

Chapter 6

Summaries

6.1 Summary

The mode of action of phloretin and its analogs on the permeability of natural membranes for neutral and charged molecules, such as urea, glucose and chloride has been characterized 25 years ago. In contrast to signal molecules with primary effects on transport systems of natural membranes, phloretin also affects model membranes, i.e., artificial membranes, which do not contain proteins. Since the dipole potential reducing effect of phloretin on mono- and bilayers has been found, it became clear that its primary effect must be a biophysical one: phloretin adsorbs to lipid layers and changes biophysical parameters of these layers.

The aim of this work was the characterization of the interaction between the surface-active molecule phloretin and artificial lipid layers. We were able to describe structural and functional parameters of the model systems mono- and bilayer as functions of one or few variables. One of these parameters, the dipole potential, measured as a function of the aqueous phloretin concentration, allowed a critical examination of the Langmuir adsorption model that has been postulated for the interaction between phloretin and lipid layers. We found significant deviations between the experimental data and the Langmuir adsorption isotherm, which could be explained by the interaction of phloretin dipoles with lipid dipoles. In consideration of the dipole-dipole interaction, the Langmuir model could be improved, which led to a better quantitative and qualitative description of the phloretin adsorption to monolayers and membranes.

Surface pressure versus area per lipid molecule (Π -A) isotherms and surface (dipole) potential change versus area per lipid molecule ($\Delta\Psi$ -A) isotherms, measured at lipid monolayers, allowed a structural description of the phloretin-lipid interaction: phloretin integrates into monolayers dependent on the surface pressure and the phase state of the lipid. The shift of the Π -A isotherms is more pronounced at lower surface pressures and strictly depends on the aqueous pH. The latter can be attributed to the charge state of phloretin: only the neutral form adsorbs to and integrates into monolayers. Liquid-expanded monolayers interact much stronger with phloretin than condensed. The phase

transition temperature decreases with the integration of phloretin into the monolayer. In presence of phloretin in the subphase the Π -A isotherms converge to the reference with increasing surface pressure; however, this does not apply to $\Delta\Psi$ -A isotherms, the dipole potential change is virtually independent from the surface pressure. The discrepancy between the Π -A and $\Delta\Psi$ -A data led to a theoretical description of the change of the dipole moment vector dependent on the area per lipid molecule. According to this model, we introduced a functional description of the relationship between $\Delta\Psi$ and the molecular area, which describes the experimental data very well.

Calorimetric measurements confirmed the integration of phloretin into membranes because of the strong decrease of the phase transition temperature, but they also showed that the cooperativity of phase transition is hardly affected, even at very high amounts of phloretin in the membrane. Obviously the interaction between phloretin and lipids is restricted to the head groups, an integration into the hydrocarbon layer is unlikely. ^2H NMR measurements with spherical unilamellar vesicles of headgroup-deuterated lipid showed changed quadrupolar splittings indicating the interaction between phloretin and headgroups of the lipids. However, the T_1 -time did not change significantly in presence of phloretin indicating unchanged headgroup dynamics. The influence of phloretin on the lateral diffusion of lipid molecules have been investigated; however, we could not decide whether a changed lateral diffusion is indicated because of the slight changes of the T_2 -time, which also could be the result of the changed quadrupolar splitting. Measurements of phloretin adsorption to unilamellar lipid vesicles by means of UV-spectroscopy revealed considerable deviations of the dissociation constant compared to that determined by measurements of the dipole potential change. Again, this deviations gave indications of complex electrostatical interactions of phloretin with lipid layers, which cannot be properly described by the Langmuir adsorption isotherm.

The results of the measurements at membranes confirmed the results of monolayer measurements. The adsorption of phloretin to lipid layers is characterized by more complex electrostatic and structural interactions than has been proposed previously.

6.2 Zusammenfassung

Die Wirkung von Phloretin und seinen Analogon auf die Permeabilität von natürlichen Membranen für bestimmte ungeladene und geladene Moleküle wie z.B. Harnstoff, Glukose und Chlorid ist bereits vor 25 Jahren beschrieben worden. Im Gegensatz zu Signalmolekülen mit Primärwirkungen auf Transportsysteme natürlicher Membranen wirkt Phloretin auch auf Modellmembranen, d.h., künstliche, reine Lipidmembranen, die keine Proteine enthalten. Nach der Entdeckung des dipolpotential-reduzierenden Effekts von Phloretin auf Monolayer und Bilayer war klar, daß dessen primäre Wirkung biophysikalischer Natur sein mußte: Phloretin adsorbiert an Lipidschichten und verändert biophysikalische Parameter dieser Schichten.

Ziel dieser Arbeit war es, Wechselwirkungen des oberflächenaktiven Moleküls Phloretin

mit künstlichen Lipidschichten zu charakterisieren. Strukturelle und funktionelle Parameter der Modellsysteme Mono- und Bilayer konnten in Abhängigkeit einer oder weniger Variablen verfolgt und beschrieben werden. Einer dieser Parameter, das Dipolpotential, gemessen als Funktion der Phloretinkonzentration in der wässrigen Phase, erlaubte eine kritische Betrachtung des in der Literatur postulierten Langmuirschen Adsorptionsverhaltens von Phloretin. Gefunden wurden signifikante Abweichungen der experimentellen Daten von der Langmuirschen Adsorptionsisotherme, welche durch den Einfluß einer Wechselwirkung von Phloretindipolen mit Dipolen der Lipidschicht erklärt werden konnten. Unter Berücksichtigung der Dipol-Dipol Wechselwirkung konnte das Langmuirsche Modell erweitert werden, was zu einer besseren quantitativen und qualitativen Beschreibung der Adsorption von Phloretin an Monolayer und Membranen führte.

Oberflächendruck-molekulare Fläche (Π -A) Isothermen sowie Oberflächenpotential (Dipolpotential)-molekulare Fläche ($\Delta\Psi$ -A) Isothermen, ermittelt an Lipidmonoschichten, erlaubten eine strukturelle Beschreibung der Phloretin-Lipid Wechselwirkung: Phloretin integriert in Monoschichten, wobei dieser Effekt stark abhängig ist vom Filmdruck und vom Phasenzustand des Lipids. Die Verschiebung der Π -A Isotherme ist für niedrige Filmdrücke deutlicher als für hohe, und es herrscht eine starke Abhängigkeit vom pH in der Subphase. Letztere ist darauf zurückzuführen, daß nur die neutrale Form von Phloretin adsorbiert, bzw. integriert. Flüssig-expandierte Monolayer wechselwirken deutlich stärker mit Phloretin als kondensierte. Die Temperatur der Phasenumwandlung der Lipide sinkt durch die Inkorporation von Phloretin. Π -A Isothermen, gemessen mit Phloretin in der Subphase, konvergieren gegen die Referenzkurve mit steigendem Filmdruck. Dies gilt jedoch nicht für $\Delta\Psi$ -A Isothermen, die Änderung des Dipolpotentials ist praktisch unabhängig vom Filmdruck. Die Diskrepanz zwischen den Π -A Daten und den $\Delta\Psi$ -A Daten führte zu einer theoretischen Beschreibung der Änderung des Dipolmomentvektors in Abhängigkeit der molekularen Fläche an der Lipidschicht. Anhand dieses Modells konnte ein funktioneller Zusammenhang zwischen $\Delta\Psi$ und der molekularen Fläche formuliert werden, der die experimentellen Daten sehr gut beschreibt.

Kalorimetrische Messungen bestätigten die Integration von Phloretin in Membranen durch eine starke Abnahme der Phasenübergangstemperatur, sie zeigten aber auch, daß die Kooperativität der Lipidmoleküle nur wenig beeinträchtigt wird, selbst bei sehr großen Mengen von Phloretin in der Membran. Die Wechselwirkung von Phloretin mit Lipiden ist offensichtlich beschränkt auf die Kopfgruppen, eine Integration in die hydrophobe Kohlenwasserstoffphase findet wahrscheinlich nicht statt. ^2H NMR Messungen an sphärischen, unilamellaren Vesikeln aus kopfgruppen-deutertem Lipid zeigten unter dem Einfluß von Phloretin eine veränderte Quadrupol-Aufspaltung, was die Wechselwirkung von Phloretin mit den Kopfgruppen der Lipide belegt. Hingegen änderte sich die T_1 -Zeit nicht signifikant in Anwesenheit von Phloretin, was auf eine unveränderte Dynamik der Kopfgruppen hinweist. Unsicherheit besteht bezüglich des Einflusses von Phloretin auf die laterale Diffusion der Lipidmoleküle. Messungen der T_2 -Zeit zeigten in Anwesenheit von Phloretin leichte Abweichungen zur Referenz, was aber auch durch die veränderte Aufspaltung bedingt sein könnte. Messungen der Adsorption von Phloretin an unilamellare Lipidvesikel

mit Hilfe der UV-Spektroskopie zeigten deutliche Unterschiede der Dissoziationskonstanten zu jener, die über Messungen der Dipolpotentialänderung ermittelt wurde. Diese Unterschiede lieferten wiederum deutliche Hinweise auf elektrostatische Zusammenhänge, die durch eine Beschreibung der Langmuirschen Adsorptionsisotherme nur unzureichend beschrieben werden können.

Die Befunde der Untersuchungen an Membranen decken sich mit denen der Monolayermessungen. Die Adsorption von Phloretin an Lipidschichten ist durch komplexere elektrostatische und strukturelle Wechselwirkungen gekennzeichnet, als bisher in der Literatur beschrieben.