

Válasz Dr. Páli Tibor opponensi véleményére, amelyet “Sejt- és lipid membrán struktúrák. Az elektromos-, termális- és kémiai kölcsönhatások szerepe.” című MTA doktori értekezésemre adott.

New York, 2012. március 12.

Dr. Sugár István

### Kritikai észrevételek

A tézisfüzet 2. oldalának alján a szerző felsorolja a membrán biofizikában kiterjedten alkalmazott kísérleti módszereket. Ezek közül hiányolom a Harden M. McConnell által bevezetett spinjelző elektron paramágneses rezonancia (EPR) spektroszkópiát, amely technika éppen a membrán kutatásban teljessé vált ki. A lipid-fehérje kölcsönhatás sztöchiometriájáról és dinamikájáról éppen a spinjelző EPR technikának köszönhetően tudjuk a legtöbbet, többek között Derek Marsh kutatásainak köszönhetően, de a lipidek laterális diffúziójáról (pl. Jack Freed munkáiban) és a membránfehérjék szerkezeti vizsgálatáról (pl. Wayne Hubbel és James Hyde munkáiban) is nagy számú fontos közlemény jelent meg.

Válasz

Köszönöm az észrevételt, amelynek megfelelően módosítottam a tézisfüzet 2. oldalát és ez a javított példány megtekinthető a pályázati anyagomban.

A magyar nyelven írott tézisfüzetben van jónéhány bosszantó nyelvtani és gépelési hiba (pl. “kiszámoltam”, hiányzó pont a mondat végéről, sok helyen hiányzó vessző, “fenomenologikus”, “tanulmányoztam”, “mikrovillus” vs. “microvillus”, “elektrofúzióját”, “sejt membrán” vs. “sejtmembrán”, “sikkal”, “mig”, “amig”, “hámsejtek”, “kialakúlhatnak”, “disszipációjára”, diffúzióját”, “alakúl” - ez a felsorolás nem teljes). Nem mentség erre az a körülmény, hogy a szerző mintegy harminc éve külföldön él, mert ezeket a hibákat a nyomtatás előtti alapos átolvasással el lehetett volna kerülni.

Válasz

Kijavítottam a nyelvtani hibákat a tézisfüzetben, és ez a javított példány megtekinthető a pályázati anyagomban.

Értekezés, 12. oldal alja (apróság): Ha  $U_m$  definíciója szerint  $d\langle a \rangle/dU$  maximumát jelenti, akkor nem meglepő, hogy az átlagos pórus méret, azaz  $\langle a \rangle$ , éppen  $U_m$ -nél változik legjobban. Az állítás a definíció következménye.

Válasz

Sajnálom, hogy a fogalmazás félreérthető. Igen.  $U_m$ -et az a feszültség definiálja, ahol  $d\langle a \rangle/dU$  a legmeredekebb.

Sajnos az értekezés általam olvasott nyomtatott változában nagyon sok ábrán fontos részletek hiányoznak. Ez valószínűleg másolási vagy nyomtatási hiba miatt van, ugyanis az elektronikus (PDF) változatban rendben vannak az ábrák. Ezzel szemben az utóbbiban gyakorlatilag használhatatlanok a képletek (talán csak az én számítógépemen, esetleg valami hibás font behelyettesítés miatt). Ezért egyszerre kellett olvasnom a nyomtatott és az elektronikus dokumentumot. A nyomtatott verzióban a 19. oldal rossz helyen van, és hiányoznak az 50., 53., 82. és 84. oldalak. Remélem, hogy a levéltárban tárolandó példányon mindez korrigálva lesz, mert így most mind a nyomtatott, mind az elektronikus változat nyomdatechnikai megjelenése méltatlan az elvégzett munkához.

Válasz

Az MTA szabályai szerint sajnos már nem lehet változtatni, még formai szempontból sem, az értekezésen. Így a számos beadott példányból a formai szempontból legjobb kerül a levéltárba. Az elektronikus változatban a képleteket rendben találtam.

## Kérdések

- Az értekezés első fejezetéből (első két fő tézispont) egy olyan elméleti modell rajzolódik ki, amely nagyon sokrétű kvantitatív predikciókra képes. Ezzel szemben úgy tűnik, hogy a modell predikcióihoz képest kevés a citált kísérleti adat. Ha kevés volt a kísérleti adat a szakirodalomban, akkor nem merült-e fel az elméleti munka során (vagy azóta), hogy egy kísérletező csoportban, az elméleti modellhez maximálisan igazodó kísérleti modellmembrán rendszeren következetesen végigmérjék a modell által jósolt minél több jelenséget, és szisztematikusan összevegyék az elméleti modellel?

Válasz

Chizmadzhev Professzor csoportja végezte el a legszisztematikusabb méréseket főleg BLM-en (Black Lipid Membrane), amelyek az elméleti munkára stimuláló hatással voltak. Ezen eredményeket hét cikkből álló sorozatban adták közre a Bioelectrochemistry Bioenergetics folyóiratban 1979-ben (6. kötet 37-104 oldal). Ebben az időszakban közzétettek kevesbé szisztematikus méréseket. Például Benz és Zimmermann (J. Membr. Biol. (1979) 48:181-204; Bioelectrochem. Bioenerg. (1980) 7:723-739; BBA (1981) 640:169-178) BLM-en végzett méréseket, és jóval később

Needham és Hochmuth óriás lipid vezikulán (Biophys. J. (1989) 55:1001-1009). A szisztematikus kísérleti munka ebben az esetben megelőzte az elméleti munkát.

Fontos még megemlíteni az úgynevezett “számítógépes kísérleteket”. Ezek az eredmények az elektroporáció molekuláris dinamikai szimulációiból adódnak. A szimulációk atomi szinten mutatják az elektroporáció dinamikáját. A szimulációk visszaadják a kísérleti eredmények jelentős részét, ami az atomi szintű szimulációk megbízhatóságát támasztja alá. A szimulációk legfontosabb eredményei (R.A. Bockmann et al., Kinetics, statistics, and energetics of lipid membrane electroporation studied by molecular dynamics simulations. Biophys. J. 2008, 95:1837-1850; M. Tarek, Membrane electroporation. Biophys. J., 2005, 88:4045-4053):

- a) Egy kritikus transzmembrán télerő (0.36-0.7V/nm) felett topologialag kör alakú pórusok keletkeznek a membránban. A pórusok néhány nanoszekundum alatt kialakulnak
- b) A pórus kialakulás lépései: Először, a membrán mindkét rétegében lévő, poláris fejcsoportok kissé elfordulnak. Ezután előpórusok formálódnak, amelyek 3-4 lipid fejcsoportot és számos vízmolekulát tartalmaznak. Végül kialakulnak a pórusok, amelyek falát poláris fejcsoportok borítják.
- c) A pórus kialakulás során lipid molekulák szabadulnak ki a lipid matrixból az extra- és intra celluláris térbe.
- d) A tér megszűntével a pórus bezáródás ugyanolyan gyors mint a kinyílás. A mérések szerint azonban ez a folyamat sokkal lassúbb (1-100s) mint a pórus kinyílás (Weaver J.C., Chizmadzhev Y.A. Theory of electroporation: a review. Bioelectrochem. Bioenerg. 1996, 41:135-160).

• Kérem magyarázza meg, hogy az értekezés 22. oldalán az 1. egyenletben honnan jön az 1,5-ös szorzófaktor. Azt gondolom, hogy a sejtnak a z tengely ( $\theta = 0$ ) menti méretének megfelelő potenciálkülönbség gyakorlatilag a pólusokon esik: fele a felső, másik fele az alsó pólusnak megfelelő membrán darabon. Később a 31. oldal alján és a 32. oldal tetején a szerző is erről ír. Csakhogy eszerint a fenti képletben 1-nek kellene lennie az 1,5 helyén.

Válasz

A 22. oldalon az 1. egyenlet egy gömbalakú sejtre vonatkozik, amelyet egy  $E$  erősségű homogén térbe helyezünk. A sejt jelenléte, azonban a teret a sejt környezetében inhomogénná teszi és ezért a transzmembrán potenciál kiszámítása nem triviális. Az 1,5 szorzófaktor megjelenése egy vezetés eredménye, amely a következő három feltételezésen alapszik: 1) a membrán vastagság,  $d$  jóval kisebb mint a sejt rádiusz,  $R$ , 2) a membrán vezetőképesség,  $K_2$ , jóval kisebb mint az extra- illetve intra-celluláris tér vezetőképessége ( $K_1$  és  $K_3$ ), 3) a tér frekvenciája alacsony. Válaszaim végén (az 6. oldal után) szeretném mellékelni H.P. Schwan részletes vezetését, amely a következő könyvben található: Electroporation and Electrofusion in Cell Biology (1989) Eds.Eberhard Neumann, Arthur E. Sowers and Carol A. Jordan, Plenum Press pp.17-

19. A transzmembrán potenciált az (A15)-ös egyenletből lehet kiszámítani. A fent említett első feltételből következik, hogy  $d \cong d' (= d - d^2/R + d^3/3R^2)$ . A második és harmadik feltétel következménye, hogy  $K_2 \cong 0$ . Mindezek figyelembevételével kapjuk, hogy az (A14)-es egyenletben definiált  $D' \cong 2K_1K_3d/R$ . Ha ezt a kifejezést behelyettesítjük az (A15)-ös egyenletbe, akkor a transzmembrán potenciálra ezt a kifejezést kapjuk:  $V_m \cong 1.5ER$ , ahol  $E$  a sejttől távoli térerő abszolút értéke.

Az értekezésben a 31. oldal alján és a 32. oldal tetején található leírás próbálja kvalitatíve értelmezni a gömb alakú sejt és a mikropórusba beszorított sejt esetén kialakuló elektromos terek közti különbséget. Ezt az értelmezést azonban nehéz biztonsággal megadni mivel a mikropórusba beszorított sejt esetén a probléma nem oldható meg analitikusan.

- 25. oldal: Mi az oka annak, hogy a modellben 100 nm-es membrán vastagsággal számolt? Ez még akkor is érdekes, ha kimutatta, hogy a reálisnál legalább tízszer nagyobb vastagságnak elhanyagolható a hatása az eredményekben. Talán a numerikus módszer nem működött jól reális vastagságú membránra?

Válasz

Igen. A valóságban a membrán vastagsága több mint két nagyságrenddel kisebb mint a sejt rádiusz. Modelünk az egész, mikropórusba szorított, sejtet tekinti, de ugyanakkor a membránbeli potenciálváltozást is szeretnénk kiszámolni. Annak érdekében, hogy a numerikus módszer pontos eredményt adjon a membránon belüli teret is finoman kell felosztani. Ezt csak úgy tudtuk megtenni, ha a reálisnál vastagabb membránnal és árokvastagsággal (a mikropórus fala és a beszorított sejt felülete közti távolság) számoltunk. A második mellékletben (1.2.7 tézispont) kimutatjuk, hogy a membránvastagság és az árokvastagság együttes csökkentése nem változtatja a transzmembrán feszültség értékét, de növeli a sejten belüli térerőt.

- Az Ising modellben (a 3. fő tézisponthoz kapcsolódó munka) a láncok kölcsönhatása biztosítja a kooperativitást. Úgy tűnik, hogy bizonyos kísérleti adatok reprodukálásához elegendő abból kiindulni, hogy egy lipid lánc csak kétféle, gél vagy fluid állapotban lehet. Ugyanakkor NMR és EPR mérésekből is ismert a rendparaméternek a láncmenti változása (a membrán közepe felé növekszik a rendezetlenség). FTIR és más mérésekből pedig tudjuk, hogy a fő fázisátmenet körül széles hőmérsékleti tartományban nincs tiszta *gauche* vagy *all-trans* lipid lánc, egy láncon belül vannak *gauche* és *trans* láncszegmensek. Márpedig ha a láncoknak nagy a konformációs heterogenitása, akkor a fenti modell nagyon erős leegyszerűsítés. Valójában milyen fizikai kölcsönhatások vannak a kooperativitás mögött? Elképzelhető-e, hogy ha a láncok reálisabb konformációs leírásából indulnánk ki, és a szomszédos láncok konformációs csatolódási kényszerét íránk le (pl. a *gauche* konformerek száma közötti különbség függvényében), akkor azt szintén lehetne úgy paraméterezni, hogy a modell visszaadja a kalorimetriás adatokat?

Válasz

Modellünk létrehozásakor arra törekedtünk, hogy a kalorimetriás görbéket leíró minimális modellt megalkossuk. Ehhez elegendő volt kétállapotú, gél és fluid, lipidmolekulákat tekinteni. A modellben a fluid állapotú molekulában lévő rotációs izomérek száma megegyezik a kísérletileg talált átlagos számmal. Modellünk megalkotása előtt Caille és munkatársai (Caille A. et al. A simple model for phase transitions in monolayers and bilayers of lipid molecules. *Can. J. Phys.* 1978, 56:348-357) kidolgoztak egy modellt, amely a lipid molekulák tíz állapotát tekinti. E modell eredményei megegyezésben voltak a mért fázisdiagrammal, de a kalorimetriás görbékkel, amely szigorúbb ellenőrzése lett volna a modellnek, nem történt összehasonlítás. Fidorra és munkatársai 2009-ben összehasonlították FTIR méréseik eredményét modellünk eredményeivel és jó egyezést találtak (Lásd 3. ábra - Fidorra M., Heimburg T., Seeger H.M. Melting of individual lipid components in binary lipid mixtures studied by FTIR spectroscopy, DSC and Monte Carlo simulations. *Biochim. Biophys. Acta* 2009, 1788: 600-607).

- A 3.9-es tézisponthoz kapcsolódóan (64-65. oldal), az eredmények megjelentetése óta végeztek-e a szakirodalomban kísérleteket ekvimoláris DMPC/DSPC keverékben abból a célból, hogy eldöntsék, hogy a membránoknak a kicsi vízdékony molekulákkal szembeni permeabilitását értelmező két elképzelés közül melyik a helyes?

Válasz

Átnéztem azokat a cikkeket, amelyek megjelenése óta idézték a *Methods in Enzymology*-ban 2000-ben megjelent cikkünket. Ezek egyikében sem mérték ekvimoláris DMPC/DSPC vezikulák membránjának kicsi, vízdékony molekulákkal szembeni permeabilitását. Konzultáltam Thomas Heimburg Professzorral, aki a probléma szakértője, és ő szerint sincs még kísérleti eredmény, amely meggyőzően eldöntené a lipid permeabilitás kérdését.

- Általános kérdés a 4. fő tézisponthoz (ill. az értekezés 3. fejezetéhez) kapcsolódóan: Úgy gondolom, hogy a fehérjének a membránfelszíni adszorpciója nem csak attól függ, hogy amikor a felülethez érkezik, akkor van-e a alatta a kritikushoz nagyobb hidrofób felület, hanem attól is, hogy mennyi ideig létezik egy-egy ilyen felület. Ha mondjuk bármely időpillanatban a membránfelszín felét ilyen foltok teszik ki, de helyük nagyon gyorsan változik a fehérje transzlációs diffúziójához és a kötés kinetikájához képest, akkor kisebb lesz az adszorpció gyakorisága. Mind a megfelelő méretű szabad hidrofób felületek kialakulásának és eltűnésének kinetikája, mind a fehérje transzlációs diffúziója és kötési kinetikája függ a hőmérséklettől, de a hőmérséklet a kérdéses kísérletekben nem változott (tehát ezzel nem kellett foglalkozni). Ellenben a hidrofób felületek kialakulásának és eltűnésének kinetikája függhet a membrán kémiai összetételétől és a felületi nyomástól is (amelyek viszont változtak). Okozhat-e ez az elhanyagolás eltérést az 76. oldal 4. ábráján bemutatott adatokban?

Válasz

A modell szerint a hidrofób felületek fluktuáció eredményei, tehát ezek nem stabil képződmények.

Eltűnésük sebessége azonban fizikai tényezők (pl. a komponensek laterális diffúziója) által korlátozottak. Érdekes összehasonlítani a kis fehérjék vízben mért translációs diffúziós állandóját a lipid molekulák fluid fázisban mért translációs diffúziós állandójával. Eszerint a lysozyme diffúziós állandója ( $D_t = 1.11 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 / \text{s}$ ) (Kuntz I.D., Kauzmann W. Hydration of proteins and polypeptides. Adv. Protein Chem. 1974, 28, 239-345) egy nagyságrenddel nagyobb mint a NBD-PE (N-(4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolyl)phosphatidylethanolamine) fluid DMPC membránbeli diffúziós állandója ( $D_t = 0.93 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 / \text{s}$ ) (Derzko Z., Jacobson K. Comparative lateral diffusion of fluorescent lipid analogues in phospholipid multibilayers. Biochemistry. 1980, 19:6050-6057). Eszerint a fehérje mozgása legalább egy nagyságrenddel gyorsabb mint a membránbeli hidrofób felületek eltűnési sebessége.

Minimális modellünk nem veszi figyelembe a hidrofób felületek képződési és eltűnési kinetikáját és e kinetikák függését a membrán kémiai összetételétől és a felületi nyomástól. Ennek ellenére kielégítő egyezés van a számított és mért normalizált kezdeti fehérje adszorpció között különböző kémiai összetételű és felületi nyomású monolayerek esetén (Lásd az értekezés 4a. ábráját a 3. fejezetben). Valószínűleg az egyezés még jobb lenne egy a mienknél részletesebb modell esetén, amely figyelembe veszi a hidrofób felületek képződési és eltűnési kinetikáját is.

- Az 5. fő tézisponthoz kapcsolódóan, ha 2%-os csökkenés a mikrovillusok átmérőjében 2,5-szeresére növeli paracrine jeladás valószínűségét, akkor nem elképzelhető-e, hogy a modellben használt mikrovillus geometria helyett egy még realisabb geometriával egészen más eredmények jönnének ki?

Válasz

A mikrovillusok átmérőjének 2%-os csökkenése azt jelenti, hogy a teljesen szorosan pakolt mikrovillusok pakolása kissé meglazul. Ezáltal egy viszonylag nagy membránfelület számára nyílik meg a paracrine jeladás lehetősége. Legyen  $H$  a mikrovillus hossza és  $d$  a mikrovillus átmérője.

Hámsejt modellünk esetében a megnyíló felület a centralis mikrovillusnál  $H/d (\approx \frac{d\pi H}{d^2\pi})$ -

szereke a szorosan pakolt esetben rendelkezésre álló felületnek, míg a centrális mikrovillustól  $R \gg d$  távolságra lévő gyűrűjére a mikrovillusoknak ez az arány

$2H/d (\approx \frac{2R\pi H + 2(R+d)\pi H}{(R+d)^2\pi - R^2\pi})$ -re növekszik. Reális esetben a mikrovillusok nagyjából

hexagonális rendben helyezkednek el a hámsejt felületén és mindenütt a megnyíló felület  $(H/d)$ -szereke a szorosan pakolt esetben rendelkezésre álló felületnek. Így akár modellünk esetében akár pedig a reális geometria esetén a paracrine jeladás erősödése  $(\gamma H/d)$  a mikrovillus hossz/szélesség  $(H/d)$  arányától függ, míg az arányossági tényező értéke  $(1 \leq \gamma \leq 2)$  a geometria további részleteitől függ. Tehát a paracrine jeladás erősödése a részletes geometriától függetlenül jelentős ha a mikrovillus hosszúsága a szélesség többszöröse.



slightly displaced from the axes. Hence, the inverse amplitude is almost a straight line. Its intercept with the ordinate and slope can also be used to extract particle parameters.

Another technique to study cells combines measurement of the  $\beta$ -peak frequency, Eq. (8), with the Maxwell-Wagner high-frequency-peak equation (22). This technique, however, assumes that the high-frequency peak is solely due to the interaction of the cytoplasm with the medium. However, protein-bound water adds another dispersion in this frequency range (Schwan, 1957, 1965; Grant, 1965). This limits the applicability of the approach.

## 5. CONCLUSIONS

We have discussed pearl chain formation as a prerequisite tool to achieve cell fusion. The cellular coupling considerations, presented here in somewhat greater detail than before, provide cellular potentials and field strength values in the membrane, cytoplasm, and nucleus. They are of use in electroporation applications: They furthermore provide insight into the detailed cellular responses to rotating fields. For example, the rotation of a cellular organelle can be readily predicted by inserting the cellular internal field into the equations for rotation. We finally concentrated on the electrorotation technique which complements dielectric spectroscopy.

We did not discuss other manifestations of field effects on particles and cells. For example, from the equations in the Appendix we derive equations which pertain to membrane compression and cell elongation which can be caused by alternating fields. But relevant experimental work is not discussed. Nor did we survey other ample experimental data, since such data are provided by other contributions to this volume.

## 6. APPENDIX: POTENTIAL INSIDE AND OUTSIDE A SPHERICAL CELL

We solve the Laplace potential differential equation for a shell-surrounded sphere. A spherical particle of radius  $R_1$  is assumed, surrounded by a membrane of thickness  $d = R - R_1$  as indicated in Fig. 10. Specific admittivities  $K = \sigma - j\omega\epsilon$  specify the electrical properties of the three phases. The subscripts 1, 2, and 3 indicate external medium, membrane properties, and core, respectively.

We write the potential  $\phi$  in the three regions:

$$\phi_1 = E(r - \alpha/r^2) \cos \delta \quad (\text{A1})$$

$$\phi_2 = (Ar - B/r^2) \cos \delta \quad (\text{A2})$$

$$\phi_3 = Cz = Cr \cos \delta \quad (\text{A3})$$

$E$  is the external unperturbed field,  $r$  the radius vector, and  $\delta$  the angle between  $E$  and  $r$ . Coefficients  $A$ ,  $B$ ,  $C$ , and  $\alpha$  are to be determined from boundary conditions.

Each equation states a sum of a homogeneous and a dipole field. The dipole term in Eq. (A3) vanishes in order to maintain the field finite at the center. The homogeneous field term in Eq. (A1) is chosen to provide a field strength identical to  $E$  for large values of  $r$ . The four constants  $\alpha$ ,  $A$ ,  $B$ , and  $C$  are determined from two pairs of boundary conditions, each pair existing at each of the two interfaces 1-2 and 2-3, respectively. The boundary conditions are that the current density component normal to the surfaces is continuous and that the potentials cannot jump. A unique solution is thus obtained, obviating the need to introduce higher-order terms into the series expressions (A1) through (A4).

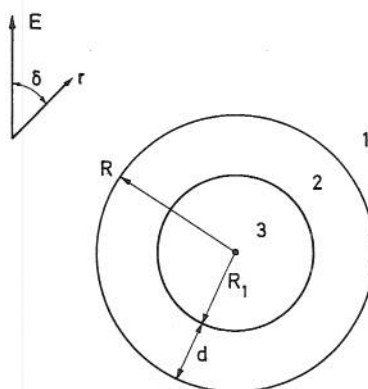


Figure 10. Geometry of the shell-surrounded sphere.

The boundary conditions to be applied to the two surfaces are:

$$K_1(\partial\phi/\partial r)_R = K_2(\partial\phi/\partial r)_R \quad (\text{A4})$$

$$K_2(\partial\phi/\partial r)_{R_1} = K_3(\partial\phi/\partial r)_{R_1} \quad (\text{A5})$$

$$E(R - \alpha/R^2) = AR - B/R^2 \quad (\text{A6})$$

$$AR_1 - B/R_1^2 = CR_1 \quad (\text{A7})$$

Solving the resulting set of four linear equations yields the following coefficients:

$$AR = 3K_1E(K_3 + 2K_2)/D \quad (\text{A8})$$

$$B = 3K_1E(K_3 - K_2)/D \quad (\text{A9})$$

$$C = 9K_1K_2E/D \quad (\text{A10})$$

$$\alpha = [R^3(2K_2 + K_3)(K_1 - K_2) + R_1^3(2K_2 + K_1)(K_2 - K_3)]/D \quad (\text{A11})$$

with the common denominator  $D$

$$D = (K_2 + 2K_1)(2K_2 + K_3) + 2(R_1/R)^3(K_2 - K_1)(K_3 - K_2) \quad (\text{A12})$$

The more complex Eqs. (A11) and (A12) can be simplified by writing

$$(R_1/R)^3 = (1 - d/R)^3 = 1 - 3d'/R \quad (\text{A13})$$



where  $d'/d = 1 - d/R + (d/R)^2/3$  and  $d'$  is identical to the membrane thickness for  $d \ll R$ . We need only the simplified expression for  $D$ :

$$D/3 = K_2(K_3 + 2K_1) - 2(K_2 - K_1)(K_3 - K_2)d'/R = D' \quad (\text{A14})$$

Now we can write the membrane potential by taking the difference of the two potentials  $\phi_2$  at the inner and outer membrane surface. For small values of  $d/R$ , we obtain for  $\cos \delta = 1$

$$V_m = 3K_1K_3dE/D' \quad (\text{A15})$$

The internal field strength is obtained from Eqs. (A3), (A10) and (A14):

$$E_i = 3K_1K_2E/D' \quad (\text{A16})$$

with  $D' = D/3$  given by Eq. (A14).

We finally discuss the optimal membrane field strength  $E_m$  which is obtained if  $\cos \delta = 1$ . From Eq. (A2)

$$E_m = -\partial\phi/\partial r = A + 2B/r^3 \quad (\text{A17})$$

Introducing the coefficients  $A$  and  $B$  [Eqs. (A8) and (A9)] we calculate the difference in field strength values  $E_m$  at the inner and outer membrane surface:

$$E_1 - E_2 = \Delta E = 6K_1E(K_3 - K_2)d'/RD' \quad (\text{A18})$$

This reduces for small  $K_2$  (small membrane conductance and low frequencies) and small membrane thickness values to

$$\Delta E = 3E \quad (\text{A19})$$

which is  $R/2d$  times smaller than the average membrane field strength  $E_m = 1.5ER/d$  derived from the low-frequency membrane potential quoted above. The cell membrane therefore experiences several forces. First, there is a compressional force given by the product of a membrane dielectric constant and membrane field strength squared,  $\epsilon_m E_m^2/2$ . Second, each membrane surface experiences a slightly different force,  $\epsilon_m E^2/2$ , yielding a net outwards-directed force,  $\epsilon_m(E_1^2 - E_2^2)/2 = \epsilon_m 3EE_m$ . This force note will tend to elongate the cell in the field direction. It is  $R/4d$  times smaller than the compressional force.

*Note:* The above derivation was based on the Laplace equation. That equation is valid for all three phases provided that the condition of electroneutrality is fulfilled—that charges accumulate only at the phase boundaries, i.e., at the outer and inner membrane surfaces. This is not correct since excess charges are distributed near the phase boundaries over distances comparable to the Debye screening length. Thus, the appropriate treatment of the potential in the neighborhood of the membrane necessitates use of the Poisson instead of the Laplace equation. The corresponding dielectric problem has been solved by Garcia *et al.* (1985). Preliminary estimates indicate that the correction is small under physiological circumstances, but can be substantial if the medium is very diluted.

ACKNOWLEDGMENT. The author appreciates support for this article and related work provided by the University of Würzburg during his affiliation with the Institute for Biotechnology in 1986–1987.