



УДК 578.6

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ  
МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЙ  
КРИОФРАКТОГРАФИИ

1. УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ Na, K-АТФ-АЗЫ  
В ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ И ПРОТЕОЛИПОСОМАХ

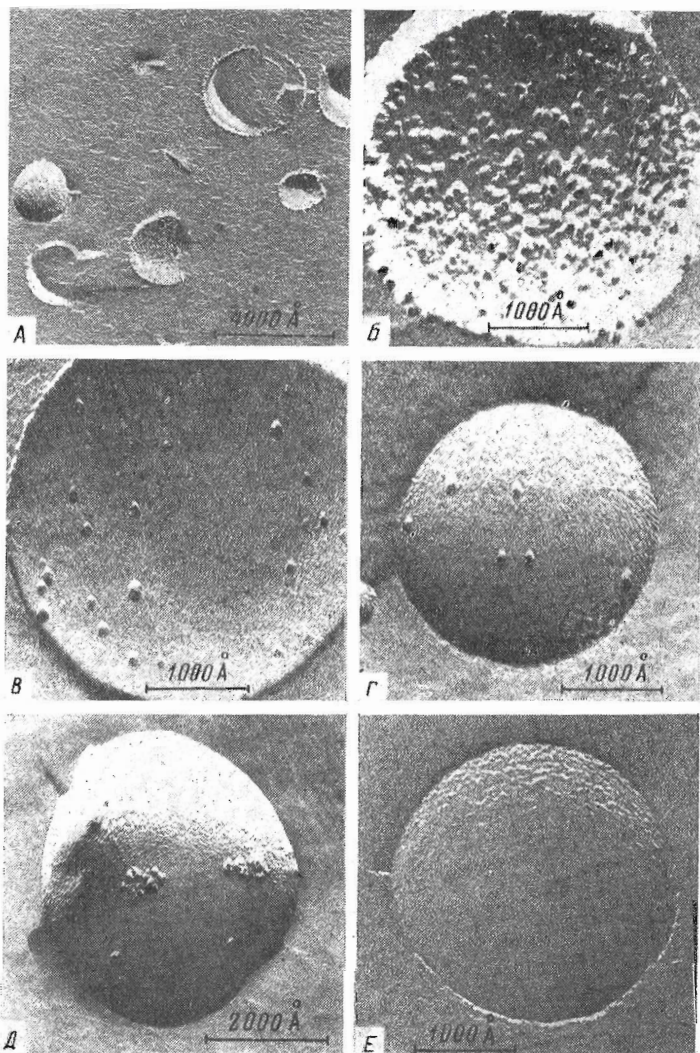
*Демин В. В., Барнаков А. Н., Джанджугазян К. Н.,  
Василова Л. А.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина  
Академии наук СССР, Москва*

Методом электронно-микроскопической криофрактографии исследованы фрагменты плазматических мембран наружного мозгового слоя почек свиньи, содержащие иммунохимически гомогенную оубанин-чувствительную Na, K-АТФ-азу, а также протеолипосомы, полученные в результате функциональной реконструкции этого фермента после его солиubilизации детергентом. Показано, что функционально активный фермент выявляется на сколах как мембранных фрагментов, так и протеолипосом в виде структурных комплексов размером 95–106 Å. На основании морфометрического анализа микрофотографий сколов двумя независимыми способами рассчитан молекулярный вес белковой части таких структурных комплексов. Оба расчета дают близкие значения: около 540 000. В состав молекулы Na, K-АТФ-азы входят в эквивальном соотношении два вида субъединиц:  $\alpha$  и  $\beta$  с суммарным молекулярным весом полипептидных цепей 136 000. Исходя из этого, сделан вывод, что локализованные в мембране структурные комплексы фермента состоят из 4  $\alpha$ - и 4  $\beta$ -субъединиц.

Молекулярные системы транспорта ионов, локализованные в клеточных мембранах, играют ключевую роль в таких процессах, как, например, трансформация энергии, поддержание ионного гомеостаза и др. К таким системам относится и Na, K-АТФ-аза — интегральный мембранный белок, осуществляющий активный транспорт ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  через клеточные мембраны за счет энергии, освобождаемой при гидролизе АТФ. К настоящему времени получен обширный материал, описывающий каталитические и транспортные свойства этого фермента, однако молекулярный механизм его функционирования не установлен. Очевидно, для решения этого вопроса наряду с функциональными исследованиями необходимо детальное изучение всех уровней структурной организации этой молекулярной машины.

Широко распространенным подходом при исследованиях структуры мембранных белков является солиubilизация их детергентом для дальнейшего изучения в солиubilизированной форме. Однако высшие уровни структурной организации, в частности четвертичная структура белков в солиubilизированной форме, могут отличаться от таковых в мембране. По этой причине при изучении структуры мембранных белков целесообразно



Микрофотографии сколов мембран препаратов Na, K-АТФ-азы. А, Б — мембранные фрагменты, В, Г — протеолипосомы, Д — протеолипосомы, обработанные антителами, специфичными к  $\alpha$ -субъединице фермента, Е — липосомы, полученные в отсутствие фермента. Направление отщепления на всех сколах снизу вверх

применение таких методов, которые позволяют изучать белки непосредственно в мембранах.

Метод электронно-микроскопической криофрактографии позволяет обнажать внутренние гидрофобные области мембран и тем самым визуализировать интегральные белки [1]. В случае Na, K-АТФ-азы наличие целого ряда данных по химическим характеристикам субъединиц фермента, возможность его выделения в гомогенном состоянии [2] и функциональной реконструкции в модельные мембраны [3] делают эффективным применение этого метода при изучении структурной организации Na, K-АТФ-азы в мембранах.

Б. настоящему времени установлено, что в состав молекулы Na, K-АТФ-азы входят в эквимольном соотношении два вида субъединиц:  $\alpha$  и  $\beta$ . [2]. Однако минимальное число субъединиц, образующих в мембране функциональную молекулу, а также их структурная организация в мем-

Плотности и диаметры ВМЧ на сколах препаратов Na, K-АТФ-азы

Препарат	Плотность, $\text{мм}^{-2}$	Диаметр, $\text{Å}$
Мембранные фрагменты	$1800 \pm 150$	$106 \pm 5$
Протеолипосомы		
вогнутые сколы	$210 \pm 70$	$95 \pm 6$
выпуклые сколы	$250 \pm 80$	$98 \pm 5$

Примечание. В таблицах даны средние значения измеряемых величин  $\pm 2\epsilon$ , где  $\epsilon$  — стандартное отклонение.

бране являются предметом дискуссий [4, 5]. В данной работе методом электронно-микроскопической криофрактографии исследовались фрагменты плазматических мембран паружного мозгового слоя почек свиньи, содержащие иммунохимически гомогенную оубаин-чувствительную Na, K-АТФ-азу, а также протеолипосомы, полученные в результате функциональной реконструкции этого фермента после его солиобилизации детергентом. Полученные данные свидетельствуют, что локализованные в мембране структурные комплексы функционально активного фермента состоят из 4  $\alpha$ - и 4  $\beta$ -субъединиц.

Известно, что при криофрактографическом исследовании мембраны, входящие в плоскости скола, расщепляются на два образующих их монослоя, обнажая при этом внутренние гидрофобные поверхности [1]. Установлено, что в большинстве случаев интегральные белки мембран выявляются на этих поверхностях в виде глобулярных частиц (так называемых внутримембранных частиц, или ВМЧ) [1].

Типичные микрофотографии сколов исследованных в данной работе препаратов Na, K-АТФ-азы представлены на рисунке. На микрофотографиях сколов мембранных фрагментов и протеолипосом на фоне относительно гладких поверхностей монослоев липида наблюдаются ВМЧ, тогда как на сколах липидных везикул, полученных без фермента, они отсутствуют. Ранее было показано, что при увеличении количества встраиваемого в протеолипосомы фермента прямо пропорционально увеличивается как число ВМЧ на единице площади скола, так и интенсивность транспорта ионов  $\text{Na}^+$  через мембраны протеолипосом [6]. Вследствие эффектов латеральной диффузии ВМЧ на сколах распределены беспорядочно. Однако после обработки протеолипосом антителами, специфичными к  $\alpha$ -субъединице фермента, наблюдается агрегация ВМЧ (рисунком Д). Сказанное выше позволяет сделать вывод, что глобулярные частицы, выявляемые на сколах, представляют собой структурные комплексы Na, K-АТФ-азы.

На сколах исследованных препаратов фермента было произведено измерение диаметров и количеств ВМЧ на единицу площади скола (табл. 1). Во всех случаях гистограммы распределения ВМЧ по размерам носят характер нормальных распределений (не приведены). Из табл. 1 видно, что средний размер структурных комплексов Na, K-АТФ-азы как в мембранных фрагментах, так и в протеолипосомах в пределах точности измерений одинаков. В состав этого фермента входит в эквивальном соотношении субъединицы  $\alpha$  и  $\beta$  с молекулярными весами полипептидных цепей 96 000 и 40 000 соответственно [2], поэтому для определения количества субъединиц, входящих в состав ВМЧ, достаточно определить ее молекулярный вес. Молекулярный вес каждой частицы должен быть кратен суммарному молекулярному весу  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц, т. е. 136 000, а показатель кратности будет определять число пар субъединиц, входящих в ее состав.

Один из методов расчета молекулярного веса ВМЧ был подробно рас-

Плотности и диаметры ВМЧ на сколах препаратов Na,K-АТР-азы

Препарат	Плотность, мкм <sup>-2</sup>	Диаметр, Å
Мембранные фрагменты	1800±150	106±5
Протеолипосомы		
вогнутые сколы	210±70	95±6
выпуклые сколы	250±80	98±5

Примечание. В таблицах даны средние значения измеряемых величин  $\pm 2\epsilon$ , где  $\epsilon$  — стандартное отклонение.

бране являются предметом дискуссий [4, 5]. В данной работе методом электронно-микроскопической криофрактографии исследовались фрагменты плазматических мембран наружного мозгового слоя почек свиньи, содержащие иммунохимически гомогенную оубаин-чувствительную Na,K-АТР-азу, а также протеолипосомы, полученные в результате функциональной реконструкции этого фермента после его солюбилизации детергентом. Полученные данные свидетельствуют, что локализованные в мембране структурные комплексы функционально активного фермента состоят из 4  $\alpha$ - и 4  $\beta$ -субъединиц.

Известно, что при криофрактографическом исследовании мембраны, находящиеся в плоскости скола, расщепляются на два образующих их монослоя, обнажая при этом внутренние гидрофобные поверхности [1]. Установлено, что в большинстве случаев интегральные белки мембран выявляются на этих поверхностях в виде глобулярных частиц (так называемых внутримембранных частиц, или ВМЧ) [1].

Типичные микрофотографии сколов исследованных в данной работе препаратов Na,K-АТР-азы представлены на рисунке. На микрофотографиях сколов мембранных фрагментов и протеолипосом на фоне относительно гладких поверхностей монослоев липида наблюдаются ВМЧ, тогда как на сколах липидных везикул, полученных без фермента, они отсутствуют. Ранее было показано, что при увеличении количества встраиваемого в протеолипосомы фермента прямо пропорционально увеличивается как число ВМЧ на единице площади скола, так и интенсивность транспорта ионов Na<sup>+</sup> через мембраны протеолипосом [6]. Вследствие эффектов латеральной диффузии ВМЧ на сколах распределены беспорядочно. Однако после обработки протеолипосом антителами, специфичными к  $\alpha$ -субъединице фермента, наблюдается агрегация ВМЧ (рисунок, Д). Сказанное выше позволяет сделать вывод, что глобулярные частицы, выявляемые на сколах, представляют собой структурные комплексы Na,K-АТР-азы.

На сколах исследованных препаратов фермента было произведено измерение диаметров и количеств ВМЧ на единицу площади скола (табл. 1). Во всех случаях гистограммы распределения ВМЧ по размерам носят характер нормальных распределений (не приведены). Из табл. 1 видно, что средний размер структурных комплексов Na,K-АТР-азы как в мембранных фрагментах, так и в протеолипосомах в пределах точности измерений одинаков. В состав этого фермента входят в эквимольном соотношении субъединицы  $\alpha$  и  $\beta$  с молекулярными весами полипептидных цепей 96 000 и 40 000 соответственно [2], поэтому для определения количества субъединиц, входящих в состав ВМЧ, достаточно определить ее молекулярный вес. Молекулярный вес каждой частицы должен быть кратен суммарному молекулярному весу  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц, т. е. 136 000, а показатель кратности будет определять число пар субъединиц, входящих в ее состав.

Один из методов расчета молекулярного веса ВМЧ был подробно рас-

смотрен Брантоном и Димером [1] и впоследствии получил развитие в работах Йоргенсена с соавт. [7]. В соответствии с этим методом на микрофотографиях сколов измеряется относительная площадь, занимаемая молекулами липида на единице площади скола. Затем, исходя из состава липидной фазы мембран, вычисляется суммарная масса молекул липида на единице площади мембраны, которая в свою очередь, согласно независимо определенному соотношению «липид/белок» для данных мембран, определяет общую массу известного числа ВМЧ на рассматриваемой площади. Следовательно, выражение для молекулярного веса одной ВМЧ можно записать следующим образом:

$$M = \frac{2[1 - \rho \pi d^2/4]}{\Delta_{\text{л}} k \rho}, \quad (1)$$

где  $M$  — молекулярный вес одной ВМЧ,  $\rho$  — число ВМЧ на  $1 \text{ мкм}^2$  мембраны,  $d$  — диаметр ВМЧ,  $k$  — соотношение «липид/белок» для данных мембран,  $\Delta_{\text{л}}$  — среднее значение по весовому содержанию отношения площади, занимаемой одной молекулой липида в мембране, к ее молекулярному весу.

Известно, что фрагменты плазматических мембран внешнего мозгового слоя почек кролика, содержащие Na,K-АТФ-азу, содержат 15% холестерина, 36% фосфолипидов и 49% белка в весовых соотношениях [8]. Исследованные в данной работе плазматические мембраны из почек свиньи по этим характеристикам практически не отличаются от препарата из почек кролика. Согласно [1], молекула холестерина, имеющая молекулярный вес 386, занимает в мембране площадь  $38 \text{ \AA}^2$ . Средняя площадь, приходящаяся на одну молекулу фосфолипида, равна  $50 \text{ \AA}^2$ , а усредненное значение ее молекулярного веса составляет 800. Подставляя численные значения в выражение (1) с учетом точности измерения  $\rho$  и  $d$ , получаем  $M = 500\,000 \pm 63\,000$ . Из-за влияния артефактов, возникающих при получении реплик, истинные размеры ВМЧ могут быть меньше наблюдаемых на  $15\text{--}25 \text{ \AA}$  [9]. В этом случае молекулярный вес ВМЧ диаметром  $80 \text{ \AA}$  равен  $599\,000 \pm 50\,000$ .

Приведенный способ расчета использует 8 параметров, характеризующих препарат фермента, из которых только 2 определяются по микрофотографиям сколов. По этой причине даже при незначительном снижении точности измерения каждого из параметров суммарная ошибка существенно возрастает, что приводит к расширению интервала получаемых значений. Поэтому в целях получения большей достоверности конечного результата молекулярный вес ВМЧ был рассчитан другим независимым способом, в котором использовались только 3 параметра, характеризующих исследуемые мембраны, причем 2 из них определялись по микрофотографиям сколов.

Основная идея второго способа расчета состоит в пересчете концентрации белка в единице объема исследуемого препарата фермента на число ВМЧ в том же объеме, которое определяется путем стереологического анализа микрофотографий сколов. Суть стереологического метода состоит в следующем: первоначально по микрофотографиям сколов определяется среднее число пересечений поверхностей сколов мембран на единицу длины случайным образом проведенной линии, так называемой тестовой линии. Согласно теории стереологического анализа, удвоенное значение этого параметра равно суммарной площади мембран в единице объема препарата [10]. Поскольку число ВМЧ на единицу площади мембраны известно, записать выражение для молекулярного веса ВМЧ можно следующим образом:

$$M = \frac{CN}{2I_L \rho}, \quad (2)$$

где  $M$  — молекулярный вес одной ВМЧ,  $I_L$  — среднее число пересечений.

Результаты стереологического анализа микрофотографий сколов мембранных фрагментов

Препарат	Концентрация белка, мг/мл	Площадь мембран в 1 мл, $\text{см}^2 \cdot 10^{-3}$	Концентрация ВМЧ, $\text{мл}^{-1} \cdot 10^{-15}$
1	2,56	$7,84 \pm 0,34$	$2,82 \pm 0,26$
2	1,60	$4,78 \pm 0,40$	$1,72 \pm 0,20$

сколов мембран на единицу длины тестовой линии,  $\rho$  — плотность ВМЧ на единицу площади мембраны,  $C$  — концентрация белка в единице объема препарата,  $N$  — число Авогадро.

Результаты стереологического анализа и определения концентрации белка для 2 препаратов фермента суммированы в табл. 2. Подставляя в выражение (2) численные значения из табл. 2 с учетом точности их измерений, получаем соответственно для двух препаратов фермента:  $M_1$   $546\,000 \pm 51\,000$ ,  $M_2$   $560\,000 \pm 66\,000$ .

Таким образом, двумя независимыми способами расчета получены сходные величины молекулярного веса ВМЧ. Однако второй способ расчета значительно меньше подвержен влиянию точности измерений входящих в него параметров на конечный результат, так как в этом случае не используется величина диаметра ВМЧ, истинное значение которой, как отмечалось выше, может отличаться от наблюдаемой из-за влияния артефактов получения реплик. Этот метод расчета может быть использован в тех случаях, когда неизвестен липидный состав исследуемых мембран, соотношение «липид/белок» и т. д.

Как отмечалось выше, молекулярный вес ВМЧ должен быть кратен сумме молекулярных весов  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц фермента, т. е. 136 000. Для всех расчетных интервалов, полученных двумя способами, этому условию удовлетворяет только одно значение — 544 000, что соответствует содержанию 4 пар субъединиц фермента в одной ВМЧ.

Приведенные данные не могут однозначно ответить на вопрос, является ли структурный комплекс Na,K-АТФ-азы состава  $\alpha_4\beta_4$  единичной молекулой фермента, способной осуществлять активный транспорт ионов, или в его состав входят, например, две независимо работающие молекулы. Установлено, что минимальный молекулярный вес солибилизированного детергентом белкового комплекса фермента, способного гидролизовать АТФ, равен 276 000, что соответствует субъединичному составу  $\alpha_2\beta_2$  [4]. Однако результаты исследований кинетики ингибирования и связывания с ферментом его специфического ингибитора оубаина [5], включения АТФ и  $^{32}\text{P}$  в фермент [11], а также сравнение скоростей гидролиза АТФ и других нуклеотидтрифосфатов, гидролиз которых в отличие от АТФ не стимулирует катион-транспортную функцию фермента [12], свидетельствуют о том, что все эти процессы имеют кооперативный характер и требуют участия не менее 4  $\alpha$ -субъединиц в составе функционально активной молекулы Na,K-АТФ-азы. По этим причинам можно предположить, что выявляемые методом электронно-микроскопической криофрактографии структурные комплексы фермента, имеющие состав  $\alpha_4\beta_4$ , представляют собой отдельные функционально активные молекулы Na,K-АТФ-азы.

### Экспериментальная часть

Выделение Na,K-АТФ-азы из почек свиньи, определение белка и АТФ-азной активности, а также получение антител, специфичных к  $\alpha$ -субъединице фермента, проводили согласно [2]. Активность полученных препаратов фермента составляла 2000–2400  $\mu\text{моль P}_i/\text{мг} \cdot \text{ч}$ . Липиды из плазматических мембран (50 мг) экстрагировали по методу Фолча в модификации Блайя и Дайера [13] и упаривали при 30°С в вакуум-эксикаторе до по-

стоянного веса. Количество фосфолипидов в общей фракции липидов измеряли путем определения органического фосфата по методу Бартлета [14]. Протеолипосомы из яичного лецитина и Na,K-АТФ-азы готовили с помощью метода быстрого разбавления [15] с соотношением «липид/белок» 10:1. Концентрацию белка в препаратах измеряли по методу Лоури [16].

Перед криофиксацией в переохлажденном жидком фреоне-22 во все препараты в качестве криопротектора был добавлен глицерин в количестве 25% по объему. Время инкубации с глицерином 1 ч, температура: 20°С. Скальвание и оттенение поверхностей сколов смесью Pt—С при температуре объектов —196°С и давлении  $133 \cdot 10^{-6}$  Па проводили в установке ВАФ-301 по стандартной методике [4]. Полученные реплики снимали на дистиллированную воду, а затем переносили на 75% серную кислоту. Реплики отмывали 15 ч на серной кислоте при 20°С. После этого их переносили на электронно-микроскопические сеточки и изучали в электронном микроскопе JEM-100С при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Диаметры ВМЧ измеряли перпендикулярно направлению оттенения под измерительным микроскопом УИМ-23 при конечном увеличении 500 000. Для каждого препарата проводили около 100 независимых измерений. Плотности ВМЧ на сколах измеряли путем наложения квадратной сетки на скол при конечном увеличении 200 000. При этом суммарная площадь сколов для каждого препарата составляла ~3 мкм<sup>2</sup>. Система тестовых линий, использовавшаяся при стереологическом анализе, представляла собой сетку параллельных линий. Суммарная площадь сколов для каждого препарата равнялась 2000 мкм<sup>2</sup>.

Выражаем искреннюю благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за постоянный интерес к работе и ценные критические замечания, высказанные при ее обсуждении.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Branton D., Deamer D. W. Membrane structure.— *Protoplasmatologia*, II, E, I. N. Y.: Springer-Verlag, 1972, p. 1—70.
2. Джанджугазян К. Н., Модянов П. Н., Овчинников Ю. А. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-активируемая аденозинтрифосфатаза из почек свиньи. I. Выделение и химическая характеристика фермента и его субъединиц.— *Биоорг. химия*, 1981, т. 7, № 6, с. 847—857.
3. Goldin S. M. Active transport of sodium and potassium ions by the sodium and potassium ion-activated adenosine triphosphatase from renal medulla.— *J. Biol. Chem.*, 1977, v. 252, № 16, p. 5630—5642.
4. Esmann M., Christensen C., Karlsson K.-A., Hansson G. C., Skou J. C. Hydrodynamic properties of solubilized (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase from rectal glands of *Squalus acanthias*.— *Biochim. et biophys. acta*, 1979, v. 567, № 2, p. 410—422.
5. Hansen O., Jensen J., Norby J., Ottolenghi P. A new proposal regarding the subunit composition of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase.— *Nature*, 1979, v. 280, № 5721, p. 410—412.
6. Skriver E., Maunsbach A. B., Jorgensen P. L. Ultrastructure of Na,K-transport vesicles reconstituted with purified renal Na,K-ATPase.— *J. Cell. Biol.*, 1980, v. 86, № 9, p. 746—754.
7. Deduchi N., Jorgensen P. L., Maunsbach A. B. Ultrastructure of the sodium pump. Comparison of thin sectioning, negative staining, and freeze-fracture of purified, membrane-bound Na,K-ATPase.— *J. Cell. Biol.*, 1977, v. 75, № 3, p. 619—634.
8. Jorgensen P. L. Purification and characterization of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase. 4. Estimation of the purity and of the molecular weight and polipeptide content per enzyme unit in preparations from the outer medulla of rabbit kidney.— *Biochim. et biophys. acta*, 1974, v. 356, № 1, p. 36—52.
9. McNitt N. S., Weinstein R. S. Membrane ultrastructure at mammalian intercellular junctions.— *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 1973, v. 26, № 1, p. 45—101.
10. Салгыков С. А. Стереометрическая металлография. М.: Металлургия, 1976, с. 65—70.
11. Askary A., Huang W. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase: half-of-the-subunits cross-linking reactivity suggests an oligomeric structure containing a minimum of four catalytic subunits.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1980, v. 93, № 2, p. 448—453.
12. Emelyanov E. A., Tunitskaya V. H., Boldyrev A. A. Adenosine-5'-(*p*-fluorosulfonylphenylphosphate) as a tool for investigation of cooperative properties of Na,K-ATPase.— *FEBS Lett.*, 1980, v. 114, № 2, p. 334—338.
13. Рейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975, с. 75—78.

14. Bartlett G. R. Phosphorous assay in column chromatography.— J. Biol. Chem., 1959, v. 234, № 3, p. 466—471.
15. Zwizinski C., Wickner W. Studies of asymmetric membrane assembly.— Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 474, № 2, p. 169—176.
16. Lowri O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent.— J. Biol. Chem., 1951, v. 193, № 1, p. 265—275.

Поступила в редакцию  
29.V.1981

**STUDIES OF THE MEMBRANE PROTEINS BY FREEZE FRACTURE ELECTRON  
MICROSCOPY. I. ULTRASTRUCTURE ORGANIZATION OF Na, K-ATPase IN  
PLASMA MEMBRANES AND LIPID-PROTEIN VESICLES**

DEMIN V. V., BARNAKOV A. N., DZHANDZHUGAZYAN K. N.,  
VASILOVA L. A.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy  
of Sciences of the USSR, Moscow*

Plasma membranes from pig kidney outer medulla containing ouabain-sensitive Na, K-ATPase in homogeneous form and lipid-protein vesicles containing reconstituted enzyme after its detergent solubilization were studied by freeze fracture electron microscopy. It was shown that on the fracture planes of both plasma and vesicle membranes the functionally active enzyme is revealed as structural complexes of 95-106 Å in diameter. On the basis of morphometrical analyses of micrographs, two independent calculations of the protein molecular weight of such structural complexes were made. Both gave a similar molecular weight of about 540 000 D. Taking into consideration that the enzyme consists of two types of subunits in equimolecular ratio and in total their polypeptide chain molecular weight is 136 000, the conclusion was made that the structural complexes of Na, K-ATPase localized in the membrane consist of 4  $\alpha$ - and 4  $\beta$ -subunits.