

**AISLAMIENTO DEL COMPLEJO F1FO ATP SINTETASA  
 DE ASCARIS SUUM MEDIANTE CN-PAGE Y SDS-PAGE**

EVELIN ROJAS-V.<sup>1</sup> Y ZADILA SUÁREZ DE MATA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Veterinarias,  
Universidad del Zulia, Apto. 526, Maracaibo 4001,  
Estado Zulia, Venezuela  
virojas@luz.edu.ve, Fax: 0261-7596147-6144*

<sup>2</sup>*Departamento de Biología Celular,  
Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela  
zsuarez@usb.ve*

*Resumen.* El complejo multienzimático F1Fo ATP sintetasa, cataliza la síntesis e hidrólisis de ATP en membranas de procariontes y eucariotes. En este trabajo se aisló dicho complejo enzimático de las mitocondrias del músculo de *Ascaris suum* y de corazón porcino, a fin de comparar la composición en subunidades del complejo mitocondrial del parásito con el del mamífero hospedador. Las fracciones mitocondriales fueron obtenidas mediante centrifugación diferencial en sacarosa y tratadas con  $\beta$ -docecilmaltósido (2,5 mg de detergente por mg de proteína). La proteína solubilizada de membrana mitocondrial fue analizada por el método de *Colorless Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (CN-PAGE). Las bandas proteicas con actividad ATPasa en CN-PAGE, fueron extraídas y separadas en segunda dimensión mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). La proteína mitocondrial solubilizada de músculo de *Ascaris* mostró en CN-PAGE tres bandas (1, 2 y 3) con actividad ATPasa, de las cuales la banda 2 fue considerada F1Fo según las masas moleculares de las bandas en SDS-PAGE. En contraste, en el extracto de proteínas de membrana mitocondrial de corazón porcino se observó sólo una banda con actividad ATPasa en CN-PAGE (banda 3). El análisis densitométrico de la composición de las bandas 2 y 3 de la mitocondria de *Ascaris* y corazón porcino, respectivamente, refleja similitudes entre las masas moleculares de las bandas correspondientes a F1, pero diferencias entre las del dominio Fo. Estas diferencias posiblemente sean atribuidas a la evolución de los organismos ya que en helmintos el complejo F1Fo funciona en condiciones anaeróbicas. *Recibido: 01 diciembre 2008, aceptado: 26 junio 2009.*

*Palabras clave.* F1Fo, ATPasa, *Ascaris suum*, CN-PAGE, SDS-PAGE, mitocondria.

ISOLATION OF F1FO ATP SYNTHASE COMPLEX  
FROM *ASCARIS SUUM* BY CN-PAGE AND SDS-PAGE

*Abstract.* The multienzymatic complex F1Fo ATP synthase, catalyzes the synthesis and hydrolysis of ATP in membranes of prokaryotes and eukaryotes. In this work we isolated this enzymatic complex from the mitochondria of *Ascaris suum* muscle and pig heart, to compare the subunit composition of the parasite mitochondrial complex with the host complex. Mitochondrial fractions were obtained by differential centrifugation in sucrose and treated with  $\beta$ -dodecyl maltoside (2.5 mg of detergent per mg of protein); and the solubilized protein of the mitochondrial membrane was analyzed using colorless native polyacrylamide gel electrophoresis (CN-PAGE). The peptide bands with ATPasa activity in CN-PAGE were extracted and separated in second dimension by sodium dodecyl sulfate polyacrylamida gel electrophoresis (SDS-PAGE). In CN-PAGE, the solubilized protein fraction from *Ascaris* muscle mitochondria showed three bands (1, 2 and 3) with ATPase activity, and band 2 was considered F1Fo, according to the molecular masses of the SDS-PAGE bands. In contrast, only one band (band 3) with ATPase activity was observed in CN-PAGE when protein extract from pig heart mitochondrial membrane was analyzed, Densitometric analysis of the composition of bands 2 (*Ascaris* mitochondria) and 3 (pig heart mitochondria) reflected similarities between the molecular masses of the bands corresponding to F1, but differences between those of the Fo domain. These differences may be attributed to the evolution of the organisms, because in helminths the F1Fo complex functions in anaerobic conditions. *Received: 01 December 2008, accepted: 26 June 2009.*

*Key words.* F1Fo, ATPase, *Ascaris suum*, CN-PAGE, SDS-PAGE, mitocondria.

## INTRODUCCIÓN

La F1Fo ATP sintetasa es un complejo enzimático localizado en la membrana de mitocondrias, cloroplastos y bacterias. Está compuesto por dos dominios oligoméricos funcional y estructuralmente diferentes: el dominio F1-ATPasa y el dominio Fo. El dominio F1 es globular, está constituido por cinco subunidades diferentes ( $\alpha_3$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) y contiene los sitios de unión a nucleótidos (subunidades  $\beta$ ) donde cataliza la síntesis e hidrólisis de ATP. El dominio Fo es la porción transmembrana, contiene un tallo receptor para su acoplamiento con F1 y funciona como un canal para la translocación de

protones hacia F1 (Krause *et al.* 2005, von Ballmoos *et al.* 2008, Wittig y Schägger 2008).

El complejo F1Fo ATP sintetasa ha sido aislado a partir de una variedad de sistemas biológicos (McEnery *et al.* 1984, Ishmukhametov *et al.* 2005, Krause *et al.* 2005, von Ballmoos *et al.* 2008). En organismos eucariotas, este complejo enzimático mitocondrial presenta extraordinaria similitud en cuanto a estructura y propiedades, mostrando una considerable diversidad con el de procariotas. En tal sentido, los estudios realizados hasta ahora para determinar la composición de subunidades de la enzima, han revelado mediante técnicas de electroforesis bajo condiciones disociantes que la estructura más simple es encontrada en *Escherichia coli*, con una estequiometría de  $\alpha_3, \beta_3, \gamma, \delta, \epsilon$ , para F1 y  $abc_{10-12}$  para Fo, con masas moleculares de 370 y 160 kDa, respectivamente (Ishmukhametov *et al.* 2005). En contraste, la forma más compleja de la enzima es encontrada en la mitocondria de mamíferos, cuya porción F1 tiene la misma composición y estequiometría que la observada en bacterias, pero la composición de subunidades de Fo ha mostrado ser mucho más compleja (Krause *et al.* 2005 y Chen *et al.* 2007).

Hasta la fecha, los procedimientos utilizados con mayor frecuencia para el aislamiento de la F1Fo ATP sintetasa han involucrado su solubilización con detergentes (deoxicolato, dodecilmaltósido, CHAPS y otros.) y purificación mediante centrifugación en sacarosa al 20% seguida de procedimientos cromatográficos (McEnery *et al.* 1984, Krause *et al.* 2005, Ishmukhametov *et al.* 2005 y von Ballmoos *et al.* 2008). En vista de lo complejo y laborioso que resulta obtener una preparación pura y funcional del complejo F1Fo a partir de mitocondria y cloroplastos, en los años 90 surgieron algunos trabajos donde purifican en un solo paso, complejos de proteínas de membranas; entre estas, el complejo F1Fo y el dominio Fo mitocondrial, mediante el uso de *Blue Native-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (BN-PAGE). Este es un método de “cambio de carga” desarrollado para el aislamiento y separación óptima de complejos de proteínas de membrana (100–1.000 kDa) en forma nativa (Schägger y von Jagow 1991, Schägger *et al.* 1994, Grandier y Guerin 1996 y Krause y Seelert 2008). Otro método, *Colorless Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (CN-PAGE), ha sido usado también para este propósito (Schägger *et al.* 1994, Grandier y Guerin 1996, Schägger 2002, Schägger 2006, Krause 2006 y Krause y Seelert 2008).

Con el fin de determinar posibles diferencias estructurales y/o funcionales entre el dominio Fo del complejo F1Fo ATP sintetasa de *Ascaris suum* y de su hospedador mamífero, se procedió a aislar, purificar y caracterizar por primera

vez en helmintos, el complejo F1Fo a partir de la mitocondria del músculo del parásito. El adulto de *Ascaris lumbricoides* es un parásito helminto que habita en el intestino delgado del hombre y el cerdo. La mitocondria del parásito adulto, no metaboliza carbohidratos hasta CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, y en lugar de oxígeno, utiliza ácidos orgánicos insaturados como aceptores finales de electrones, y de esta manera, es capaz de sintetizar ATP por fosforilación oxidativa. Debido a la particularidad funcional de esta mitocondria es posible que estos organismos hayan desarrollado sistemas enzimáticos especializados que difieran a los presentes en su hospedador mamífero, lo que representa una herramienta valiosa en el diseño racional de drogas para el control de la enfermedad que ellos producen (Kohler 1985).

### MÉTODOS Y MATERIALES

*Material biológico:* Se utilizó *Ascaris suum* como animal de experimentación, obtenidos del intestino delgado de cerdos procesados en los mataderos del Tuy (Santa Teresa del Tuy, estado Miranda, Venezuela) y Caracas (carretera vieja de los Teques, estado Miranda). Se mantuvieron en solución salina isotónica por 24 h, se les extrajo el tejido muscular mediante disección en frío y se aisló la fracción mitocondrial. Se obtuvo además corazón de cerdo sacrificado en estos mataderos, el cuál se mantuvo en hielo hasta su traslado al laboratorio, y se aisló la fracción mitocondrial.

*Aislamiento de la fracción mitocondrial:* Se aisló la fracción mitocondrial a partir del músculo del parásito y del músculo cardíaco del cerdo por el método de centrifugación diferencial en sacarosa, según describe Saz y Lascure (1969).

*Preparación de las muestras:* Las muestras fueron preparadas utilizando una combinación de los métodos descritos por Schägger y von Jagow (1991), Schägger *et al.* (1994) y Grandier y Guerin (1996). Para ello la fracción mitocondrial proveniente de 25 y 34 g de músculo de corazón porcino y *Ascaris*, respectivamente, se resuspendió en buffer 50 mM BIS-TRIS/HCl, 750 mM ácido aminocaproico pH 7,0, y se lavó dos veces en este buffer mediante centrifugación a 13.000 rpm a 4 °C en el rotor SS-34 de una centrífuga SORVALL Modelo RC2-B (Sorvall, Wilmington, DE, EUA). La fracción mitocondrial lavada se resuspendió en el mismo buffer a razón de 10 mg de proteínas/ml. Esta suspensión fue tratada con β-docecil maltósido (2,5 mg de detergente/mg de proteína) durante 45 min. a 4 °C. La mezcla proteína-detergente se centrifugó a 35.000 rpm durante 30 min en el rotor Ty 65,1 de una ultracentrífuga Beckman Modelo L-8M (Beckman, México). El

sobrenadante fue reservado para análisis de proteínas y CN-PAGE; el material insoluble fue descartado.

*Determinación de proteínas:* La cantidad de proteína solubilizada se determinó mediante el método de Bradford (1976). Se prepararon curvas de calibración (0–20 mg/mL) usando albúmina de suero bovino (BSA) como proteína estándar y mediante la ecuación de los mínimos cuadrados se calcularon los mg de proteínas totales en cada preparación.

*Actividad ATPasa:* La actividad ATPasa en las preparaciones de proteína solubilizada se determinó espectrofotométricamente a 830 nm mediante el ensayo de Fiske y Subbarow (1925), en el cual se cuantifica el fósforo inorgánico (Pi) liberado durante la hidrólisis enzimática del ATP que conlleva a la formación de ADP + Pi. El ensayo enzimático (volumen final 1 mL) contenía: 0,15 M Tris/HCl, pH 7,6; 3 mM MgCl<sub>2</sub> y 3 mM ATP. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 15 min. y la reacción se detuvo por adición de 0,1 mL de ácido tricloroacético al 50%. La proteína precipitada se eliminó por centrifugación a 5.000 rpm durante 5 min. en centrífuga Sorvall rotor SS-34.

Para determinar actividad ATPasa sensible a inhibidores específicos del complejo F1Fo, como oligomicina y dicitclohexilcarbodiimida (DCCD), previo al ensayo, la suspensión de proteína fue incubada a temperatura ambiente durante 10–15 min. con el inhibidor. Las concentraciones de oligomicina y DCCD utilizadas en este estudio fueron establecidas previamente mediante curvas dosis-respuesta de estos inhibidores sobre la actividad ATPasa de partículas mitocondriales de *Ascaris* (Rojas 2001).

*Electroforesis nativa (CN-PAGE):* Se realizó electroforesis en primera dimensión por CN-PAGE en gel preparativo, siguiendo los procedimientos descritos por Shägger y von Jagow (1991) y Shägger *et al.* (1994). Los geles se prepararon con un gradiente lineal de acrilamida (5–13%) con 1,5 mm de espesor y fueron corridos durante 1,5 h a 4–7 °C con 100 V en el gel de apilamiento, aumentado a 500V en el gel de separación. Finalizada la corrida electroforética en la mini celda Protean II de BioRad, una parte del gel fue utilizado para ensayar la actividad ATPasa y la otra parte fue coloreada con una solución 0,2% de Coomassie Blue R-250 en metanol:ácido acético:agua (25:10:65). En los geles CN-PAGE se aplicaron entre 25–100 µg por bolsillo del sobrenadante de proteína mitocondrial mezclado con 5 µL de una mezcla de Rojo Ponceau:glicerol (1:1), para visualizar el frente de la corrida electroforética.

*Actividad ATPasa sobre CN-PAGE:* La actividad ATPasa fue visualizada directamente sobre el gel siguiendo el método descrito por Yoshida *et al.* (1975). El gel CN-PAGE o parte de él se incubó en una solución que contenía 5 mM ATP; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; y 0,05% de acetato de plomo en buffer 50 mM glicina/NaOH pH 8,6 a 60 °C, hasta que se observara una o más bandas blancas que contenían fosfato de plomo precipitado, producto de la hidrólisis del ATP en presencia de acetato de plomo. El gel fue luego lavado con agua de chorro.

*SDS-PAGE en segunda dimensión:* Las bandas de proteínas separadas en forma nativa en primera dimensión por CN-PAGE fueron extraídas del gel con un bisturí estéril, cortadas, aplicadas y separadas en segunda dimensión utilizando electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes (SDS-PAGE) según describe Laemmli (1970), usando geles de separación y apilamiento con 15% y 4%, respectivamente de acrilamida (1,5 mm de diámetro). Las electroforesis fueron realizadas utilizando la mini celda protean II de BioRad y los geles fueron coloreados con la técnica de nitrato de plata amoniacal (Wray *et al.* 1981). Las masas moleculares de las bandas de proteínas observadas fueron analizadas en base a proteínas marcadoras de peso molecular de BioRad (estándar de amplio rango) usando un densitómetro GS-690 marca BioRad (Hercules, C. A., USA) con el programa Multi-Analyst TM/PC Versión 1,1.

## RESULTADOS

*Mitocondria de músculo de Ascaris:* Se obtuvo 27,43 mg (5,5 ml) de proteína al extraer la fracción mitocondrial proveniente de 34 g de músculo de *Ascaris* con dodecilmaltósido. Esta suspensión de proteínas mostró actividad ATPasa (2,8  $\mu\text{mol/ml/min}$  y 0,1  $\mu\text{mol/ml mg}$ ) sensible a inhibición (94%) por Oligomicina (5 $\mu\text{g/ml}$ ) y 5 $\mu\text{g/ml}$  de Diciclohexilcarbodiimida (DCCD) (100%), inhibidores específicos de la actividad del complejo F1Fo (Tabla 1). Cuando se aplicó 100  $\mu\text{g}$  de esta proteína en CN-PAGE, se observó tres bandas proteicas: banda 1, muy cerca del origen del gel (Rf 0,031); banda 2 con un Rf de 0,37 y banda 3 con Rf de 0,43. Las tres bandas fueron positivas para el ensayo de actividad ATPasa. Sin embargo, en la banda 3 se observó mayor precipitado, por lo que parece haber mayor actividad (Fig. 1).

Las bandas 1, 2 y 3 fueron cortadas del gel y analizadas en segunda dimensión mediante SDS-PAGE. Se observó que la banda 1 contiene gran proporción de bandas de elevada masa molecular (7 bandas entre 25 y 69 kDa); la banda 2 contiene 16 bandas proteicas con masas moleculares de 56, 53, 49, 44, 36, 34, 32, 28, 26, 19, 16, 14, 13, 11, 10 y 8 kDa; mientras que la banda 3 contiene ocho bandas de 71, 63, 51, 34, 25, 13, 11 y 8 kDa. (Fig. 2).

Tabla 1. Actividad ATPasa de la proteína solubilizada de la mitocondria de *Ascaris suum* y corazón porcino.

Fracción de Proteína Solubilizada	Proteínas Totales (mg)	Actividad ATPasa		
		Total ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )	Específica ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )	Inhibición (%)*
<i>Ascaris suum</i> (A)	27,43	2,8	0,1	-
A + oligomicina	-	0,168	0,0061	94
A + DCCD	-	0	0	100
Corazón Porcino (P)	12,56	190,3	15,1	-
P + oligomicina	-	39,96	3,18	79
P + DCCD	-	79,93	6,36	100

\*En presencia de  $5\mu\text{g}/\text{ml}$  de cada inhibidor, A = Mitocondria de *Ascaris suum*, P = Mitocondria de corazón porcino, DCCD = dicitlohexilcarbodiimida.

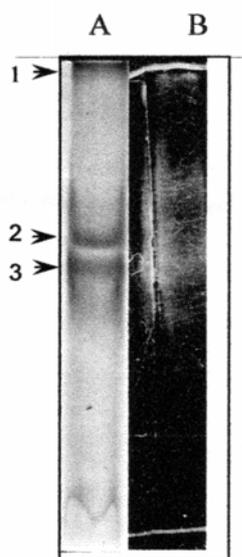


Figura 1. Electroforesis en primera dimensión en CN-PAGE de proteínas de membrana mitocondrial de *Ascaris*. En A) CN-PAGE, y en B) Actividad ATPasa en CN-PAGE en presencia de acetato de plomo.

*Mitocondria de corazón porcino:* La extracción con dodecilmaltósido de la fracción mitocondrial proveniente de 25 g de músculo de corazón porcino, rindió 12,56 g de proteína de membrana. La fracción de proteínas solubilizadas de membrana mitocondrial presentó una actividad ATPasa de 15,15  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  sensible a inhibición por  $5\mu\text{g}/\text{ml}$  de oligomicina (79%) y DCCD (58%) (Tabla 1).

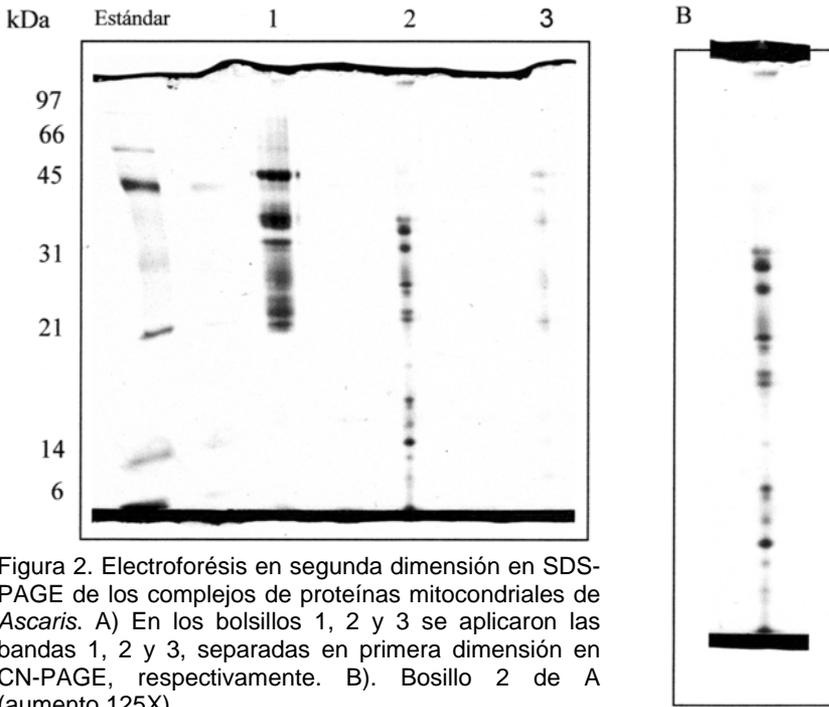


Figura 2. Electroforesis en segunda dimensión en SDS-PAGE de los complejos de proteínas mitocondriales de *Ascaris*. A) En los bolsillos 1, 2 y 3 se aplicaron las bandas 1, 2 y 3, separadas en primera dimensión en CN-PAGE, respectivamente. B). Bolsillo 2 de A (aumento 125X).

En electroforesis nativa a partir de la proteína de la membrana mitocondrial de corazón porcino se resolvieron cinco bandas proteicas: Banda 1, ubicada cerca del origen de la corrida con Rf de 0,58; banda 2 con Rf 0,43; banda 3 con Rf de 0,5; banda 4 con Rf 0,48 y banda 5 con Rf de 0,72; de éstas sólo la banda 3 mostró actividad ATPasa en el gel. Este patrón fue diferente al observado a partir de la proteína de la membrana mitocondrial de músculo de *Ascaris*, donde se observaron solo tres complejos de proteínas (Fig. 1). Cuando la banda 3 de corazón porcino fue resuelta en SDS-PAGE en segunda dimensión (Fig. 3), se observó que el perfil densitométrico fue considerablemente diferente entre ambos organismos (Fig. 2). ⇨

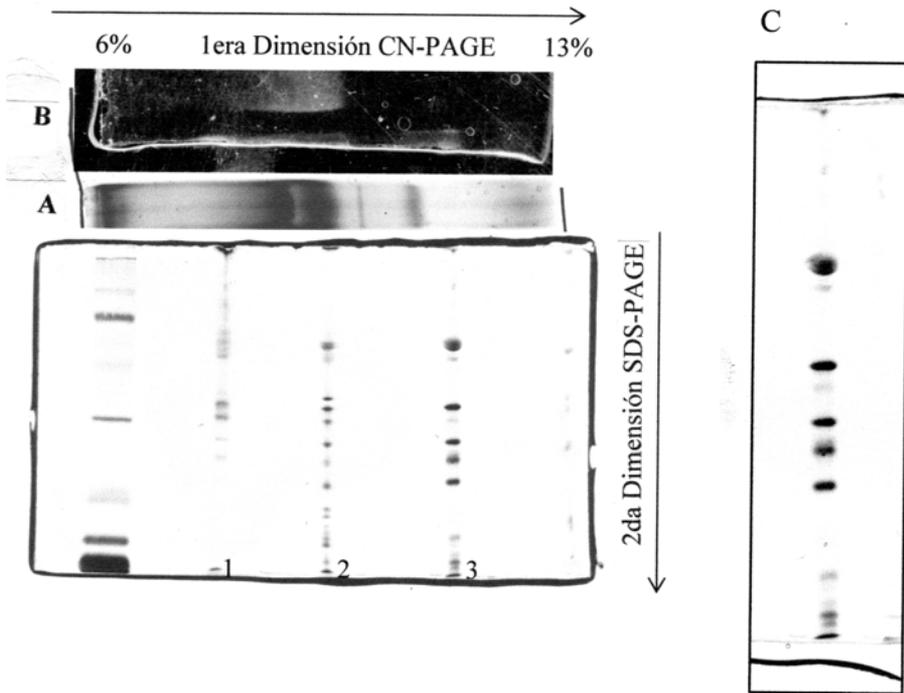


Figura 3. Electroforésis en primera y segunda dimensión en SDS-PAGE de los complejos de proteínas mitocondriales de corazón porcino. A) CN-PAGE. En los bolsillos 1, 2 y 3 se aplicaron las bandas 1, 2 y 3, separadas en primera dimensión en CN-PAGE, respectivamente. B) Actividad ATPasa en CN-PAGE en presencia de acetato de plomo. C) Bolsillo 3 de A (aumento 125X).

## DISCUSIÓN

La preparación de proteína mitocondrial aislada con  $\beta$ -dodecilmaltósido contiene el complejo F1Fo ATPsintetasa. Esto fue evidenciado porque la actividad ATPasa de dicha preparación fue inhibida por Oligomicina y DCCD, dos inhibidores específicos de la actividad ATPasa mediante su unión a las subunidades OSCP y proteolípídica del dominio Fo del complejo respectivamente (Wittig y Shägger 2008).

La combinación de electroforésis nativa en primera dimensión (CN-PAGE) y electroforésis bajo condiciones disociantes en segunda dimensión (SDS-PAGE) de un extracto de proteínas mitocondriales de *Ascaris suum* y corazón bovino, mostró diferencias en el número de bandas proteicas presentes en forma nativa y en el número de éstas que mostraron actividad ATPasa sobre el gel en presencia de acetato de plomo (tres en *Ascaris suum* y una en corazón

bovino). En vista que la actividad fue evidenciada por la formación de un precipitado blanco de fosfato de plomo sobre la banda que está hidrolizando el ATP, en la preparación de proteína mitocondrial de *Ascaris suum* pareciera que además de la actividad ATPasa de la F1Fo, existe otra fuente de fosfato en esta preparación. Es probable también que algunas de esas bandas correspondan a estados oligoméricos enzimáticamente activos del complejo F1Fo (Krause *et al.* 2005, Meyer *et al.* 2007) o asociaciones de otras proteínas mitocondriales (ej. complejos I y II de la cadena de transporte de electrones) con el dominio F1 ATPasa del complejo (Chen *et al.* 2007, Meyer *et al.* 2007). Es razonable observar diferencias en el número de complejos separados en las preparaciones de *Ascaris suum* y corazón porcino ya que en la membrana mitocondrial de mamíferos se ha descrito un mayor número de complejos involucrados en el transporte de electrones, que en la membrana del parásito (4 contra 2, respectivamente) (Shägger 2002, Wittig y Shägger 2008) (Fig. 3).

El análisis densitométrico de las bandas 2 de *Ascaris suum* y 3 de corazón porcino mostraron un patrón de bandas proteicas que se corresponden con las del complejo F1Fo mitocondrial. Entre éstas, las bandas  $\alpha$  y  $\beta$  del dominio F1, que están presentes en la misma relación estequiométrica, lo que evidencia correspondencia de estas bandas con el complejo F1Fo (McEnery *et al.* 1984). Además, la composición de bandas en la preparación de la especie *Ascaris suum* estudiada en segunda dimensión, se correlaciona con la de preparaciones de este complejo obtenidas por Rojas (2001) utilizando otros procedimientos de aislamiento.

Aunque las bandas de alta masa molecular que corresponden a las subunidades de F1 son muy similares entre el parásito y su hospedador, el número de bandas de menor masa molecular que corresponden a la porción Fo, parecen diferir (Fig. 3). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que probablemente existan entre 7–8 bandas de proteínas asociadas al dominio Fo de *Ascaris suum* lo cuál resulta intermedio entre las tres subunidades reportadas en *E. coli* (von Ballmoos *et al.* 2008) y las 8–16 presentes en eucariotas superiores (McEnery *et al.* 1984, Guerreri *et al.* 1991).

## CONCLUSIONES

El análisis densitométrico de las preparaciones del complejo F1Fo de la mitocondria de corazón porcino y *Ascaris suum* señala que las masas moleculares de las bandas correspondientes a F1 son muy similares entre estos organismos. Sin embargo, la composición del dominio Fo parece diferir entre ellos. Esto conlleva a pensar que la composición peptídica del complejo F1Fo ATP sintetasa, principal proveedor de energía en forma de ATP en el parásito,

parece haber cambiado a través de la evolución. En tal sentido, la composición del dominio F1 se ha conservado desde los organismos procariotas hasta los eucariotas ( $\alpha_3$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ), mientras que la variabilidad que ha experimentado el dominio Fo ha determinado las diferencias en la composición peptídica en el complejo F1Fo en diversos organismos.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el grado de complejidad estructural del dominio Fo de la mitocondria del músculo de *Ascaris suum* parece intermedio entre bacterias y mamíferos, por lo que el conocimiento de su estructura y composición resulta una herramienta valiosa para el diseño racional de drogas que controlen la Ascariasis, parasitosis que afecta a la quinta parte de la población mundial.

#### AGRADECIMIENTO

Al Decanato de Investigación y Desarrollo, y al Decanato Post-grado de la Universidad Simón Bolívar, estado Miranda, Venezuela, por haber financiado esta investigación.

#### LITERATURA CITADA

- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- CHEN, R., M. J. RUNSWICK, J. CARROLL, I. M. FEARNLEY Y J. E. WALKER. 2007. Association of two proteolipids of unknown function with ATP synthase from bovine heart mitochondria. *FEBS Lett.* 581(17): 3145–3148.
- FISKE, C. Y Y. SUBBAROW. 1925. The colorimetric determination of phosphorous. *J. Biol. Chem.* 66(2): 375–400.
- GRANDIER, X. Y M. GUERIN. 1996. Separation by blue native and colorless native polyacrylamide gel electrophoresis of the oxidative phosphorylation complexes of yeast mitochondria solubilized by different detergents: specific staining of the different complexes. *Anal. Biochem.* 242(2): 248–254.
- GUERRERI, F., F. ZANOTTI, G. CAPOZA, G. CALAIANNI, S. RONCHI, Y S. PAPA. 1991. Structural and functional characterization of subunits of the Fo sector of the mitochondrial FoF1-ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1059: 348–354.
- ISHMUKHAMETOV, R. R., M. A. GALKIN Y S. B. VIK. 2005. Ultrafast purification and reconstitution of His-tagged cysteine-less *Escherichia coli* F1Fo ATP synthase. *Biochim Biophys Acta.* 1706(1–2):110–116.
- KOHLER, P. 1985. The strategies of energy conservation in helminths. *Mol. Biochem. Parasitol.* 17: 1–18.
- KRAUSE, F. 2006. Detection and analysis of protein-protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (Membrane) protein complexes and supercomplexes. *Electrophoresis* 27(13): 2759–2781.

- KRAUSE, F., N. H. REIFSCHEIDER, S. GOTO Y N. A. DENCHER. 2005. Active oligomeric ATP synthases in mammalian mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329(2): 583–590.
- KRAUSE, F. Y H. SEELERT. 2008. Detection and analysis of protein-protein interactions of organellar and prokaryotic proteomes by blue native and colorless native gel electrophoresis. *Curr. Protoc. Protein. Sci.* Chapter 14: Unit 14.11.
- LAEMMLI, V. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature* 227: 680–685.
- MCENERY, M., E. BUHLE, U. AEBI Y P. PEDERSEN. 1984. Proton ATPase of rat liver mitochondria. Preparation and visualization of a functional complex using the novel zwitterionic detergent 3-[3-cholamidopropyl] dimethylammonio]-1-propanesulfonate. *J. Biol. Chem.* 259(7): 4642–4651.
- MEYER, B., I. WITTIG, E. TRIFILIEFF, M. KARAS Y H. SCHÄGGER. 2007. Identification of two proteins associated with mammalian ATP synthase. *Mol. Cell Proteomics* 6(10): 1690–1699.
- ROJAS, E. 2001. Purificación y caracterización del dominio Fo de la F1Fo ATP sintetasa mitocondrial de *Ascaris suum*. Tesis de Doctorado, Dpto. Biología Celular, División de Ciencias Biológicas, Universidad Simón Bolívar, estado Miranda, Venezuela, 228 pp.
- SAZ, H. Y O. LASCURE. 1969. The functions of phosphoenol pyruvate carboxykinase and malic enzyme in the anaerobic formation of succinate by *Ascaris lumbricoides*. *Comp. Biochem. Physiol.* 30(1): 49–60.
- SCHÄGGER, H. 2002. Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1555(1–3):154–159.
- SCHÄGGER, H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* 1(1): 16–22.
- SCHÄGGER, H., W. CRAMER Y G. VON JAGOW. 1994. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* 217: 220–230.
- SCHÄGGER, H. Y G. VON JAGOW. 1991. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199: 223–231.
- VON BALLMOOS, C., G. M. COOK Y P. DIMROTH. 2008. Unique rotary ATP synthase and its biological diversity. *Annu. Rev. Biophys.* 37: 43–64.
- WITTIG, I. Y H. SCHÄGGER. 2008. Structural organization of mitochondrial ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1777(7–8): 592–598.
- WRAY, W., T. BOULIKAS, V. P. WRAY Y R. HANCOCK. 1981. Silver staining of proteins in polyacrilamide gels. *Anal. Biochem.* 118(1): 197–203.
- YOSHIDA, M., N. SONE, H. HIRATA, Y Y. KAGAWA. 1975. A highly stable adenosine triphosphatase from a thermophilic bacterium. Purification, properties and reconstitution. *J. Biol. Chem.* 20(19): 7910–7916.