendió en tampón HEPES pH 7.0 (Hepes 50 mM, pH 7.0, KCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM), con glicerol al 20%. La fracción anterior se filtró en Sephadex G-25 medium, previamente equilibrada con el mismo tampón con glicerol. Las fracciones con actividad PFK se recogieron y se utilizaron para los ensayos cinéticos.

La FBP-asa se precipitó con sulfato amónico entre el 50 y el 70%. Después de la agitación en frío durante 30 minutos, se centrifugó a $30\ 000 \times g$ durante 30 minutos. El precipitado se resuspendió en tampón TED (Trietanolamina 40 mM, pH 7.5, MgCl₂ 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, DTT 1.0 mM), con glicerol al 20%. El exceso de sulfato amónico se eliminó por diálisis, único tratamiento de purificación que no afectó a la FBP-asa.

Los protocolos de fraccionamiento descritos se emplearon tanto en células en crecimiento como con células después de 5 horas de diferenciación.

2.3. Determinación de las actividades de PFK y de FBP-asa

La actividad de la PFK se determinó utilizando un sistema enzimático auxiliar acoplado a la oxidación de NADH, midiendo espectrofotométricamente los cambios de absorbancia a 340 nm. El sistema auxiliar estaba constituido por aldolasa, triosa fosfato isomerasa y glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (Figura 2).

La mezcla de incubación, en un volumen final de 1 ml, contenía: Hepes 50 mM, pH 7.0; KCl 100 mM; MgCl₂ 5mM; NADH 0.15 mM; ATP 1 mM; 0.7-1.2 U/ml de aldolasa; 10 U/ml de triosa fosfato isomerasa; 1 U/ml de glicerol 3-fosfato deshidrogenasa; fructosa 6-fosfato 1 mM y 10 µl de la preparación enzimática. La reacción se realizó a 25°C y se inició con la adición de fructosa 6-fosfato.

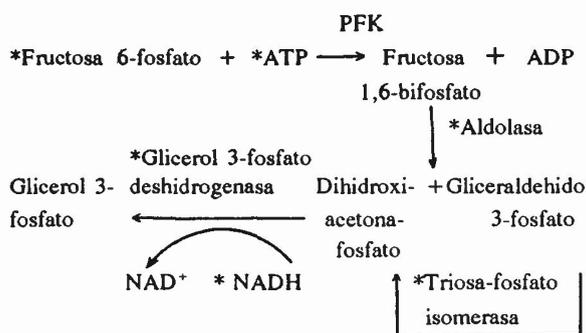


Figura 2. Esquema general utilizado en la determinación de la actividad de la fosfofructokinasa (Los marcados con (*) se adicionaron a la mezcla de reacción).

La actividad de la FBP-asa se determinó espectrofotométricamente a 340 nm, siguiendo la reducción del NADP⁺ y utilizando como sistema auxiliar fosfoglucoosa isomerasa (PGI) y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (Figura 3).

La mezcla de reacción, en un volumen final de 1 ml, contenía: Trietanolamina 40 mM, pH 7.5; MgCl₂ 1.5 mM; EDTA 0.2 mM; DTT 1 mM; NADP⁺ 0.3 mM; 1 U/ml de fosfoglucoosa isomerasa; 1 ml de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y fructosa 1,6-bisfosfato 5 μM. La reacción se realizó a 25°C y se inició con la adición de fructosa 1,6-bisfosfato.

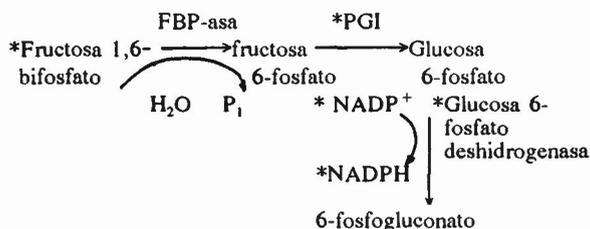


Figura 3. Esquema general utilizado en la determinación de la actividad de la fructosa 1,6-bisfosfatasa (Los marcados con (*) se adicionaron a la mezcla de reacción).

En cada caso, una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nanomol de producto en un minuto en las condiciones de ensayo (nanomoles/minuto). La actividad específica se expresó como unidades por miligramo de proteína (U/mg ó nanomoles/min/mg).

2.4. Determinación de parámetros cinéticos

Para estudiar las cinéticas de PFK y FBP-asa

se determinó su actividad frente a concentraciones crecientes de cada uno de sus sustratos para PFK se utilizó fructosa 6-fosfato entre 2.5 y 500 μM y ATP entre 2.5 y 5000 μM; para FBP-asa, fructosa 1,6-bisfosfato entre 0.5 y 50 μM. La información se procesó utilizando el modelo matemático de Lineweaver-Burk.

2.5. Determinación del efecto de fructosa 2,6-bisfosfato sobre PFK

Para determinar el efecto de fructosa 2,6-bisfosfato sobre la PFK, se incubó la preparación con concentraciones crecientes del mismo, 0.1 a 100 micromolar, durante 1-2 minutos, a 25°C. La actividad PFK se determinó a una concentración subsaturante (15 μM) de fructosa 6-fosfato.

Las mismas condiciones se utilizaron para estudiar la existencia de posible sinergismo entre el fructosa 2,6-bisfosfato y otros efectores conocidos.

2.6. Determinación del efecto de fructosa 2,6-bisfosfato sobre PBP-asa

Para determinar la inhibición de la FBP-asa de *D. discoideum* por fructosa 2,6-bisfosfato, se utilizaron concentraciones crecientes del mismo en el rango nanomolar (0 a 5 nM). Las concentraciones de fructosa 1,6-bisfosfato se mantuvieron entre 1 y 50 micromolar.

El posible sinergismo entre fructosa 2,6-bisfosfato y el AMP se evaluó utilizando concentraciones crecientes de AMP en el rango milimolar y a una concentración de fructosa 2,6-bisfosfato 1 nM.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Comportamiento cinético de PFK frente a sus sustratos

La PFK de *D. discoideum* (Cuadro 1) se comportó como una enzima típicamente Michaeliana respecto al fructosa 6-fosfato (Figura 4a). Experimentos en paralelo con la cepa salvaje M-2 en fase vegetativa no registraron variación en

Cuadro 1

Fraccionamiento con $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ de fosfofructokinasa de **Dictyostelium discoideum**

Etapa	Volumen (ml)	Proteína (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)
I Extracto crudo	6.0	174	1548	8.9
II Sobrenadante de la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 35%	7.6	100	980	9.8
III Precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entre 35-50%	1.0	35	524	15.0
IV Filtración en Sephadex	1.5	26	423	16.3

Cuadro 2

Constantes cinéticas (Km) de PFK de **Dictyostelium discoideum**

Células	Km	
	Fructosa 6-fosfato (μM)	ATP (μM)
Vegetativas	23	6
Diferenciadas (5 horas)	22	7

Cuadro 3

Actividad de PFK de **Dictyostelium discoideum** en presencia de moduladores

Adición	Actividad			
	Fase vegetativa		Fase de diferenciación (5 horas)	
	U/mg	%	U/mg	%
Ninguno	3.6	100	3.8	100
Fosfato inorgánico 5.0 mM	3.4	94	3.2	84
AMP 0.1 mM	3.6	100	3.6	95
AMPc 0.1 mM	4.0	111	3.0	79
NH_4^+ 1 mM	3.5	97	3.9	103
Fosfoenolpiruvato 2.0 mM	3.4	94	3.6	95
Citrato 1 mM	3.3	92	3.6	95

este comportamiento cinético. Iguales resultados se obtuvieron con preparaciones de PFK provenientes de células con 5 horas de diferenciación. Este tiempo coincide con los máximos niveles de AMPc alcanzados durante la fase de diferenciación.

El comportamiento de la PFK frente al ATP, también fue Michaeliano y no indicó inhibición significativa por concentraciones saturantes del mismo. El resultado fue idéntico en la fase vegetativa y tras 5 horas de diferenciación (Figura 4b).

Aunque se registró mayor actividad total de PFK en células diferenciadas, los valores de las constantes de afinidad (Km) para cada sustrato (Cuadro 2) fueron similares en ambos estados.

Los resultados anteriores están en marcado contraste con el comportamiento de las PFK provenientes de otras fuentes, las que describen curvas sigmoidales respecto a sus sustratos y muestran alto grado de regulación (Sols y col., 1981; Hers y Hue, 1985).

3.2. Evaluación de posibles reguladores de fosfofructokinasa

Tanto en fase vegetativa como después de 5 horas de diferenciación la actividad de la PFK de *D. discoideum* no se modificó en presencia de ninguno de los moduladores utilizados (Cuadro 3).

Estos resultados contrastan con el comportamiento de la PFK de otras fuentes, que está sujeta a multimodulación; se inhibe por ATP y se activa por fructosa 6-fosfato (Sols y col., 1981).

3.3. Ausencia de efecto de fructosa 2,6-bifosfato sobre PFK

El fructosa 2,6-bifosfato no tuvo efecto activador sobre la PFK de *D. discoideum*, ni en células proliferantes (fase vegetativa) ni tras 5 horas de diferenciación. Tampoco se encontró ningún tipo de sinergismo entre el fructosa 2,6-

bifosfato y los demás moduladores (Cuadro 4).

La ausencia de efecto de fructosa 2,6-bifosfato sobre PFK indicaría que esta enzima no desempeña un papel central en el metabolismo almacenador de energía de este organismo. Los resultados también sugieren que la glucosa no actúa como fuente energética principal y que probablemente *D. discoideum* depende de proteínas y de aminoácidos como fuente energética.

3.4. Comportamiento cinético de la fructosa 1,6-bifosfatasa frente a su sustrato

Según los datos del fraccionamiento con sulfato amónico entre el 50 y el 70% la actividad específica de la FBP-asa mejoró unas 40 veces (Cuadro 5).

La FBP-asa de *D. discoideum* se inhibió por su sustrato (fructosa 1,6-bifosfato) a concentraciones saturantes del mismo. Su comportamiento no varió de células en fase vegetativa a células en diferenciación (Figura 5). Los experimentos con la cepa salvaje M-2 en fase vegetativa dieron los mismos resultados.

La constante cinética para fructosa 1,6-bifosfato en ausencia de moduladores se calculó en 1.2 micromolar en ambos estados.

3.5. Inhibición de FBP-asa por fructosa 2,6-bifosfato

El fructosa 2,6-bifosfato se comportó como un potente inhibidor de la FBP-asa, cuya curva de saturación por sustrato cambió de hiperbólica a sigmoidal (Figura 6).

A concentraciones subsaturantes de sustrato, la constante de inhibición (Ki) para el fructosa 2,6-bifosfato fue de 1 nanomolar. Sin embargo, los valores de Ki aumentaron con la concentración de sustrato (Figura 7), resultado que sugiere una inhibición por competencia.

Cuadro 4

Ausencia de efecto de fructosa 2,6-bifosfato sobre PFK de *Dictyostelium discoideum*

Adición	Actividad			
	Fase vegetativa		Fase de diferenciación (5 horas)	
	U/mg	%	U/mg	%
Ninguno	3.6	100	3.8	100
Fructosa 2,6-bifosfato 0.1 μ M	2.9	81	3.8	100
Fructosa 2,6-bifosfato 1.0 μ M	3.8	106	3.3	87
Fructosa 2,6-bifosfato 10 μ M	3.1	86	3.5	92
Fructosa 2,6-bifosfato 100 μ M	4.1	114	4.2	110
Fructosa 2,6-bifosfato 10 μ M + fosfato inorgánico 5 mM + AMP 0.1 mM + NH_4^+ 1 mM	3.1	86	3.5	92

Cuadro 5

Fraccionamiento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de fructosa 1,6-bifosfatasa de *Dictyostelium discoideum*

Etapas	Volumen (ml)	Proteína (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Conc. de fructosa 2,6-bifosfato (nM)
I Extracto crudo	7.6	136.8	19.6	0.15	40.0
II Sobrenadante de la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50%	13.6	54.4	263.2	4.8	1.2
III Precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entre 50-70%	1.0	18.0	109.7	6.1	1.0
IV Precipitado anterior dializado	1.0	18.0	109.7	6.1	< 1.0

Cuadro 6

Ausencia de efecto de fructosa 2,6-bifosfato y AMP sobre FBP-asa de *Dictyostelium discoideum*

Adición	Actividad			
	Fase vegetativa		Fase de diferenciación (5 horas)	
	U/mg	%	U/mg	%
A. Control				
Ninguno	3.0	100	2.8	100
AMP 0.1 mM	3.1	103	2.6	93
AMP 0.5 mM	2.8	93	2.8	100
AMP 1.0 mM	2.2	73	2.9	104
B. Más fructosa 2,6-bifosfato 1nM				
Ninguno	1.6	100	1.0	100
AMP 0.1 Mm	1.3	81	1.1	110
AMP 0.5 mM	1.3	81	1.0	100
AMP 1.0 mM	1.2	75	0.9	90

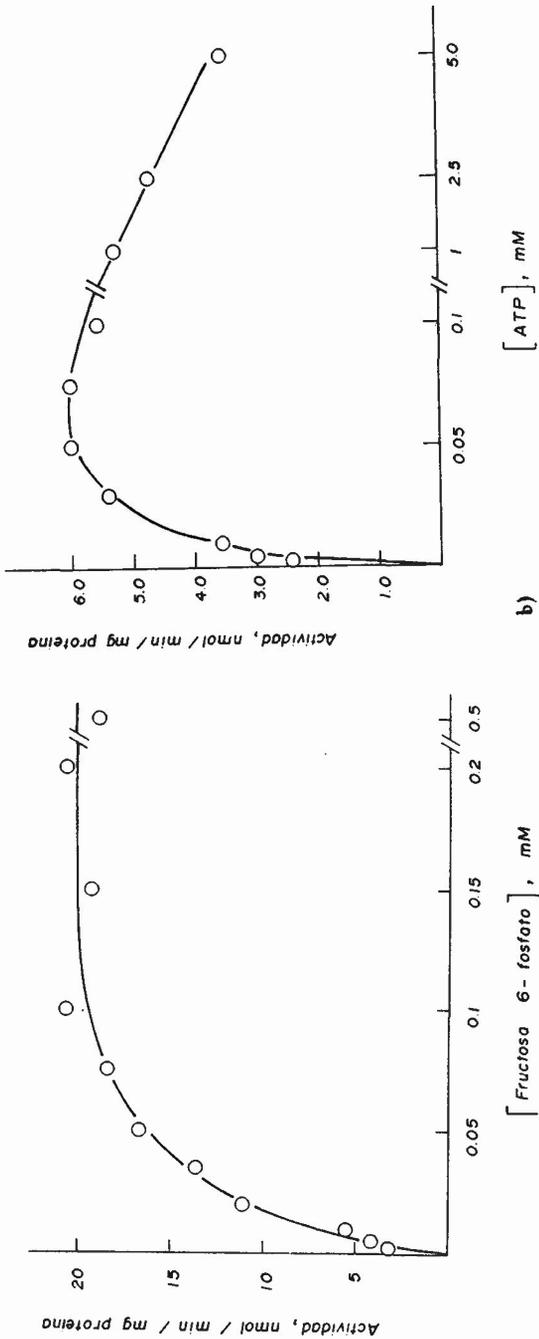


Fig. 4. Cinética de la PFK de *Dictyostelium discoideum* en fase vegetativa frente a:
 a) Fructosa 6-fosfato
 b) ATP

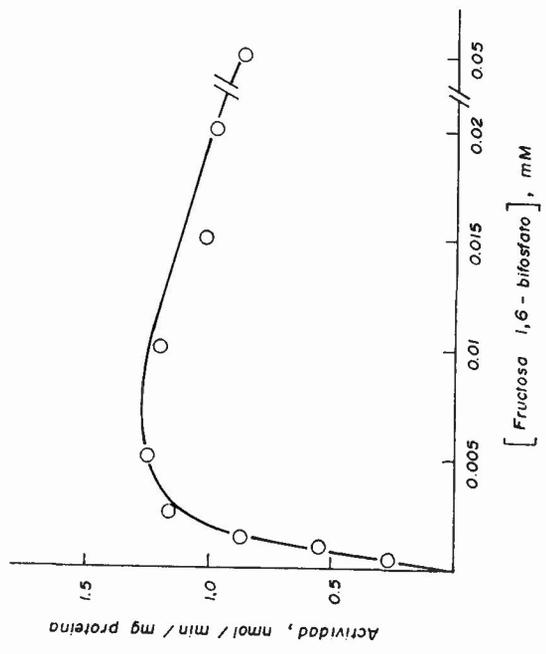


Fig. 5. Cinética de la FBP-asa de *Dictyostelium discoideum* en fase de diferenciación frente a fructosa 1,6-bisfosfato.

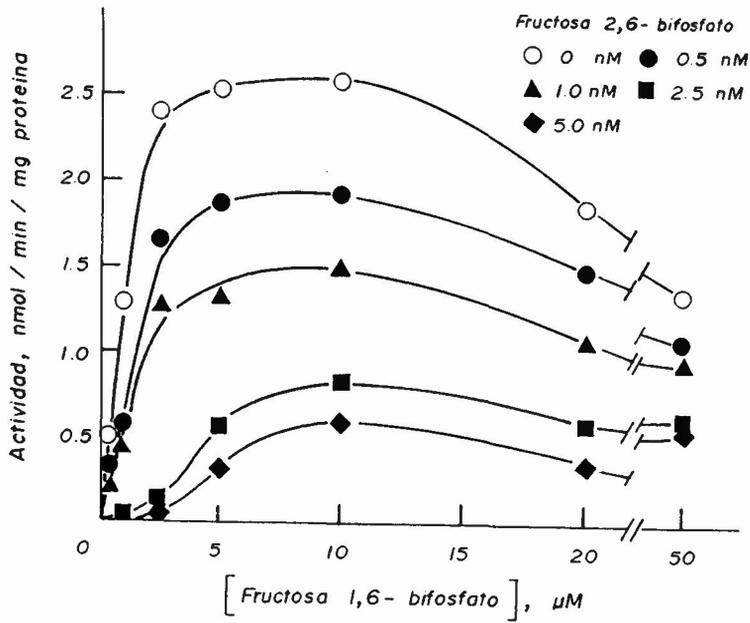


Fig. 6. Inhibición de FBP-asa por fructosa 2,6-bifosfato.

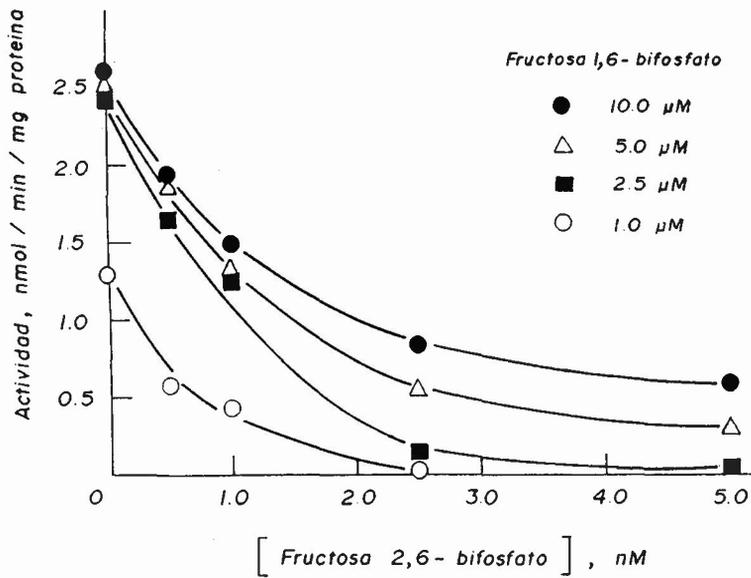


Fig. 7. Reversión por sustrato de la inhibición de FBP-asa por fructosa 2,6-bifosfato.

3.6. Ausencia de sinergismo entre fructosa 2,6-bifosfato y AMP

En *Dictyostelium discoideum* no se encontró acción sinérgica entre el fructosa 2,6-bifosfato y el AMP (Cuadro 6). Por su parte, el AMP no produjo más del 25% de inhibición a las diferentes condiciones ensayadas. Trabajos de Van Schaftingen y Hers (1981b) y Pilkis y col, (1981), caracterizan al fructosa 2,6-bifosfato y al AMP como inhibidores sinérgicos de la FBP-asa de diversas fuentes.

La extrema sensibilidad de la FBP-asa ante el fructosa 2,6-bifosfato sugiere que en *D. discoideum* este metabolito puede desempeñar un papel regulador importante. La concentración de fructosa 2,6-bifosfato en los pasos de purificación de FBP-asa (Cuadro 5) se encontró en el rango nanomolar, metabolito que va siendo removido durante el proceso. Su elevada concentración en el homogenado (40 nM) explica la escasa actividad FBP-asa detectable.

4. CONCLUSIONES

- 4.1. En *Dictyostelium discoideum* no se registraron variaciones en el comportamiento cinético de PFK y FBP-asa durante el crecimiento ni después de cinco horas de diferenciación.
- 4.2. El fructosa 2,6-bifosfato no activó la fosfofructokinasa de *Dictyostelium discoideum*, aún a concentraciones (micromolar) casi mil veces superiores a los niveles endógenos (nanomolar).
- 4.3. El fructosa 2,6-bifosfato inhibió fuertemente a la FBP-asa de *Dictyostelium discoideum*, con una K_i de 1 nM, cuyo valor puede aumentar con la concentración de sustrato.
- 4.4. No se presentó sinergismo entre la inhibición del fructosa 2,6-bifosfato y el AMP.

5. BIBLIOGRAFIA

1. BAUMANN, P. and WRIGHT, B. *Biochem.* 7:3653-3661. 1968.
2. BAUMANN, P. and WRIGHT, B. *Biochem.* 8:1655-1659. 1969.
3. BONNER, J. T. Comparative biology of cellular slime molds. In: W. LOOMIS (ed). *The development of Dictyostelium discoideum*. New York, Academic Press. 1982. p. 1-33.
4. BOTO, L.; CANO, A. and PESTAÑA, A. *Mol. Cell. Biochem.* 74:137-147. 1987.
5. FRANÇOIS, J; VAN SCHAFTINGEN, E. and HERS, H-G. *Eur. J. Biochem.* 134: 269-273. 1983
6. GERISCH, G. *Ann. Rev. Biochem.* 56:853-879. 1987.
7. HERS, H-G. and HUE, L. *Ann. Rev. Biochem.* 54:617-653. 1985.
8. HERS, H-G, and VAN SCHAFTINGEN, E. *Biochem. J.* 206: 1-12. 1982.
9. HUE, L. *Adv. Enzymol.* 52:247-331. 1981.
10. KELLY, G. J. *et al.* *Plant Cell Physiol.* 26(2): 301-307. 1985.
11. MALAISSE, W. J.; *et al.* *FEBS Lett.* 125:217-219. 1981.
12. PILKIS, S. J. *et al.* *J. Biol. Chem.* 256:3171-3174. 1981.
13. PILKIS, S. J. *et al.* *J. Biol. Chem.* 256: 3619-3622. 1982.
14. SABULARSE, D. C. and ANDERSON, R. L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 103:848-855. 1981.
15. SOLS, A. *et al.* In: HOLZER (ed). *Metabolic of Enzymes Interconversion*. Heidelberg. Springer-Verlag. 1981. 111-123 p.
16. STITT, M. *et al.* *Plant Physiol.* 72:1139-1141. 1983.
17. UYEDA, K.; FURUYA, E. and LUBY, L. J. *J. Biol. Chem.* 256:8394-8399. 1981.