

**TMPRSS2 (TRANSMEMBRAN SERİN PROTEAZ 2) İNHİBİTÖRLERİ,
ETKİ MEKANİZMALARI VE YENİ TÜREVLERİN TASARLANMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Ecz. Selim MUYNAK

Eskişehir 2023

**TMPRSS2 (TRANSMEMBRAN SERİN PROTEAZ 2) İNHİBİTÖRLERİ,
ETKİ MEKANİZMALARI VE YENİ TÜREVLERİN TASARLANMASI**

Ecz. Selim MUYNAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Farmasötik Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Asiye MERİÇ**

**Eskişehir Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Şubat 2023**

Bu tez çalışması, BAP Komisyonunca kabul edilen 2103S010 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Selim MUYNAK'ın "TMPRSS2 (Transmembran Serin Proteaz 2) İnhibitörleri, Etki Mekanizmaları ve Yeni Türevlerin Tasarlanması" başlıklı tezi 06/02/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Unvanı Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı)

: Doç Dr. Asiye MERİÇ

Üye

: Prof. Dr. Rahime ŞİMŞEK

Üye

: Prof. Dr. Ahmet Çağrı KARABURUN

Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

FINAL APPROVAL FOR THESIS

This thesis titled “TMPRSS2 (Transmembrane Protease Serine 2) Inhibitors, Their Mechanisms of Action and Design of Novel Derivatives” has been prepared and submitted by Selim MUYNAK in partial fulfillment of the requirements in “Anadolu University Directive on Graduate Education and Examination” for the Degree of Master of Science in Pharmaceutical Chemistry Department has been examined and approved on 06/02/2023

Committee Members

Signature

Member (Supervisor) : Assoc. Prof. Dr. Asiye MERİÇ

Member : Prof. Dr. Rahime ŞİMŞEK

Member : Prof. Dr. Ahmet Çağrı KARABURUN

Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ

Director

Graduate School of Health Sciences

ÖZET

TMPRSS2 (TRANSMEMBRAN SERİN PROTEAZ 2) İNHİBİTÖRLERİ, ETKİ MEKANİZMALARI VE YENİ TÜREVLERİN TASARLANMASI

Ecz. Selim MUYNAK

Farmasötik Kimya Anabilim Dalı
Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Şubat 2023

Danışman: Doç. Dr. Asiye MERİÇ

Transmembran serin proteaz 2, insanlarda TMPRSS2 geni tarafından kodlanan bir enzimdir. Bu gen, serin proteaz ailesine ait bir proteini kodlamaktadır. Serin proteazların birçok fizyolojik ve patolojik sürece dahil olduğu bilinmektedir. 2003 SARS koronavirüsü ve SARS-CoV-2 gibi bazı koronavirüslerin, TMPRSS2 tarafından aktive edildiği ve bu nedenle TMPRSS2 inhibitörleri tarafından inhibe edilebileceği öne sürülmektedir. SARS-CoV-2, giriş için SARS-CoV reseptörü ACE2'yi ve S protein hazırlama için serin proteaz TMPRSS2'yi kullanmaktadır. Bu nedenle en önemli viral hedef proteinlerden biri olarak TMPRSS2 ile inhibitörleri arasındaki olası etkileşimlerin incelenmesi, TMPRSS2 inhibitörleri ile yaygın olarak etkileşime giren önemli kalıntıların saptanması amaçlanmıştır. SARS-COV-2 için potansiyel tedaviler olarak TMPRSS2 inhibitörleri ve Bromheksin, Aprotinin, Rimantadin, Kamostat ve Nafamostat ile metabolitleri GBPA model alınarak tasarlanan beş molekül, bu tez konusunun kapsamını oluşturmuştur. Sentez aşamasında guanidin yapısı içeren moleküllerin stabilitesinde yaşanan sıkıntılardan dolayı bileşikler izole edilememiş olsa da, bilgisayar programlar aracılığıyla, tasarlanan beş molekülün ilaç benzerlik ve ilaç skorları incelenmiş, esnek hizalama ve farmakofor araştırmaları yapılmış, en yüksek değere sahip olanların moleküler yerleştirme ve modelleme çalışmaları yapılmıştır. TMPRSS2'nin yanısıra, Prostatin, Tripsin ve Matriptazın da hedef olarak değerlendirilerek karşılaştırma yapılması, gelecekteki araştırmalara ışık tutması açısından tarafımızca önerilmektedir.

Anahtar Sözcükler: Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı (BDİT), Kamostat, Nafamostat, TMPRSS2 inhibitörleri, Yapı-Aktivite İlişkileri

ABSTRACT

TMPRSS2 (TRANSMEMBRANE PROTEASE SERINE 2) INHIBITORS, THEIR MECHANISMS OF ACTION AND DESIGN OF NOVEL DERIVATIVES

Pharm. Selim MUYNAK

Department of Pharmaceutical Chemistry
Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, February 2023

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Asiye MERİÇ

Transmembrane serine protease 2 is an enzyme encoded in humans by the TMPRSS2 gene. This gene encodes a protein belonging to the serine protease family. Serine proteases are known to be involved in many physiological and pathological processes. It is suggested that some coronaviruses, such as the 2003 SARS coronavirus and SARS-CoV-2, are activated by TMPRSS2 and can therefore be inhibited by TMPRSS2 inhibitors. SARS-CoV-2 uses the SARS-CoV receptor ACE2 for input and serine protease TMPRSS2 for S protein preparation. Therefore, it is aimed to examine the possible interactions between TMPRSS2 and its inhibitors as one of the most important viral target proteins and to determine the important residues that commonly interact with TMPRSS2 inhibitors. In the context of TMPRSS2 inhibitors as potential treatments for SARS-COV-2, five molecules modeled on Bromhexine, Aprotinin, Rimantadin, Camostat, Nafamostat and their metabolites GBPA were the scope of this thesis topic. Although the compounds could not be isolated due to the difficulties in the stability of the designed molecules containing guanidine structure during the synthesis phase, drug similarity and drug scores of the five target molecules were examined through computer programs, flexible alignment and pharmacophore researches were carried out, and molecular docking and modeling studies of the highest value ones were carried out. In addition to TMPRSS2, we recommend that Proctasin, Trypsin and Matryptase be evaluated as targets and compared in order to shed light on future research.

Keywords: Camostat, Computer-Aided Drug Design (CADD), Nafamostat, Structure-Activity Relationships (SARs), TMPRSS2 inhibitors

06/02/2023

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı” yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Selim MUYNAK

** Bu belgenin ciltlenmiş tezin “Abstract” tan sonraki sayfasında ıslak imzanız ile (fotokopi olmayacak) yer alması gerekmektedir.*

06/02/2023

STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES

I hereby truthfully declare that this thesis is an original work prepared by me; that I have behaved in accordance with the scientific ethical principles and rules throughout the stages of preparation, data collection, analysis and presentation of my work; that I have cited the sources of all the data and information that could be obtained within the scope of this study, and included these sources in the references section; and that this study has been scanned for plagiarism with “scientific plagiarism detection program” used by Anadolu University, and that “it does not have any plagiarism” whatsoever. I also declare that, if a case contrary to my declaration is detected in my work at any time, I hereby express my consent to all the ethical and legal consequences that are involved.

Selim MUYNAK

**This document has to be included with your original signature (no photocopies) on the page following the “Abstract” page of the bound copy of the thesis.*

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	ii
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	iii
FINAL APPROVAL FOR THESIS.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vii
STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Transmembran Serin Proteaz 2 (TMPRSS2).....	3
1.2. TMPRSS2 Fonksiyonel Alanları.....	4
1.3. TMPRSS2 Biyomarker Olarak Önemi.....	6
1.4. TMPRSS2 Viral Hastalıklar İlişkisi.....	6
1.4.1. TMPRSS2 SARS- CoV İlişkisi.....	6
1.4.2. TMPRSS2 İnfluenza İlişkisi.....	11
1.5. TMPRSS2 Kanser İlişkisi.....	13
1.6. TMPRSS2 Hedefli Tedavilerin Avantajları.....	16
1.7. TMPRSS2 İnhibitörleri.....	17
1.7.1. Kamostat ve Nafamostat.....	18
1.7.2. Aprotinin.....	20
1.7.3. Bromheksin.....	21
1.7.4. Bazı Doğal Flavonoidler.....	21
1.7.5. Benzoselenoksanten Türevi Bileşikler.....	22
1.7.6. Phe(3-Am) Türevi Bileşikler.....	23
1.7.7. Diğer Bileşikler.....	23

1.8.TMPRSS2 İnhibitörleri İle Yapılmış Çalışmalar.....	27
1.9.TMPRSS2 İnhibitörleri Moleküler Etkileşimleri.....	28
1.10.Literatürde İzlenen Genel Sentez Yöntemleri.....	35
1.10.1.Nafamostat sentezi.....	35
1.10.2.Kamostat sentezi.....	35
1.11.Literatür Özeti.....	36
1.12.Konu ve Kapsam.....	37
2. GEREÇ VE YÖNTEM	39
2.1.İlaç Benzerlik Özelliği ve İlaç Skoru Araştırması.....	39
2.2.Tasarlanan Bileşiklerin Planlanan Sentez Şemaları.....	42
3. BULGULAR VE YORUM.....	48
3.1.Kimyasal Sentez Çalışmaları.....	48
3.2.Moleküler Modelleme Çalışmaları.....	48
3.2.1.Esnek hizalama çalışması.....	48
3.2.2.Ligand etkileşim haritası.....	50
3.2.3.Farmokofor çalışması.....	51
3.2.4.Moleküler yerleştirme çalışması.....	54
3.2.4.1.1 nolu bileşik için moleküler yerleştirme çalışması.....	54
3.2.4.2.5 nolu bileşik için moleküler yerleştirme çalışması.....	59
4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	61
KAYNAKÇA.....	63
EK-1. Tez Hazırlama Kontrol Listesi.....	70
ÖZGEÇMİŞ.....	71

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1. Protein parçalanmasında rol oynayan başlıca amino asitler	1
Tablo 2. En yaygın kullanılan proteazlar	2
Tablo 3. Çalışılan bileşiklerin moleküler yerleştirme skorları ve H-bağları	30
Tablo 4. Protein-ligand bağlanma enerjileri ve AutoDock Vina ile yapılan moleküler yerleştirme'den türetilen etkileşimler	33
Tablo 5. Tez kapsamında tasarlanan bileşikler	39
Tablo 6. Tasarlanan bileşikler ile literatüre kayıtlı bileşiklerin Osiris Programı ile incelenmesi	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.	TMPRSS2 proteininin fonksiyonel alanları ve protein dizisindeki yerleri 5
Şekil 2.	TMPRSS2'yi hedefleyen kilit temas bölgeleri 5
Şekil 3.	TMPRSS2 inhibitörü olan Nafamostat, SARS-CoV-2 hücre girişini engelleme mekanizması 7
Şekil 4.	TMPRSS2 astarlama ile aktif hale gelen viral membran füzyon ve hücresel girişten önce; TMPRSS2'nin ve furin astarlanmış Spike proteininin ACE2 reseptörüne bağlanması 8
Şekil 5.	TMPRSS2 proteazın, SARS-CoV-2 enfeksiyonundaki rolü 9
Şekil 6.	TMPRSS2'nin HAI-2 ile inhibisyonu için şematik model 15
Şekil 7.	Kamostat ve metabolitleri 18
Şekil 8.	TMPRSS2'nin klinikte kullanılan inhibitörleri 19
Şekil 9.	Aprotinin 20
Şekil 10.	Bromheksin 21
Şekil 11.	Bazı doğal diyet flavonoidler 22
Şekil 12.	Benzoselenoksantenler 22
Şekil 13.	Phe(3-Am) türevi TMPRSS2 inhibitörleri 23
Şekil 14.	Bazı TMPRSS2 ve furin inhibitörleri 23
Şekil 15.	Sanal taramadan tanımlanan TMPRSS2 inhibitörleri 24
Şekil 16.	Teaflavin 24
Şekil 17.	TMPRSS2 inhibitörü olarak listelenen ilaçların kimyasal yapısı 25
Şekil 18.	Çalışılan TMPRSS2 inhibitörlerinin yapısı 26
Şekil 19.	Enzalutamid 26
Şekil 20.	Diminazen'in TMPRSS2 bağlama modu ve bağlanma bölgesi içinde; hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler ve π -istiflenmesinin 3D gösterimi 28
Şekil 21.	Diminazen'in Furin katalitik/bağlanma bölgesinde bağlanma modu ve hidrojen bağları ile hidrofobik etkileşimlerin 3D gösterimi 28
Şekil 22.	In silico değerlendirmede seçilen 3 TMPRSS2 inhibitörünün bağlanma etkileşim analizi 29
Şekil 23.	TMPRSS2'nin bağlanma yeri ve katalitik kalıntıları 29
Şekil 24.	Bilinen bazı TMPRSS2 inhibitörlerinin, TMPRSS2 aktif bölgesinde tahmin edilen bağlanma modelleri 31
Şekil 25.	Moleküler yerleştirme skoru yüksek iki molekül 32
Şekil 26.	Benzkuersin 33

Şekil 27.	Beş standart ilaç molekülünün iki boyutlu gösterimi	34
Şekil 28.	Son önerilen moleküllerin iki boyutlu gösterimi	34
Şekil 29.	Nafamostat sentez şeması	35
Şekil 30.	Kamostat sentez şeması	35
Şekil 31.	Tasarlanan 5 molekülün ana yapısı	42
Şekil 32.	1 Nolu bileşik için önerilen sentez şeması	43
Şekil 33.	2 Nolu bileşik için önerilen sentez şeması	44
Şekil 34.	3 Nolu bileşik için önerilen sentez şeması	45
Şekil 35.	4 Nolu bileşik için önerilen sentez şeması	46
Şekil 36.	5 Nolu bileşik için önerilen sentez şeması	47
Şekil 37.	Tasarlanan bileşiklerin MOE programı ile “Esnek Hizalama” çalışması	49
Şekil 38.	Tasarlanan bileşiklerin ligand etkileşimleri ve ligand etkileşim raporu	50
Şekil 39.	Tasarlanan 5 Nolu bileşik	51
Şekil 40.	Oluşturulan ilk ek açıklama özelliği, H bağı donörü olan <i>Don</i> özelliği	51
Şekil 41.	Oluşturulan ikinci ek açıklama özelliği, H bağı alıcısı olan <i>Acc</i> özelliği	52
Şekil 42.	Oluşturulan bir sonraki ek açıklama özellikleri, aromatik merkezler olan <i>Aro</i> özellikleri	52
Şekil 43.	Oluşturulan son ek açıklama özelliği, hidrojen bağı donör projeksiyonu olan <i>Don2</i> özelliği	52
Şekil 44.	%100 skora sahip farmakofor alanlar	53
Şekil 45.	Tüm skorların işaretli olduğu farmakofor alanlar	53
Şekil 46.	Tasarlanan 1 nolu bileşiğin “Moleküler yerleştirmesi” (pdb:7meq)	58
Şekil 47.	Tasarlanan 5 nolu bileşiğin “Moleküler yerleştirmesi” (pdb:7meq)	59
Şekil 48.	Tasarlanan 5 nolu bileşiğin “Moleküler yerleştirmesi” (pdb:7meq)	60

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

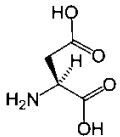
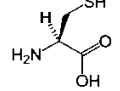
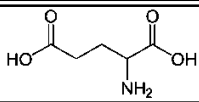
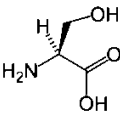
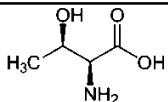
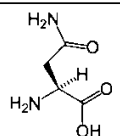
ACE 2	Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2
ADT	Androjen yoksunluk tedavisi
AR	Androjen Reseptörü
ARDS	Akut solunum sıkıntısı sendromu
ARE	Androjen Regüle Element
CatB/L	Katepsin B ve L
COVID-19	Koronavirüs hastalığı 2019
ERG	ETS ile ilişkili gen (ERG)
F2RL1	Pıhtılaşma faktörü II (trombin) reseptör türevi 1
GBA	4-Guanidinobenzoik asid
GBPA	4-(4-Guanidinbenzoiloksi) fenil-asetik asid
GEO	Gene expression omnibus
HA	Hemaglutininin
HCoV-229E	İnsan Koronavirüs 229E
HCoV-EMC	İnsan Koronavirüs Erasmus Tıp Merkezi /2012
HCV	Hepatit C virüsü
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
IAV	İnfluenza A virüsü
MERS-CoV	Orta Doğu solunum koronavirüs sendromu
MOE	Moleküler İşletim Ortamı
mRNA	Haberci (messenger) RNA
NA	Nöraminidaz
NRP1	Nöropilin-1
PAR-2	Proteaz-aktive reseptör-2
PC	Prostat Kanseri
PCA3	Prostat kanser antijeni 3
Phe(3-Am)	3-Amidinofenilalanin
PSA	Prostat spesifik antijen
SARS-CoV-2	Şiddetli akut solunum koronavirüs 2 sendromu
TTSP	Tip II transmembran serin proteaz
TMPRSS2	Transmembran Serin Proteaz 2

1. GİRİŞ

Genel olarak proteazlar, proteinlerin parçalanmasından sorumlu enzim grubudur. Proteazlar (veya peptidazlar), peptid bağlarının hidroliz reaksiyonu ile yıkımını katalizler. Proteaz enzimleri hayvan, bitki, bakteri, arkea ve virüslerde bulunur. Katalitik mekanizmalarına göre 7 ana sınıfa ayrılırlar; serin, treonin, sistein, aspartik, glutamik asit, metallo proteazlar ve asparagin peptid liyazlar.

- ❖ Serin proteazlar, serin alkol kullanır
- ❖ Sistein proteazlar, bir sistein tiyol kullanır
- ❖ Treonin proteazlar, treonin sekonder alkol kullanır
- ❖ Aspartik proteazlar, bir aspartat karboksilik asit kullanır
- ❖ Glutamik proteazlar, bir glutamat karboksilik asit kullanır
- ❖ Metallo proteazlar, bir metal, genellikle çinko kullanır
- ❖ Asparagin peptid liyazlar, bir eliminasyon reaksiyonu gerçekleştirmek için bir asparagin kullanır (su gerektirmez).

Tablo 1. Protein parçalanmasında rol oynayan başlıca amino asitler

Aminoasit	Moleküler Yapı	3-Harf	Tek harf	Yan zincir polaritesi	Yan zincir asidite veya bazisite
Aspartik asit		Asp	D	polar	asidik
Sistein		Cys	C	polar	nötr
Glutamik asit		Glu	E	polar	asidik
Serin		Ser	S	polar	nötr
Treonin		Thr	T	polar	nötr
Asparagin		Asn	N	polar	nötr

Proteazlar ilk olarak 1993 yılında evrimsel ilişkilerine göre 84 aileye ayrılmış ve 4 katalitik tip altında sınıflandırılmıştır: Serin, sistein, aspartik ve metalloproteazlar. Treonin (1995) ve glutamik asit (2004) proteazlar nispeten daha sonra karakterize edilmiştir (https://www.atamanchemicals.com/proteases_u26405/?lang=TR).

Tablo 2. *En yaygın kullanılan proteazlar*

Proteaz	Gen Ailesi	Parçalama Noktası
ArgC	Sistein proteaz	R'nin C-terminali
AspN	Metalloproteaz	D'nin N-terminali
Kimotripsin	Serin proteaz	F, Y, L, W ve M bölgelerinin C-terminali
GluC	Serin proteaz	D'nin C-terminali
LisargiNaz	Metalloproteaz	R ve K bölgelerinin N-terminali
LysC	Serin proteaz	K'nın C-terminali
LysN	Metalloproteaz	K'nın N-terminali
Pepsin	Aspartik proteaz	Y, F ve W'nin C-terminali
Tripsin	Serin proteaz	R ve K'nın C-terminali
WaLP ve MaLP	Serin proteaz	Alifatik aminoasitlerin C-terminali

Peptid bağının yıkımı, proteazın katalitik sistein veya treonin amino asitinin veya bir su molekülünün peptitteki karboksil (C=O) grubuyla nükleofilik yer değiştirme reaksiyonu sonucu olur. Nükleofil oluşumunu katalitik üçlüde yer alan histidin sağlar. Proteazlar ayrıca en aktif oldukları pH derecelerine göre de sınıflandırılırlar: asidik, nötr ve bazik (alkali) proteazlar. Proteolitik reaksiyonlar basit veya karmaşık biyolojik proseslerdir ve iyi şekilde düzenlenmeleri gerekir. Doğada bunu sağlayan proteaz regülasyon mekanizmaları görülmektedir, örneğin; yüksek substrat özgüllüğü. Bazı proteazlar yüksek substrat özgüllüğü göstermez ve neredeyse bütün proteinleri parçalayabilir, sindirimde rol alan tripsin gibi.

Serin proteazların gıda sindirimi, hormon işleme, kan pıhtılaşması, yara iyileşmesi ve embriyonik gelişim dahil olmak üzere çeşitli biyolojik işlemler için gerekli olduğu ilk beyan edilen bilgiler arasındadır. Tripsin benzeri serin proteazların çoğu salgılanan

proteinler olup, ilerleyen süreçte, hücre dışı C terminallerinde tripsin benzeri proteaz alanı içeren transmembran proteinler olan korin ve matriptaz gibi birkaç yeni serin proteaz tanımlanmıştır. Enteropeptidaz ve hepsin ile birlikte bu proteinlerin, tripsin süper ailesi içinde tip II transmembran proteazlarının farklı bir alt sınıfını temsil ettiği not edilmiştir. Tripsin benzeri serin proteazlar ayrıca *Drosophila melanogaster*'da embriyonik gelişimde önemli rol oynamaktadır. Serin proteazlar, gelişmekte olan bir embriyodaki dorsal-ventral polarite için önemli bir sinyal yolunun anahtar bileşenleridir. Stubble-stubbloid geni, hepsininkine benzer genel bir alan yapısı ile tip II transmembran serin proteazı kodlar (Xu vd., 2022).

1.1. Transmembran Serin Proteaz 2 (TMPRSS2)

Transmembran serin proteaz 2 (TMPRSS2) ile ilgili araştırmaların başlangıcı 1999 yılına dayanmaktadır. TMPRSS2, gen orijinal olarak klonlandıktan kısa süre sonra ilk olarak prostat kanserinde tanımlanmıştır.

Transmembran serin proteaz II; hepsin, matriptaz, insan solunum tripsin benzeri proteaz (HAT) ve korin gibi fizyolojik önemi olan enzimlerin dahil olduğu tip II transmembran serin proteaz (TTSP) ailesinin bir üyesidir (Zhang vd., 2022).

TMPRSS2 mRNA prostat, göğüs, safra kanalı, böbrek, kolon, ince bağırsak, pankreas, yumurtalık, tükrük bezi, mide ve akciğer dokularında sentezlenir. TMPRSS2 proteini aerodijestif yolda sentezlenir (Singh vd., 2021).

TMPRSS2'nin hücre içi otokataliz yoluyla aktive edildiği ve hepatosit büyüme faktörü aktivatör inhibitörleri 1 ve 2 varlığında bu sürecin bloke edildiği keşfedilmiştir. Çoğu TTSP, tek zincirli bir zimojen formunda sentezlenir. N- veya O-glikozilasyon, zimojen aktivasyonu, fosforilasyon ve ektodomain bölünmesi gibi posttranslasyonel değişimler, TTSP faaliyetlerinin düzenlenmesinde önemli mekanizmalardır (Zhang vd., 2022).

TMPRSS2 geni, androjen bakımından zengin ortamlarda yüksek oranda eksprese edilir. Androjenlerin yanı sıra, TMPRSS2 aktivitesi östrojen ve glukokortikoidler gibi

diğer steroid hormonlarının varlığında da düzenlenir. Genin en yüksek ekspresyon seviyesi prostat bölgesinde bildirilirken, akciğerler de önemli ölçüde yüksek ekspresyon seviyelerine sahiptir. Bu yüksek ifade, TMPRSS2'nin transkripsiyon başlangıç bölgesinin ve ilk intron'un yukarı akımında bulunan androjen regüle elementler (ARE'ler) içerdiği gerçeğiyle açıklanabilir. Androjen tarafından düzenlenen prostat kanseri hücrelerinde, TMPRSS2 androjen hormonları tarafından yukarı regüle edilirken, bunun tersi androjenden bağımsız prostat kanseri hücreleri için geçerlidir (Abbasi vd., 2021).

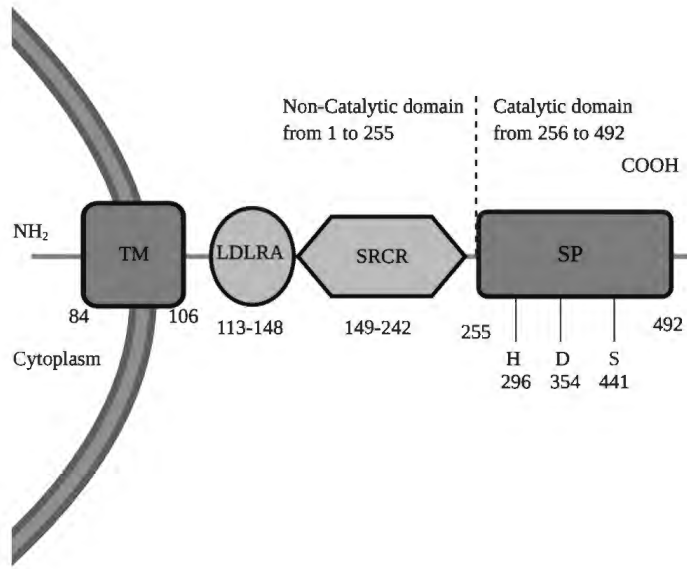
Bunun yanı sıra, TMPRSS2 ayrıca prostattaki proteaz-aktive reseptör-2'yi (PAR-2) proteolitik olarak aktive ederek inflamasyonu düzenlemektedir (Abbasi vd., 2021).

Akciğerlerde TMPRSS2, epitelyal sodyum kanallarını proteolitik olarak ayırarak epiteldeki sodyum akımlarını kontrol eder. Solunum yolu epitelinde TMPRSS2'nin epitel sodyum kanallarının (ENaC) düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Donaldson vd., 2002).

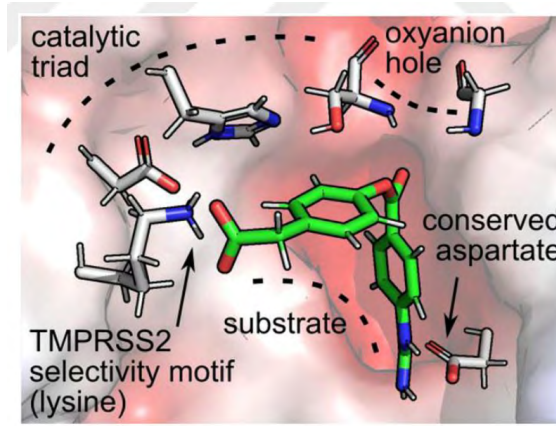
TMPRSS2 pek çok substratı aktive eder: HGF (hepatosit büyüme faktörü), F2RL1 (pıhtılaşma faktörü II (trombin) reseptör türevi 1), ekstraselüler matriks bozulmasına neden olan matriptaz/ST14 gibi. Trigeminal nöronları aktive ederek spontane acı ve mekanik allodini oluşturur (Lam vd., 2015).

1.2. TMPRSS2 Fonksiyonel Alanları

TMPRSS2 proteini çeşitli fonksiyonel alanlara sahiptir. Bu alanlar ve protein dizisindeki yerleri Şekil 1'de gösterilmektedir.



Şekil 1. *TMPRSS2* proteininin fonksiyonel alanları ve protein dizisindeki yerleri. *TMPRSS2*, katalitik olmayan zinciri (1-255) ve katalitik zinciri (256-492) içerir. Katalitik zincir, bağlanma ve katalitik bölgeler olarak işlev gören *HIS296*, *ASP345* ve *SER441* kalıntılarını içerir. *ASP* (*D*), *HIS* (*H*), *LDL* reseptör sınıf *A* (*LDLRA*) alanı, çöpçü reseptörü sistein 'ce zengin (*SRCR*) alanı, *SER* (*S*), serin proteaz (*SP*) alanı ve transmembran (*TM*) alanı (Abbasi vd., 2021).



Şekil 2. *TMPRSS2*'yi hedefleyen kilit temas bölgeleri (Escalante vd., 2021)

Substrat bağlanmasının, paylaşılan guanidino farmakoforu ve A cebinde D435 (katalitik S441'in yanında) arasında tuz köprüsü oluşumu yoluyla öncelikle stabilize edildiği gösterilmiştir. GBPA'nın bağlama moduna göre, K342 ve W461 kalıntıları, *TMPRSS2* seçici bağlanma ve aktivitesinde rol oynayan potansiyel temas noktaları olarak tanımlanmıştır. Ek veriler göstermiştir ki, geçiş durumu yapısı, S441'e karbonil'in alt taraftan atağını takiben bir oksianyon deliği içinde, iskeletin N-H grupları ile H-bağ etkileşimleri yoluyla stabilize edilmektedir (Escalante vd., 2021).

1.3.TMPRSS2 Biyomarker Olarak Önemi

Serum prostat spesifik antijen (PSA), tümör biyolojisinde en önemli biyomarkerlerden biridir. Prostat kanseri teşhis ve hastalık takibinde standart biyomarker olarak kabul edilmektedir. Fakat PSA oldukça fazla hatalı pozitif veya hatalı negatif sonuçlar verebilmektedir. PSA düşük spesifikasyona sahiptir (%25-40). Yüksek serum PSA seviyeleri prostatit ve benign prostat hiperplazisi gibi non-neoplastik hastalıklarda da gözlenebilmektedir (Thompson vd. 2004). TMPRSS2:ERG tek başına marker olarak kullanıldığında düşük hassasiyet (%37), yüksek spesifikasyona (%93) sahiptir. TMPRSS2:ERG ve PCA3 kombine kullanıldığında prostat teşhisinde %90 spesifikasyon, %80 hassasiyet sağlayabilmektedir. Fakat bunun geniş kapsamlı araştırmalarla doğrulanması gerekmektedir (Reig vd., 2016).

Biyomarker olarak TMPRSS2:ERG hormon dirençli metastatik prostat kanseri hastalarının taksan türevi ilaçlara yanıt verme durumu hakkında bilgi verebileceği öne sürülmektedir (Reig vd., 2016).

1.4. TMPRSS2 Viral Hastalıklar İlişkisi

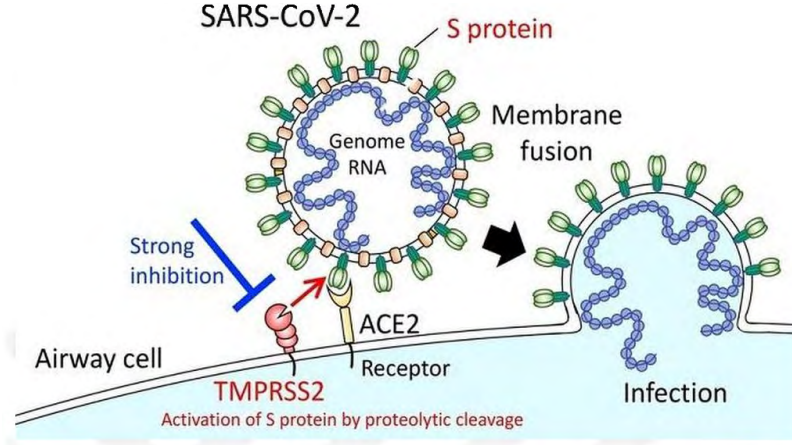
Bazı virüs tipleri (SARS-COV-1, MERS-CoV, SARS-CoV-2 gibi) TMPRSS2 üzerinden aktive olmaktadır.

1.4.1. TMPRSS2 SARS-CoV ilişkisi

TMPRSS2, TMPRSS11A, TMPRSS11D gibi tripsin türevi serin proteazların, Furin, Katepsin L gibi pek çok proteazın *in vitro* ortamda koronavirüsleri aktive ettiği tespit edilmiştir (Luan vd., 2020). Pek çok virüsün proteolitik aktivasyonunda TMPRSS2 ve furin önemli rol oynamaktadır (Bestle vd., 2020).

SARS virüsünün konak hücreye giriş süreci ACE2 (Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2) reseptörü ve hücre yüzeyi proteini TMPRSS2 ile olabilmektedir (Matsuyama vd., 2010; Li vd., 2003).

Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) virüsü, ACE2 reseptörüne bağlanma eğilimi göstermektedir. Virüsün spike glikoproteininin aktivasyonu ve ayrılması konak hücre TMPRSS2 enzimi ile olmaktadır. Bu yolun inhibe edilmesinin virüsün replikasyonunu ve yayılmasını durdurduğu veya engellediği öne sürülmektedir.

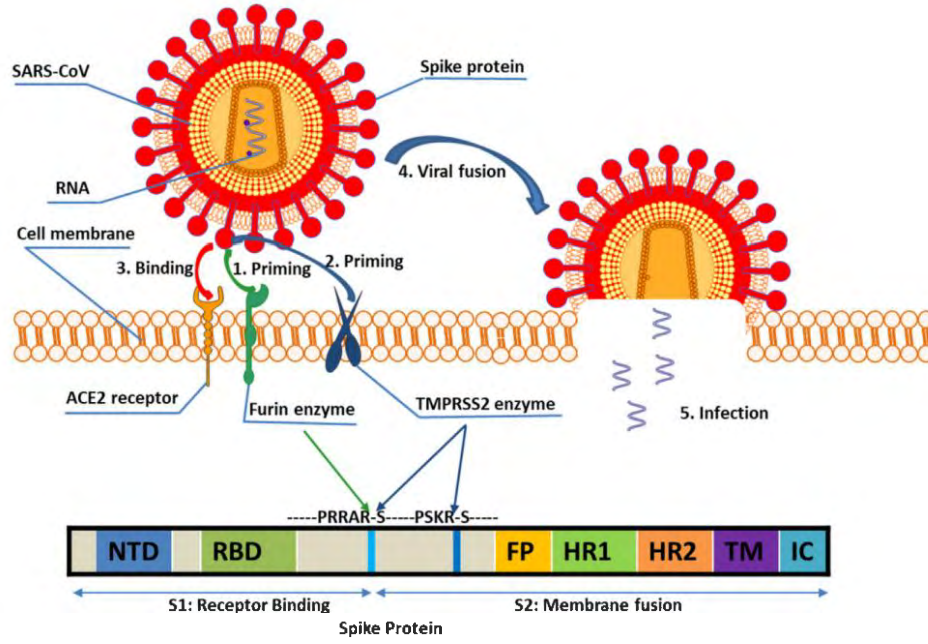


Şekil 3. *TMPRSS2 inhibitörü olan Nafamostatın SARS-CoV-2 girişini engelleme mekanizması* (https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/en/about/press/page_00002.html)

Koronavirüslerin hücre içine girişi spike (S) proteini ile sağlanmaktadır (Şekil 3). Bu protein S1 ve S2 olarak iki kısımdan meydana gelmektedir. S1 kısmı virüsün hücre yüzeyine bağlanmasını sağlamakta, S2 kısmı ise virüsün hücre membranı ile füzyonunu sağlamaktadır (Hoffmann vd., 2020).

TMPRSS2'nin, tip II pnömositler üzerinde SARS-CoV reseptörü ACE2 ile birlikte eksprese edildiği bildirilmiştir. TMPRSS2 fonksiyonu yoluyla S proteininin proteolitik işlenmesinin viral replikasyonu düzenleyebileceği ve enfekte konakçıda yayılabileceği düşünülmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, SARS-CoV-2'nin S proteininin, konakçı kaynaklı proteazlar tarafından iki bölgede (S1 / S2 ve S2') proteolitik olarak işlendiğini göstermektedir (Paszti-Gere vd., 2022).

Calu-3 hücrelerinde furin, S proteinini S1 / S2 bölgesinde ve TMPRSS2'yi S2' bölgesinde parçalamakta, böylece viral ve hücrel membranların füzyonunu sağlayan N-terminal füzyon peptidi ile S2 alt birimini serbest bırakmaktadır (Paszti-Gere vd., 2022).



Şekil 4. *TMPRSS2* astarlama ile aktif hale gelen viral membran füzyon ve hücresel girişten önce; *TMPRSS2*'nin ve furin astarlanmış Spike proteininin ACE2 reseptörüne bağlanması. NTD: N terminal etki alanı; RBD: reseptör bağlama alanı; FP: füzyon peptidi; HR: heptad tekrarlar; TM: transmembran alanı; CT: sitoplazmik kuyruk (Xu YM vd., 2022).

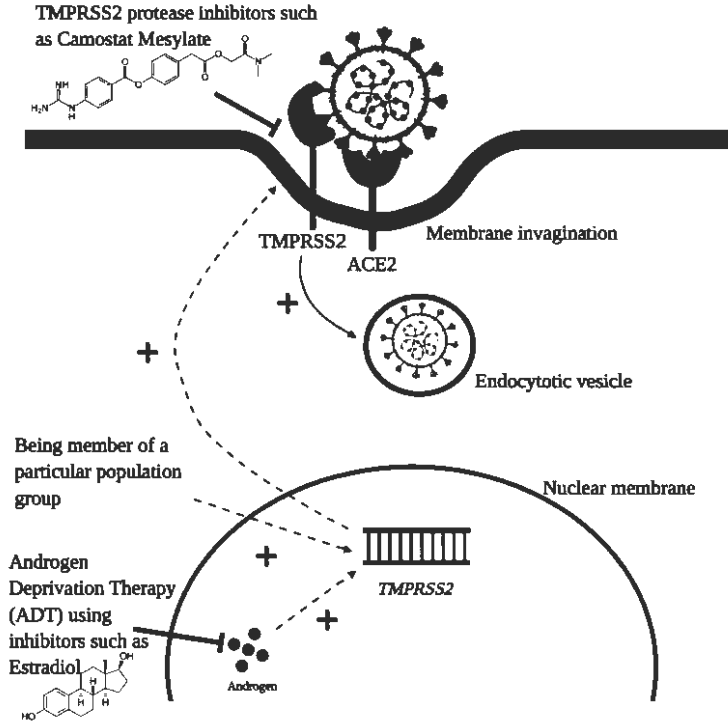
Furin, S proteinin S1/S2 bölgesinden bölünmesini sağlarken, *TMPRSS2*'nin S2 bölgesinden bölünmesini sağlamakta ve S proteinin membran füzyon aktivitesini başlatmaktadır (Bestle vd., 2020).

TMPRSS2, konakçıdan antikorları nötralize ederek virüslerin tespitini daha da zayıflatmakta, böylece viral patogenezi kolaylaştırmaktadır (Glowacka vd., 2011; Sharma vd., 2022).

Farklı bir çalışmada NRP1 (Nöropilin-1), SARS-CoV-2 enfeksiyonunda görev alan konak hücreye ait bir diğer faktör olarak tanımlanmıştır. NRP1 solunum ve olfaktör organlarda yoğun bir şekilde eksprese edilmektedir (Daly vd., 2020).

S protein parçası direkt olarak NRP1 ile etkileşime girebilmektedir. ACE2 ve *TMPRSS2* ko-ekspresyonu ile NRP1 SARS-CoV-2 enfeksiyonu ve yayılmasında görev alabilmektedir (Cantuti-Castelvetri vd., 2020; Yao vd., 2022).

TMPRSS2 ekspresyonunun fazla olduğu hücrelerde viral hasarın daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Abbasi vd., 2021).



Şekil 5. *TMPRSS2 proteazın, SARS-CoV-2 enfeksiyonundaki rolü. SARS-CoV-2 S-proteininin ACE2 reseptörü ile bağlanmasından sonra, S-proteini TMPRSS2 proteazı tarafından astarlanır ve bu da viral girişle sonuçlanır. Artı (+) işareti, TMPRSS2 proteaz ekspresyonunu ve SARS-CoV-2 astarlamasını artıran tüm faktörleri gösterir. İnhibitör (---) işareti, TMPRSS2 proteazına karşı inhibitör etkiye sahip olabilecek terapötik hedefleri gösterir (Abbasi vd., 2021).*

SARS-CoV-2 virüsünün S proteinin ayrılması TMPRSS2 reseptörleri sayesinde gerçekleşmektedir. Bu reseptörlerin yokluğunda virüs endozomal proteaz olan Katepsin B/L gibi diğer proteazlar ile etkileşime girebilmektedir (Simmons vd., 2005).

Virüsün konak hücreye girişinde ve yayılmasında diğer proteazlar da görev almasına rağmen TMPRSS2'nin hayati önem taşıdığı düşünülmektedir (Iwata-Yoshikawa vd., 2019; Oluwaseun vd., 2022).

Bunların yanısıra TMPRSS2'nin SARS-CoV ve MERS-CoV enfeksiyonlarında virüsün konak hücreye girişinde vazgeçilmez olduğu belirtilmiştir (Abbasi vd., 2021).

Ayrıca, serin proteaz inhibitörü olan kamostat ile muamele edilmiş hücre hatları içeren TMPRSS2'nin tedavisi, MERS-CoV'nin bu hücreleri enfekte etme yeteneğini tamamen bloke etmekte ve bu da MERS-CoV'nin TMPRSS2 proteazına bağımlılığını açıklamaktadır. Konakçı hücrelere SARS-CoV girişi, TMPRSS2 astarına ek olarak katepsin-L'ye bağlıdır ve bu reseptörlerin inaktivasyonu, SARS-CoV girişinin tamamen bloke edilmesi için gerekli olduğu bildirilmiştir (Abbasi vd., 2021).

Yapılan bir çalışmada SARS-CoV-2 virüsünün ACE2-IPS hücreyi enfekte edebilmesi için TMPRSS2 ve CTSB (Katepsin B) gerekli olduğu belirtilmiştir. TMPRSS2 ve CTSB'nin endositoz bağımlı veya endositoz bağımsız enfeksiyonda önemli rol oynadığı belirtilmiştir. Özellikle CA-074 Me ve kamostat tedavisi virüs enfeksiyon etkisinde düşüş sağlamıştır fakat tam inhibisyon etkisi gerçekleşmemiştir. Bu nedenle tanımlanmamış diğer genlerin de enfeksiyona etki ettiği düşünülmektedir (Hashimoto vd., 2021).

Diğer viral hastalıklarla karşılaştırıldığında SARS-CoV-2'nin en yaygın ve ayırt edici özelliklerinden biri, semptomatik ve asemptomatik hastaların hepsinde olmasa da çoğunda görülen anosmi olarak bilinen geçici koku duyusu kaybıdır. Anosmi, SARS-CoV-2'nin epitel tabakasına verdiği hasarla ve daha sonra koku alma organındaki reseptör nöronlarının iltihaplanması veya bozulmasıyla bağlantılı olarak varsayılabilir (Abbasi vd., 2021).

SARS-CoV-2 patogeneziindeki hayati rolü ile birçok çalışma, TMPRSS2'yi SARS-CoV-2 enfeksiyonunu baskılamak için etkili bir hedef olarak önermektedir (Padmanabhan vd., 2020; Shang vd., 2020).

Gene expression omnibus (GEO) sigara kullanımının akciğerde TMPRSS2 ekspresyonunu önemli ölçüde artırdığını açıklamıştır. Fakat bu artışın kalıcı olmadığını ve sigara kullanımı bırakıldığında TMPRSS2 ekspresyonunun sigara kullanmayan bireyinki ile aynı seviyeye geldiği açıklanmıştır (Abbasi vd., 2021).

Epidemiyolojik veriler, teşhis edilen SARS-COV-2 insidansının ve şiddetinin erkeklerde kadınlardan daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu durumun androjenler gibi

cinsiyet hormonlarının seviyelerindeki farklılıklar ve erkeklerde TMPRSS2 konakçı giriş faktörünün yukarı regülasyonu da dahil olmak üzere, erkeklerde ve kadınlarda meydana gelen transkripsiyonel sinyal ağlarından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Bu durumun androjen reseptörü (AR) aktivitesi inhibisyonunun ve TMPRSS2'nin aşağı regülasyonunun SARS-CoV-2 enfeksiyonunu önleyebileceği hipotezine yol açmıştır (Qiao vd., 2021; Xu vd., 2022).

Farklı bir çalışma farelerde enzalutamid tedavisinin akciğerdeki TMPRSS2 seviyelerini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. TMPRSS2 ekspresyonunu azaltmak ve SARS-COV-2 tedavisinde enzalutamid gibi AR inhibitörlerinin kullanımında güçlü bir gerekçe sağlamıştır. Yapılan yeni çalışmalarda enzalutamidin insan prostat hücrelerinde, SARS-CoV-2 enfeksiyonunu etkili bir şekilde inhibe etmesine rağmen, akciğer hücrelerinde TMPRSS2 ekspresyonunu azaltmadığı ve SARS-COV-2 tedavisinde koruyucu bir rolü olmadığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, androjen yoksunluğu tedavisi alan PC (Prostat Kanseri) hastalarının SARS-CoV-2 enfeksiyonundan kısmen korunduğu görülmektedir. Bu nedenlerle, TMPRSS2 ekspresyonunu veya aktivitesini hedeflemek, SARS-COV-2 dahil olmak üzere koronavirüslerinin potansiyel müdahalesi için umut verici bir yaklaşım olabileceği düşünülmektedir (Xu vd., 2022).

1.4.2. TMPRSS2 İnfluenza İlişkisi

İnfluenza A virüsü (IAV) hemaglutininin (HA), konakçı proteazlar tarafından proteolitik bölünmesi virüsün bulaşıcılığı ve yayılması için çok önemli olduğu düşünülmektedir.

Shen arkadaşlarının 2020'de yaptığı çalışma ile, insan TMPRSS2 geninin promotör bölgesinde ve potasyum iyonları varlığında, molekül içi G-dörtlüsü oluşturabilen guanin bakımından zengin bir alanın, gen transkripsiyonel aktivite için oldukça önemli olduğu ve bu nedenle işlevi arttırdığı gözlemlenmiştir. Sözü edilen çalışmada, 7 yeni sentezlenmiş benzoselenoksanten analogunun, bu G-dörtlüsünü stabilize edebildiği bulunmuştur. Daha önemlisi, bu bileşiklerin, TMPRSS2 gen ekspresyonunu, özellikle endojen TMPRSS2 protein seviyelerini aşağı regüle edebileceği

ve sonuç olarak influenza A virüsünün *in vitro* yayılımını baskılayabileceği rapor edilmiştir (Shen vd., 2020).

Hem H1N1 hem de H7N9, konakçı girişi için gerekli olan hemaglutinin (HA) ve nöraminidaz (NA) proteinleri içeren influenza-A virüsleridir ve ayrıca bu virüsler için sınıflandırmanın temelini oluşturur (Abbasi vd., 2021).

İnfluenza virüsü yüzey glikoproteini hemaglutininin (HA) hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanmada, virüsün füzyonunda ve viral nükleokapsitin hedef hücre sitoplazmasına bırakılmasında aracılık eder. HA, HA0'ın prekürsör proteini olarak sentezlenir. Füzojenik kapasitesini kazanmak için konak hücre proteazı tarafından HA1 ve HA2 olarak bölünmesi gerekmektedir (Böttcher vd., 2009).

İnsan serin proteazlar olan HAT (insan hava yolu tripsin benzeri proteaz) ve TMPRSS2'nin HA'yı monobazik bölünme bölgesi ile parçaladığı ve *in vitro* olarak çok döngülü viral replikasyonu desteklediği gösterilmiştir (Böttcher vd., 2006).

Son zamanlarda, influenza virüsü HA için; TMPRSS2'nin, füzyon proteini F'nin proteolitik aktivasyonu ile insan metapnömovirüsünün *in vitro* olarak çok döngülü replikasyonunu desteklediği gösterilmiştir (Shirogane vd., 2008).

Pászti-Gere arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada TMPRSS2'nin mevsimsel grip için de potansiyel hedef olabileceği öne sürülmüştür (Pászti-Gere vd., 2022).

In vivo çalışmalar, TMPRSS2-nakavt farelerin daha hafif influenza semptomları sergilediğini ve vahşi tip akranlarına kıyasla ölüm oranlarının azaldığını göstermiştir (Hatesuer vd., 2013).

Bütünüyle değerlendirildiğinde; konak hücre yüzeyi faktörü TMPRSS2 klinik olarak koronavirüs suşları ve influenza A virüs suşları gibi virüslerin yayılmasında önemli yer aldığı görülmektedir (Matsuyama vd., 2010; Gierer vd., 2013; Zhou vd., 2015).

1.5.TMPRSS2 Kanser İlişkisi

TMRSS2 proteini, çoğunlukla prostat salgı epitelinde ve prostat kanserinde sentezlenir. Sentezi androjen sinyaline bağlıdır. Çalışmalar göstermektedir ki; en yüksek TMPRSS2 sentezlenmesi prostatın apikal tarafı, prostat kanseri salgı epiteli ve bezlerin lümenidir. Ayrıca kolon kanseri ve pankreas örneklerinde gözlenmiştir. Veriler ışığında, TMPRSS2'nin prostat ve prostat kanserinde yüksek oranda sentezlenmesi TMPRSS2'yi prostat kanserinin tanı ve tedavisi için olası bir hedef yapmaktadır (Afar vd., 2001; Afshari vd, 2021).

TMRSS2-ERG füzyonu prostat kanserli hastalarda bulunabilmektedir. Bu genin prostat kanseri prognozunda ve hedefe yönelik tedavilerde potansiyel hedef olarak kullanılabilceği düşünülmektedir (Tomlins vd., 2005).

İnsanlarda TMPRSS2'nin aşırı ekspresyonunun ve genin yeniden düzenlenmesinin prostat kanseri gelişimi ve ilerlemesi ile ilgili bir mekanizma olduğu düşünülmektedir (Zhang vd., 2022).

HAI-1 ve HAI-2, hedef proteazlarına kovalent olmayan etkileşimler yoluyla membrana implante edilmiş, Kunitz tipi serin proteaz inhibitörleridir. HAI-1'in insan kanseri ilerlemesinin inhibisyonundaki rolü, çoğunlukla PC, meme ve yumurtalık kanserleri olarak bildirilmiştir (Ko vd., 2020).

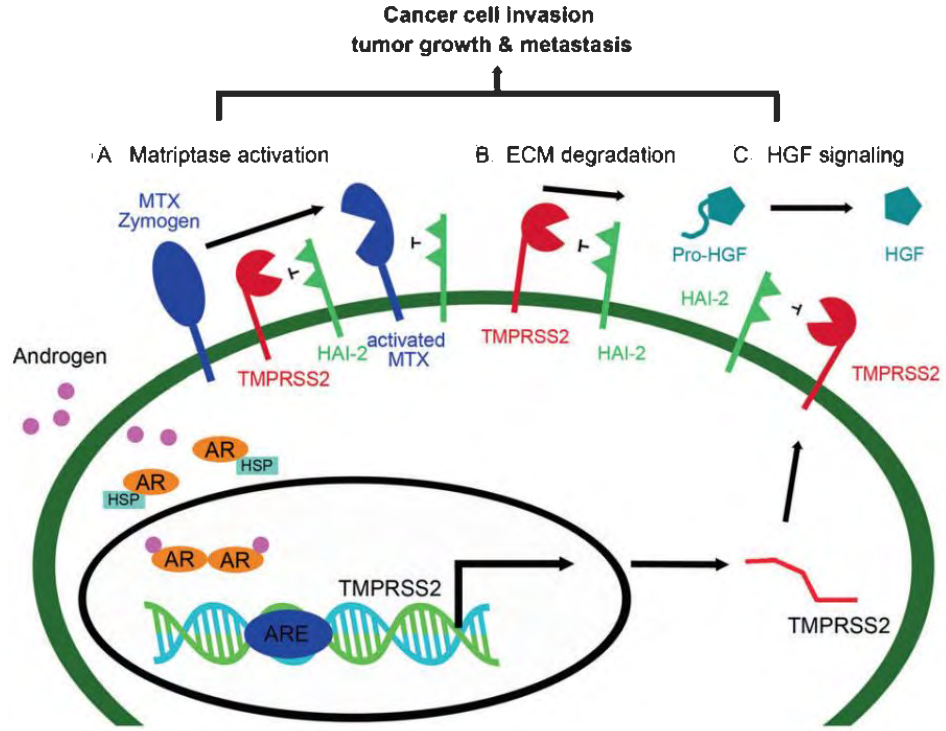
HAI-1 HGFA (Hepatosit Büyüme Faktörü)' yı inhibe etmektedir. Ek olarak, HAI-1 ayrıca matriptaz, hepsin ve prostaz dahil olmak üzere diğer tripsin benzeri proteazları da inhibe etmektedir. Matriptaz, HGFA ve hepsin, insan kanseri progresyonunu teşvik etmek için prometastatik faktörler olarak gösterilmiştir. Öte yandan, HAI-2'nin pankreas, prostat ve böbrek gibi birçok dokuda eksprese edildiği bulunmuştur. HAI-2, plazmin, HGFA, prostasin, Matriptaz ve Matriptaz-2 dahil olmak üzere çeşitli perisellüler serin proteazları etkili bir şekilde inhibe etmektedir (Ko vd., 2020).

Bununla birlikte, androjen reseptörü (AR) ekspresyonu ne olursa olsun, TMPRSS2 seviyeleri ile prostat kanseri hücre hatları arasında invaziv yetenek arasında pozitif bir korelasyon göstermez. Bu veriler ışığında TMPRSS2'nin prostat kanseri hücre hareketliliği ve progresyonunda sadece hormon duyarlı hastalarda etkili olabileceği düşünülmektedir. Çalışmada, TMPRSS2'nin tek başına, HAI-2 tarafından büyük ölçüde bastırılan AR ne olursa olsun prostat kanseri hücre invazyonunu teşvik edebileceği savunulmaktadır. Bir serin proteaz, proteolitik biyolojik fonksiyonun yürütülmesi için fizyolojik olarak genellikle bir akraba inhibitörü bulunmaktadır. Fakat TMPRSS2'nin akraba inhibitörü henüz aydınlatılmamıştır (Ko vd., 2020).

Yapılan çalışmalarda, insan prostat kanser hücrelerinde HAI-2'nin, TMPRSS2 için bir akraba inhibitörü olarak işlev görebileceği ve TMPRSS2 aracılı maligniteyi baskılamak için potansiyel bir faktör olarak hizmet edebileceğine işaret edilmektedir (Ko vd., 2020).

Perisellüler proteazlar arasında, membrana implante serin proteazlar son zamanlarda detaylı olarak incelenmektedir, bu enzimlerden bazıları TMPRSS2 ve Matriptaz dahil olmak üzere kanserin gelişimi ve ilerlemesine katkıda bulunmaktadır (Ko vd., 2020).

TMPRSS2 ile indüklenen PC progresyonu için Matriptaz, pro-HGF ve hücre dışı matriks (Nidogen-1 ve Laminin β 1) gibi çeşitli substratlar tanımlanmıştır. Öte yandan, TMPRSS2'nin 5' translasyonel olmayan bölgesinin ETS transkripsiyon faktörlerine füzyonu PC'da sıklıkla meydana gelse de, TMPRSS2'nin artmış ekspresyonu ve hücre altı yanlış lokalizasyonu da PC progresyonu ile ilişkilidir (Ko vd., 2020).



Şekil 6. TMPRSS2'nin HAI-2 ile inhibisyonu için şematik model (Ko vd., 2020).

Androjen regüle edilen androjen yoksunluk tedavisi (ADT), TMPRSS2 ekspresyonunu azaltarak etki gösteren kanser hastalarında düzenli kullanılmaktadır. Prostat kanserinin yanı sıra, androjenle maruziyetin artmasının akciğerlerde TMPRSS2 ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir. Bu öncüllere dayanarak, akciğerlerde androjen maruziyetini inhibe etmenin TMPRSS2 aktivitesini baskılaması gerektiğini varsaymak mantıklı görünmektedir.

Bu amaçlar için, androjen reseptör (AR) ekspresyon antagonistleri, AR koregülasyon faktörleri ve ETS1 ve SP1 gibi transkripsiyon faktörleri kullanılabilir. Son zamanlarda, prostat kanseri hastaları için kullanılan ADT'nin SARS-CoV-2 hastalarında da kullanılabilirliği öne sürülmüştür (Abbasi vd., 2021).

Günümüzde ADT olarak kullanılan bileşikler, bicalutamid ve enzalutamid gibi androjen reseptörlerinin blokerlerini, anti-gonadotropinleri ve androjen sentezi inhibitörlerini içermektedir. Estradiol, enzalutamid, genistein ve fitoöstrojenler gibi ADT'lerin, bu çalışmalarda kullanılan hücre hatlarına ve deneysel koşullara bağlı olarak

TMPRSS2 ekspresyonunu 1.6 ile 14 kat azalttığı gösterilmiştir. Öte yandan, androjen maruziyetinin TMPRSS2 ekspresyonunu 1.4 ile 20 kat arttırdığı bulunmuştur (Abbasi vd., 2021).

Montopoli arkadaşları ADT alan prostat kanseri hastalarının SARS-CoV-2 enfeksiyonuna yakalanma riskinin daha düşük olduğu sonucuna varmışlardır (Abbasi vd., 2021; Montopoli vd., 2020).

1.6. TMPRSS2 Hedefli Tedavilerin Avantajları

Koronavirüsler gibi RNA virüslerini hedefleyen ilaçlara karşı özellikle sık mutasyon geliştiği zamanlarda tedaviden sonra hızlı şekilde direnç gelişebilmektedir (Shyr vd., 2020).

Bunun aksine konak hücreyi hedefleyen ilaçlara karşı direnç, konak hücrede gelişen mutasyonların nadir olması nedeniyle yavaştır. Bu sebeple TMPRSS2 hedefli tedaviler yüksek potansiyel taşımaktadır (Xu vd., 2022).

Saklama koşulları, dağıtımı, aşı olma konusunda kararsız insanlar hakkındaki endişelere rağmen aşuların geliştirilmesiyle birlikte SARS-CoV-2'nin yayılmasının kontrol altına alınabileceğine dair umut oluşmuştur (Xu vd., 2022).

SARS-CoV-2 aşularına bağlı olarak gelişen yan etkiler arasında nadir olarak miyokardit (Oster vd., 2022), nörolojik komplikasyonlar (Assiri vd., 2022) ve hızlı progresif demans (Chakrabarti vd., 2022) vakaları bildirilmiştir. Bu nedenle koruyucu/tedavi edici terapötik ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır (Xu vd., 2022).

TMPRSS2 transgenik nakavt fareleri ile yapılan çalışmalar, TMPRSS2 kaybının akciğerlerde SARS-CoV replikasyonunu azalttığını ve daha hafif bir akciğer patolojisine neden olduğunu göstermiştir. TMPRSS2 gen ekspresyonunun gelişimsel düzenlenmesinin, bebeklerin ve çocukların ciddi solunum yolu hastalıklarından göreceli olarak korunmasını sağladığı öne sürülmüştür (Schuler vd., 2021).

Farelerde TMPRSS2 geninin bozulmasının embriyonik gelişim, doğum sonrası hayatta kalma, doğurganlık, prostat morfolojisi ve böbrek fonksiyonlarında belirgin değişiklik yaratmadığı belirtilmiştir (Zhang vd., 2022).

SARS-CoV-2'nin ACE2 azalmasına sebep olduğu ve pulmoner hasar ve kardiyovasküler komorbiditeleri olan hastalarda daha olumsuz sonuçlara yol açtığı bilinmektedir (Verdecchia vd., 2020; Zaman vd., 2020). Bu sebeple ACE2 yerine TMPRSS2 hedefli tedavilerin daha avantajlı olabileceği düşünülmektedir.

TMPRSS2'nin vücut homeostazisinde ACE2'ye göre daha az önemli olduğu ve TMPRSS2'nin inhibisyonunun, hayati süreçleri etkilemeyeceği belirtilmiştir. Ayrıca TMPRSS2 konak hücre gelişimde ve homeostazisinde elzem olmayan bir unsur olarak görünmektedir (Alzain vd., 2022; Kim vd, 2006).

1.7. TMPRSS2 İnhibitörleri

TMPRSS2'nin SARS, MERS ve influenza ile mücadeledeki önemine rağmen, seçici ilaçların keşfinin zor olduğu bildirilmektedir. Bugüne kadar, TMPRSS2 veya diğer ilgili TTSP'lerle substrat veya inhibitör komplekslerini yapısal olarak karakterize etmek için hiçbir X-ışını kristalografik verisi ortaya çıkmamıştır. Bu büyük olasılıkla, membrana bağlı proteinlerin kristal yapılarının çözülmesiyle ilişkili doğal zorluklardan kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, yapısal veri eksikliği, seçici TMPRSS2 ajanlarını tanımlamak için yapı tabanlı tasarım çabalarını önemli ölçüde engellemiştir (Escalante vd., 2021).

Buna rağmen TMPRSS2, insan plazma kallikrein, faktör Xia ve hepsin dahil olmak üzere yapısal olarak çözülmüş diğer tripsin benzeri serin proteazları ile önemli sekans kimliği göstermektedir (Escalante vd., 2021).

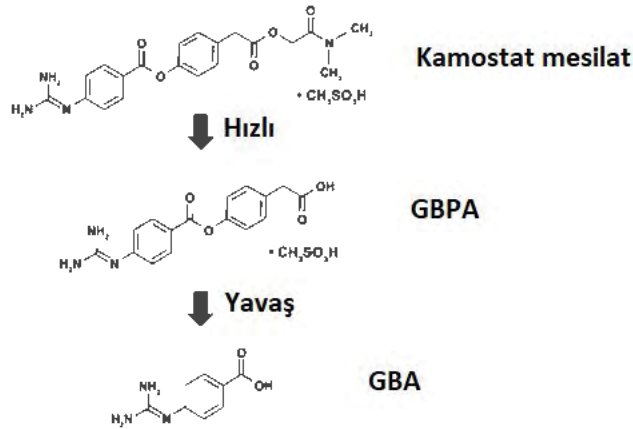
ACE 2 inhibitörü ve TMPRSS2 inhibitörü olarak dual etki gösterebilecek ilaçlar *in silico* araştırılmış ve bunlara “giriş inhibitörleri” adı verilmiştir (Baby vd., 2021).

Homoloji, moleküler modelleme ve moleküler yerleştirme vb. yapılan çalışmada bazı ilaçların TMPRSS2 inhibitörü olarak bağlanma eğilimleri araştırılmıştır. Referans ilaç Kamostat kabul edilmiş, Nafamostat, Meloksikam, Ganodermanontriol, Kolumbin, Mirisetin, Proantosiyanidin A2, Jatrorhizin ve Baikalein bağlanma eğilimleri bakımından ön plana çıktığı kaydedilmiştir (Pooja vd., 2021).

1.7.1. Kamostat ve Nafamostat

Kamostat mesilat 1980'lerde Japonyada geliştirilmiştir. Kronik pankreatit, postoperatif reflü özofajit ve ilaç kaynaklı akciğer tahribatı tedavileri için ruhsatlandırılmıştır (Padmanabhan vd., 2020; Shang vd., 2020; Talukdar vd., 2006; Zhou vd., 2015).

Geniş spektrumlu serin proteaz inhibitörü olan Kamostat'ın başlıca yan etkileri kaşıntı, susuzluk ve iştahın artmasıdır. Kamostat vücutta hızlıca 4-(4-guanidinobenzoiloksi) fenil-asetik asid (GBPA)'e metabolize olur. GBPA yarılanma ömrü 0.75-1.4 saattir. GBPA, 4-guanidinobenzoik asid (GBA)'e metabolize olur. GBPA ve GBA Kamostat'a göre çok daha az aktiftir (Weiss vd., 2021).

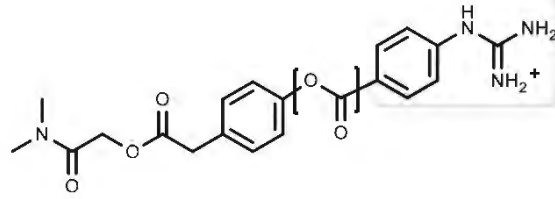


Şekil 7. Kamostat ve metabolitleri

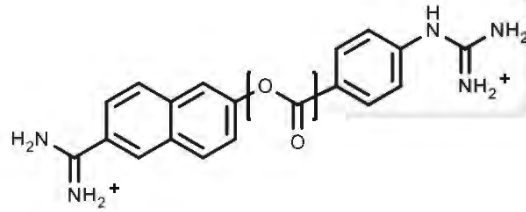
Nafamostat, Kamostat kadar güvenli görünmemektedir. Agranülasitöz, hiperkalemi, anafaksi ve kardiyak arrest gibi yan etkileri bildirilmiştir.

TMPRSS2'nin seçici inhibitörleri bilinmemekle birlikte, son çalışmalar SARS-CoV-2 girişinin Şekil 8' de gösterilen iki geniş spektrumlu serpin; kamostat ve nafamostat tarafından inhibe edildiğini göstermiştir. Her iki ilaç da tüm tripsin benzeri proteazlar tarafından tanınan jenerik guanidino farmakoforunu gösterir ve substrat bağlanmasını etkili bir şekilde bloke etmek için stabil açıl-enzim ara ürünleri oluşturur (Hedstrom, 2002).

Bununla birlikte, seçicilik eksikliği, TMPRSS2'yi hedef alan ve tripsin bağımlı süreçlerin toptan inhibisyonunu önleyen, güvenli ve etkili terapötiklerin geliştirilmesinde yeterince çalışma yapılmamış bir alandır (Escalante vd., 2021).



Kamostat



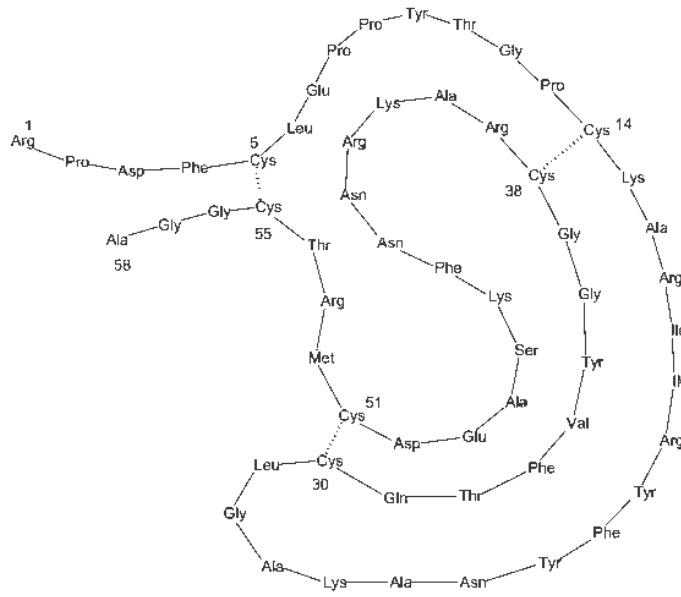
Nafamostat

Şekil 8. *TMPRSS2'nin klinikte kullanılan inhibitörleri. Makas ester bağı (parantez içinde) ve anahtar guanidino farmakoforunu vurgulamaktadır (Escalante vd., 2021).*

TMPRSS2 inhibitörlerinin farmakolojik aktivite moleküler mekanizması belirsiz kalmaktadır. Kamostat ve Nafamostat kendiliğinden ve istikrarlı olarak TMPRSS2 katalitik merkeze bağlanır. Böylece S proteininin proteolitik sentezini inhibe eder (Zhu vd., 2021).

1.7.2. Aprotinin

Aprotinin, 58 aminoasitten oluşan geniş spektrumda serin proteaz inhibitörüdür. Oral ve aerosol formları bulunan aprotinin'in, sıçan deneylerinde influenza ve parainfluenza sebepli ölümleri %50 oranında düşürdüğü gözlenmiştir. Atrial fibrilasyon, ateş, mide bulantısı başlıca yan etkileridir. Piyasada bulunan Trasylol isimli ilaç böbrek yetmezliği ve felç riskini artırması öne sürülerek toplatılmıştır. İnhaler ve enjeksiyonluk formları araştırılmaktadır (Azimi A, 2020).



Şekil 9. Aprotinin

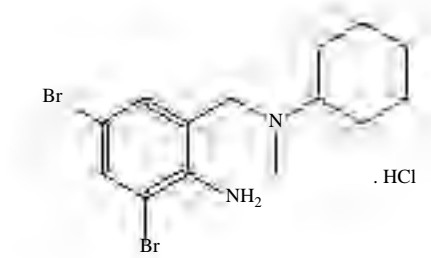
HA bölünmesini inhibe ederek viral replikasyonu baskıladı; tavuk embriyoları, insan hava yolu epitel hücreleri ve farelerde gösterilmiştir (Ovcharenko vd., 1994; Zhirnov vd., 1984, 1985 ve 2002).

Aprotinin ve Kamostat gibi bazı proteaz inhibitörleri, mükemmel *in vitro* anti-influenza aktivite sergilemekte, fakat bu inhibitörlerin hiçbiri TMPRSS2'ye spesifik değildir. Bunların spesifik olmayan doğası, düşük biyoyararlanıma veya öngörülemez yan etkilere yol açabilmektedir. Örneğin Aprotinin'in miyokard enfarktüsü, kalp yetmezliği, felç ve ensefalopati risklerini arttırdığı bildirilmiştir (Shen vd., 2020).

Ek olarak aprotinin gibi polipeptid türevi inhibitörleri, soya fasulyesi tripsin inhibitörü, ovomukoid tripsin inhibitörünün yüksek molekül ağırlıkları olması farmakokinetik özelliklerini kısıtlamaktadır (Böttcher vd., 2009).

1.7.3. Bromheksin

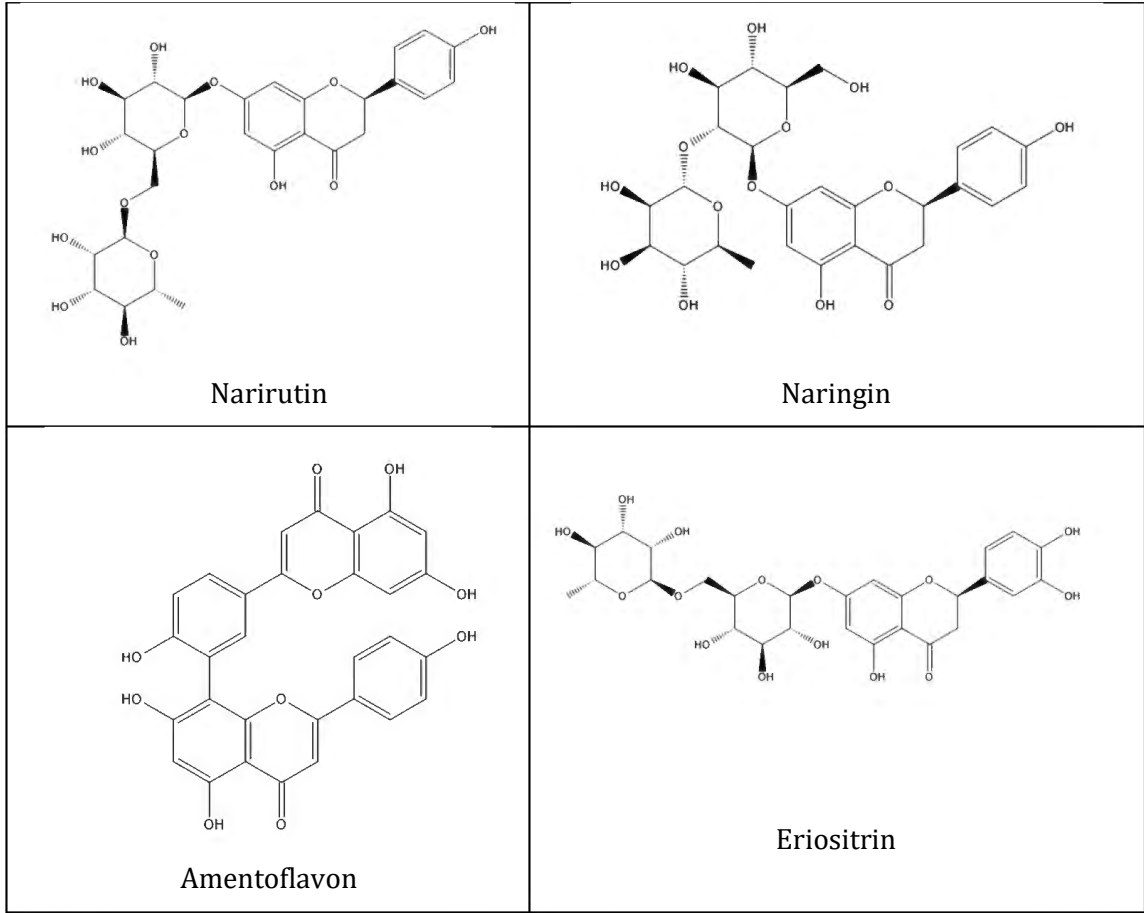
Ekspektoran olarak uzun süredir kullanılmakta olan bromheksine dair az sayıda yan etki bildirilmiştir. Vücutta ambroksol'e metabolize olur. ARDS'yi (akut solunum sıkıntısı sendromu) artırabildiği ve dispne gibi semptomları ağırlaştırabildiği bildirilmiştir (Azimi A, 2020).



Şekil 10. Bromheksin

1.7.4. Bazı Doğal Flavonoidler

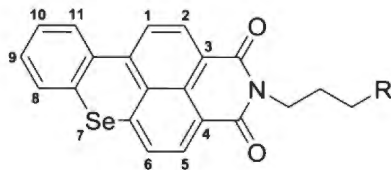
Narirutin, Naringin, Amentoflavon, Eriositrin gibi doğal diyet flavonoidler, TMPRSS2'nin potansiyel inhibitörleri olarak değerlendirilmiş, diğer terapötik ajanlara göre; besin desteği olarak kullanılabilmesi, nadir yan etki görülmesi, görece olarak az maliyetli olmaları, bağırsaktan kolay absorbe olmaları, hafif semptomlu hastalarda evde etkili olarak kullanılabilmesi gibi avantajları olduğu bildirilmiştir (Varughese vd., 2022).



Şekil 11. Bazı doğal diyet flavonoidler (Varughese vd., 2022)

1.7.5. Benzoselenoksanten Türevi Bileşikler

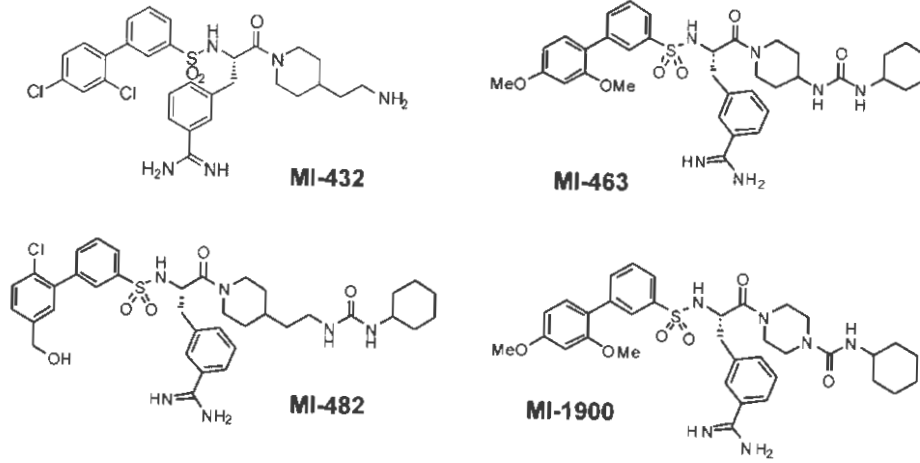
TMPRSS2, koronavirüs spike proteinini ve influenza virüsün pek çok alt türünün hemaglutininini parçalayabilen bir proteaz olduğu tanımlanmıştır. Son çalışmalarda Benzoselenoksantenlerin, TMPRSS2 gen üzerindeki guanince zengin bölgesine etki ederek virüsün yayılmasını önleyebileceği belirtilmiştir (Shen vd., 2020).



Şekil 12. Benzoselenoksantenler (Shen vd., 2020)

1.7.6. Phe(3-Am) Türevi Bileşikler

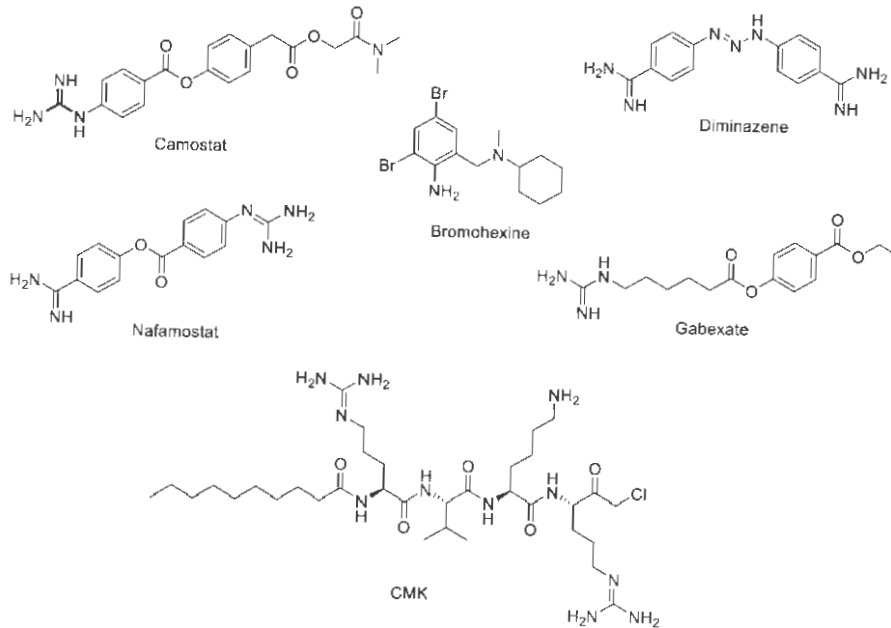
3-amidinofenilalanin türevi (Phe(3-Am)-türevi) 4 adet TMPRSS2 inhibitörüne (MI-432, MI-463, MI-482 ve MI-1900) işaret edilmiştir (Pászti-Gere vd., 2022).



Şekil 13. Phe(3-Am) türevi TMPRSS2 inhibitörleri

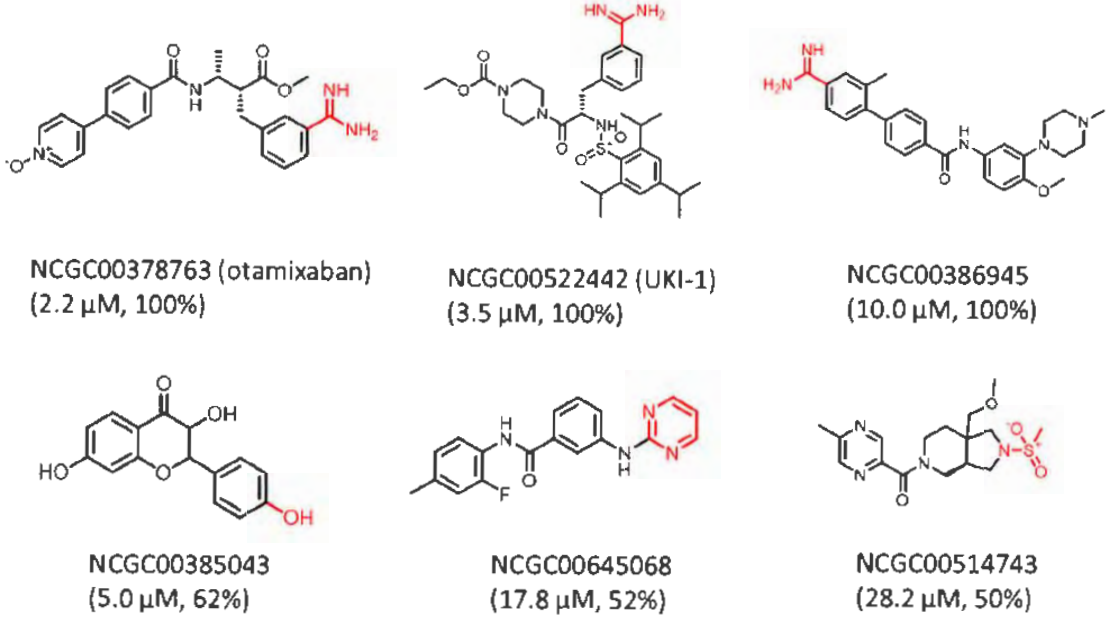
1.7.7. Diğer Bileşikler

Alfa-1-antitripsin'in TMPRSS2'yi inhibe ettiği ve SARS-CoV-2 enfeksiyonunu engileyebildiği, son bildirilen çalışmalar arasında öne sürülmektedir (Wettstein vd., 2021).



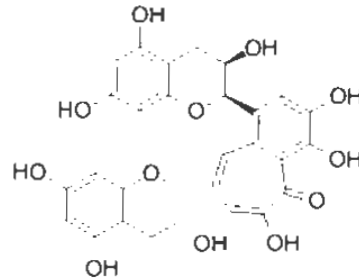
Şekil 14. Bazı TMPRSS2 ve furin inhibitörleri (Xu vd., 2022)

Farklı bir çalışmada *in silico* yapılan, moleküler modelleme ve yerleştirme gibi yöntemleri içeren çalışmada en yüksek selektif inhibisyon otamiksaban molekülünde görülmüştür (Hu vd., 2020).

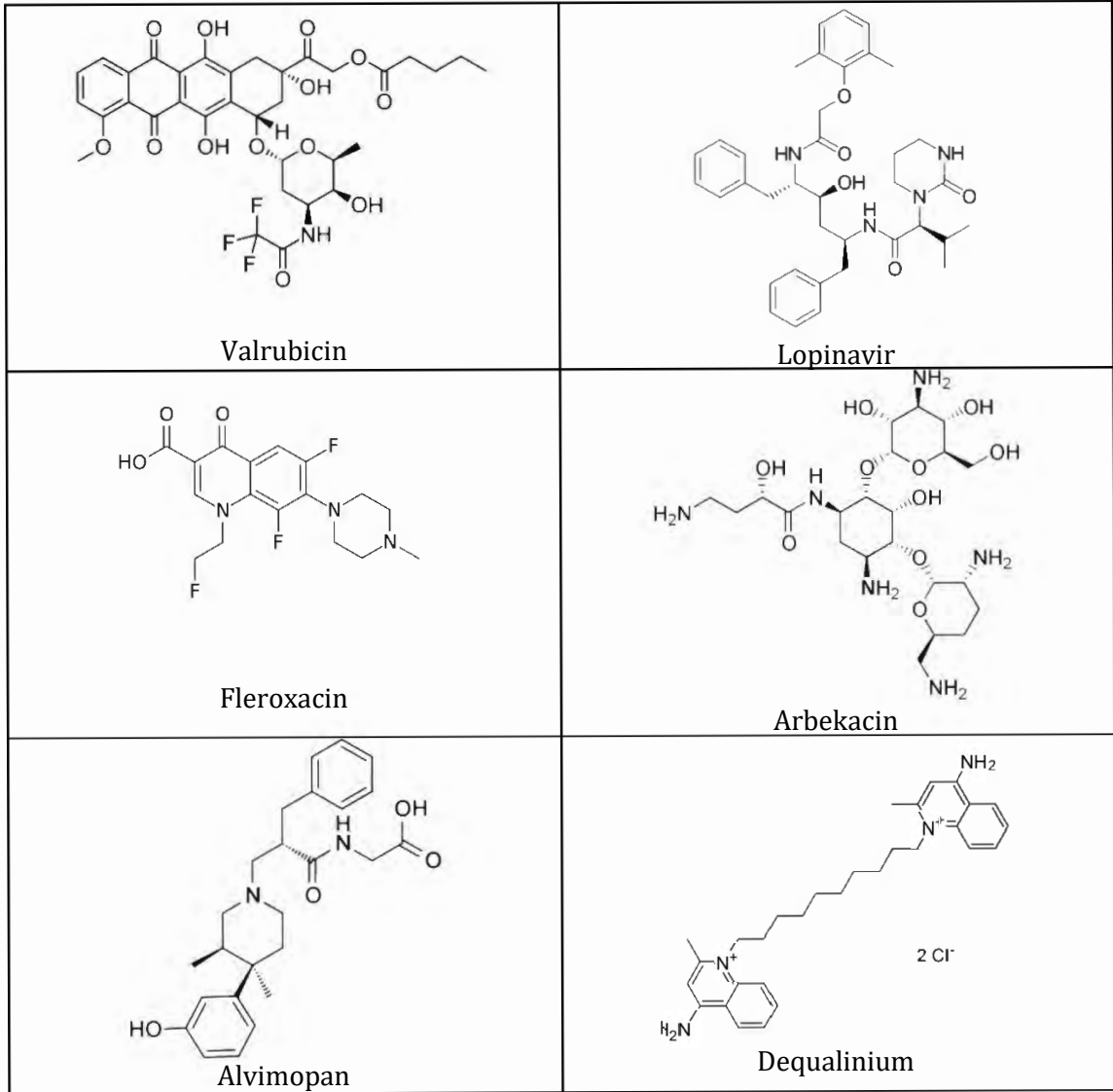


Şekil 15. Sanal taramada tanımlanan TMPRSS2 inhibitörleri

Wu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Teaflavin ve GB-2'nin ACE2 ve TMPRSS2 protein sentezini inhibe edebileceği öne sürülmüştür. GB-2 tedavisinin yan etki olmadan akciğer ve böbrek dokusunda TMPRSS2 protein sentezini inhibe edeceği öne sürülmüştür (Wu vd., 2020).

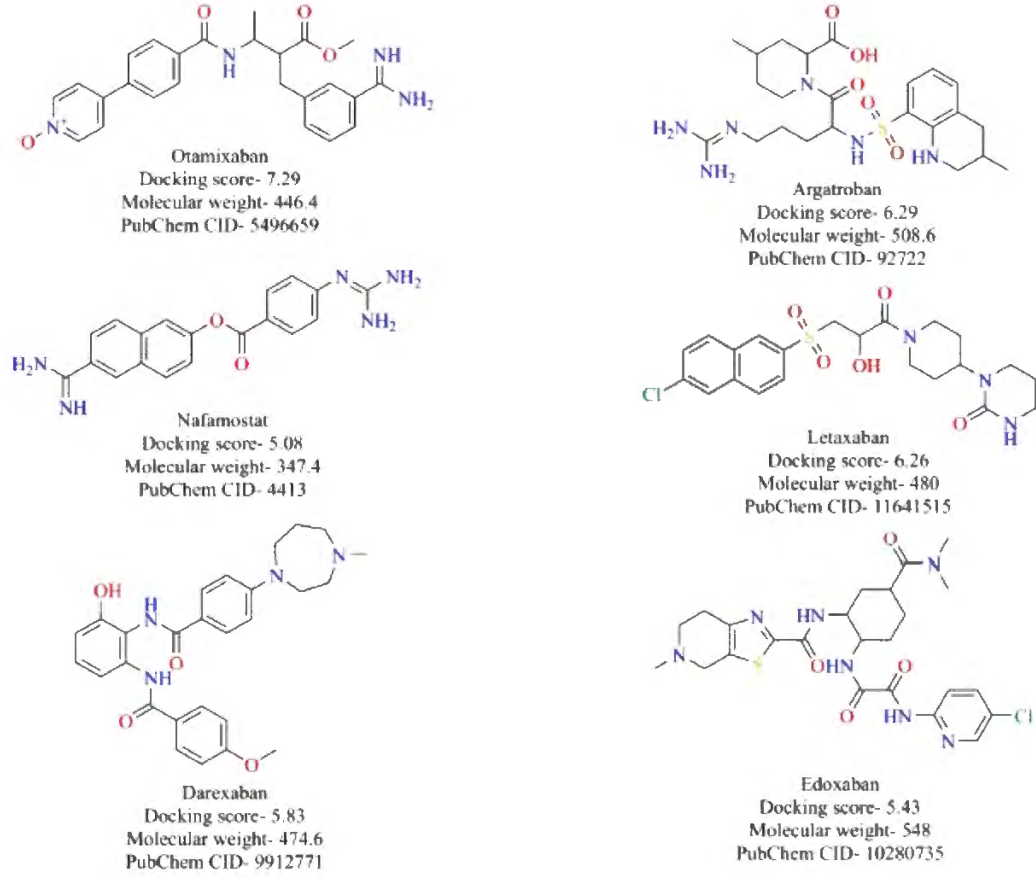


Şekil 16. Teaflavin



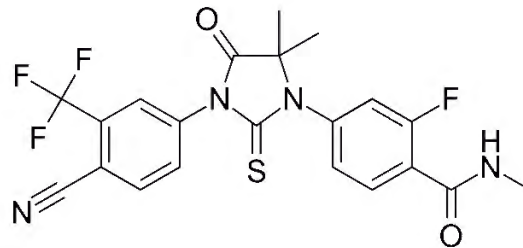
Şekil 17. *TMPRSS2* inhibitörü olarak listelenen ilaçların kimyasal yapısı (Baby vd., 2021).

Rapor edilen diğer TMPRSS2 inhibitörleri aşağıda verilmiştir (Şekil 18)



Şekil 18. Çalışılan TMPRSS2 inhibitörlerinin yapısı (Faheem vd, 2020)

Enzalutamid gibi antiandrojen ajanlar TTSP ekspresyonunu düşürerek TMPRSS2 aktivitesini düşürür. Fakat enzalutamid tedavisi sonrası SARS-CoV-2 enfeksiyonu akciğer yerine daha çok prostatta baskılanır. Bu da TMPRSS2 ekspresyonunun akciğer epitel hücrelerinde androjen reseptöründen bağımsız olabileceğini göstermektedir (Pászti-Gere vd., 2022).



Şekil 19. Enzalutamid

Son on yılda birkaç araştırma grubu kendini bromheksin hidroklorür, benzilsülfonil-dArg-Pro-4-amidinobenzilamid veya diğer sentetik inhibitörler gibi TMPRSS2'yi inhibe eden küçük kimyasal ilaçları aramaya adanmıştır. Ancak küçük molekül ağırlıklı hedeflendirilmiş ilaçların bilinmeyen yan etkiler sergilediği düşünülmektedir. Bunun yerine, protein bazlı ilaçların kimyasal hedefli ilaçlardan daha iyi hedef özgülüğü ve daha az yan etkisi olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle TMPRSS2'nin akraba inhibitörünün bulunması, TMPRSS2 aracılı malignite veya virüs enfeksiyonuna karşı protein bazlı terapötik yaklaşımlar geliştirmek için önemli fayda sağlayacağı öne sürülmektedir (Ko vd., 2020).

1.8. TMPRSS2 İnhibitörleri İle Yapılmış Çalışmalar

TMPRSS2 inhibitörlerinden Kamostat mesilat SARS-CoV-2'ye karşı *in vitro*, SARS-CoV-1'e karşı *in vivo* etkili olduğu gösterilmiş antiviral ajandır (Hoffmann vd., 2020; Hoffmann vd., 2020b; Zhou vd., 2015).

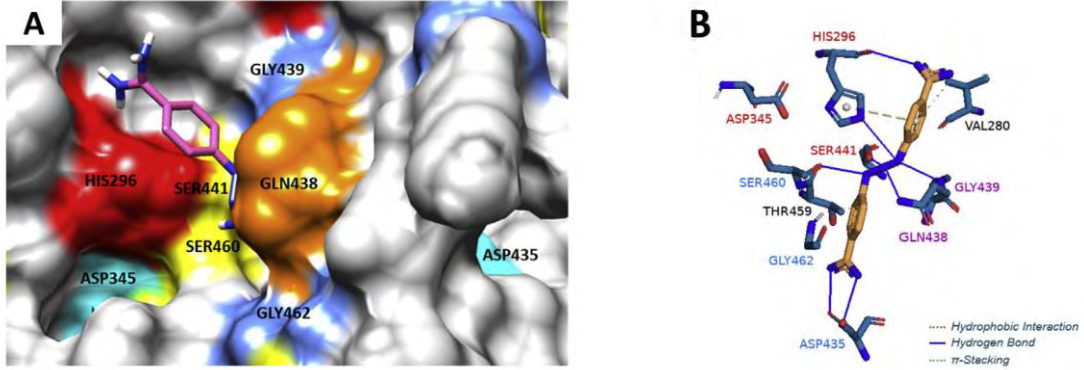
SARS-CoV-2 enfekte ve hastane yatışı olan hastalarda çift kör randomize kontrollü çalışmada günde 3x200 mg kamostat mesilat kullanılmıştır. Kamostat mesilat belirgin olarak klinik seyri, entübasyon veya ölüm riskini, oksijen desteğine ihtiyaç duyulma süresi veya etkililik ile ilgili diğer sonuçları iyileştiremediği gözlenmiştir (Gunst vd., 2021).

Nafamostat'ın SARS-CoV-2'ye karşı *in vitro* olarak etkili olduğu belirtilmiştir. Fakat intravenöz dozlama gerektirmektedir. SARS-CoV 1 veya SARS-CoV-2'ye karşı *in vivo* araştırması yapılmamıştır (Breining vd., 2021; Hoffmann vd., 2020).

Nafamostat Kamostat'a göre katalitik merkeze bağlanma açısından daha spesifiktir. Nafamostat'ın Kamostat'a göre daha düşük dozda SARS-CoV-2 enfeksiyonunu engelleyebileceği öne sürülmüştür (Zhu vd., 2021).

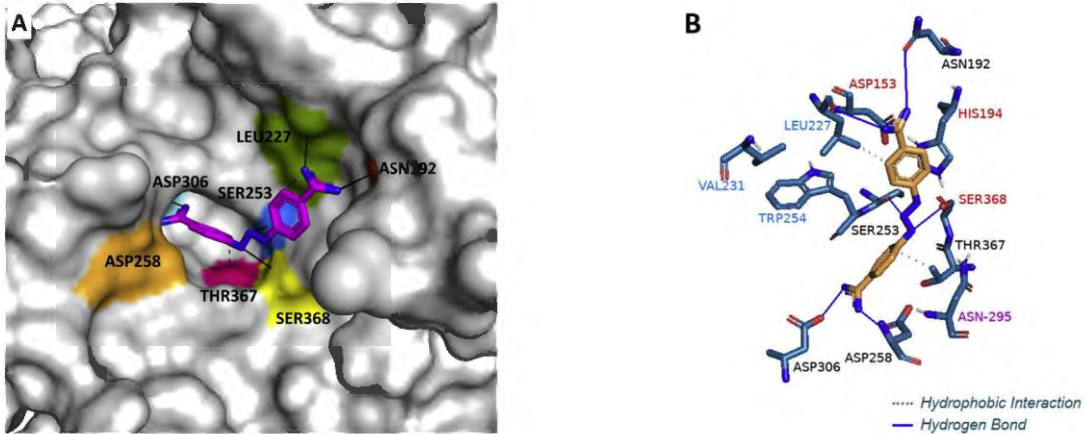
Yapılan yeni bir çalışmada TMPRSS2 ekspresyonunu azaltmak ve SARS-COV-2 tedavisinde enzalutamid gibi androjen reseptör inhibitörlerinin kullanımını için güçlü bir gerekçe sağlamıştır (Qiao vd., 2021; Xu YM vd., 2022).

1.9. TMPRSS2 İnhibitörleri Moleküler Etkileşimleri



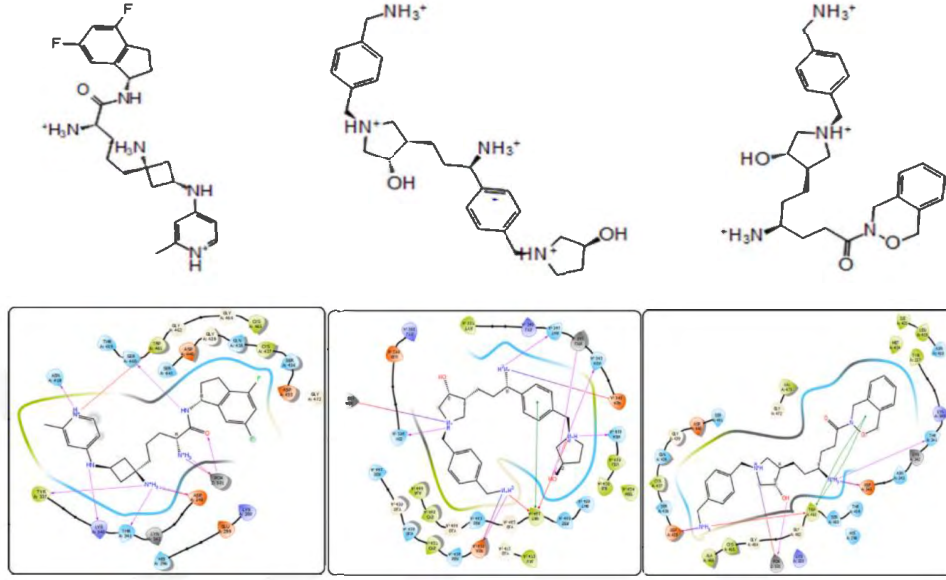
Şekil 20. Diminazen'in TMPRSS2 bağlama modu ve bağlanma bölgesi içinde; H bağları, hidrofobik etkileşimler ve π -istiflenmesinin 3D gösterimi (A) Diminazen'in (pembe) TMPRSS2 bağlama modu. Üçlü kalıntı (HIS296; kırmızı, SER441; sarı ve ASP345; camgöbeği) içeren katalitik bölge ve SER460 (sarı), GLY462 (mavi) ve ASP435 (camgöbeği) kalıntılarını içeren bağlama bölgesi (Görselde UCSF Chimera kullanıldığı bildirilmiştir). (B) TMPRSS2 bağlanma bölgesi içinde Diminazen'in; hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler ve π -istiflenmesinin 3D gösterimi. Görselin Pymol kullanılarak yapıldığı bildirilmiştir. Diminazen, katalitik bölgede (kalıntı isimleri kırmızı renkte), substrat bağlanma bölgesinde (kalıntı adları mor renkte) bulunan kalıntılarla ve oksianyum deliğini oluşturan korunmuş kalıntılarla (kalıntı adları mor renkte) olumlu etkileşimler oluşturur. Moleküler kenetlenme, AutoDock Vina 1.1.2 kullanılarak gerçekleştirilmiş ve ızgara kutusu parametreleri, TMPRSS2'nin katalitik ve bağlanma bölgelerini kapsayacak şekilde ayarlanmıştır (homolog modeli, UniProtKB id I/4 O15393). Protein ve reseptörün hazırlanmasında MarvinSketch, AutoDock tools 1.5.6, Mopac 2016 ve UCSF Chimera 1.15 yazılımları kullanılmıştır. Bağlanma enerjisi=6.7 kcal/mol. (Xu vd., 2022)

TMPRSS2 veya furini inhibe ettiği bilinen bileşikler incelendiğinde diminazen, TMPRSS2 ve furinin ikili inhibitörü olarak keşfedilmiştir (Xu vd., 2022).

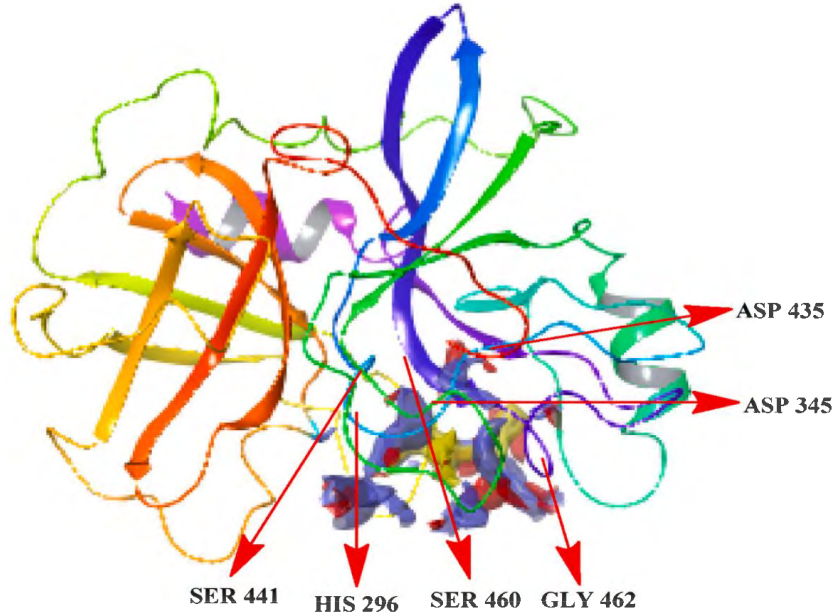


Şekil 21. Diminazen'in Furin katalitik/bağlanma bölgesinde bağlanma modu ve H bağları ile hidrofobik etkileşimlerin 3D gösterimi (A) Furin katalitik/bağlanma bölgesinde diminazen'in (pembe) bağlanma modu. ASN192 (kırmızı), LEU227 (yeşil), SER253 (mavi), ASP258 (turuncu), ASP306 (camgöbeği), SER368 (sarı) ve THR367 (pembe). Moleküler yerleştirmenin DockThor kullanılarak gerçekleştirildiği ve görselin Pymol kullanılarak yapıldığı bildirilmiştir. (B) Diminazen'in, Furin bağlanma bölgesi içinde hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimlerin 3D gösterimi. Görselin Pymol kullanılarak yapıldığı bildirilmiştir. Diminazen, katalitik bölgede (kalıntı adları kırmızı renkte) ve substrat bağlanma bölgesinde (kalıntı adları mavi renkte) bulunan kalıntılarla olumlu etkileşimler oluşturur. bağlanma enerjisi = 18.3 kcal/mol (Xu vd., 2022).

Diğer taraftan farklı bir çalışmada Nafamostat ve Ambroksol referans alınarak oluşturulan 10 potansiyel bileşikten 3'ü, *in silico* değerlendirmede TMPRSS2 inhibitörü olarak kayda değer bulunmuştur.



Şekil 22. *In silico* değerlendirmede seçilen 3 TMPRSS2 inhibitörününün bağlanma etkileşim analizi. Ligandlarla bağlanmada önemli rol oynayan SER460, ASN418, LYN342, THR341, PO4501, GLU299, GLY464, ASP435, ASN343, ASP345, LYS342, TYR337 kalıntılarının, TMPRSS2'nin aktif bölgesinde hidrojen bağı oluşturduğu gözlenmektedir (Alzain vd., 2022).



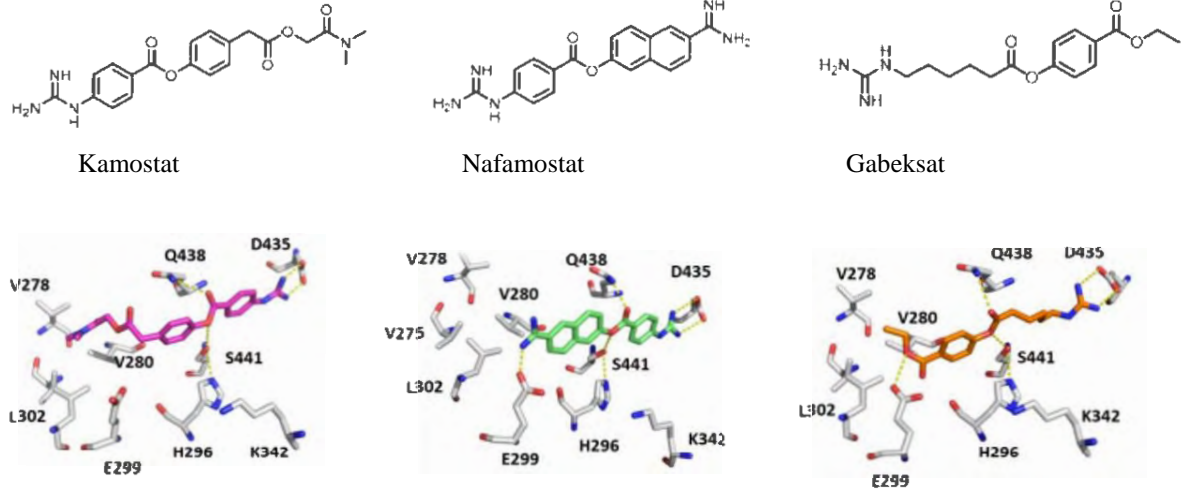
Şekil 23. TMPRSS2'nin bağlanma yeri ve katalitik kalıntıları (Alzain vd., 2022).

Farklı bir çalışmada ilgili inhibitörlerin bağlanma enerjileri ve etkileşim gösterdiği aminoasitler çalışılmıştır (Tablo 3).

Tablo 3. Çalışılan bileşiklerin moleküler yerleştirme skorları ve H-bağları (Pooja vd, 2021).

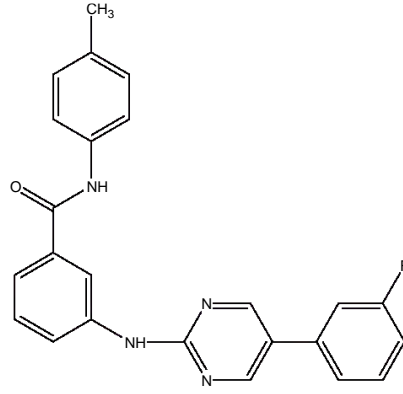
Bil. No	Bileşik	Moleküler Yerleştirme Skoru (kcal/mol)	H-bağ kalıntıları (Bağ uzunluğu Å ^o)	π-Etkileşimleri	Diğer etkileşimlerde rol oynayan amino asit kalıntıları
1	Kamostat	- 8.4	His 296 (1.89), Cys 281 (2.71), Glu 389 (2.8), Lys 390 (2.78), Gln 438 (2.72)	Val 280, Ala 386	Ser 441, His 279, Gly 439, Gly 391, Thr 393, Cys 297, Leu 302, Lys 391, Lys 392, Gly 385, Ser 460, Trp 461, Gly 462
2	Kolumbin	- 8.2	His 296 (2.0).	Ser 460, Ser 436, Cys 437, Cys 465	Gly 464, Gly 462, Trp 461, Gln 438, Gly 439, Ser 411, Thr 459
3	Meloksikam	- 8.3	Gly 462 (1.91), Ser 441 (2.61), Ser 460 (1.81).	Cys 437, Val 280, Trp 461, Lys 342	Thr 459, Ser 436, Gly 439, Cys 465, Gln 438, His 279, Val 278, Leu 302, Ser 463, His 296
4	Mirisetin	- 8.3	Ser 460 (1.96), Glu 389 (2.88), His 296 (2.55).	Cys 437, Trp 461, Glu 389	Asp 435, Gly 472, Cys 465, Gly 464, Ser 436, Thr 459, Ser 441
5	Ganodermanontriol	- 8.1	Gly 462 (2.77), Ser 441 (2.18).	Trp 461	Cys 437, Cys 465, Glu 389, Gln 438, Leu 419, Thr 341, Lys 340, Lys 342, Ser 460, His 296
6	Nafamostat	- 7.8	Ser 436 (2.74), Asp 435 (2.35), Gly 461 (4.75).	Asp 435, Trp 461, His 296, Cys 437, Cys 465	Ala 466, Ser 441, Lys 342, Val 473, Gly 472, Thr 459, Ser 460, Gly 464, Gln 438, Leu 419.
7	Proantiosianidin A2	- 7.9	Gly 462 (2.83), Cys 465 (2.90), Ser 436 (2.71), Ser 441 (2.84), His 296 (2.62)	Trp 461.	Ser 463, Lys 342, Asp 435, Gly 464, Cys 437, Gly 472, Val 473, Thr 459, Ser 460, Gln 438, Gly 439.
8	Baikalein	- 7.7	His 296 (2.46), Ser 460 (2.21), Ser 436 (2.15).	Trp 461, Cys 437, Cys 465.	Gly 464, Asp 435, Gly 462, Gly 472, Val 473, Thr 459, Ser 441, Gln 438, Glu 389.
9	Jatrorhizin	- 7.5	His 296 (2.66), Gly 439 (2.17).	His 296, Leu 302, Pro 301, Val 275, Val 280	His 279, Gln 438, Ser 441
10	3-TAPAP	- 6.7	Asn 192 (2.04), Arg 182 (2.55), Glu 289 (2.38)	Ile 242, Pro 288, Met 488	Thr 287, Lys 191, Trp 290, Arg 489, Phe 194, Pro 354
11	Di-isopropil florofosfat	- 4.2	Gln 438 (2.48), Gly 462 (2.81)	-	His 296, Ser 441, Ser 460, Thr 459, Cys 465, Trp 461, Cys 437, Gly 464, Ser 436, Asp 435, Gly 472
12	AEBSF	- 5.5	His 296 (2.13), Ser 436 (2.29)	Cys 465, Trp 461, Asp 435	Ser 441, Ala 466, Gly 464, Cys 437, Gln 438, Gly 439, Thr 459, Ser 460, Gly 462, Gly 472, Val 473
13	P-Amino benzamidin	- 6.0	Asp 440 (2.02), Gly 385 (2.91), Asp 435 (2.31)	Ala 400	Thr 387, Ala 386, Trp 384, Gly 383, Ser 394, Asn 398, Ile 381, Gly 259, Val 434, Asn 433
14	Ulinastatin	- 5.2	Ser 441 (2.94), His 296 (2.04)	Val 280	Gln 438, Trp 461, Ser 460, Cys 281, Gly 439
15	Eskulitanin B	- 7.7	Ser 441 (2.30)	Leu 419, Lys 342, Cys 465	His 296, Ser 339, Lys 340, Gly 462, Gly 464, Ser 460, Gln 438, Thr 459, Ser 436, Cys 437, Tyr 416, Arg 470, Ser 463, Trp 461, Met 424, Thr 341
16	Ganoderiol D	- 7.4	Ser 441 (2.26), Gly 462 (2.17)	Trp 461	His 296, Gly 439, Gln 438, Ser 436, Thr 459, Cys 437, Ser 460, Cys 465, Lys 342, Leu 419, Thr 341, Lys 340
17	Ekdisteron	- 7.3	Asn 192 (2.74), Glu 289 (2.36)	Phe 194	Leu 355, Phe 357, Pro 288, Ile 242, Thr 287, Arg 182, Trp 290, Thr 356, Pro 354
18	Magnoflorin	- 6.9	Gly 462 (2.34), Gly 464 (2.83)	His 296, Trp 461	Ser 441, Leu 419, Ser 463, Lys 342, Ser 460
19	Tetratriakontan	- 6.1	-	Pro 363, Ile 242, Ala 243, Pro 288, Pro 354, Phe 194, Val 246, Lys 362, Leu 248, Phe 357	Arg 240, Cys 244, Glu 289, Asn 247
20	Hesperetin	- 7.6	Ser 441 (2.92), Ser 436 (2.22)	Cys 437, Trp 461	His 296, Val 280, Cys 281, Gly 439, Gln 438, Ser 460, Thr 459, Gly 472, Gly 462, Asp 435, Cys 465
21	Fisetin	- 6.9	Arg 150 (2.70), Tyr 190 (2.76), Cys 241 (2.51)	Ile 452, Leu 151, Ala 243	Val 246, Gly 153, Phe 156, Arg 240, Ile 242, Cys 244, Arg 147
22	Naringenin	- 6.8	Arg 486 (2.09), Arg 489 (2.77), Arg 186 (2.05), Val 219 (2.26)	Ala 490, Arg 486, Arg 489	Asn 218, Asp 220, Ala 216, Gly 217, Tyr 485, Ala 490
23	Siskapsaisin	- 5.5	Gly 462 (2.54)	Met 424, Lys 342, Trp 461, Leu 419, Cys 465	His 296, Ser 441, Gly 439, Gln 438, Cys 437, Gly 464, Thr 341
24	Dihidroapsaisin	- 5.8	His 296 (2.72), Ser 460 (2.24), Gly 464 (2.13)	His 296, Leu 419, Trp 461, Lys 342	Ser 441, Thr 341, Ser 463, Gly 462, Thr 459, Gln 438
25	3,4-Dikloro isokumarin	- 6.3	Cys 148 (1.95), Val 149 (2.18)	Pro 369, Lys 223, Ile 221	Asp 187, Arg 147, Asn 368, Gly 370
26	APMSF	- 6.2	Val 331 (2.11), Val 298 (2.49), Asn 303 (2.33)	Val 331, Val 298	Glu 329, Pro 305, Val 328, Lys 330, Ser 333

Yaygın kullanılan TMPRSS2 inhibitörlerinin, TMPRSS2 aktif bölgesinde tahmin edilen bağlanma modelleri aşağıdaki şekilde önerilmektedir (Hu vd., 2021):

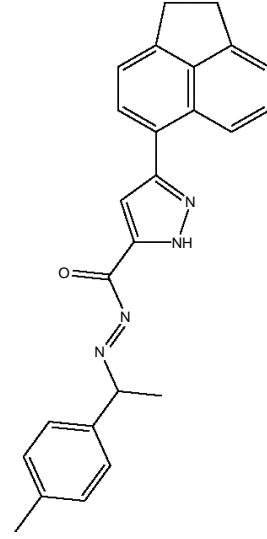


Şekil 24. Bilinen bazı TMPRSS2 inhibitörlerinin, TMPRSS2 aktif bölgesinde tahmin edilen bağlanma modelleri (Hu vd., 2021)

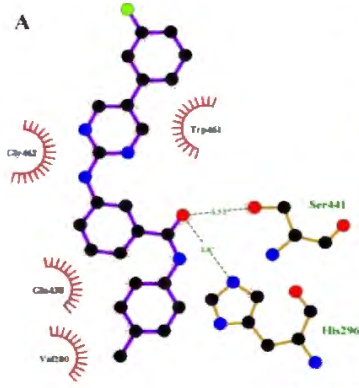
TMPRSS2 inhibitörleri ile yapılan homoloji modelleme ve moleküler yerleştirme çalışmalarında Kamostat mesilat, Nafamostat, Pefabloc SC, Fenilmetilsülfonil florür, Barisitinin ve Ruksolitinib bileşiklerine dikkat çekilmektedir. TMPRSS2'in aktif yöresinde özellikle 6 amino asit kalıntısının önemli olduğu vurgulanmaktadır. Bunlardan 3'ü (His296, Asp345, Ser441) katalitik bölgede, diğer 3'ü ise (Asp435, Ser460, Gly462) substrat bağlanma yöresinde olduğu öne sürülmektedir. Farmakofor, moleküler modelleme, moleküler dinamik simülasyon kombinasyonları kullanılarak bilgisayar tabanlı taramada; moleküler yerleştirme skoru yüksek iki molekül (ZINC64606047 ve ZINC05296775), referans ilaç olan Kamostat'tan daha yüksek bağlanma affinitesi gösterdiği tespit edilmiştir (Idris vd., 2020):



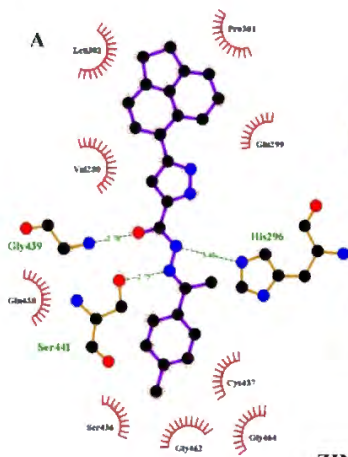
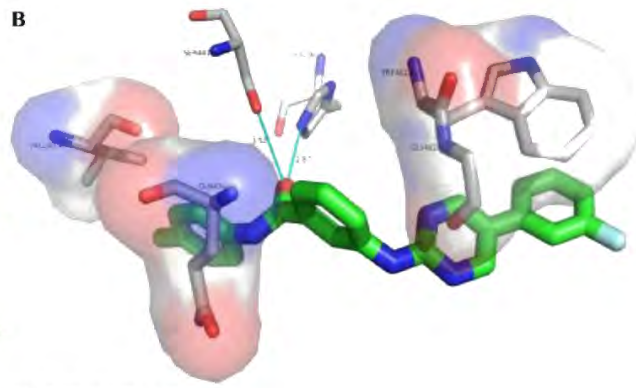
ZINC64606047: 3-[[5-(3-fluorophenyl)pirimidin-2-il]amino(N)-(4-metil fenil)benzamid



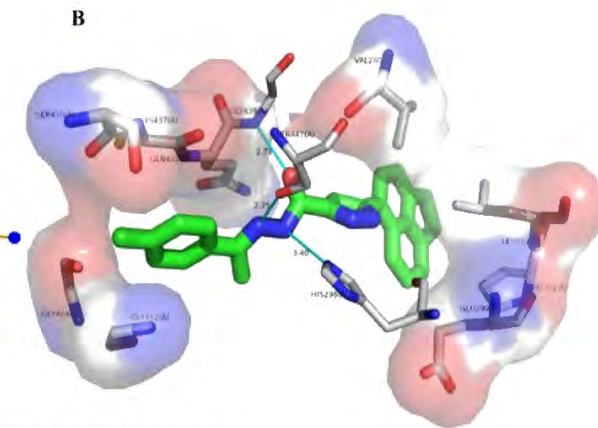
ZINC05296775: 3-(1,2-dihidroasenaftilen-5-il)-(N)-[(-E)-1-(4-metilfenil)etilidenamino]-1-(H)-pirazol-5-karboksamid



ZINC64606047 (LIGAND1)



ZINC05296775 (LIGAND2)

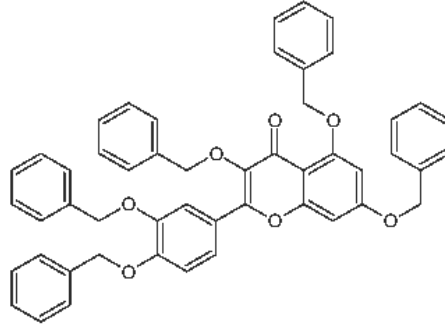


Şekil 25. Moleküler yerleştirme skoru yüksek iki molekül (ZINC64606047 ve ZINC05296775) (İdris vd., 2020)

Tablo 4. Protein-ligand bağlanma enerjileri ve AutoDock Vina ile yapılan moleküler yerleştirme'den türetilen etkileşimler

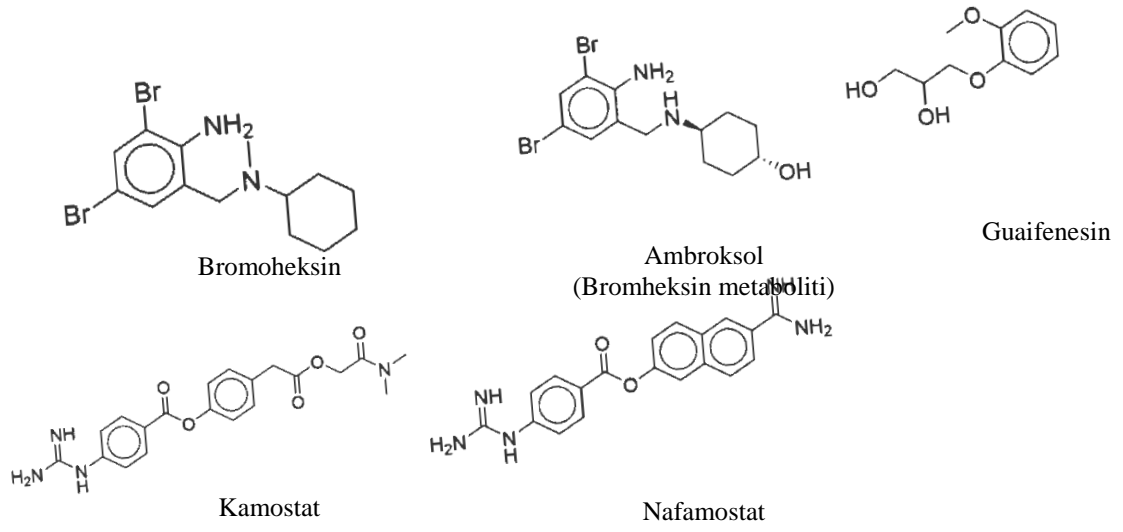
Ligandlar	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)	Protein-ligand etkileşimlerinde rol oynayan kalıntılar	
		Hidrojen bağları (bond uzunluğu, Å)	Hidrofobik etkileşimler (bağ uzunluğu, Å)
ZINC64606047 (Ligand 1)	-9.30	Ser ⁴⁴¹ (3.52), His ²⁹⁶ (2.87)	Trp ⁴⁶¹ (3.59), Gly ⁴⁶² (3.93), Gln ⁴³⁸ (3.77), Val ²⁸⁰ (3.23)
ZINC05296775 (Ligand 2)	-9.20	His ²⁹⁶ (3.40), Gly ⁴³⁹ (2.78), Ser ⁴⁴¹ (2.75)	Val ²⁸⁰ (3.79), Val ²⁸⁰ (3.22), Leu ³⁰² (3.56), Leu ³⁰² (3.20), Pro ³⁰¹ (3.54), Glu ²⁹⁹ (2.87), Cys ⁴³⁷ (3.64)
Nafamostat	-8.20	Gly ⁴⁶⁴ (2.90), Asp ⁴³⁵ (2.87), Trp ⁴⁶¹ (3.19), His ²⁹⁶ (3.31), Val ²⁸⁰ (3.21), His ²⁷⁹ (2.93)	Thr ⁴⁵⁹ (3.90)
Kamostat	-7.20	Ser ⁴⁴¹ (2.38), Gln ⁴³⁸ (2.31), Ser ⁴³⁶ (2.89), His ²⁹⁶ (3.26)	Gln ⁴³⁸ (3.78)
Barisitinin	-6.90	Ser ⁴⁶⁰ (3.36), Ser ⁴⁴¹ (2.98), Gly ⁴⁶⁴ (3.11), Gln ⁴³⁸ (3.29)	Val ²⁸⁰ (3.91)
Ruksolitinin	-6.70	Ser ⁴⁴¹ (3.06), Ser ⁴⁶⁰ (3.33), Gly ⁴⁶⁴ (3.05)	Gly ⁴⁶² (3.85), His ²⁹⁶ (3.50), Trp ⁴⁶¹ (4.06), Gln ⁴³⁸ (3.74)
Pefablok	-5.60	His ²⁹⁶ (3.10), Gly ⁴³⁹ (3.37), Ser ⁴³⁶ (3.04), Ser ⁴³⁶ (3.02), Asp ⁴³⁵ (3.11)	Gln ⁴³⁸ (3.71)
Fenilmetil sulfonilflorür	-5.00	His ²⁹⁶ (2.92), Gly ⁴³⁹ (3.34), Ser ⁴⁴¹ (3.41)	Thr ⁴⁵⁹ (3.48)

Sayısal hesaplamalara dayanan bir diğer çalışmada TMPRSS2'nin güçlü bir inhibitörü olarak Benzkuersin'e dikkat çekilmiş, sonuçların *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla doğrulanması durumunda klinik çalışmalarda kullanılabileceği ve bağlanma yöresinde Val280, Asp435, Ser436, Gln438, Gly439, Ser441, Ser460 ve Val473'ün önemli aminoasit kalıntıları olduğu öne sürülmüştür (Durdağı, 2020):

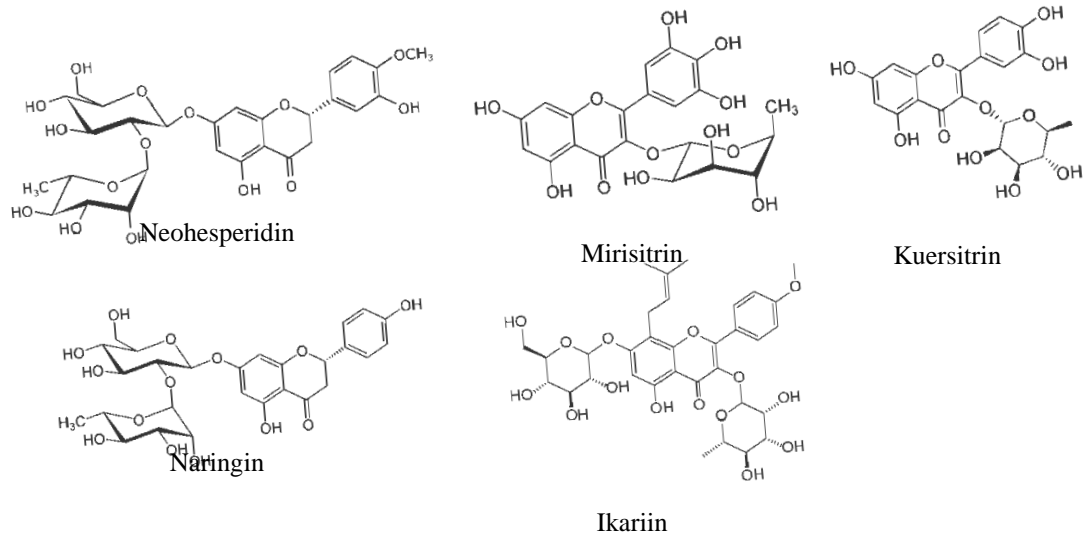


Şekil 26. Benzkuersin

Bir başka moleküler yerleştirme çalışmasında 5 ilaç molekülü (Bromoheksin, Ambroksol, Guaifenesin, Kamostat, Nafamostat) referans alınarak; doking skoru, bağlanma enerjisi ve etkileşimi göz önüne alındığında 6 molekülün (Neoheperidin, Mirisitrin, Kuersitirin, Naringin, Ikariin ve Ambroksol) TMPRSS2 inhibitörü olarak elverişli olabileceği öne sürülmüştür (Chikhale vd., 2020):



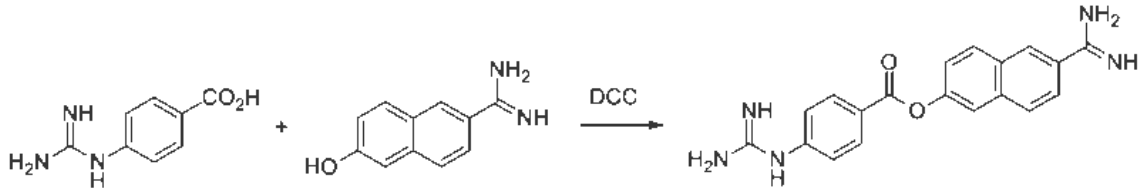
Şekil 27. Beş standart ilaç molekülünün iki boyutlu gösterimi (Chikhale vd., 2020)



Şekil 28. Son önerilen moleküllerin iki boyutlu gösterimi (Chikhale vd., 2020)

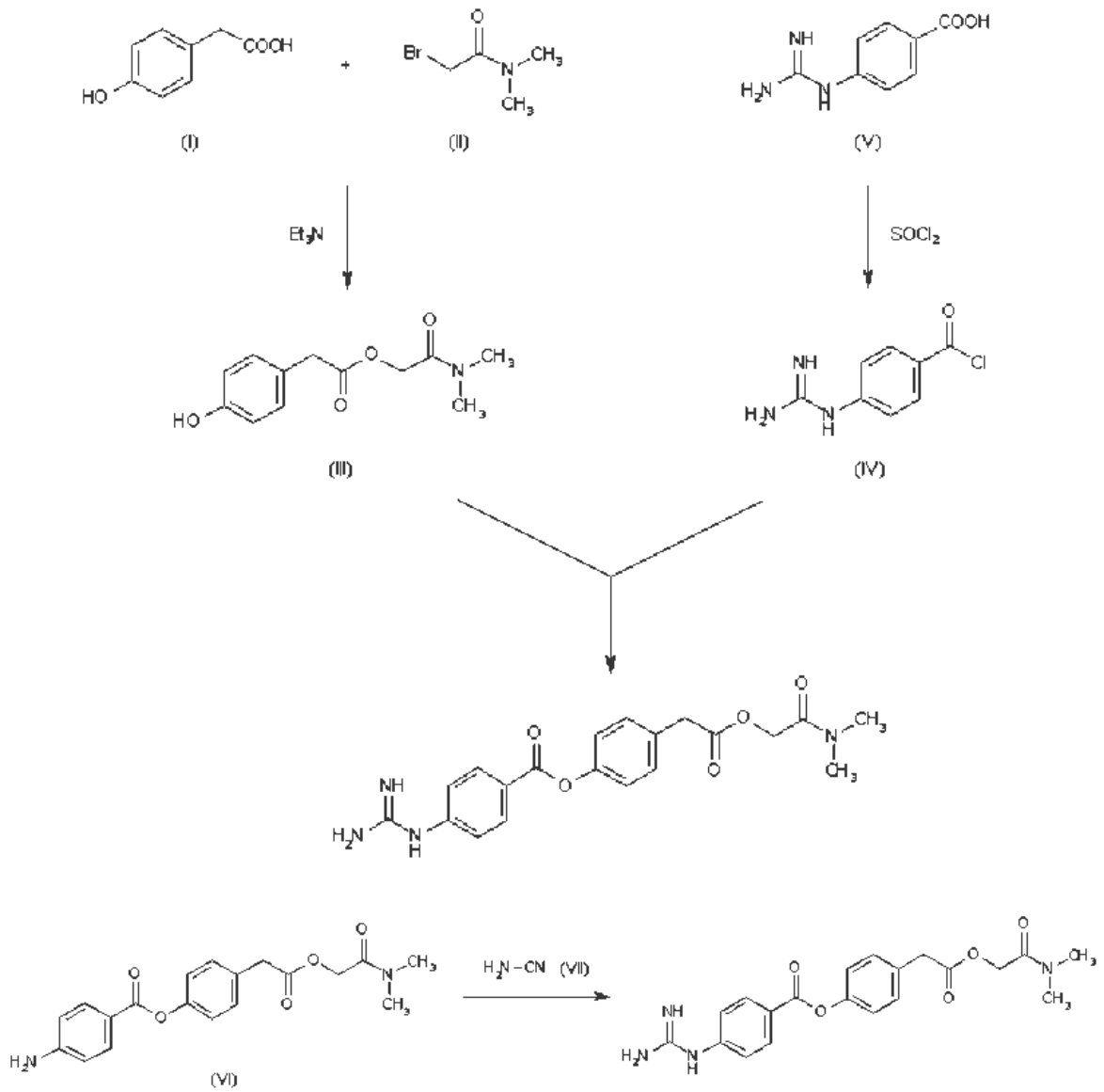
1.10. Literatürde İzlenen Genel Sentez Yöntemleri

1.10.1. Nafamostat Sentezi



Şekil 29. Nafamostat sentez şeması
(<https://patents.google.com/patent/KR101595747B1/en>)

1.10.2. Kamostat Sentezi



Şekil 30. Kamostat sentez şeması
(<https://newdrugapprovals.org/2020/03/16/camostat-mesilate>)

p-Hidroksifenilasetik asid (I)'in N,N-dimetilbromoasetamid (II) ile asetonitril içinde ve trietilamin varlığında geri çeviren soğutucu altında ısıtılarak karıştırılması, N,N-dimetilkarbamoylmetil-p-hidroksifenilasetat (III)'ı verir. Elde edilen ürün (III)'ün, p-guanidinobenzoil klorür (IV) ile piridin içinde kondenzasyonu ile Kamostat elde edilir.

p-Guanidinobenzoil klorür (IV) bileşiği ise, p-guanidinobenzoik asid (V) ve türevlerinin tiyonil klorür ile reaksiyonu sonucu elde edilmektedir.

Kamostat; N,N-Dimetilkarbamoylmetil-p-(p-aminobenzoiloksi)fenilasetat (VI)'ın siyanamid (VII) ile reaksiyonuyla da elde edilmektedir.

1.11. Literatür Özeti

Konu ile ilgili literatüre kayıtlı bilgiler incelendiğinde dikkat çeken TMPRSS2 inhibitörü aktif bileşiklerin ortak bir yapı-spesifik kimyasal yapıya/halkaya sahip olmadıkları gözlenmektedir. Bu bakımdan aktif hedef bölge ile etkileşim için inhibitörlerin stereokimyasal ve fizikokimyasal özelliklerinin önem kazandığı görülmektedir.

Yapılan bilimsel çalışmalarda tedaviye yönelik yeni moleküllerin tasarımından ziyade “repurposing” yani klinikte kullanılmakta olan mevcut ilaçların TMPRSS2 inhibitörü olarak yeniden incelendiği ve değerlendirildiği görülmektedir.

Yapılan çalışmalarda moleküler modelleme, homoloji modelleme yöntemleri kullanılmakta olup, şimdiye kadar bileşiklerin “ilaç benzerliği” gibi değerlerinin incelenmediği gözlenmektedir.

Bununla birlikte TMPRSS2 geni ile spesifik bir inhibitörün kokristal hale getirilmediği, protein data banka deponit edilmediği gözlenmişken, tez çalışmalarımıza başladıktan kısa süre sonra 2021’de nafamostat inhibitörünün ligand olarak yer aldığı protein kompleksi deponit edilmiştir. Bu çalışmaların ardından moleküler yerleştirme araştırmalarının hız kazanacağı öne sürülebilir.

1.12. Konu ve Kapsam

Mevcut tez çalışması, 2019 başlarında tüm dünyayı etkisi altına alarak pandemi şekline ulaşan yeni tip koronavirüs SARS-CoV-2’de yeni ilaç arayışları ile ortaya konan birkaç önemli hedef genden biri olan tip 2 transmembran serin proteazları hedef alması bakımından özgün değer taşımaktadır. Tüm dünyada bu alanda “repurposing” çalışmaları sürmekte iken orijinal bileşiklere ihtiyaç olduğu açıktır. Günümüzde, Nafamostat ve Kamostat’a benzer mekanizmaya sahip serin proteaz inhibitörleri olan Gabeksat ve Sivelestat üzerinde çalışmalar sürmektedir.

TMPRSS2’nin konakçı hücre proteazı olarak farklı popülasyonlarda genetik analizleri yapılarak viral enfeksiyonlardaki rolleri araştırılmaktadır. Bu araştırmalardan birinde test edilen farelerin ekstrapulmoner hava yollarında 32 genden dördünün (Furin, Thop1, Ppia ve TMPRSS2) önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir. Bu nedenle bu tez kapsamında, her biri global SARS-CoV-2 krizinde terapötik hedef olarak anılan proteazlardan TMPRSS2 üzerinde yoğunlaşmış, potansiyel ilaç adaylarının yapı-etki ilişkileri ve etkileşim haritaları incelenmiştir.

Klinikte henüz onaylanmış bir ilacı olmamakla birlikte SARS-CoV-2 kapsamında TMPRSS2 inhibitörü olarak değerlendirme aşamasında pek çok ilaca araştırmacıların yoğun ilgisi devam etmektedir. Tasarlanan piperazin halkası taşıyan moleküller, referans UKI-1 molekülündeki heterosiklik yapılar nedeniyle “ilaç benzerlik” ve “ilaç skorları”nın yüksek olması sonucundan yola çıkılarak düşünülmüştür.

Piperazin halkası içeren tasarlanmış moleküllerin TMPRSS2 hedef geni üzerinde inhibitör özellik göstereceği tarafımızca önerilmiştir. Mevcut TMPRSS2 inhibitörlerinden daha umut vadeden değerlere teorik olarak ulaşıyor olması bizi bu bileşiklerin sentez ve etkileşim bölgelerinin araştırılmasına sevk etmiştir.

Bu tez kapsamında referans moleküller Nafamostat, Kamostat gibi TMPRSS2 inhibitörleri model alınarak tasarlanan bileşikler, moleküler modelleme çalışmasından önce “ilaç benzerlik” özellikleri bakımından değerlendirilmiş, ilaç skoru yüksek olan ve umut vaadeden bileşiklerin sentezi planlanmıştır. Tasarlanan moleküllerin, aktif

TMPRSS2 molekülleri ile mevcut MOE programı kullanılarak benzerlikleri “esnek hizalama” gibi ön çalışmaların ardından, ligand etkileşimleri, farmakofor modelleme ve moleküler yerleştirme çalışmaları planlanmıştır.

Orijinal olduğu tespit edilen bileşiklerin sentezlerinin benzer moleküllerin genel sentez prosedürleri uygulanarak gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Çalışmanın devamında aktivite testleri ikincil çalışma olarak düşünülmektedir.

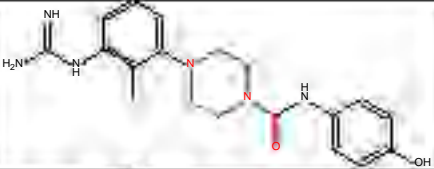
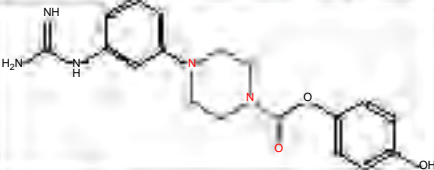
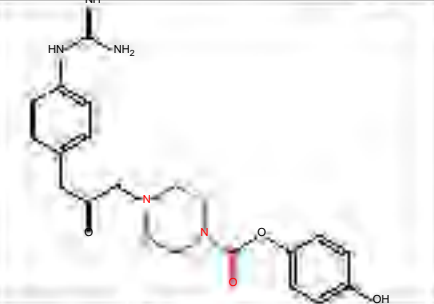
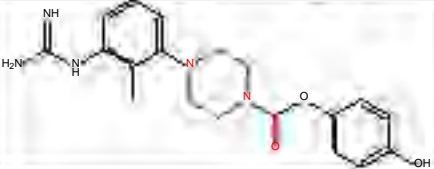
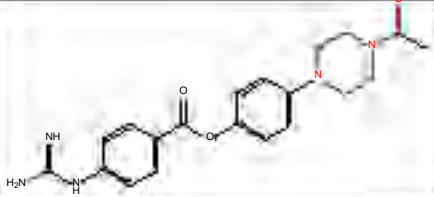
2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. İlaç Benzerlik Özelliği ve İlaç Skoru Araştırması

Piperazin halkası taşıyan tasarladığımız **1-5 nolu** bileşikler etkili referans moleküller gözden geçirilerek “İlaç benzerlik özelliği” programlarından Osiris programı kullanılarak (Qin vd., 2015) ilaç benzerlik özellikleri ile ilaç skorları karşılaştırılmıştır.

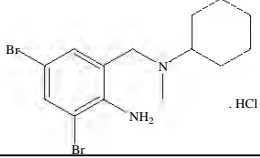
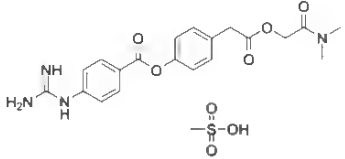
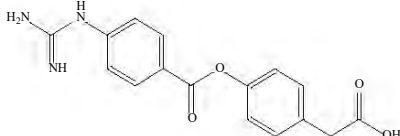
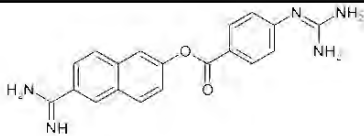
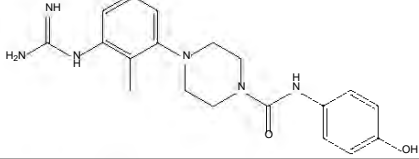
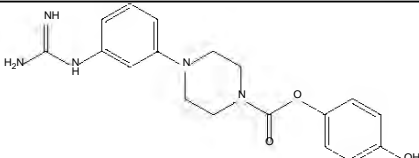
Sonuç olarak umut vadeden **1-5 nolu** bileşiklerin üzerinde çalışılması hedeflenmiştir.

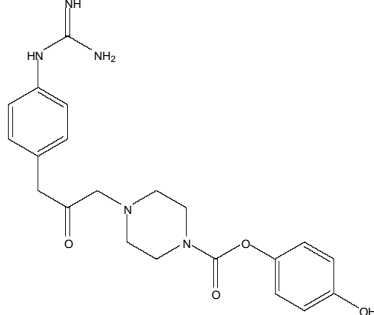
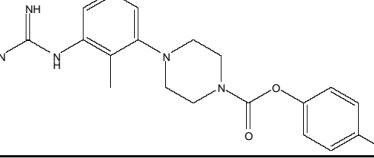
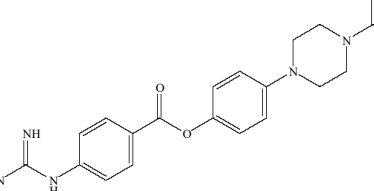
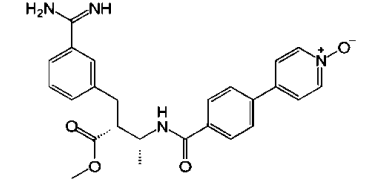
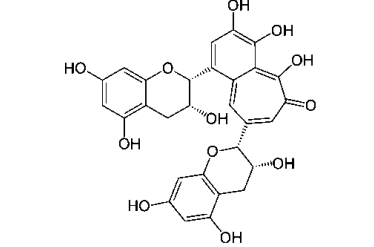
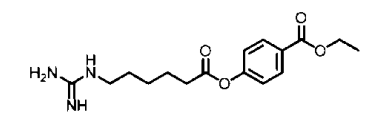
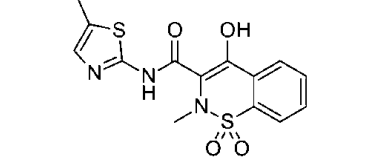
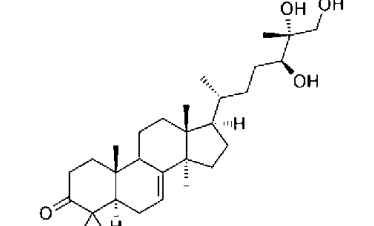
Tablo 5. Tez kapsamında tasarlanan bileşikler

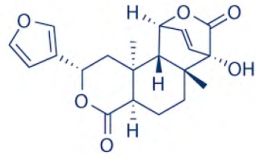
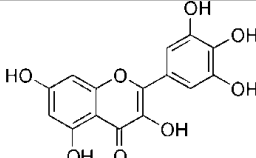
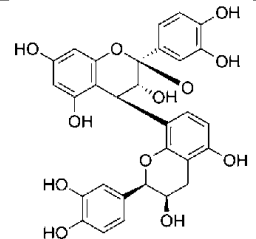
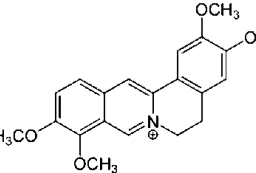
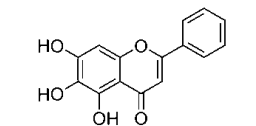
Bil. No		SMILES kodu	IUPAC isimlendirmesi	Moleküler Ağırlık	Moleküler Formül	Moleküler Bileşim
1		<chem>C1=CC(=C(C(=C1)N2CCN(CC2)C(=O)N(C3=CC=C(C=C3)O)[H])C)N(C(=N[H])N([H])[H])[H])</chem> (pubchemde çizildi) (orijinal)	4-(3-Guanidino-2-metil-fenil)-piperazin-1-karboksilik asid (4-hidroksi-fenil)-amid	368.44	$C_{19}H_{24}N_6O_2$	C 61.94%, H 6.57%, N 22.81%, O 8.68%
2		<chem>C1=CC(=CC(=C1)N2CCN(CC2)C(=O)OC3=CC=C(C=C3)O)[H])N(C(=N[H])N([H])[H])[H]</chem> (pubchemde çizildi) (orijinal)	4-(3-Guanidino-fenil)-piperazin-1-karboksilik asid 4-hidroksi-fenil ester	355.40	$C_{18}H_{21}N_5O_3$	C 60.83%, H 5.96%, N 19.71%, O 13.51%
3		<chem>O=C(CN2CCN(C(OC3=CC=C(C=C3)O)CC2)CC1=CC=C(C=C1)NC(N)=N</chem>	4-[3-(4-Guanidino-fenil)-2-okso-propil]-piperazin-1-karboksilik asid 4-hidroksi-fenil ester	411.46	$C_{21}H_{25}N_5O_4$	C 61.30%, H 6.12%, N 17.02%, O 15.55%
4		<chem>C1=CC(=C(C(=C1)N2CCN(CC2)C(=O)OC3=CC=C(C=C3)O)[H])C)N(C(=N[H])N([H])[H])[H]</chem> (pubchemde çizildi) (orijinal)	4-(3-Guanidino-2-metil-fenil)-piperazin-1-karboksilik asid 4-hidroksi-fenil ester	369.43	$C_{19}H_{23}N_5O_3$	C 61.77%, H 6.28%, N 18.96%, O 12.99%
5		<chem>C1=CC(=CC=C1C(=O)OC2=CC=C(C=C2)N3CCN(CC3)C(=O)N(C(=N[H])N([H])[H])[H])[H]</chem> (pubchemde çizildi) (orijinal)	4-Guanidino-benzoik asid 4-(4-asetil-piperazin-1-il)-fenil ester	381.44	$C_{20}H_{23}N_5O_3$	C 62.98%, H 6.08%, N 18.36%, O 12.58%

Tasarlanan bileşikler ile literatüre kayıtlı bileşikler (Bromheksin, Kamostat, Nafamostat, Meloksikam gibi) Osiris programı üzerinde ön incelemeleri yapılarak fizikokimyasal benzerlikleri aşağıdaki tabloda karşılaştırılmıştır. “İlaç benzerlik” değeri ve İlaç skoru” kayda değer olanlar yeşil renkte işaretlenmiştir.

Tablo 6. *Tasarlanan bileşikler ile literatüre kayıtlı bileşiklerin Osiris Programı ile incelenmesi*

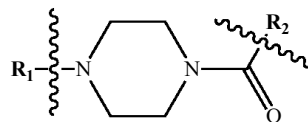
		Clog p	Çözünürlük	Molekül Ağırlığı	TPSA	“İlaç benzerlik” değeri	İlaç skoru	Referans
Bromheksin		2,06	-2,87	306	29,26	0,72	0,74	
Kamostat		1,03	-2,38	398	134,8	5,7	0,85	Weiss vd., 2021
GBPA 4-(4-Guanidinobenzoyloksi) fenilasetik asid (metabolik ürün)		1,84	-2,85	313	125,5	2,38	0,85	
Nafamostat		1,43	-4,36	347	140,5	0,17	0,55	
1		1,61	-3,02	368	117,7	7,33	0,84	
2		1,55	-2,64	355	114,9	2,41	0,84	

3		1,31	-2,15	411	131,9	3,87	0,83	
4		1,9	-2,98	369	114,9	2,28	0,8	
5		1.61	-2.76	381	111	8.33	0.85	
Otamiksaban (NCGC00378763) 2.2 mM, % 100		2,58	-6,41	446	130,7	-3,02	0,25	Hu vd., 2020
Teaflavin (ZINC3978446)		1,99	-3,93	564	217,6	1,67	0,52	Wu vd., 2020
GB-2	Ekstrat							Wu vd., 2020
Gabeksat		2,02	-3,61	321	117	-14,84	0,42	
Meloksikam		1,91	-2,64	351	136,2	5,76	0,87	Pooja vd., 2021
Ganodermanontriol		6,27	-5,69	456	57,53	-3,81	0,17	Pooja vd., 2021

Columbin		0,97	-3,28	358	85,97	1,35	0,46 irritan	Pooja vd., 2021
Mirisetin		1,14	-2,2	318	147,6	0,75	0,46 mutaje nik	Pooja vd., 2021
Proantosiyaniidin A2		2,65	-2,95	576	209,7	2,08	0,33 Üreme üzerine etkisi	Pooja vd., 2021
Jatrorhizin		-1,58	-3,68	337	54,63	0,42	0,67	Pooja vd., 2021
Baikalein		2,34	-2,86	270	86,99	0,75	0,75	Pooja vd., 2021

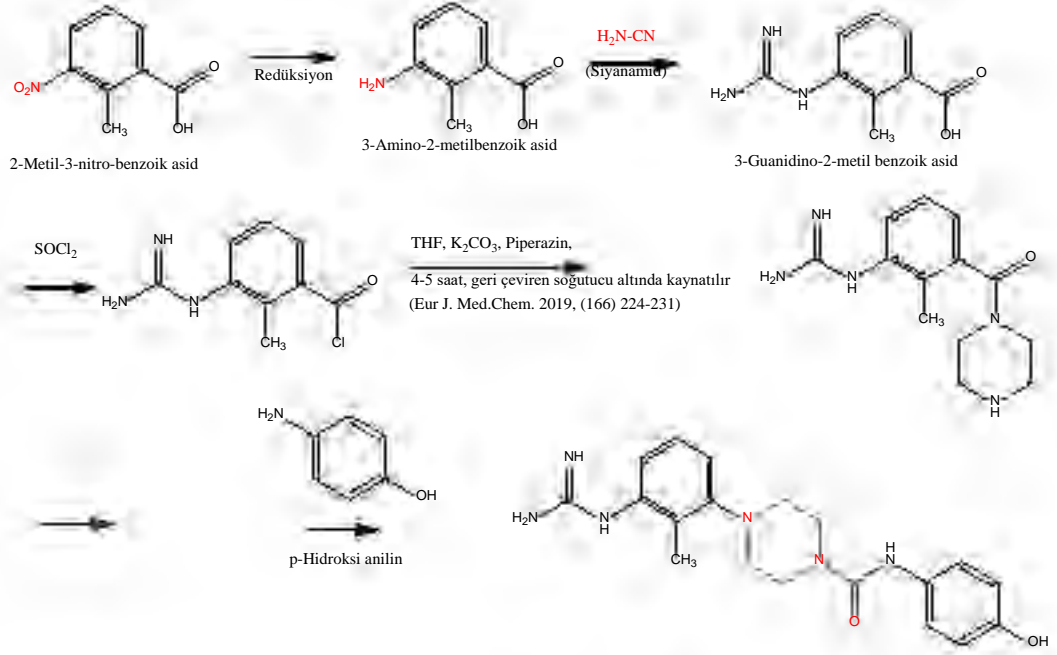
2.2. Tasarlanan Bileşiklerin Planlanan Sentez Şemaları

Tasarlanan 5 molekülün ana yapısı, yapısal olarak farklı olduğundan her bir bileşik için ayrı sentez şeması tasarlanmıştır.

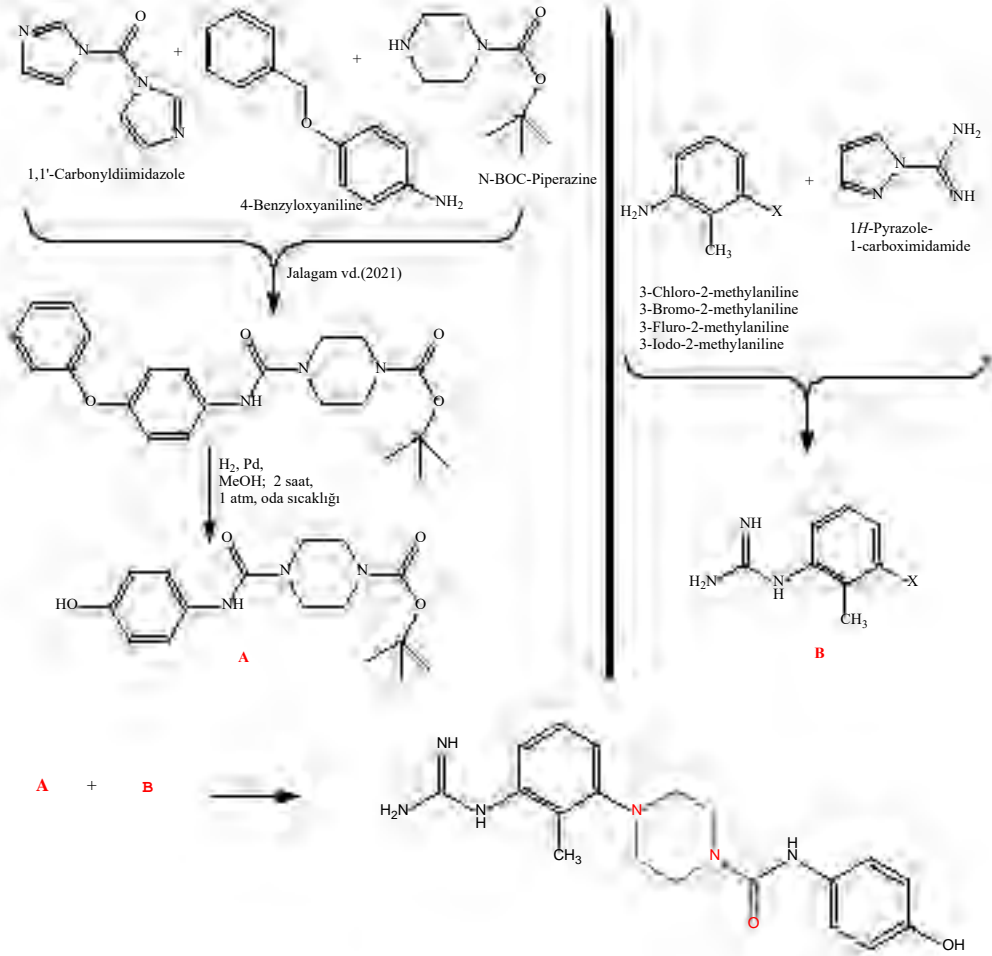


Şekil 31. Tasarlanan 5 molekülün ana yapısı

A metodu:

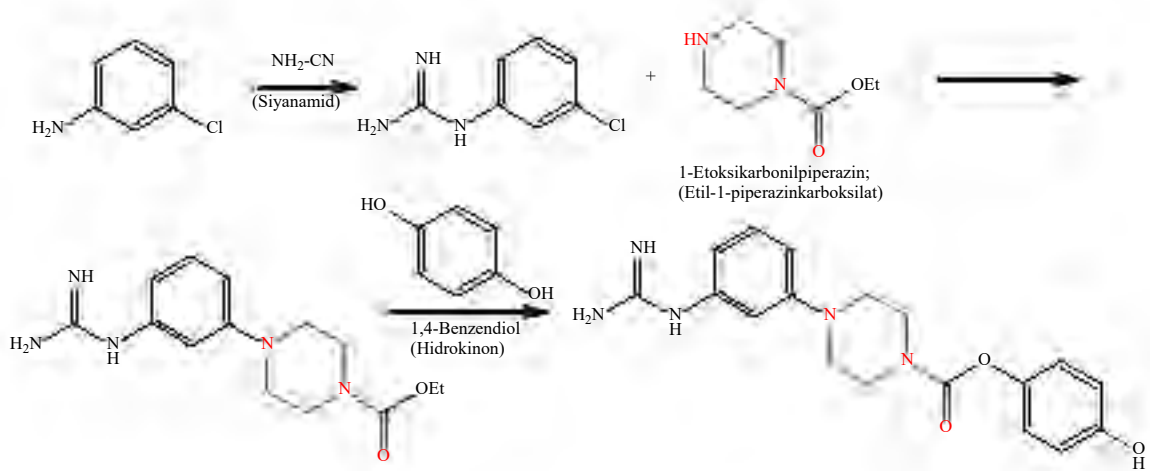


B metodu:

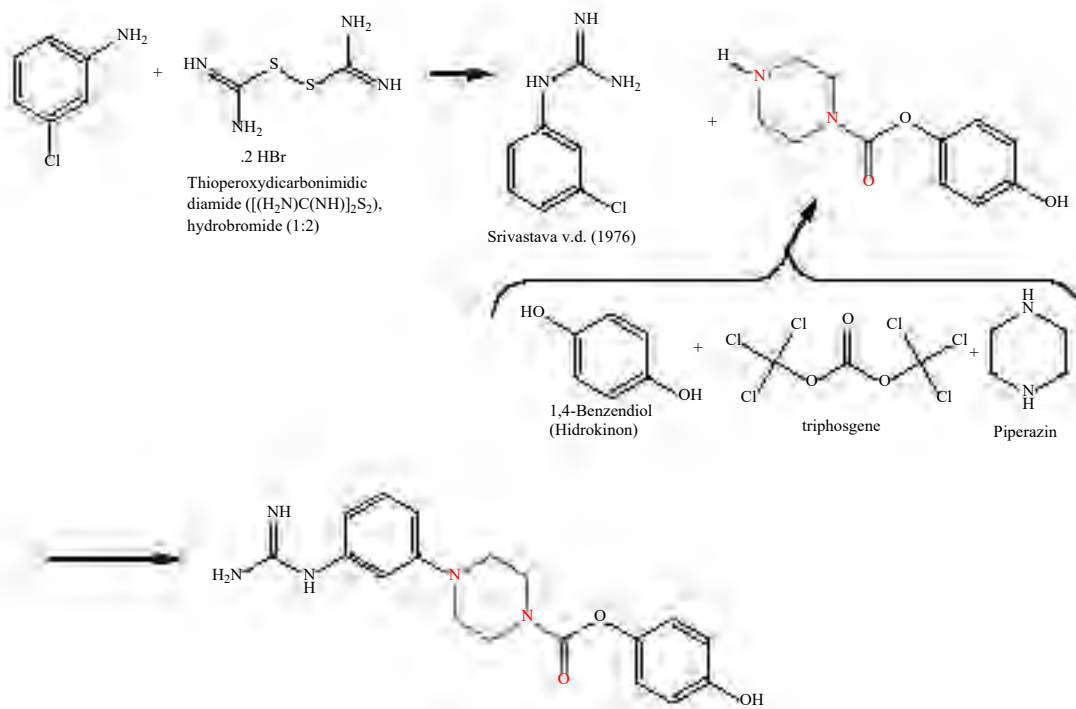


Şekil 32. 1 Nolu bileşik için önerilen sentez şeması

A metodu:

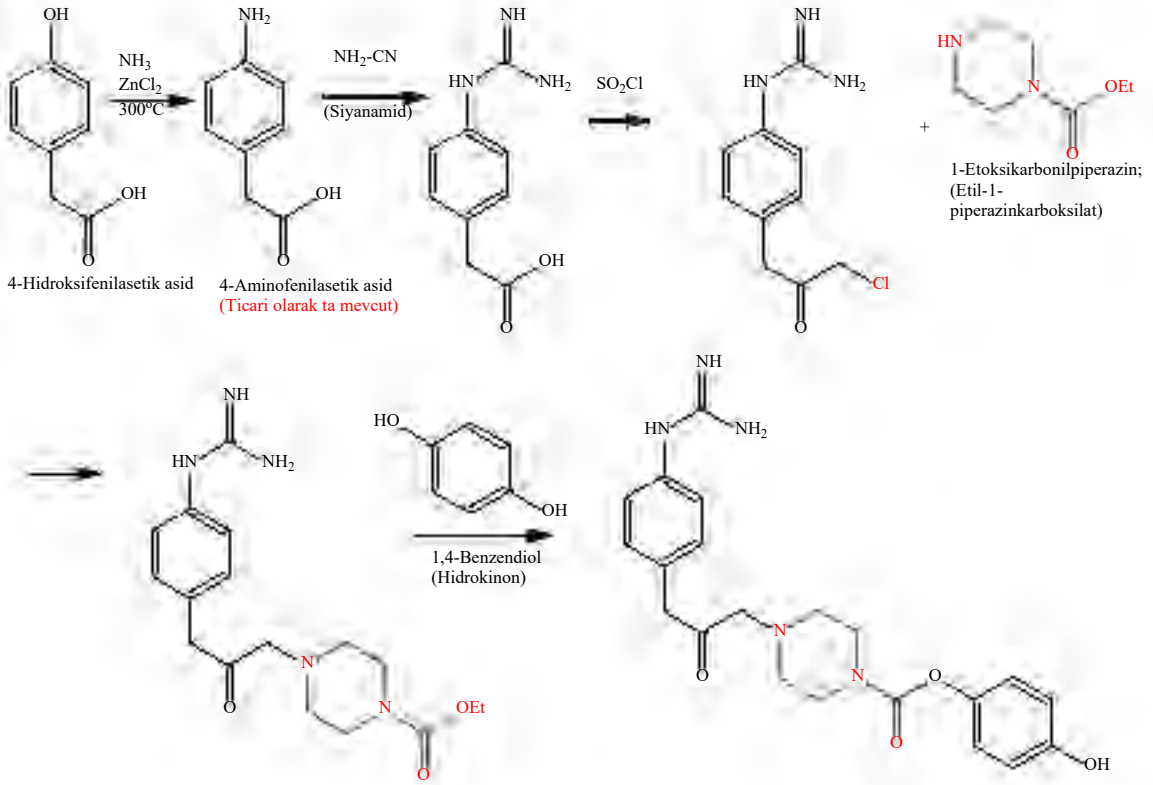


B metodu:

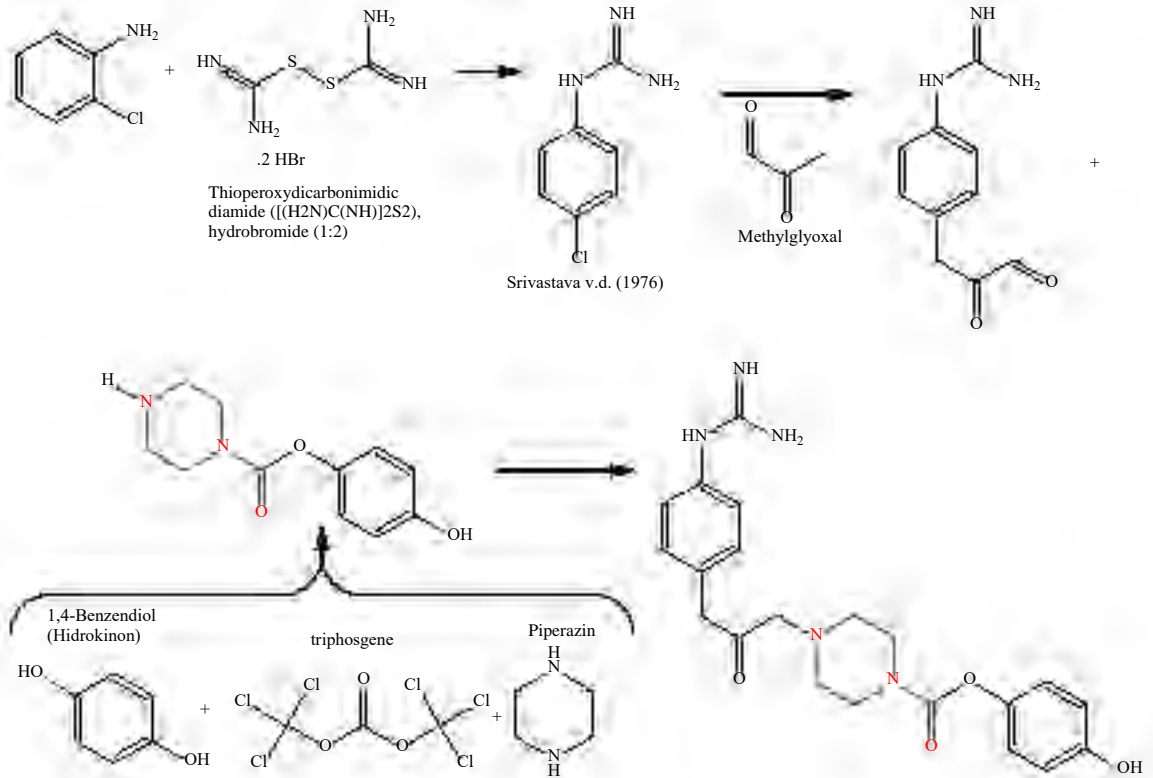


Şekil 33. 2 Nolu bileşik için önerilen sentez şeması

A metodu:

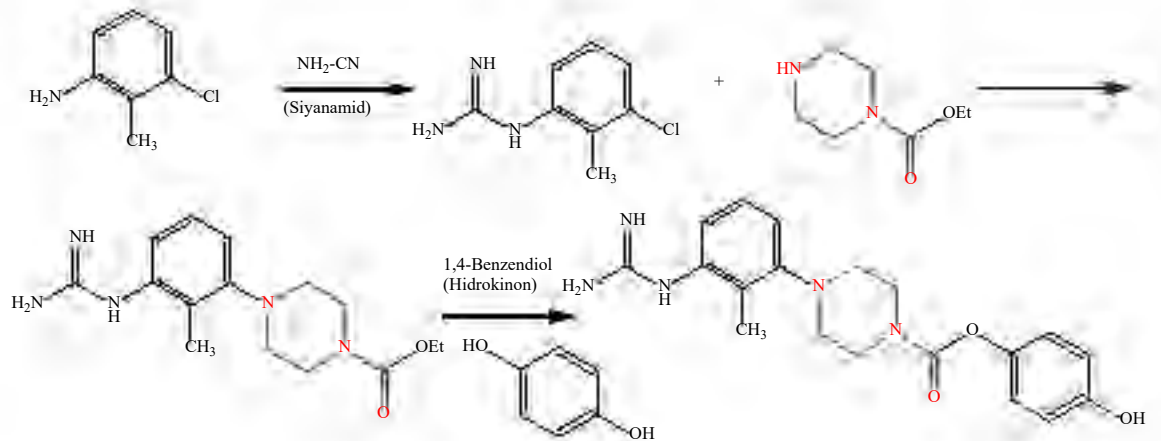


B metodu:

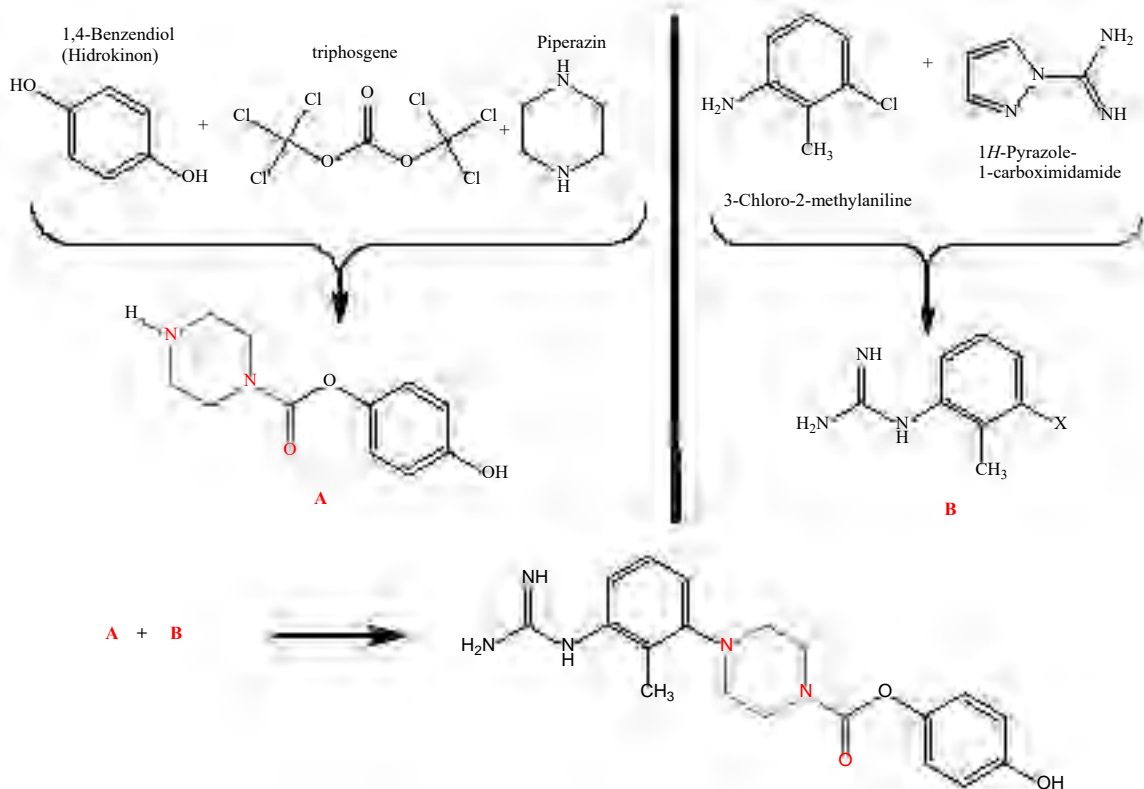


Şekil 34. 3 Nolu bileşik için önerilen sentez şeması

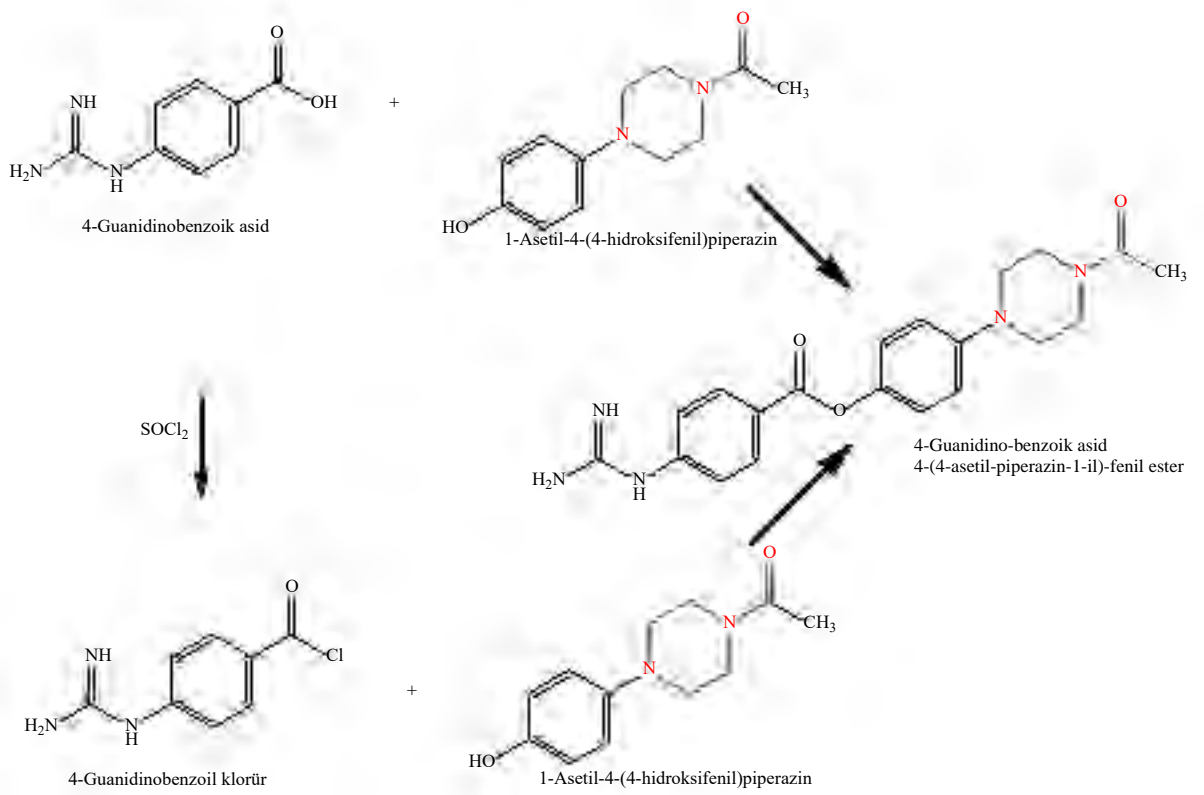
A metodu:



B metodu:



Şekil 35. 4 Nolu bileşik için önerilen sentez şeması



Şekil 36. 5 Nolu bileşik için önerilen sentez şeması

3. BULGULAR VE YORUM

3.1. Kimyasal Sentez Çalışmaları

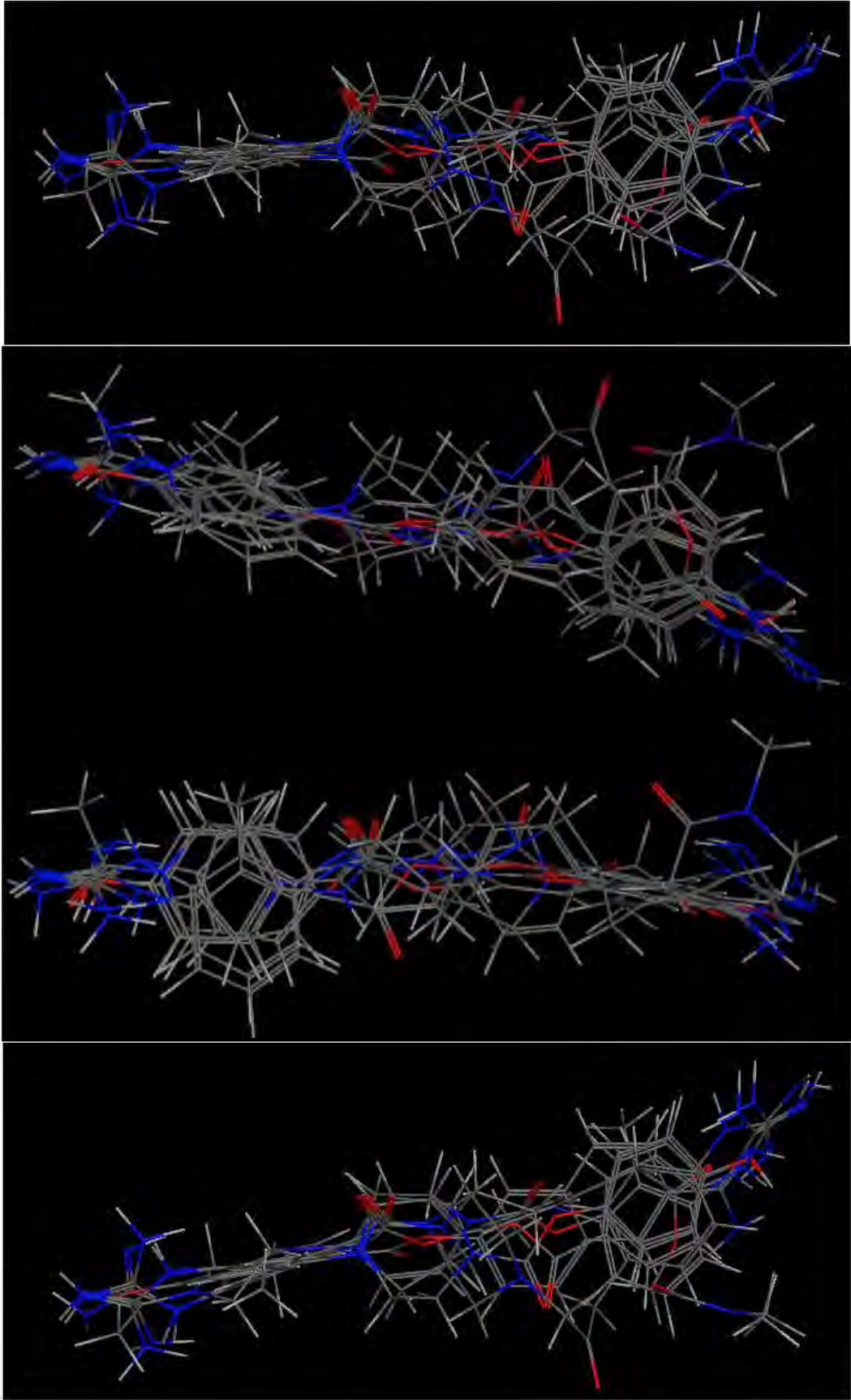
Orijinal olarak tasarlanan moleküllerin sentez yöntemleri mevcut bilgiler ışığında planlanmış, önerdiğimiz sentez şemaları doğrultusunda başlangıç maddeleri temin edilmiştir. Guanidino benzoik asid türevleri, SOCl_2 ile asid klorür haline getirildikten sonra uygun bir fenol türevi (piperazin ve diğer heterosiklik halkalarla süstitüe fenoller) ile esterin elde edilmesi tasarlanmıştır. Ancak siyanamid basamağında guanidin süstitüe moleküllerin stabilitesi uygun koşullar sağlanamadığından ileri basamaklara geçilememiştir (A metodu, Şekil 32-36).

3.2. Moleküler Modelleme Çalışmaları

TMPRSS2'ye karşı, FDA tarafından onaylanmış ilaç nafamostat'ın ko-kristal halde protein databanka çok yeni (2021) depozit edilmiş olan 7meq pdb kodlu yapı kullanılarak 3D modelleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. TMPRSS2 ve nafamostat arasındaki etkileşim, tasarlanan 5 bileşikten en yüksek "ilaç benzerlik" ve "ilaç skoru" değerine sahip 5 nolu bileşik üzerine odaklanılmış, MOE programı kullanılarak ligand etkileşim haritası, esnek hizalama, farmakofor modelleme ve moleküler yerleştirme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Tasarlanan (1-5 nolu) bileşikler, MOE programı üzerinde 3 boyutlu hale getirilerek stereokimyasal benzerlikleri karşılaştırılmıştır.

3.2.1. Esnek hizalama çalışması

Yazılımın öğretici kılavuzunda belirtildiği şekilde "Esnek Hizalama" çalışması yapılmıştır (https://www.chemcomp.com/moe/help/latest/index_tut.html).

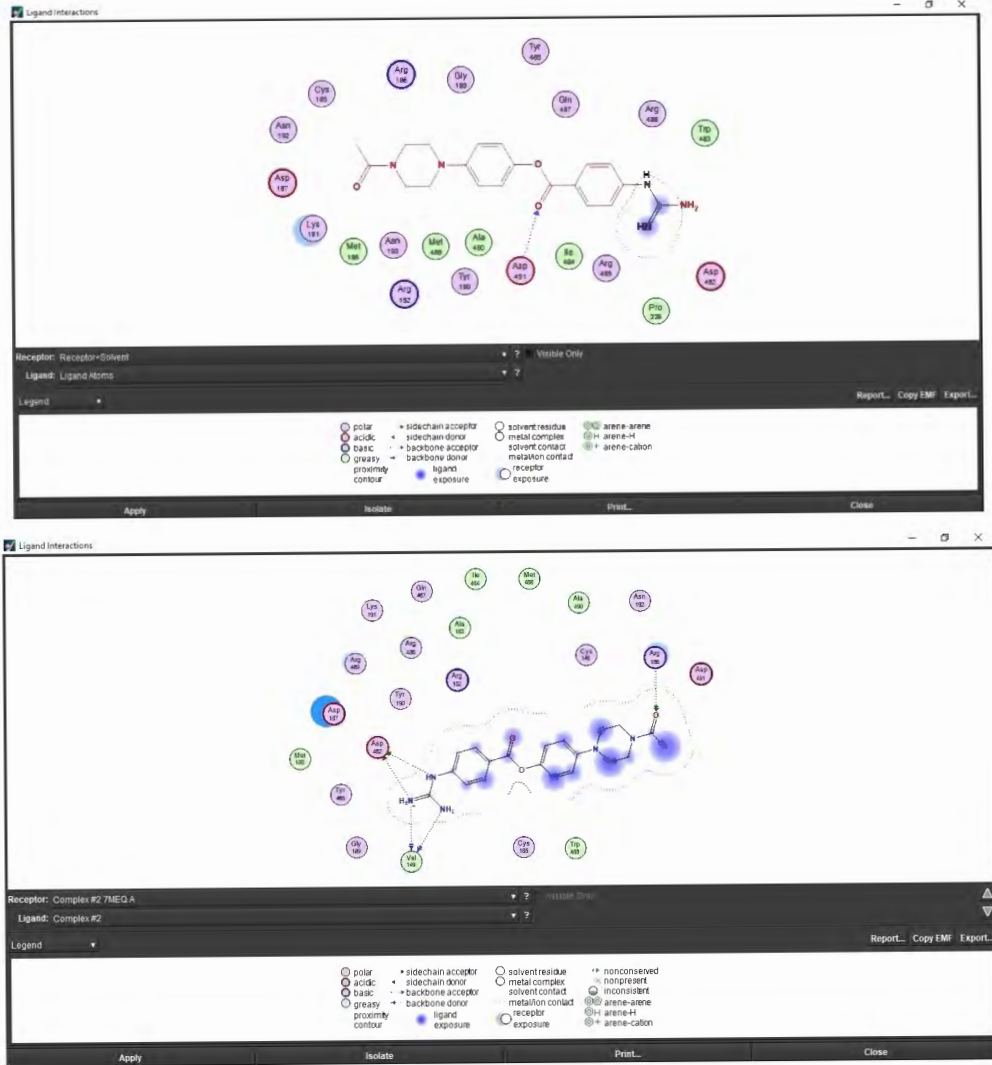


Şekil 37. Tasarlanan bileşiklerin MOE programı ile “Esnek Hizalama” çalışması

3.2.2. Ligand etkileşim haritası

Ligand etkileşimlerini görüntülemek için, protein data banktan pdb kodu 7meq olan kokristal yapısı alınarak, yazılımın öğretici kılavuzunda belirtildiği şekilde etkileşim haritası çıkarılmıştır (Fraser vd., 2022).

(https://www.chemcomp.com/moe/help/latest/index_tut.html)



7MEQ: HİDROLAZ/HİDROLAZ İNHİBİTÖRÜ / 7MEQ

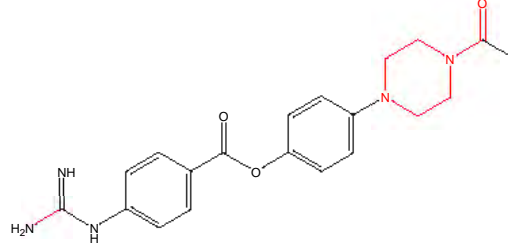
Ligand	Reseptör	Etkileşim	Mesafe	E (kcal/mol)
N 1	O VAL 149 (A)	H-donör	2.96	-3.1
N 5	O VAL 149 (A)	H-donör	2.97	-2.9
N 5	OD1 ASP 482 (A)	H-donör	3.01	-5.7
N 5	OD2 ASP 482 (A)	H-donör	2.90	-6.3
N 8	OD1 ASP 482 (A)	H-donör	3.08	-5.9
O 52	NE ARG 186 (A)	H-akseptör	3.01	-5.2
O 52	NH2 ARG 186 (A)	H- akseptör	3.18	-3.1
N 5	OD1 ASP 482 (A)	iyonik	3.01	-4.4
N 5	OD2 ASP 482 (A)	iyonik	2.90	-5.2
N 8	OD1 ASP 482 (A)	iyonik	3.08	-4.0

Şekil 38. Tasarlanan bileşiklerin ligand etkileşimleri ve ligand etkileşim raporu

3.2.3. Farmakofor çalışması

Yazılımın öğretici kılavuzunda belirtildiği şekilde Tasarlanan 5 nolu bileşik üzerinde “Farmakofor Modelleme” çalışması yapılmıştır.

(https://www.chemcomp.com/moe/help/latest/index_tut.html).

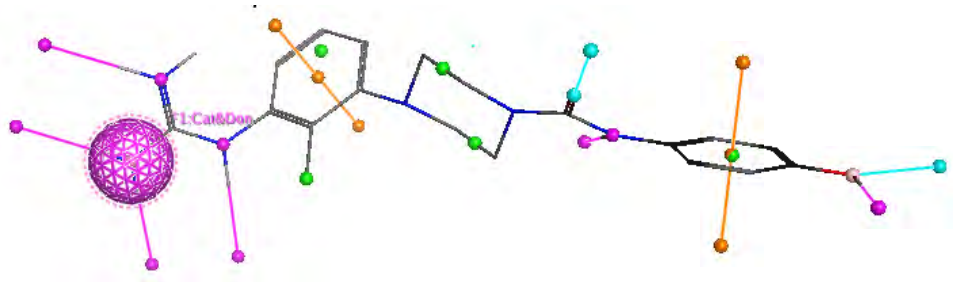


Şekil 39. Tasarlanan 5 Nolu bileşik

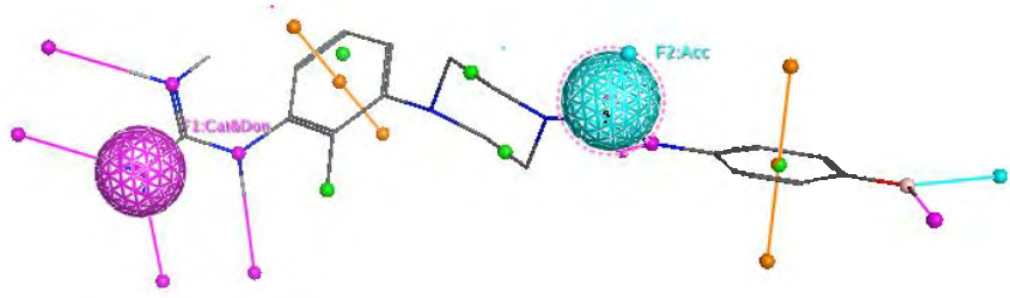
Oluşturulan ilk ek açıklama özelliği, hidrojen bağı donörü olan *Don* özelliğidir.

Don eşiği, reseptör gücüne göre değiştirilir:

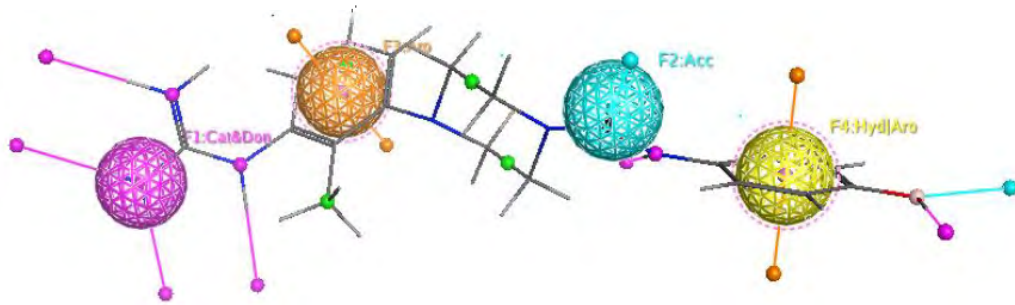
- 1) R-Dayanıklılık seçeneği etkinleştirilir (Farmakofor Editörü'nün sağ üst köşesinde). Bu, ek açıklama eşik denklemindeki reseptör gücünü gösterir.
- 2) “Reseptör gücü” açılır menüsü tıklanır ve (ASN, GLN, O =) seçilir. Bu, etkileşim alıcı atomunun, reseptör gücü 2.0 olan bir karbonil olduğunu belirtir. Reseptör gücü 2.0'a yükseldiğinde, $\epsilon_{acc}\epsilon_{don}>1$ durumunu korumak için *Don* eşiği 0.5'e düşürülür.



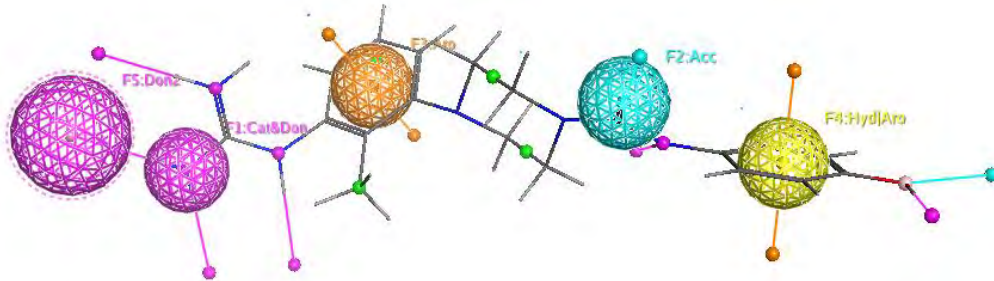
Şekil 40. Oluşturulan ilk ek açıklama özelliği, H bağı donörü olan *Don* özelliği



Şekil 41. Oluşturulan ikinci ek açıklama özelliği, H bağı alıcısı olan Acc özelliği



Şekil 42. Oluşturulan bir sonraki ek açıklama özellikleri, aromatik merkezler olan Aro özellikleri

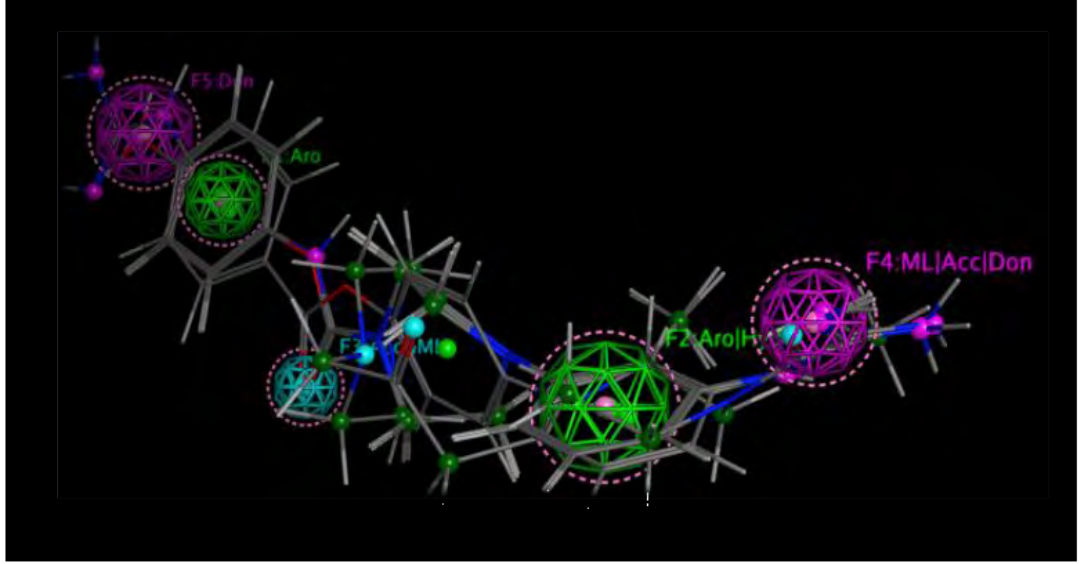


Şekil 43. Oluşturulan son ek açıklama özelliği, hidrojen bağı donör projeksiyonu olan Don2 özelliği

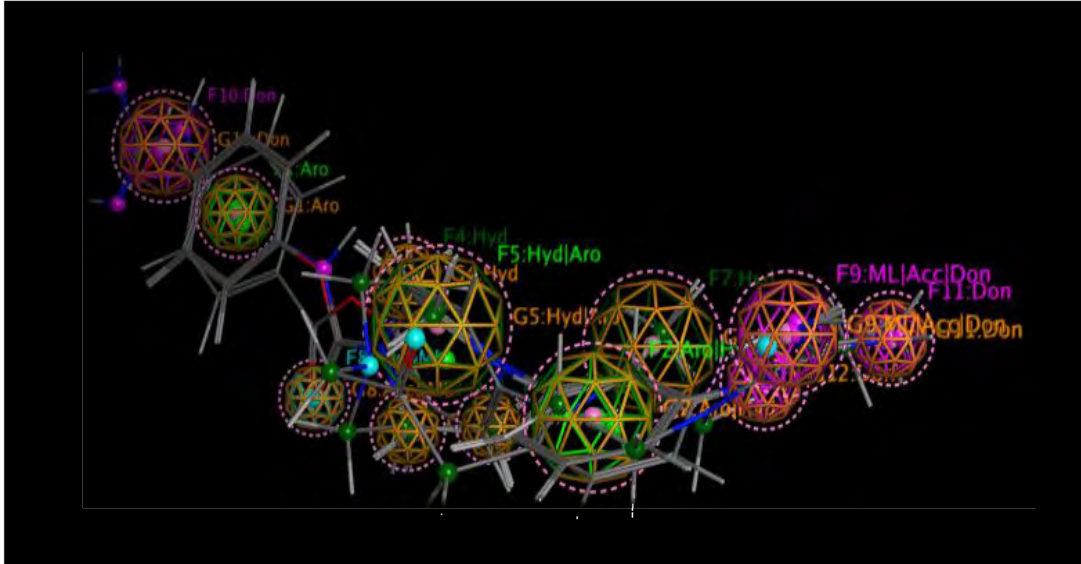
Oluşturulan son ek açıklama özelliği, hidrojen bağı donör projeksiyonu olan Don2 özelliğidir. Bu Don2 özelliği, Don özelliği ile etkileşime girebilecek olası hidrojen bağı ortaklarının yerini açıklar (ilk adımda daha önce oluşturulmuş olan, guanidin grubundan N atomunu temsil eder)

Farmakofor modelleme için program üzerinde aşağıdaki yöntemler uygulanmıştır: Tasarlanan 5 molekül yapısı, MOE programı üzerinde çizilmiş, database olarak kaydedilmiştir. Add entry'den chain kısmı seçilmiş, Iteration limit 20, failure limit

10 seçilerek esnek hizalama başlatılmıştır. Çıkan sonuçlar arasında daha küçük S değerine sahip olan seçilmiştir. “Pharmacophore query” üzerinden planlardan (scheme) PCH_All seçilerek “consensus” butonundan hesaplama yapılmıştır. %100 skora sahip olanlar aşağıdaki şekilde gösterilmiştir:



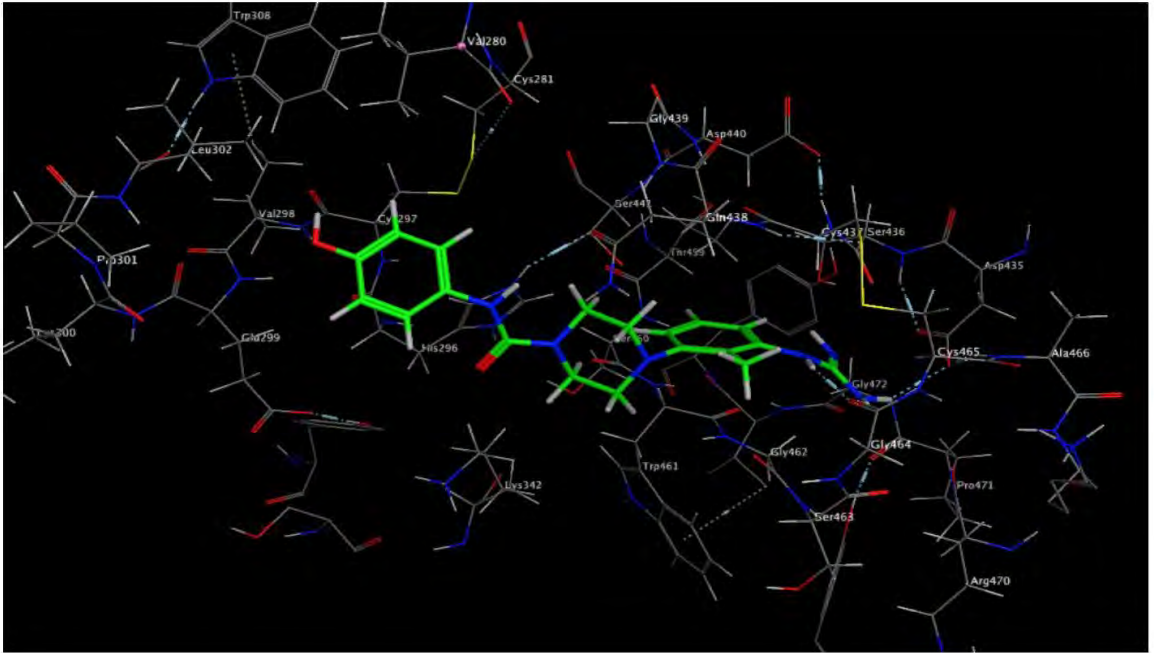
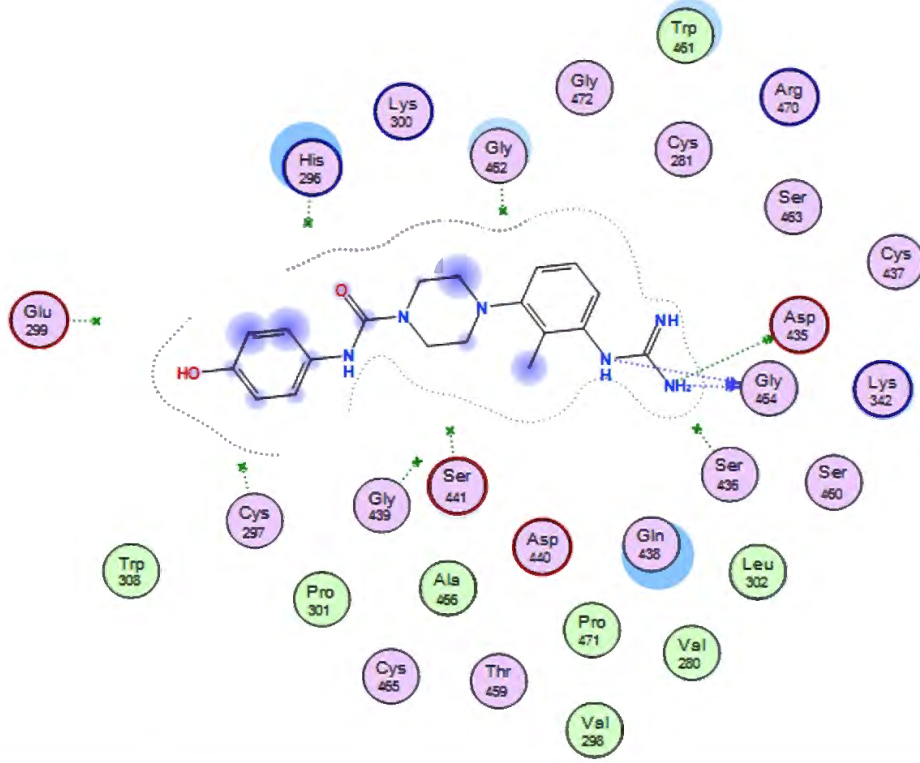
Şekil 44. %100 skora sahip farmakofor alanlar

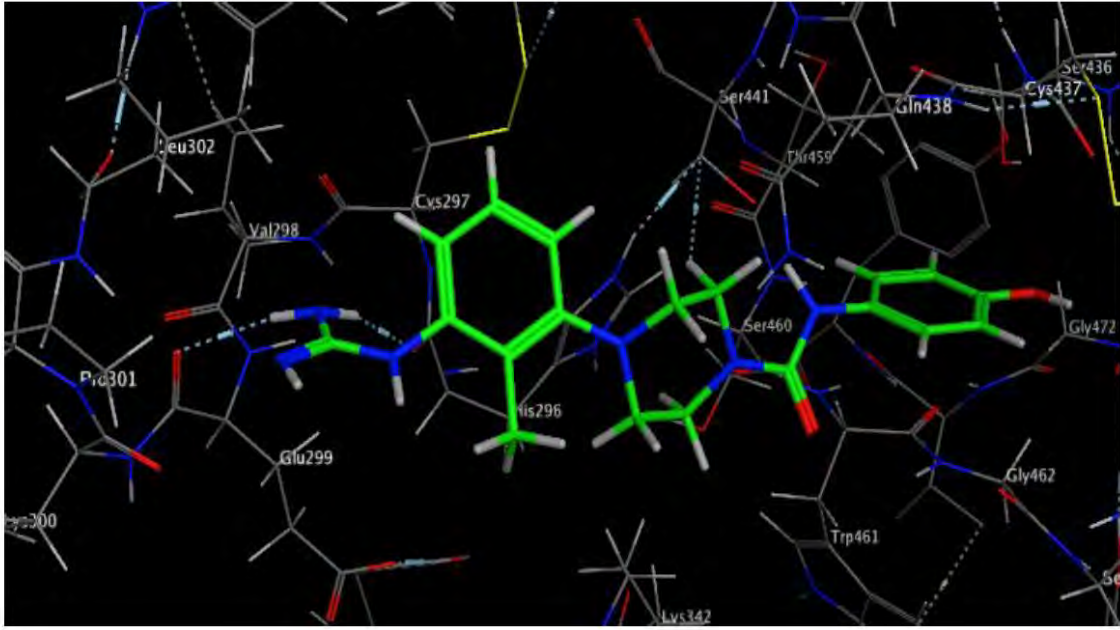
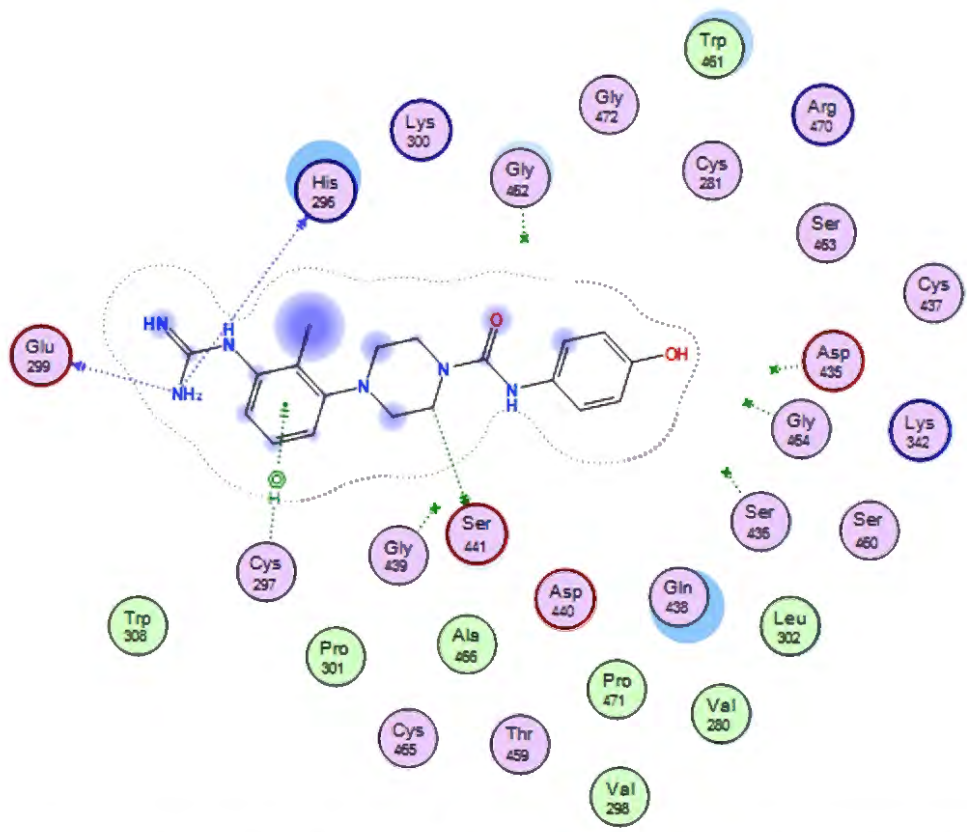


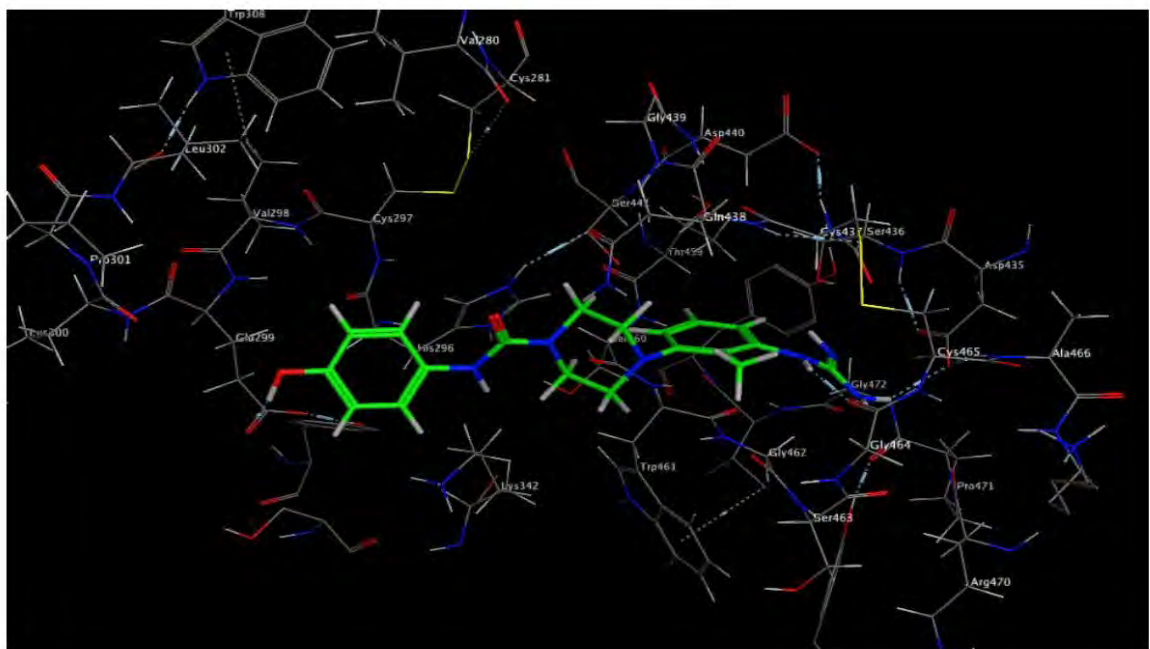
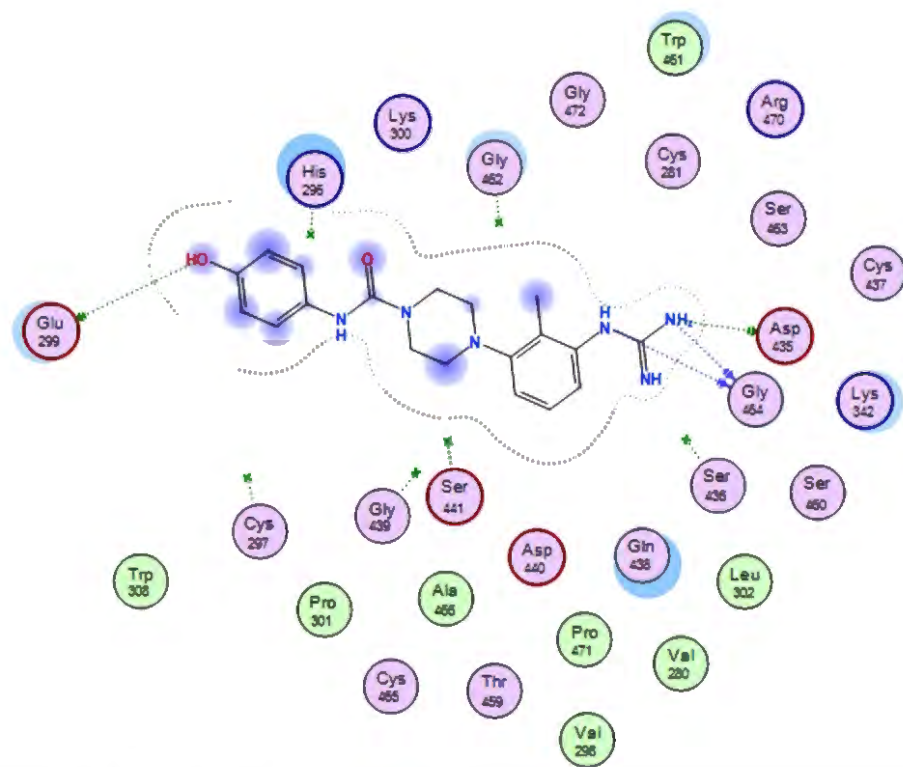
Şekil 45. Tüm skorların işaretli olduğu farmakofor alanlar

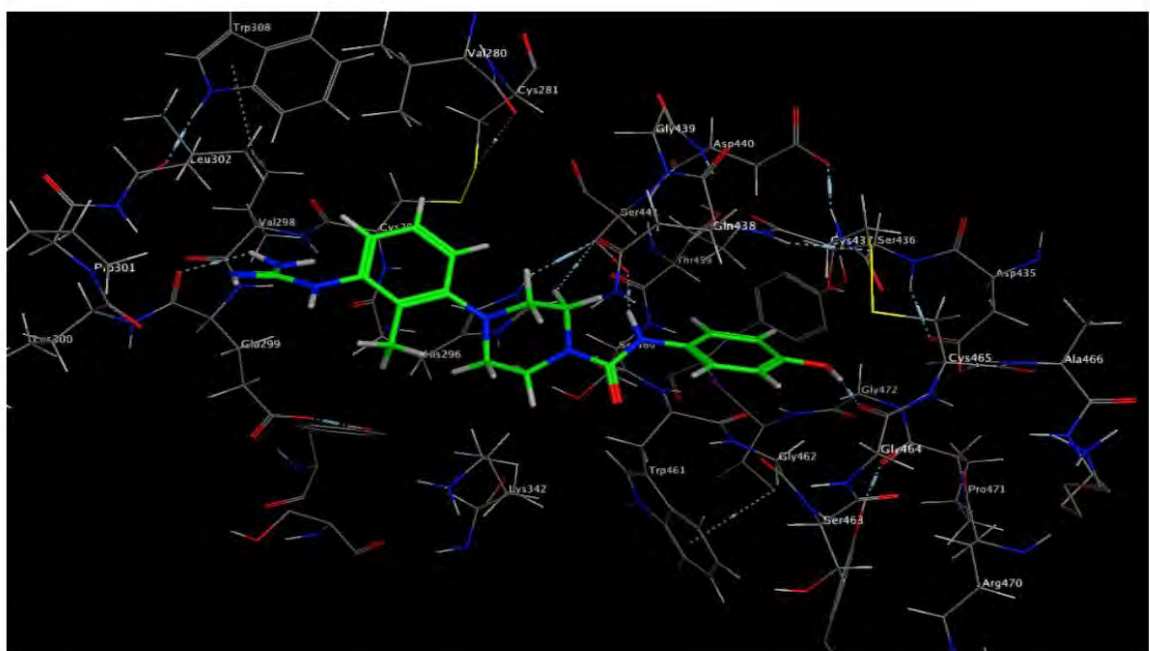
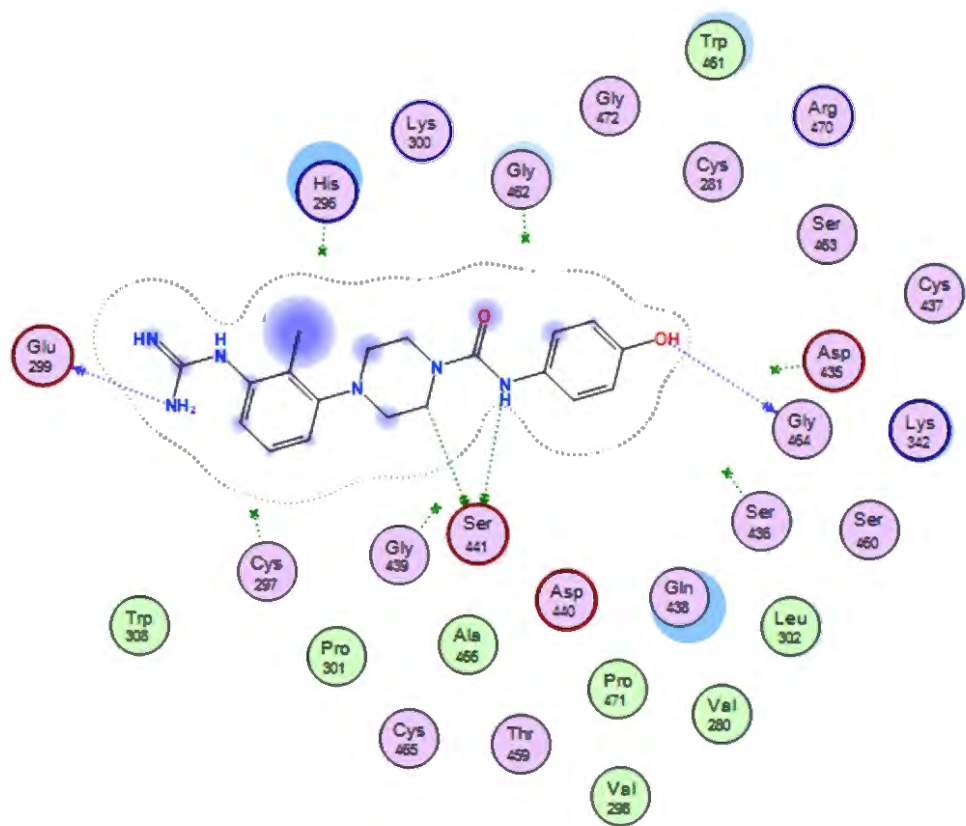
3.2.4. Moleküler yerleştirme çalışması

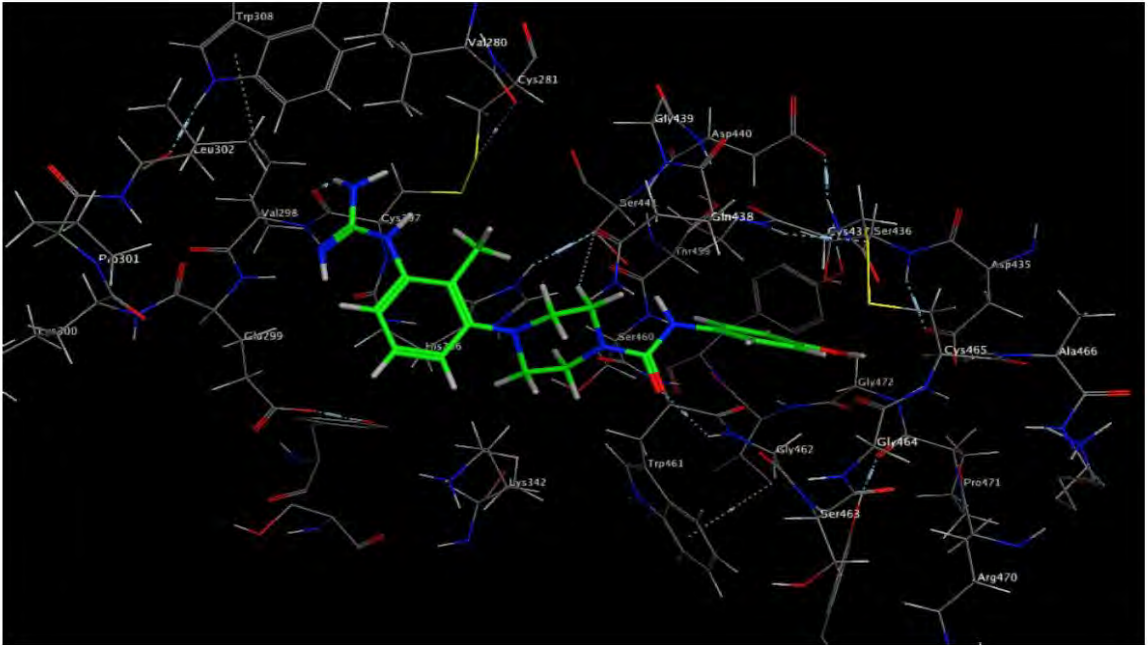
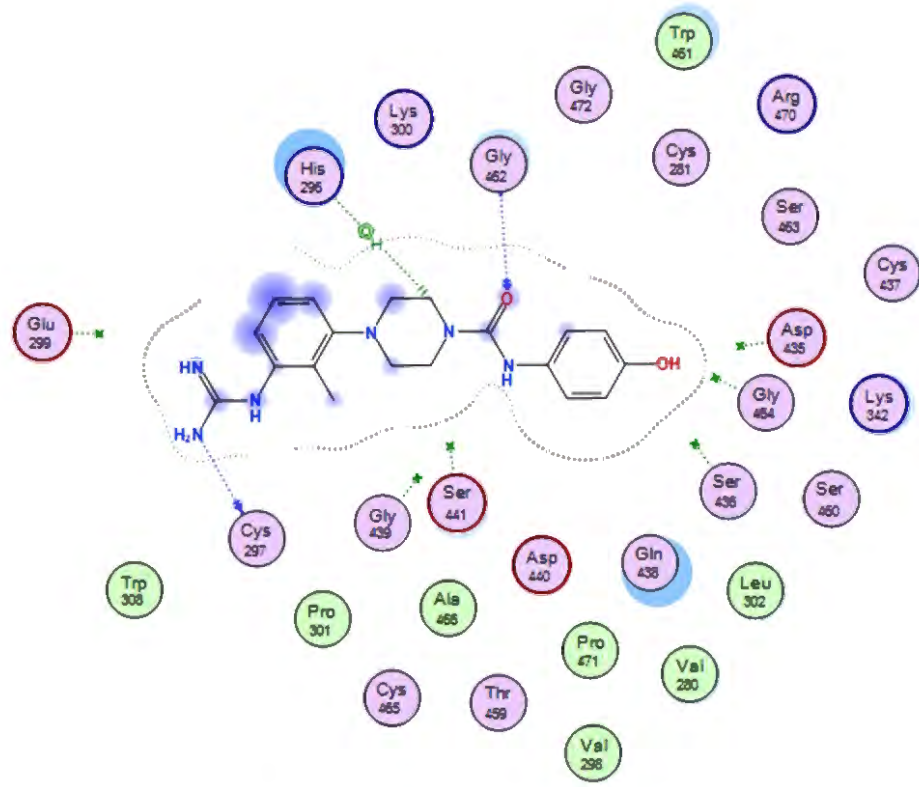
3.2.4.1. 1 nolu bileşik için moleküler yerleştirme çalışması









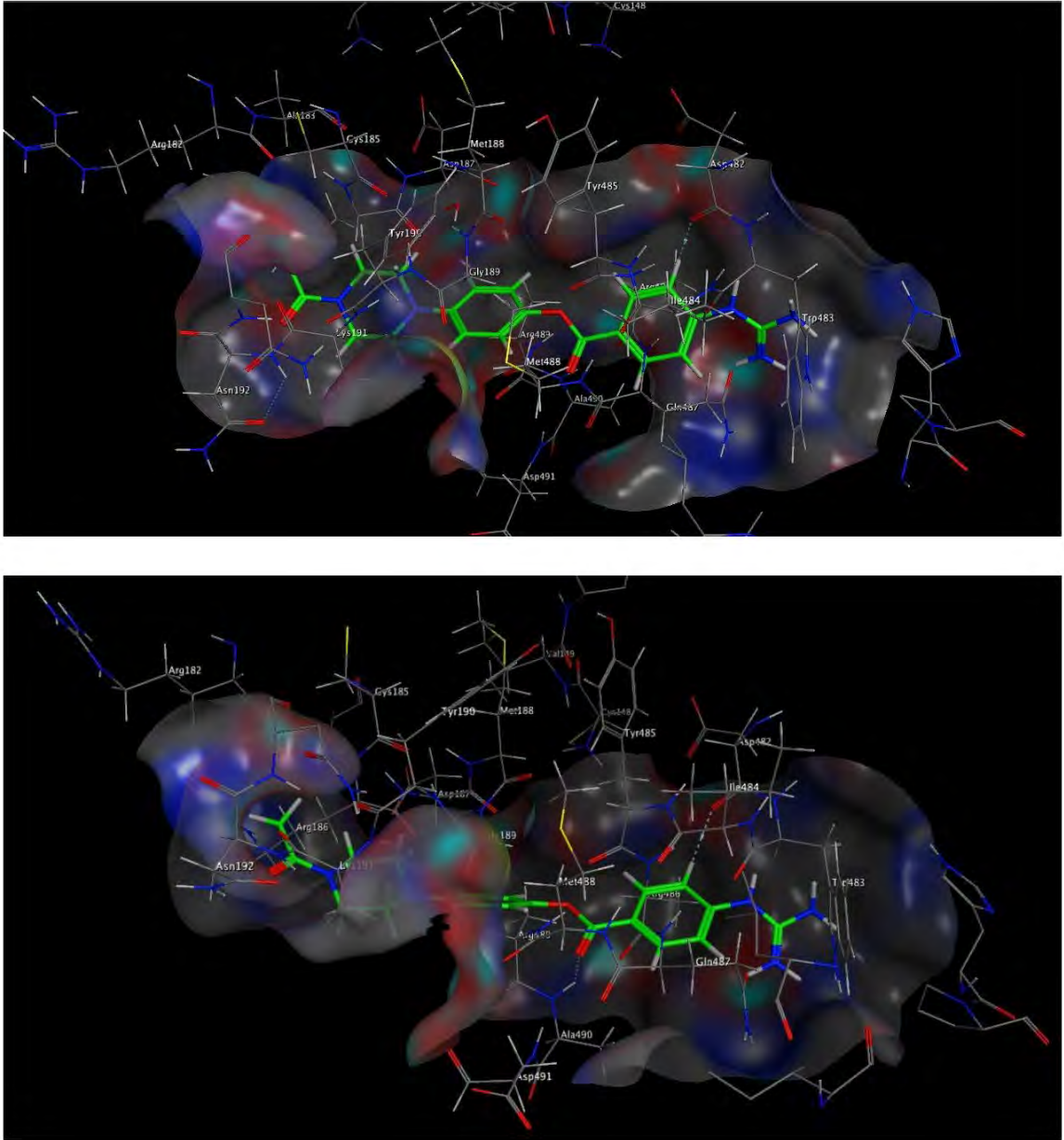


Şekil 46. Tasarlanan 1 nolu bileşiğin “Moleküler yerleştirmesi” (pdb:7meq)

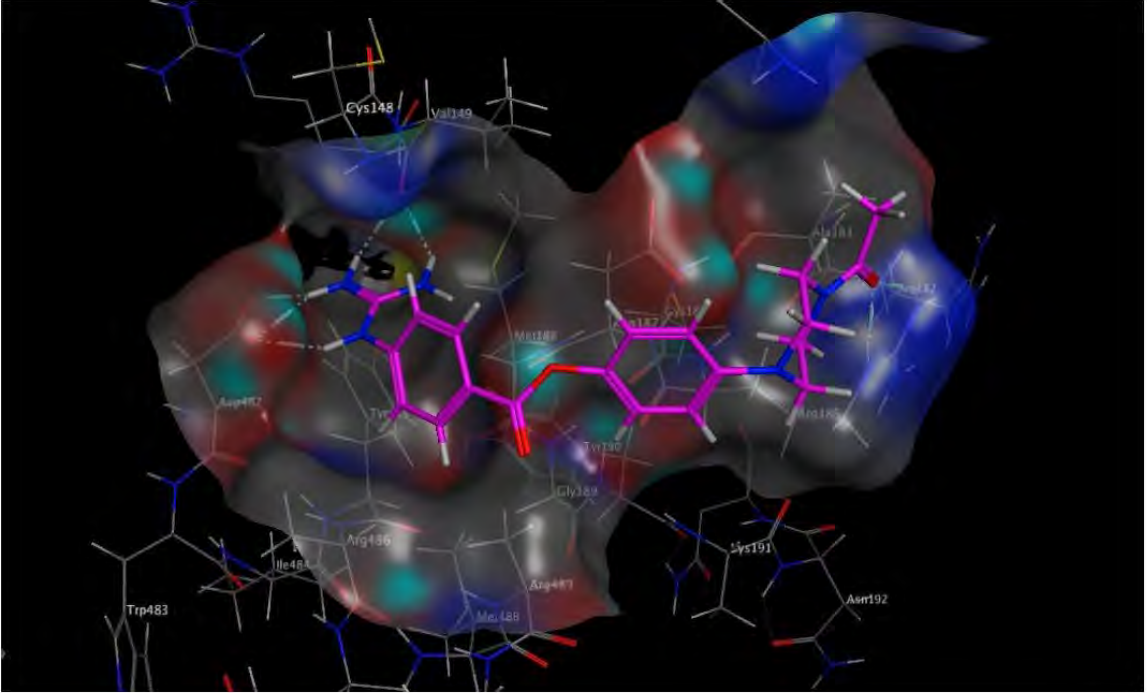
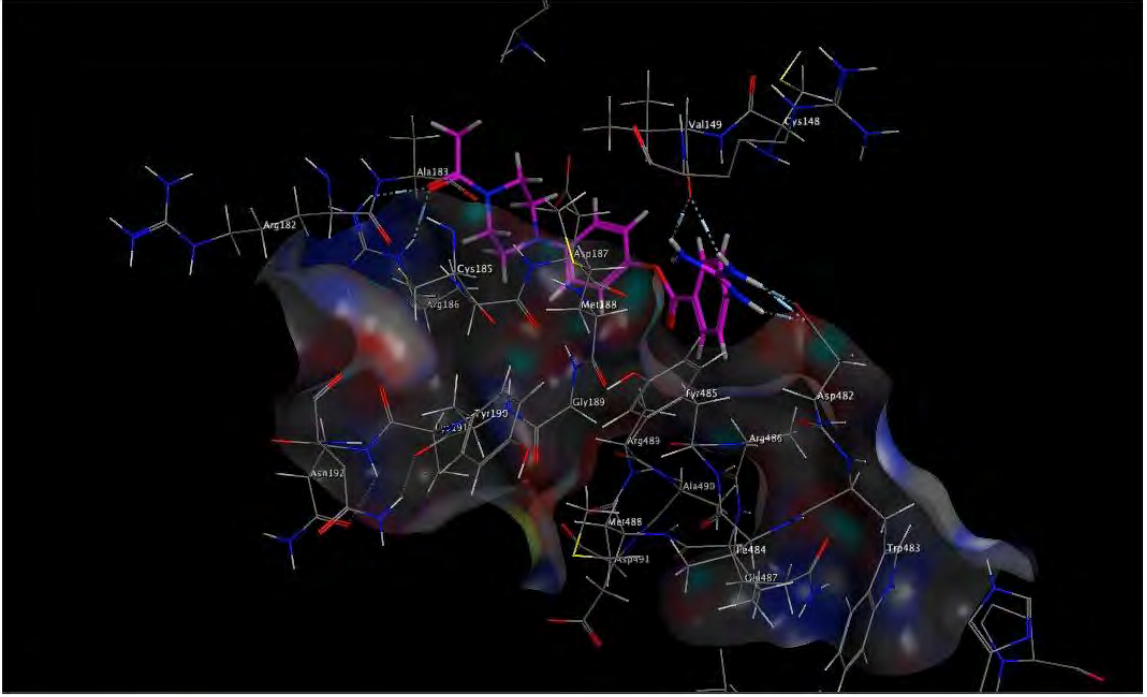
3.2.4.2 5 nolu bileşik için moleküler yerleştirme çalışması

Tasarlanan 1 ve 5 nolu bileşik üzerinde “Moleküler yerleştirme” çalışması yapılmıştır. Yerleştirme işleminde protein data banktan temin edilen pdb:7meq olan kristal yapı kullanılmış, yazılımın öğretici kılavuzunda belirtildiği şekilde yerleştirme işlemi gerçekleştirilmiştir.

(https://www.chemcomp.com/moe/help/latest/index_tut.html).



Şekil 47. Tasarlanan 5 nolu bileşiğin “Moleküler yerleştirmesi” (pdb:7meq)



Şekil 48. Tasarlanan 5 nolu bileşiğin “Moleküler yerleştirmesi” (pdb:7meq)

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Proje konusunu teşkil eden; TMPRSS2 proteinleri, içinde bulunduğumuz SARS-CoV-2 pandemi sürecinde ilgi odağı haline gelen önemli hedeflerden biridir. İnhibitör olarak tasarlanan küçük moleküllü bileşikler (ligandlar), referans bileşiklere kimyasal eşdeğerlikleri nedeniyle potansiyel biyoaktiftir. Protein Data Bank ve diğer literatür bilgileri ışığında, TMPRSS2 inhibitörlerinin moleküler modelleme ve moleküler yerleştirmesi üzerine fazla araştırma yapılmamıştır. Bu enzim üzerine maksimum etkinliğe ve minimum advers etkilere sahip olabilecek yeni moleküllerin tasarımı, yüzlerce yılda bir görülebilecek ancak şu anda büyük kayıplar vererek şahit olduğumuz çağımızın salgınına çare olabilecek potansiyel ilaçları insanlığın hizmetine sunma olasılığı gibi yaygın bir etkisi bulunmaktadır.

Tasarlanan bileşiklerin sentez aşamasına geçmeden önce, bilgisayar modeller üzerinde ön araştırma yapılmıştır. Literatüre kayıtlı modeller incelenerek, aktif bileşiklerin kimyasal yapıları analiz edilmiştir. Kamostat, Nafamostat ve metabolitleri GBPA, Bromheksin, Aprotinin, Rimantadin gibi etkinliği bilinen referans bileşikler, ilaç benzerlik ve ilaç skor özelliklerinin incelendiği Osiris Programı baz alınarak yüksek bağlanma skoru göstereceği öngörülen yeni TMPRSS2 inhibitörleri tasarlanmıştır. Bu tasarım aşamasında toksik, iritan, mutajenik gibi istenmeyen özelliklere sahip moleküller kapsam dışında bırakılmıştır. Umut vaadeden 5 bileşik seçilmiştir. Tasarlanan bu 5 bileşikte, UK-1 molekülünde gözlenen piperazin halka sisteminin korunmasına dikkat edilmiştir. Piperazin halkasının yanısıra amid ve ester gibi farklı fonksiyonel grupların dahil edilmesiyle yüksek skora sahip bileşiklere tasarım olarak ulaşılabilmektedir. Ardından umut vaadeden bu 5 bileşiğin, kimyasal sentez prosedürleri araştırılmıştır. SciFinder veri tabanı aracılığıyla, tasarlanan bileşiklerin orijinalliği ve sentez yöntemleri araştırılmıştır. Benzer fonksiyonel grupları ve halka sistemlerini taşıyan moleküllerin sentez prosedürleri incelenerek sentetik prosedür şematize edilmiştir. Guanidino benzoik asid türevlerinin, SOCl_2 ile asid klorür haline getirildikten sonra uygun bir fenol türevi (piperazin ve diğer heterosiklik halkalarla süstitüe fenoller) ile esterin elde edilmesi tasarlanmıştır. Ancak siyanamid basamağında guanidin süstitüe moleküllerin stabilitesi uygun koşullar sağlanamadığından ileri basamaklara geçilememiştir (Tüm tasarlanan bileşiklerde A metodu olarak gösterilen yöntemler; Şekil 32-36).

Moleküllerin daha önce literatüre göre sentezlenmemiş olması, sentetik prosedürün yeniden gözden geçirilme ve hedef moleküllerin ulaşılabilir olup olmadığı detaylı sorgulama gerekliliğini ortaya koymaktadır. Tüm tasarlanan bileşiklerin sentezi için B metodu olarak gösterilen yöntemlerin daha uygulanabilir olacağı, ileriki çalışmalar için tarafımızca önerilmektedir (Şekil 32-36)

Sentez çalışmalarının dışında, henüz protein data banka çok yeni depozit edilmiş olan bir ligand-TMPRSS2 kompleksi üzerinde (ligand:nafamostat; pdb:7meq), tasarlanan bileşiklerin ligand etkileşimleri ve moleküler modelleme çalışmaları yapılmasına olanak sağlanmıştır. TMPRSS2 ve nafamostat arasındaki etkileşim incelenerek, tasarlanan 5 bileşikten en yüksek “ilaç benzerlik” ve “ilaç skoru” değerine sahip 5 nolu bileşik üzerine odaklanılmış, MOE programı kullanılarak ligand etkileşim haritası, esnek hizalama, farmakofor modelleme ve moleküler yerleştirme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Tasarlanan bileşikler TMPRSS2'ye bağlanmada referans bileşiklerle benzer etkileşim ve skoru göstermekle birlikte, sentezlerinin daha başarılı ve yüksek verimle elde edilebilecek yeni inhibitörlerin tasarlanmasına ihtiyaç bulunmaktadır. Piperazin halkası ve guanidin sübstitüenti içeren moleküller haricinde, literatüre yeni kaydolun modelleme sonucu işaret edilen yeni hedef moleküller göze çarpmaktadır.

KAYNAKÇA

- Abbasi AZ, Kiyani DA, Hamid SM, Saalim M, Fahim A, Jalal N. (2021). Spiking dependence of SARS-CoV-2 pathogenicity on TMPRSS2. *J Med Virol.*, 93(7), 4205-4218. doi: 10.1002/jmv.26911.
- Afar DE, Vivanco I, Hubert RS, Kuo J, Chen E, Saffran DC, Raitano AB, Jakobovits A. (2001). Catalytic Cleavage of the Androgen-regulated TMPRSS2 Protease Results in its Secretion by Prostate and Prostate Cancer Epithelia. *Cancer Res.*, 61(4),1686-92.
- Afshari A, Janfeshan S, Yaghobi R, Roozbeh J, Azarpira N. (2021). Covid-19 pathogenesis in prostatic cancer and TMPRSS2-ERG regulatory genetic pathway. *Infect Genet Evol.* 88, 104669. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104669.
- Alzain AA, Elbadwi FA, Alsamani FO. (2022). Discovery of novel TMPRSS2 inhibitors for COVID-19 using *in silico* fragment-based drug design, molecular docking, molecular dynamics, and quantum mechanics studies. *Inform Med Unlocked.* 29:100870. doi: 10.1016/j.imu.2022.100870.
- Assiri SA, Althaqafi RMM, Alswat K, Alghamdi AA, Alomairi NE, Nemenqani DM, Ibrahim ZS, Elkady A. (2022). Post COVID-19 vaccination associated neurological complications. *Neuropsychiatric Dis. Treat.* 18, 137–154.
- Azimi A. (2020). TMPRSS2 Inhibitors, Bromhexine, Aprotinin, Camostat and Nafamostat as Potential Treatments for COVID-19. *Frenxiv.* DOI: 10.31226/osf.io/a3rvm
- Baby K, Maity S, Mehta CH, Suresh A, Nayak UY, Nayak Y (2021). SARS-CoV-2 entry inhibitors by dual targeting TMPRSS2 and ACE2: An *in silico* drug repurposing study. *Eur. J. Pharm.* 173922
- Bestle D, Heindl MR, Limburg H, Van Lam van T, Pilgram O, Moulton H, Stein DA, Harges K, Eickmann M, Dolnik O, Rohde C, Klenk H-D, Garten W, Steinmetzer T, Böttcher-Friebertshäuser E. (2020). TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation and spread of SARS-CoV-2 in human airway epithelial cells and provide promising drug targets. *BioRxiv*, 1-33.
- Böttcher E, Matrosovich T, Beyerle M, Klenk HD, Garten W, Matrosovich M. (2006). Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *J Virol* 80, 9896–9898.
- Böttcher E, Freuer C, Steinmetzer T, Klenk HD, Garten W. (2009). MDCK cells that express proteases TMPRSS2 and HAT provide a cell system to propagate influenza viruses in the absence of trypsin and to study cleavage of HA and its inhibition. *Vaccine*, 27(45):6324-6329. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.03.029.)
- Breining P, Frølund AL, Højen JF, Gunst JD, Staerke NB, Saedder E, Cases-Thomas M, Little P, Nielsen LP, Søgaard OS, Kjolby M. (2021). Camostat mesylate against SARS-CoV-2 and Covid-19-rationale, dosing and safety. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 128 (2), 204–212.
- Cantuti-Castelvetri L, Ojha R, Pedro LD, Djannatian M, Franz J, Kuivanen S, Meer F, Kallio K, Kaya T, Anastasina M, Smura T, Levanov L, Szivoczka L, Tobi A,

- Kallio-Kokko H, Österlund P, Joensuu M, Meunier FA, Butcher SJ, Winkler MS, Mollenhauer B, Helenius A, Gokce O, Teesalu T, Hepojoki J, Vapalahti O, Stadelmann C, Balistreri G, Simons M. (2020). Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science* 370, 856–860.
- Chakrabarti SS, Tiwari A, Jaiswal S, Kaur U, Kumar I, Mittal A, Singh A, Chakrabarti S. (2022). Rapidly progressive dementia with asymmetric rigidity following ChAdOx1 nCoV-19 vaccination. *Aging Dis.* 13(3), 633–636. <https://doi.org/10.14336/ad.2021.1102>.
- Chikhale RV, Gupta VK, Eldesoky GE, Wabaidur SM, Patil SA, Islam MA. (2020). Identification of potential anti-TMPRSS2 natural products through homology modelling, virtual screening and molecular dynamics simulation studies, *J. Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(17), 6660-6675. [10.1080/07391102.2020.1798813](https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1798813).
- Daly JL, Simonetti B, Klein K, Chen K-E, Williamson MK, Antón-Plágaro C, Shoemark DK, Simón-Gracia L, Bauer M, Hollandi R, Greber UF, Horvath P, Sessions RB, Helenius A, Hiscox JA, Teesalu T, Matthews DA, Davidson AD, Collins BM, Cullen PJ, Yamauchi Y. (2020). Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science* 370, 861–865.
- Donaldson SH, Hirsh A, Li DC, Holloway G, Chao J, Boucher RC, Gabriel SE. (2002). Regulation of the epithelial sodium channel by serine proteases in human airways. *J Biol Chem.*, 277(10), 8338–45.
- Durdağı S. (2020). Virtual drug repurposing study against SARS-CoV-2 TMPRSS2 target, *Turkish J. Biology*, (44), 185-191.
- Escalante DE, Ferguson DM. (2021). Structural modeling and analysis of the SARS-CoV-2 cell entry inhibitor camostat bound to the trypsin-like protease TMPRSS2. *Med Chem Res.*, 30(2), 399-409. doi: 10.1007/s00044-021-02708-7.
- Faheem, Kumar BK, Sekhar KVGC, Kunjiappan S, Jamalis J, Balana-Fource R, Tekwani BL, Sankaranarayanan M. (2020). Druggable targets of SARS-CoV-2 and treatment opportunities for COVID-19. *Bioorg. Chem.*, 104, 104269.
- Fraser BJ, Beldar S, Seitova A, Hutchinson A, Mannar D, Li Y, Kwon D, Tan R, Wilson RP, Leopold K, Subramaniam S, Halabelian L, Arrowsmith CH and Bénard F (2022). Structure and activity of human TMPRSS2 protease implicated in SARS-CoV-2 activation. *Nature Chemical Biology*, 18, 963-971.
- Gierer S, Bertram S, Kaup F, Wrensch F, Heurich A, Kraemer-Kuehl A, Welsch K, Winkler M, Meyer B, Drosten C, Dittmer U, Hahn T, Simmons G, Hofmann H, Pöhlmann S. (2013). The spike protein of the emerging betacoronavirus EMC uses a novel coronavirus receptor for entry, can be activated by TMPRSS2, and is targeted by neutralizing antibodies. *J. Virol.*, 87(10), 5502-5511.
- Glowacka I, Bertram S, Muller MA, Allen P, Soilleux E, Pfefferle S, Steffen I, Tsegaye TS, He Y, Gnirss K, Niemeyer D, Schneider H, Drosten C, Pöhlmann S. (2011). Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the

- humoral immune response. *J. Virol.*, 85(9), 4122–4134. <https://doi.org/10.1128/JVI.02232-10>.
- Gunst JD, Staerke NB, Pahus MH, Kristensen LH, Bodilsen J, Lohse N, Dalgaard LS, Brønnum D, Frøbert O, Hønge B, Johansen IS, Monrad I, Erikstrup C, Rosendal R, Vilstrup E, Mariager T, Bove DG, Offersen R, Shakar S, Cajander S, Jørgensen NP, Sritharan SS, Breining P, Jespersen S, Mortensen KL, Jensen ML, Kolte L, Frattari GS, Larsen CS, Storgaard M, Nielsen LP, Tolstrup M, Sædder EA, Østergaard LJ, Ngo HTT, Jensen MH, Højen JF, Kjolby M, Søgaard OS. (2021). Efficacy of the TMPRSS2 inhibitor camostat mesilate in patients hospitalized with Covid-19-a double-blind randomized controlled trial. *EClinicalMedicine*. 35,100849. doi: 10.1016/j.eclinm.2021.100849.
- Hashimoto R, Sakamoto A, Deguchi S, Yi R, Sano E, Hotta A, Takahashi K, Yamanaka S, Takayama K. (2021). Dual inhibition of TMPRSS2 and Cathepsin B prevents SARS-CoV-2 infection in iPS cells. *Mol Ther Nucleic Acids*. 26, 1107-1114. doi: 10.1016/j.omtn.2021.10.016.
- Hatesuer B, Bertram S, Mehnert N, Bahgat MM, Nelson PS, Pöhlman S, Schughart K. (2013). TMPRSS2 is essential for influenza H1N1 virus pathogenesis in mice. *PLoS Pathol.*, 9, e1003774. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003774>.
- Hedstrom L. (2002). Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev.*,102, 4501–24. <https://doi.org/10.1021/cr000033x>
- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu N-H, Nitsche A, Müller MA, Drosten C, Pöhlmann S. (2020) SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell.*, 181(2), 271-280.e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
- Hoffmann M., Hofmann-Winkler H., Smith J.C., Krüger N, Sørensen LK, Søgaard OS, Hasselstrøm JB, Winkler M, Hempel T, Raich L, Olsson S, Yamazoe T, Yamatsuta K, Mizuno H, Ludwig S, Noé F, Sheltzer JM, Kjolby M, Pöhlmann S. (2020b) Camostat mesylate inhibits SARS-CoV-2 activation by TMPRSS2-related proteases and its metabolite GBPA exerts antiviral activity. *BioRxiv*. Preprint. 2020 Aug 5. DOI: 10.1101/2020.08.05.237651
- Hu X, Shrimp JH, Guo H, Zakharov A, Jain S, Shinn P, Simeonov A, Hall MD, Shen M. (2020). Non-covalent TMPRSS2 inhibitors identified from virtual screening. *BioRxiv* DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.12.28.424413>
- Huggins DJ (2020). Structural analysis of experimental drugs binding to the SARS-CoV-2 target TMPRSS2. *J Mol Graph Model*. 100, 107710. doi: 10.1016/j.jmgm.2020.107710
- Idris MO, Yekeen AA, Alakanse OS, Durojaye OA. (2020). Computer-aided screening for potential TMPRSS2 inhibitors: A combination of pharmacophore modeling, molecular docking and molecular dynamics simulation approaches, *J. Biomolecular Structure and Dynamics*. 10.1080/07391102.2020.1792346
- Iwata-Yoshikawa N, Okamura T, Shimizu Y, Hasegawa H, Takeda M, Nagataa N. (2019). TMPRSS2 Contributes to Virus Spread and Immunopathology in the

- Airways of Murine Models after Coronavirus Infection. *J Virol*, 93(6), e01815-18. DOI: 10.1128/JVI.01815-18
- Jalagam PR, Nara SJ, Panda M, Natesan M, Devasthale P. (2021). Preparation of triazolyl glycosides as inhibitors of galectin-3. World Intellectual Property Organization, WO2021231243 A1 2021-11-18
- Kim TS, Heinlein C, Hackman RC, and Nelson PS (2006). Phenotypic analysis of mice lacking the *Tmprss2*-encoded protease. *Mol. Cell. Biol.* 26, 965–975.
- Ko CJ, Hsu TW, Wu SR, Lan SW, Hsiao TF, Lin HY, Lin HH, Tu HF, Lee CF, Huang CC, Chen MM, Hsiao PW, Huang HP, Lee MS. (2020). Inhibition of TMPRSS2 by HAI-2 reduces prostate cancer cell invasion and metastasis. *Oncogene*, 39(37), 5950-5963. doi: 10.1038/s41388-020-01413-w.
- Lam DK, Dang D, Flynn AN, Hardt M, Schmidt BL. (2015) TMPRSS2, a novel membrane-anchored mediator in cancer pain. *Pain* 156(5):923-930. doi: 10.1097/j.pain.000000000000130.
- Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TC, Choe H, Farzan M. (2003). Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426, 450–454.
- Li F, Han M, Dai P, Xu W, He J, Tao X, Wu Y, Tong X, Xia X, Guo W, Zhou Y, Li Y, Zhu Y, Zhang X, Liu Z, Aji R, Cai X, Li Y, Qu D, Chen Y, Jiang S, Wang Q, Ji H, Xie Y, Sun Y, Lu L, Gao D. (2021). Distinct mechanisms for TMPRSS2 expression explain organ-specific inhibition of SARS-CoV-2 infection by enzalutamide. *Nat. Commun.* 12(1), 866.
- Luan B, Huynh T, Cheng X, Lan G, Wang H-R (2020). Targeting proteases for treating COVID-19. *J. Proteome Res.* 19, 4316–4326.
- Matsuyama S, Nagata N, Shirato K, Kawase M, Takeda M, Taguchi F. (2010). Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2. *J. Virology*, 84(24), 12658-12664.
- Montopoli M, Zumerle S, Vettor R, Rugge M, Zorzi M, Catapano CV, Carbone GM, Cavalli A, Pagano F, Ragazzi E, Prayer-Galetti T, Alimonti A. (2020). Androgen-deprivation therapies for prostate cancer and risk of infection by SARS-CoV-2: a population-based study (N=4532). *Ann Oncol.*, 31(8), 1040-1045. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.04.479>.
- Oluwaseun AS, Yinka JI, Ambrose GO, Olamide AT, Adenike SF, Nkechinyere OJ, Mukhtar I, Abiodun YA, Durojaye OA. (2022). Identification of lead inhibitors of TMPRSS2 isoform 1 of SARS-CoV-2 target using neural network, random forest, and molecular docking. *Data Science for COVID-19.* 547–75. doi: 10.1016/B978-0-323-90769-9.00021-9.
- Oster ME, Shay DK, Su JR, Gee J, Creech CB, Broder KR, Edwards K, Soslow JH, Dendy JM, Schlaudecker E, Lang SM, Barnett ED, Ruberg FL, Smith MJ, Campbell MJ, Lopes RD, Sperling LS, Baumblatt JA, Thompson DL, Marquez PL, Strid P, Woo J, Pugsley R, Reagan-Steiner S, DeStefano F, Shimabukuro TT,

- (2022). Myocarditis cases reported after mRNA-based COVID-19 vaccination in the US from December 2020 to August 2021. *JAMA* 327 (4), 331–340.
- Ovcharenko AV, Zhirnov OP. (1994). Aprotinin aerosol treatment of influenza and paramyxovirus bronchopneumonia of mice. *Antiviral Res*, 23, 107–118.
- Padmanabhan P, Desikan R, Dixit NM, Davenport MP. (2020). Targeting TMPRSS2 and Cathepsin B/L together may be synergistic against SARS-CoV-2 infection. *PLoS Comput. Biol.* 16 (12), e1008461. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008461>
- Pászti-Gere E, Szentkirályi A, Fedor Z, Nagy G, Szimrök Z, Pászti Z, Pászti A, Pilgram O, Steinmetzer T, Bodnárová S, Fliszár-Nyúl E, Poór M. (2022). In vitro interaction of potential antiviral TMPRSS2 inhibitors with human serum albumin and cytochrome P 450 isoenzymes. *Biomed Pharmacother.*, 1(46), 112513. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112513.
- Pooja M, Reddy GJ, Hema K, Dodoala S, Koganti B. (2021). Unravelling high-affinity binding compounds towards transmembrane protease serine 2 enzyme in treating SARS-CoV-2 infection using molecular modelling and docking studies. *Eur. J. Pharm.* 890(5), 173688.
- Qiao Y, Wang X-M, Mannan R, Pitchiaya S, Zhang Y, Wotring JW, Xiao L, Robinson DR, Wu Y-M, Tien JC-Y, Cao X, Simko SA, Apel IJ, Bawa P, Kregel S, Narayanan SP, Raskind G, Ellison SJ, Parolia A, Zelenka-Wang S, McMurry L, Su F, Wang R, Cheng Y, Delekta AD, Mei Z, Pretto CD, Wang S, Mehra R, Sexton JZ, Chinnaiyan AM (2021). Targeting transcriptional regulation of SARS-CoV-2 entry factors ACE2 and TMPRSS2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 118(1), e2021450118. doi: 10.1073/pnas.2021450118. Epub 2020 Dec 28.
- Qin H-L, Shang Z-P, Jantan I, Unsal Tan O, Hussain MA, Sher M, Bukhari SNA. (2015). Molecular docking studies and biological evaluation of chalcone based pyrazolines as tyrosinase inhibitors and potential anticancer agents, *RSC Adv.* 5, 46330-46338.
- Reig Ò, Marín-Aguilera M, Carrera G, Jiménez N, Paré L, García-Recio S, Gaba L, Pereira MV, Fernández P, Prat A, Mellado B. (2016). TMPRSS2-ERG in Blood and Docetaxel Resistance in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur Urol.* 70(5), 709-713. doi: 10.1016/j.eururo.2016.02.034. Erratum in: *Eur Urol.* 2017 Aug;72(2), e49.
- Schuler BA, Habermann AC, Plosa EJ, Taylor CJ, Jetter C, Negretti NM, Kapp ME, Benjamin JT, Gulleman P, Nichols DS, Braunstein LZ, Hackett A, Koval M, Guttentag SH, Blackwell TS, Webber SA, Banovich NE; Vanderbilt COVID-19 Consortium Cohort; Human Cell Atlas Biological Network; Kropski JA, Sucre J. (2021). Age-determined expression of priming protease TMPRSS2 and localization of SARS-CoV-2 in lung epithelium. *J Clin Invest*, 131(1), e140766. doi: 10.1172/JCI140766.
- Shang J, Wan Y, Luo C, Ye G, Geng Q, Auerbach A, Li F. (2020). Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117(21), 11727–11734.
- Sharma T, Baig MH, Khan MI, Alotaibi SS, Alorabi M, Dong JJ. (2022). Computational screening of camostat and related compounds against human TMPRSS2: A

- potential treatment of COVID-19. *Saudi Pharm J.* 30(3), 217-224. doi: 10.1016/j.jsps.2022.01.005.
- Shen L-W, Qian MQ, Yu K, Narva S, Yu F, Wu YL, Zhang W. (2020). Inhibition of Influenza A virus propagation by benzoselenoxanthenes stabilizing TMPRSS2 Gene G-quadruplex and hence down-regulating TMPRSS2 expression, *Scientific Reports*, 10:7635, 9.
- Shirogane Y, Takeda M, Iwasaki M, Ishiguro N, Takeuchi H, Nakatsu Y, Tahara M, Kikuta H, Yanagi Y. (2008). Efficient multiplication of human metapneumovirus in Vero cells expressing the transmembrane serine protease TMPRSS2. *J Virol*, 82, 8942–6.
- Shyr ZA, Gorshkov K, Chen CZ, Zheng W, (2020). Drug discovery strategies for SARSCoV- 2. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 375 (1), 127–138.
- Simmons G, Gosalia DN, Rennekamp AJ, Reeves JD, Diamond SL, and Bates P. (2005). Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 11876–11881.
- Singh H, Choudhari R, Nema V, Khan AA. (2021). ACE2 and TMPRSS2 polymorphisms in various diseases with special reference to its impact on COVID-19 disease. *Microb Pathog.* 150, 104621. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104621).
- Srivastava PK, Sharma RD, Saleem M. (1976), A convenient method for the preparation of monosubstituted guanidines, *Current Science* 45(21), 764-5.
- Talukdar R, Saikia N, Singal DK, Tandon R. (2006). Chronic pancreatitis: evolving paradigms. *Pancreatology*, 6(5), 440–9.
- Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, Minasian LM, Ford LG, Lippman SM, Crawford ED, Crowley JJ, Coltman CA Jr. (2004). Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or ¼ 4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med*, 350, 2239-46
- Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun X-W, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R, Lee C, Montie JE, Shah RB, Pienta KJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM. (2005). Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*, 310, 644–8.
- Varughese JK, Kavitha J, Sindhu KS, Francis D, Libin LKJ, Abi TG. (2022). Identification of some dietary flavonoids as potential inhibitors of TMPRSS2 through protein-ligand interaction studies and binding free energy calculations. *Struct Chem.*, 33(5), 1489-1502. doi: 10.1007/s11224-022-01955-7.
- Verdecchia P, Cavallini C, Spanevello A, Angeli F. (2020). The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection. *Eur. J. Intern. Med.* 76, 14–20.
- Weiss J, Bajraktari G, Haefeli WE. (2021). Low risk of the TMPRSS2 inhibitor camostat mesylate and its metabolite GBPA to act as perpetrators of drug-drug interactions. *Chemico-Biological Interactions*, (338), 109428 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109428>
- Wettstein L, Weil T, Conzelmann C, Müller JA, Groß R, Hirschenberger M, Seidel A, Klute S, Zech F, Prelli Bozzo C, Preising N, Fois G, Lochbaum R, Knaff PM,

- Mailänder V, Ständker L, Thal DR, Schumann C, Stenger S, Kleger A, Lochnit G, Mayer B, Ruiz-Blanco YB, Hoffmann M, Sparrer KMJ, Pöhlmann S, Sanchez-Garcia E, Kirchhoff F, Frick M, Münch J. (2021). Alpha-1 antitrypsin inhibits TMPRSS2 protease activity and SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun.*, 12(1), 1726. doi: 10.1038/s41467-021-21972-0.
- Wu C-Y, Lin Y-S, Yang Y-H, Shu L-H, Cheng Y-C, Liu HT. (2020). GB-2 inhibits ACE2 and TMPRSS2 expression: *In vivo* and *in vitro* studies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, (132), 110816 DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110816.
- Yao Y, Ma D, Xu Y, Yuan XL, Liang JJ, Chen SL, Jhanji V, Ng TK. (2022). Hydroxychloroquine treatment on SARS-CoV-2 receptor ACE2, TMPRSS2 and NRP1 expression in human primary pterygium and conjunctival cells. *Exp Eye Res.* 214, 108864. doi: 10.1016/j.exer.2021.108864.
- Xu YM, Inacio MC, Liu MX, Gunatilaka AAL. (2022). Discovery of diminazene as a dual inhibitor of SARS-CoV-2 human host proteases TMPRSS2 and furin using cell-based assays. *Curr Res Chem Biol.*, 2, 100023. doi: 10.1016/j.crchbi.2022.100023.
- Zaman S, Maclsaac AI, Jennings GLR, Schlaich, MP, Inglis SC, Arnold R, Kumar S, Thomas L, Wahi S, Lo S, Naismith C, Duffy SJ, Nicholls SJ, Newcomb A, Almeida AA, Wong S, Lund M, Chew DP, Kritharides L, Chow CK, Bhindi R (2020). Cardiovascular disease and COVID-19: Australian and New Zealand consensus statement. *Med. J. Aust.* 213 (4), 182–187.
- Zhang Y, Sun S, Du C, Hu K, Zhang C, Liu M, Wu Q, Dong N. (2022). Transmembrane serine protease TMPRSS2 implicated in SARS-CoV-2 infection is autoactivated intracellularly and requires N-glycosylation for regulation. *J Biol Chem.* 298(12),102643. doi: 10.1016/j.jbc.2022.102643.
- Zhirnov OP, Ovcharenko AV, Bukrinskaya AG. (1984). Suppression of influenza virus replication in infected mice by protease inhibitors. *J Gen Virol*, 65, 191–6.
- Zhirnov OP, Ovcharenko AV, Bukrinskaya AG. (1985). Myxovirus replication in chicken embryos can be suppressed by aprotinin due to the blockage of viral glycoprotein cleavage. *J Gen Virol*, 66, 1633–8.
- Zhirnov OP, Ikizler MR, Wright PF. (2002). Cleavage of influenza a virus hemagglutinin in human respiratory epithelium is cell associated and sensitive to exogenous antiproteases. *J Virol*, 76, 8682–9.
- Zhou Y, Vedantham P, Lu K, Agudelo J, Carrion R Jr, Nunneley JW, Barnard D, Pöhlmann S, McKerrow JH, Renslo AR, Simmons G. (2015) Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry. *Antivir Res.*, 116:76–84.
- Zhu H, Du W, Song M, Liu Q, Herrmann A, Huang Q. (2021). Spontaneous binding of potential COVID-19 drugs (Camostat and Nafamostat) to human serine protease TMPRSS2. *Comput Struct Biotechnol J.* 28(19), 467-476. doi: 10.1016/j.csbj.2020.12.035.

EK-1. Tez Hazırlama Kontrol Listesi

	Evet	Hayır
Tez, “Tez Yazım Kılavuzu”na uygun olarak yazıldı.	✓	
Dış kapak ve iç kapak sayfası eklerde belirtilen şekilde düzenlendi.	✓	
On sayfalar i, ii, iii şeklinde Romen rakamları ile numaralandırıldı.	✓	
Dizinler, “Tez Yazım Kılavuzu”na göre sıralandı ve metin içindeki yerleşime göre sayfa numaraları verildi.	✓	
Özet ve Abstract hazırlandı.	✓	
Onay sayfası “Tez Yazım Kılavuzu”na uygun olarak hazırlandı ve imzalandı.	✓	
Etik İlke ve Kurallara Uygunluk Beyanname sayfası imzalandı.	✓	
Simgeler, kısaltmalar, tablolar ve şekillerin tamamı kontrol edilerek ilgili dizinde gösterildi.	✓	
Ana metinde harf karakteri, harf büyüklüğü ve satır aralıkları “Tez Yazım Kılavuzu”na uygun olacak şekilde düzenlendi.	✓	
Görsel öğeler, tablolar (çizelgeler), şekiller ve denklemler metin içine “Tez Yazım Kılavuzu”na uygun şekilde yerleştirildi.	✓	
Kaynakça “Tez Yazım Kılavuzu”na göre düzenlendi.	✓	
Kaynakların tamamına tez içerisinde atıfta bulunularak kaynakça bölümünde yer verildi.	✓	
Etik Kurul onayı gerekli ise teze eklendi. (Etik Kurul onayı gerekmiyorsa yandaki “HAYIR” kutucuğunun altına “YOK” yazılacak).		YOK
Anket, görüşme veya veri formları kullanıldıysa ilgili kurumlardan alınan izin yazıları ve formlar teze eklendi. (Bu formlar kullanılmadıysa yandaki “HAYIR” kutucuğunun altına “YOK” yazılacak).		YOK
Ekler “Tez Yazım Kılavuzu”nda belirtildiği şekilde sunuldu. (Ek kullanılmadıysa yandaki “HAYIR” kutucuğunun altına “YOK” yazılacak).		YOK
Güzel Sanatlar Enstitüsüyle ilgili anasanat dallarında sergi, konser, gösterim vb. sunumları hazırlandı.		YOK

“TMPRSS2 - (Transmembran Serin Proteaz 2) İnhibitörleri, Etki Mekanizmaları ve Yeni Türevlerin Tasarlanması” başlıklı Tez, yukarıdaki listede yer alan konularla ilgili olarak tarafımızca kontrol edilmiş ve gerekleri yerine getirilmiştir.

06/02/2023

Selim MUYNAK

Doç. Dr. Asiye MERİÇ