



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**Corso di Laurea
Scienze Biologiche**

**Inibizione della dipeptidil peptidasi-4 da parte dei
flavonoidi: relazione struttura-attività, cinetica e
meccanismo di interazione**

**Inhibition of Dipeptidyl Peptidase-4 by Flavonoids:
Structure–Activity Relationship, Kinetics and
Interaction Mechanism**

Tesi di Laurea di:
Marco Sutera

Docente Referente
Chiar.ma Prof.ssa
Tiziana Bacchetti

Sessione autunnale dicembre 2024

Anno Accademico 2023/2024

Riassunto

L'articolo indaga gli effetti inibitori di 70 flavonoidi diversi sulla DPP-4. I ricercatori hanno scoperto che cinque flavonoidi - miricetina, iperoside, narcissoside, cianidina 3-O-glucoside e isoliquiritigenina - hanno mostrato un'attività inibitoria significativa. Attraverso l'analisi della relazione struttura-attività, lo studio ha identificato le caratteristiche strutturali dei flavonoidi che influenzano la loro efficacia nell'inibire la DPP-4:

- **Idrossilazione:** L'introduzione di gruppi idrossilici nelle posizioni 3', 4' dell'anello B e 6 dell'anello A sembra aumentare l'attività inibitoria. Al contrario, l'idrossilazione in posizione 3 dell'anello C si è dimostrata sfavorevole.
- **Metilazione:** La metilazione dei gruppi idrossilici in C3', C4' e C7 tende a ridurre l'attività inibitoria. Tuttavia, la metilazione in posizione 3 dell'anello C potrebbe migliorare l'effetto inibitorio.
- **Glicosilazione:** L'effetto della glicosilazione varia a seconda della struttura dell'aglicone flavonoide, del tipo di glicoside e della posizione di sostituzione. Alcuni glicosidi hanno mostrato un'attività inibitoria maggiore rispetto ai loro agliconi corrispondenti, mentre altri hanno mostrato una diminuzione dell'attività.
- **Legame doppio 2,3 e gruppo 4-carbonile nell'anello C:** Questi elementi strutturali sono essenziali per l'inibizione della DPP-4, poiché la loro idrogenazione riduce l'attività.

L'analisi cinetica ha rivelato che la miricetina inibisce la DPP-4 in modo non competitivo, mentre gli altri quattro flavonoidi la inibiscono in modo misto. L'analisi di spegnimento della fluorescenza ha dimostrato che tutti e cinque i flavonoidi legano spontaneamente la DPP-4. Le forze intermolecolari predominanti nel complesso flavonoide-DPP-4 sono legami idrogeno, forze di van der Waals e forze elettrostatiche. La simulazione di docking molecolare ha confermato le interazioni di legame tra i flavonoidi e la DPP-4. La miricetina si lega in una tasca minore vicino al sito attivo, invece gli altri 4 flavonoidi si legano nel sito attivo.



Introduzione : cos'è il diabete e come trattarlo

Il diabete mellito di tipo 2 (T2DM) è una condizione cronica caratterizzata da alti livelli di zucchero nel sangue. Questo è causato dall'incapacità del corpo di utilizzare efficacemente l'insulina, o dalla produzione insufficiente di insulina.

Esistono diverse strategie per trattare il T2DM, tra cui:

- Ritardare lo svuotamento gastrico e l'assorbimento dei carboidrati.
- Potenziare la segnalazione dell'insulina.
- Aumentare la secrezione di insulina.

Un approccio promettente riguarda gli ormoni incretinici, che stimolano la secrezione di insulina. Purtroppo, questi ormoni vengono rapidamente degradati dalla DPP-4. Inibire la DPP-4 può quindi aumentare l'efficacia delle incretine nel trattamento del T2DM. Esistono inibitori sintetici della DPP-4, ma questi possono avere effetti collaterali. La ricerca si concentra quindi su inibitori naturali, come i flavonoidi.



Dipeptidil peptidasi-4 e flavonoidi:

La dipeptidil peptidasi-4 (DPP-4) è una serina proteasi presente in molti tessuti del corpo. Questo enzima è noto per disattivare rapidamente le incretine.

I flavonoidi sono dei composti polifenolici principalmente idrosolubili, sono abbondanti in una ampia varietà di piante e offrono una vasta gamma di bioattività e potenziali benefici per la salute umana.

È stato scoperto che alcuni composti flavonoidi hanno la capacità di modulare l'attività della DPP-4.

Effetti inibitori in vitro dei flavonoidi contro DPP-4

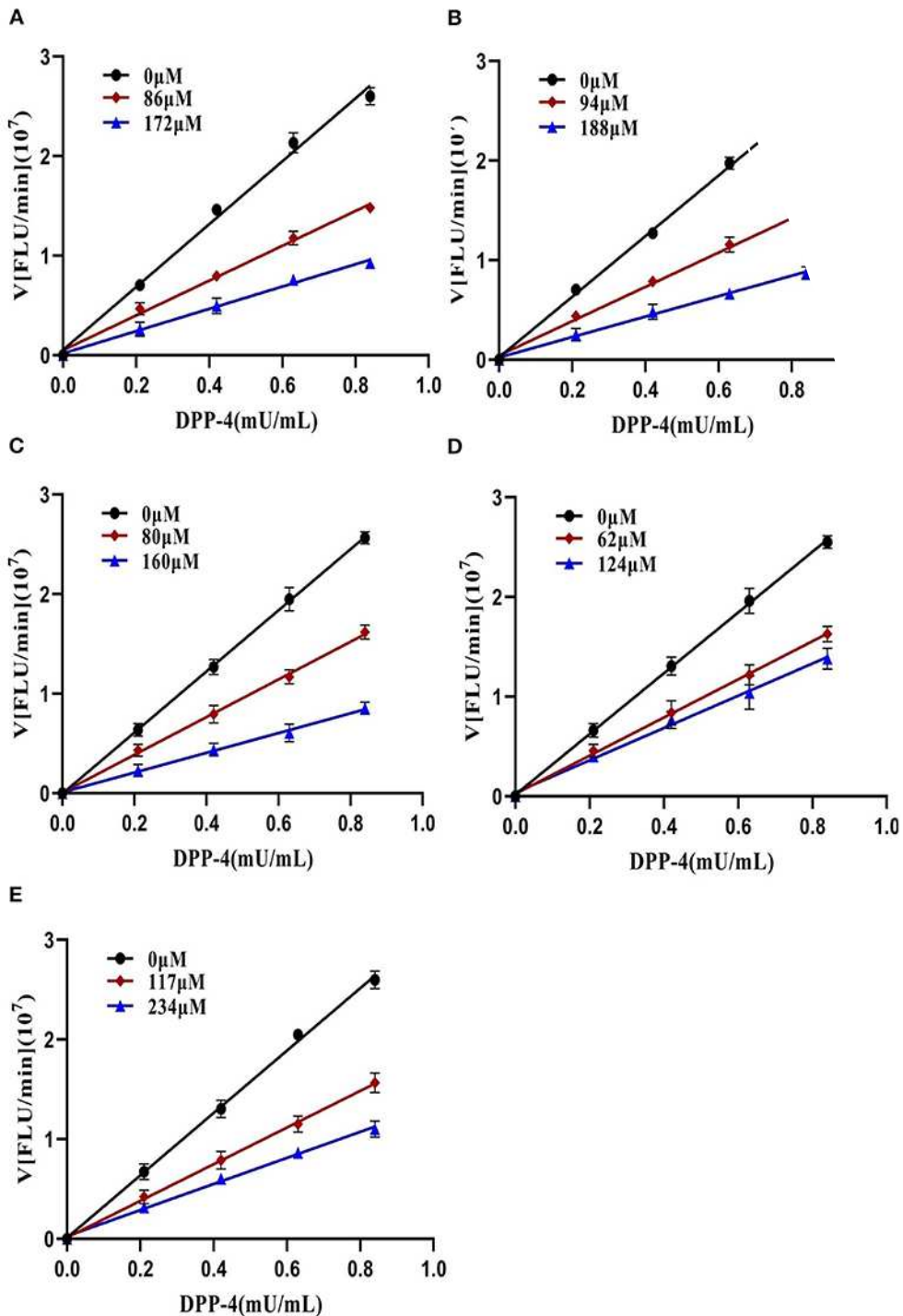
- Un pannello di 70 flavonoidi con strutture diverse è stato valutato per le loro attività inibitorie in vitro contro DPP-4 utilizzando il metodo della fluorescenza. Come mostrato nella Tabella , solo cinque flavonoidi, vale a dire iperoside (E4), miricetina (E19), narcissoside (E21), cianidina 3-O-glucoside (F2), isoliquiritigenina (G1), hanno mostrato una percentuale inibitoria superiore al 50% alla concentrazione di prova di 200 µM.

No.	Flavonoids	Skeleton	C3	C5	C6	C7	C8	C2'	C3'	C4'	C5'	% Inhibition at 200µM
A1	Apigenin		H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	46.36 ± 1.49
A2	Baicelein		H	OH	OH	OH	H	H	H	H	H	39.38 ± 0.41
A3	Chrysin		H	OH	H	OH	H	H	H	H	H	26.08 ± 3.07
A4	Dicometin		H	OH	H	OH	H	H	OH	OMe	H	22.20 ± 1.22
A5	Diosmin		H	OH	H	ORut	H	H	OH	OMe	H	16.35 ± 1.73
A6	Iscorientin		H	OH	Glu	OH	H	H	OH	OH	H	42.63 ± 0.33
A7	Isovitexin		H	OH	Glu	OH	H	H	H	OH	H	42.36 ± 1.23
A8	Luteolin		H	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	47.51 ± 0.89
A9	Luteolin 7-O-glucuronide		H	OH	H	OGlu	H	H	OH	OH	H	35.65 ± 0.11
A10	Luteoloside		H	OH	H	OGlu	H	H	OH	OH	H	45.61 ± 0.62
A11	Narirutin		H	OH	H	ORut	H	H	H	OH	H	13.97 ± 0.13
A12	Orientin		H	OH	H	OH	Glu	H	OH	OH	H	38.61 ± 2.10
A13	Tangeretin		H	OMe	OMe	OMe	OMe	H	H	OMe	H	14.16 ± 1.06
A14	Vitexin		H	OH	H	OH	Glu	H	H	OH	H	27.01 ± 1.35
A15	Vitexin 2"-glucoside		H	OH	H	OH	Glg	H	H	OH	H	36.97 ± 0.63
A16	Vitexin 4'-O-glucoside		H	OH	H	OH	Glu	H	H	OGlu	H	45.90 ± 1.48
B1	Biochanin A		H	OH	H	OH	H	H	H	OMe	H	14.35 ± 1.48
B2	Calycosin		H	H	H	OH	H	H	OH	OMe	H	42.99 ± 2.41
B3	Daidzein		H	H	H	OH	H	H	H	OH	H	19.25 ± 3.44
B4	Formononetin		H	H	H	OH	H	H	H	OMe	H	17.56 ± 0.19
B5	Genistein		H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	15.31 ± 0.21
B6	Genkwanin		H	OH	H	OMe	H	H	H	OH	H	20.78 ± 1.92
C1	Dihydromorin		OH	OH	H	OH	H	OH	H	OH	H	30.92 ± 1.22
C2	Dihydromyricetin		OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH	20.59 ± 0.36
C3	Hesperetin		H	OH	H	OH	H	H	OH	OMe	H	<10
C4	Hesperidin		H	OH	H	ORut	H	H	OH	OMe	H	<10
C5	Liquiritigenin		H	H	H	OH	H	H	H	OH	H	17.06 ± 0.94
C6	Naringenin		H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	<10
C7	Neohesperidin		H	OH	H	ONeo	H	H	OH	H	OMe	11.79 ± 1.61
C8	Taxifolin		OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	19.93 ± 0.85
D1	Catechin		OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	<10
D2	Epicatechin		OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	<10
D3	Epigallocatechin gallate		Gallate	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH	<10
E1	Avicularin		OAra	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	27.10 ± 0.42
E2	Galangin		OH	OH	H	OH	H	H	H	H	H	38.26 ± 0.36
E3	Herbacetin		OH	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	25.74 ± 1.82
E4	Hyperoside		OGlu	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	62.10 ± 0.16
E5	Isoquercitrin		OGlu	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	36.94 ± 1.13
E6	Isohammetin		OH	OH	H	OH	H	H	OMe	OH	H	29.35 ± 1.52
E7	Isohammetin 3-O-glucoside		Glu	OH	H	OH	H	H	OMe	OH	H	38.58 ± 1.41
E8	Isohammetin 3-O-neohesperidin		ONeo	OH	H	OH	H	H	OMe	OH	H	40.63 ± 0.42
E9	Kaempferide		OH	OH	H	OH	H	H	H	OMe	H	15.68 ± 0.58
E10	Kaempferitrin		Dir	OH	H	Dir	H	H	H	OH	H	19.27 ± 0.47
E11	Kaempferol		OH	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	32.23 ± 0.19
E12	Kaempferol 3-O-arabinoside		OAra	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	39.24 ± 0.43
E13	Kaempferol 3-O-galactoside		OGal	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	46.32 ± 1.57
E14	Kaempferol 3-O-rutinoside		ORut	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	36.83 ± 0.01
E15	Kaempferol 3-O-sophoroside		OSop	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	43.19 ± 1.48
E16	Kaempferol 4'-O-glucoside		OH	OH	H	OH	H	H	H	OGlu	H	37.22 ± 0.64
E17	Kaempferol 7-O-glucoside		OH	OH	H	OGlu	H	H	H	OH	H	48.84 ± 1.07
E18	Morin		OH	OH	H	OH	H	OH	H	OH	H	42.79 ± 0.91
E19	Myricetin		OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH	53.16 ± 0.72
E20	Myricitrin		ORha	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH	39.8 ± 0.78
E21	Narcissoside		ORut	OH	H	OH	H	H	OMe	OH	H	57.50 ± 1.28
E22	3-O-Methylquercetin		OMe	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	45.62 ± 0.78
E23	Quercetin		OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	39.37 ± 0.58
E24	Quercetin 3-O-glu-7-O-gentiobioside		OGlu	OH	H	OGen	H	H	OH	OH	H	33.92 ± 1.07
E25	Quercetin 7-O-rhamnoside		OH	OH	H	ORha	H	H	OH	OH	H	48.96 ± 0.12
E26	Quercitrin		ORha	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	47.65 ± 0.36
E27	Rhamnetin		OH	OH	H	OMe	H	H	OH	OH	H	22.24 ± 0.63
E28	Rutin		ORut	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	42.67 ± 1.28
F1	Cyanidin		OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	18.82 ± 0.40
F2	Cyanidin 3-O-glucoside chloride		OGlu	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	68.05 ± 0.15
F3	Malvidin 3-O-glucoside		OGlu	OH	H	OH	H	H	OMe	OH	OMe	14.98 ± 2.42
F4	Malvin		OGlu	OGlu	H	OH	H	H	OMe	OH	OMe	13.71 ± 2.07
F5	Pelargonidin		OH	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	<10
G1	Isoliquiritigenin		H	H	OH	-	-	H	H	OH	H	62.81 ± 0.13
G2	Neosperidin dihydrochalcone		H	H	OH	-	-	H	OH	OMe	H	17.15 ± 0.23
G3	Phloretin		H	H	OH	-	-	H	H	OH	H	17.80 ± 1.21
G4	Phlorizin		H	H	OH	-	-	H	H	OH	H	<10



Relazione struttura- attività dei flavonoidi sull'inibizion e della DPP-4

- I ricercatori hanno scoperto che l'introduzione di gruppi idrossilici nelle posizioni 3', 4' dell'anello B e 6 dell'anello A nella struttura dei flavonoidi era vantaggiosa per migliorare l'efficacia inibitoria contro la DPP-4, mentre l'idrossilazione in posizione 3 dell'anello C era sfavorevole all'inibizione.
- Inoltre, la metilazione dei gruppi idrossilici a C3', C4' e C7 della struttura dei flavonoidi tendeva a ridurre l'attività inibitoria contro la DPP-4.
- il doppio legame 2,3 e il gruppo 4-carbonilico sull'anello C della struttura dei flavonoidi erano essenziali per l'inibizione.
- La glicosilazione ha influenzato l'attività inibitoria in modo diverso, a seconda della struttura dell'aglicone flavonoide, del tipo di glicoside e della posizione di sostituzione.

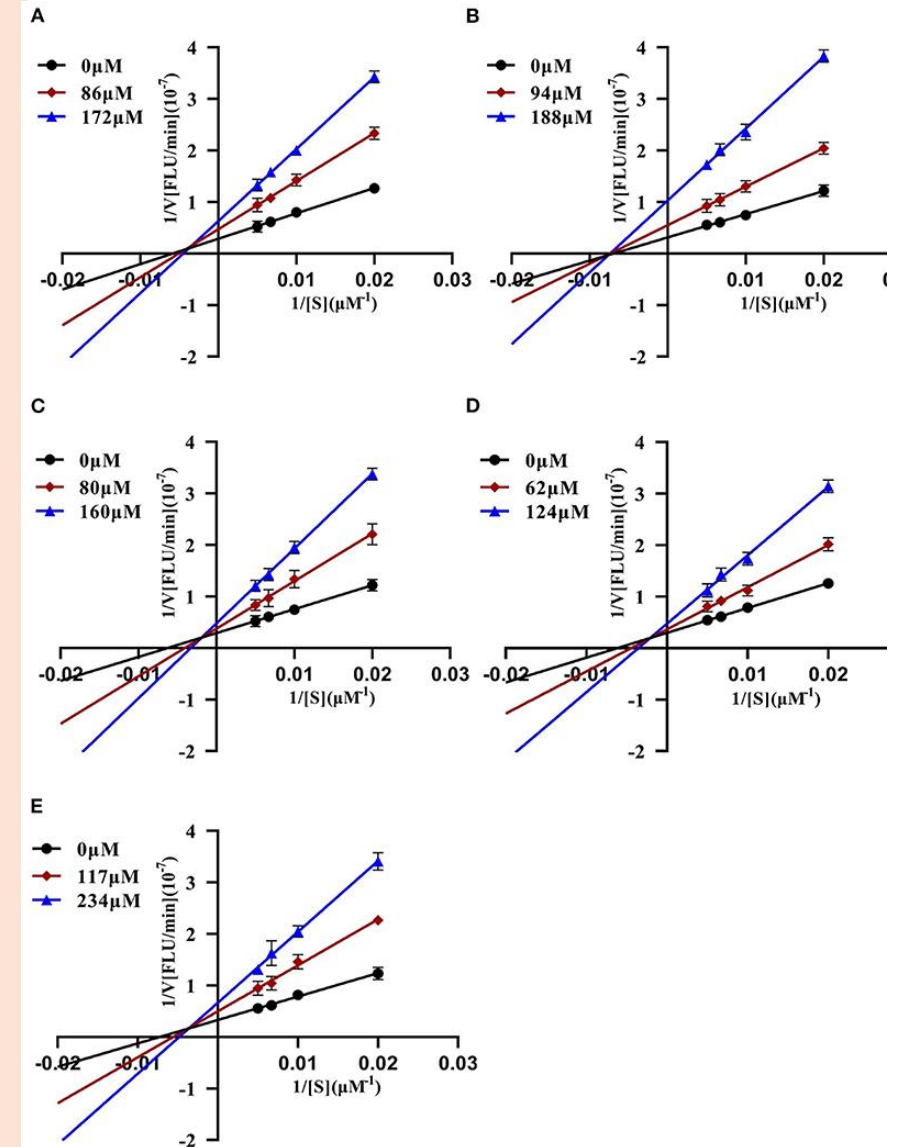


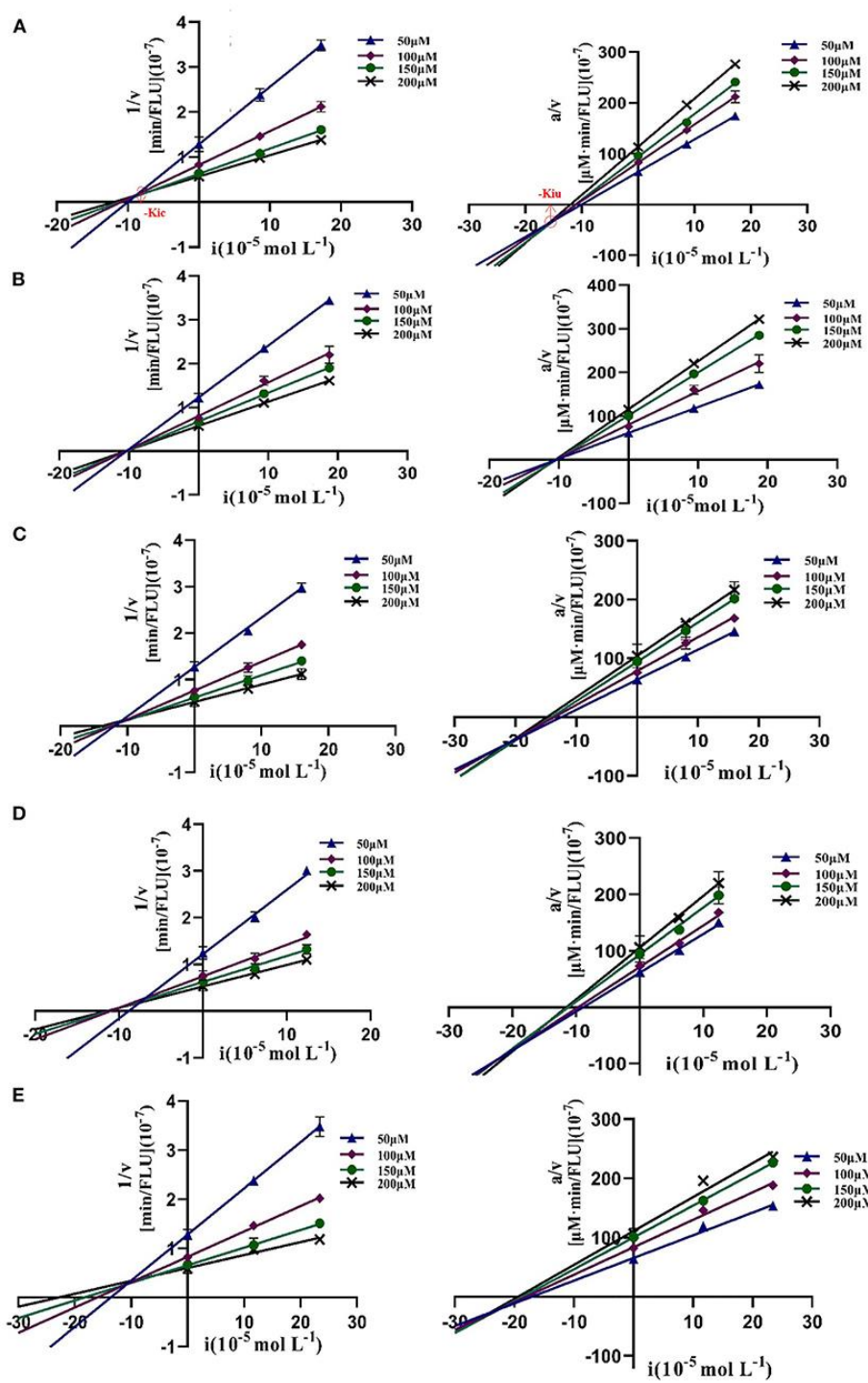
Cinetica di inibizione dei flavonoidi su dpp-4

Lo studio ha analizzato la cinetica di inibizione dei cinque flavonoidi con elevata attività inibitoria contro la DPP-4. Hanno prima verificato la reversibilità dell'inibizione tracciando la velocità di reazione enzimatica (V) rispetto alla concentrazione di DPP-4 a diverse concentrazioni di inibitore. I grafici risultanti, indicano che le linee rette di questi flavonoidi a diverse concentrazioni passano tutte per l'origine, dimostrando che la loro inibizione sulla DPP-4 è reversibile.

Successivamente, hanno utilizzato i grafici di Lineweaver-Burk per determinare il tipo di inibizione:

- 4 flavonoidi inibiscono la DPP-4 con un meccanismo misto, poiché la velocità massima di reazione (V_{max}) diminuisce e il valore della K_m aumenta con l'aumentare delle concentrazioni di inibitore.
- Al contrario, la miricetina inibisce la DPP-4 in modo non competitivo, poiché la V_{max} diminuisce con l'aumento della concentrazione di miricetina, mentre il valore di K_m rimane invariato. Questo indica che la miricetina e il substrato possono legarsi simultaneamente all'enzima.





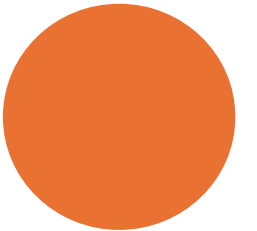
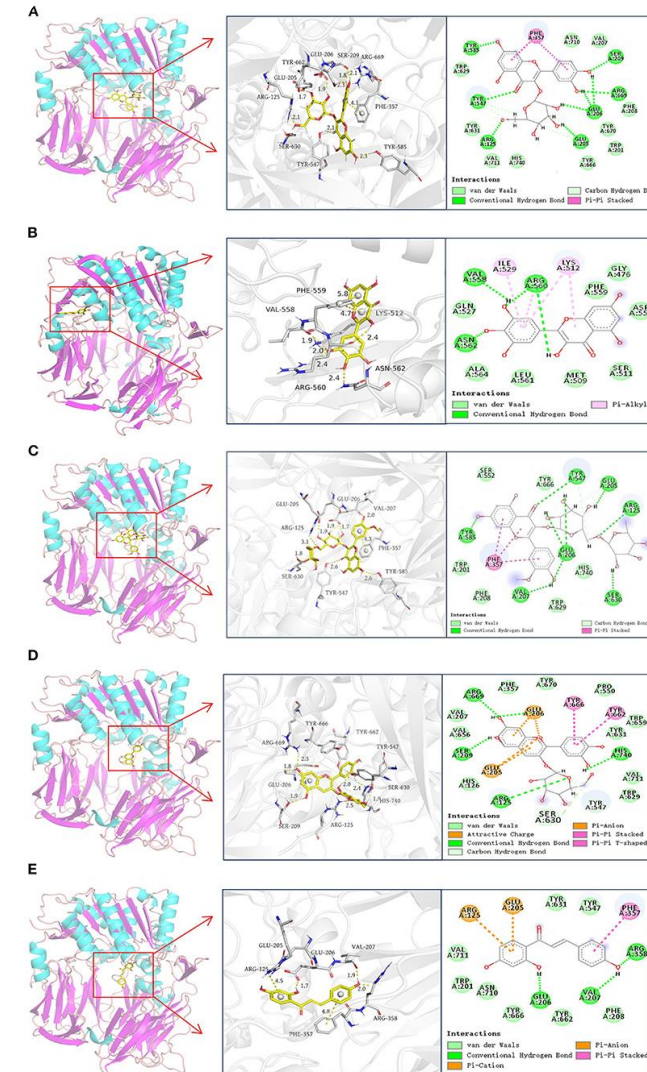
Flavonoid	Inhibition type	K_{ic} (10^{-5} mol L^{-1})	K_{iu} (10^{-5} mol L^{-1})	$1/K_{ic}$ (10^4 L mol $^{-1}$)	$1/K_{iu}$ (10^4 L mol $^{-1}$)
Hyperoside	Mixed	9.03 ± 0.10	14.8 ± 0.22	1.10 ± 0.01	0.67 ± 0.01
Myricetin	Non-competitive	10.35 ± 0.11	10.35 ± 0.11	0.97 ± 0.00	1.01 ± 0.01
Narcissoside	Mixed	11.57 ± 0.21	22.3 ± 0.15	0.86 ± 0.02	0.44 ± 0.03
Cyanidin 3-O-glucoside	Mixed	7.43 ± 0.12	18.37 ± 0.24	1.30 ± 0.02	0.57 ± 0.03
Isoliquiritigenin	Mixed	9.82 ± 0.34	26.7 ± 0.34	1.01 ± 0.03	0.37 ± 0.01

I grafici di Dixon e Cornish-Bowden confermano ulteriormente questi risultati. Nel caso della miricetina, entrambi i grafici si intersecano sull'asse i , dove la costante di inibizione competitiva (K_{ic}) è uguale alla costante di inibizione non competitiva (K_{iu}), a conferma del meccanismo non competitivo. Per i restanti flavonoidi entrambi i grafici si intersecano in un punto, suggerendo un'inibizione di tipo misto. In questi casi, il valore di K_{ic} è inferiore a quello di K_{iu} , indicando che questi flavonoidi preferiscono inserirsi nel sito attivo della DPP-4 e quindi mostrano un modello di inibizione più competitivo.

Fluorescenza e meccanismo di interazione

L'analisi di spegnimento della fluorescenza ha indicato che tutti e cinque i composti flavonoidi potevano spegnere efficacemente la fluorescenza intrinseca della DPP-4 legandosi spontaneamente ad essa. I legami idrogeno e le forze di van der Waals erano le forze predominanti per mantenere il complesso della miricetina con la DPP-4, le forze elettrostatiche potrebbero svolgere un ruolo importante nello stabilizzare i complessi dei restanti quattro flavonoidi con la DPP-4. Il legame dei flavonoidi testati potrebbe anche indurre il cambiamento conformazionale della DPP-4 e quindi portare all'inibizione dell'enzima.

La simulazione di docking molecolare ha ulteriormente accertato le interazioni di legame tra la DPP-4 e i cinque flavonoidi selezionati, tra cui mircetina dove il sito di legame si trova in una cavità minore vicino alle tasche attive, mentre i restanti 4 flavonoidi inseriti nella cavità del sito attivo della DPP-4.



conclusioni

In conclusione, lo studio ha fornito informazioni dettagliate sui requisiti strutturali dei flavonoidi per l'inibizione della DPP-4 e ha chiarito i meccanismi di interazione tra i flavonoidi selezionati e l'enzima. Queste scoperte sono utili per lo screening e la modifica strutturale dei flavonoidi come potenziali inibitori della DPP-4 e potrebbero promuovere l'applicazione dei flavonoidi nello sviluppo di prodotti per combattere e trattare il diabete di tipo 2 .





Grazie per
l'attenzione