



**YENİ 1,2,3-TRİAZOLKARBAMAT BİLEŞİKLERİNİN SENTEZİ,
KARAKTERİZASYONU VE ANTI-FUNGAL ÖZELLİKLERİNİN İN
SİLİKO ARAŞTIRILMASI**

Ahmet Buğra ORTAAKARSU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2025

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

.

Ahmet Buğra ORTAAKARSU

02/07/2025

YENİ 1,2,3-TRIAZOLKARBAMAT BİLEŞİKLERİNİN SENTEZİ,
KARAKTERİZASYONU VE ANTİ-FUNGAL ÖZELLİKLERİNİN İN SİLİKO
ARAŞTIRILMASI
(Yüksek Lisans Tezi)

Ahmet Buğra ORTAAKARSU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Temmuz 2025

ÖZET

Dünya nüfusunun katlanarak artması, *Fusarium oxysporum* kaynaklı verim kayıpları nedeniyle gıda güvenliğini ciddi biçimde tehlikeye atmaktadır. Bu çalışmada, fenil halkasında klor sübstituentlerinin konumuna göre tasarlanan on dört adet yeni 1,2,3-triazol-karbamat hibriti sentezlenmiştir. Bakır katalizli [3 + 2] siklokatılmayla oluşturulan triazol-alkol bileşiklerinde, alkol grupları izosiyanatlar kullanılarak karbamatlar elde edilmiştir. Bileşikler FT-IR-ATR, ¹H/¹³C-NMR ve HR-APCI-TOF analizleriyle karakterize edilmiştir. Bileşiklerin DFT çalışmaları M06-2X-D3/def2-SVP optimizasyonu ile ωB97X-D/def2-TZVP tek-nokta hesaplamaları, 8,4–8,7 eV'lik HOMO–LUMO aralığı ortaya koymuştur. AlphaFold-3 ve ESMFold tabanlı Fmk1 proteinin modeli ilk kez bilimsel bir çalışmada kullanılarak, QM/MM kenetlenme, 200 ns moleküler dinamik ve MM/GBSA-difüzyon haritası analizleri, hibritlerin aktif bölgede konformasyonel kısıtlamalarla kompleks stabilitesini güçlendirdiğini göstermiştir. *Fusarium oxysporum* üzerinde gerçekleştirilen in vitro deneyler, üç karbon zincirli meta-kloro türevlerinin en yüksek fungusit aktiviteyi (%54,8) sağlayarak Propamokarb-HCl'ye yaklaştığını ortaya koymuştur ve in silico yöntemle uyumludur; para-kloro türevlerindeki tek bir bileşiğin ise Fmk1 üzerindeki potansiyel etki mekanizması in silico yöntemlerle tam olarak aydınlatılamamıştır. Hibritler yararlı fitobakterilere minimal etki gösterirken Fmk1'e seçici, yüksek afinite sunmaktadır. Sonuçlar, çevre dostu ve hedefe yönelik fungusit tasarımında triazol-karbamat türevi bileşiklerin ölçeklenebilir, yenilikçi bir çözüm oluşturduğunu vurgulamaktadır.

Bilim Kodu : 20115
Anahtar Kelimeler : 1,2,3-triazol, karbamat, fungusit, moleküler docking, moleküler dinamik
Sayfa Adedi : 226
Danışman : Prof. Dr. Aliye ALAYLI ALTUNDAŞ

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND IN SILICO INVESTIGATION OF ANTI-FUNGAL PROPERTIES OF NOVEL 1,2,3-TRIAZOLCARBAMATE COMPOUNDS

(M. Sc. Thesis)

Ahmet Buğra ORTAAKARSU

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

July 2025

ABSTRACT

The rapid increase in the world population poses a serious threat to food security due to yield losses caused by *Fusarium oxysporum*. In this study, fourteen new 1,2,3-triazole-carbamate hybrids were synthesised based on the position of chlorine substituents in the phenyl ring. In the triazole-alcohol compounds formed by copper-catalysed [3 + 2] cycloaddition, carbamates were obtained by using isocyanates. The compounds were characterised by FT-IR-ATR, ¹H/¹³C-NMR and HR-APCI-TOF analyses. DFT studies of the compounds, performed using M06-2X-D3/def2-SVP optimisation and ωB97X-D/def2-TZVP single-point calculations, revealed an HOMO–LUMO energy gap of 8.4–8.7 eV. The AlphaFold-3 and ESMFold-based model of the Fmk1 protein was used for the first time in a scientific study, and QM/MM coupling, 200 ns molecular dynamics, and MM/GBSA-diffusion mapping analyses demonstrated that the hybrids enhance complex stability in the active site through conformational constraints. In vitro experiments conducted on *Fusarium oxysporum* revealed that three-carbon chain meta-chloro derivatives provided the highest fungicidal activity (54.8%), approaching Propamokarb-HCl, and are consistent with in silico methods; while the potential mechanism of action of a single compound in para-chloro derivatives on Fmk1 could not be fully elucidated using in silico methods. Hybrids exhibit minimal effect on beneficial phytobacteria while providing selective, high affinity for Fmk1. The results highlight that triazole-carbamate derivative compounds represent a scalable, innovative solution for the design of environmentally friendly and target-specific fungicides.

Science Code : 20115
Key Words : 1,2,3-triazole, carbamate, fungicide, molecular docking, molecular dynamics
Page Number : 226
Supervisor : Prof. Dr. Aliye ALAYLI ALTUNDAŞ

TEŞEKKÜR

Tez çalışması kapsamında öncelikle, sunulan olanaklar ve imkanlar için Türkiye Cumhuriyeti Devleti'ne teşekkürü bir borç bilirim. Şahsi yaşamımın yegâne amacı olan liyakat ve fayda, sadece Türkiye Cumhuriyeti Devletine ve Türk Milletine bilim yolunda adanmıştır. Tez boyunca gösterdiği sabır, paylaştığı bilgi ve tecrübeyle beni ve tüm öğrencilerini yılmadan eğiten, lisans yıllarımdan itibaren eğitimimde daima rol oynayan; bu tez kapsamında, liderlik vasfı ve bilimsel bakış açısıyla daima bana yol gösteren Danışman Hocam Prof. Dr. Aliye ALAYLI ALTUNDAŞ'a en içten şükranlarımı sunarım. Engin bilgisiyle ekibimize Prof. Dr. Aliye ALAYLI ALTUNDAŞ'tan sonra rehberlik eden Dr. Öğr. Üyesi Güler YAĞIZ ERDEMİR Hocama, yalnızca hocam olduğu için değil, beni yakın bir arkadaş olarak görme onurunu bana verdiği için, teşekkür ederim. Desteklerini esirgemeyen ve tez kapsamındaki deneysel çalışmaları gerçekleştiren Prof. Dr. Hatice ÖĞÜTCÜ ve Dr. Öğr. Üyesi Yusuf BAYAR Hocalarıma teşekkür ederim. Tez çalışmam süresince bana her türlü desteği veren annem Gülten ORTAAKARSU'ya, babam Yavuz ORTAAKARSU'ya içtenlikle teşekkür ederim. Bizzat kendisi tarafından yetiştirilme ayrıcalığına sahip olduğum Prof. Dr. Nurcan KARACAN'a minnettarım ve ömrüm boyunca minnettar kalacağım. Moralimi yüksek tutan aile sohbet gruplarıyla her daim destek olan teyzelerim Ayten ERGÜL ve Nurten ULUS'a; kuzenlerim Zeynep Şule ALBAYRAK, Kaan ALBAYRAK, Alperen ULUS ve Merve ULUS'a gönülden teşekkür ederim. Bana her zaman abilik yapan kuzenim Onur ÖZDEMİR'e minnettarım. Desteklerini esirgemeyen sevgili halam Macide ÖZDEMİR, babaannem Sebahat ORTAAKARSU ve dedem Ahmet ORTAAKARSU'ya teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xx
1. GİRİŞ.....	1
2. GEREÇLER VE YÖNTEM	35
2.1. Organik Bileşiklerin Sentezi	35
2.1.1. Reaktifler ve cihazlar.....	35
2.1.2. Sentez yöntemi	35
2.2. Hesaplamalı Yöntem.....	37
2.2.1. Moleküler mekanik.....	37
2.2.2. Kuantum mekaniği	41
2.2.3. Yoğunluk fonksiyonel teorisi (DFT) hesaplamaları	48
2.2.4. Moleküler kenetlenme	49
2.2.5. Moleküler dinamik çalışması.....	55
2.2.6. Moleküler mekanik ile genelleştirilmiş born ve yüzey alanı solvasyonu (MM/GBSA)	56
2.2.7. Manifold temelli istatistiksel detaylar	57
2.2.8. Protein dinamiklerinin boyut indirgeme uygulaması	63
2.3. <i>in vitro</i> Çalışmalar.....	63
2.3.1. <i>Fusarium oxysporum</i> 'a karşı etkinlik	64
2.3.2. Bitki büyümesini teşvik eden bakteriler üzerine etki	65

	Sayfa
3. DENEYSEL	67
3.1. Anilin Türevlerinden Azür Türevi Bileşiklerin Sentezi	67
3.2. Fenil azür Türevlerinden Triazoilalkol Bileşiklerinin Sentezi	68
3.3. Triazol-Alkol Bileşiklerden Karbamat Bileşiklerinin Sentezi	69
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	73
4.1. 1,2,3-Triazolaalkol Bileşiklerinin Yapılarının Doğrulanması	73
4.1.1. 1-Fenil-4-(2-hidroksietil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol bileşiğinin yapı doğrulaması	73
4.1.2. 1-(4-Klorofenil)-4-(2-hidroksietil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol bileşiğinin yapı doğrulaması	75
4.1.3. 1-Fenil-4-(3-hidroksipropil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol bileşiğinin yapı doğrulaması	78
4.1.4. 1-(4-Klorofenil)-4-(2-hidroksietil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol bileşiğinin yapı doğrulaması	80
4.2. Yeni Sentezlenen 1,2,3-Triazol-Karbamat Bileşiklerinin Yapı Aydınlatması ve Karakterizasyonu	83
4.2.1. ab1 (2-(1-fenil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)etil fenilkarbamat) bileşiğinin yapı aydınlatması	83
4.2.2. ab2 (2-(1-(4-klorofenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)etil(4-klorofenil)karbamat) bileşiğinin yapı aydınlatması	86
4.2.3. ab3 (2-(1-(4-klorofenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)etil(3-klorofenil)karbamat) bileşiğinin yapı aydınlatması	89
4.2.4. ab4 (2-(1-(4-klorofenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)etil fenilkarbamat) bileşiğinin yapı aydınlatması.....	92
4.2.5. ab5 (2-(1-(3-klorofenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)etil (4-klorofenil)karbamat) bileşiğinin yapı aydınlatması ve karakterizasyonu	95
4.2.6. ab6 (2-(1-(2-klorofenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)etil (4-klorofenil)karbamat) bileşiğinin yapı aydınlatması	98
4.2.7. ab7 (2-(1-fenil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)etil (4-klorofenil)karbamat) bileşiğinin yapı aydınlatması.....	101
4.2.8. ab8 (3-(1-fenil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)propil fenilkarbamat) bileşiğinin yapı aydınlatması.....	104

Sayfa

4.2.9. ab9 (3-(1-(4-klorofenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)propil (4-klorofenil)karbamat) bileşığının yapı aydınlatması	107
4.2.10. ab10 (3-(1-(4-klorofenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)propil (3-klorofenil)karbamat) bileşığının yapı aydınlatması	110
4.2.11. ab11 (3-(1-(4-klorofenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)propil fenilkarbamat) bileşığının yapı aydınlatması.....	113
4.2.12. ab12 (3-(1-(3-klorofenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)propil (4-klorofenil)karbamat) bileşığının yapı aydınlatması	116
4.2.13. ab13 bileşığının(3-(1-(2-klorofenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)propil (4-klorofenil)karbamat) yapı aydınlatması ve karakterizasyonu	119
4.2.14. ab14 (3-(1-fenil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)propil (4-klorofenil)karbamat) bileşığının yapı aydınlatması.....	122
4.3. Hesaplamalı Yöntemler.....	125
4.3.1. DFT hesaplamaları	125
4.3.2. QM/MM moleküler kenetlenme	137
4.3.3. Moleküler dinamik çalışması.....	172
4.3.4. Protein dinamikleri ve serbest enerji ilişkisi.....	174
4.4. <i>in vitro</i> Deneyler	187
4.4.1. <i>Fusarium oxysporum</i> 'a karşı etkinlik	187
4.4.2. Bitki büyümesini teşvik eden bakteriler (PGPR) üzerine etki.....	189
5. TARTIŞMA	193
6. SONUÇ	201
KAYNAKLAR	205
ÖZGEÇMİŞ	223

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 1.1. <i>Fusarium oxysporum</i> bazı proteinlerin sekans benzerlik oranları.....	27
Çizelge 2.1. Yaygın kuvvet alanlarının özellikleri, kullanım alanları, bilinen avantajları ve sınırlamaları.....	39
Çizelge 2.2. Geliştirilen Difüzyon-Haritası–MM/GBSA algoritmasının iş akışı şeması.....	62
Çizelge 3.1. Sentezlenen azür bileşiklerinin fiziksel özellikleri	67
Çizelge 3.2. Sentezlenen triazol-alkol bileşiklerinin fiziksel özellikleri ve elde edilmiş verimleri	68
Çizelge 3.3. Yan zincir uzunluğu iki karbon olan triazoilkarbamat bileşikleri	69
Çizelge 3.4. Yan zincir uzunluğu üç karbon olan triazoilkarbamat bileşikleri.....	70
Çizelge 4.1. MM/GBSA enerji ortalamaları ve standart sapma değerleri	175
Çizelge 4.2. DMSO ile hazırlanan ab1-14 bileşikleri çözeltilerinin derişime bağlı <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> inhibisyon oranları.....	188
Çizelge 4.3. Sentezlenen ab1-7 serisi bileşiklerinin antimikrobiyal aktivite sonuçları ..	190
Çizelge 4.4. Sentezlenen ab8-14 serisi bileşiklerinin antimikrobiyal aktivite sonuçları	190
Çizelge 5.1. <i>Fusarium oxysporum</i> ’da bulunan Fmk1 proteini ile aynı görevi bitki büyümesini teşvik eden bakterilerde gerçekleştiren proteinlerin sekans benzerliği.....	200

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Bazı önemli bitki fungusitleri	3
Şekil 1.2. Fonksiyonel gruplarla ilişkili bitki fungusit bileşiklerinin ağ gösterimi. Büyük düğümler fonksiyonel grupları, küçük düğümler bileşiklerin isimleridir.	4
Şekil 1.3. 1,2,3-Triazol sınıfının yer seçimli kullanımının avantajları	6
Şekil 1.4. 1,2,3-Triazol yapısı içeren ilaç (üstte) ve ilaç adayı (altta) bileşikler.	7
Şekil 1.5. Bir azür ve bir alkinin 1,3- dipolar siklokatılmasında katalizör türüne göre farklı triazol oluşumu.	8
Şekil 1.6. 1,2,3-Triazollerin bakır katalizli sentez mekanizması	9
Şekil 1.7. Azür ve alkinden, metal katalizli 1,2,3 triazol sentez yöntemlerinden bazıları.....	10
Şekil 1.8. Huo ve diğerleri, yaptıkları <i>N</i> -aril-1,2,3-triazol- β -karbolin fungusit hibritlerinin sentez şeması.....	11
Şekil 1.9. Dai ve diğerleri, 1,2,3-triazol-hidrazon hibriti fungusit bileşiklerinin sentez şeması.....	12
Şekil 1.10. Jiang ve diğerleri, sentezledikleri bileşiklerden patojen organizmalara karşı en iyi aktivite gösteren bileşikler ve 48 saatte toplanan aktivite verileri.	13
Şekil 1.11. Jiang ve diğerleri, 1,2,3-triazol-kinoksalin hibrit yaklaşımının sentez şeması.....	14
Şekil 1.12. Karbamat fonksiyonel grubu içeren çeşitli ilaçlar.	15
Şekil 1.13. Klorprofam bozunma bileşenleri (üstte) ve “çevre dostu” karbamatlı fungusit bileşikler (altta).	16
Şekil 1.14. Wan ve diğerleri, süstitüent olarak halojen, metil ve metoksi bulunan bileşiklerinin sentez şeması.....	17
Şekil 1.15. 1,2,3-Triazolkarbamat bileşiklerinin sentez şeması.....	18
Şekil 1.16. Anahtar-kilit modelinin gösterimi, protein yapıdaki kırmızı ışıkla aydınlatılan alan bağlanma bölgesini gösterir.....	19
Şekil 1.17. <i>Fusarium oxysporum</i> organizmasının bitkiye bulaş sürecinde etkili olan proteinler ve etki mekanizması bitkinin gösterdiği direnç tepkisiyle birlikte gösterilmiştir.	24

Şekil	Sayfa
Şekil 1.18. <i>Fusarium oxysporum</i> 'ın hayat döngüsündeki kritik biyosinyalleşme basamakları	26
Şekil 1.19. AlphaFold 3 yapısı ile belirlenen Fmk1 protein yapısı genel ve aktif bölge görüntüsü.....	29
Şekil 1.20. AlphaFold 3 ile elde edilmiş ve OPLS4 kuvvet alanı ile Mg^{2+} -ATP arasındaki koordinasyon etkileşimleri oluşturularak geometri düzenlemesi yapılmış Fmk1 protein yapısının oktehdral geometrisi.....	30
Şekil 1.21. Fmk1 protein yapısının biyokimyasal işlevi; reaksiyona giren bileşenler ve reaksiyon sonucu oluşanlar	31
Şekil 1.22. <i>Fusarium</i> türlerinde Fmk1 düğümünden alınan sinyal ile biyosentezi yapılan bazı bileşikler.	33
Şekil 2.1. Fenil azür bileşiklerinin sentezi	36
Şekil 2.2. Fenil azür bileşiklerinden triazolalkol türevlerinin sentezi	36
Şekil 2.3. Karbamilasyon için kullanılan sentez yönteminin detayları.....	37
Şekil 2.4. AlphaFold 3 (yeşil şerit protein) ve ESMFold (kırmızı şerit protein) yapıları 0.8081 Å fark ile üst üstedir	52
Şekil 4.1. 1-Fenil-4-(2-hidroksietil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu.....	74
Şekil 4.2. 1-Fenil-4-(2-hidroksietil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu .	74
Şekil 4.3. 1-Fenil-4-(2-hidroksietil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu	75
Şekil 4.4. 1-(4-klorofenil)-4-(2-hidroksietil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu.....	76
Şekil 4.5. 1-(4-Klorofenil)-4-(2-hidroksietil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu.....	77
Şekil 4.6. 1-(4-Klorofenil)-4-(2-hidroksietil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu.....	77
Şekil 4.7. 1-Fenil-4-(3-hidroksipropil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu.....	79
Şekil 4.8. 1-Fenil-4-(3-hidroksipropil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu.....	79
Şekil 4.9. 1-Fenil-4-(3-hidroksipropil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu.....	80

Şekil	Sayfa
Şekil 4.10. 1-(4-Klorofenil)-4-(2-hidroksietil)-1H-1,2,3-triazol bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu.....	81
Şekil 4.11. 4-Klorofenil-1H-1,2,3-triazol-4-il)propanol bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu.....	82
Şekil 4.12. 4-Klorofenil-1H-1,2,3-triazol-4-ilpropanol bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu.....	82
Şekil 4.13. ab1 bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu	84
Şekil 4.14. ab1 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	84
Şekil 4.15. ab1 bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	85
Şekil 4.16. ab1 bileşiğinin HR-APCI-TOF spektrumu.....	85
Şekil 4.17. ab2 bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu	87
Şekil 4.18. ab2 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	87
Şekil 4.19. ab2 bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	88
Şekil 4.20. ab2 bileşiğinin HR-APCI-TOF spektrumu.....	88
Şekil 4.21. ab3 Bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu.....	90
Şekil 4.22. ab3 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	90
Şekil 4.23. ab3 bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	91
Şekil 4.24. ab3 bileşiğinin HR-APCI-TOF spektrumu.....	91
Şekil 4.25. ab4 bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu	93
Şekil 4.26. ab4 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	93
Şekil 4.27. ab4 bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	94
Şekil 4.28. ab4 bileşiğinin HR-APCI-TOF spektrumu.....	94
Şekil 4.29. ab5 bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu	96
Şekil 4.30. ab5 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	96
Şekil 4.31. ab5 bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	97
Şekil 4.32. ab5 bileşiğinin HR-APCI-TOF spektrumu.....	97
Şekil 4.33. ab6 bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu	99

Şekil	Sayfa
Şekil 4.34. ab6 bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu	99
Şekil 4.35. ab6 bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu	100
Şekil 4.36. ab6 bileşiğinin HR-APCI-TOF spektrumu	100
Şekil 4.37. ab7 bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu	102
Şekil 4.38. ab7 bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu	102
Şekil 4.39. ab7 bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu	103
Şekil 4.40. ab7 bileşiğinin HR-APCI-TOF spektrumu	103
Şekil 4.41. ab8 bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu	105
Şekil 4.42. ab8 bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu	105
Şekil 4.43. ab8 bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu	106
Şekil 4.44. ab8 bileşiğinin HR-APCI-TOF spektrumu	106
Şekil 4.45. ab9 bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu	108
Şekil 4.46. ab9 bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu	108
Şekil 4.47. ab9 bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu	109
Şekil 4.48. ab9 bileşiğinin HR-APCI-TOF spektrumu	109
Şekil 4.49. ab10 bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu	111
Şekil 4.50. ab10 bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu	111
Şekil 4.51. ab10 bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu	112
Şekil 4.52. ab10 bileşiğinin HR-APCI-TOF spektrumu	112
Şekil 4.53. ab11 bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu	114
Şekil 4.54. ab11 bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu	114
Şekil 4.55. ab11 bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu	115
Şekil 4.56. ab11 bileşiğinin HR-APCI-TOF spektrumu	115
Şekil 4.57. ab12 bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu	117
Şekil 4.58. ab12 bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu	117
Şekil 4.59. ab12 bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu	118

Şekil	Sayfa
Şekil 4.60. ab12 bileşiğinin HR-APCI-TOF spektrumu.....	118
Şekil 4.61. ab13 bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu	120
Şekil 4.62. ab13 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	120
Şekil 4.63. ab13 bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	121
Şekil 4.64. ab13 bileşiğinin HR-APCI-TOF spektrumu.....	121
Şekil 4.65. ab14 bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu	123
Şekil 4.66. ab14 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	123
Şekil 4.67. ab14 bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	124
Şekil 4.68. ab14 bileşiğinin HR-APCI-TOF spektrumu.....	124
Şekil 4.69. ab1-7 bileşiklerinin DFT çalışmasında elde edilen en düşük enerjili konformasyonları ve HOMO-LUMO orbitalleri enerji seviyeleri ile birlikte gösterilmiştir.....	126
Şekil 4.70. ab8-14 bileşiklerinin DFT çalışmasında elde edilen en düşük enerjili konformasyonları ve HOMO-LUMO orbitalleri enerji seviyeleri ile birlikte gösterilmiştir.....	127
Şekil 4.71. ab1-14 Serisinin HOMO ve LUMO arasındaki enerji farklarının ($\Delta E_{\text{boşluk}}$) karşılaştırılması	129
Şekil 4.72. ab1-14 bileşiklerinin HOMO–LUMO saçılım grafiği ve ΔE ilişkisi	130
Şekil 4.73. ab1-14 serisinin HOMO/LUMO seviye diyagramı	131
Şekil 4.74. ab1-14 Bileşiklerinin elektron yoğunluğu dağılımı gösterimi.....	132
Şekil 4.75. ab1-14 Bileşiklerinin elektrostatik potansiyellerinin (ESP) gösterimi	133
Şekil 4.76. Elektrostatik denge değerlerinin bileşiklere göre dağılımı.....	135
Şekil 4.77. Elektrostatik potansiyelin en yüksek ve en düşük değerleri denge değeri ile birlikte saçılım grafiği.....	136
Şekil 4.78. ab1-14 Bileşiklerinin pozitif ve negatif ortalama elektrostatik potansiyel değerinin karşılaştırılması	137
Şekil 4.79. ab1 Bileşiğinin Fmk1 proteinine moleküler kenetlenme çalışmasında değişen elektron konfigürasyonu	139
Şekil 4.80. ab1 Bileşiğinin Fmk1 proteini aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü	140

Şekil	Sayfa
Şekil 4.81. Aynı konformasyonlarda ab1 bileşiğinin QSite (sağda) ve tek nokta enerji hesabı (solda) ile belirlenen elektrostatik potansiyel haritası.	140
Şekil 4.82. ab2 Bileşiğinin Fmk1 proteinine moleküler kenetlenme çalışmasında değişen elektron konfigürasyonu	141
Şekil 4.83. ab2 bileşiğinin Fmk1 proteini aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü.....	142
Şekil 4.84. Aynı konformasyonlarda ab2 bileşiğinin QSite(sağda) ve tek nokta enerji hesabı(solda) ile belirlenen elektrostatik potansiyel haritası.	142
Şekil 4.85. ab3 bileşiğinin Fmk1 proteinine moleküler kenetlenme çalışmasında değişen elektron konfigürasyonu.	143
Şekil 4.86. ab3 bileşiğinin Fmk1 proteini aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü.....	144
Şekil 4.87. Aynı konformasyonlarda ab3 bileşiğinin QSite(sağda) ve tek nokta enerji hesabı(solda) ile belirlenen elektrostatik potansiyel haritası.	144
Şekil 4.88. ab4 bileşiğinin Fmk1 proteinine moleküler kenetlenme çalışmasında değişen elektron konfigürasyonu.	145
Şekil 4.89. ab4 bileşiğinin Fmk1 proteini aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü.....	146
Şekil 4.90. Aynı konformasyonlarda ab4 bileşiğinin QSite(sağda) ve tek nokta enerji hesabı(solda) ile belirlenen elektrostatik potansiyel haritası.	146
Şekil 4.91. ab5 bileşiğinin Fmk1 proteinine moleküler kenetlenme çalışmasında değişen elektron konfigürasyonu.	147
Şekil 4.92. ab5 bileşiğinin Fmk1 proteini aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü.....	148
Şekil 4.93. Aynı konformasyonlarda ab5 bileşiğinin QSite(sağda) ve tek nokta enerji hesabı(solda) ile belirlenen elektrostatik potansiyel haritası.	149
Şekil 4.94. ab6 bileşiğinin Fmk1 proteinine moleküler kenetlenme çalışmasında değişen elektron konfigürasyonu.	150
Şekil 4.95. ab6 bileşiğinin Fmk1 proteini aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü.....	151
Şekil 4.96. Aynı konformasyonlarda ab6 bileşiğinin QSite(sağda) ve tek nokta enerji hesabı(solda) ile belirlenen elektrostatik potansiyel haritası.	152
Şekil 4.97. ab7 bileşiğinin Fmk1 proteinine moleküler kenetlenme çalışmasında değişen elektron konfigürasyonu.	153
Şekil 4.98. ab7 bileşiğinin Fmk1 proteini aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü.....	154
Şekil 4.99. Aynı konformasyonlarda ab7 bileşiğinin QSite(sağda) ve tek nokta enerji hesabı(solda) ile belirlenen elektrostatik potansiyel haritası.	154

Şekil	Sayfa
Şekil 4.100. ab8 bileşiğinin Fmk1 proteinine moleküler kenetlenme çalışmasında değişen elektron konfigürasyonu.	155
Şekil 4.101. ab8 bileşiğinin Fmk1 proteini aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü....	156
Şekil 4.102. Aynı konformasyonlarda ab8 bileşiğinin QSite(sağda) ve tek nokta enerji hesabı(solda) ile belirlenen elektrostatik potansiyel haritası.	156
Şekil 4.103. ab9 bileşiğinin Fmk1 proteinine moleküler kenetlenme çalışmasında değişen elektron konfigürasyonu	157
Şekil 4.104. ab9 bileşiğinin Fmk1 proteini aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü....	158
Şekil 4.105. Aynı konformasyonlarda ab9 bileşiğinin QSite(sağda) ve tek nokta enerji hesabı(solda) ile belirlenen elektrostatik potansiyel haritası	159
Şekil 4.106. ab10 bileşiğinin Fmk1 proteinine moleküler kenetlenme çalışmasında değişen elektron konfigürasyonu	159
Şekil 4.107. ab10 bileşiğinin Fmk1 proteini aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü..	160
Şekil 4.108. Aynı konformasyonlarda ab10 bileşiğinin QSite(sağda) ve tek nokta enerji hesabı(solda) ile belirlenen elektrostatik potansiyel haritası	161
Şekil 4.109. ab11 bileşiğinin Fmk1 proteinine moleküler kenetlenme çalışmasında değişen elektron konfigürasyonu	162
Şekil 4.110. ab11 bileşiğinin Fmk1 proteini aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü..	163
Şekil 4.111. Aynı konformasyonlarda ab11 bileşiğinin QSite(sağda) ve tek nokta enerji hesabı(solda) ile belirlenen elektrostatik potansiyel haritası	163
Şekil 4.112. ab12 bileşiğinin Fmk1 proteinine moleküler kenetlenme çalışmasında değişen elektron konfigürasyonu	165
Şekil 4.113. ab12 bileşiğinin Fmk1 proteini aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü..	166
Şekil 4.114. Aynı konformasyonlarda ab12 bileşiğinin QSite(sağda) ve tek nokta enerji hesabı(solda) ile belirlenen elektrostatik potansiyel haritası	166
Şekil 4.115. ab13 bileşiğinin Fmk1 proteinine moleküler kenetlenme çalışmasında değişen elektron konfigürasyonu	167
Şekil 4.116. ab13 bileşiğinin Fmk1 proteini aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü..	168
Şekil 4.117. Aynı konformasyonlarda ab13 bileşiğinin QSite(sağda) ve tek nokta enerji hesabı(solda) ile belirlenen elektrostatik potansiyel haritası	168
Şekil 4.118. ab14 bileşiğinin Fmk1 proteinine moleküler kenetlenme çalışmasında değişen elektron konfigürasyonu	169

Şekil	Sayfa
Şekil 4.119. ab14 bileşiğinin Fmk1 proteini aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü..	170
Şekil 4.120. Aynı konformasyonlarda ab14 bileşiğinin QSite(sağda) ve tek nokta enerji hesabı(solda) ile belirlenen elektrostatik potansiyel haritası	170
Şekil 4.121. 200 ns simülasyonlarda ab1-14 serisi bileşiklerinin RMSD grafikleri.....	173
Şekil 4.122. 200 ns simülasyonlarda ab1-14 serisi bileşiklerinin RMSF grafikleri	174
Şekil 4.123. MM/GBSA enerji hesaplamasında yan zincir uzunluğuna göre dağılım. ..	175
Şekil 4.124. Fmk1 protein yapının apo form difüzyon haritası boyut indirgemesi.	178
Şekil 4.125. Fmk1 protein yapının ab1 ile oluşturduğu kompleksin difüzyon haritası boyut indirgemesinin MM/GBSA verileri ile bütünleşmiş grafiği.	179
Şekil 4.126. Fmk1 protein yapının ab2 ile oluşturduğu kompleksin difüzyon haritası boyut indirgemesinin MM/GBSA verileri ile bütünleşmiş grafiği.	179
Şekil 4.127. Fmk1 protein yapının ab3 ile oluşturduğu kompleksin difüzyon haritası boyut indirgemesinin MM/GBSA verileri ile bütünleşmiş grafiği.	180
Şekil 4.128. Fmk1 protein yapının ab4 ile oluşturduğu kompleksin difüzyon haritası boyut indirgemesinin MM/GBSA verileri ile bütünleşmiş grafiği.	181
Şekil 4.129. Fmk1 protein yapının ab5 ile oluşturduğu kompleksin difüzyon haritası boyut indirgemesinin MM/GBSA verileri ile bütünleşmiş grafiği.	181
Şekil 4.130. Fmk1 protein yapının ab6 ile oluşturduğu kompleksin difüzyon haritası boyut indirgemesinin MM/GBSA verileri ile bütünleşmiş grafiği.	182
Şekil 4.131. Fmk1 protein yapının ab7 ile oluşturduğu kompleksin difüzyon haritası boyut indirgemesinin MM/GBSA verileri ile bütünleşmiş grafiği.	183
Şekil 4.132. Fmk1 protein yapının ab8 ile oluşturduğu kompleksin difüzyon haritası boyut indirgemesinin MM/GBSA verileri ile bütünleşmiş grafiği.	183
Şekil 4.133. Fmk1 protein yapının ab9 ile oluşturduğu kompleksin difüzyon haritası boyut indirgemesinin MM/GBSA verileri ile bütünleşmiş grafiği.	184
Şekil 4.134. Fmk1 protein yapının ab10 ile oluşturduğu kompleksin difüzyon haritası boyut indirgemesinin MM/GBSA verileri ile bütünleşmiş grafiği.	184
Şekil 4.135. Fmk1 protein yapının ab11 ile oluşturduğu kompleksin difüzyon haritası boyut indirgemesinin MM/GBSA verileri ile bütünleşmiş grafiği.	185
Şekil 4.136. Fmk1 protein yapının ab12 ile oluşturduğu kompleksin difüzyon haritası boyut indirgemesinin MM/GBSA verileri ile bütünleşmiş grafiği.	186
Şekil 4.137. Fmk1 protein yapının ab13 ile oluşturduğu kompleksin difüzyon haritası boyut indirgemesinin MM/GBSA verileri ile bütünleşmiş grafiği.	186

Şekil**Sayfa**

- Şekil 4.138. Fmk1 protein yapının ab14 ile oluşturduğu kompleksin difüzyon haritası boyut indirgemesinin MM/GBSA verileri ile bütünleşmiş grafiği. 187



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

Å	Ångstrom (10 ⁻¹⁰ m)
E	Elektron yükü (1,602 x 10 ⁻¹⁹ C)
ħ	İndirgenmiş Planck sabiti (1,055 x 10 ⁻³⁴ J.s)
kal	Kalori (4,184 J)

Kısaltmalar

Açıklamalar

cc-pVTZ	Correlation Consistent Triple Zeta Basis Set
DFT	Density Functional Theory
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HRMS	Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektroskopisi
IC50	Yarı Maksimum İnhibitor Konsantrasyon
LAV3P	Los Alamos Valence triple-zeta
MD	Moleküler Dinamik
MM	Moleküler Mekanik
PCA	Temel Bileşin Analizi
QM	Kuantum Mekaniği
UMAP	Tekdüzen Manifold Yaklaşımı ve Projeksiyon

1. GİRİŞ

Dünya nüfusu günümüzde 8 milyarlık yüksek bir popülasyona sahiptir ve bu sayının 2050’li yıllara gelindiğinde 9 milyara ulaşması beklenmektedir. Artan nüfus, beraberinde üstel bir şekilde artan sağlıklı gıda ihtiyacını da beraberinde getirmektedir. Bu durum, en çok, nüfus artışının hızlı olduğu ve hem ekonomik hem de endüstriyel anlamda kalkınmanın tarım alanlarındaki üretimlerle ilişkili olduğu gelişmekte olan ülkeler ve sanayisi tarım üretimi ile doğrudan ilişkili gelişmiş ülkeleri ilgilendirmektedir. Gelişmiş ülkelerin bir kısmının gıda ihtiyaçlarını ithalat yoluyla sağladığı da düşünüldüğünde tarım alanlarındaki mahsul üretiminin verimi küresel çapta bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Artan küresel gıda talebinin sağlıklı ve yüksek verimle karşılanması için Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü gıda üretiminin en az %50 dolaylarında artması gerektiğini tahmin etmektedir [1].

Tarım zararlılarından ve patojenlerden kaynaklanan yıllık mahsul kaybının, küresel ölçekte yıllık mahsul üretiminin yaklaşık %35’inin yok olmasına neden olduğu bilinmektedir [2]. Bu kaybın ortadan kaldırılmasıyla Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü hedeflerine mevcut arazi ve mahsullerle büyük oranda ulaşılabileceği düşünülmektedir. Yıllık mahsul kaybının ise %10 ile %35 arasındaki kısmını, özellikle pirinç, buğday, mısır, patates ve soya fasulyesi gibi tarım ürünleri üzerinde olumsuz etkileri sonucunda funguslar tek başlarına oluşturmaktadır [3]. Küresel ısınmanın tüm dünyayı etkilediği 2000’li yılların başında ise fungusların üreme, hayatta kalım ve dolayısıyla zarar verme potansiyelleri artmış ve artmaya da devam etmektedir [4, 5]. Bu nedenle hem mevcut durum hem de öngörülen etkiler değerlendirildiğinde fungus bitki patojenlerine karşı acil önlem alınması gerektiği açıktır.

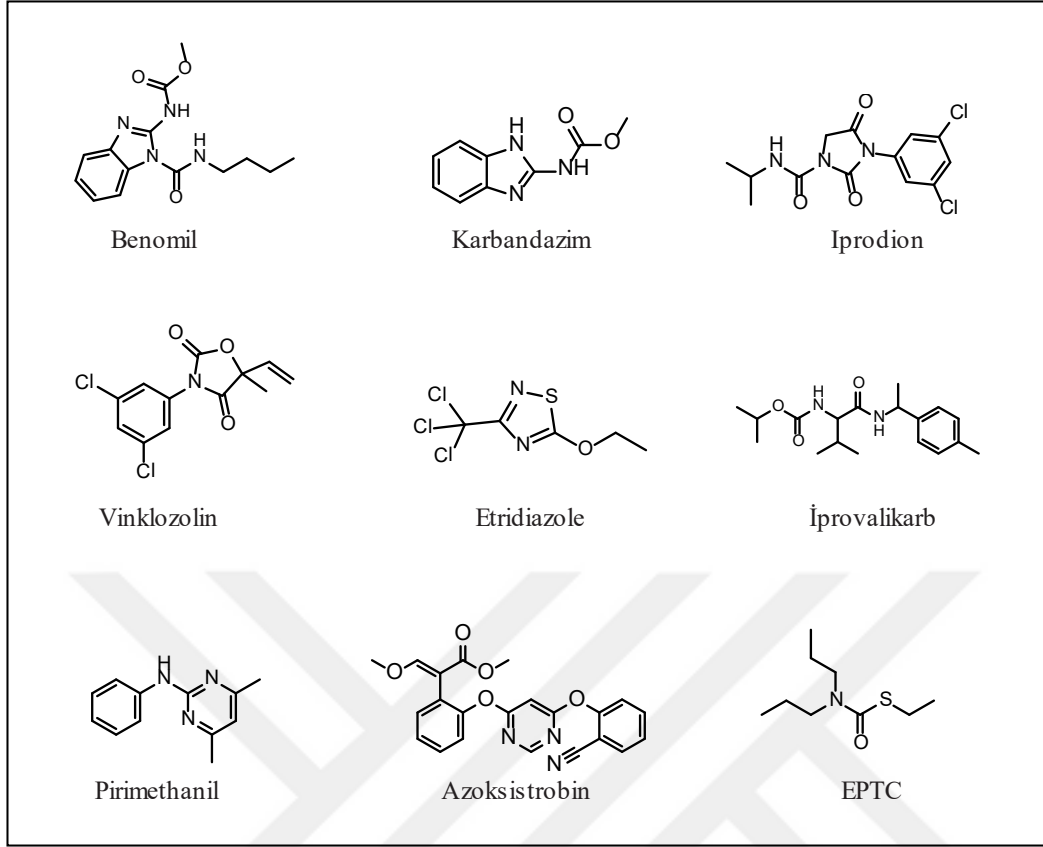
Fungusların hızla artan tehdit edici unsuru, yakın tarihten itibaren insanlığı tarımsal üretim adımları için koruma teknolojileri geliştirmeye yöneltmiştir. Bu teknolojiler fungusit olarak kullanılan sentetik kimyasallar, biyolojik kontrol ajanları [6], RNA bazlı biyopestisitler [7], ve agronanoteknolojileri [8] gibi geniş bir yelpazeye yayılmıştır [9]. Bu teknolojilerden RNA bazlı biyopestisitler RNA interferansı (RNAi) mekanizmasına dayanır ve bitki patojenlerinde hayati genlerin susturulması prensibini kullanır. Bu son derece yüksek maliyetli ve uygulama zorluğu olan yöntem henüz geliştirilme aşamasındadır [10]. Biyolojik kontrol ajanları daha az maliyetli ve çevre dostu çözümler sunsa da hem etki ettiği patojen türlerinin sayısı hem de patojene etkisi bakımından sınırlı kullanım alanı bulmaktadır [11].

Agronanoteknolojiler ise bitkilerde ve çevrede potansiyel toksik etkilere yol açabilmektedir ve maliyetleri oldukça yüksektir [12].

Antifungal ajanlar olarak kullanılan en yaygın, güvenilir etki potansiyeline sahip, uygun maliyetli, doğru kullanımında çevre dostu olan yöntem ise sentetik kimyasallardır. Modern analiz yöntemleri ve toksik etki çalışmaları ile doğa dostu olma potansiyelini etki potansiyeli ile birleştiren sentetik kimyasallar, ekonomik bir çözüm olarak dünya genelinde hızla uygulanabilir, etkili ve gerçekçi bir çözümdür [9].

Antifungal ajan olarak kullanılan ilk kimyasal 19. Yüzyılın sonlarında Fransa'da üzüm bağlarında meydana gelen küllenme hastalığına karşı kullanılan bordo bulamacı, yani trikalsiyum tetrabakır sülfattır [13]. Kimyasalların antifungal olarak kullanılması o tarihten günümüze kadar gelişerek devam etmiştir. Farklı ve karmaşık molekül yapılarıyla organik bileşiklerin kullanılması yaygınlaşmış ve kimyasal bileşikler etkinliğini kanıtlamıştır [14–16].

Günümüzde kullanılan antifungal bileşiklerin çok çeşitli olması, farklı fonksiyonel grupları içermesi ve bu fonksiyonel grupların çeşitlenmesine rağmen yeni antifungal bileşiklerin keşfine ihtiyaç, patojenlerin direnç kazanması ile her geçen gün artmaktadır. Patojen fungus türleri, tıpkı medikal kimyada, herbisitlerde, insektisitlerde olduğu gibi mevcut antifungal bileşiklere direnç geliştirmiş, etkinlikleri çok sınırlı hale gelmiştir. Ayrıca bu bileşiklere maruz kalan mahsullerin tüketilmesi ile insan patojeni olarak etki eden bu tür patojenlerin yol açtığı sorunların tedavisi için kullanılan bileşikler, benzer fonksiyonel gruplar içerdiğinden insanlara bulaşan fungal patojen sınıflarında genel bir ilaç direnci gözlenmiştir [17–19]. Tüm bu nedenler bitki fungusiti yeni bileşiklere olan ihtiyacı arttırırken etkinliğini kanıtlamış fonksiyonel gruplar, bu bileşiklerin tasarımında ön plana çıkmaktadır. Bu bileşikler, etkinliği kanıtlanan pirimidin [20], piridazin [21], imidazol [22], benzimidazol [23], pirazol [24], triazol [25], karbamat [26], dikarboksimid [27] ve bunun gibi fonksiyonel gruplarını içermektedir. Şekil 1.1'de bu fonksiyonel gruplarından bazılarını içeren ticari bitki fungusit bileşiklerinin molekül yapıları gösterilmiştir.

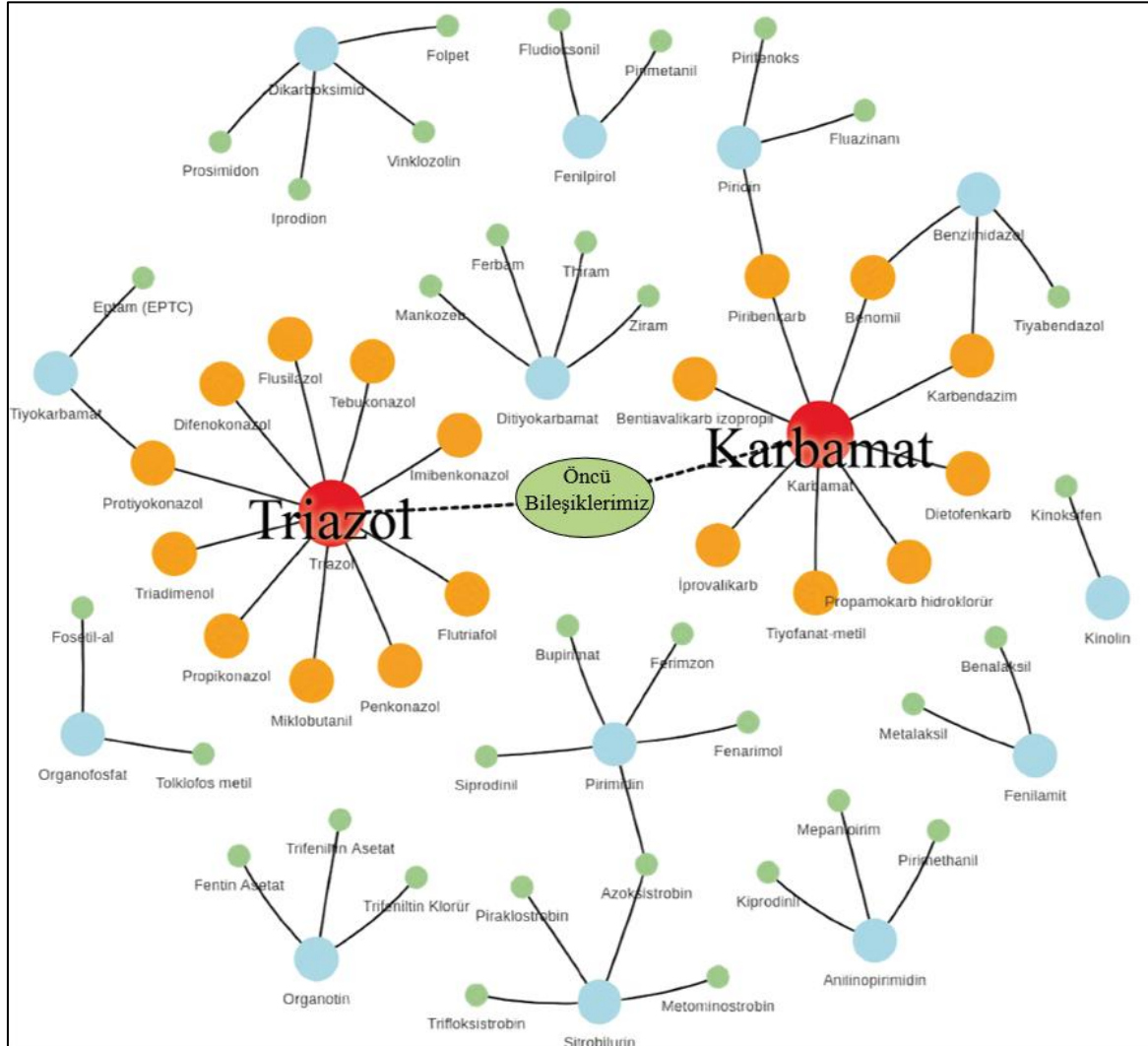


Şekil 1.1. Bazı önemli bitki fungusitleri

Medikal kullanımda en çok triazol grubu içeren bileşikler ön plana çıkarken [28], bitki koruması ve sağlığı için hem triazol hem de karbamat fonksiyonel grupları içeren bileşiklere sık rastlanmakta ve endüstriyel olarak kullanılmaktadır [29, 30]. Bu iki fonksiyonel grubu aynı bileşikte içeren endüstriyel fungusit bileşik ise bulunmamaktadır. 1, 2, 3 triazol grubunun ise antifungal bileşiklerde potansiyeli, Klik Kimyanın geliştirilmesi ve hibrit yaklaşımların etki potansiyelinin günümüzde fark edilmesiyle gerçekleşmiştir [31].

Tarım ürünleri ve bitkilerde fungusit olarak kullanılmaya yönelik yeni, çevreye zarar vermeyen, yararlı organizmaların hayat döngüsüne dahil olmayan, zararlı fungus türleri için etkili bileşiklerin geliştirilmesi, sürdürülebilir tarım ve sürdürülebilir çevresel sağlık için büyük bir önem taşımaktadır. Ayrıca tarım ürünlerinde kullanılan fungusitlerin insanlarda görülen fungal hastalıkların tedavisinde, direnç kazanan türlerin sayısındaki artışla olumsuz etkilerinin olduğunun tespiti, farklı fonksiyonel grupları bir arada içeren etkili yeni bileşiklerinin geliştirilmesini de gerekli kılmaktadır. Bu bilgiler ışığında bu çalışmada bitki fungusitleri içerisinde en çok kullanılan ve etkinliğini kanıtlamış fonksiyonel gruplar olan triazol ve karbamat gruplarını bir arada içeren yeni “öncü bileşikler” geliştirmeyi amaçladık.

Stratejimizin mevcut antifungal bileşikler içerisindeki yeri Şekil 1.2’de detaylı olarak görülebilir.



Şekil 1.2. Fonksiyonel gruplarla ilişkili bitki fungusit bileşiklerinin ağ gösterimi. Büyük düğümler fonksiyonel grupları, küçük düğümler bileşiklerin isimleridir

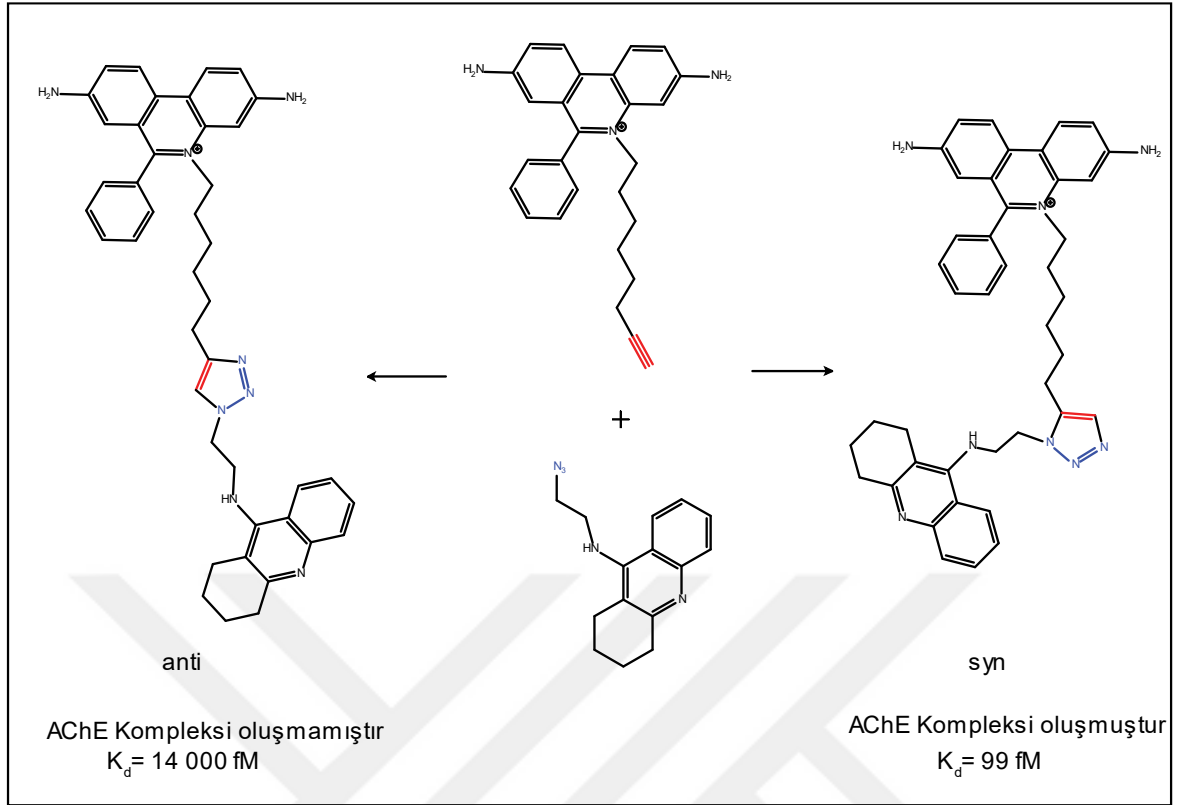
Triazol grupları içeren fungusitler ilk sentezlendikleri zamanlarda fungal organizmalara karşı çok yüksek etkinlik gösterse de günümüze gelindiğinde bu etkinlik, daha önce bahsedildiği gibi organizmaların direnç kazanması sonucu giderek düşmüştür ve düşmeye de devam etmektedir. İnsanda görülen fungal hastalıkların tedavisine direnç gelişiminin tarım ürünlerinde kullanılan fungusitlerdeki aynı sınıf triazollere karşı olduğu tespit edilmiştir. Geliştireceğimiz bileşiklerde antifungal potansiyeli tespit edilen bir başka triazol sınıfı olan 1, 2, 3-triazolü kullanmayı tercih ettik. Bunu diğer bir etkili antifungal potansiyele

sahip fonksiyonel grup olan karbamat ile aynı bileşikte bir araya getirerek hibrit bir yaklaşım gerçştirdik.

FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve APCI-MS yöntemleri ile bileşiklerimizin yapı aydınlatmasını yaptığımız çalışmamız kapsamında, bileşiklerimizi *in silico* yöntemlerle *Fusarium oxysporum* patojen fungus organizmasının hayat döngüsünde önemli yeri olan kilit bir proteine etkileri bakımından inceleyerek hem seçiciliklerini hem de etki potansiyellerini değerlendirdik. Çalışmamızdaki *in silico* yöntemler kapsamında, bileşiklerimiz tam esnek moleküler kenetlenmesini kuantum mekaniğini temel alan yöntemlerle gerçştirdik. Ardından moleküler dinamik simülasyonları, protein dinamiklerinin güncel yöntemlerle analizi, serbest enerji hesabı ile detaylı analizler gerçleştirerek patojen organizmalar üzerindeki potansiyel etki mekanizması aydınlattık.

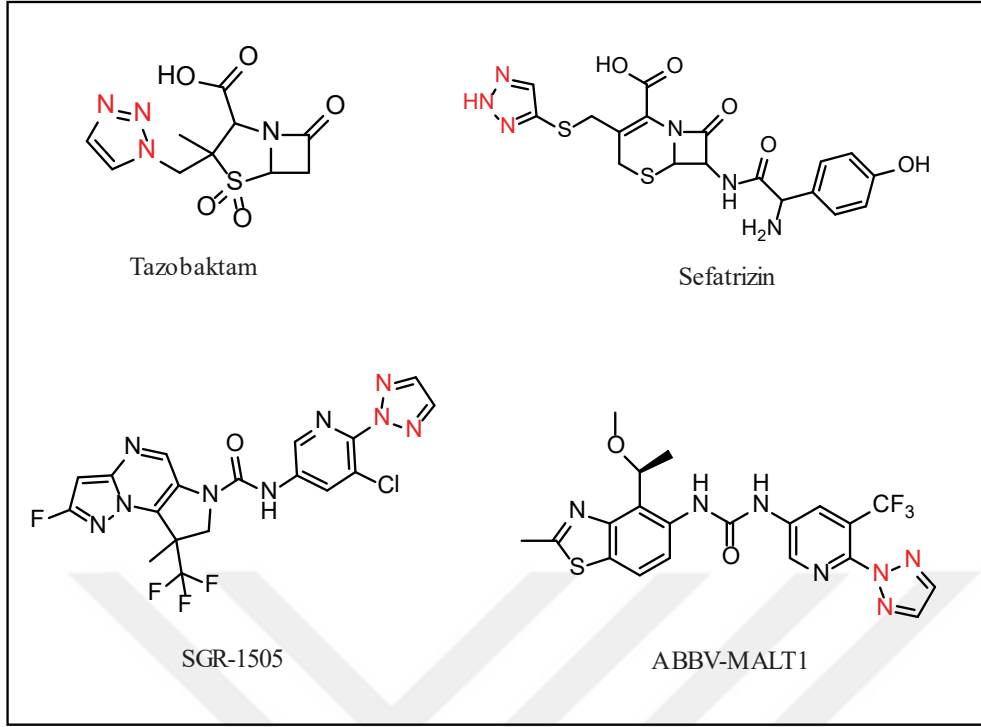
Triazoller

Tasarlayıp sentezlediğimiz bileşiklerdeki triazoller; üç azot ve iki karbon atomu içeren, aromatik heterosiklik bileşik sınıfındadır [32]. Triazollerin, antimikrobiyal, antimikotik, insektisit, sitotoksik, analjezik, antihistaminik, antikonvülsan, anti-inflamatuar, antiprotozoal, antimikobakteriyel, antikanser, antimalaryal ve anti-ülser aktivite gibi geniş bir biyolojik aktivite yelpazesine sahip özel bir heterosiklik bileşik sınıfları olduğu bilinmektedir [33]. Triazol sınıfının çok sayıda fonksiyonel grupla bir arada bulunacak şekilde aynı molekülde sentezlenebilir elektron konfigürasyonunda olduğunun belirlenmesi [34–36], kolay sentezlenebilir ve pek çok reaksiyon koşulunda kararlı yapısal özellikleri ile birleştğinde hızlı ve verimli sentez yöntemlerinin keşfine katkıda bulunmuştur. *Klik* kimyasının “oyun değıştirici” bu etkisine katkı sağlayan triazol sentezi, Sharpless'ın ufuk açıcı fikirleri ile diğer sentetik platformlar için de umut verici perspektiflerin önünü açmıştır. Triazol içeren oligosakkaritlerin [37], doğal ürün analoglarının [38, 39], peptitlerin [40, 41], polimerik malzemelerin [42], sıvı kristallerin [43], dendrimerlerin [44, 45] hazırlanması bu sayede gerçleşmiştir. Tüm bunların yanında triazol grubunun hem tek başına bir farmakofor grup [46] olarak kullanılması hem de farmakofor gruplar arasında yer seçilimli “köprüler” olarak kullanılabilmesi [47] ilaç kimyasındaki yerini pekiştirmiştir. Şekil 1.3’de yer seçilimli olarak köprü triazol yapısı kullanımının avantajları gösterilmektedir [47].



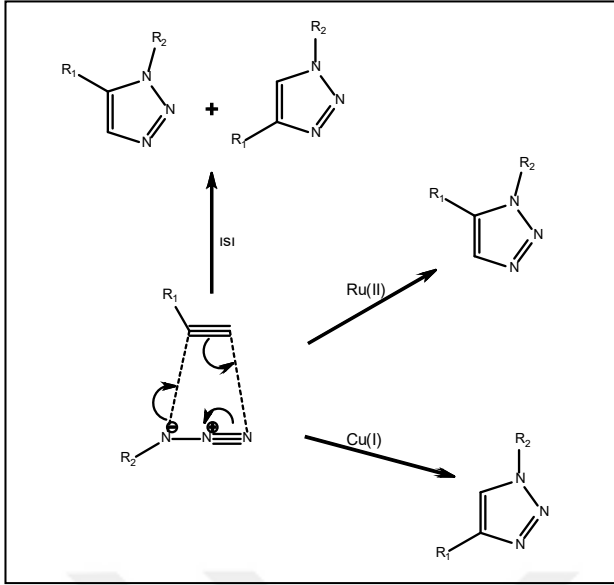
Şekil 1.3. 1, 2, 3-Triazol sınıfının yer seçimli kullanımının avantajları

Günümüzdeki son gelişmeler triazol grubunun tek başına kullanıldığı deneysel ilaçlar üzerine de yoğunlaşmıştır. Yeni tasarlanan, geliştirilen ve klinik deneyleri günümüzde devam etmekte olan mukoza ile ilişkili lenfoid doku lenfoma translokasyon proteini 1(MALT1) 'in inhibitör bileşikler triazol fonksiyonel grubu ile karakterize görünmektedir. Schrödinger Şirketinin geliştirdiği ve klinik deneylerin (günümüzde Faz 1) yürütüldüğü SGR-1505 bileşiği umut verici sonuçlar veren bir bileşiktir [48, 49]. Ayrıca klinik öncesi modellerinde B hücresi sinyalini seçici olarak güçlü bir şekilde kapatan yeni bir küçük molekül inhibitör olan ABBV-MALT1 bileşiği yine triazol içeren başka bir bileşiktir [50]. Şekil 1.4'te bahsedilen bu bileşikler ve kullanımda olan onaylanmış bileşiklerden bazıları gösterilmiştir.



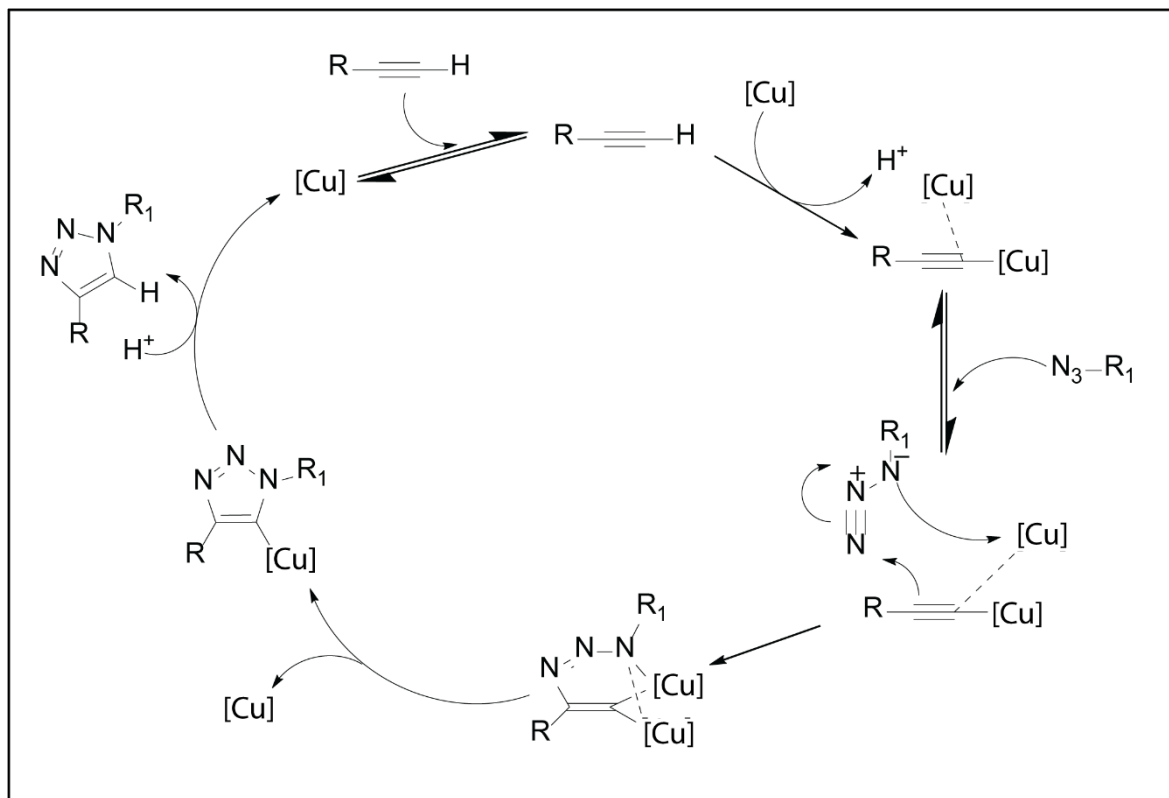
Şekil 1.4. 1, 2, 3-Triazol yapısı içeren ilaç (üstte) ve ilaç adayı (altta) bileşikler

1, 2, 3-Triazoller sentezlenirken tepkimede kullanılan reaktifler değiştirilerek anti ve syn konumları yüksek verimlerle elde edilir. Triazoller, Huisgen 1, 3-dipolar siklokatılma [51], bakır katalizli azür-alkin siklokatılma [52], rutenyum katalizli azür-alkin siklokatılma [53], elektrokimyasal yöntem [54], organokatalizörlerle sentez [55], mikrodalga destekli sentez [56] yöntemleri ile geniş bir sentez yöntemi çeşitliliğine sahiptir. Bu yöntemler ihtiyaca göre yer seçimli olarak 1, 2, 3 triazol sentezleyebilme avantajları sağlasa da en çok kullanılan yöntemler ekonomik olarak avantaj sağlayan yöntemlerdir. En çok kullanılan sentez yöntemleri hem ekonomik avantaj hem de yer seçimli sentez avantajı sağlayan bakır katalizli ve rutenyum katalizli sentez yöntemleri üzerine yoğunlaşsa da diğer sentez yöntemleri de çeşitli ihtiyaçlara göre kullanılmaktadır. Tepkimede kullanılan katalizör türüne bağlı olarak gerçekleşen yer seçimli sentezler Şekil 1.5' de özetlenmiştir.



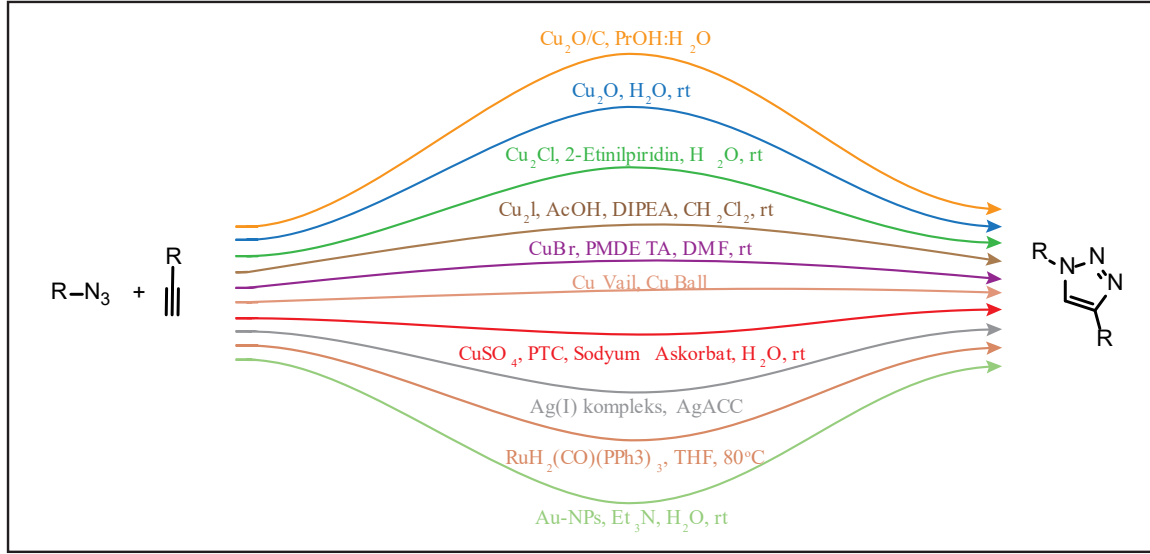
Şekil 1.5. Bir azür ve bir alkinin 1, 3- dipolar siklokatılmasında katalizör türüne göre farklı triazol oluşumu

Bakır iyonu varlığında sadece 1, 4-disubstitüe triazoller oluşur ve verim genellikle yüksektir [57]. Tepkime koşulları su ve organik çözücü karışımlarından veya tamamen sudan oluşur [58]. Burada suyun, bakır iyonlarını serbest bırakacak şekilde katalizör olarak kullanılan bakır kompleksini çözerken, organik çözücünün tepkime ortamındaki organik maddeleri çözerek, katalizörün ve organik maddelerin birbiriyle etkileşime girmeye uygun hale getirildiği açıktır [59]. Bakır katalizörlü bu tepkimelerde Bakır(I) genellikle CuSO₄ ve askorbik asit gibi bir indirgen ile *in situ* olarak üretilir. Tepkime oda sıcaklığında kendiliğinden gerçekleşme eğilimindedir [52]. Bu tepkimelerde geniş bir aralıkta azür ve alkin bileşiklerinin kullanılabilir olması daha önce bahsedilen biyomoleküler konjugasyon, ilaç tasarımı, polimer kimyası gibi alanlarda kullanım alanı bulmasını sağlar [59, 60]. 1, 2, 3 Triazollerin bakır katalizli 1, 4-disubstitüe sentezinde mekanizma detaylı olarak Şekil 1.6'den takip edilebilir.



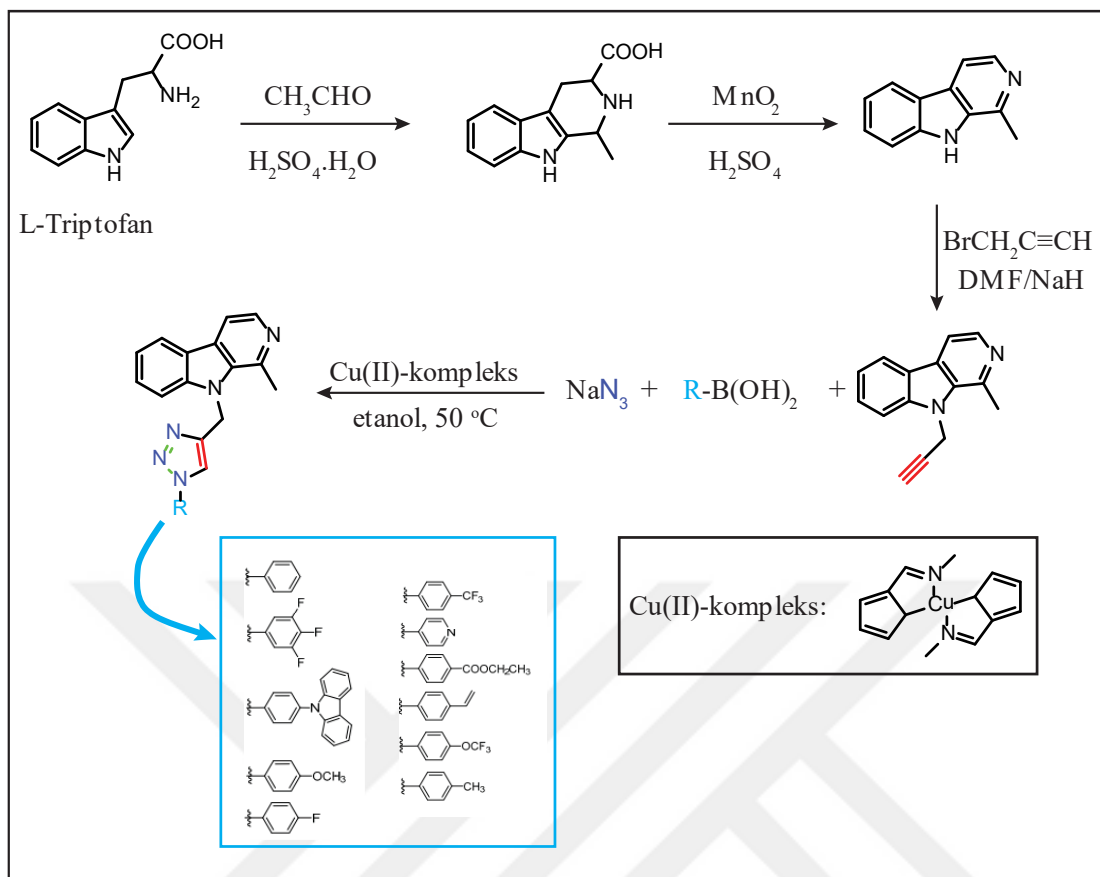
Şekil 1.6. 1, 2, 3-Triazollerin bakır katalizli sentez mekanizması [31]

Klik kimyası yalnızca en güvenilir ve pratik dönüşümleri kullanan, bu dönüşümlerin yüksek verimlerde gerçekleşmesini sağlayan modüler tabanlı bir yaklaşım sunar. Özel olarak tasarlanmış yapı taşlarının sentezi için mükemmel yakın birkaç kimyasal reaksiyondan yararlanarak bu süreci büyük ölçüde kolaylaştıran yeni bir sentez yaklaşımıdır [47, 57]. Klik Kimyasının özellikle verimli, hızlı ve uygun maliyetli yöntemler benimsemesi, bakır katalizörlü sentezlerin ağırlık kazanmasına yol açmıştır. Triazol sınıfındaki bileşiklerin sentezi de çoğunlukla bu çerçevede geliştirilmiştir. Cu(I) iyonunun kullanıldığı 1, 2, 3-triazol oluşumu sağlayan çalışmalar fazlasıyla mevcuttur. Klik kimyası ile sentezde sıkça kullanılan yöntemler metal katalizli pratik yaklaşımlardır ve bazı farklı metal iyonları ile de çeşitli yaklaşımlar mevcuttur. Bu yaklaşımların özet gösterimi Şekil 1.7' de reaktifleriyle verilmiştir.



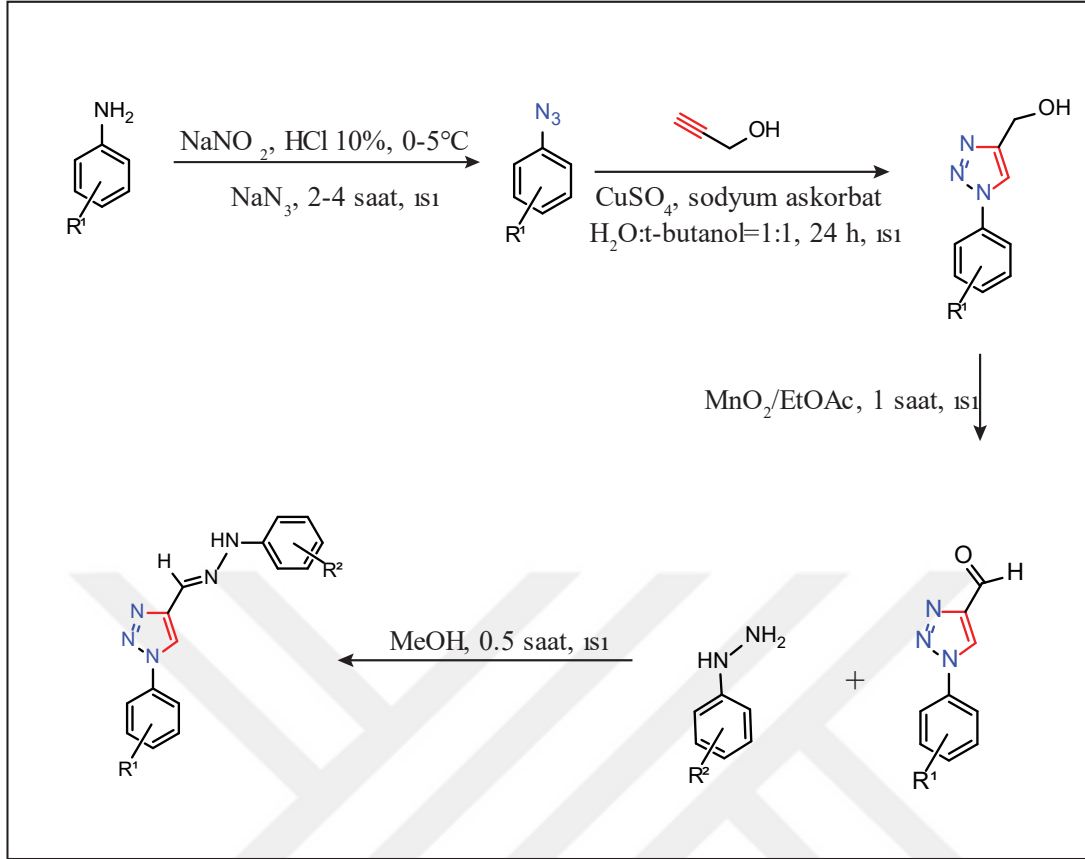
Şekil 1.7. Azür ve alkinden, metal katalizli 1, 2, 3 triazol sentez yöntemlerinden bazıları [61]

Yukarıda bahsedilen sentez yöntemlerini ve benzerlerini kullanarak antifungal bileşikler geliştirildiği pek çok çalışma bulunmaktadır. Bunlardan birisi yeni aril-1, 2, 3-triazol- β -karbolin hibritlerinin tasarımı, sentezi ve antifungal aktivitesini içeren Huo ve diğerleri, gerçekleştirdiği bir çalışmadır. Huo ve arkadaşları geliştirdikleri bileşikler *Rhizoctoria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* Pers., ayçiçeği *sclerotinia* çürüklüğü ve kanola *sclerotinia* çürüklüğüne karşı *in vitro* olarak değerlendirmiştir. Geliştirilen bileşiklerde ise L-triptofan bileşiğini çıkış maddesi olarak kullanarak 1-metil-9-(prop-2-in-1-il)- β -karbolin üretimini de içeren üç aşamadan oluşan bir sentez yaklaşımı benimsemiştir. Bu yaklaşıma göre ilk olarak Pictet–Spengler kondensasyonu ile bir halka oluşturulmuş ve trisiklik(1-metil- β -karbolin) bir yapı elde edilmiştir [62]. 1-Metil- β -karbolin sınıfındaki bu bileşik DMF ortamında sodyum hidrür kullanılarak N9-alkilasyon yoluyla propargil bromür ile reaksiyona sokulmuştur. Elde edilen bu bileşik klik kimyası kullanılarak bakır katalizli azür-alkin siklokatılma için sodyum azür ve pek çok türde arilboronik asitler kullanılarak 2-pirolkarbaldimina-Cu(II) kompleksleri katalizörlüğünde 1, 4-disüstitüe 1, 2, 3-triazoller sentezlenmiştir. Hibrit bileşik yaklaşımını benimseyen bu makale, hem 2-pirolkarbaldimina-Cu(II) komplekslerinin katalizör olarak kullanımı hem de sentezlenen bileşiklerin sayılan organizmalardan *F. Oxysporum* dışında bütün organizmalara yüksek etki göstermesi bakımından hem ilginç hem de rehber niteliğindedir. Huo ve diğerleri, bileşikler nasıl sentezlediği Şekil 1.8’de tüm adımları ile birlikte şematize edilmiştir [63].



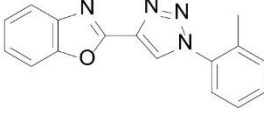
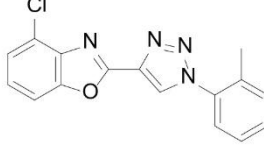
Şekil 1.8. Huo ve diğerleri, yaptıkları *N*-aril-1, 2, 3-triazol- β -karbolin fungusit hibritlerinin sentez şeması

Bir diğerk çalışıma Dai ve arkadaşlarına aittir ve temel bir organik kimyasal olan aromatik amin çeşitlerinin çıkış bileşiiği olarak kullanıldığı sentezleri içermektedir. *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium graminearum* ve *Phytophthora capsica* organizmalarına karşı hem *in vitro* hem *in vivo* deneylerin yapıldığı çalışıma tüm patojenlere karşı etkili olurken sentezlenen bileşikler 1, 2, 3 triazol-hidrazon hibrit bileşikleridir. Bu bileşiklerin sentezi aromatik aminlerin sodyum nitrit ile diazotize edilerek diazoniyum tuzlarına ve ardından da azitlerin senteziyle başlamaktadır Oluşturulan azitler proparjil alkol ile Cu(I) katalizörlüğünde 1, 3-dipolar siklokatılma tepkimesine sokularak 1, 4-disübstitüe 1, 2, 3-triazoller i oluşturulmuştur. Dai ve arkadaşları bu aşamadan sonra proparjil alkol ile elde ettikleri 1, 2, 3 triazol kısmının diğerk tarafında kalan alkol kısmını etil asetat içerisinde kullanılan mangan oksit ile yükseltgeyerek aldehite, daha sonra da farklı fenilhidrazin türevleri ile hidrazon türevlerini elde edecek şekilde tepkimeye sokmuşlardır. Dai ve diğerkleri, kullandıkları sentez stratejisi Şekil 1.9’de detaylı olarak şematize edilmiştir [64].



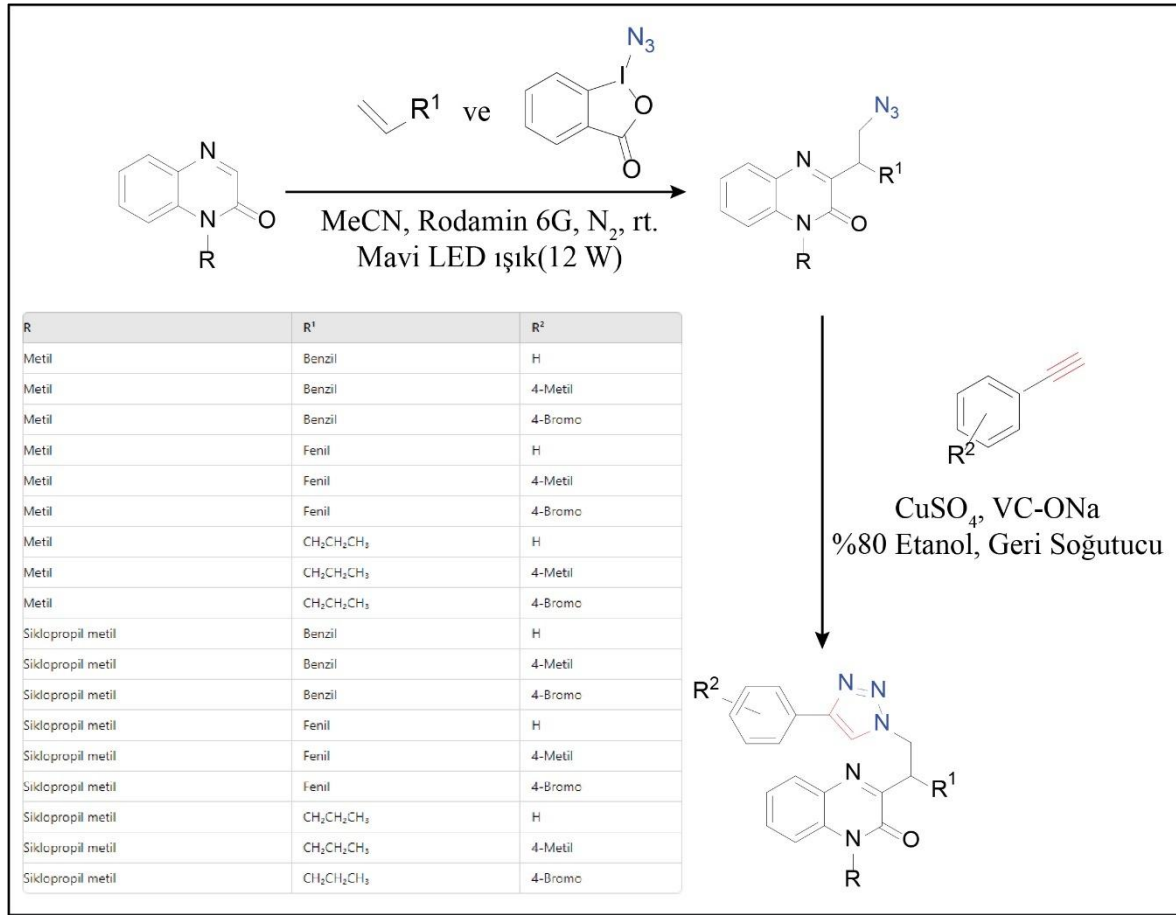
Şekil 1.9. Dai ve diğerleri, 1, 2, 3-triazol-hidrazon hibriti fungusit bileşiklerinin sentez şeması.

Benzer bir çalışma Jiang ve arkadaşlarına aittir ve Dai'nin çalışmasına benzer şekilde aromatik aminler çıkış bileşiği olarak kullanılmaktadır. Triazol-alkol türevi bileşiklerin sentezine kadar çok benzer olan sentez stratejisi triazol-aldehit bileşiğine yükseltgemeyi mangan oksit yerine Dess-Martin reaktifi kullanarak yapmaktadır. Bu adımdan elde edilen aldehit bileşiğini kullanarak, Jiang ve arkadaşları tarafından son adımda bakır(II) asetilasetonat katalizörlüğünde benzoksazol türevleri sentezlenmiştir. Jiang ve arkadaşları, sentezlenen bileşiklerin *Botrytis cinerea* ve *Fusarium Verticillium* organizmalarına karşı antifungal aktivitelerini değerlendirmiş ve *Botrytis cinerea*'a karşı bileşiklerin yüksek etkili olduğunu gözlemlerken *Fusarium Verticillium*'e karşı kısmi bir aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Organizmalara karşı etkinlik gösteren molekül şekilleri ve aktiviteleri Şekil 1.10'da gösterilmiştir [65].

40 µg/mL'de antifungal aktiviteler	
 Bileşik 5c <i>Botrytis cinerea</i>'e karşı: %81.9 <i>Fusarium Verticillium</i>'e karşı: %70.0	 Bileşik 5n <i>Botrytis cinerea</i>'e karşı: %81.5 <i>Fusarium Verticillium</i>'e karşı: %56.4

Şekil 1.10. Jiang ve diğerleri, sentezledikleri bileşiklerden patojen organizmalara karşı en iyi aktivite gösteren bileşikler ve 48 saatte toplanan aktivite verileri

Doğal bileşik çekirdeği içeren 1, 2, 3-triazol türevleri Jiang ve arkadaşları tarafından çalışılmış ve 1, 2, 3-triazol-kinoksalin bileşikleriy yeşil kimya prensiplerine bağılı kalarak sentezlenmiştir. Ana iskeleti oluşturan gruplar arasında bir alkil köprüsünün de yer aldığı bileşikler altı farklı fungal patojene karşı *in vitro* ve *in vivo* deneylerle değerlendirilmiştir. Ayrıca bu çalışma, benzer amaçlı çalışmalardan farklı olarak bileşiklerin miselyum büyümesini inhibe etme, spor çimlenmesini inhibe etme ve *in vivo* koruma özelliklerini de incelemiştir. *C.fragariae* Brooks., *B.maydis* (Nishik.) Shoemaker., *P.oryzae* Cav., *B.cinerea* Pers. Fr., *B.cinerea* Pers. ve *C.gloeosporioides* organizmalarına karşı etkisi araştırılan 1, 2, 3-triazol türevleri özellikle *C.gloeosporioides*a karşı yüksek etkinlik göstermiş, *B.maydis* (Nishik.) Shoemaker.'a karşı ise etkisi sınırlı kalmıştır. Bu bileşiklerin sentez şeması Şekil 1.11'de gösterilmiştir [66].



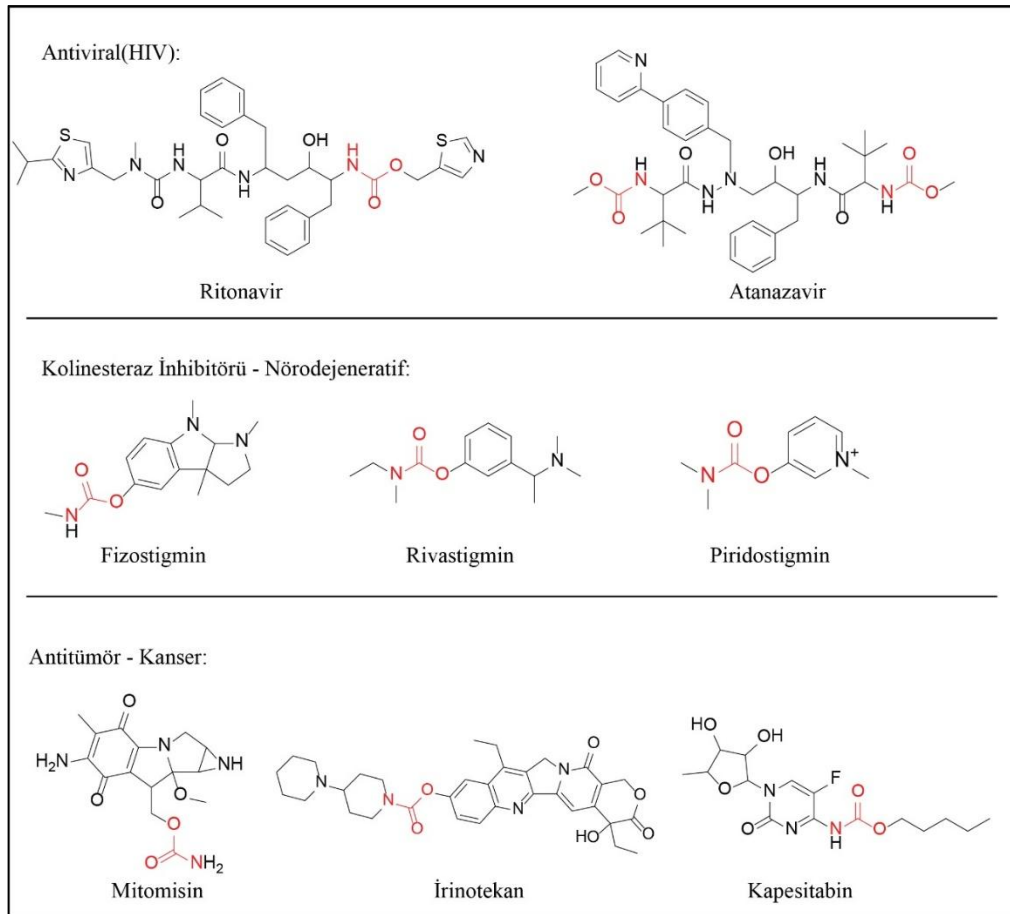
Şekil 1.11. Jiang ve diğerleri, 1, 2, 3-triazol-kinoksalin hibrit yaklaşımının sentez şeması

Karbamatlar

Triazoller haricinde antifungal aktivite özellik gösteren bir başka fonksiyonel grup, pek çok ticari fungusitte de yer alan karbamat fonksiyonel grubudur. Karbamat fonksiyonel grubu triazol fonksiyonel grubundan sonra ticari fungusitlerde en çok bulunan fonksiyonel gruptur. Literatürde organafosforlar ile birlikte anılan karbamatlar insektisit olarak da kullanılmaktadır ve etkileri uzun süredir bilinip araştırılmaktadır [67].

Karbonil karbonuna bağlı oksijen ve azot atomlarından oluşan karbamat fonksiyonel grubuna, kemoterapötik ajanlar (mitomisin C, irinotekan), nörodejeneratif bozuklukların tedavisinde kolinesteraz inhibitörleri (rivastigmin, neostigmin, fizostigmin, piridostigmin), insan immün yetmezlik virüsü (HIV) proteaz inhibitörleri (ritonavir, amprenavir, atazanavir, darunavir), antikonvülzanlar (felbamat, retigabin, cenobamat), antelmintikler (febendazol, albendazol, febantelmendazol) ve kas gevşeticiler (metokarbamol, metoksalon) gibi geniş bir yelpazedeki ilaçlarda rastlanmaktadır [68]. Ayrıca karbamat fonksiyonel gruplarının

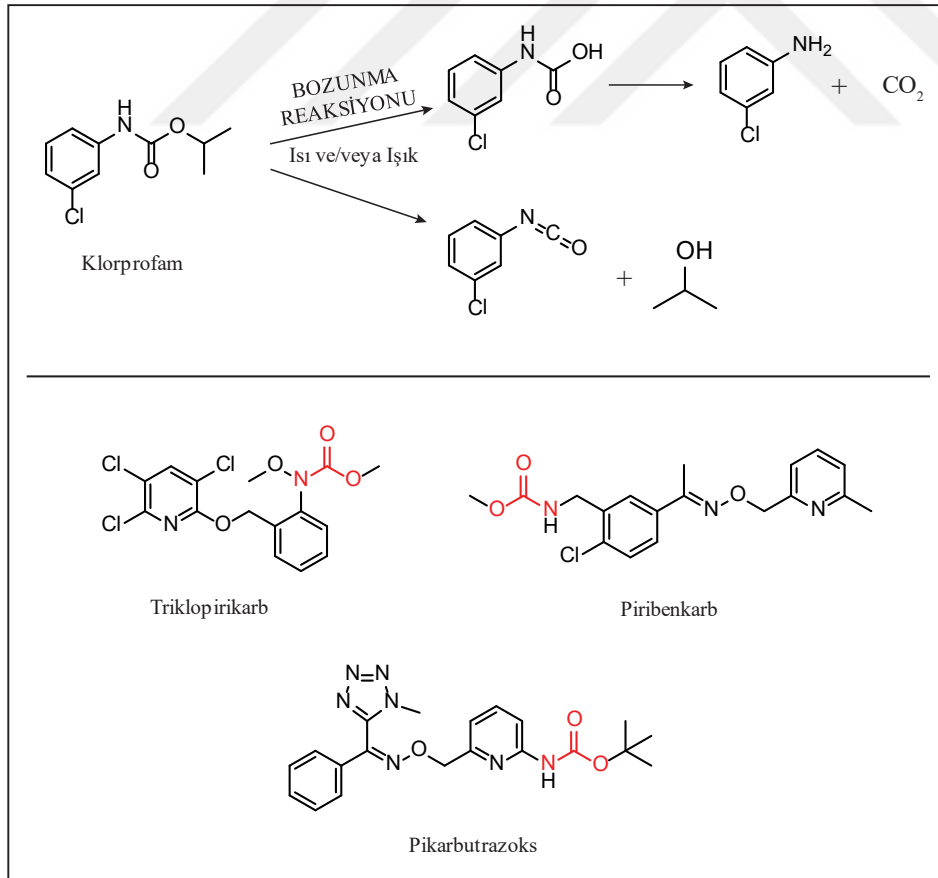
bağlanması ile bazı ilaç bileşiklerinin etki süresinin uzaması kullanım amacının çeşitlenmesini sağlayan başka bir etkidir. Literatürde “ön ilaç” olarak geçen bu olgu irinotekan, bambuterol, gabapentin, encabril, kapesitabin gibi ilaç bileşiklerinde karşımıza çıkmaktadır. Karbamatların bu etkileri ilk geçiş ve sistemik hidrolitik stabilite elde etme aracı olarak ön ilaçların tasarımında kullanılmak üzere değiştirilmelerinden ileri gelmektedir [68–70]. Karbamat fonksiyonel grubu ve bu gruba sahip bileşiklerden bazıları Şekil 1.12’de kategorize edilerek gösterilmiştir.



Şekil 1.12. Karbamat fonksiyonel grubu içeren çeşitli ilaçlar

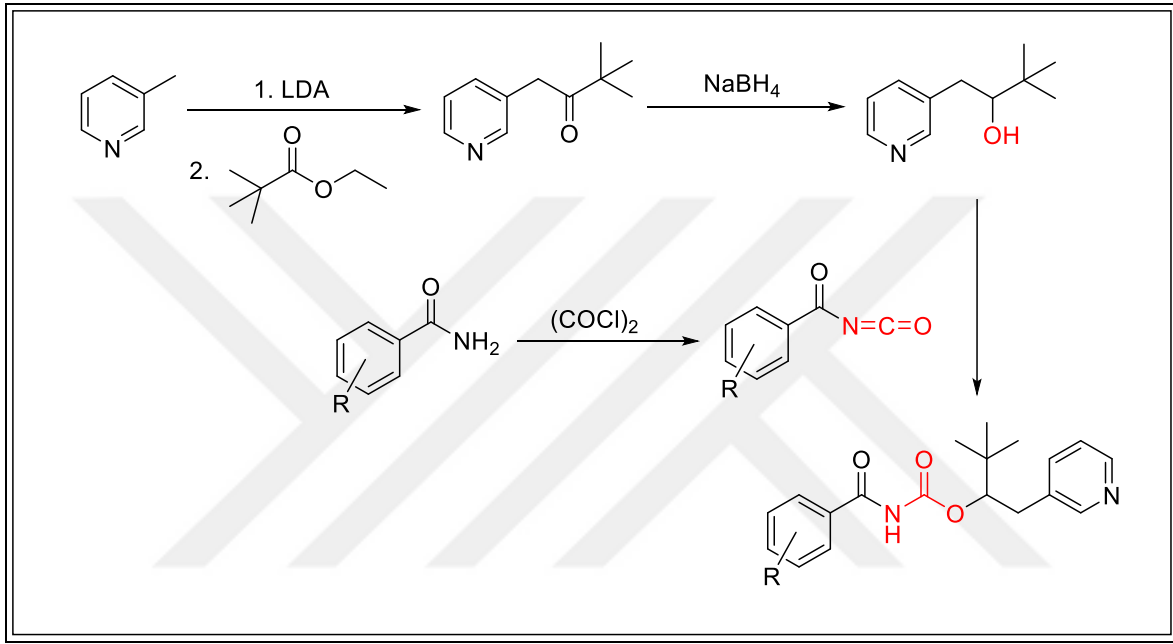
Karbamat, kararlı yapısı ile kullanım açısında elverişli bir gruptur ve bunun da yanında memelilerden kolay atılım sağlanan amin, karbon dioksit ve alkolü verecek şekilde sorunsuz bir şekilde hidroliz olabilir [71–74]. Bu da ilaç bileşiklerinde kullanımını büyük oranda avantajlı kılmaktadır. İlaçlardaki bu önemli özelliği onu, çevre dostu pestisitlerin geliştirilmesine de elverişli kılabilceği son zamanlarda anlaşılmıştır ancak geçmişte bozulma ürünleri çevreye zararlı olan karbamat pestisitleri kullanılmıştır. Karbamat fonksiyonel grubunun bozulması çok az kalıntı sorununa neden olsa da bileşik yapısının

tümünün bu konuda büyük önem taşıdığı fark edilmiştir. Karbamat fonksiyonel grubu taşıyan bileşikler hedeflendikleri işlevleri yerine getirdikten sonra zararlı, kanserojen veya istenmeyen bileşiklere artakalır şekilde bırakabilir. Bu durumun en göze çarpan örneği karbamat grubu barındıran bir herbisit bileşiği olan Klorprofam bileşiğidir. 1951 yılında piyasaya çıkan bu pestisit çok büyük satış rakamlarına ulaşmıştır ve oldukça etkilidir. Ancak kısa bir süre sonra bozulma ürünlerinden zararlı olan 3-kloroanilin, bu pestisit gelecekteki yıllardaki kullanımını sınırlandıran etmen olmuştur [75, 76]. Bitki fungusitlerine karşı olan etkisinin başlı başına bilindiği karbamat fonksiyonel grubu içeren bileşikler, sadece bozulma ürünlerinin biyolojik etkileri ön görülerek, çevre dostu bileşikler olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Bu prensiplere sahip olarak geliştirilen bazı fungusitler (ticari kullanımı henüz yoktur) Şekil 1.13’de Klorprofam bileşiğinin bozulma mekanizmasıyla birlikte karşılaştırmalı olarak verilmiştir [77–79]. Bu şekilde yer alan yeni nesil fungusit bileşiklerinin Klorprofam bozulmasında açığa çıkan 3-kloroanilin bileşiğinden farklı bozulma ürünleri vereceği açıktır.



Şekil 1.13. Klorprofam bozunma bileşenleri (üstte) ve “çevre dostu” karbamatlı fungusit bileşikler (altta)

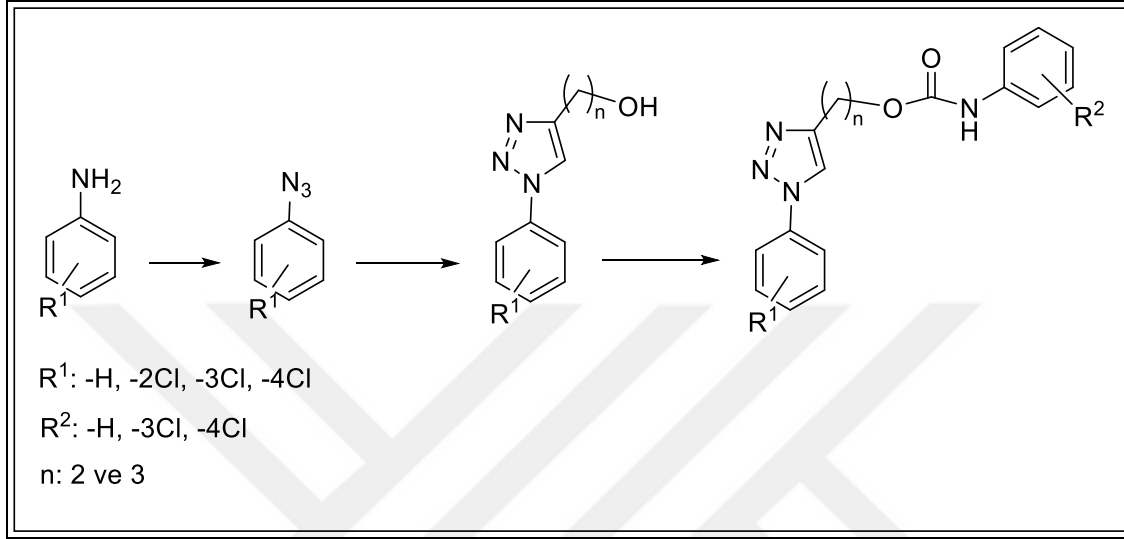
Wan ve arkadaşları “mükemmel” fungusit olarak tanımladığı pikarbutrazoks'u önder bileşik seçerek gerçekleştirdikleri bir çalışmada bu prensipler benimsenerek yeni piridin halkası içeren benzoil karbamat bileşiklerini sentezlemişler ve *in vitro* olarak *B. cinerea* ve *S. sclerotiorum* organizmalarına karşı etkilerini değerlendirmişlerdir. Sentezlenen bileşikler orta ile yüksek arasında etkinlik göstermiştir. Bu senteze ait şema Şekil 1.14'te gösterilmektedir [80].



Şekil 1.14. Wan ve diğerleri, süstitüent olarak halojen, metil ve metoksi bulunan bileşiklerinin sentez şeması

Literatürdeki bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızın hedeflerinden biri hesaplamalarla daha fazla etkili olma potansiyeli olan substitüentlerin belirlenmesini ve sentezlenmesini amaçlamaktadır. Kloro anilinlerden sentezlenen bileşikler, bitki fungus patojenleri ile mücadelede kimyasal direnç sorunlarını aşmak için umut vaat eden yeni antifungal ajanlar olma potansiyeli ve bu alanda mevcut sınırlamaları aşacak çevre dostu alternatifler oluşturabilir. Bu amaçla kloro anilinleri çıkış bileşiği olarak kullanarak amin grubunu azür, daha sonra da bu azür grubunu pentinol ve bütinol ile bakır katalizörlüğü varlığında [3+2] siklokatalıma ile iki farklı uzunlukta karbon zinciri olan triazol türevlerini oluşturmak için kullandık. Pentinol ve bütinol kullanılmasından kaynaklı karbon zincirinin serbest uçlarındaki hidroksi grupları da klor süstitüe fenilizosiyanatlarla tepkimeye sokularak 2-(1*H*-1, 2, 3-triazol-4-il)etil karbamat ve 3-(1*H*-1, 2, 3-triazol-4-il)propil karbamat serileri elde edildi. Bu bileşiklere ait sentez şeması Şekil 1.15'te gösterilmektedir. Sentezlediğimiz

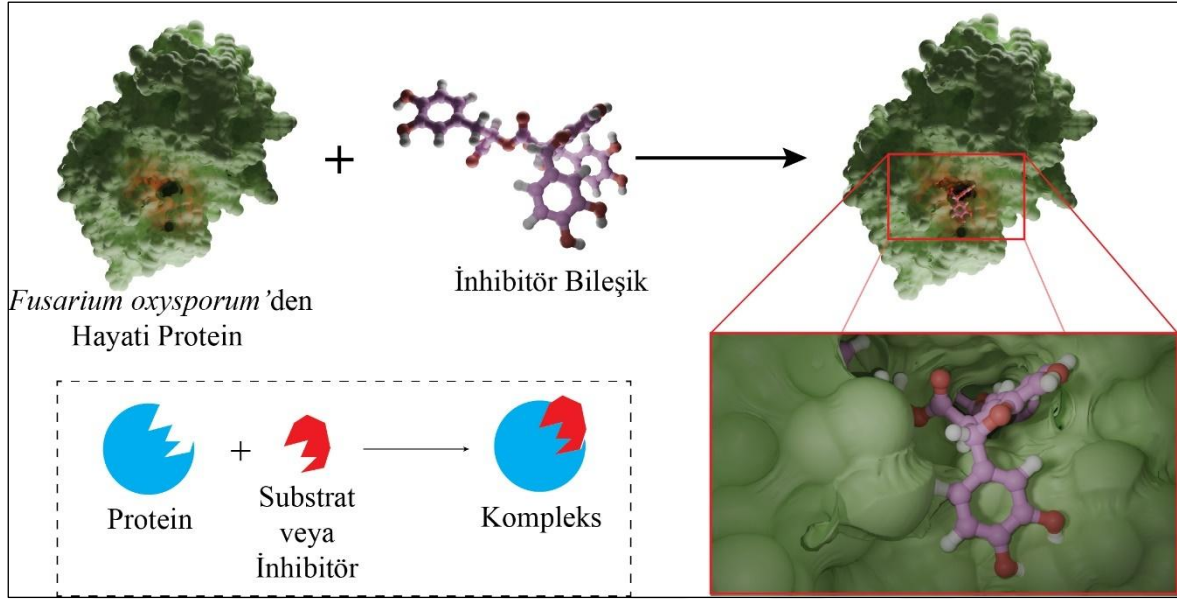
bileşiklerin literatürdeki ve ticari olarak satılan bileşiklerin en az etki gösterdiği organizma olan *Fusarium oxysporum* patojeni başta olmak üzere çeşitli patojenlere karşı etkinliği in silico ve in vitro çalışmalarla araştırıldı. bu etkinliğin moleküler mekanizmasının dayandığı temelleri tespit etmek ve anlamak için *in silico* yaklaşımlarla çıkarımlar yapılmıştır.



Şekil 1.15. 1, 2, 3-Triazolkarbamat bileşiklerinin sentez şeması

Hesaplamalı yöntemler

Biyokimyada protein-ligand komplekslerinin oluşumu temel olarak Anahtar-Kilit Modeline dayanır. 1894 yılında Fischer'in enzimlerin substratlarını tanımasını açıklayan bir modele duyulan ihtiyacı ortadan kaldırmak için önerdiği model, kısa sürede kabul görmüştür. Bu model ligand tarafında, ligandın protein yapıdaki başta aktif bölge olmak üzere fiziksel olarak da ayırt edilebilen bölgelere uyumlu yerleşimi içerir [81]. Moleküler kenetlenme yöntemi ise bu paradigmaya dayanarak ligand ve protein arasındaki etkileşimlerin öngörülmesini sağlar [82]. Anahtar-Kilit Modelini moleküler kenetlenme yöntemi ile açıklayan bir görsel Şekil 1.16'da verilmektedir.



Şekil 1.16. Anahtar-kilit modelinin gösterimi, protein yapıdaki kırmızı ışıyla aydınlatılan alan bağlanma bölgesini gösterir

Moleküler kenetlenme yazılımları protein yapılarıdaki bağlanma bölgelerine ligandların konformasyonel değişimlerini en yüksek düzeyde hesaba katarak, ligandların bağlanma afinitelerini atomlar arasındaki etkileşim enerjisine göre belirler [83]. Bununla birlikte Fischer'in Anahtar-Kilit Modelini önermesinden yarım asır kadar sonra; Koshland, prensipleri büyük bir hızla kabul gören İndüklenmiş Uyum Modelini önermiştir [84, 85]. Bu yeni modele göre; protein ve ligand tanıma ve kenetlenme aşamasında birbirlerine göre hareket etmekte ve esneklik kazanmaktadır. Bu hareket ise bağlanma bölgesi ile ligandın kovalent olmayan etkileşimlerle atomlarının yüklerine ve polaritelerine göredir. Bu durum x-ışını kristal verilerinin bir protein yapısının herhangi bir ligand içermezken ve ligand bağlandıktan sonra bağlanma bölgesinde görülen değişimden kolaylıkla anlaşılabilir. Bu oldukça etkili ve belirleyici prensipler, aynı bileşiğin farklı enantiyomerlerinin bile protein yapıları tarafından seçici olarak ayırt edilmesini ve/veya farklı etkiler yapmasını bile açıklayabilmektedir [86]. Modelin büyük bir doğrulukla bilgisayar ortamına aktarılmasını sağlayan, İndüklenmiş Uyum Modelini temel prensipleriyle uygulayarak protein-ligand komplekslerinin doğru öngörülmesini sağlayan esnek kenetleme yazılımları günümüzde kullanılmaya bu prensiplerle başlamıştır [87].

Moleküler kenetlenme yazılımları, protein-ligand kristal verilerine benzer, uyumlu ve oldukça yakın sonuçlar üretseler de tam bir doğruluk söz konusu olamamaktadır. Bunun da altında yatan temel sebep, doğal koşulları sağlama amacı taşımaması ve kuvvet alanına

(force field) bağımlılıktır. Yazılımlar moleküler mekanik temelli kuvvet alanları kullanarak kuantum mekaniğinin moleküler düzeydeki gerçekçiliğinden çoğunlukla mahrumdur. Ayrıca İndüklenmiş Uyum Modelinin prensiplerinden açıkça anlaşıldığı üzere protein-ligand kompleksi dinamik bir doğaya sahiptir. Oysaki moleküler kenetlenme yazılımları statik bir doğaya ait sonuçlar üretmektedir ve doğal koşullar olan sıcaklık, basınç ve bunun gibi parametreleri kullanmamaktadır. Bu yazılımlarda hem protein hem de ligand esnek olarak ele alınmalarına rağmen çıktı durağan bir protein-ligand kompleksleridir.

Biyomoleküler yapıların statik durumları için mevcut teknolojilerimizle doğru olarak kabul edebileceğimiz x-ışını kristal verilerinin doğada dinamik durumlarda bulunan yapıları açıklanmasına yönelik ilk adımlar, 1970'li yıllarda Karplus ve McCammon ilk moleküler dinamik simülasyonlarını gerçekleştirerek biyomoleküllerin atomik seviyede hareketlerini ve davranışlarını anlamak için ilk adımları atmışlardır [88–90]. Temel prensipleri, ilk ortaya çıktığı günden bu güne Newton mekaniğine dayanan moleküler dinamik simülasyonları (MD) kuvvet alanının protein yapıdaki (ve varsa liganddaki) atomların tümüne, hem birbirlerine göre hem de çözücü ortamına göre (özel bir amaç yoksa çözücü olarak su kullanılır) kısmi yükler atanması ve bu atomların kısmi yüklere göre birbirine etki etmesi ile atomların yeni pozisyonlara hareket etmesi prensibine dayanır [91]. MD simülasyonları günümüzde kullanım amacına bağlı olarak hem kuantum mekaniği hem de moleküler mekanik kullanılarak gerçekleştirilebilir [92, 93]. MD simülasyonlarında biyomoleküler sistemler, çözücü moleküllerinden oluşan “çözücü kafesi” içerisine, tamamı kafesin içerisinde kalacak şekilde daldırılır. Simülasyon başlatıldığında ise atomların konumları çözücü moleküllerini de hesaba katacak şekilde, birbirlerine göre bir zaman serisi boyunca ayarlanarak sürekli yeniden pozisyonlandırılır. Simülasyonlarda sıcaklık ve basınç gibi parametrelerin simülasyon sürecinde değerlendirilmesi fizyolojik ortamın veya çalışılan konuya göre doğal koşulların doğru bir şekilde küçük bir zaman adımında ayarlanmasını sağlayarak protein yapının dinamik hareketine ışık tutar.

Biyomoleküler sistemlerin MD simülasyonlarında tıpkı bir film yapımında olduğu gibi kareler(frame)ler) kullanılır. Her kare hesaplama sonuçlarına göre farklı pozisyonlar alan yeni atomik pozisyonları içerir. Simülasyon sonunda kareler birleştirilerek biyomoleküllerin hareketi zaman serisi boyunca belirlenmiş olur. Böylece atomların pozisyonlarının her biri, belirli bir zaman serisi boyunca her karede yüksek hassasiyetle pozisyonel olarak belirlenir. Bu, atomik pozisyonları, hem protein yapının genel durumuna dair basit yorumlar yapmak

hem de derinlemesine analizler yaparak protein dinamikleri hakkında çıkarımlarda bulunmak için elverişli hale getirir. Ancak protein yapıların kaotik doğası, fizyolojik işlevi önemli olan proteinlerin atom sayısının binlerle ifade edilen rakamlara ulaşmasıyla birleştiğinde üstel olarak artan bir karmaşıklıkla beraberinde getirmektedir [94–97]. Temel analizlerin (kök ortalama kare sapma analizi ve bunun gibi) dışında daha detaylı analizlerde bu devasa veri kümesinin “ham haliyle” kullanılması önemli olayların tespit edilememesine neden olabilir. Veri boyutu arttığında, önemli olayların ön plana çıkarılarak indirgeme yöntemlerinin MD simülasyon verilerine uygulanması, büyük veri kümesini doğru analiz ederken, veri kaybını mümkün olduğunca düşük tutmayı amaçlar. Birbirinden farklılık gösteren indirgeme yöntemleri önemli olayları büyük boyutlu bir matrisi kendilerine has algoritmaları kullanarak işler. Farklı algoritmaları içeren yöntemler, farklı olayları ön plana çıkarırken hesaplama maliyeti ile protein yapıda gerçekleşen olayların ayırt edilmesindeki duyarlılık arasında geniş bir makas vardır. Protein yapılarda meydana gelen değişimler yüksek duyarlılıkla analiz edildiğinde hesaplama maliyeti büyük ölçüde artmaktadır. Bu da büyük boyutlu verileri düşük boyuta indirmek için kullanılan Temel Bileşen Analizi (PCA) yöntemini protein dinamiklerini anlamaya çalışırken ön plana çıkarır [98, 99]. Böylece sistemde düşük hesaplama maliyeti ile sistemin en fazla varyans gösteren hareketleri tanımlanarak, yüksek boyutlu veri setlerini daha anlaşılır, yönetilebilir ve analiz edilebilir hale getirir [100].

MD simülasyonlarında ortaya çıkan büyük veri kümelerini analiz edilebilir olmasını sağlamak için pek çok indirgeme yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin pek çoğu sadece biyomoleküler yapıların MD simülasyonları için değil, dinamik sistem olarak tanımlanabilecek akışkanlar mekaniği, sosyal dinamikler, N-Body simülasyonları, sinirsel dinamikler ve beyin modellemeleri gibi alanların bütününde amaca göre küçük modifikasyonların yapılmasıyla ayrı ayrı kullanılabilecek şekilde tasarlanmışlardır [101–106]. Bunlardan biyomoleküllerin MD simülasyonlarında kullanımına en elverişli olanları doğrusal olmayan sistemleri doğrusal olarak ifade ederek önemli olayların tespiti sağlayan yöntemlerdir [107]. PCA analizi, sistemi doğrusal olarak kabul ettiğinden analizi kolaylaştırırken bir miktar hata payını da beraberinde getirir. Bu tür sorunları çözmek ve hata payını en aza indirmek için geliştirilen yöntemlerden biri de Difüzyon Haritalarıdır. Difüzyon Haritaları yüksek boyutlu simülasyon yörüngelerinin temel dinamik modlarını sistematik olarak çıkarma kapasitesine sahip, termodinamiğin içgörüsünü ve anlayışını geliştirmek için kinetik olarak anlamlı, düşük boyutlu bir çerçeve sağlayan, doğrusal

olmayan bir boyut indirgeme tekniği olarak avantaj sağlar [105, 108]. Bu yöntem kontrolsüz makine öğrenimi (unsupervised learning) tekniklerinden biridir [109]. Temel işlevi veriler arasında doğal olarak var olan benzerlikleri kullanarak, veriyi düşük boyutlu bir alana indirgemek ve yapısal bilgileri açığa çıkarmaktır [110]. Difüzyon haritalarının, verinin altında yatan geometrik yapıyı difüzyon süreci üzerinden modellemek için Markov süreçlerini kullanması, onu MD simülasyon verilerine dair yaklaşımlarda kullanılmasına çok uygun hale getirir.

Verileri düşük boyutlara önemli olayların kaybolmadan indirgenmesini sağlayan bir diğer yöntem Düzgün Manifold Yaklaşımı ve Projeksiyonu (UMAP) yaklaşımıdır [111]. Kontrolsüz makine öğrenimi tekniklerinden bir diğeri olan UMAP temelde aynı prensiplerde çalışır ancak verinin manifold yapısını modellemek için topoloji teorisi ve Riemann Geometrisini [112, 113] kullanması yönünden diğer yöntemlerden ayrılır. UMAP, genellikle veri görselleştirme, sınıflandırma ve kümeleme için kullanılır. Bu süreçte Riemann geometrisi, manifoldun yapısını koruyarak veri noktalarını yerleştirme amacı taşır. Riemann geometrisini etkili bir şekilde kullanması UMAP yöntemini, biyomoleküler sistemlerin MD simülasyonlarıyla değerlendirildiği ve büyük veri kümeleri içeren pek çok çalışmada kullanılmasını sağlamıştır [102, 114–117]. UMAP diğer indirgeme yöntemlerine göre pek çok avantaj sağlayarak büyük verilerin analizinin etkili bir şekilde gerçekleştirilmesini sağlamaktadır [117–119].

Fusarium oxysporum'daki hedefler ve patojenin özellikleri

Geniş spektrumlu antifungal bileşik arayışımızda fungus patojenlerinin genelini hedeflerken, bu patojenler arasında en büyük zarara yol açan ve mücadelesi en zor olan *Fusarium oxysporum*'a yoğunlaşarak *in vitro* ve *in silico* çalışmaları bu organizmayı hedefleyerek gerçekleştirdik.

Fusarium oxysporum; Fungi âlemi, Ascomycota filumu, Sordariomycetes sınıfı, Hypocreales ordosu ve Nectriaceae familyası içinde yer alır. Tür, genetik ve patojenik açıdan geniş bir “species complex” oluşturur. Bu topluluk, evrimsel olarak yakın fakat konak tercihi, virulens repertuarı ve genomik düzeni açısından farklı “forma specialis” (özel konaklara adepte olma) alt gruplarına ayrılır; her biri belirli bir konak bitki türünde vasküler solgunluk veya kök çürüklüğü tablosuna yol açar.

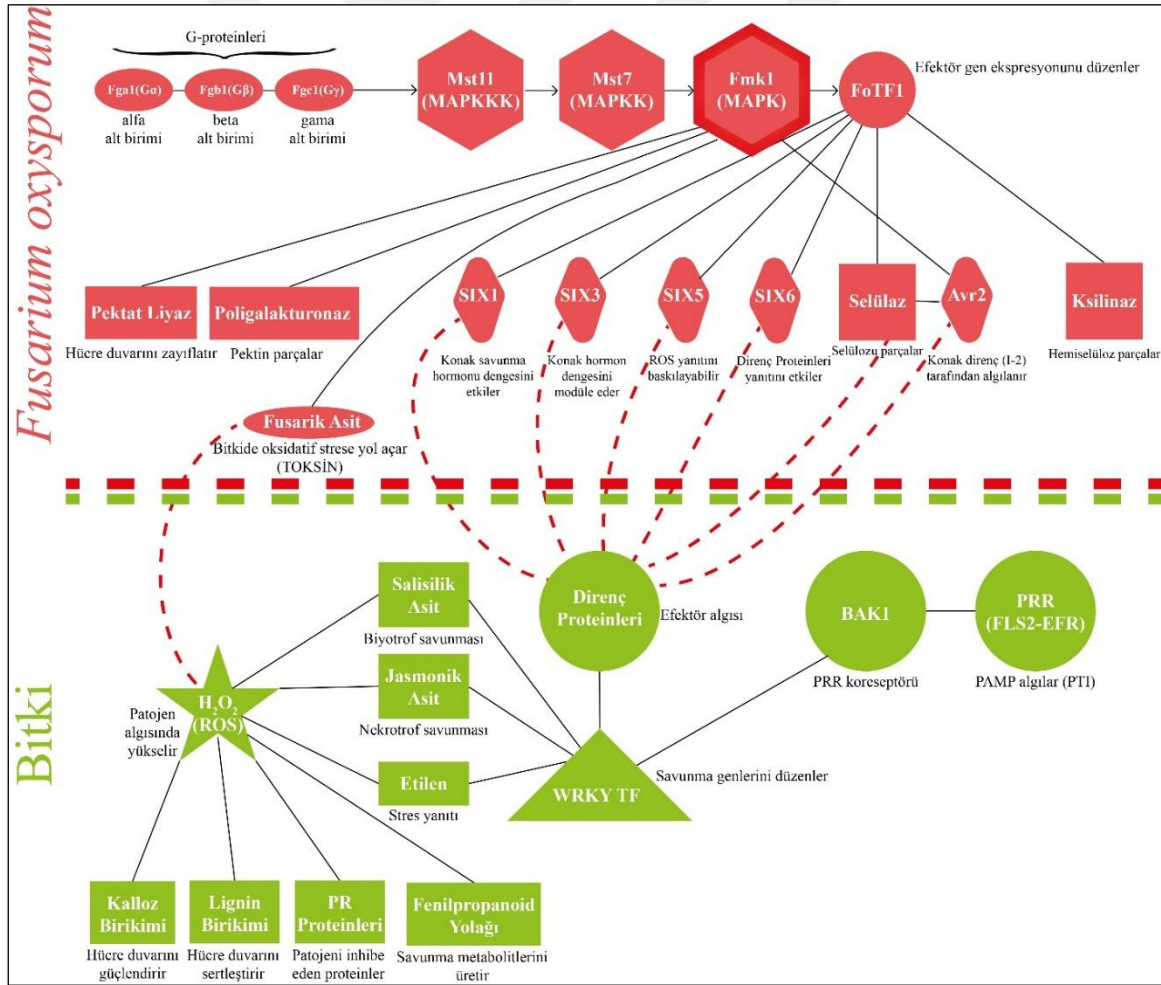
“Çekirdek kromozom”-“aksesuar kromozom” ikiliğine sahip olan organizmada çekirdek kromozom yaşamsal döngünün devam ettirilmesinde ana kalıtsak faktörü oluştururken aksesuar kromozom transpozon (transpozisyon ile hareket eden DNA dizileri), ikincil metabolitlerin üretimi ve patojenite ile ilgili süreçleri yönetir. Özellikle aksesuar bölgelerde bulunan “SIX (*Secreted In Xylem*)” genleri, konak savunmasını baskılayıcı efektör proteinleri sentezler. Bu modüler genom mimarisi, türün hızlı evrimsel uyum yeteneğini ile ilaç direnci geliştirme mekanizmasını moleküler düzeyde açıklar.

Fusarium oxysporum yüksek ve hızlı bulaş oranı ile toprak-kökenli en önemli fitopatojenlerden biridir. 100’den fazla taksonomik seviye çeşitliliğine sahiptir. Bunlardan ekonomik olarak en geniş perspektifte zarar verme seviyesinde olan *lycopersici* (domates), *cubense* (muz) ve *vasinfectum* (pamuk) öne çıkmaktadır. Toprak için latent klamidospore havuzu, dezenfeksiyon veya ürün rotasyonu gibi klasik tarımsal önlemlerle tam olarak önlenmesi mümkün değildir. Yüksek genetik plastisite sahip oluşu ilaç direnci geliştirmeye yatkınlığını açıklarken hızlı yayılım süreci ve epidemiyolojik olarak yayılım göstermesi önemli özelliklerindendir.

Bilinen kimyasal fungusitler bu türe karşı kısa vadeli etki sağlar ancak direnç gelişimi kısa sürede tetiklenir. Biyolojik kontrol ajanları olan *Trichoderma spp.*, *Pseudomonas spp.* gibi organizmalar ve antifungal metabolit üretim mekanizmalarına sahip olmaları ile umut vadetseler de kontrollü koşullara olan gereksinim bu konudaki önemli zorluklardan birini oluşturur. Genetik direnç geliştirmek amacıyla konak bitkilerde dayanıklılık genleri ve SIX efektörlerini tanıyan sensör yapılar gibi patojen yayılımı ile ilgili konular araştırılmaktadır ve ileri moleküler yaklaşımlar, aksesuar kromozomların CRISPR-bazlı silinmesi veya interferansı ile patojenite faktörlerini hedef alması bakımından incelemelere konu olmaktadır.

Fusarium oxysporum organizmasının konakçıdaki kolonizasyonu yayılım süreci işleten pek çok patojen organizmadakine benzer şekilde algıla-yanıtla-yayıl şeklinde gerçekleşir. *Fusarium oxysporum*’u ise diğer patojen organizmalarından ayıran ise algıla-yanıtla-yayıl sürecinin oldukça karmaşık ve modüler bir protein şebekesiyle yönetilmesidir. Bu süreci yöneten Mst11, Mst7, Fmk1 proteinlerinin verilen sıralar ile birbirini tetikleyerek Mitojenle Aktifleşen Protein Kinaz (MAPK) kaskadınıdır. Mitojenle aktifleşen protein kinaz ailesini oluşturan bu üç yapı, algı katmanından gelen heterotrimerik G-proteinler (Fga1 [Gα], Fgb1

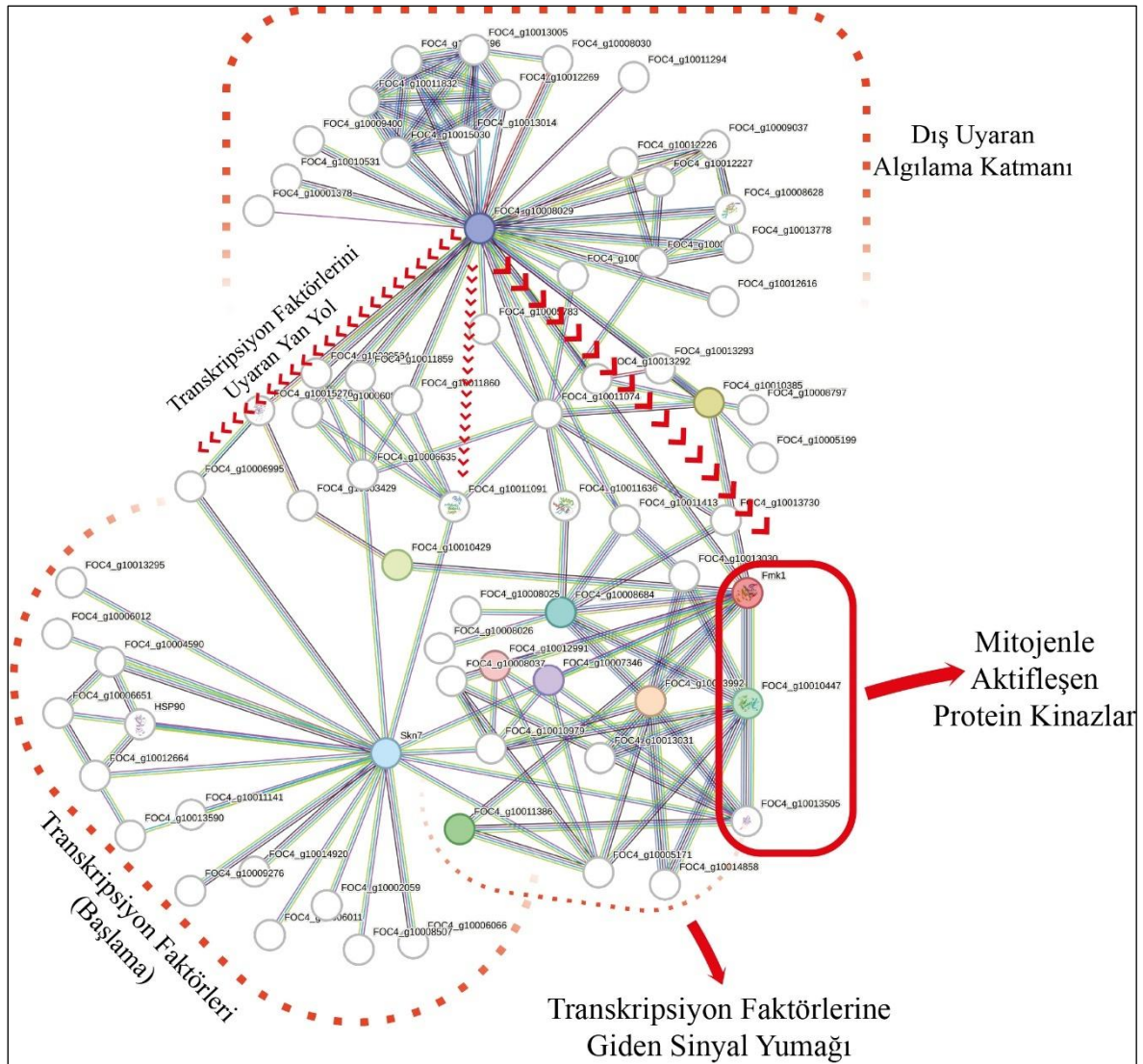
[G β] ve Fgc1 [G γ]) konaktaki besin ile savunma sinyallerini algılayarak ilk tetiklenme sinyalini alır. Böylece patojenin yayılım süreci başlar. MAPK kaskadının son kademesindeki Fmk1 nükleer translokasyonla FoTF1 transkripsiyon faktörünü fosforile eder; bu faktör “SIX”, “Avr” ve hücre duvarı yıkıcı enzim genlerinin promotörlerinde bulunan konservatif FoTF-box dizilerine bağlanarak geniş bir patojenite programını koordine eder ve hızla yayılmayı sağlar. Bu sürecin kontrolünde MAPK kaskadının tetiklenmesi ve son basamaktaki Fmk1 proteini yayılım için gerekli olan efektör proteinlerin sentezlenmesi sinyalini iletmesi bakımından yolağın en önemli basamağını oluşturur. *Fusarium oxysporum* organizmasının konakçıya, yani bitkiye yayılım sürecini ana hatları ile anlatan Şekil 1.17.’de G proteini ile eşleşmiş protein ailesinden başlayan sürecin bitkiye saldırı mekanizmasındaki SIX enzimlerinin üretiminden sorumlu basamak olan FoTF1’e olan sinyal iletimi şematize edilmiştir.



Şekil 1.17. *Fusarium oxysporum* organizmasının bitkiye bulaş sürecinde etkili olan proteinler ve etki mekanizması bitkinin gösterdiği direnç tepkisiyle birlikte gösterilmiştir

Fusarium oxysporum'da özelleşmiş *SIX* proteinleri doğrudan bitkideki direnç proteinlerini hedef alır. Bitkinin direnç göstermesi kaçınılmazdır ancak hem özelleşmiş *SIX* proteinleri hem de *Fusarium oxysporum*'da FoTF1 proteinin tetiklediği *Selüloz/ksilinaz* enzimleri oluşumu ile kutikula altındaki selüloz-hemiselüloz ağı zayıflar, *pektat liyaz* kök hücre ara lamellerindeki Ca^{2+} -pektat komplekslerini parçalaması sonucu patojenin bitkiye hücrelerinin duvarından sızması kaçınılmazdır. Özelleşmiş *SIX* enzimleri derinlemesine incelendiğinde ise ksilemden hızla çoğalan hifler, *SIX5* üzerinden ROS (H_2O_2) akümüleyonunu baskıladığı; böylece konak lignifikasyon ve kalloz birikimi geciktirdiği görülür. Paralel olarak *SIX3* jasmonik asit dengesini bozarak nekrotrofik ortam avantajı yaratır.

Fusarium oxysporum'da MAPK kaskadında doğal adaptasyon sürecinin bir parçası olarak tetiklenmenin Mst11 ve Mst7 proteinlerini atlayarak Fmk1 proteinin tetiklenmesi söz konusu olmaktadır. İlaç direncini açıklayan başka bir süreç olarak dikkat çeken bu durum Şekil 1.18'de *Fusarium oxysporum*'daki proteinlerin birbiriyle biyosinyalleşme mekanizmasını detaylı olarak vermektedir. Şekil 1.18'de kırmızı yuvarlak içerisine alınan proteinlerin sinyalleşme için köprü olarak kullanılmasıyla patojen yayılım sürecinin Mst11 ve Mst7 proteinlerini kısmen de olsa atlayarak doğrudan Fmk1'e ulaştığı görülmektedir. Gerçekleşme olasılığı "yolların" genişliği ile gösterilen ve sinyal iletimi oranının düşük olmasına rağmen direnç durumlarında kullanılabileceği düşünülebilen bu biyosinyalleşme Fmk1'in daha önce bahsedilen işlevlerini yerine getirerek yayılım sürecini başlatmasıyla ve devam ettirilmesiyle sonuçlanır. Aynı görselde Fmk1'in merkezi rolü detaylı olarak biyosinyalleşmenin devamlılığını sağlayan ana proteinler arasında önemli bir basamak olduğu da açıktır. Bu bilgilerden yola çıkarak Fmk1'in işlevinin engellenmesi patojen ile mücadele büyük bir avantaj sağlar. Transkripsiyon faktörlerine giden yan yolların kullanımı ise Mitojenle Aktifleşen Protein Kinazlardan çok daha az tercih edilir.



Şekil 1.18. *Fusarium oxysporum*'ın hayat döngüsündeki kritik biyosinyalleşme basamakları

Fusarium oxysporum organizmasının protein yapılarının farklı forma specialis seviyeleri için detaylı yapı aydınlatması literatürde mevcut değildir. Yapı aydınlatması bulunan forma specialis seviyelerde özellikle efektör proteinlerin sekansları açıklığa kavuşturulmuştur. Bu proteinler SIX, Avr2, Pektat liyaz/Poligalakturonaz, Selülaaz/Ksilinaz ve Fusarik Asit Sentez Enzimleri bulunur ve forma specialis farkı olmasına rağmen yüksek sekans benzerliği gösterdiği Çizelge 1.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. *Fusarium oxysporum* bazı proteinlerin sekans benzerlik oranları.

Efektör	Fonksiyon	Sekans Korunumu (% Kimlik)*	Forma specialis Örnekleri
SIX1	Salisilik asit (SA) sinyallemesini baskılar	≥ 92	<i>lycopersici, cubense, conglomerans</i>
SIX3	Jasmonik asit (JA) dengesini modüle eder	75-85	<i>lycopersici, melonis</i>
SIX5	Konak ROS (H ₂ O ₂) yanıtını azaltır	≥ 90	Tüm ana gruplar
SIX6	Direnç (R) proteinlerinin tanınmasını engeller	60-70	<i>lactucae, radice-lycopersici</i>
Avr2	Ksilinaz inhibitörü; R-gen (I-2) tarafından algılanır	≥ 95	<i>lycopersici</i> spesifik
Pektat liyaz/Poligalakturonaz	Pektin parçalama	80-98	Yaygın
Selüloz/Ksilanaz	Selüloz-hemiselüloz hidrolizi	85-97	Yaygın
Fusarik Asit Sentez Enzimleri	Oksidatif stres indüksiyonu	yüksek	Yaygın

Aksesuar kromozom kökenli paraloglarda varyans genişliği olacağı unutmaması gereken bir konu olsa da çekirdek amino asit dizileri üzerinden hesaplanan ortalama değerlerin yüksek sekans benzerlik oranlarına işaret ettiği açıktır. Bunun yanında *Fusarium oxysporum* için her forma specialis kritik protein olan Fmk1 için sekans dizilemesi yapılmamıştır ancak bu son basamaktan tetiklenen efektör proteinleri sentezleyen genlerin yüksek sekans benzerliği için genetik malzemede de yüksek benzerlik olması kaçınılmaz görünmektedir. Bunun da başlıca nedeni proteinlerin mRNA tarafından uyarılarak sentezlenmeye başlamasıdır. Buradan mRNA'nın DNA'dan transkripsiyonu ile sentezlenmesinin gerçekleşmesinde yüksek sekans benzerliği oluşturan proteinler sentezlemesi için aynı veya çok benzer genetik materyale sahip olduğu sonucuna varılır. Fmk1 proteinin *Fusarium oxysporum* için pek çok forma specialis bulunduğu kesin olmakla beraber aynı görevi yerine getiren küçük sekans farklılıkları bulunan bir protein olması güçlü bir olasılıktır. Bunun en güçlü kanıtı anlatıldığı gibi aynı efektör proteinlerin sentezinin sadece genetik benzerlik söz konusu ile gerçekleşmesinin olanağı olmasıdır. Bu durum Fmk1 proteinin *Fusarium oxysporum* organizmasıyla mücadelede merkezi ve ana hedef haline getirir. Fmk1; MAPKKK→MAPKK→MAPK omurgasında yer alan, Mg²⁺-bağımlı aktif bölgesi ve yüksek sekans-yapı korunumuyla, *F. oxysporum* ve yakın akraba fitopatojenlerde patojeniteyi tetikleyen merkezi bir sinyal düğümüdür. Bu nedenle, konak çeşitliliğinden bağımsız, moleküler hedefli mücadele stratejilerinin odak noktası olarak öne çıkar.

Fmk1 kristal yapısı henüz aydınlatılmamış olsa da *Fusarium oxysporum* genomundaki Fmk1'in 355 amino asitlik (41, 193 Da) Ser/Thr-MAP kinazı kodladığı (UniProt: Q9HGU2)

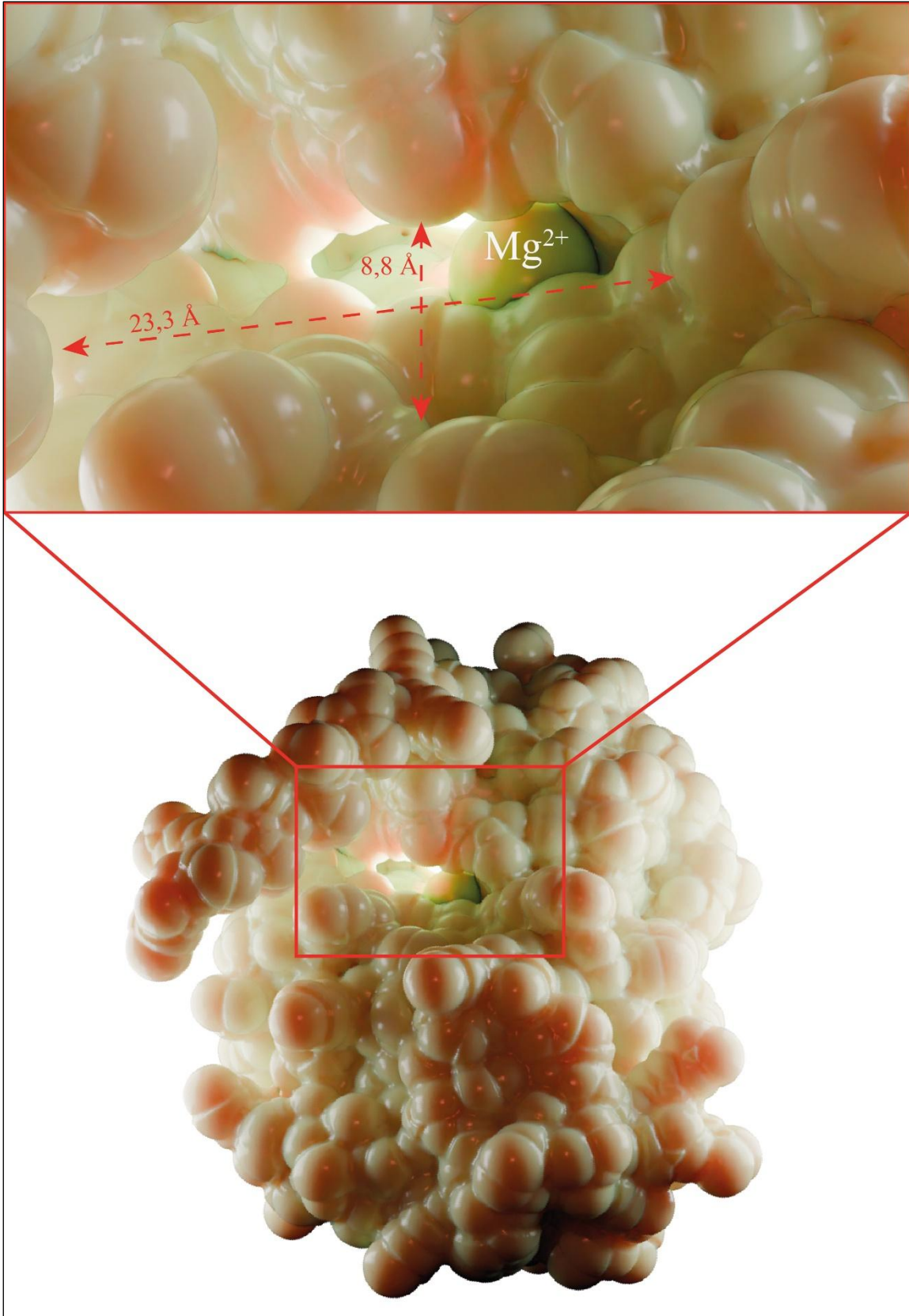
bilinmektedir. Fmk1; mayada Fus3/Kss1, pirinç patojeni *Magnaporthe oryzae*'de Pmk1, gri küf etmeni, *Botrytis cinerea*'de Bmp1 ve insan patojeni *Candida albicans*'ta Cek1 ile ortologdur. Bu ortologların %65–80 dizin benzerliği, virulens ve invaziv büyüme işlevlerinin filogenetik olarak geniş bir yelpazede korunduğunu gösterir. Farklı forma *specialis*'larda ise bu benzerlik çok daha fazladır.

Fmk1 protein yapısı *Fusarium oxysporum* hayat döngüsünde önemli bir düğüm noktasında ve hayati bir yolağın son proteini olduğu için organizmanın yayılım sürecinde pek çok efektif proteini tetikleyici konumdadır. Kök penetrasyonu ve yüzey hidrofobisitesi ile hücresel sağ kalıma etkisi Fmk1 gen ifadesi susturulmuş (Δ fmk1) mutantlarla, penetrasyon hiflerini kullanamaz hale gelmiştir ve kök yüzeyine tutunma 20 kat azalmıştır [120].

Hücre duvarı yıkıcı enzim ifadelerini tetiklediği için Fmk1'in inhibe edilmesi, *pektat liyaz*, *selülaz*, *ksilanaz* genleri Fmk1 bağımlı promotör aktivitesi ile regüle edilir; Δ fmk1 suşlarında bu enzimlerin transkript seviyesi 4 kata kadar düşer [121].

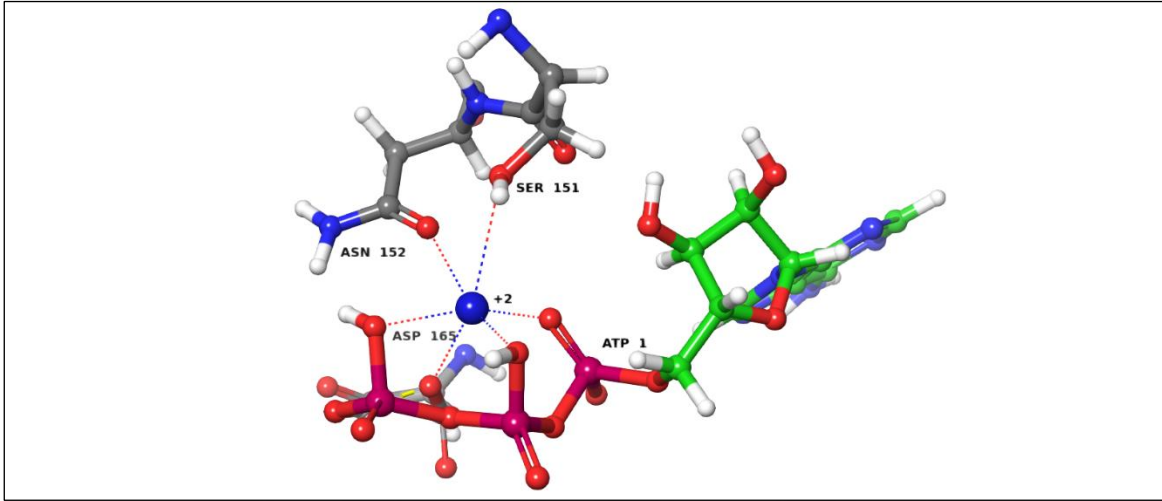
Fusarik asit biyosentezinde Fmk1, MAPK kaskadı tri-keto acid aminotransferaz kodlarını uyarak toksin üretimini optimize eder; muz patojeni TR4'de Fmk1 hiperfosforile varyantlar, konak oksidatif stresi baskılamada daha üstündür [122].

Vejetatif hif füzyonu ve yüzey algılama sistemi Msb2 mukin sensörü Fmk1'i aktive ederek kemotropik büyümeyi yönlendirir; bu hat bozulduğunda kolonide düzensiz morfoloji görülür [123]. Şekil 1.19'te görülen Fmk1 protein yapısı aktif bölgesine gömülü şekilde Mg^{2+} atomu barındırır ve bu atom katalitik mekanizmanın işlevini yerine getirmesini sağlayan ana unsurdur.



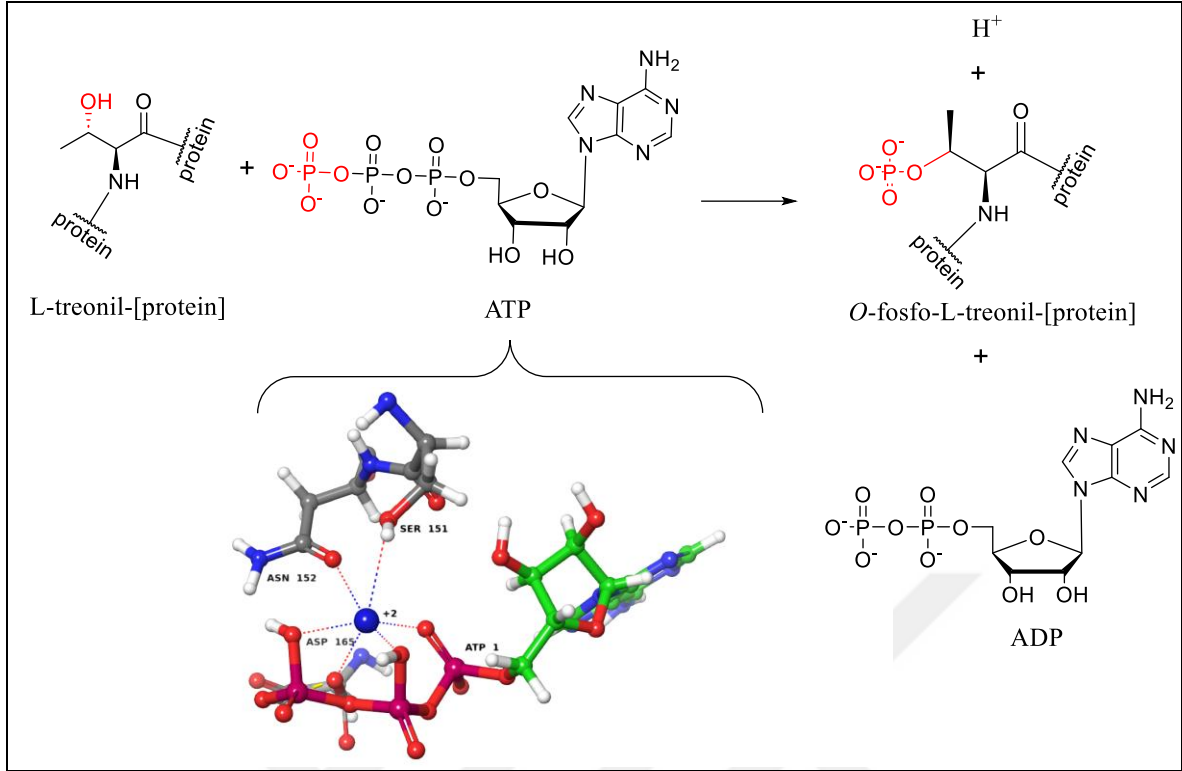
Şekil 1.19. AlphaFold 3 yapısı ile belirlenen Fmk1 protein yapısı genel ve aktif bölge görüntüsü

Fmk1 protein yapısının ana işlevi ATP'nin β/γ -fosfatlarıyla oluşturduğu oktahedral koordinasyon ile proteinin bu bölgesinde yer alan L-treonil üzerine ATP'den kopardığı bir fosfat grubunu ilavesini katalizlemesidir. Bu biyoreaksiyon sonucunda protein yapı O-fosfo-L-treonil taşıyan hale gelirken ADP ve bir H^+ ortaya çıkar. AlphaFold 3 ile belirlenen Mg^{2+} -ATP kompleksi pH 6 için optimize edilmiş ve OPLS4 kuvvet alanı uygulanmış olarak Şekil 1.20'te gösterilmiştir.



Şekil 1.20. AlphaFold 3 ile elde edilmiş ve OPLS4 kuvvet alanı ile Mg^{2+} -ATP arasındaki koordinasyon etkileşimleri oluşturularak geometri düzenlemesi yapılmış Fmk1 protein yapısının oktahedral geometrisi

Mg^{2+} 'nın elektro negatif yük yoğunluğu ile katalizlenen reaksiyon, fiziksel parametrelerle belirlenen substrat tanıma süreçlerini içerir. Protein yapıda işi yapan bölge olan aktif bölge yarığı Mg^{2+} atomunu derinliklerinde barındırırken bölge eni 8, 8 Å, uzunluğu ise 23, 3 Å kadardır. Fmk1 protein yapısı Şekil 1.21'te gösterilen reaksiyonunu katalizler ve sinyal iletim basamaklarında tetikleyici rol oynayacak olan konformasyonları indükler. Çözücü bulunan ortamlarda koordinasyona bir adet su molekülü protein yapıdan veya ATP'deki etkileşimlerden birinden feragat edilerek gerçekleşir. Reaksiyon sonucunda L-treonil ucunun stereokimyasında da değişiklik olmaktadır.



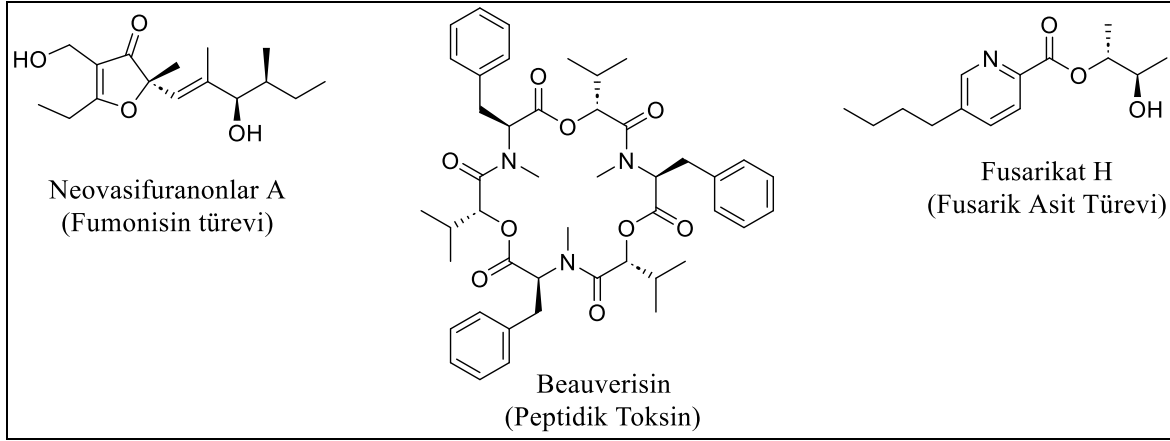
Şekil 1.21. Fmk1 protein yapısının biyokimyasal işlevi; reaksiyona giren bileşenler ve reaksiyon sonucu oluşanlar

Reaksiyonun katalitik baz olarak davranan Asp165 treonin yan zincirinin –OH grubundaki protonu alarak alkoksit (negatif yüklü oksijen oluşumunu sağlar ve proton geçici olarak Asp165 kalıntısına bağlı kalır. Alkoksit grubu, ATP’nin γ -fosfatına nükleofilik saldırı yapar. Bu esnada Mg²⁺ negatif yükleri dengeler. Mg²⁺-ATP kompleksini ve substrat treoninini hizalamaya yardımcı hidrojen-bağ köprüsünün bir parçası olarak Ser151 kalıntısı fosforil-transfer geometrisini stabilize ederek tüm yapıyı kilitleyip reaktif hizalamayı hızlandırır. Burada Ser151’in üstlendiği kritik görev Mg²⁺ ve fosfat grubunu doğru pozisyona kilitleyerek katalizin aktivasyon enerjisini düşürmek ve enzimin çevrim hızını artırmaktır. Protein kinazların genelinde Mg²⁺ bağlayan ana nokta bölgedeki aspartat amino asidi kalıntılarıdır ve bu kalıntının mutasyonu Mg²⁺/ATP bağlanmasını durdurduğu deneysel olarak kanıtlanmıştır [124]. Fmk1 proteininde de gerçekleşen olayın negatif yüklü Asp165’nin Mg²⁺’yi güçlüce tutması, Ser151’nin ise esnek hidrojen bağı desteğiyle ATP molekülünün konumunu aktif merkeze göre “ince ayar” yapmasıdır. Bu düzenleme Fmk1’in çevrim başına harcadığı entropik maliyeti minimize eder ve ATP’deki uç fosfat grubu kolay ayrılabilir hale gelir. Protein yapıdaki L-treonil kalıntısına bağlanma bu adımlarla gerçekleşir. Fusarik asit biyosentez kümesindeki piridinkarboksilik asit türetimini

katalizleyen ana enzim olan FusA; Mg^{2+} bağımlı dekarboksilaz, Fmk1 sinyalinin doğrudan hedefi olan Aktivatör Protein-1 ailesinden, oksidatif stres ve toksin gen ekspresyonunu yöneten bZIP tipi transkripsiyon faktörünü fosforile edilerek aktifleştirir. Reaksiyon sonucu ortaya çıkan ürünlerden bir adet H^+ , çözücü ortamı olan suya geçerek protein tamponları tarafından yutulur. Organizmanın hayat döngüsündeki pH 6 civarı optimum seviyeler, H^+ ortaya çıkışının etkisinin sınırlı kalmasında veya organizmanın çözücü ortamının pH'ını düşürerek kendine üreme ve çoğalma için zemin hazırlamasıyla ilgili pek çok alternatif ve potansiyel olduğunun göstergesidir. Böylece MAP kinazların aktivasyon döngüsündeki eşzamanlı fosforilasyon; Fmk1 kinazı tam aktif konuma getirir. Fusarik Asit, ksilemde *in planta* 15–30 μM 'a ulaştığında konakta NADPH oksidaz temelli ROS birikimini inhibe eder ve lignifikasyon gecikir. Bu, bitkinin patojene tepisinin serbest radikallerle göstermesini engelleyen olgudur. Söz konusu kimyasal baskı, Fmk1'in indüklediği pektat liyaz-selüloz eksenini sinerjik olarak destekler; hifler ksilemden hızlıca mezofil dokulara yayılır.

İkincil metabolitler ve kimyasal bileşiklerin çeşitliliği bu patojenin konak savunmasını aşma ve yayılım perspektifinin temel belirleyicisidir. Bu amaçla biyosentezi gerçekleştiren bileşiklerin yeni tanımlanan sayısı sadece 2019-2024 yılları arasında *Fusarium* (tür geneli) için 250'den fazla olarak rapor edilmiştir [125]. Bu çeşitlilik poliketidler(fumosinler), alkaloidler (fusarik asit), peptidik toksinler ve terpenoidler şeklinde dört ana kimyasal sınıfta toplanarak türün ürettiği kimyasal çeşitliliği gösterirken bu bileşiklerin patojenin saldırı araçları olarak kullanıldığı düşünüldüğünde Fmk1 düğümünün düzenleyici rolünün bu geniş spektrumlu üretiminde etkili olduğu görülür.

İkincil metabolitlerin oluşturduğu bileşik kümeleri aksesuar kromozomların telomerik bölgelerine yerleşmiştir. Bu bölgeler transpozon-zengindir ve ülseratif H3K27me3 heterokromatini barındırır; heterokromatin açılmasının ana tetikleyicisi, Fmk1-FoVel1-FoLae1 üçlüsüdür. Burada yine Fmk1'in zincirleme haberleşmeyi başlatarak ikincil metaboliklerin biyosentezini tetiklediği bilinmektedir. FoVel1 kromatin okuyucusu Fmk1'den gelen sinyali okuduğunda, histon metilasını hedef alan FoLae1 epimetilaz ile birlikte toksin kümelerinde aktif açık kromatin oluşturur. Bu Şekil 1.22'da görülen bazı bileşikler gibi *Fusarium oxysporum*'un ürettiği fumonisin, fusarik asit ve beauverisin gibi toksin kümelerinin biyosentezinin gerçekleşmesini sağlar [126].



Şekil 1.22. *Fusarium* türlerinde Fmk1 düğümününden alınan sinyal ile biyosentezi yapılan bazı bileşikler

Fusarik asitler pikolinik asidin yan zincir modifikasyonlarıyla türetilen, bitkide kloroz, hayvanda kardiyotoksisite yapan bir alkaloid iken fumonisinler C_{18} poliketid bazlı fumonisin B₁/B₂, sfingolipid biyosentez enzimi serin palmitoil transferazı geri-besleme ile baskılayarak bitkide programlı hücre ölümünü tetikler. Beauverisin türevleri ise iyonofor özellikleriyle konak protoplazmasında Ca^{2+} homeostazını bozar. Bozulan Ca^{2+} dengesi hücrede iyon dengesizliğini meydana getirerek bitki hücresinde, hayvanlarda meydana gelen sodyum-potasyum dengesizliği sonucu oluşan inflamasyonun bir benzerini bitki hücresinde oluşturur.

Tüm bu etkileri, Fmk1 proteinini *Fusarium oxysporum*'un hayat döngüsünde kritik bir konuma getirirken pestisit tasarımı için de birincil hedefler arasında olmasını sağlar. Fmk1 benzeri yapıların zararlı-patojen organizmalardaki hayat döngülerini yöneten konumu Fmk1'in hedeflenmesinin yüksek seçicilikle, pestisit tasarım süreçlerinin akılcı kullanımı ile ilaç direnci ve çevre duyarlılığı gibi konularda verimli olmasını sağlar.

Bu bilgiler doğrultusunda yeni 1, 2, 3-triazoilkarbamat bileşiklerinin sentezini gerçekleştirerek yapı aydınlatmasını ve karakterizasyonunu gerçekleştirdik. DFT çalışmasıyla elektronik yapılarını incelediğimiz bileşiklerimizle genel patojen fungus yelpazesindeki mitojenle aktifleşen protein yolaklarını hedefledik. Bileşiklerimizin *Fusarium oxysporum*'un mitojenle aktifleşen protein yolağının da bir parçası olan Fmk1 proteini üzerindeki etkisini kuantum kimyası destekli hesaplamalı yaklaşımlarla değerlendirerek bilimsel iş birlikleri kapsamında *in vitro* çalışmalarının gerçekleştirilmesini sağladık. *In vitro* çalışmalarda bileşiklerimizin hem *Fusarium oxysporum* üzerindeki

etkinliği deneysel olarak incelenirken ayrıca faydalı bakteri suşları üzerindeki etkisinin de incelenmesi ile evre sağlığı üzerindeki etkisini de değerlendirerek büyük çaplı veya endüstriyel kullanımındaki potansiyel etkisine de ışık tutmayı amaçladık.



2. GEREÇLER VE YÖNTEM

2.1. Organik Bileşiklerin Sentezi

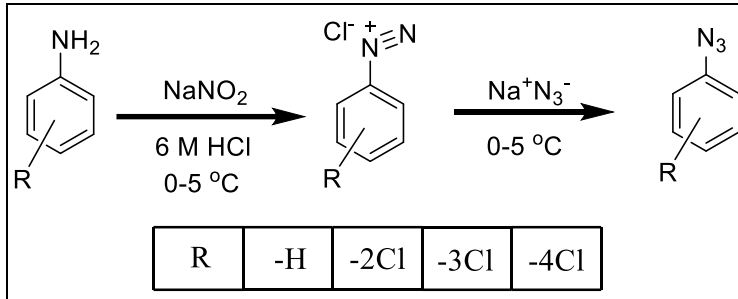
2.1.1. Reaktifler ve cihazlar

Bu çalışma kapsamında kullanılan 4-kloroanilin, 3-kloroanilin, 2-kloroanilin, büt-3-in-1-ol (bütin-1-ol), pent-4-in-1-ol (pentin-1-ol) izosiyanobenzen, 1-kloro-4-izosiyanobenzen, sodyum nitrit (NaNO_2), sodyum azür (NaN_3), 2-metinpropan-2-ol (tert-bütanol), bakır sülfat (CuSO_4), sodyum askorbat (Na askorbat), N, N-dietiletanamin (trietilamin), tolüen, diklorometan (DCM), tetrahidrofuran (THF), dietil eter, hidroklorik asit (HCl), sodyum sülfat (NaSO_4) kimyasallarının her biri yüksek saflıkta olacak şekilde Sigma Aldrich ve Merck firmalarından temin edilmiştir. Kromatografi çalışmalarında kullanılan çözücü sınıfındaki kimyasallar olan n-hekzan ve etil asetat ise teknik kalitede temin edilerek destilasyonla kullanıma hazır hale getirilmiştir. Sentezlenen bileşiklerin yapı aydınlatması Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde bulunan FT-IR ATR spektrometresi, Gazi Üniversitesi Temel ve Mühendislik Bilimleri Merkez Laboratuvarı U.A.M. (GÜTMAM)'da bulunan 500 MHz Bruker Avance NEO Sıvı NMR Spektrometresi ve Bilkent Üniversitesi UNAM'da bulunan Agilent Technologies 6224 TOF-LC/MS spektrometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm maddelerin yapı karakterizasyonu için erime noktası tayini Stuart Melting Point tipindeki, yine Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde bulunan erime noktası tayin cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.1.2. Sentez yöntemi

Farklı anilinlerden fenil azürlerin sentezi

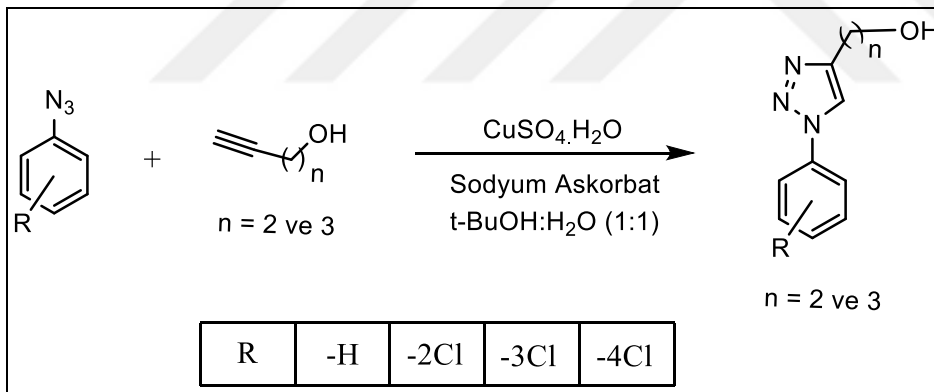
Anilin, 4-kloroanilin, 3-kloroanilin, 2-kloroanilin bileşiklerinden ilgili azürlerin sentezi literatürde bilinen yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla düşük sıcaklıklarda amin önce NaNO_2 varlığında diazonyum tuzuna dönüştürülmüş ve ardından NaN_3 ile reaksiyona sokularak fenil azürler (Şekil 2.1) elde edilmiştir [127].



Şekil 2.1. Fenil azür bileşiklerinin sentezi

Fenil azürlerden 1-fenil-1*h*-1, 2, 3-triazol-4-iletanol ve 1-fenil-1*h*-1, 2, 3-triazol-4-ilpropanol türevlerinin sentezi

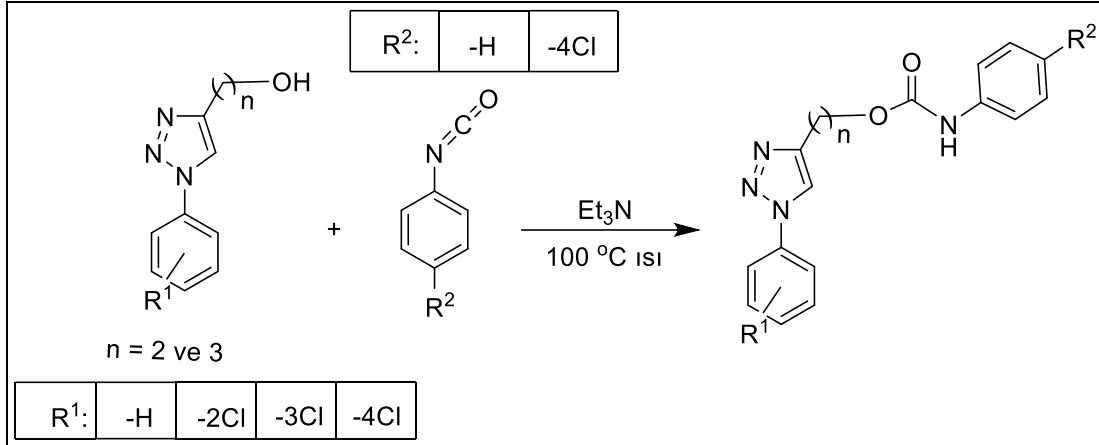
Elde edilen fenil azür bileşikleri ve alkinollerin “Klik Kimyası Temel Prensipleri” kullanılarak katalizör olarak bakır sülfat ve sodyum askorbat varlığında [3+2] siklokatılma tepkimesiyle triazolalkol türevleri sentezlenmiştir [128]. Bu senteze ait şema Şekil 2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Fenil azür bileşiklerinden triazolalkol türevlerinin sentezi

Farklı köprü zincir uzunluğuna sahip feniltriazol alkollerden feniltriazolil karbamat türevlerinin sentezi

Feniltriazol alkoller trietilamin katalizörlüğünde toluen çözücüsü varlığında izosiyanat türevleri ile etkileştirilerek alkol grubundan nükleofilik katılma tepkimesi ile karbamatlar elde edilmiştir [129]. Bu tepkime için kullanılan sentez şeması Şekil 2.3’te detaylı olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Karbamilasyon için kullanılan sentez yönteminin detayları

2.2. Hesaplamalı Yöntem

2.2.1. Moleküler mekanik

Protein-ligand etkileşimlerinin ön görülmesi ile ilgili hesaplamalı yaklaşımların temelini oluşturan moleküler kenetlenme ve moleküler dinamik yöntemleri, yerel maksimum ve minimumlarda göstermiş olduğu başarıları neticesinde genellikle tercih edilir. Moleküler mekanik, atomlar ve moleküller arasındaki etkileşimlerin klasik mekanik sayalarınca modellenmesini içeren bir yaklaşımdır. Biyomoleküllerin devasa ve karmaşık yapılarına sağladığı basit ve etkili çözümler sağlar. Böylece proteinler, DNA, RNA gibi yapıların küçük organik moleküllerle olan ilişkisi de dahil olmak üzere biyomoleküllerin yapılarının incelenmesinde moleküler mekaniğin kullanımı yaygın hale gelmiştir.

Moleküler mekanik, enerji hesaplamalarında potansiyel enerji fonksiyonuna dayanan yaklaşımlar kullanır ve bu yaklaşımlar; bağ uzunlukları, bağ açıları, torsiyonlar açıları ve kovalent olmayan etkileşimler (elektrostatik etkileşimler, van der Waals kuvvetleri vb.) içeren detaylı hesaplamaları içerir.

Bağ enerjisi

Atomlar arasındaki kovalent bağların esnekliğini ifade eder ve aşağıda gösterilen denklem olan harmonik osilatör modeliyle temsil edilir:

$$E_{\text{bağ}} = \sum k_b (r - r_0)^2 \quad (2.1)$$

Burada r_0 , bağ uzunluğunun dengedeki bir değeridir.

Açısal enerji

Açılarıdaki sapmaların hesaplanması ile elde edilen bir değerdir ve aşağıdaki denklem ile temsil edilir:

$$E_{\text{açı}} = \sum k_{\theta} (\theta - \theta_0)^2 \quad (2.2)$$

Burada θ_0 , dengedeki açı değeridir.

Torsiyon enerjisi

Bağlar ve atomlar arasındaki dönme hareketini temsil eder ve aşağıdaki denklemle ifade edilir:

$$E_{\text{torsiyon}} = \sum V_n [1 + \cos(n\phi - \gamma)] \quad (2.3)$$

Kovalent olmayan etkileşimler

Atomlar arasındaki kovalent olmayan etkileşimlerin bir ifadesini oluşturarak temel bir yaklaşım sunan denklem Lennard-Jones Potansiyeli ve Coulomb potansiyelini ifade eden aşağıdaki denklemdir:

$$E_{\text{nonkovalent}} = \sum \left[4\epsilon \left(\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right) + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right] \quad (2.4)$$

Lennard-Jones Potansiyeli iki atomun sahip olduğu yüklere göre birbirine yaklaşabileceği en düşük uzaklığı ifade eder ve bu yakınlığın daha da azzalması enerjinin sonsuza gitmesi anlamına gelir. Coulomb Potansiyeli ise elektriksel olarak yüklü parçacıkları tanımlayan fiziksel bir modeldir.

Tüm bu enerji fonksiyonlarının toplamı ise toplam potansiyel enerji olarak aşağıdaki gibi ifade edilir:

$$E_{toplam} = E_{bağ} + E_{açı} + E_{torsiyon} + E_{nonkovalent} \quad (2.5)$$

Moleküler mekanikte tüm bu enerji hesaplamaları ve fonksiyonlar parametrik ifadeler içeren kuvvet alanları kullanılarak hesaplanır.

Kuvvet alanı

Moleküler mekanikte kuvvet alanları, enerji hesaplamaları için kullanılan matematiksel modellerdir ve kullanılacakları yere göre farklı parametrik özellikler amaca göre detaylandırılır. Yaygın kullanılan kuvvet alanlarında küçük molekül ve ligand modellemesinde OPLS, proteinler, DNA ve lipidler gibi biyomoleküller sistemlerde AMBER ve CHARMM öne plana çıkar. GROMOS ise çözücü etkileşiminin modellenmesi gerektiği zamanlarda ağırlıklı olarak kullanılır. Kuvvet alanlarından elde edilen bilgilerin doğruluğu tasarım amaçlarına göre değişse de çeşitli atomlarla ilgili genel parametreleri içerdikleri için geniş bir yelpazede kullanılmaktadır. Aşağıda kuvvet alanların kullanım türlerine yönelik hazırlanmış Çizelge 2.1 detaylı bilgi vermektedir:

Çizelge 2.1. Yaygın kuvvet alanlarının özellikleri, kullanım alanları, bilinen avantajları ve sınırlamaları

Kuvvet Alanı	Temel Özellikler	Kullanım Alanları	Avantajları	Sınırlamaları
AMBER	Protein, DNA ve RNA için tasarlanmıştır.	Protein-ligand simülasyonları, DNA ve RNA dinamikleri.	Yüksek doğruluk. Geniş kullanıcı topluluğu.	Standart olmayan moleküller için zor parametrelendirme.
CHARMM	Protein, lipid ve karbonhidratlar için geniş kapsamlıdır.	Membran proteinleri, karbonhidratlar ve biyolojik kompleksler.	Geniş parametre seti. Membran modellemeye uygun.	Parametre uyumu zorlukları. Daha yüksek maliyet.
GROMOS	Sıvılar ve biyomoleküller için tasarlanmıştır.	Proteinlerin çözeltideki davranışları, sıvılar ve çözücüler.	Hızlı enerji minimizasyonu. Çözücü etkilerinde güçlü.	Karbonhidratlarda sınırlı. Daha az yaygın.
OPLS	Non-kovalent etkileşimlerde iyi. Küçük moleküller için tasarlanmıştır.	Küçük moleküller, ligand kenetleme ve ilaç tasarımı.	Küçük moleküller için optimize ve yüksek doğruluğu.	Büyük biyomoleküller için sınırlı kapsam.

Moleküler mekanik-genelleştirilmiş born yüzey alanı (mm/gbsa)

MM/GBSA moleküllerin serbest enerjisini hesaplamak için kullanılan bir yöntemdir. Özellikle protein-ligand komplekslerinde bağlanma serbest enerjisini hesaplamak amacıyla kullanılması protein-ligand etkileşimi hakkında fiziksel koşullardaki duruma dair daha gerçekçi ön görüler yapılmasını sağlar. MM/GBSA yöntemi MM enerji hesaplamalarını ve çözgen etkilerini birleştirir ve hesaplamalar aşağıdaki formül kullanılarak gerçekleştirilir:

$$\Delta G_{bağlanma} = \Delta E_{MM} + \Delta G_{\text{çözücü}} + \Delta G_{SA} \quad (2.6)$$

ΔE_{MM} moleküler mekanik enerji hesabı

Yukarıdaki formülde ΔE_{MM} moleküler mekanik ile hesaplanan enerjiyi temsil eder ve moleküler mekanik enerji aşağıdaki bağlanma enerjisinin hesaplandığı formüle dayanır:

$$\Delta E_{MM} = \Delta E_{bağ} + \Delta E_{elektrostatik} + \Delta E_{vdW} \quad (2.7)$$

Bu formüldeki $\Delta E_{bağ}$ atomlar arasındaki kovalent bağları, $\Delta E_{elektrostatik}$ atomlar arasındaki yük etkileşimlerini ve ΔE_{vdW} dispersiyon ve itici kuvvetlerin etkisini ifade eder.

$\Delta G_{\text{çözücü}}$ çözgen etkisi

Çözücü etkileşimlerinin modellenmesi ve hesaplamaya dahil edilmesi için kullanılır. Polar ve apolar çözücülerin etkileşim enerjileri hesaplanır. Polar çözücülerde genelleşmiş Born yaklaşımını kullanarak hesaplama yaparken, apolar çözücülerde çözücü-molekül etkileşimlerinin yüzey alanına bağlı hesaplama yapılır.

ΔG_{SA} yüzey alanı enerjisi

Molekülün çözücüye temas eden yüzey alanın hesaplamaya dahil edilmesi anlamına gelir ve çözücü erişim yüzey alanı (yani SASA) şu formülle ifade edilir:

$$\Delta G_{SA} = \gamma \cdot SASA + b \quad (2.8)$$

Bu formülde γ , SASA katsayısıdır ve genellikle $0.00542 \text{ kcal/mol/\AA}^2$ olarak kullanılır. b ise sabit enerji terimidir.

Bağlanma enerjisi hesaplaması

Denklemlerin ligand, reseptör ve reseptör-ligand kompleksi için ayrı ayrı hesaplanması sonucu elde edilen değerlerin aşağıdaki denklemde yerine konulması sonucu bağlanma enerjisi elde edilir:

$$\Delta G_{\text{bağlanma}} = G_{\text{kompleks}} - (G_{\text{reseptör}} + G_{\text{ligand}}) \quad (2.9)$$

2.2.2. Kuantum mekaniği

Moleküler mekaniğin elektron ve çekirdek gibi çok küçük sistemleri açıklamadaki yetersizliği bir dereceye kadar hata payını beraberinde getirir. Kuantum mekaniğinin temellerinin atılmasıyla küçük sistemlerin davranışlarının açıklanması mümkün hale gelirken, etkileşim hesaplamalarında da doğruluk artmaktadır. Kuantum mekaniğine dayalı hesaplamalar temelde Schrödinger dalga denkleminin çözülmesine dayanmaktadır. İncelenen sistemin enerjisi dalga fonksiyonun çözümünden elde edilir. Fonksiyonun çözümü ise dalga fonksiyonuna uygulanan operatörlerle gerçekleşir. Kuantum mekaniksel sistemlerin temel çözümünde Schrödinger dalga denklemi, enerji öz değerini belirlemek için kullanılır ve aşağıdaki formülle ifade edilir:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (2.10)$$

$\hat{H}$ Hamiltonian operatörünü, Ψ dalga fonksiyonunu ve E enerji öz değerini tanımlar. Hamiltonian Operatörü kinetik enerjiyi ve potansiyel enerjiyi de hesaba katarak sistemin toplam enerjisini aşağıdaki gibi ifade eder:

$$\hat{H} = T_e + T_n + V_{en} + V_{ee} + V_{nn} \quad (2.11)$$

Denklemde T_e elektronların kinetik enerjisini ifade eder. Bu terim elektron dalga fonksiyonunun ikinci türevi üzerinden hesaplanır ve elektron hareketi ile oluşan momentumu dikkate alır. T_n çekirdeğin kinetik enerjisini ifade eder ve çekirdek elektronlara göre çok daha ağır olduğundan yavaş hareket eder. Dolayısıyla bu terim çoğu zaman ihmal

edilebilir. V_{en} terimi elektron-çekirdek potansiyel enerjisini elektrostatik çekim kuvvetleri ile hesaba katarak içerir. Bu genellikle Coulomb Yasası olarak tanımlanır. V_{ee} elektron-elektron arasındaki potansiyel enerjiyi ifade eder ve elektronların birbirinden uzak durma eğilimlerini hesaba katar. V_{nn} çekirdek-çekirdek potansiyel enerjisini ifade eder. Çekirdekler pozitif yüklü olduğundan birbirlerini itme eğilimindedir ve bu itmenin potansiyel enerjiye katkısı bu ifade ile sağlanır. Hamiltonian Operatörü sistemlerdeki enerji terimlerini ayırarak sistemin detaylı olarak incelenmesini mümkün kılar. Her bir terim, fiziksel bir etkileşimi veya hareket türünü temsil ettiğinden dalga fonksiyonunu “gerçek” değerlere yaklaştırır.

Born-oppenheimer yaklaşımı

Born-Oppenheimer Yaklaşımı atom çekirdekleri ile elektronların hareketinin ayrı ayrı ele alınabileceği prensibine dayanmaktadır. Atom çekirdeği ve elektronlar arasındaki kütle farkının çok büyük olmasından dolayı, elektronlara göre çok ağır olan çekirdeğin daha yavaş hareketi bu yaklaşımın temelini oluşturur. Kütle ve hız farkı, çekirdek ve elektronun hareketinin birbirinden ayrılmasına olanak tanır. Bu prensiplere dayalı olarak toplam dalga fonksiyonu çekirdeklerin ve elektronların dalga fonksiyonlarının çarpımı olarak aşağıdaki gibi ayrılarak gösterilebilir:

$$\Psi_{toplam}(r, R) \approx \Psi_{elektron}(r; R) \Psi_{çekirdek}(R) \quad (2.12)$$

Burada r , electron koordinatlarını ifade ederken, R ise çekirdek koordinatlarını ifade eder. Böylece Born-Oppenheimer Yaklaşımı ile Hamiltonian yeniden düzenlenerek aşağıdaki gibi ifade edilir:

$$\hat{H} = \hat{H}_{elektron} + T_n + V_{nn} \quad (2.13)$$

Yukarıdaki formülde $\hat{H}_{elektron}$ sadece elektron hareketine bağlı olan kısmı ifade eder:

$$\hat{H}_{elektron} = T_e + V_{en} + V_{ee} \quad (2.14)$$

Elektronlar için Schrödinger denklemi:

$$\hat{H}_{elektron} \Psi_{elektron}(r; R) = E_{elektron}(R) \Psi_{elektron}(r; R) \quad (2.15)$$

Bu denklemde $\Psi_{elektron}(r;R)$ sabit kabul edilen çekirdek konumuna bağlı olarak hesaplanan elektron dalga fonksiyonudur. $E_{toplamlam}(R)$ ise sabit kabul edilen çekirdek konumları için elektronların toplam enerjisidir. Her bir R değeri için hesaplanan $E_{toplamlam}(R)$ çekirdek hareketini belirleyecek potansiyel yüzeyin önemli bir bileşenidir.

Elektronların enerjisi, her bir sabit R değeri için belirlenip potansiyel bir fonksiyon gibi ele alındıktan sonra çekirdek denklemi şöyledir:

$$(T_n + E_{elektron}(R) + V_{nn})\Psi_{çekirdek}(R) = E_{toplamlam}\Psi_{çekirdek}(R) \quad (2.16)$$

Çekirdeklerin titreşimsel ve dönme hareketlerini hesaplamak için kullanılan bu denklemde $\Psi_{çekirdek}(R)$ çekirdek dalga fonksiyonudur. $E_{toplamlam}$ ise molekülün toplam enerjisidir.

Bu yaklaşım çekirdek konumlarının parametre olarak alarak elektron çözümlerini kullanan bir potansiyel enerji yüzeyi tanımlar ve aşağıdaki şekilde ifade edilir:

$$V(R) = E_{elektron}(R) + V_{nn} \quad (2.17)$$

Born-Oppenheimer Yaklaşımında adyabatik temsillerde elektron dalga fonksiyonları çekirdeğin yavaş hareketini içeren dalga fonksiyonlarına uyumlu hareket eder. Yani elektronlar çekirdeğin yer aldığı pozisyonlara “hızlı” bir şekilde uyum sağlar. Bu prensiplerle Born-Oppenheimer Yaklaşımı protein-ligand kenetlenmesinde ligand proteinde bir cebe bağlandığında oluşan potansiyel enerji yüzeyini hesaplamada etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Adyabatik yaklaşım protein-ligand etkileşiminde çekirdek hareketinin bağlanma cebindeki titreşimleri de içeren elektron hareketi ile ilgili olayların doğru olarak tespitini kolaylaştırır ve kenetlenme modellenmek istendiğinde hesaplama doğruluğunu bu sayede artırır.

Slater determinanı

Çok elektronlu sistemlerde dalga fonksiyonları matematiksel bir yapı olan Slater Determinanı ile tanımlanabilir. Pauli Dışarlama İlkesini karşılayan bu matematiksel yapı iki elektronun yer değiştirmesi durumunda işaret değiştirir. Bu matematiksel ifade aşağıda gösterilen spin-orbitallerin determinanı olarak ifade edilir. Her bir elektron, bir uzay ve spin

değişkenine bağlı tek elektron dalga fonksiyonu olan spin-orbital ile tanımlanabilir. Genel olarak bir elektron için spin-orbital şu şekilde ifade edilir:

$$\varphi_i(x) = \psi_i(r)\chi(\sigma) \quad (2.18)$$

Burada x hem uzay koordinatlarını r hem de spin koordinatını σ içerir. $\varphi_i(x)$ uzay koordinatına bağlı orbital fonksiyonudur. $\chi(\sigma)$ ise spin fonksiyonudur. Buradan anlaşılacağı üzere elektronların tümü, bir dizi spin-orbitaleri işgal etmesiyle tanımlanabilir. Slater determinantının tanımı buradan hareketle N elektronlu bir sistem için toplam dalga fonksiyonu $\Psi(x_1, x_2, \dots, x_N)$ olarak ifade edilirse antisimetri ilkesini sağlamak için şu biçim kullanılır:

$$\Psi(x_1, x_2, \dots, x_N) = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{bmatrix} \varphi_1(x_1) & \cdots & \varphi_N(x_1) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \varphi_1(x_N) & \cdots & \varphi_N(x_N) \end{bmatrix} \quad (2.19)$$

Slater determinantı, bir elektronun aynı spin orbitali paylaşması durumunda determinantın sıfır olmasını sağlayarak Antisimetri Prensipli'nin ve iki elektronun aynı spin orbitalinde bulunamayacağını göstererek de Pauli Dışarlama İlkesi'nin matematiksel karşılığını oluşturur.

Hartree-fock teorisi

Slater determinantı, etkileşimleri tek parçacık fonksiyonları temelinde antisimetriyi koruyarak ifade etmeyi sağlar ve Hartree-Fock yaklaşımını temel alır. Hartree-Fock denklemleri, bir dizi spin-orbital seçerek enerjiyi minimal yapacak spin-orbitaleri bulur. Yani her bir elektron etkili bir potansiyelde hareket ediyormuş gibi ele alınır. Buna bağlı olarak Hartree-Fock yaklaşık enerjisi şu şekilde yazılabilir:

$$EHF = \sum_i \langle \varphi_i | \hat{h} | \varphi_i \rangle + \frac{1}{2} \sum_{i,j} \left(\langle \varphi_i \varphi_j | \frac{1}{r_{12}} | \varphi_i \varphi_j \rangle - \langle \varphi_i \varphi_j | \frac{1}{r_{12}} | \varphi_j \varphi_i \rangle \right) \quad (2.20)$$

Bu denklemde $\hat{h}$ kinetik enerji ve çekirdek-elektron potansiyelinin toplamını ifade ederken $\langle \varphi_i \varphi_j | \frac{1}{r_{12}} | \varphi_i \varphi_j \rangle$ ise Coulomb integralidir. Diğer terim olan $\langle \varphi_i \varphi_j | \frac{1}{r_{12}} | \varphi_j \varphi_i \rangle$ değiş-tokuş (exchange) integralidir.

Elektron korelasyonu

Elektron korelasyonu, çok elektronlu sistemlerin kuantum mekaniksel tanımında önemli ve çoğu zaman ihmal edilmesi güç bir etkidir. Hartree-Fock yaklaşımı, her elektronun sabit bir ortalama potansiyel alan içinde hareket ettiğini varsayarak, karmaşık elektron-elektron etkileşimlerini basite indirger. Bu yaklaşım, sistemin toplam enerjisinin hesaplanmasında istikrarlı ve genellikle makul sonuçlar verse de, gerçek fiziksel durumu tam olarak yansıtmaz. Özellikle elektronların birbirlerine göre konumlarının eşgüdümlü değişimleri, yani korelasyon etkileri, Hartree-Fock yöntemiyle tam anlamıyla hesaba katılmaz.

HF sonucu elde edilen enerji değerleri, gerçekte ölçülebilecek (ya da daha yüksek düzey teoriyle hesaplanabilecek) enerjilerden daima biraz daha yüksektir. Bu sapma, elektron korelasyon enerjisi olarak adlandırılır. Her ne kadar toplam enerjinin görece küçük bir yüzdesini oluştursa da korelasyon enerjisinin ihmal edilmesi moleküler özelliklerin, bağ enerjilerinin veya reaksiyon mekanizmalarının analizinde hatalı veya yanıltıcı sonuçlara yol açabilir.

Hartree-Fock modelinde dalga fonksiyonu, tek bir Slater determinantı ile tanımlanır. Bu determinant, sistemin temel hâlini tanımlasa da gerçekte var olabilecek diğer elektronik konfigürasyonların (örneğin, bazı elektronların daha yüksek enerjili orbitallere uyarılması) katkılarını dahil etmez. Dolayısıyla tek bir determinant, çok elektronlu dalga fonksiyonunun tam formunu temsil etmekte eksik kalır.

Bu eksikliği gidermek amacıyla, HF sonrası yöntemler — Konfigürasyon Etkileşimi, Coupled-Cluster veya Møller-Plesset perturbasyon teorisi gibi — devreye girer. Bu yöntemlerde temel hâl Slater determinantına ek olarak, uyarılmış durumları temsil eden başka determinantlar da dalga fonksiyonuna eklenir. Böylece dalga fonksiyonu, genel formda şöyle ifade edilebilir:

$$\Psi_{gerçek} = c_0\Psi_0 + \sum_{ai} c_{ai}\Psi_{ai} + \sum_{abij} c_{abij}\Psi_{abij} + \dots \quad (2.21)$$

Burada Ψ_0 temel hâl determinantını, Ψ_{ai} , Ψ_{abij} gibi terimler ise tekli, ikili (ve hatta daha yüksek dereceli) uyarılmalarla oluşturulan farklı konfigürasyonları temsil eder. Katsayılar c_0, c_{ai}, c_{abij} , ... her bir elektronik konfigürasyonun gerçek dalga fonksiyonuna katkı

derecesini belirler. Bu sayede korelasyon etkileri daha doğru bir şekilde hesaba katılarak, sistemin enerji düzeyleri ve yapı özellikleri daha isabetli tahmin edilebilir.

Bu çok-determinantlı yaklaşımlar korelasyon enerjisini daha eksiksiz yakalamalarına karşın hesaplama maliyeti açısından oldukça yoğundur. Elektron sayısının arttığı, dolayısıyla sistemin büyüdüğü durumlarda, gereken hesaplama süresi ve bellek ihtiyacı katlanarak artar. Bu nedenle, tam korelasyonun hesaba katılabildiği yüksek seviye metotlar, büyük ve karmaşık moleküler sistemler için pratik olmaktan uzaklaşabilir. Gelişen bilgisayar teknolojisi ve gelişmiş yaklaşımlar (ölçeklendirme stratejileri, lineer büyüklükte hesaplama algoritmaları vb.) bu sınırlamaları bir miktar aşmaya yardımcı olsa da, halen korelasyon enerjisinin yüksek doğrulukla hesaba katılması, kuantum kimyasında önemli ve zorlu bir alandır.

Yoğunluk fonksiyoneli teorisi (dft)

Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi, kuantum kimyası ve hesaplamalı biyofizik alanlarında, özellikle karmaşık biyomoleküler sistemler üzerindeki ayrıntılı elektronik yapı incelemelerini, tek bir keyfi dalga fonksiyonuna dayanmaksızın, doğrudan sistemin elektron yoğunluğuna bağlı evrensel fonksiyoneller aracılığıyla gerçekleştirme olanağı tanıyan gelişmiş bir kuramsal çerçevedir.

Kohn-Sham yaklaşımına dayanmakta olan teorik altyapı, çok-elektronlu problemin çözümü için, etkileşimsiz referans bir sistemin tek-parçacık (Kohn-Sham) orbitalleriyle temsil edilerek, toplam enerji fonksiyonelinin yoğunluk üzerinden belirlenmesine dayanır. Kohn-Sham denklemleri:

$$\left(-\frac{\hbar^2}{2m}\nabla^2 + v_{eff}[\rho(r)]\right)\phi_i(r) = \varepsilon_i\phi_i(r) \quad (2.22)$$

şeklinde ifade edilen bir özdeğer problemidir. Burada $\phi_i(r)$ Kohn-Sham spin-orbitalleri, $\rho(r)$ elektron yoğunluğu, ε_i ise ilgili özdeğerleri (Kohn-Sham orbital enerjileri) temsil eder. Etkin potansiyel $v_{eff}[\rho(r)]$, dış potansiyel (çekirdek-elektron etkileşimi), klasik Coulomb potansiyeli ve değiş-tokuş-korelasyon (exchange-correlation, XC) potansiyelini içerir ve aşağıdaki gibi gösterilir:

$$v_{eff}[\rho(r)] = v_{ext}(r) + v_H[\rho(r)] + v_{XC}[\rho(r)] \quad (2.23)$$

Bu yaklaşımın protein-ligand komplekslerinde uygulanması, özellikle ligandın bağlanma bölgesindeki elektronik yapı karakterizasyonunu, bağ enerjilerinin hassas tahminini ve konformasyon optimizasyonunu mümkün kılar. Protein yapıları, binlerce atom içeren karmaşık sistemler olduğundan, tam kuantum mekaniksel (QM) optimizasyonlar gerek hesaplama gücü gerek zaman bakımından sınırlayıcı olabilir. Ancak en kritik bölge olan ligand ve yakın çevresini yüksek seviyede tanımlamak, geri kalan protein matriksini ise klasik potansiyellerle (örn. QM/MM yaklaşımlar) ele almak yaygın bir stratejidir. Bu şekilde, ligandın proteinde konumlandığı aktif bölgenin elektronik özellikleri DFT düzeyinde optimize edilebilir.

DFT uygulanırken, değiş-tokuş-korelasyon fonksiyonellerinin seçimi büyük önem taşır. Modern bir meta-hibrit değiş-tokuş-korelasyon fonksiyonu olan M06 (Zhao ve Truhlar tarafından geliştirilen bir fonksiyonel ailesinin üyesi) [130], zayıf etkileşimlerden, geçiş metali komplekslerine kadar geniş bir kimyasal uzayda güvenilir sonuçlar vermesiyle bilinir. M06-2x fonksiyoneli, protein-ligand etkileşimlerinde hidrojen bağları, π - π etkileşimleri ve van der Waals benzeri etkileşimlerin gerçekçi bir şekilde modellenmesinde kullanılabilir. Bu fonksiyonel, ligandın protein içindeki bağlanma modunu, stabilitesini ve reaksiyon koordinatları boyunca enerji bariyerlerini daha doğru biçimde öngörebilmektedir.

DFT tabanlı optimizasyon çalışmalarında baz set seçimi de kritik parametrelerden biridir. LAV3P++** gibi genişletilmiş baz setleri, özellikle d- ve f-türü polarizasyon fonksiyonlarını içerebilen, yoğunlaştırılmış elektron dağılımlarını ve ince elektronik yapı özelliklerini doğru olarak yakalayabilen temel uzay genişletmeleridir. LAV3P++**, çoğu zaman ligand çekirdeklerine yakın yüksek doğruluklu bir dalga fonksiyonu temsilini mümkün kılar; böylece ligandın protein içindeki konumuna dair enerji gradyanları daha sağlıklı hesaplanabilir. Bu baz setlerin optimizasyon protokollerine entegrasyonu sırasında, Self-Consistent Field (SCF) döngüleri yüksek hassasiyetle çözümlenir ve yakınsama kriterleri sıkılaştırılır. Böylece elde edilen lokal minimum yapı, yüksek seviye kuantum kimya yöntemleriyle uyumlu bir nicel tutarlılık sergiler.

Antifungal etkinlikleri ile bilinen fonksiyonel grupların bir arada bulunduğu 1, 2, 3-triazoilkarbamat bileşiklerinin antifungal etkinlikleri hakkında potansiyel çıkarımlar

yapmak için bileşikler hesaplamalı kimya yöntemleri ile incelendi. Hesaplamalı yöntemlerde aksi belirtilmediği sürece Schrödinger Yazılım Şirketinin Maestro Arayüzü 2023-4 [131] kullanıldı. Hesaplamalı yöntemlerin tamamında literatürde kabul görmüş bir protokol sıralı işlemler basamağı şeklinde kullanılarak hesaplama doğruluğunun fiziksel koşulları olabildiğince doğru yansıtması amaçlanmıştır [132–136]. Hesaplamalı yöntemler DFT ile kararlı konformasyon durumlarının belirlenmesi, QM/MM esnek kenetlenme, moleküler dinamik simülasyonları, protein dinamiklerinin serbest enerji verileriyle boyut indirgemeli incelenmesi yöntemlerini içermektedir. Hesaplamalı yöntemlerde kullanılan hedef protein *Fusarium Oxysporum* organizması başta olmak üzere pek çok patojen organizmada yüksek sekans benzerliği gösteren Fmk1 geni tarafından kodlanan Mitojenle Aktifeleşen Protein Kinaz protein yapısıdır. Bileşiklerimizin özellikle içerdiği fonksiyonel gruplar nedeniyle fungus türlerin hayat döngüsüne olan etkisi ve bu protein yapının katalitik bölgesinde bulunan Mg^{2+} ve L-treonin yapısıyla etkileşim potansiyeli bakımından değerlendirilmesinde etkili olmuştur.

2.2.3. Yoğunluk fonksiyonel teorisi (DFT) hesaplamaları

Sentezlenen triazoilkarbamat bileşiklerinin hepsi kuantum kimyasal hesaplamalara tabi tutuldu. Öncesinde bileşiklerde LigPrep [137] modülü kullanılarak OPLS4 kuvvet alanında giriş konformasyon temizliği yapılarak pH 6-7 aralığında iyonizasyon durum kontrolü ile düşük enerjili birer konformasyon oluşturması sağlandı. Bu konformasyonlar kullanılarak Konformasyon Tarama (Conformational Search-Advanced Search) aracı ile her bir molekülün en az 100 adet konformasyonu oluşturularak enerjilerine göre sıralandı. Her bir bileşiğin en düşük enerjili konformasyonu kuantum kimyasal hesaplamalar için kullanılmak üzere Jaguar [138] modülüne aktarıldı. M06-2X-D3/def2-SVP seviyesinde geometri optimizasyonu gerçekleştirildi. Bu seviye, meta-hibrit M06-2X fonksiyoneli Grimme'nin sıfır sönümlü D3 dispersiyon düzeltmesi ve çift- ζ valans-polarize def2-SVP temel setiyle birleştirdiği ve bileşiklerde hâkim sistemler olan π -konjuge sistemlerin, kovalent olmayan etkileşimlerin ve halojen içeren yapılardaki literatürde kanıtlanmış doğruluğundan dolayı seçildi. Sayısal hataları en aza indirmek için “ultrafine” ızgara boyutları ayarlandı. SCF yakınsama enerji eşiği 10^{-7} Hartree olarak belirlendi ve optimizasyon işleminde herhangi bir simetri kısıtlaması uygulanmadı. Sanal frekans kontrolü için titreşim analizi optimizasyon sürecine dahil edilmiştir ve hesaplama sonucunda sanal frekans tespit edilmemiştir. Optimizasyon sonuçları daha sonra B3LYP/6-31G seviyesinde küçük çaptı bir kontrolden

geçirilmiş minimum enerjili konformasyonların farklı seviyelerdeki DFT hesaplamalardaki durumları incelenerek herhangi bir tutarsızlığa rastlanmadığından Tek Nokta Enerji Hesabı'na geçilmiştir.

Elde edilen optimize geometriler üzerinde frontier moleküler orbital ve elektronik enerji verilerinin daha derinlemesine ve doğru analizi için yapıların hepsi optimizasyon sonundaki halleri ile tek nokta enerji hesabına ω B97X-D/def2-TZVP seviyesinde tabi tutulmuştur. Aralık-ayrılmış hibrit karakterli ω B97X-D fonksiyoneli, HOMO–LUMO aralıklarını, yük transferi geçişlerini ve elektrostatik özellikleri güvenilir şekilde modellemesi nedeniyle tercih edildi. Triple- ζ kalitesindeki def2-TZVP temel seti, hesaplama süresini aşırı artırmadan elektronik yapının daha ayrıntılı tanımlanmasında pareto etkin seçim olarak karar verildi.

2.2.4. Moleküler kenetlenme

Moleküler kenetle yöntemi öncelikli olarak protein yapıya etkili bağlanmanın olup olmadığını modelleme amacıyla hem ligandın hem de protein yapıdaki yan zincirler ve omurga atomları dahil protein yapının esnek olarak ele alındığı esnek kenetleme yöntemini içermektedir. Daha sonra bağlanma bölgesindeki atomların tümünün son pozisyonları kuantum mekaniği temelli kısmi yük hesaplaması ve buna göre uzaklıkların etkileşimlerle birlikte yeniden hesaplanıp tekrar pozisyonlandırılmasını içermektedir. Bu işlemlerin gerçekleştirilmesine yönelik adımlar aşağıdaki anlatılmıştır.

Ligandların hazırlanması

Sentezlediğimiz 1, 2, 3-triazoilkarbammat bileşiklerinin tümü Maestro'daki LigPrep [137] uygulaması ile *Fusarium oxysporum*'ın optimum gelişim pH seviyesi olan 5, 0 ile 7, 0 [139, 140] arasındaki iyonik durumunu tahmin etmek için EPIK [141] gömülü yazılımı kullanılarak 6, 0 değerinde $\pm 1, 0$ ile tahmin edilmiştir. Hesaplama OPLS4 [142] kuvvet alanı kullanılarak başlatılmıştır. Organizmanın optimum gelişim pH seviyesinin seçilmesi, bileşiklerin patojenin en aktif ve biyosinyalleşme mekanizmalarının en etkili çalıştığı durumlarda bile patojeni durdurma kabiliyetleri hakkında doğru çıkarımlar yapabilmektir. Elde edilen sonuçlarda bu pH değerlerinde proton kaybı görülmemiştir. Bu nedenle kararlı konformasyonların belirlenmesi ve kısmi yüklerin hesaplanmasında daha gerçekçi bir

yöntem olan DFT hesaplamalarından elde edilen kısmi yükler ve konformasyonlar kullanılmıştır. Toplamda bileşiklerin her biri için en düşük enerjili konformasyondan türetilen 20 düşük enerjili konformasyon kullanılmıştır.

Protein yapı ile ilgili işlemler

Fusarium oxysporum'ın hayat döngüsünde etkili olan protein yapıların hiçbiri x-ışını kırınım yöntemi gibi yüksek doğruluklu yöntemlerle aydınlatılmamıştır. Bu nedenle literatürde *Fusarium oxysporum* ile ilgili çalışmaların genelinde protein yapılar, mevcut yapısı aydınlatılan protein yapılardan yola çıkarak manuel veya otomatik sistemler kullanılarak oluşturulan homoloji modeli temelli yapılardır [143–146]. Bunun aksine günümüzde makine öğrenmesi ve yapay zekâ uygulamalarının geliştirilmesiyle protein yapıların derin öğrenme yöntemleri kullanılarak yüksek doğrulukla tahmin edilmesi çok büyük bir yeniliktir ve protein yapı tahmininin bir sorun olmasını tamamen ortadan kaldırma aşamasındadır [147]. 2024 yılı Nobel Kimya Ödülünün bu konudaki çalışmalara öncülük eden Google'ın iştiraki olan DeepMind'daki Demis Hassabis ve John M. Jumper ile Washington Üniversite'sinden David Baker'ın verilmesi bu konudaki önemli kanıtlardandır[148]. Bu gelişmeler ışığında *Fusarium oxysporum* patojeninden Fmk1 geninin kodladığı Mitojenle Aktifeleşen Protein Kinaz protein yapısının yapı tahminin yapılmasında DeepMind tarafından geliştirilen AlphaFold 3 [149]'ü kullandık. AlphaFold 3'ün eğitim materyal sayısı tam olarak açıklanmasa da AlphaFold 2'nin 170 bin deneysel protein kristal verisi ile eğitildiği resmi olarak açıklanmıştır [150]. AlphaFold 3 ile ilgili resmî açıklama ise AlphaFold 2'den daha büyük bir veri seti ile eğitildiğini söylemektedir [151]. Bu da kullandığımız protein tahmin aracı olan AlphaFold 3'ün 150 ile 170 bin deneysel protein verisiyle eğitildiğini gösterir. Alphafold 3 çeşitli temel kofaktörlerin protein yapılarıdaki yerlerinin yüksek doğrulukla tahmin edilmesini de sağlamaktadır. AlphaFold modelinin sürümleri ile pek çok protein yapının keşfine öncülük edilmiş ve proteinlerin yapı aydınlatmasına yol göstererek bilim dünyasına hem büyük kolaylık sağlamış hem de protein katlanması gibi biyokimyanın “en büyük problemlerinden birini” büyük ölçüde ortadan kaldırmıştır [23]. AlphaFold benzeri derin öğrenme yöntemleri kullanan ancak farklı algoritmalarla da yapı tahmini yapan Meta Şirketi iştiraki MetaAI'den ESM Metagenomik Atlas'ın ESMFold [153] bunlardan başka bir örnektir.

Alphafold 3 ile belirlenen protein yapı

AlphaFold 3 modelinin Mitojenle Aktifeleşen Protein Kinaz protein yapısının belirlenmesinde AlphaFold Server'ı kullanıldı. AlphaFold Server, Google kullanıcı hesapları ile giriş yapılarak kullanılabilmekte ve çalışmaların veri gizliliği Google tarafından küresel olarak sağlanmaktadır. Aktifeleşen Protein Kinaz proteinin sekansları UniProt kodu Q9HGU2 [120] olan yapıdan elde edilmiş ve AlphaFold Server'a girilmiştir. UniProt bilgilerine göre kofaktör olarak aktif bölgesinde Mg^{2+} içerdiği bilinen yapıya, arayüzde bu metal atomu seçilerek yapı tahminine dahil edilmesi sağlanmıştır. Ayrıca enzimin işlevini yerine getirdiği ATP'den ADP'ye dönüşüm katalizinde enzim işlevinin tam o andaki yapısı istendiğinden ATP'de yapı tahminine eklenmiştir. Yapı tahmini gerçekleştirildikten sonra "cif" formatında Maestro arayüzüne aktarılmıştır.

Esm2 ile belirlenen protein yapı

AlphaFold Server ile elde edilen yapı tahminin doğruluğu hakkında fikir sahibi olmak ve DeepMind'ın AlphaFold Server için getirdiği kullanım kısıtlaması olan "elde edilen yapılar bize aittir ve otomatik sistemlerde kullanılamaz" sınırlandırmasını ihlal etmemek için ESMFold ile aynı sekansların yapı tahmini yapılmıştır. Elde edilen yapı "pdb" formatında Maestro arayüzüne aktarılmıştır. ESMFold kullanım itibari ile sekansların girişini alır ve yapı tahmini gerçekleştirir. Herhangi bir iyon, ligand veya kofaktör için pozisyon tahminini şu an için gerçekleştirilmemektedir.

Protein yapı seçimi

AlphaFold 3 ve ESMFold ile belirlenen iki protein yapı Şekil 2.4'te görüldüğü gibi üst üste bindirilmiş ve ardından da kök ortalama kare sapma (RMS) ile atomik pozisyonlarının aralarındaki farkın sayısal bir ölçütü oluşturulmuştur. İki yapı arasındaki yapısal farkın son derece düşük olması kullanım kısıtlaması içermeyen ESM2 ile elde edilen yapının da kullanılabilirliğini göstermiştir. Ayrıca İki farklı algoritma ile belirlenen yapıların, birbirine son derece yüksek yapısal benzerliği yapının doğru belirlendiğine dair önemli bir delildir. Ancak ESMFold yapısının, Mg^{2+} ve/veya enzim substratı olan ATP'nin konumu hakkında bilgi vermemesi katalitik bölgedeki önemli etkileşimlerin ıskalanmasına neden olabilir. Tahmin edilen her iki yapı arasındaki yüksek benzerlik Mg^{2+} ve ATP için koordinat transferi

ile hem ESMFold' un tahminin Mg^{2+} ile ATP içerecek şekilde olmasını sağlarken AlphaFold 3'ün kullanım kısıtlamaları ihlal edilmemiş olacaktır. Bu amaçla AlphaFold 3'ün Mg^{2+} ve ATP'yi yerleştirdiği yerler referans alınarak uzaydaki koordinatlarının aynısı ESMFold' un yapısına manuel olarak yerleştirilmiştir. Böylece Mg^{2+} ve ATP' yi içeren ESMFold yapısı hiçbir kullanım kısıtlamasına tabi olmadan direkt kullanıma uygun şekilde hesaplamalı çalışmaların devamı için seçilmiştir.



Şekil 2.4. AlphaFold 3 (yeşil şerit protein) ve ESMFold (kırmızı şerit protein) yapıları 0.8081 Å fark ile üst üstedir

Proteinin su moleküller ile çevrenmesi

Seçilen ve kullanıma hazır hale getirilen bu yapı fiziksel koşulları en gerçekçi şekilde sağlamak ve hesaplama doğruluğunu arttırmak için HydraProt ile su molekülleri ile çevrenmiştir. HydraProt 4.000 protein kristal yapısındaki toplamda 1.743.108 adet deneysel su molekülünün protein yapıları göre üç boyutlu uzaydaki konumlarına göre Torch kütüphanesi kullanılarak derin öğrenme yöntemleri ile eğitilmiştir [154].

Protein yapının hazırlanması

Elde edilen protein yapının hazırlığı Maestro'daki Protein Preparation Wizard (Protein Hazırlama Sihirbazı) [155] kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Protein yapı ligand hazırlamadaki aynı nedenlerden *Fusarium oxysporum*'ın optimum gelişim pH'ı olan $6,0 \pm 1$,

0 değerine ayarlanmış ve metal bağları ayarlanmış (zero-order olarak geçmektedir), hidrojenler eklenmiş, kükürt bağları oluşturulmuş ve böylece Preprocess (önişlem) gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada eksik aminoasitler kontrol edilmiş ve herhangi bir sorun tespit edilmemiştir. Su moleküllerinin hiçbirisi, protein yapısı, moleküler dinamik simülasyonlarında da kullanılacağı için hesaplama doğruluğunu arttırmak için silinmeden bırakılmıştır. Maestro, Lennard-Jones [156] potansiyelini hesaplayarak tespit ettiği yüksek enerjili hidrojen atomları arasında yakın etkileşimler (Maestro’da “bad” kötü etkileşim olarak geçmektedir), su molekülleri ile aminoasit kalıntıları arasındadır. Bu yüksek enerjili yakınlıklar manuel olarak su moleküllerinin konumları hidrojen atomunun ters yönünde 0, 2 Å değiştirilerek ortadan kaldırılmıştır. Bu uygulama daha sonra uygulanacak olan moleküler mekanik temelli kuvvet alanının bu atomlar arasındaki gerekli yakınlığı ve konumlanmayı daha doğru olarak yapabilmesi içindir. Çünkü kuvvet alanları (hangi kuvvet alanı olduğundan bağımsız olarak) yüksek yakınlık olmasına rağmen belirli sınır koşullarında serbestlik derecelerine izin vermektedir. Daha sonra pH 6’da hidrojen bağları PROPKA [157] kullanılarak optimize edilmiştir. OPLS4 kuvvet alanı uygulanarak yapıdaki her bir atom üzerine kısmi yükler atanmış, her bir atomlar kuvvet alanına göre konumlandırılarak protein yapısı çalışma için hazır hale getirilmiştir.

Esnek kenetleme protokolleri

Aktif bölgenin Mg^{2+} atomunu içerdiği literatürde bilinmektedir. Mitojenle Aktifeleşen Protein Kinaz protein yapısının işlevini yerine getirirken Mg^{2+} atomunu kullanarak fosfat grubunu ayırdığı daha önce açıklanmıştır. AlphaFold 3’ün belirlediği yapıda da Mg^{2+} ve ATP arasında fosfat gruplarından etkileşim yaptığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu kinaz proteinde etkinliğin engellenmesi için bu bölgeye kenetlenmesi ve ligandların ATP’nin bulunduğu konuma yerleşerek ATP’nin bağlanmasının engellenmesi bu enzimin en önemli inhibisyon şartını oluşturmaktadır. Dolayısıyla ATP molekülü protein yapıda ligandların bağlanacağı koordinatlar olarak seçilerek Induced Fit Docking (IFD) [158] uygulamasına gösterilmiştir. IFD uygulaması Glide [159] modülünü kullanır ve moleküler kenetleme çalışmalarını hem liganda hem de protein yapının gösterilen bölgesindeki atomlarının belirli sınırlar çerçevesinde birbirine göre etkileşimlerini ve hareketlerini de dikkatle alarak yapar. IFD uygulaması ile gelişmiş örnekleme modunda her bir ligand için 80 poz talep edilerek hassasiyeti en yüksek ayarlar kullanılmıştır. Diğer bütün ayarlar varsayılan değerlerde tutulmuştur.

Qm/mm kenetlenme

Ligandların her birinin kenetlenmesinde IFD ile en yüksek afinite gösterdiği tespit edilen pozlar kuantum mekaniği fonksiyonelleri kullanılarak son kez, pozisyon ve yük güncellemesine tabi tutulmuştur. Bu amaçla QSite [160] modülü kullanılmıştır. Qsite modülü Jaguar [138] modülü ile birlikte çalışarak protein-ligand etkileşimlerinde seçilen bölgelerin kuantum mekaniği ile protein içerisinde DFT hesaplamasını yaparken, diğer bölgelerde moleküler mekanik kullanılmasını sağlar. IFD uygulaması ile tespit edilen en yüksek afiniteye sahip pozlardaki ligandlar ve 3 Å yakınındaki aminoasit kalıntıları Qsite uygulamasında kuantum mekaniğine göre hesaplaması yapılacak şekilde seçilmiştir. Diğer bütün atomlar ise moleküler mekanik kullanılacak şekilde ayarlanmıştır. Seçilen aminoasit kalıntılarının omurga atomlarına bağlandığı yerlere “hidrojen tıkama” yapılmış, yani bu bağın uç tarafının hidrojen atomu olarak ele alınması sağlanmıştır. Kuantum mekaniği hesaplamalarında M06-2X fonksiyoneli ve LAV3P++** temel seti kullanılmıştır. M06-2X fonksiyoneli non-kovalent etkileşimlerin hesaplanması için tasarlandığından protein-ligand etkileşimleri arasındaki hesaplama doğruluğunu arttırmak için tercih edilmiş ve başka herhangi bir fonksiyonelle deneme yapılmadan direkt olarak, literatür kaynakları referans alınarak bu fonksiyonel kullanılmıştır [161, 162]. Metal atomu üzerindeki hızlı spin geçişlerinin doğru hesaplanması, polarizasyonun doğru hesaplanması, anyonik ve elektron açısından zengin sistemler daha iyi modellenmesi için LAV3P++** temel seti seçilmiştir. Moleküler mekanik kullanılan atomlarda ise OPLS4 kuvvet alanı kullanılmıştır.

Ligandlar ve protein arasındaki son pozisyon güncellemesi ve kısmi yük güncellemesi hesaplamasının ardından proteininin ligandlar üzerindeki etkisini ve değişen elektron konfigürasyonunu inceleyebilmek için Qsite ile elde edilen protein-ligand komplekslerinden ligandlar çıkarılmış ve ligandların konformasyonları değiştirilmeden Tek Nokta Enerji hesaplaması, Qsite hesaplamasındaki aynı fonksiyonel ve temel set kullanılarak yapılmıştır. Böylece ligandların aynı fonksiyonel ve temel set ile hesaplanmış, birisi protein yapı ile etkileşim halinde olan diğerinde ise çözücü ortamında aynı konformasyonda elektron konfigürasyonu değerlendirilebilmiştir. Bu çalışma değişen elektron konfigürasyonu ile etkileşimlerin gücünün moleküler mekanik sınırlamalarına bağlı kalmadan kuantum mekaniği doğruluğuna atıf yapılabilecek seviyede bir ayrıntıyla değerlendirilebilmesi için yapılmıştır. Tek Nokta Enerji hesaplaması Jaguar modülünü kullanarak fonksiyonel, temel set ve çözücü ortamı hariç varsayılan ayarlarda gerçekleştirilmiştir.

2.2.5. Moleküler dinamik çalışması

Moleküler kenetlenme çalışması ile elde edilen protein-ligand komplekslerinin kararlılığı, etkileşim sürekliliği, ligandın protein yapısı üzerindeki etkisi ve protein yapısının ligandın etkisi ile değişen fonksiyonlarını değerlendirmek için her bir ligandın protein yapısı ile yaptığı en düşük enerjili kompleks için moleküler dinamik simülasyonları gerçekleştirilmiştir. Moleküler dinamik simülasyonları protein yapısını çevreleyen fiziksel koşulların küçük bir zaman dilimi için oluşturulması prensibine dayanır ve moleküler düzeydeki olayların zaman içerisindeki hareketine ışık tutar.

Sistem kurulumu ve hazırlığı

Moleküler dinamik simülasyonlarının gerçekleştirilmesi için her bir kompleks (HydraProt suları ile birlikte) $10 \text{ \AA} \times 10 \text{ \AA} \times 10 \text{ \AA}$ boyutlarında ortorombik, SPC [163] tipi su moleküllerinden oluşan bir çözücü kutusuna daldırılmıştır. Çözücü kutusuna ortamının nötr olmasını sağladıktan sonra 0, 15 M NaCl monte carlo yöntemi kullanılarak eklenmiştir. Ortam nötralizasyonun sağlanması çözücü kutusunun etrafını saran yüksek enerji bariyerlerinin aşılması simülasyonun dağılmasını önlemek için, 0, 15 M NaCl eklenmesi fiziksel koşulların tam olarak sağlanması istendiğindendir. Literatür bilgisi *Fusarium oxysporum*'ın optimum gelişiminin 1 M NaCl' nin altında olması ve NaCl derişiminin 1 M ve üzerine çıkması durumlarında osmotik stres kökenli gelişim inhibisyonuna işaret etmektedir [164]. Optimum gelişim için ise 0.4 M NaCl derişiminden daha düşük bir derişim gerektiği tespit edilmiştir [139]. Bu bilgiler doğrultusunda hem Fmk1 proteinin işlevini yerine getirdiği hem de protein katlanması ile hareketin doğru ve hatasız modellendiği 0.15 derişimi ideal değer olarak seçilmiştir. Zaten varsayılan değer olan 0.15 M protein dinamiklerinin analizinde de ideal NaCl derişimi olarak görülmektedir. Çözücü kutusunun hazırlanması OPLS4 kuvvet alanı ile gerçekleştirilmiştir.

Moleküler dinamik sistem protokolleri

Moleküler dinamik simülasyonlarının gerçekleştirilmesi moleküler düzeyde fizik tabanlı olarak çalışan Desmond [165] modülü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Simülasyonun fiziksel koşulların tam bir karşılığını oluşturması için sabit sayılarda parçacık, sıcaklık ve basınç değerlerinin simülasyon ortamına uygulanmasını içermektedir. Sabit sayıda parçacık,

yüksek enerji bariyerleri ile çevrelenen sistemin dağılması önlenerek sağlanmıştır. Sabit sıcaklık Nose-Hoover thermostat ^[166] kullanılarak 300 °K sabitlenmiştir. Sabit basınç ise Martyna-Tobias-Klein ^[167] barostat kullanılarak 1 bar'da tutulmuştur. 300 °K literatürde *Fusarium oxysporum*'ın gelişimi için en uygun sıcaklık seviyesi olan 301.15 °K civarındaki sıcaklığa yakındır ve protein dinamiklerinin incelenmesinde biyolojik sistemlerin fizyolojik koşullarda en gerçekçi davranışlarını göstermesidir[139]. Simülasyonların her biri aynı parametreler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her biri 2 ps'lik gevşeme aşaması ve 200 ns'lik simülasyon üretim aşaması içermektedir. Literatür standartının biraz üzerinde olan 200 ns'lik simülasyon süresi 100 ns'lik simülasyonlarda protein yapı dinamiklerinde periyodik hareket tespit edilememesinden dolayı tercih edilmiştir. Yani 100 ns'lik simülasyonlar denenmiş ancak RMSD grafikleri başta olmak üzere yapı dinamiklerin “plato” seviyesinin tespit edilememesi simülasyon süresinin arttırmasına neden olmuştur. Simülasyonların her birisi 2000 framede ile 0.2 fs'lik frame başı zaman adımında hesaplanmıştır. Her bir simülasyon üç kere tekrar edilmiştir.

2.2.6. Moleküler mekanik ile genelleştirilmiş born ve yüzey alanı solvasyonu (MM/GBSA)

Moleküler dinamik simülasyonlarını oluşturan her bir frame (kare) deki protein-ligand kompleksinin serbest enerjisi MM/GBSA hesaplaması ile hesaplanmıştır [168]. Tüm simülasyonlar için ayrı ayrı uygulanan MM/GBSA hesaplaması protein-ligand komplekslerinin kararlılıklarını fiziksel çerçevede hesaplamak için kullanılmıştır. Protein dinamiklerinin zaman içerisinde değişiminin kompleks kararlılığına etkisinin açıkça görülmesi için günümüz literatür standartı olan 200-300 frame'de bir MM/GBSA hesaplaması yerine, bundan çok daha gelişmiş bir protokol benimsenerek her simülasyonun her karesi için MM-GBSA hesaplaması gerçekleştirildi. Bu konformasyonel geçiş durumlarında tüm olayların takibinin etkili bir şekilde yapılmasını sağlamak için yapılmıştır. MM-GBSA hesaplaması Prime [169] modülü kullanılarak, VSGB [170] ile OPLS4 kuvvet alanı kullanılarak aşağıdaki formüle göre gerçekleştirilmiştir.

$$\Delta G = E_{\text{complex}} (\text{minimized}) - [E_{\text{ligand}} (\text{minimized}) + E_{\text{receptor}} (\text{minimized})] \quad (2.24)$$

2.2.7. Manifold temelli istatistiksel detaylar

Moleküler dinamik simülasyonları da dahil olmak üzere pek çok konuda ortaya çıkan yüksek boyutlu veri yığınlarının anlaşılır ve doğru analizi için temelde olasılık yoğunluğuna dayalı olan pek çok boyut indirgeme yöntemi geliştirilmiştir ve amaca göre kullanımları pek çok çeşitliliği beraberinde getirmiştir. Pearson'ın çok-değişkenli istatistik [171] geleneğinin parçası olan Temel Bileşen Analizi (PCA), manifold öğrenme yaklaşımlarını temel alarak veri yapısının temel dokusunu koruyan Düzgün Manifold Yaklaşımı ve Projeksiyonu (UMAP) ve istatistiksel kökenli stokastik süreç ve çekirdek yoğunluk kavramlarını diferansiyel geometriyle birleştiren Difüzyon Haritası yöntemi bunlardan bir kaçıdır. Günümüzde UMAP, modern ve oldukça popüler bir yöntem olarak dikkat çekerken, Difüzyon Haritası hem manifold yapısını koruması hem de asimetrik veri kümelerinden veri kaybını az miktarda tutarak boyut indirgeme yapması bakımından tercih edilmektedir.

Temel bileşen analizi (pca)

Çok boyutlu (yüksek D) veri kümelerindeki doğrusal korelasyonları yakalayıp $d \ll D$ indirgemesi yapma olanağı sağlayan istatistiksel temelli bir boyut indirgeme yöntemidir. Yöntemin ana yaklaşımı ve hedefi toplam varyansın olabildiğince büyük bir kısmını koruyarak hem görselleştirilebilir hem de yorumlanabilir niteliklere sahip yeni ve birbirinden bağımsız değişkenler, yani ana bileşenler üretilmesidir. Bunun için verilerin matris biçimiyle ele alınması söz konusudur ve PCA aşağıdaki adımlardan oluşur:

Verilerin merkezlenmesi

$$\tilde{X} = X - 1\mu^T, \quad \mu = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \mathbf{x}_i \quad (2.25)$$

Bu denklem ile veriler merkezleştirilerek matris oluşturulmasına hazırlık yapılır.

Kovaryans matrisinin oluşturulması

$$C = \frac{1}{N-1} \widetilde{X^T X} \quad (2.26)$$

Denklemleri ile matris oluşturulmuş olur ve bu matris de her özelliğin kendi iç varyansı ile diğeri ile ortak olan varyansı hakkındaki bilgiyi taşır.

Öz-Değer Ayırışımı:

Oluşturulan kovaryans matrisinin öz-değerlerini(λ_j) ve bunlara karşılık gelen öz-vektörlerini(w_j) hesaplama adımına bundan sonra geçilir ve şu yol izlenir:

$$Cw_j = \lambda_j w_j, \lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \dots \geq \lambda_D \quad (2.27)$$

Bileşen Seçimi ve Projeksiyonel Yaklaşım:

Bu aşamada en büyük öz-vektör sütunu birleştirilir:

$$w_k = [w_1, w_2, \dots, w_k] \quad (2.28)$$

Merkezlenmiş olan veriler oluşturulan bu yeni eksene Z matrisinin satırları, her gözlemin k boyutlu temsilleri olacak şekilde yansıtılır (projekte edilir):

$$Z = \tilde{X}w_k \quad (2.29)$$

Böylece bu projeksiyon doğrultularını öyle bir seçer ki veriye ait toplam varyans bu alt uzayda en fazla olsun. Bundan dolayı yöntem kovaryans matrisinin öz-değer ayırışımına dayanır. Uygulamada ise varyans maksimizasyonu ve yeniden yapılandırma hatası minimizasyonuna dayalı olarak çalışır.

Düzgün manifold yaklaşımı ve projeksiyonu (umap)

UMAP çok boyutlu verilerin($\mathbb{R}^D$) düşük boyutlu ($\mathbb{R}^d, d \ll D$) bir temsil uzayına indirgenmesi için hem yerel hem de küresel topolojik özelliklerin korunmasını (büyük ölçüde) sağlayarak indirgeme işleminde özellik kaybını çok büyük ölçüde azaltarak doğrusal olmayan bir boyut indirgeme yöntemidir. UMAP algoritması 2018'de McInnes, Healy ve Melville tarafından geliştirilmiştir. Riemann geometrisi, kalıntısız ölçüler (measure theory) ve kategorik topoloji (simplicial complex kuramı) üzerine inşa edilen UMAP algoritması

doğrusal olmayan sistemler üzerinde denetimsiz makine öğrenmesi (unsupervised learning) ile graf tabanlı bir optimizasyon problemini çözer.

UMAP, Riemann Manifold Varsayımı üzerine inşa edilmiştir ve veri noktalarının yerel Öklidyen fakat küresel olarak kıvrımlı $\mathcal{d}_{\mathcal{M}}$ –boyutlu bir manifold ($\mathcal{M}$) üzerine yoğunlaştığı kabulüne dayanır. Manifold yapısı nokta başına komşuluk grafiği oluşturularak etkili şekilde yakalanır. Grafik bulanık ağırlıklar taşıyan “simplicial complex” olarak modellenir. Eğer komşuluk örüntüsü yeterince sık modellenirse algoritmanın oluşturduğu “simplicial complex” manifold ile homotopi olarak eş değerdir ve bu da indirgeme sırasında topolojinin korunumu sağlar.

UMAP’da veri kümesindeki her nokta için adaptif yarıçap (σ_i) ve minimum mesafe (ρ_i) tanımlanır. Sonrasında komşu j için olasılık aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$\mu_{ij} = \exp\left(-\frac{|x_i - x_j|^2 - \rho_i}{\sigma_i}\right) \quad (2.30)$$

Bulunan olasılıklardan asimetrik olanlar De Morgan t-normu ile aşağıdaki gibi simetrik hâle getirilerek bulanık ağırlıklar şeklinde ifade edilir:

$$p_{ij} = \mu_{ij} + \mu_{ji} - \mu_{ij}\mu_{ji} \quad (2.31)$$

Ağırlıklı ve yönsüz bir olasılık grafiğinin elde edilmesi adımımdan sonra düşük boyutlu karmaşıklık hesaplaması gerçekleştirilir ve aşağıdaki gibi ifade edilir:

$$L = \sum_{i < j} [p_{ij} \log q_{ij} + (1 - p_{ij}) \log (1 - q_{ij})], \quad q_{ij} = (1 + a |z_i - z_j|^{2b})^{-1} \quad (2.32)$$

Bu denklemle hedef uzayda nokta çiftlerine ilişkin Bernoulli çapraz-entropi kaybı a , b hiperparametreleri (yani varsayılan eğri uyumu) ile dağılımın sıklık derecesini kontrol etmiş olur. Son adım olaraksa veri optimizasyonu hesap karmaşıklığını çözen, stokastik gradyan inişi ve yakın-komşu arama içeren aşağıdaki denklemle ifade edilir.

$$O(N \log N) \quad (2.33)$$

Difüzyon haritası

Difüzyon Haritası yöntemi yüksek boyutlu verilerin indirgenmesinde manifoldun çok-ölçekli geometrisini yakalamak üzere Markov süreçleri, ısı denklemleri ve spektral kuramını birleştirerek doğrusal olmayan bir süreç işletir. Küme yapıları ve dallanan süreçler (esnek ve katı bölgelerin diferansiyel hareketlerini içeren süreçler buna örnektir) gibi karmaşık topolojiler söz konusu olduğunda veriye özgü jeodezik uzaklıkları koruyarak düşük boyutta anlamlı koordinatlar elde edilmesini sağlar. Genellikle ağırlıklı graf inşası Gaussian çekirdeği kullanılarak aşağıdaki gibi oluşturulur ve veri noktaları $X = X^1, \dots, X^n \subset \mathbb{R}^D$ koşuluna sahiptir.

$$w_{ij} = k_{\epsilon}(x_i, x_j) = \exp\left(-\frac{|x_i - x_j|^2}{\epsilon}\right) \quad (2.34)$$

Bant genişliği ϵ yerel ölçeği belirler ve Difüzyon Haritası için en önemli parametreyi oluşturur. Bu parametrenin doğru girilmesi indirgeme işleminin doğru bir şekilde gerçekleşmesinde en kritik adım olmakla beraber doğru ϵ değerinin belirlenmesi yöntemin en önemli büyük zorluğudur.

Oluşturulan çekirdek satır Markov geçiş matrisinde kullanılır ve normalize edilmiş geçiş olasılıkları aşağıdaki gibi elde edilir:

$$p_{ij} = \frac{w_{ij}}{\sum_l w_{il}}, \quad P = [p_{ij}]_{N \times N} \quad (2.35)$$

Böylece P üzerinde yürüyen bir difüzyon süreci tanımlanmış olur. P , spektral ayrışım için difüzyon koordinatları aşağıdaki gibi ifade edilirken özvektörler ve özdeğerler $P\psi_1 = \lambda_1\psi_1, 1 = \lambda_0 \geq \lambda_1 \geq \dots \geq \lambda_{N-1} \geq 0$ 'dir

$$\Phi_t(x_i) = (\lambda_1^t \psi_1(i), \lambda_2^t \psi_2(i), \dots, \lambda_d^t \psi_d(i)) \quad (2.36)$$

Bu denklemle zaman parametresi t yüksek frekans bileşenlerini, yani gürültüyü λ_1^t ile söndürülendirerek ölçek seçimi üzerinde kontrol sağlar ve sonra difüzyon metriği aynı süreçle tanımlı uzaklık için manifold yapısı üzerinde ısı akısının yayılım hızını ölçtüğünden jeodezik uzaklıklara yakınsamayı şöyle gerçekleştirir:

$$D_t(i, j)^2 = \sum_{l \geq 1} \lambda_l^{2t} (\psi_l(i) - \psi_l(j))^2 = |\Phi_t(x_i) - \Phi_t(x_j)|^2 \quad (2.37)$$

Böylece Laplace–Beltrami operatörünün ayrık bir türevi olan $\epsilon \rightarrow 0$ ve $N \rightarrow \infty$ şeklinde kullanımı geometrik ısı denklemini veri tabanlı biçimde ele alarak çözer.

Difüzyon haritası için enerji hesabı ile tümleşik algoritma tasarımı

Difüzyon haritası yönteminde ϵ yerel bant genişliklerinin çoğu zaman yüzlerle ifade edilen deneme yanılmalarla belirlenmesine yönelik klasik yaklaşımın aksine ϵ değerini otomatik hesaplayan difüzyon haritası yönteminin ise güçlü yönlerini koruyan bir algoritma geliştirdik. Bu yaklaşımı fiziksel süreçlerde iyi bir karşılığı bulunduğu bilinen MM/GBSA hesaplaması ile birleştirerek difüzyon haritaları ile elde edilen boyut indirgemesinin moleküler dinamik simülasyonlarındaki klasik fizik tabanlı yaklaşımın gerçekçi konformasyonel hareketi yansıtmayı sağladık. Bu amaçla Difüzyon Haritası yaklaşımının öncelikli adımlarını koruyarak çekirdek band genişliği mesafelerinin hesaplanması için Ball Tree yöntemi ile elde edilen küre-ağaç yapısının Zelnik-Manor & Perona^[172]'nın Self-Tuning/Local Scaling spektral kümeleme yaklaşımlarına çekirdek(Kernel) matrisinin oluşturulması için doğrudan bir hiyerarşi geliştirdik. Bu amaçla Ball Tree ile veri budaması ile oluşturulan komşuluk bilgilerini Self-Tuning ile adaptif benzerlik matrisine dönüştürülmektedir.

Ball Tree ile veri kümesindeki k -en-yakın-komşu (k -NN) ve yarıçap $O(\log N)$ ortalama karmaşıklıkta gerçekleştirmek için her düğümün küresel bir bölgeyi temsil etmesini sağlayan aşağıdaki denklemi kullandık:

$$\mathcal{B}(c, r) = \{x \in R^D \mid \|x - c\| \leq r\}; \quad c = \frac{1}{|\mathcal{S}|} \sum_{x \in \mathcal{S}} x, \quad r = \max_{x \in \mathcal{S}} \|x - c\| \quad (2.38)$$

Ball Tree'de veri düğümlerine ait noktaların kovaryans matrisinin en büyük öz-değerine karşılık gelen asal doğrultu bulunarak noktalar iki kümeye ayrılır. k -NN sorgusu öncelik kuyruğunda düğüm $\mathcal{B}$ ve sorgu q için alt sınır $LB(q, \mathcal{B}) = \max_{c \in \mathcal{B}} 0, \|q - c\| - r$ ile hesaplanarak LB mevcut en iyi k 'inci uzaklıktan büyükse düğüm kesilerek atılır (budanmış olur). Böylece Ball Tree altyapısı kullanılarak oluşturulan verimli komşu bulma işleminden elde edilen sonuçlar temel yaklaşımımız olan aşağıdaki denkleme aktarılabilir.

$$\sigma_i = d_k(i); \quad K_{ij} = e^{-\frac{|x_i - x_j|^2}{\sigma_i \sigma_j}} \quad (2.39)$$

Burada birinci adım yerel ölçek (σ_i) tespiti için $\sigma_i = d_k(i)$ ile ifade edilen her bir veri noktasının k 'inci en yakın komşusuna $d_k(i)$ öklidyen uzaklığı iken ikinci adımda değişken band genişliği $K_{ij} = e^{-\frac{|x_i - x_j|^2}{\sigma_i \sigma_j}}$ ile Gauss benzerliği yönünden ele alınmıştır. σ_i yoğun bölgelerde küçük olurken seyrek bölgelerde büyük olur. Böylece yoğunluk farkı tam bir dengelenmeyle tek bir ε seçim sorununu otomatik çözer. Bu sayede çekirdek matrisinin manifold üzerindeki Laplace–Beltrami operatörünün değişken band genişlikli ayrık türevi kullanılabilir hale gelir ve veri kaybı en aza indirilerek çok ölçekli geometrinin korunumu klasik yöntemden daha iyi bir hale gelir. Daha sonra normalizasyon sağlanarak veriler görselleştirilebilir hale getirilir.

Tüm bu adımlar Difüzyon haritasının oluşturulması için iken moleküler dinamik simülasyonlarının her bir frame'i için csv uzantılı dosyada toplanan MM/GBSA hesaplama verileri her iki veri türünün de matris haline getirilmesi ile frame numaralarına göre birbiri ile aşağıdaki gibi eşleştirilir:

$$\mathcal{D} = \begin{bmatrix} \Phi_{1,1} & \Phi_{1,2} & \Phi_{1,3} & E_1 & \text{frame} = 1 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \Phi_{N,1} & \Phi_{N,2} & \Phi_{N,3} & E_N & \text{frame} = N \end{bmatrix} \quad (2.40)$$

Çizelge 2.2. Geliştirilen Difüzyon-Haritası–MM/GBSA algoritmasının iş akışı şeması

1	$Z \leftarrow z - \text{score}(X)$	$z_{i\ell} = (x_{i\ell} - \mu_\ell)/\sigma_\ell \triangleright z\text{-skor ölçekleme}$
2	$\varepsilon_i \leftarrow kthNNDist(z_i, k)$	$\varepsilon_i = \text{dist}_k(z_i, \mathcal{N}_k) \triangleright \text{yerel ölçek}$
3	for all $(i, j) \in [1, N]^2$ do	
4	$d_{ij} \leftarrow \ z_i - z_j\ ^2$	
5	$K_{ij} \leftarrow \exp(-d_{ij}^2/(\varepsilon_i \varepsilon_j))$	
6	end for	
7	$D_i \leftarrow \sum_j K_{ij}; \tilde{V}_{ij} \leftarrow K_{ij}/\sqrt{(D_i D_j)}$	
8	$\tilde{V} \leftarrow (\tilde{V} + \tilde{V}^T)/2$	simetrizasyon
9	Solve $\tilde{V}\psi_m = \lambda_m \psi_m, m = 1 \dots n_c$	öz-değer ayrışımı
10	$\Phi_i \leftarrow (\psi^1(i), \dots, \psi_{n_c}(i))$	difüzyon bileşenleri
11	$c(i) \leftarrow k - \text{means}(\Phi, K)$	amaç: $\min \sum_i \ \Phi_i - \mu_{c(i)}\ ^{22}$
12	tag Φ_i with energy E_i	enerji eşlemesi
13	return $\Phi, c(i), \hat{f}$	

2.2.8. Protein dinamiklerinin boyut indirgeme uygulaması

Moleküler dinamik simülasyonlarından elde edilen bilgiler yapı dinamiklerinin incelenmesi için kullanılmıştır. Protein fonksiyonlarında ligandların yarattığı değişiklikler moleküler dinamik simülasyonları boyunca doğrusal olmayan boyut indirgeme yöntemlerinden olan, manifold yapısını koruyarak denetimsiz öğrenme ile makine öğrenimini gerçekleştiren, difüzyon haritası kullanılarak incelenmiştir. Difüzyon haritaları yapı dinamiklerine ışık tutarken mikro konformasyonların ve metastabil (yarı kararlı) durumların tespiti için MM/GBSA hesaplaması ile entegre edilmiştir. Entegrasyon işlemi her frame için hesaplanan serbest enerji değerlerinin difüzyon haritası grafiğindeki frame'lerle enerji değerlerine göre renklendirilerek yapılmıştır. Böylelikle boyut indirgeme yöntemlerinde sıkça kullanılan fiziksel koşulları yansıtmaktan çok uzak olan tekrar eden durumların olasılık yoğunluğuna bağlı kalmak yerine fiziksel koşulları net bir şekilde yansıtan serbest enerji değerlerini içeren boyut indirgeme grafikleri oluşturulmuştur. Difüzyon haritası grafiklerinin değerlendirilmesinde “insan hatasını” en aza indirmek amacıyla matematiksel doğruluğu yüksek olan OPTIC [173] algoritmasından faydalanılmıştır.

Difüzyon haritası grafiklerinin oluşturulması ve enerji verilerinin entegre edilmesi için geliştirdiğim, NumPy v1.26.4 [174], MDAnalysis v2.7.0 [175], scikit-learn v1.2.1 [176, 177], pandas v2.2.1 [178], Bokeh v3.4.0, pyemma v2.5.7 [179] python kütüphanelerini kullanan yazılımları, <https://github.com/cannabinoid13/MDScripts> adresindeki github deposunda, difuzyon_map_MMGBSA_OPTICS.py ve difuzyon_map_2D.py dosya adlarıyla, kullanıldıkları hakemli dergi makale referansları ile bulunmaktadır [180].

2.3. *in vitro* Çalışmalar

Tamamı bilimsel iş birlikleri kapsamında Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi ve Ankara Hacı Bayram Veli Üniversitesi laboratuvarları kullanılarak gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalar, ab1-14 serimizin *Fusarium oxysporum* üzerindeki inhibe edici etkisini ve bitki büyümesini teşvik eden bakteri suşları üzerindeki etkisinin deneysel olarak değerlendirilmesini içerir. Bileşik serimizin *Fusarium oxysporum* organizması üzerindeki etkisinin organizmanın büyüme, gelişim ve yayılım gibi özelliklerini sınırlaması beklenirken, bitki büyümesini teşvik eden bakteriler üzerinde etkisinin en az düzeyde olması olumlu sonuçlar olarak değerlendirilir.

2.3.1. *Fusarium oxysporum*'a karşı etkinlik

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi'nden Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yusuf BAYAR tarafından *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* üzerinde *in vitro* gerçekleştirilen deneyler şu şekilde gerçekleştirilmiştir:

Bu çalışmada kullanılan bitki patojeni fungal kültürü (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*), Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Fitopatoloji laboratuvarlarında bulunan stok kültürlerden temin edilmiştir. Bu kültürler, 20 ml Patates Dekstroz Agar (PDA) içeren 90 mm'lik Petri kaplarında 23 ± 2 °C'de 7 gün inkübe edildikten sonra kullanılmıştır.

In vitro antifungal aktivite (zehirli gıda testi)

Pozitif kontrol olarak %99 saflıkta Propamocarb-HCl kullanılmıştır. Tüm hedef bileşikler *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 'ye karşı inhibisyon aktiviteleri açısından test edilmiştir.

Son konsantrasyonları 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} mM olacak şekilde stok çözelti hazırlamak için her bir bileşik tartılmış, DMSO (1 mL) içinde çözülmüş ve Tween-80 çözeltisi (%1) ile 10 mL'ye seyreltilmiştir. Seyreltilmiş çözelti (1 mL) steril patates dekstroz agarına (PDA, 29 mL) eklenmiştir. Kültür ortamlarından 5 mm çapında hifler kesilmiş ve sterilize edilmiş bir bistrübü yardımı ile alınarak 6 cm çapındaki PDA plakalarının ortasına inoküle edilmiştir. Aşılana plakalar 23 ± 2 °C'de inkübe edilmiştir. Her deneyin üç tekrarı vardı. Boş kontroller için koloni çapı 5-6 cm'ye ulaştığında, her bir koloni çapı çaprazlama yoluyla ölçülmüştür. Her bir koloni için ortalama çapı hesaplandı. Düzeltilmiş inhibitör oranı şu formüle göre hesaplanmıştır: $I = [(C - T)/(C - 0, 5)] \times \%100$, burada I, C ve T sırasıyla inhibisyon oranını, boş kontrol hiflerinin ortalama çapını ve muamele edilmiş hiflerin ortalama çapını gösterir [181].

Miselyal büyüme verileri yüzde inhibisyona dönüştürülmüştür ve yüzde inhibisyon olarak hesaplanmıştır. Tek yönlü varyans analizi ($p \leq 0.05$) ve Duncan testi ($p \leq 0.05$) SPSS istatistik paketi (V. 15.0., SPSS Inst. Inc., Cary, NC, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.3.2. Bitki büyümesini teşvik eden bakteriler üzerine etki

Bilimsel iş birlikleri kapsamında ab1-14 serisi bileşiklerinin endüstriyel, geniş kapsamlı ve ticari kullanımına yönelik olarak, başta tarım alanları olmak üzere çevreye etkileri bitki büyümesini teşvik eden *Bacillus aryabhatai*, *Bacillus subtilis*, *Pantoea vagans*, *Chryseobacterium lathyr*, *Bacillus (Priestia) megaterium*, *Pseudomonas brassicacearum*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas vancouverensis* bakterileri türlerine nasıl etkileri olduğu Ankara Hacı Bayram Veli Üniversitesi Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Hatice ÖĞÜTCÜ tarafından geniş kapsamlı *in vitro* deneylerle belirlenmiştir. Gerçekleştirilen antimikrobiyal aktivite deneyleri şu şekilde yapılmıştır:

Kullanılan bitki gelişimini teşvik eden bakteriler

“Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Yerel Bakteri Kültür Koleksiyonu’nda bulunan 16S rDNA ile tanımlaması yapılmış bitki gelişimini teşvik eden bakteri türleri (PGPR) (daha önceki çalışmalarda izolasyonu yapılmış ve PGPR özellikleri belirlenmiş) *Bacillus aryabhatai* (Genbank No: PP494337), *Bacillus subtilis* (Genbank No: PP494338), *Pantoea vagans* (Genbank No: PP494340), *Chryseobacterium lathyr* (Genbank No: PP494341), *Bacillus (Priestia) megaterium* (Genbank No: PP494342), *Pseudomonas brassicacearum* (Genbank No: PP494332), *Pseudomonas koreensis* (Genbank No: PP49434), *Pseudomonas vancouverensis* (Genbank No: PP49434) kullanılmıştır.”

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

“Sentezlenen ab1-14 bileşikleri antimikrobiyal aktiviteleri well difüzyon (agar kuyucuk difüzyon) yöntemi kullanılarak test edilmiştir. Bu amaçla tüm bileşikler DMSO’da çözünmüştür. Ayrıca DMSO aktivite çalışmalarında kontrol amacıyla da kullanılmış ve çalışmada kullanılan organizmalara karşı herhangi bir aktivite gözlenmemiştir. Çalışmada kullanılan PGPR’lar 28°C’de 24 saat boyunca Nutrient Broth besiyerinde (106 CFU/mL) inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda bu kültürler, otoklavlanıp 45°C’ye kadar soğutulmuş Mueller-Hinton Agar (MHA) (15mL) besiyerine ilave edilip homojenize edilmiştir. Homojenizasyon sonrası besiyerleri plaklara dökülüp soğumaya bırakılmıştır. Daha sonra bu besiyerlerinde 6mm çapında kuyucuklar açılmış ve içerisine sentezlenen bileşiklerden 20

μL ilave edilmiştir. Plaklar 24 saat boyunca, 28°C 'de etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Son aşamada ise; inkübasyonun sonunda, her bileşik için inhibisyon zonu ölçülmüş ve üç tekrarlı yapılan aktivite değerlerinin ortalaması alınmıştır.”

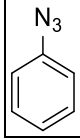
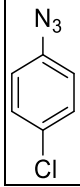
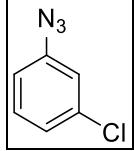
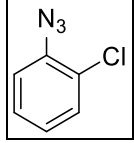


3. DENEYSEL

3.1. Anilin Türevlerinden Azür Türevi Bileşiklerin Sentezi

Fenilazür bileşiklerinin sentezi Şekil 2.1'deki sentez şeması takip edilerek anilin bileşiklerini kullanarak gerçekleştirilmiştir. Destilasyon ile saflaştırılmış ve okside formundan ayrıştırılarak saf hale getirilmiş 10 mmol anilin türevleri (0,93 g) 50 mL suda çözündü. Daha sonra buz banyosu (0-5 °C) içerisinde soğutulan bu çözeltiye 10 mL 6 M HCl (20 mmol) çözeltisi içerisinde çözünmüş 10 mmol (0,69 g) NaNO₂ ilave edilerek bu sıcaklıkta bir saat karıştırıldı. Ardından 10 mL suda çözünmüş 10 mmol NaN₃ tepkime ortamına damla damla eklendi 3 saat daha karıştırıldı. Bu sürenin sonunda tepkime karışımı etil asetat (30 ml) ile 3 defa ekstraksiyon yapılarak sonrasında organik faz sodyum sülfat ile kurutulup çözücü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı. İleri saflaştırılma yapılmadan bir sonraki basamakta kullanıldı. Elde edilen bileşikler Çizelge 3.1'de fiziksel özellikleri ve verimleri ile birlikte verilmiştir.

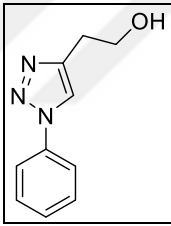
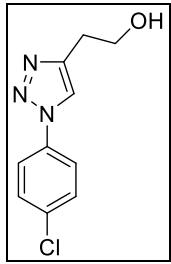
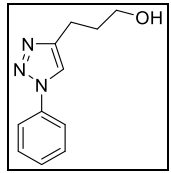
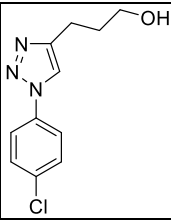
Çizelge 3.1. Sentezlenen azür bileşiklerinin fiziksel özellikleri

Bileşik İsmi	Molekül Yapısı	Fiziksel Özellik	Verim (%)
Fenil azür		Sıvı	95
4-Klorofenil azür		Sıvı	92
3-Klorofenil azür		Sıvı	87
2-Klorofenil azür		Sıvı	91

3.2. Fenil azür Türevlerinden Triazoilalkol Bileşiklerinin Sentezi

Triazoilalkol bileşiklerinin sentezi için Şekil 2.2'deki sentez şeması takip edilmiştir. 5.0 mmol fenil azür (0, 65 g fenil azür ve klor sübtitue fenil azürler için 0, 7 g) 4, 5 mmol alkinol (333, 5 mg bütün-1-ol ve 396, 7 mg pentin-1-ol) ile 0.4 mmol (114 mg) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0, 91 mmol (180 mg) sodyum askorbat tepkime ortamına eklenmiştir. 3 mL t-BuOH ve 3 mL suyun ortama eklenmesi ile üç gün boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak devam etmesi sağlanan tepkime, ince tabaka kromatografisi ile takip edilmiş ortamdaki alkol bittiğinde etil asetat ve suyun ekstraksiyon işlemi için eklenmesi ile sonlandırılmıştır. Ekstraksiyon işlemi 15 mL etil asetat ile üç defa tekrarlanmış, ardından organik faz sodyum sülfat ile kurutulmuş ve silika jel dolgululu kolon kromatografisinde CHCl_3 'te çözünerek saflaştırılmıştır.

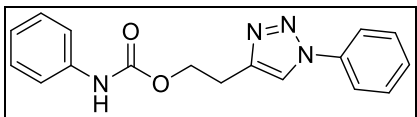
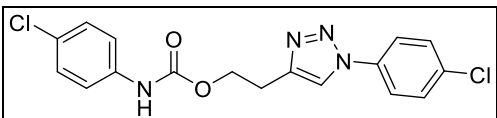
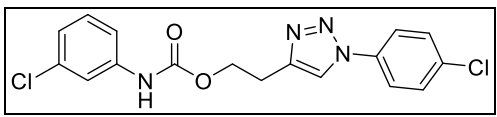
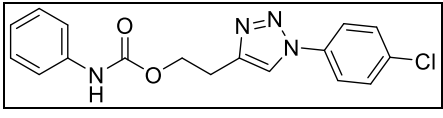
Çizelge 3.2. Sentezlenen triazol-alkol bileşiklerinin fiziksel özellikleri ve elde edilmiş verimleri

Bileşik İsmi	Molekül Yapısı	Erime Noktası (°C)	Verim (%)
1-Fenil-4-(2-hidroksietil)-1 <i>H</i> -1, 2, 3-triazol		116-119	89
1-(4-klorofenil)-4-(2-hidroksietil)-1 <i>H</i> -1, 2, 3-triazol		Viskoz	76
1-Fenil-4-(3-hidroksipropil)-1 <i>H</i> -1, 2, 3-triazol		52-53	65
1-(4-klorofenil)-4-(2-hidroksietil)-1 <i>H</i> -1, 2, 3-triazol		98-99	88

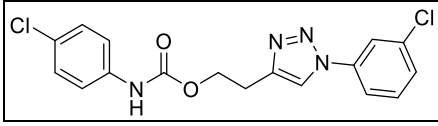
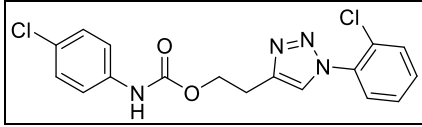
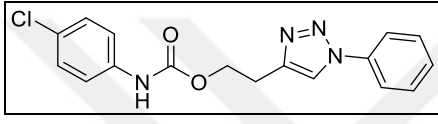
3.3. Triazol-Alkol Bileşiklerden Karbamat Bileşiklerinin Sentezi

Triazol-alkol türevi haline getirilen fenil ve farklı klorofenil sübstitüentleri içeren bileşiklerin karbamat bileşiklerine sentezi için Şekil 2.3'teki sentez şeması takip edilmiştir. Triazol-alkol türevlerinden; fenil gruplu triazol-alkol için 0, 44 mmol, klorofenil gruplular için 0, 45 mmol tepkimelerde kullanılmıştır. Buna karşılık fenil izosiyanattan 59 mg (0, 45 mmol) ve 4-klorofenilizosiyanat 75 mg (0, 49 mmol) alınarak 6 mL tolüen içerisinde çözünmesi sağlanmış, katalitik miktarda trietilamin eklenerek 100 °C'de bir gün geri soğutucu altında karıştırılmıştır. İnce tabaka kromatografisi ile takip edilen tepkime, 24 saat sonra sonlandırılmıştır. Daha sonra 3 x 10 mL etil asetat kullanılarak ekstraksiyon yapılmış, organik faz ayrılarak sodyum sülfat ile kurutulmuştur. Çözücü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılmış, ham ürün silika jel dolgulu kolonda %40'lık etil asetat/hekzan çözücü sisteminde yürütülerek saflaştırılmıştır. Elde edilen katılar DCM/Hekzan çözücü sisteminde tekrar kristallendirilmiştir.

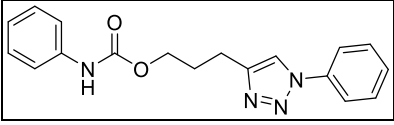
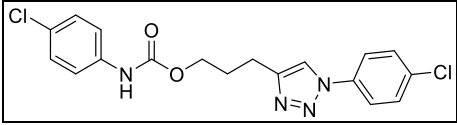
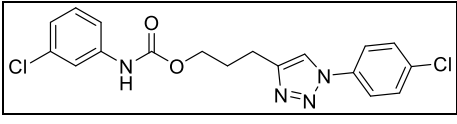
Çizelge 3.3. Yan zincir uzunluğu iki karbon olan triazoilkarbamat bileşikleri

Molekül Yapısı ve IUPAC Adı	Bileşik Kodu	Erime Noktası (°C)	Verim (%)
 2-(1-fenil-1H-1, 2, 3-triazol-4-il)etil fenilkarbamat	ab1	102-104	42
 2-(1-(4-klorofenil)-1H-1, 2, 3-triazol-4-il)etil (4-klorofenil)karbamat	ab2	142-145	51
 2-(1-(4-klorofenil)-1H-1, 2, 3-triazol-4-il)etil (3-klorofenil)karbamat	ab3	157-160	23
 2-(1-(4-klorofenil)-1H-1, 2, 3-triazol-4-il)etil fenilkarbamat	ab4	105-107	49

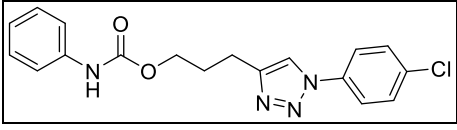
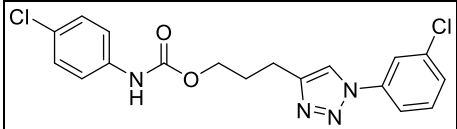
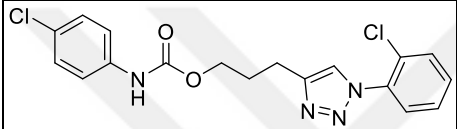
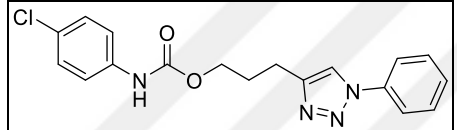
Çizelge 3.3. (devam) Yan zincir uzunluğu iki karbon olan triazoilkarbamat bileşikler

 2-(1-(3-klorofenil)-1H-1, 2, 3-triazol-4-il)etil (4-klorofenil)karbamat	ab5	124-126	26
 2-(1-(2-klorofenil)-1H-1, 2, 3-triazol-4-il)etil (4-klorofenil)karbamat	ab6	168	36
 2-(1-fenil-1H-1, 2, 3-triazol-4-il)etil (4-klorofenil)karbamat	ab7	92-95	43

Çizelge 3.4. Yan zincir uzunluğu üç karbon olan triazoilkarbamat bileşikler

Molekül Yapısı ve IUPAC Adı	Bileşik Kodu	Erime Noktası (°C)	Verim (%)
 3-(1-fenil-1H-1, 2, 3-triazol-4-il)propil fenilkarbamat	ab8	144	63
 3-(1-(4-klorofenil)-1H-1, 2, 3-triazol-4-il)propil (4-klorofenil)karbamat	ab9	158-160	72
 3-(1-(4-klorofenil)-1H-1, 2, 3-triazol-4-il)propil (3-klorofenil)karbamat	ab10	206-210	7

Çizelge 3.4. (devam) Yan zincir uzunluğu üç karbon olan triazoilkarbamat bileşikleri

 3-(1-(4-klorofenil)-1<i>H</i>-1, 2, 3-triazol-4-il)propil fenilkarbamat	ab11	133-135	59
 3-(1-(3-klorofenil)-1<i>H</i>-1, 2, 3-triazol-4-il)propil (4-klorofenil)karbamat	ab12	132-133	26
 3-(1-(2-klorofenil)-1<i>H</i>-1, 2, 3-triazol-4-il)propil (4-klorofenil)karbamat	ab13	144-145	24
 3-(1-fenil-1<i>H</i>-1, 2, 3-triazol-4-il)propil (4-klorofenil)karbamat	ab14	140-141	43

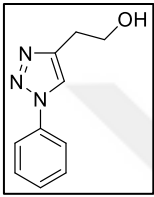


4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. 1, 2, 3-Triazolaalkol Bileşiklerinin Yapılarının Doğrulanması

Sentezini gerçekleştirdiğimiz 1, 2, 3-triazolalkol bileşiklerinin yapıları erime noktası tayini, FT-IR ATR, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR ile doğrulanmıştır.

4.1.1. 1-Fenil-4-(2-hidroksietil)-1*H*-1, 2, 3-triazol bileşiğinin yapı doğrulaması

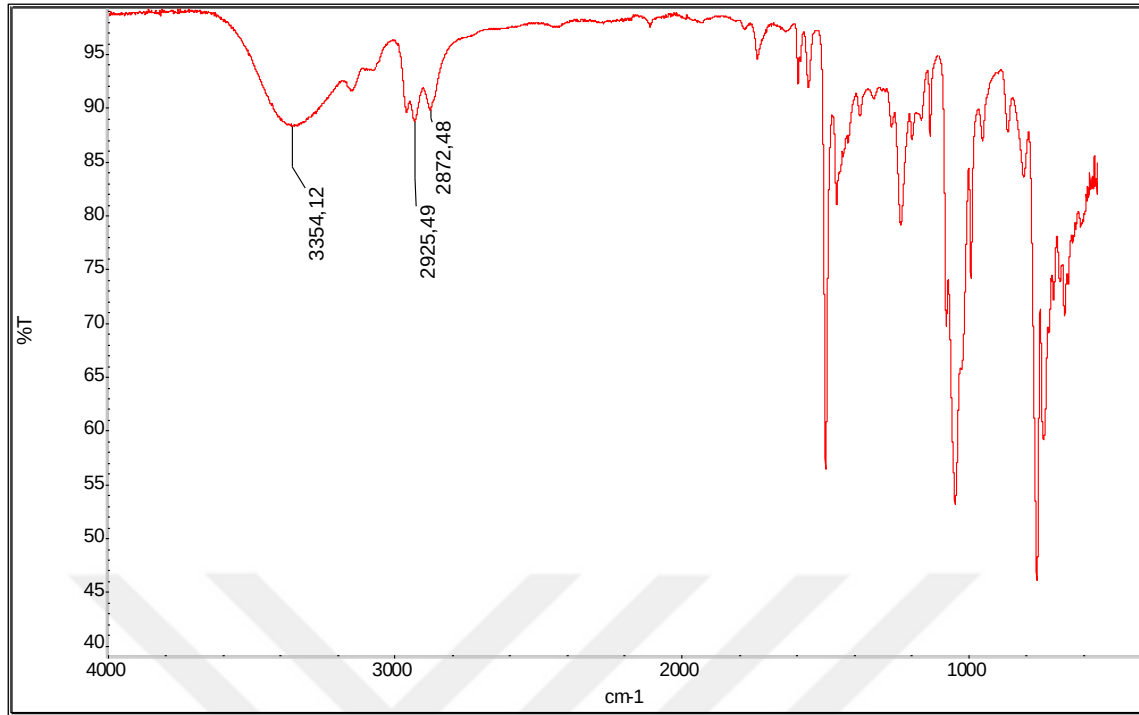


1-Fenil-4-(2-hidroksietil)-1*H*-1, 2, 3-triazol bileşiği yapısı spektroskopik verileri ile detaylı olarak analiz edilmiştir. Bileşik literatürde olan bir bileşiktir ve elde edilen spektrumlar literatürle uyumludur [182, 183]. Bileşik %90'lık etilasetat/hekzan çözücü sistemi ile silika jel dolgusu kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı.

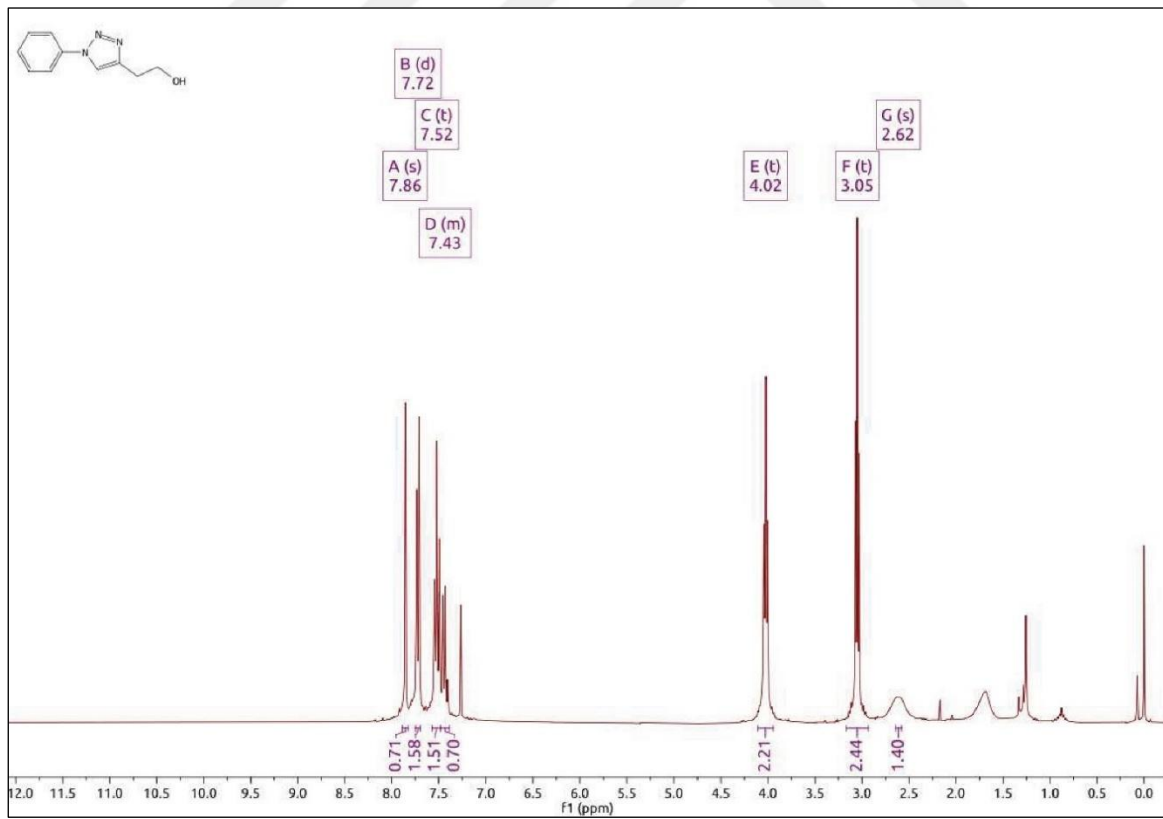
IR (ATR, cm^{-1}): 3354 (yayvan): -OH gerilme bandı, 2925: Aromatik C-H gerilme bandı, 2872: Alifatik C-H gerilme bandı.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.86 (s, 1H, $-\text{C}_{\text{triazol}}\text{H}$), 7.72 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, $-\text{C}_{\text{aromatik}}\text{H}$), 7.52 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, $-\text{C}_{\text{aromatik}}\text{H}$), 7.48 – 7.39 (m, 1H, $-\text{C}_{\text{aromatik}}\text{H}$), 4.02 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2$), 3.05 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H, $-\text{C}_{\text{triazol}}-\text{CH}_2$), 2.62 ppm (s, 1H, -OH).

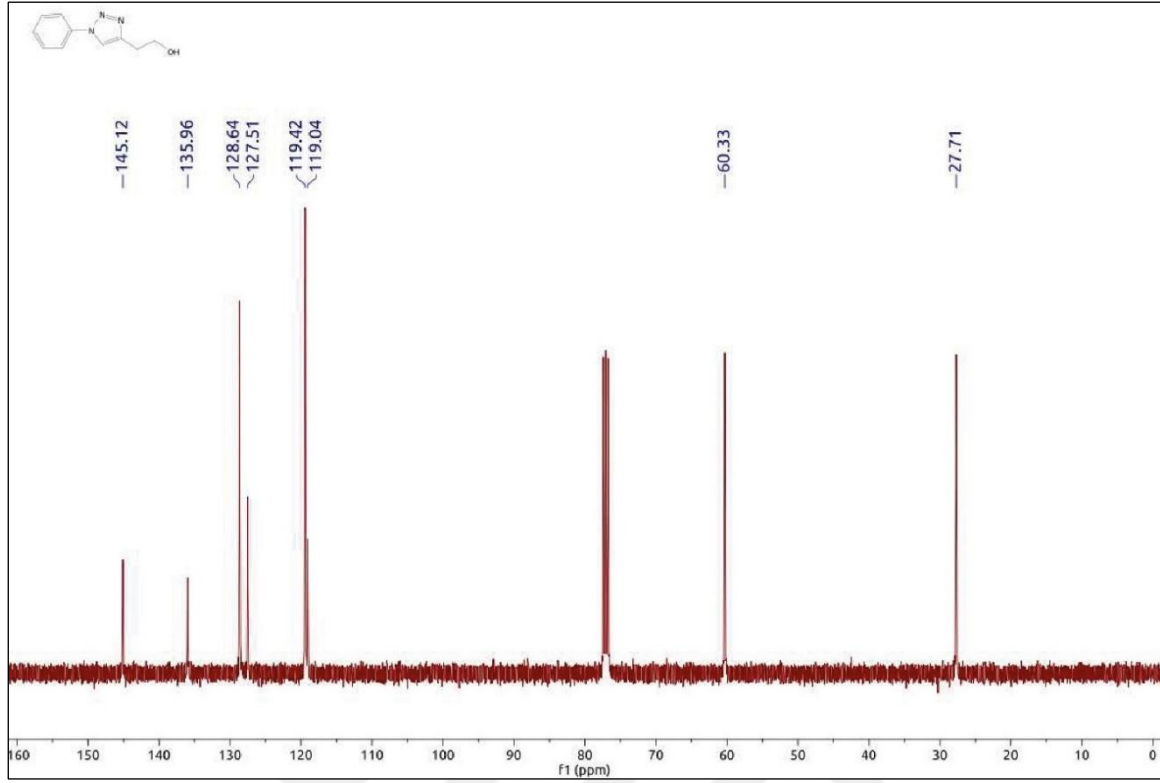
^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 145.12, 135.96, 128.64, 127.51, 119.42, 119.04, 60.33, 27.71 ppm.



Şekil 4.1. 1-Fenil-4-(2-hidroksietil)-1H-1, 2, 3-triazol bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu



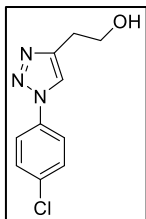
Şekil 4.2. 1-Fenil-4-(2-hidroksietil)-1H-1, 2, 3-triazol bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu



Şekil 4.3. 1-Fenil-4-(2-hidroksietil)-1H-1, 2, 3-triazol bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu

Tüm karakterizasyon ve spektral veriler birlikte değerlendirildiğinde 1-fenil-4-(2-hidroksietil)-1H-1, 2, 3-triazol bileşiğinin elde edildiği tespit edilmiştir.

4.1.2. 1-(4-Klorofenil)-4-(2-hidroksietil)-1H-1, 2, 3-triazol bileşiğinin yapı doğrulaması

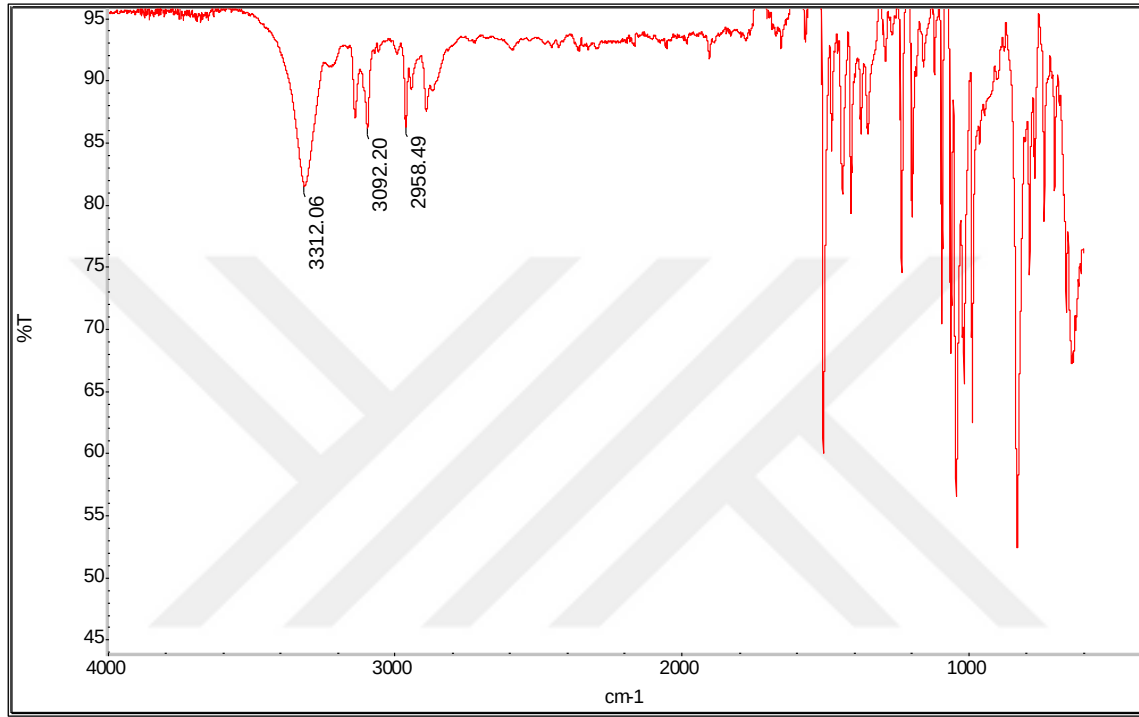


1-(4-Klorofenil)-4-(2-hidroksietil)-1H-1, 2, 3-triazol bileşiği yapısı detaylı olarak analiz edilmiştir ve literatürdeki verileri ile karşılaştırılarak doğrulanmıştır. Yapı literatürle uyumludur [184, 185]. Bileşik %90'lık etil asetat/hekzan çözücü sistemi ile silika jel dolgusu kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı.

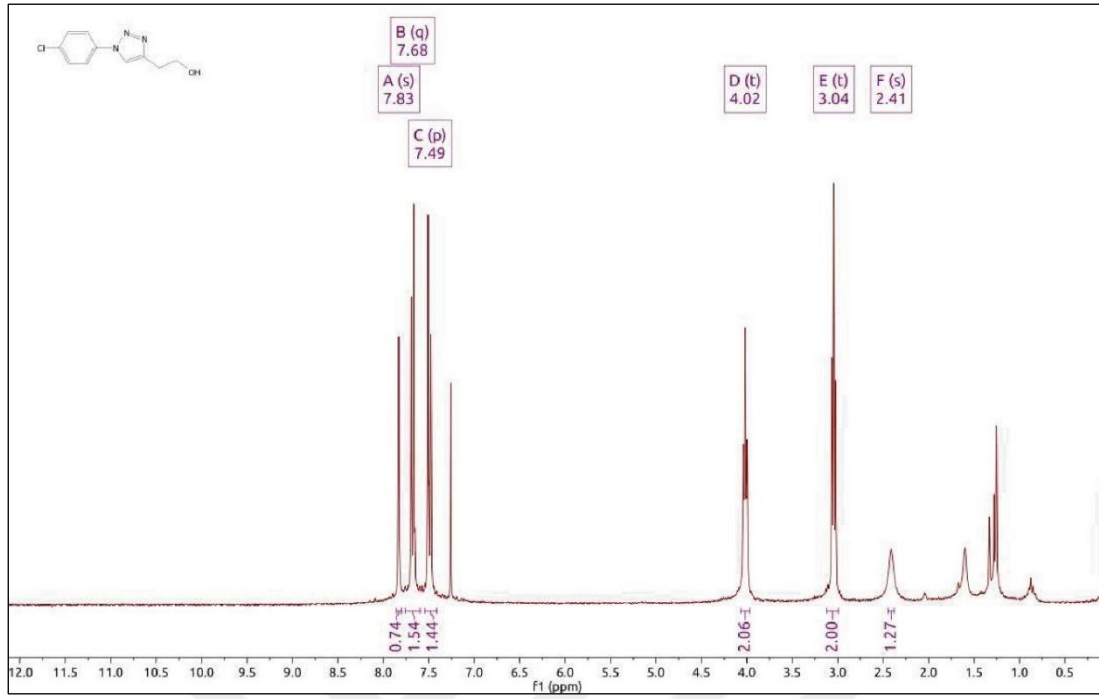
IR (ATR, cm⁻¹): 3312 (yayvan): -OH gerilme bandı, 3092: Aromatik C-H gerilme bandı, 2958: Alifatik C-H gerilme bandı.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.83 (s, 1H, $-\text{C}_{\text{triazolH}}$), 7.68 (q, $J = 2.8, 2.1$ Hz, 2H, $-\text{C}_{\text{aromatikH}}$), 7.49 (p, $J = 2.9, 2.9, 2.1$ Hz, 2H, $-\text{C}_{\text{aromatikH}}$), 4.02 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2$), 3.04 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, $-\text{C}_{\text{triazol}}-\text{CH}_2$), 2.41 ppm (s, 1H, $-\text{OH}$).

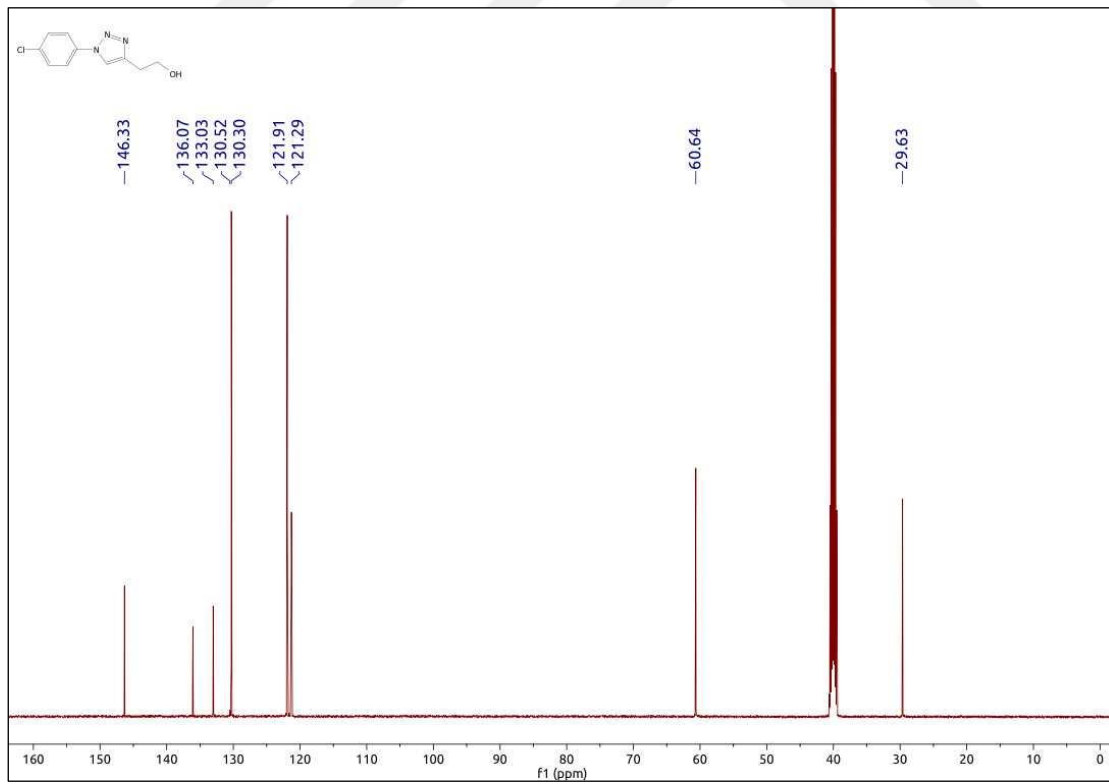
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 146.3, 136.0, 133.0, 130.5, 121.9, 121.2, 60.6, 29.6 ppm.



Şekil 4.4. 1-(4-klorofenil)-4-(2-hidroksietil)-1H-1, 2, 3-triazol bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu

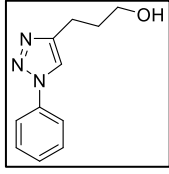


Şekil 4.5. 1-(4-Klorofenil)-4-(2-hidroksietil)-1H-1, 2, 3-triazol bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu



Şekil 4.6. 1-(4-Klorofenil)-4-(2-hidroksietil)-1H-1, 2, 3-triazol bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu

4.1.3. 1-Fenil-4-(3-hidroksipropil)-1*H*-1, 2, 3-triazol bileşiğinin yapı doğrulaması

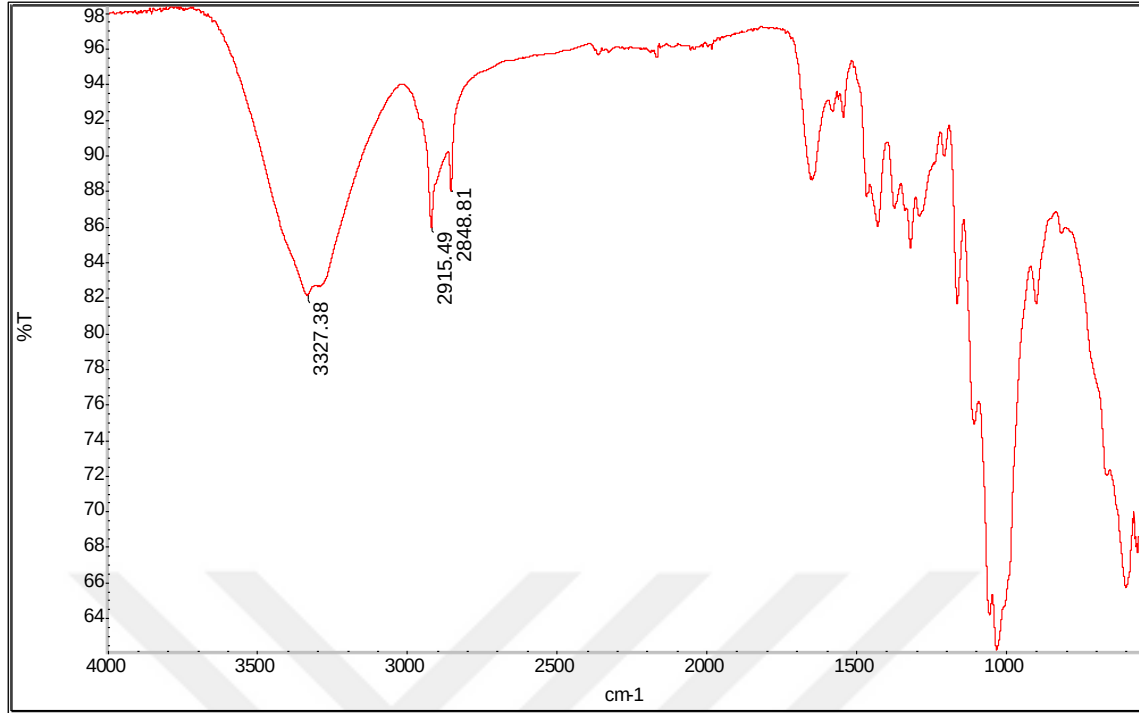


1-fenil-4-(3-hidroksipropil)-1*H*-1, 2, 3-triazol bileşiği %90'lık etil asetat/hekzan çözücü sistemi ile silika jel dolgusu kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Literatürde raporlanmış bir bileşik olduğundan bilinen veriler ile de karşılaştırılarak doğrulama yapılmıştır [185].

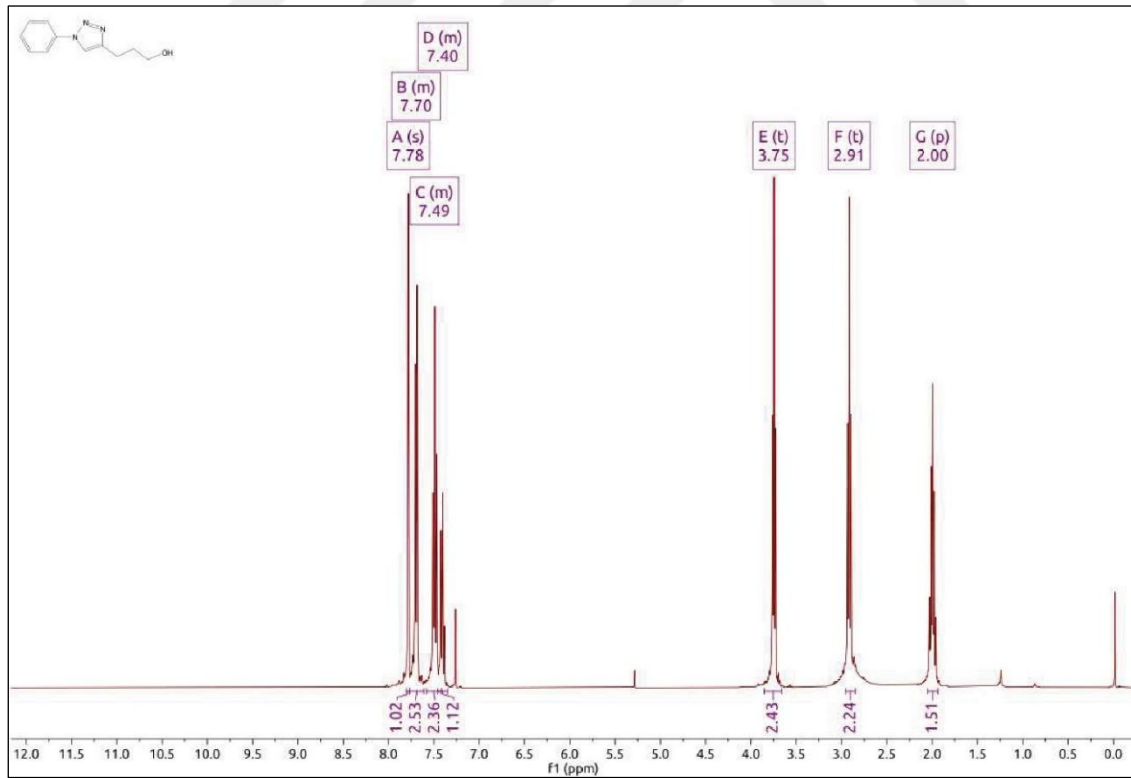
IR (ATR, cm^{-1}): 3327(yayvan): -OH gerilme bandı, 2915: Aromatik C-H gerilme bandı, 2848: Alifatik C-H gerilme bandı.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.78 (s, 1H, - $\text{C}_{\text{triazolH}}$), 7.77 – 7.61 (m, 3H, - $\text{C}_{\text{aromatikH}}$), 7.58 – 7.42 (m, 2H, - $\text{C}_{\text{aromatikH}}$), 7.46 – 7.35 (m, 1H, - $\text{C}_{\text{aromatikH}}$), 3.75 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H, -O- CH_2), 2.91 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, - $\text{C}_{\text{triazol-CH}_2}$), 2.00 ppm (m, $J = 6.8$ Hz, 2H, -C- CH_2 -C-).

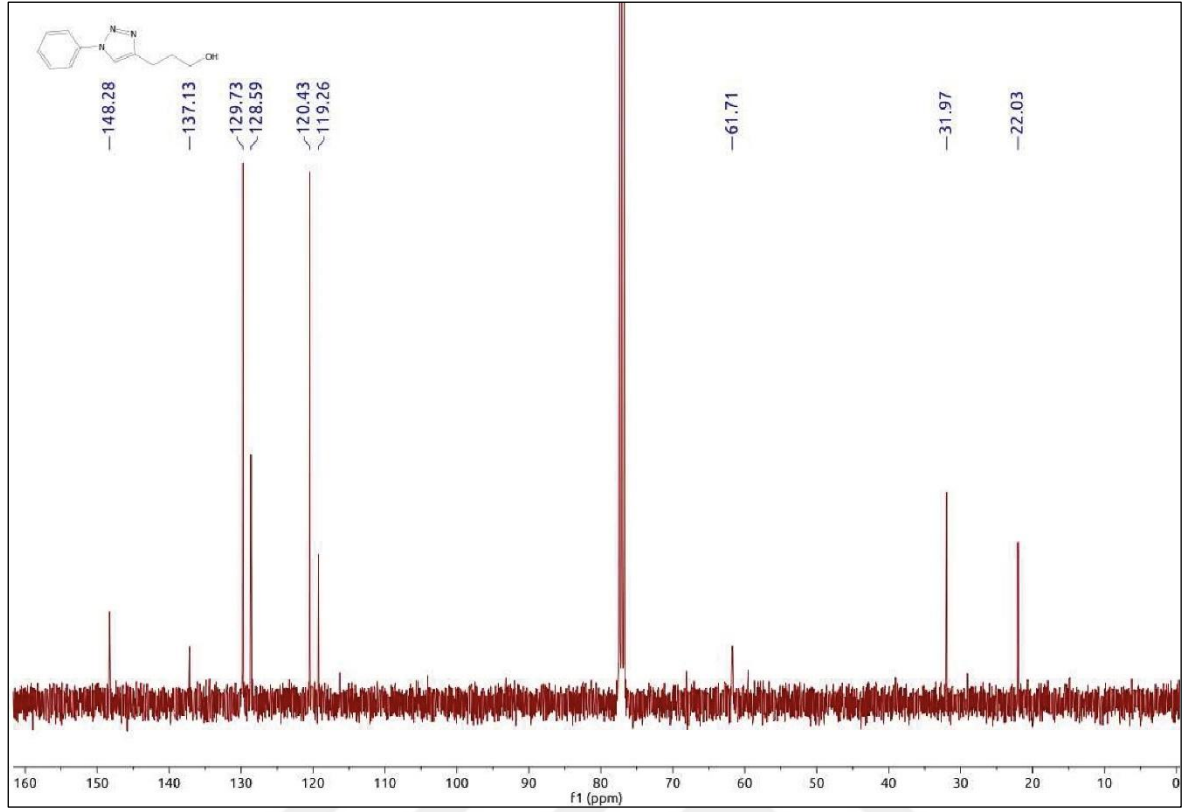
^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 148.2, 137.1, 129.7, 128.5, 120.4, 119.2, 61.7, 31.9, 22.0 ppm.



Şekil 4.7. 1-Fenil-4-(3-hidroksipropil)-1H-1, 2, 3-triazol bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu

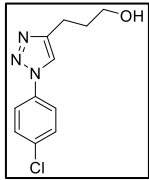


Şekil 4.8. 1-Fenil-4-(3-hidroksipropil)-1H-1, 2, 3-triazol bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu



Şekil 4.9. 1-Fenil-4-(3-hidroksipropil)-1H-1, 2, 3-triazol bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu

4.1.4. 1-(4-Klorofenil)-4-(2-hidroksietil)-1H-1, 2, 3-triazol bileşiğinin yapı doğrulaması

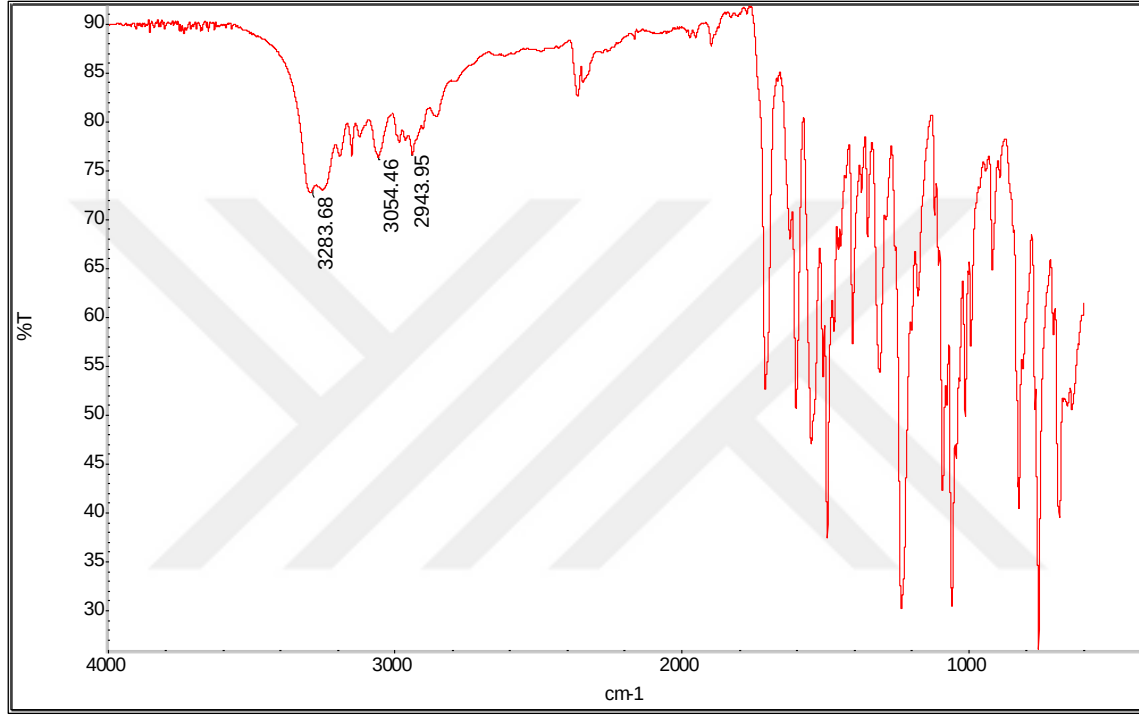


1-(4-Klorofenil)-4-(2-hidroksietil)-1H-1, 2, 3-triazol bileşiği %90'lık etil asetat/hekzan çözücü sistemi ile silika jel dolgusu kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Literatürde raporlanmış bir bileşik olduğundan bilinen veriler ile de karşılaştırılarak doğrulama yapılmıştır [186].

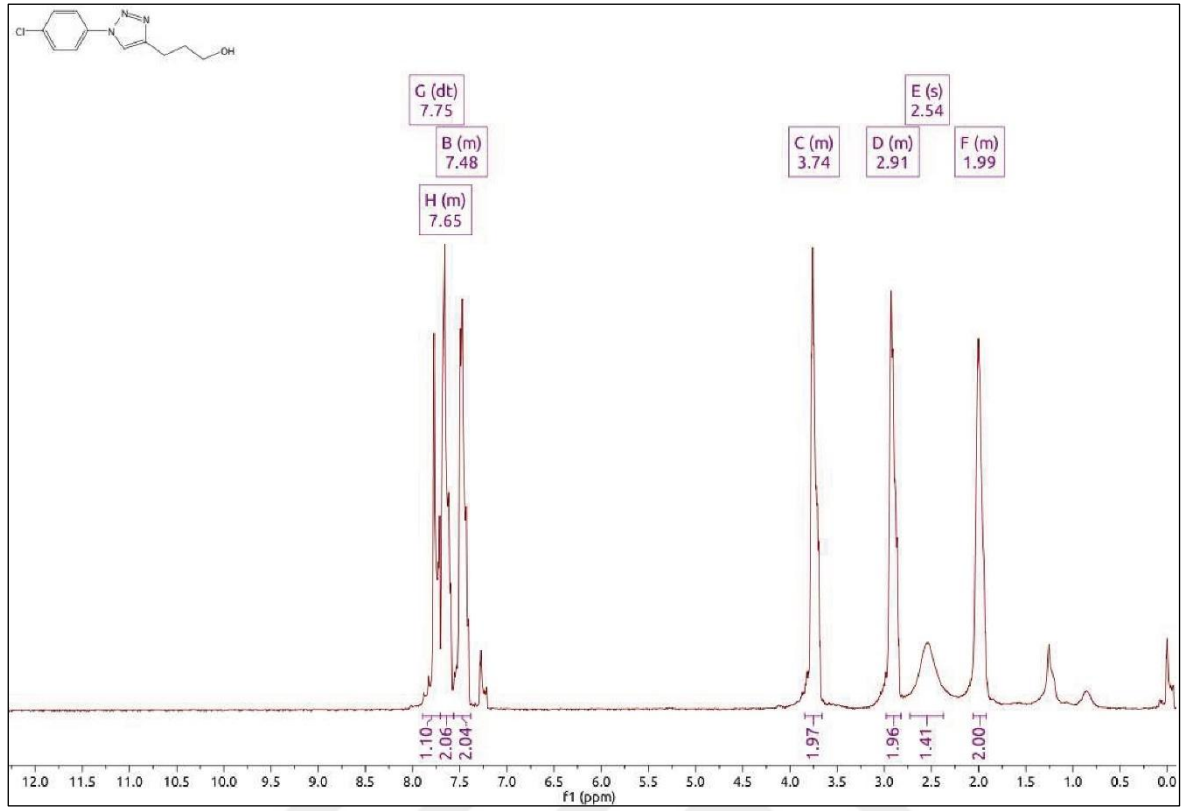
IR (ATR, cm⁻¹): 3283(yayvan): -OH gerilme bandı, 3054: Aromatik C-H gerilme bandı, 2943: Alifatik C-H gerilme bandı.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.81 – 7.58 (m, 3H, $-\text{C}_{\text{triazol}}\text{H} + -\text{C}_{\text{aromatik}}\text{H}$), 7.47 (s, 2H, $-\text{C}_{\text{aromatik}}\text{H}$), 3.76 (s, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2$), 2.93 (s, 2H, $-\text{C}_{\text{triazol}}-\text{CH}_2$), 2.54 (s, 1H, $-\text{OH}$), 2.00 ppm(s, 2H, $-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-$).

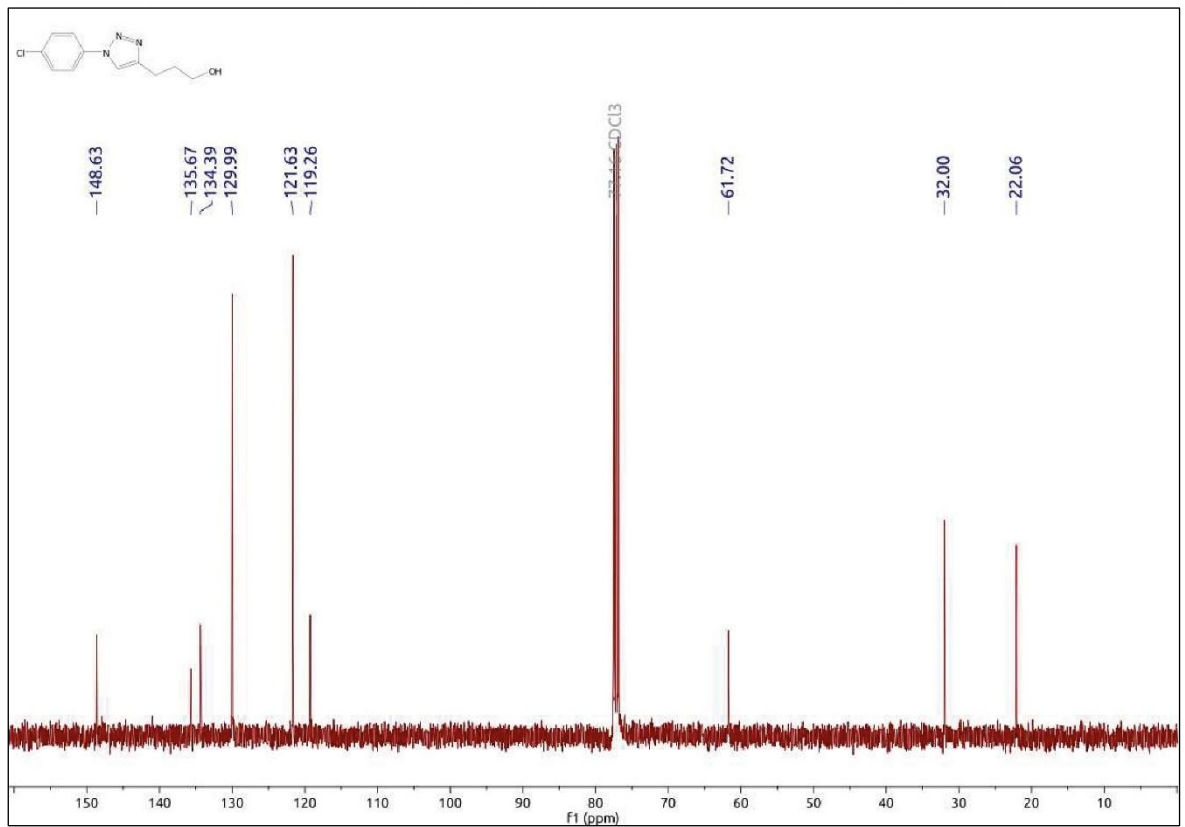
^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 148.6, 135.6, 134.3, 129.9, 121.6, 119.2, 61.7, 32.0, 22.0 ppm.



Şekil 4.10. 1-(4-Klorofenil)-4-(2-hidroksietil)-1H-1, 2, 3-triazol bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu



Şekil 4.11. 4-Klorofenil-1*H*-1, 2, 3-triazol-4-il)propanol bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu



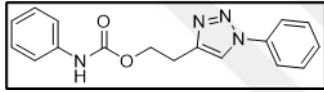
Şekil 4.12. 4-Klorofenil-1*H*-1, 2, 3-triazol-4-il)propanol bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu

^1H -NMR ve ^{13}C -NMR verileri doğrultusunda ara basamak bileşiğimiz olan 4-klorofenil-1*H*-1, 2, 3-triazol-4-ilpropanol şekilde sentezlenmiştir.

4.2. Yeni Sentezlenen 1, 2, 3-Triazol-Karbamat Bileşiklerinin Yapı Aydınlatması ve Karakterizasyonu

Yeni sentezlenen 1, 2, 3-triazoilkarbamat bileşiklerinin yapıları FT-IR ATR, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR ve HR-APCI-TOF yöntemleriyle aydınlatılıp, erime noktası tayini ile karakterizasyonu tamamlanmıştır.

4.2.1. ab1 (2-(1-fenil-1*H*-1, 2, 3-triazol-4-il)etil fenilkarbamat) bileşiğinin yapı aydınlatması



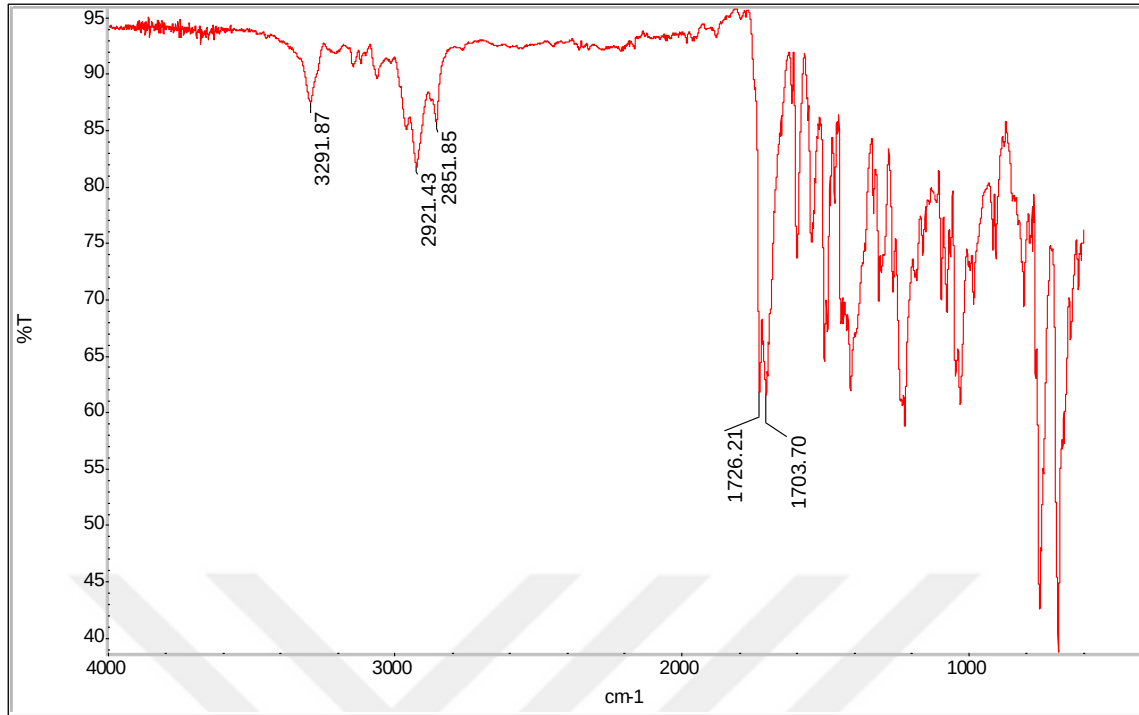
Bileşik ab1 %40'lık etil asetat/hekzan çözücü sistemi ile silika jel dolgusu kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı, katılar MeOH/DCM/hekzan ile kristallendirildi.

IR (ATR, cm^{-1}): 3291 N-H gerilme, 2921 aromatik C-H gerilme, 2852 alifatik C-H gerilme, 1726 ve 1703 karbamat C=O (tautomerizasyon ve/veya rotasyonel izomerizasyondan kaynaklı iki band) gerilme bandları

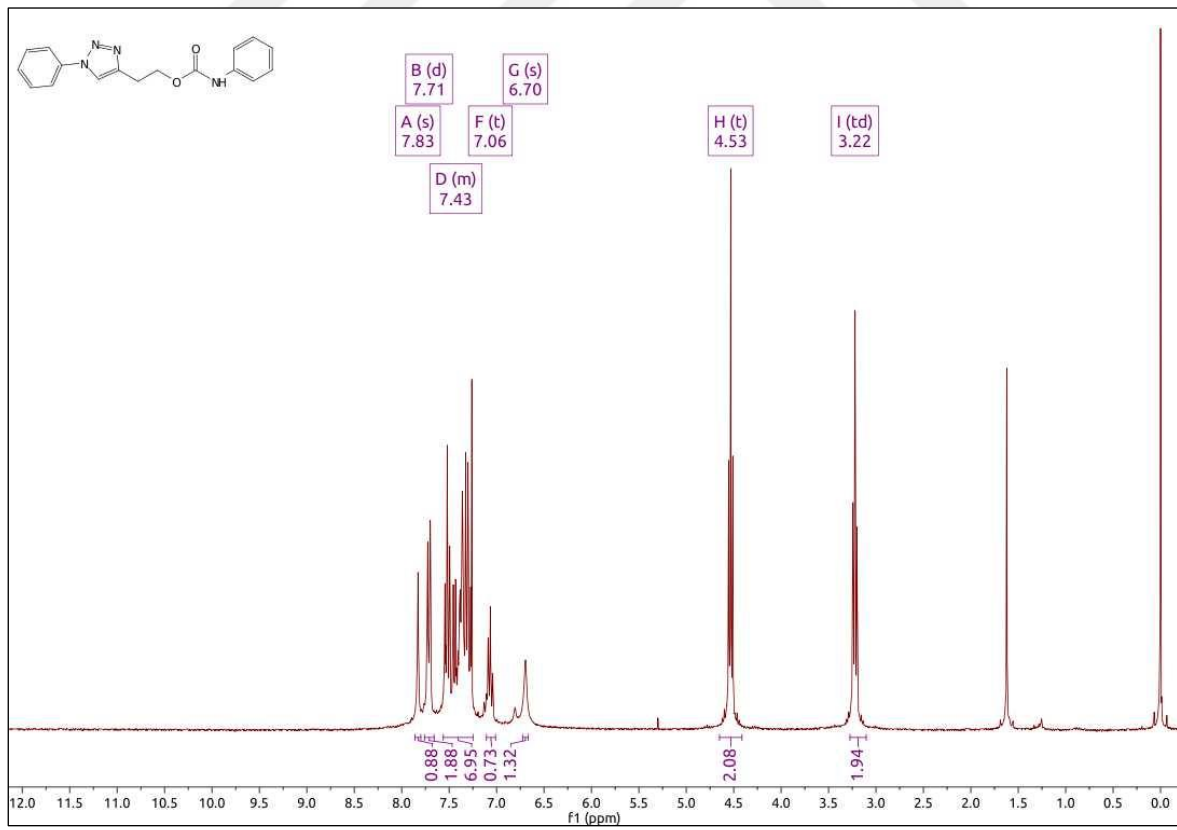
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.83 (s, 1H, - $\text{C}_{\text{triazol}}\text{H}$), 7.71 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, - $\text{C}_{\text{aromatik}}\text{H}$), 7.56 – 7.25 (m, 7H, - $\text{C}_{\text{aromatik}}\text{H}$), 7.06 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, - $\text{C}_{\text{aromatik}}\text{H}$), 6.70 (s, 1H, -NH), 4.53 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, -O- CH_2), 3.22 ppm(td, $J = 6.6, 0.7$ Hz, 2H, - $\text{C}_{\text{triazol}}\text{-CH}_2$).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 153.5, 145.2, 140.6, 138.4, 134.9, 130.5, 129.8, 128.8, 126.9, 124.8, 120.6, 63.4, 25.8 ppm

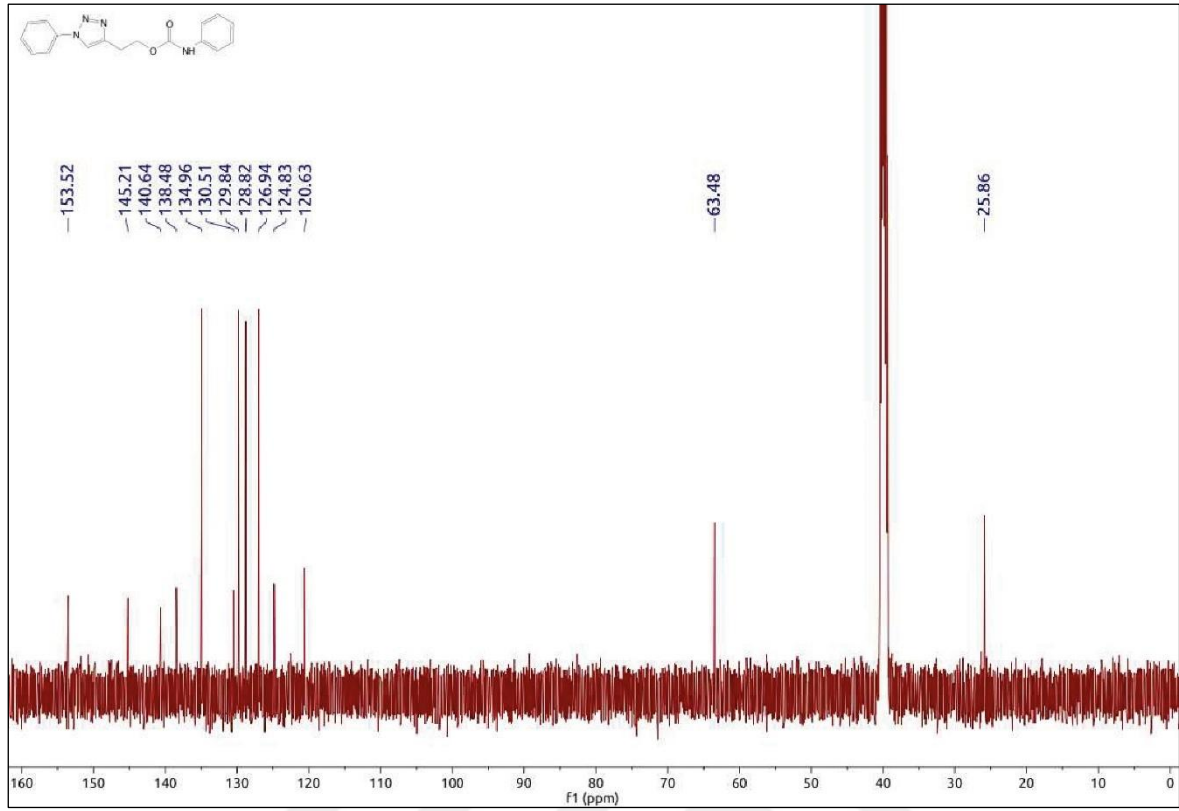
HRMS (APCI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ hesaplanan $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2^+$: 309.13460; bulunan: 309.13696



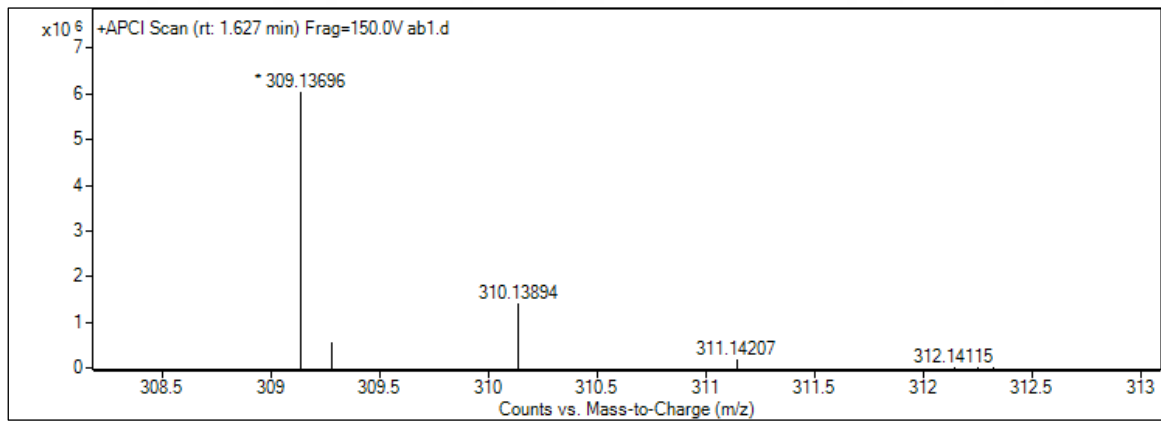
Şekil 4.13. ab1 bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu



Şekil 4.14. ab1 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu

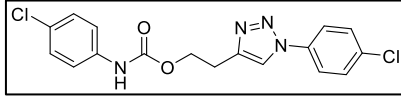


Şekil 4.15. ab1 bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu



Şekil 4.16. ab1 bileşiğinin HR-APCI-TOF spektrumu

4.2.2. ab2 (2-(1-(4-klorofenil)-1*H*-1, 2, 3-triazol-4-il)etil(4-klorofenil)karbamat) bileşiminin yapı aydınlatması



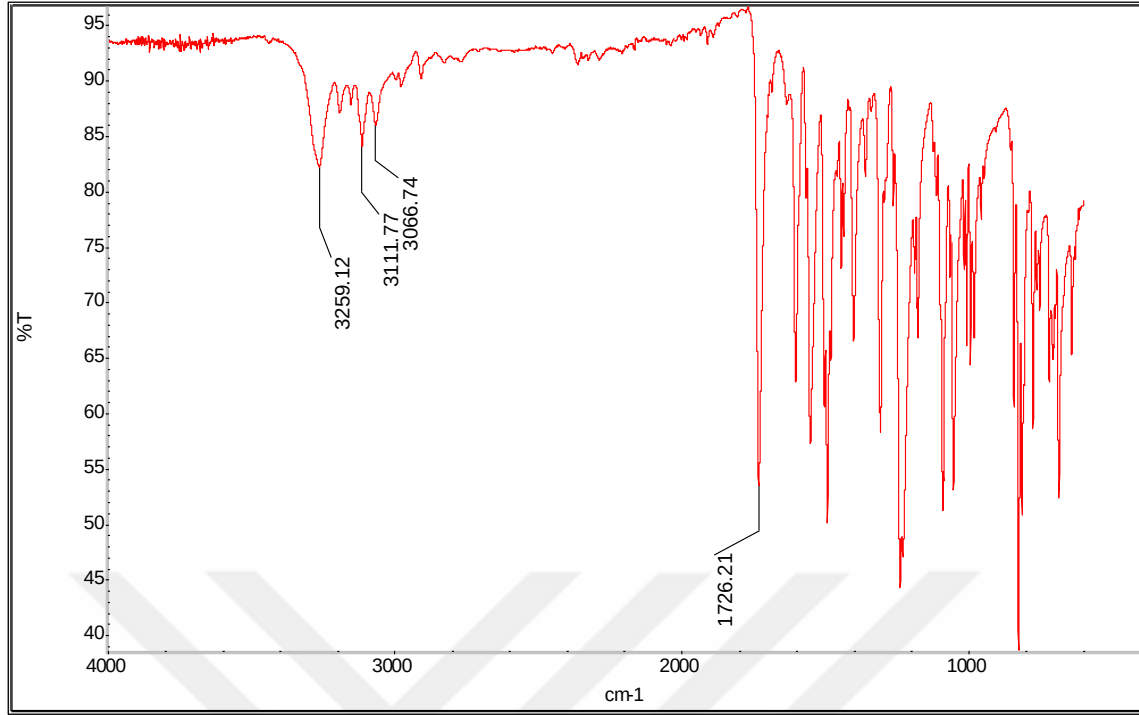
Bileşik ab2 %40'lık etil asetat/hekzan çözücü sistemi ile silika jel dolgusu kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı, katılar MeOH/DCM/hekzan ile kristallendirildi.

IR (ATR, cm^{-1}): 3259 N-H gerilme, 3111 aromatik C-H gerilme, 3066 alifatik C-H gerilme, 1726 karbamat C=O gerilme bandları

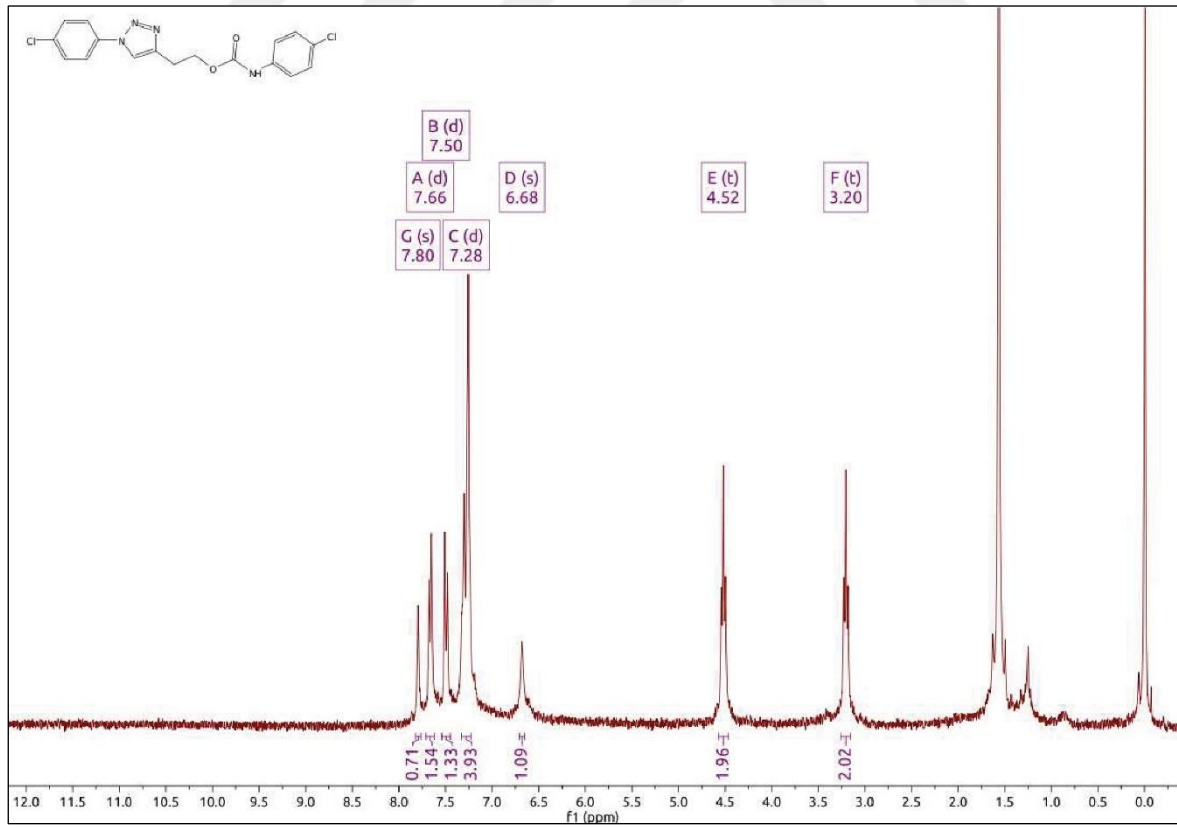
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.80 (s, 1H, $-\text{C}_{\text{triazol}}\text{H}$), 7.66 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, $-\text{C}_{\text{aromatik}}\text{H}$), 7.50 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, $-\text{C}_{\text{aromatik}}\text{H}$), 7.28 (d, $J = 13.1$ Hz, 4H, $-\text{C}_{\text{aromatik}}\text{H}$), 6.68 (s, 1H, $-\text{NH}$), 4.52 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2$), 3.20 ppm (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, $-\text{C}_{\text{triazol}}-\text{CH}_2$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 155.0, 141.8, 139.0, 134.2, 130.8, 129.9, 129.2, 125.3, 124.5, 122.3, 121.6, 120.0, 116.2, 112.5, 108.7, 62.6, 23.1 ppm

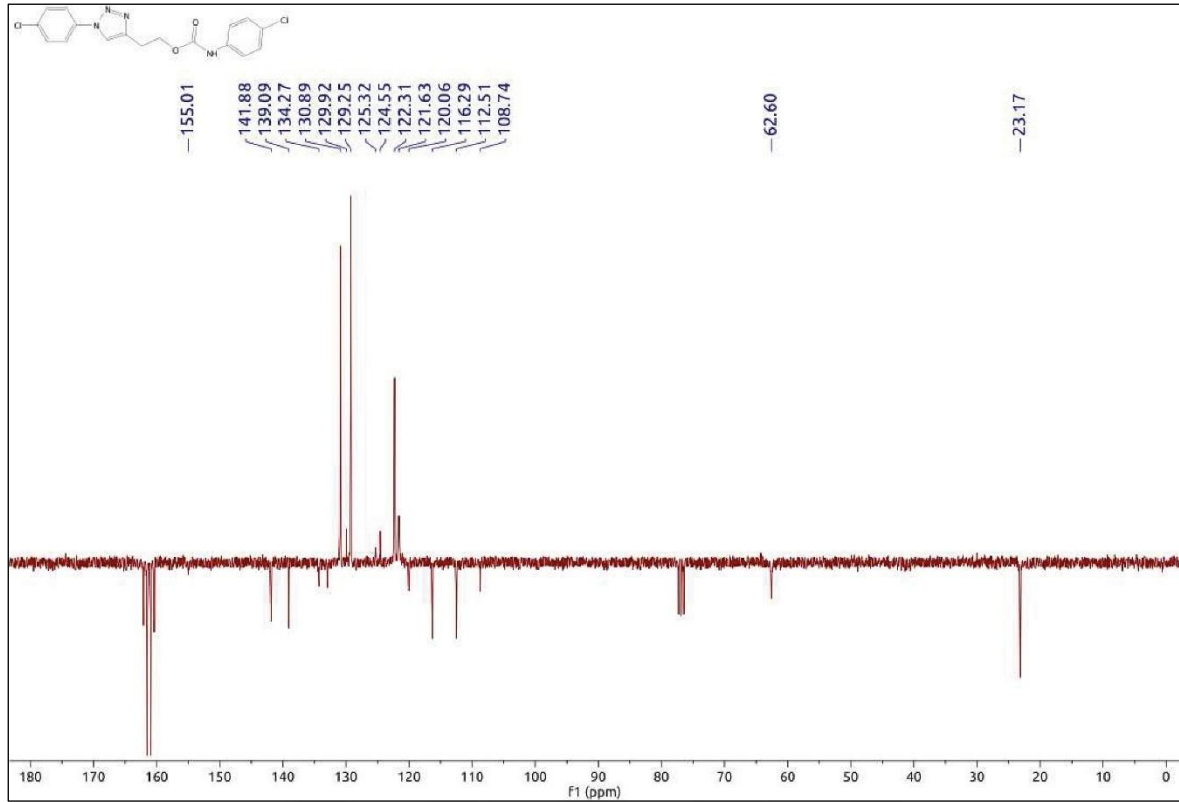
HRMS (APCI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ hesaplanan $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_2^+$: 377.05666; bulunan: 377.05710



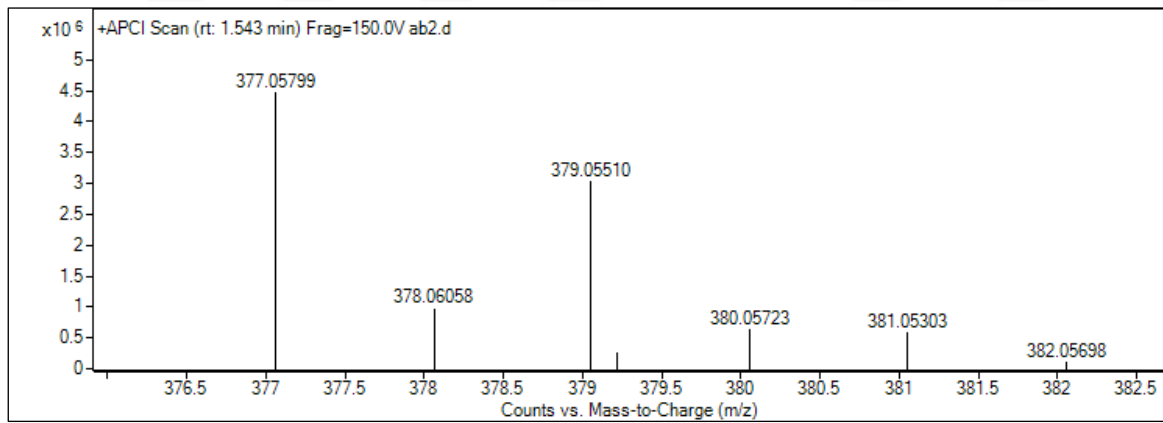
Şekil 4.17. ab2 bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu



Şekil 4.18. ab2 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu

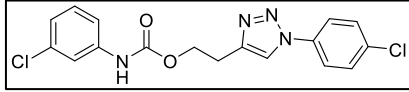


Şekil 4.19. ab2 bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu



Şekil 4.20. ab2 bileşiğinin HR-APCI-TOF spektrumu

4.2.3. ab3 (2-(1-(4-klorofenil)-1*H*-1, 2, 3-triazol-4-il)etil(3-klorofenil)karbamat) bileşiminin yapı aydınlatması



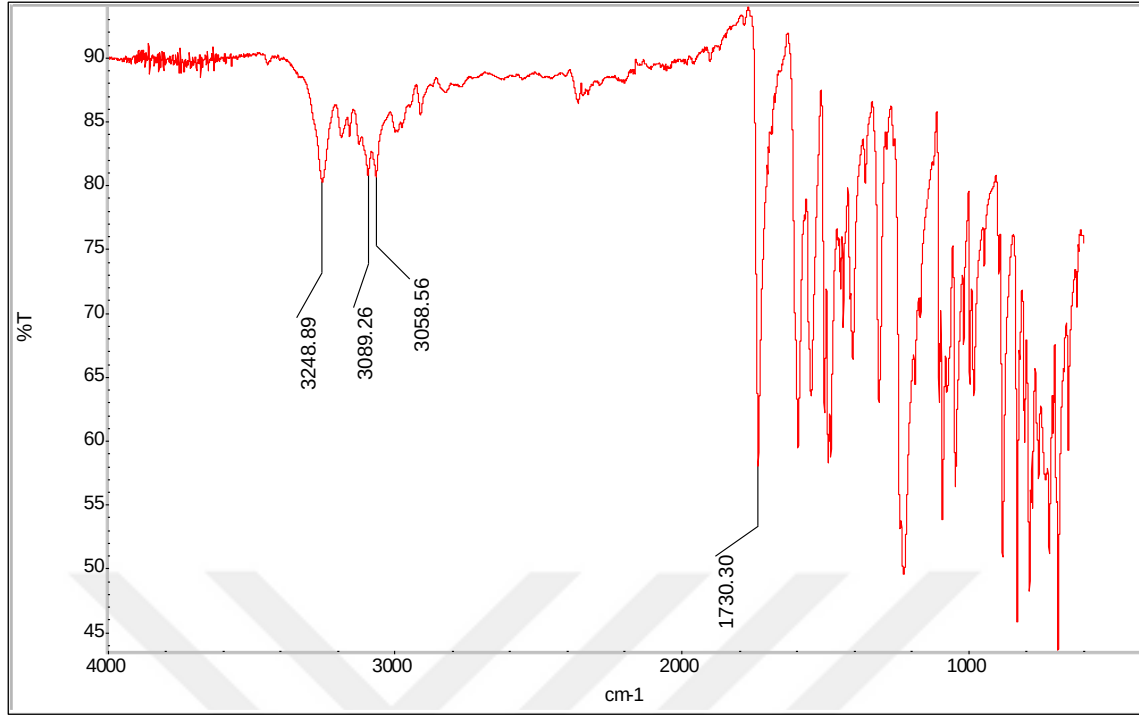
Bileşik ab3 %40'lık etil asetat/hekzan çözücü sistemi ile silika jel dolgusu kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı, katılar MeOH/DCM/hekzan ile kristallendirildi ve yapı aydınlatması gerçekleştirildi.

IR (ATR, cm^{-1}): 3248 N-H gerilme, 3089 aromatik C-H gerilme, 3058 alifatik C-H gerilme, 1730 karbamat C=O gerilme bandları

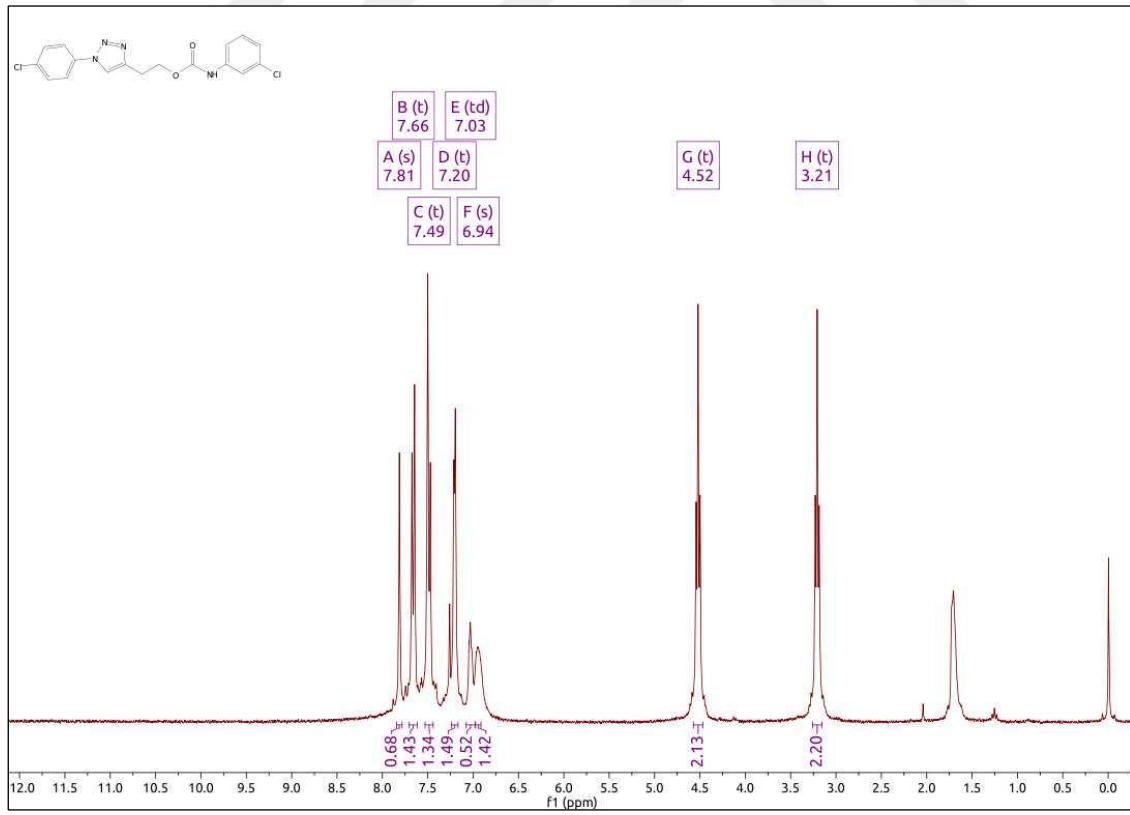
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.81 (s, 1H, -C_{triazol}H), 7.66 (t, J = 8.8 Hz, 2H, -C_{aromatik}H), 7.49 (t, J = 8.8 Hz, 2H, -C_{aromatik}H), 7.20 (t, J = 4.8 Hz, 2H, -C_{aromatik}H), 7.03 (td, J = 4.5, 2.0 Hz, 2H, -C_{aromatik}H), 6.94 (s, 1H, -NH), 4.52 (t, J = 6.5 Hz, 2H, -O-CH₂), 3.21 ppm (t, J = 6.5 Hz, 2H, -C_{triazol}-CH₂).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 158.3, 149.8, 145.7, 140.5, 138.2, 135.5, 134.9, 127.1, 126.6, 126.2, 121.7, 68.2, 30.3 ppm

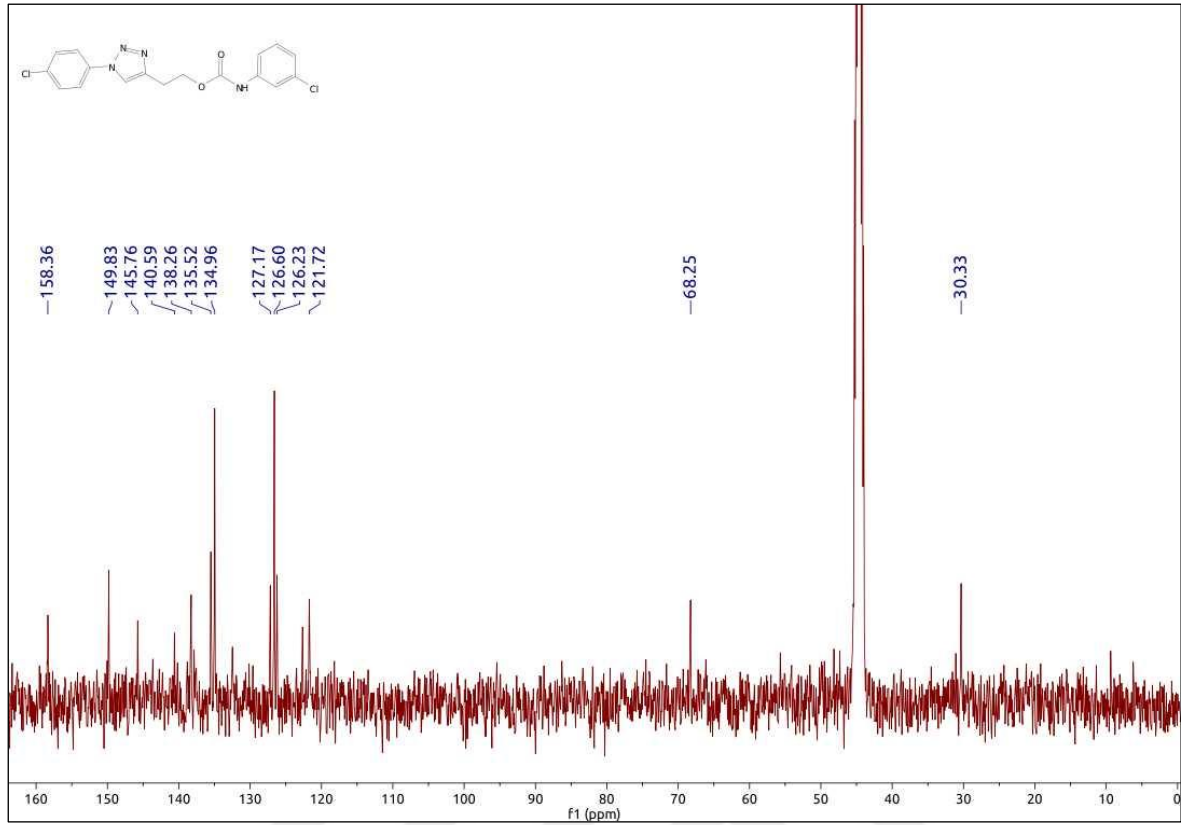
HRMS (APCI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ hesaplanan $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_2^+$: 377.05666; bulunan: 377.05739



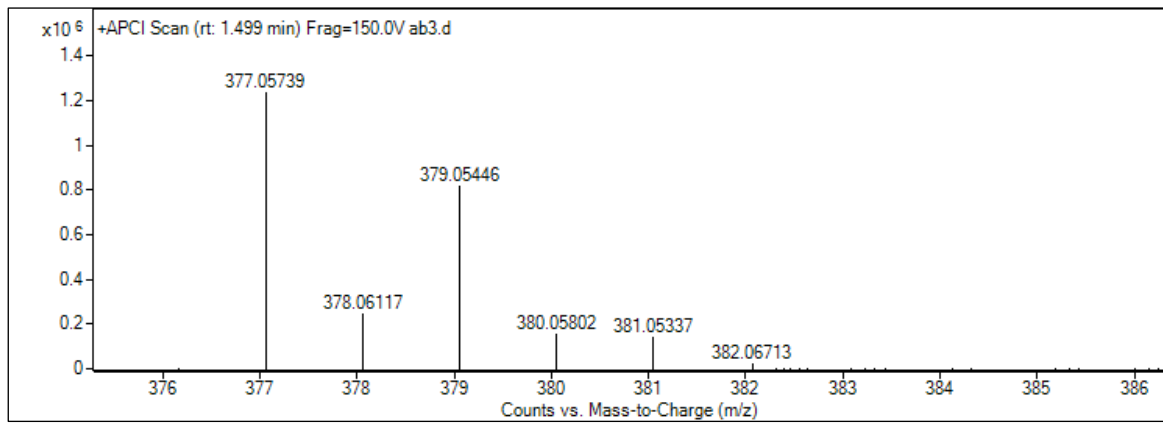
Şekil 4.21. ab3 Bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu



Şekil 4.22. ab3 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu

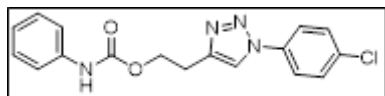


Şekil 4.23. ab3 bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu



Şekil 4.24. ab3 bileşiğinin HR-APCI-TOF spektrumu

4.2.4. ab4 (2-(1-(4-klorofenil)-1*H*-1, 2, 3-triazol-4-il)etil fenilkarbamat) bileşiğinin yapı aydınlatması



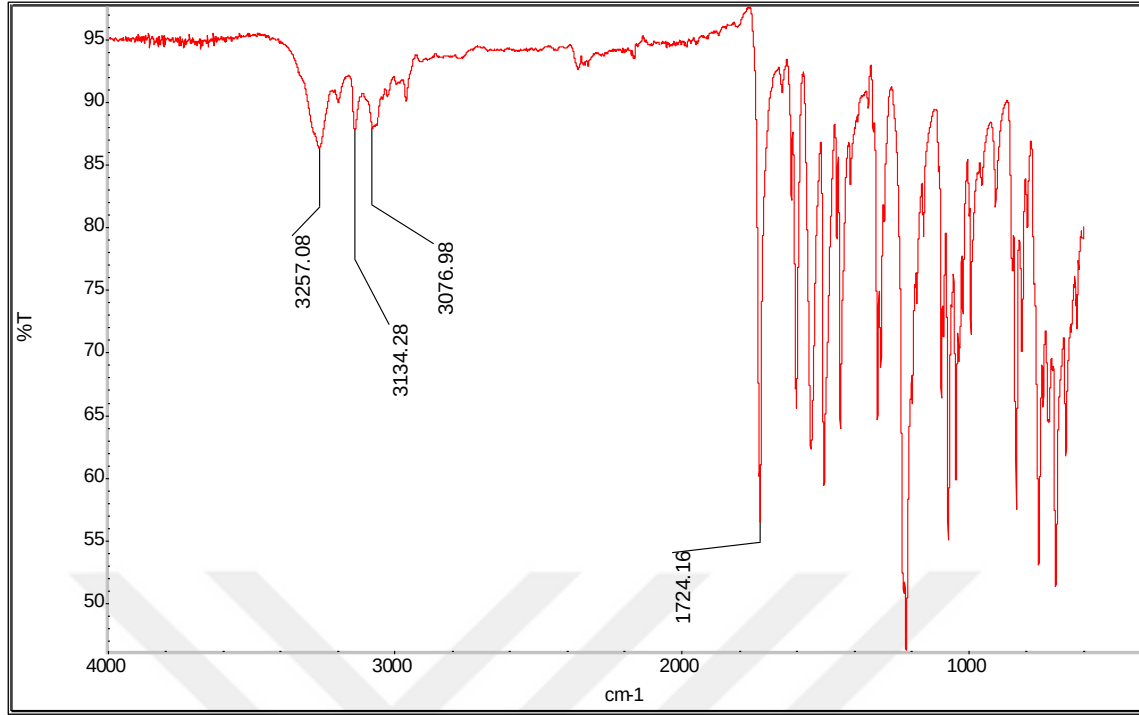
Bileşik ab4 %40'lık etil asetat/hekzan çözücü sistemi ile silika jel dolgusu kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı, katılar DCM/hekzan ile kristallendirildi.

IR (ATR, cm^{-1}): 3257 N-H gerilme, 3134 aromatik C-H gerilme, 3076 alifatik C-H gerilme, 1724 karbamat C=O gerilme bandları

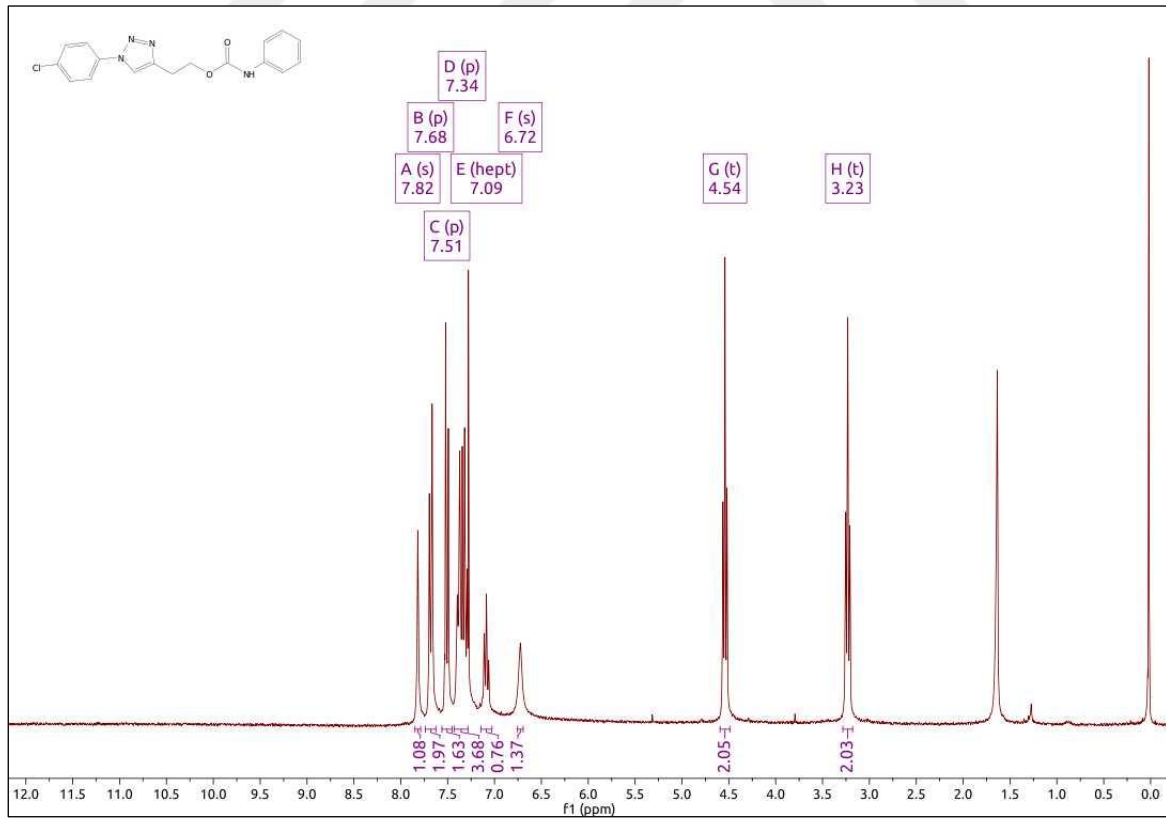
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.82 (s, 1H, -C_{triazol}H), 7.68 (p, $J = 3.3$ Hz, 2H, -C_{aromatik}H), 7.51 (p, $J = 3.0$ Hz, 2H, -C_{aromatik}H), 7.34 (p, $J = 8.0$ Hz, 4H, -C_{aromatik}H), 7.09 (hept, $J = 1.4$ Hz, 1H, -C_{aromatik}H), 6.72 (s, 1H, -NH), 4.54 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, -O-CH₂), 3.23 ppm (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, -C_{triazol}-CH₂).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 165.9, 148.9, 134.7, 129.8, 128.9, 122.3, 121.0, 119.8, 118.2, 62.9, 25.3 ppm

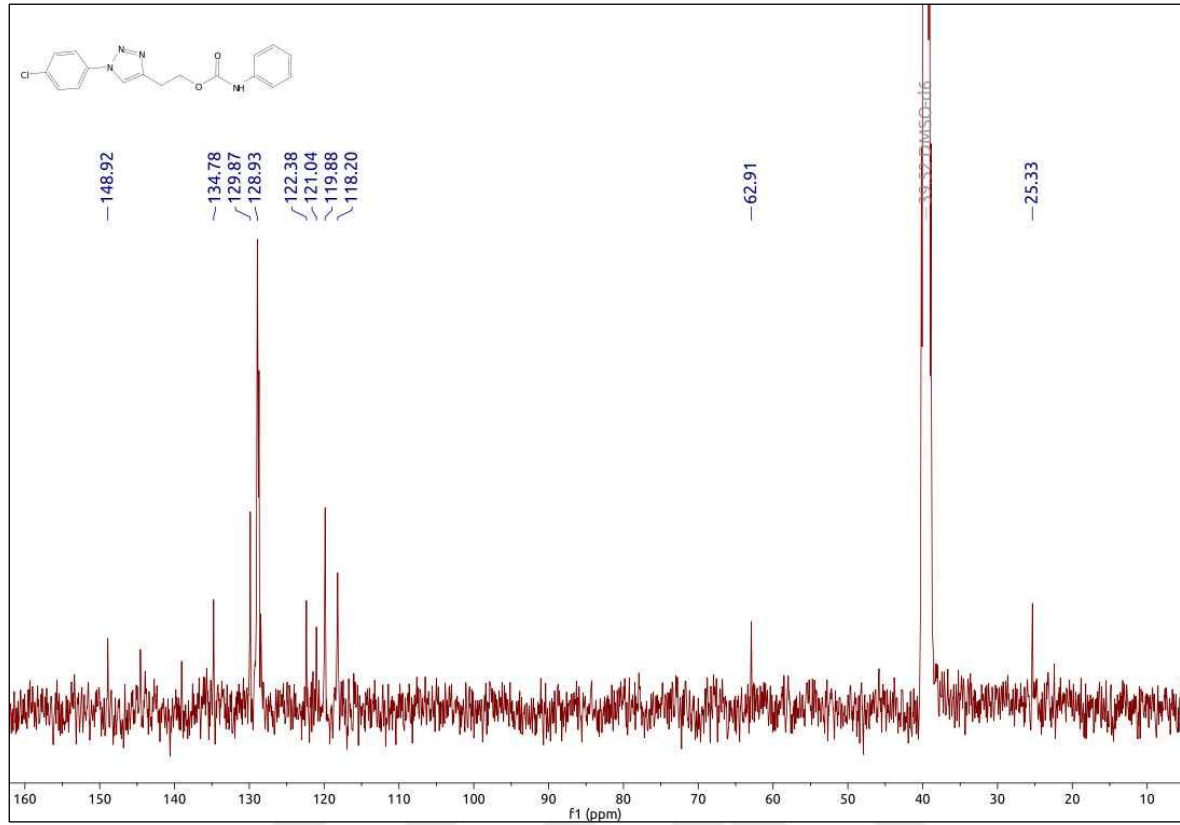
HRMS (APCI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ hesaplanan $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{ClN}_4\text{O}_2^+$: 343.09563; bulunan: 343.09661



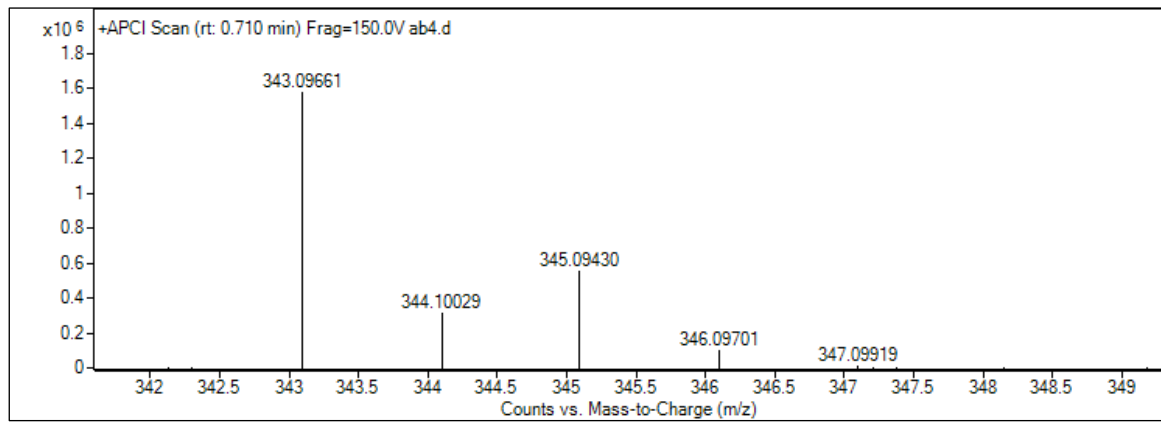
Şekil 4.25. ab4 bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu



Şekil 4.26. ab4 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu

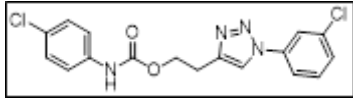


Şekil 4.27. ab4 bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu



Şekil 4.28. ab4 bileşiğinin HR-APCI-TOF spektrumu

4.2.5. ab5 (2-(1-(3-klorofenil)-1*H*-1, 2, 3-triazol-4-il)etil (4-klorofenil)karbamat) bileşığının yapı aydınlatması ve karakterizasyonu



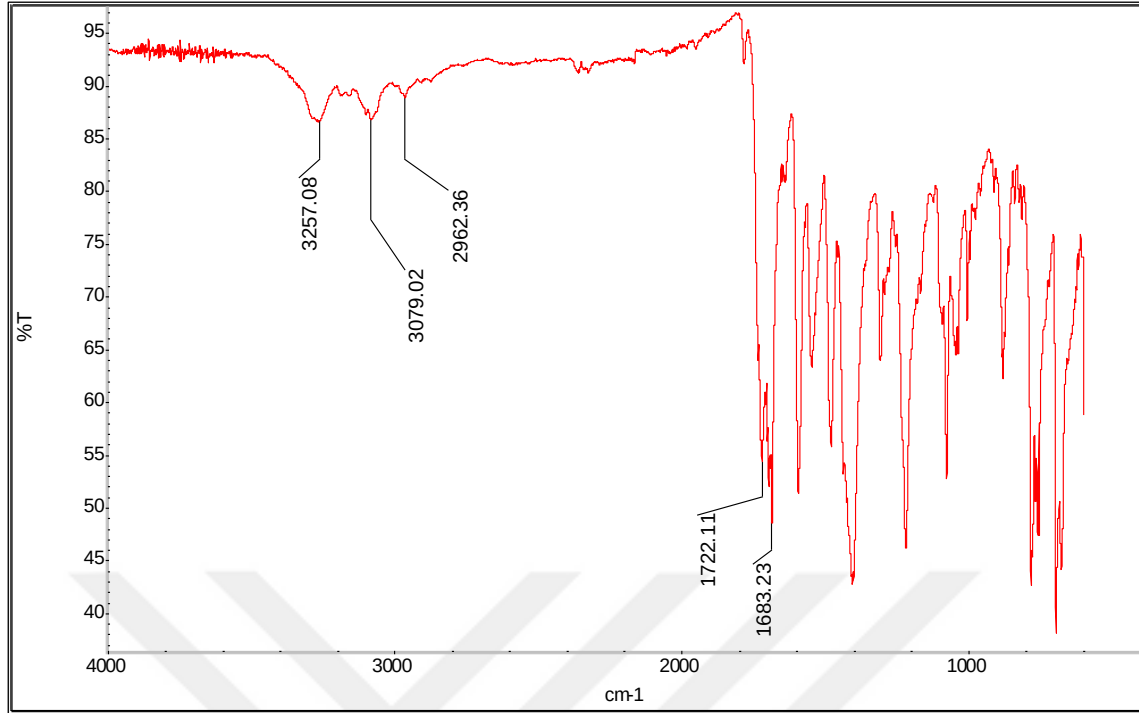
Bileşik ab5 %40'lık etil asetat/hekzan çözücü sistemi ile silika jel dolgusu kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı, katılar MeOH/DCM/hekzan ile kristallendirildi.

IR (ATR, cm^{-1}): 3257 N-H gerilme, 3079 aromatik C-H gerilme, 2962 alifatik C-H gerilme, 1722 ve 1683 karbamat C=O (izomerizasyon ve/veya tautomeriasyondan kaynaklı iki band) gerilme bandları

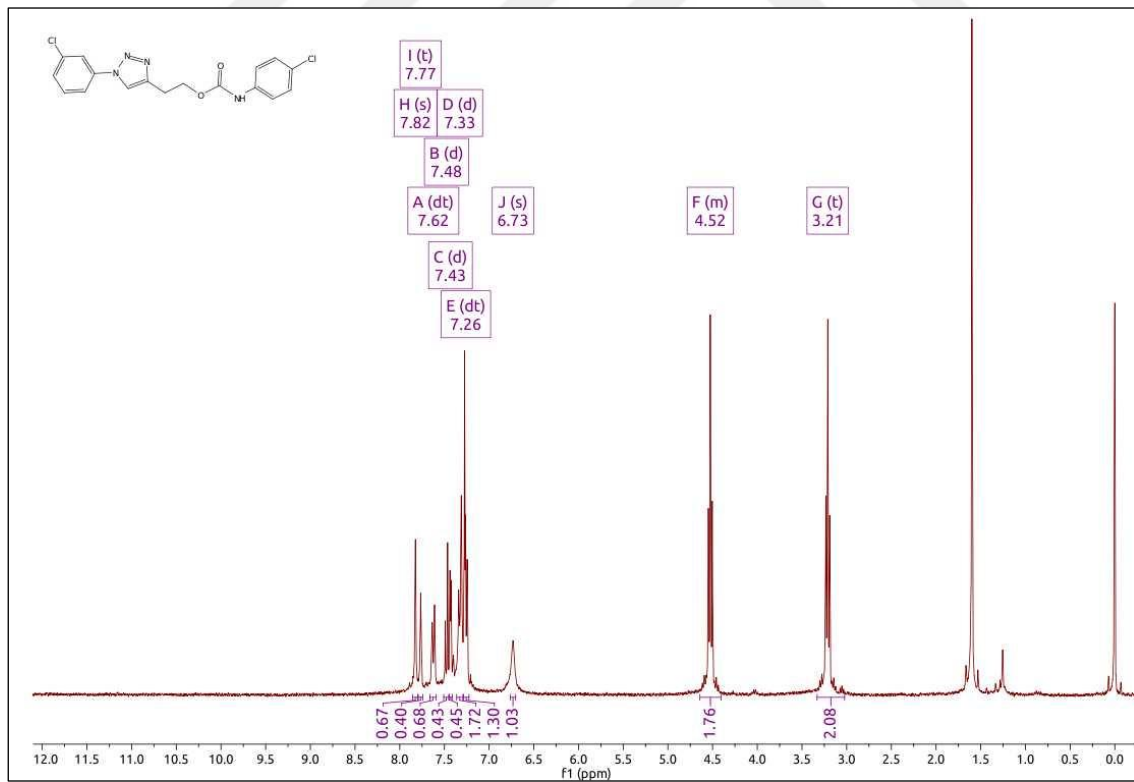
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.82 (s, 1H, -C_{triazol}H), 7.77 (t, J = 2.0 Hz, 1H, -C_{aromatik}H), 7.62 (dt, J = 7.7, 1.9 Hz, 1H, -C_{aromatik}H), 7.48 (d, J = 8.0 Hz, 1H, -C_{aromatik}H), 7.43 (d, J = 3.5 Hz, 1H, -C_{aromatik}H), 7.33 (d, J = 8.8 Hz, 2H, -C_{aromatik}H), 7.26 (dt, J = 8.9, 3.9 Hz, 2H, -C_{aromatik}H), 6.73 (s, 1H, -NH), 4.64 – 4.41 (m, 2H, -O-CH₂), 3.21 ppm (t, J = 6.5 Hz, 2H, -C_{triazol}-CH₂).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 153.7, 145.2, 138.5, 138.2, 134.6, 132.1, 129.1, 128.7, 126.5, 121.7, 120.1, 118.9, 63.5, 25.7 ppm.

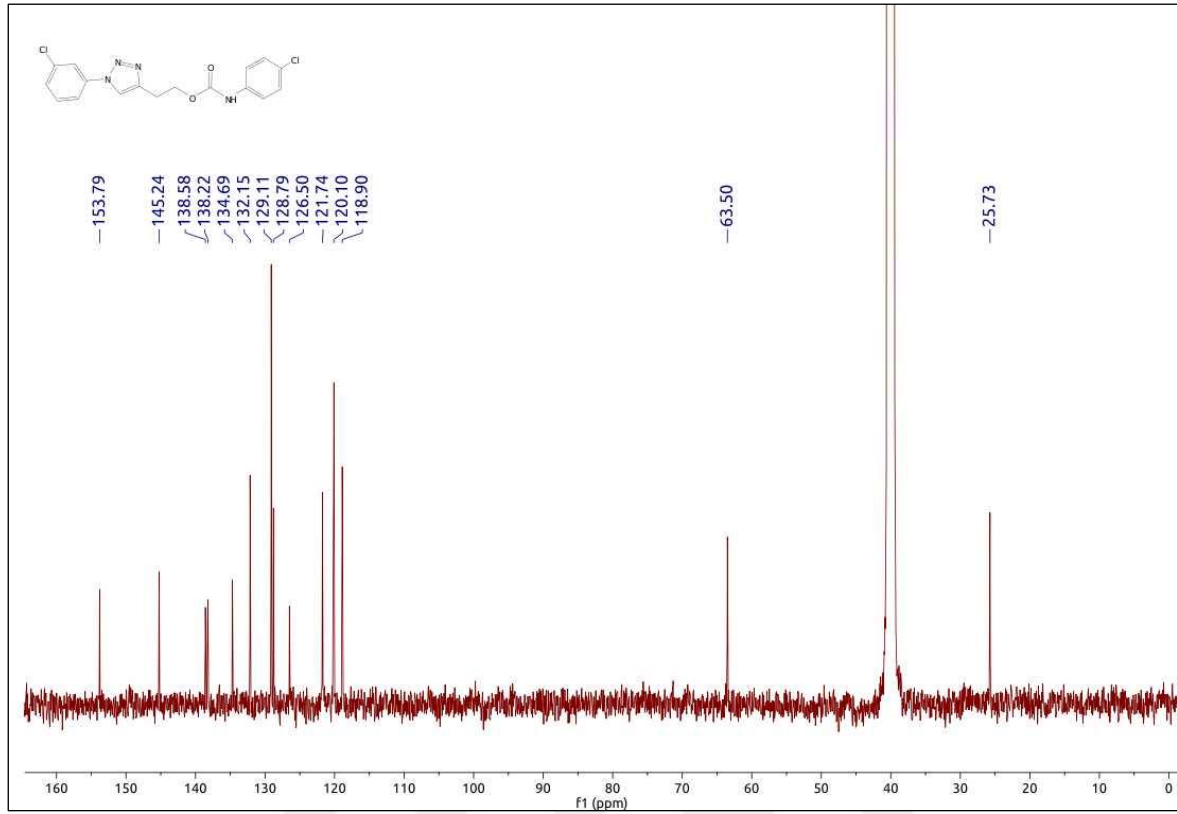
HRMS (APCI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ hesaplanan $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_2^+$: 377.05666; bulunan: 377.05694.



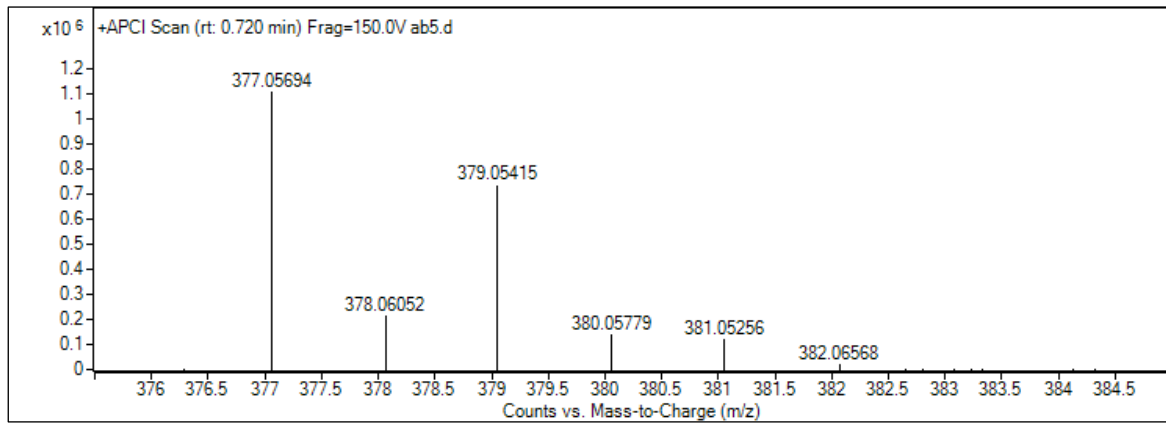
Şekil 4.29. ab5 bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu



Şekil 4.30. ab5 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu

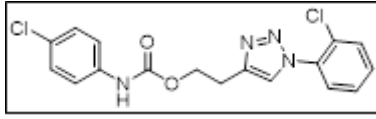


Şekil 4.31. ab5 bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu



Şekil 4.32. ab5 bileşiğinin HR-APCI-TOF spektrumu

4.2.6. ab6 (2-(1-(2-klorofenil)-1*H*-1, 2, 3-triazol-4-il)etil (4-klorofenil)karbamat) bileşığının yapı aydınlatması



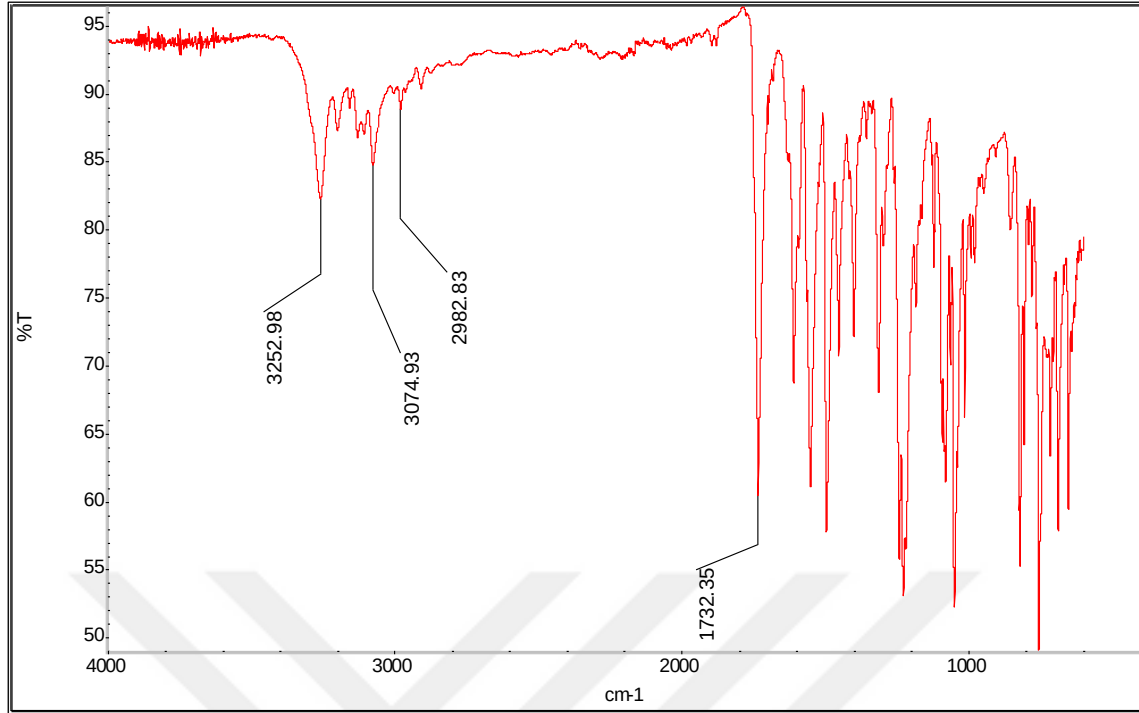
Bileşik ab6 %40'lık etil asetat/hekzan çözücü sistemi ile silika jel dolgusu kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı, katılar MeOH/DCM/hekzan ile kristallendirildi.

IR (ATR, cm^{-1}): 3252 N-H gerilme, 3074 aromatik C-H gerilme, 2982 alifatik C-H gerilme, 1732 karbamat C=O gerilme bandları

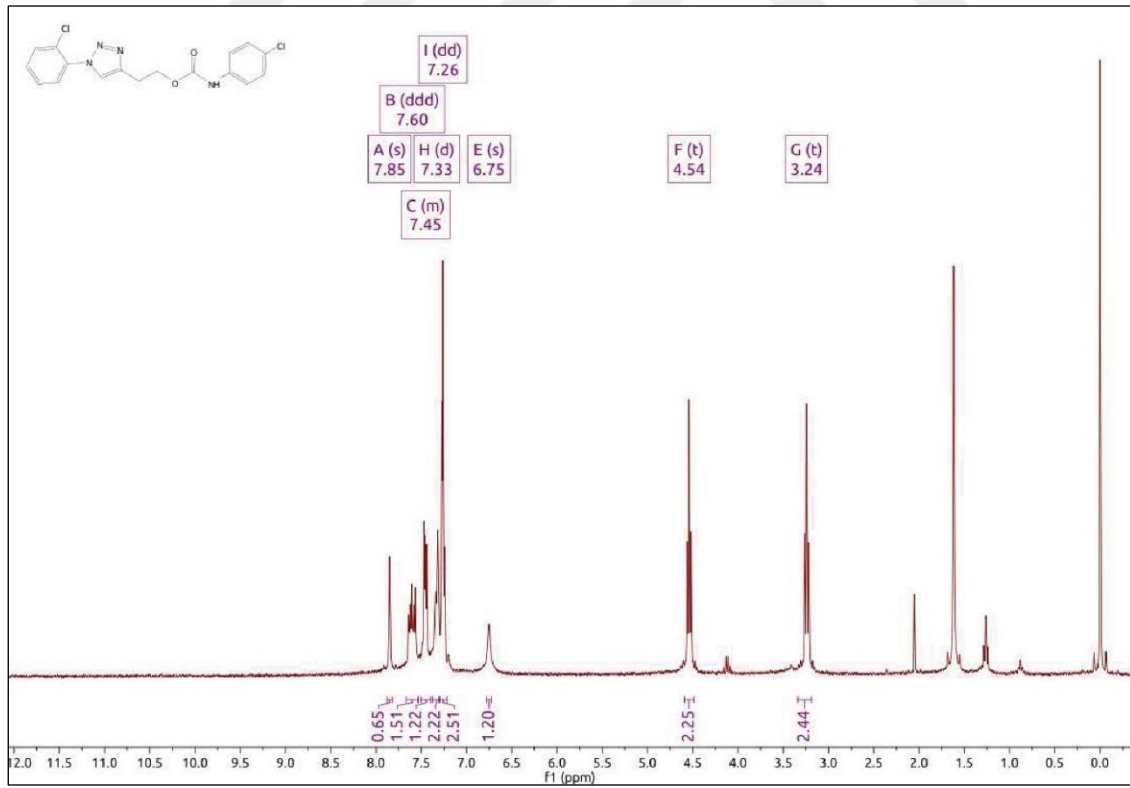
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.85 (s, 1H, - $\text{C}_{\text{triazolH}}$), 7.60 (ddd, $J = 12.6, 5.6, 3.8$ Hz, 1H, - $\text{C}_{\text{aromatikH}}$), 7.50 – 7.39 (m, 1H, - $\text{C}_{\text{aromatikH}}$), 7.33 (d, $J = 8.4$ Hz, 3H, - $\text{C}_{\text{aromatikH}}$), 7.26 (dd, $J = 5.4, 3.6$ Hz, 3H, - $\text{C}_{\text{aromatikH}}$), 6.75 (s, 1H, -NH), 4.54 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, -O- CH_2), 3.24 ppm (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, - $\text{C}_{\text{triazol-CH}_2}$).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ 153.7, 143.9, 138.5, 135.1, 131.9, 131.0, 129.1, 128.9, 128.8, 128.7, 126.4, 125.4, 120.1, 63.5, 25.6 ppm

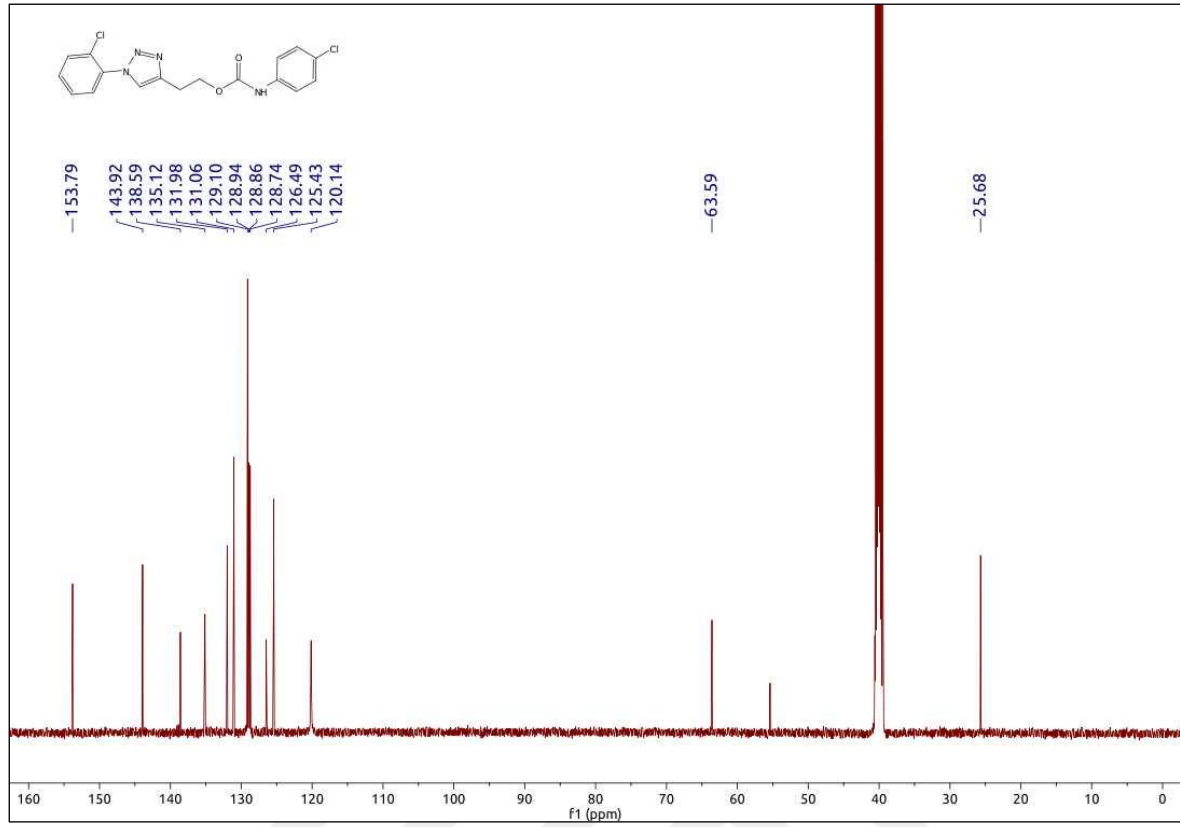
HRMS (APCI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ hesaplanan $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_2^+$: 377.05666; bulunan: 377.05691



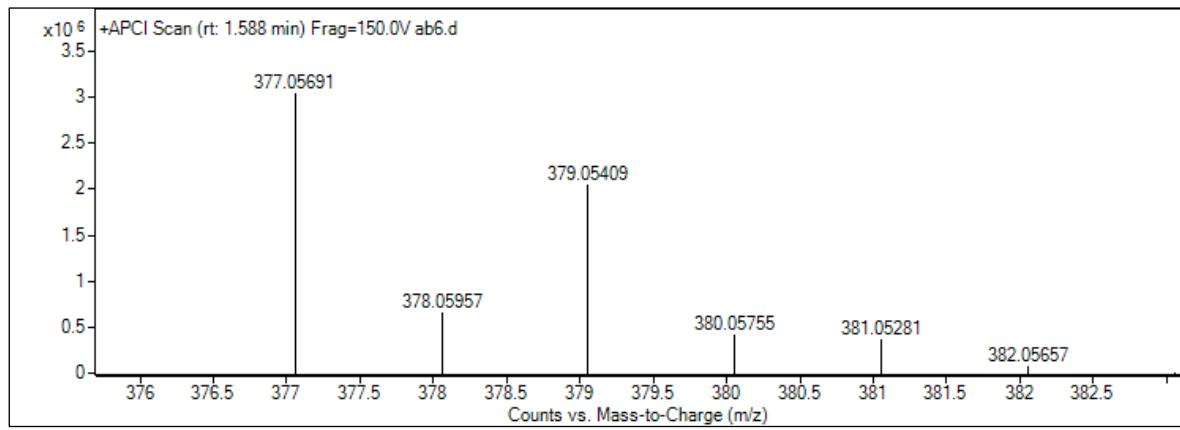
Şekil 4.33. ab6 bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu



Şekil 4.34. ab6 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu

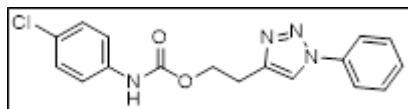


Şekil 4.35. ab6 bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu



Şekil 4.36. ab6 bileşiğinin HR-APCI-TOF spektrumu

4.2.7. ab7 (2-(1-fenil-1*H*-1, 2, 3-triazol-4-il)etil (4-klorofenil)karbamat) bileşığının yapı aydınlatması



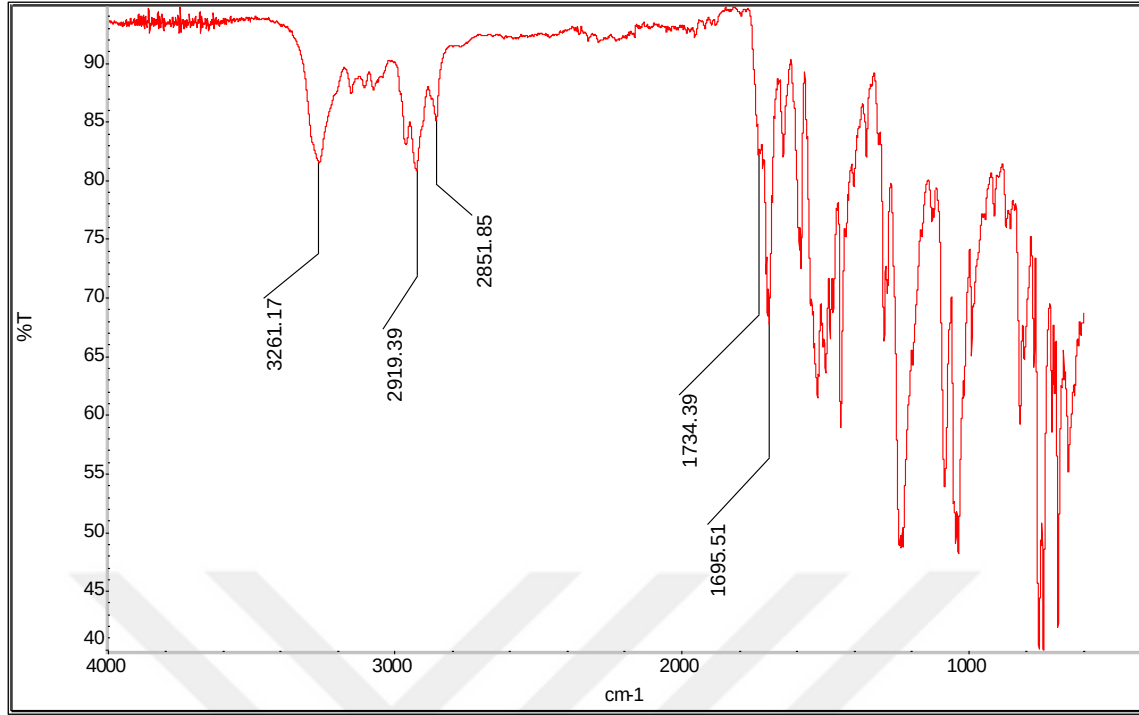
Bileşik ab7 %40'lık etil asetat/hekzan çözücü sistemi ile silika jel dolgusu kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı, katılar MeOH/DCM/hekzan ile kristallendirildi.

IR (ATR, cm^{-1}): 3261 N-H gerilme, 2919 aromatik C-H gerilme, 2851 alifatik C-H gerilme, 1734 ve 1695 karbamat C=O (izomerizasyon ve/veya tautomeriasyondan kaynaklı iki band) gerilme bandları.

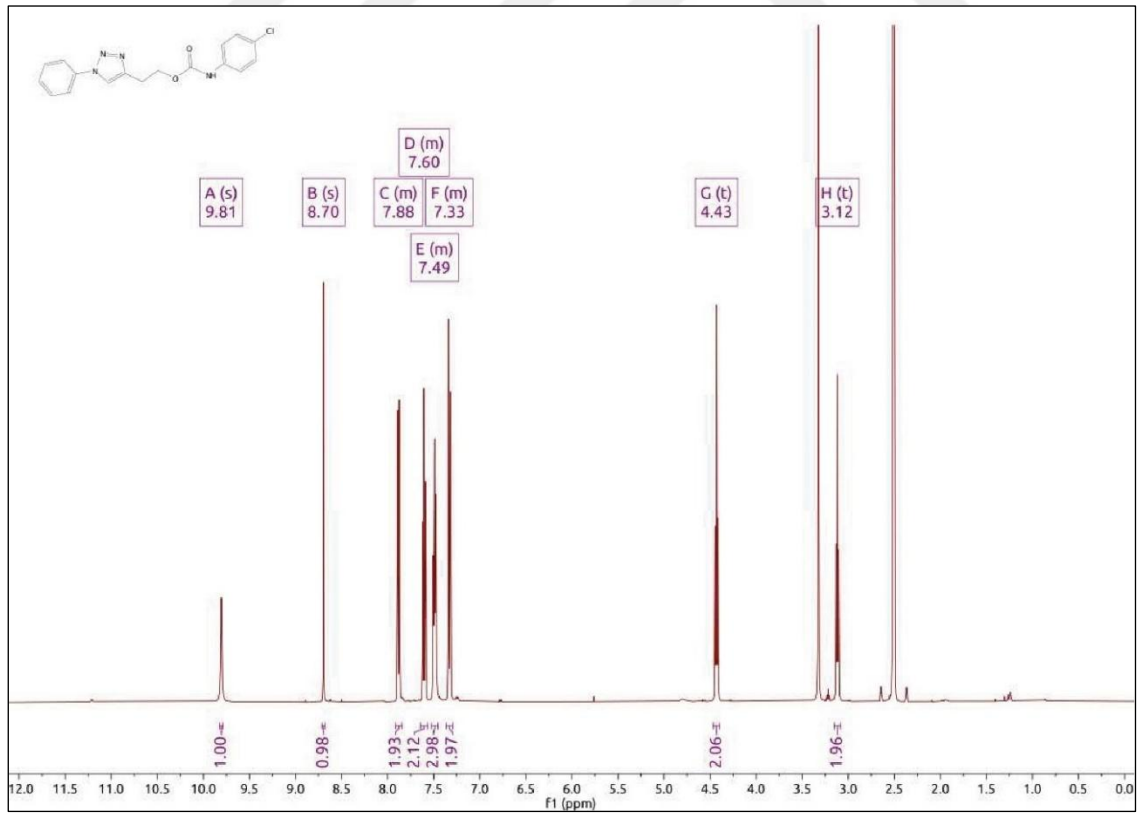
^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 9.81 (s, 1H, -NH), 8.70 (s, 1H, -C_{triazol}H), 7.91 – 7.85 (m, 2H, -C_{aromatik}H), 7.64 – 7.57 (m, 2H, -C_{aromatik}H), 7.52 – 7.45 (m, 3H, -C_{aromatik}H), 7.36 – 7.30 (m, 2H, -C_{aromatik}H), 4.43 (t, J = 6.6 Hz, 2H, -O-CH₂), 3.12 ppm (t, J = 6.6 Hz, 2H, -C_{triazol}-CH₂).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 153.8, 145.0, 138.5, 137.2, 130.3, 129.1, 128.9, 126.4, 121.5, 120.3, 120.1, 63.6, 25.7 ppm.

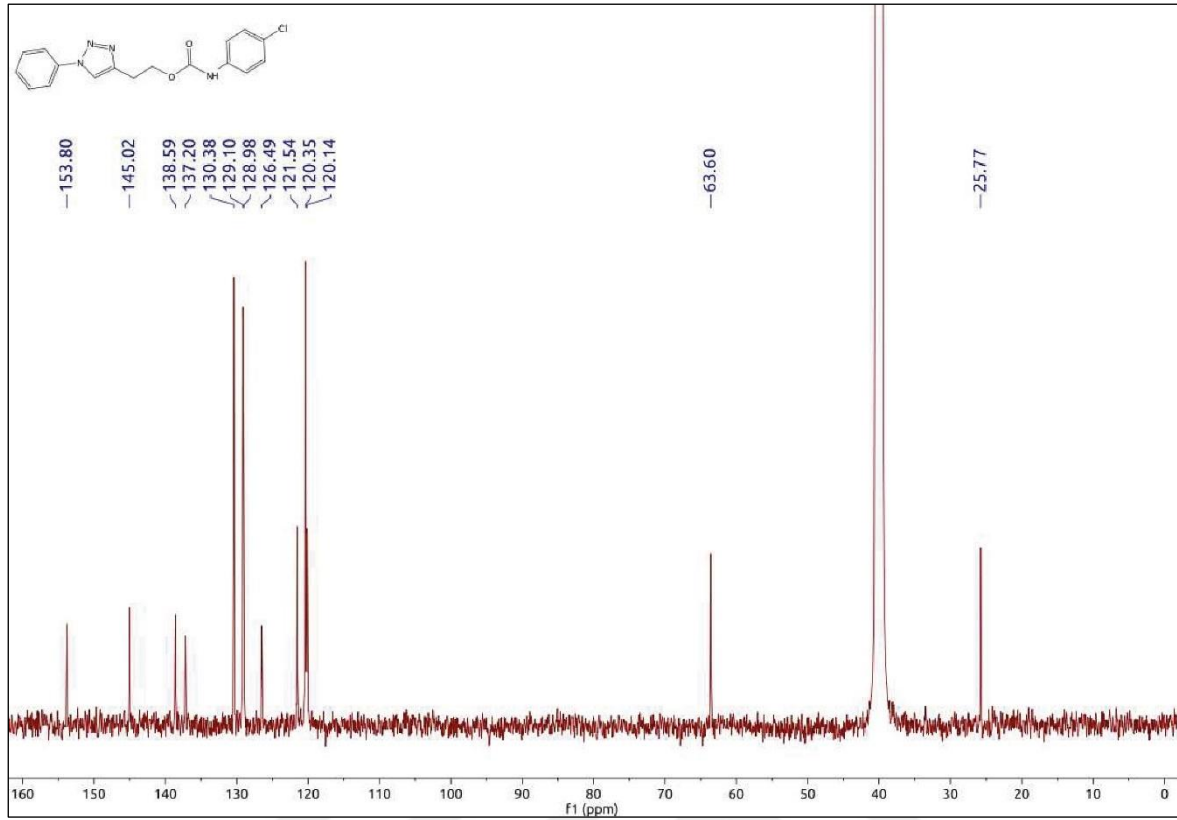
HRMS (APCI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ hesaplanan $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2^+$: 309.13460; bulunan: 309.13696



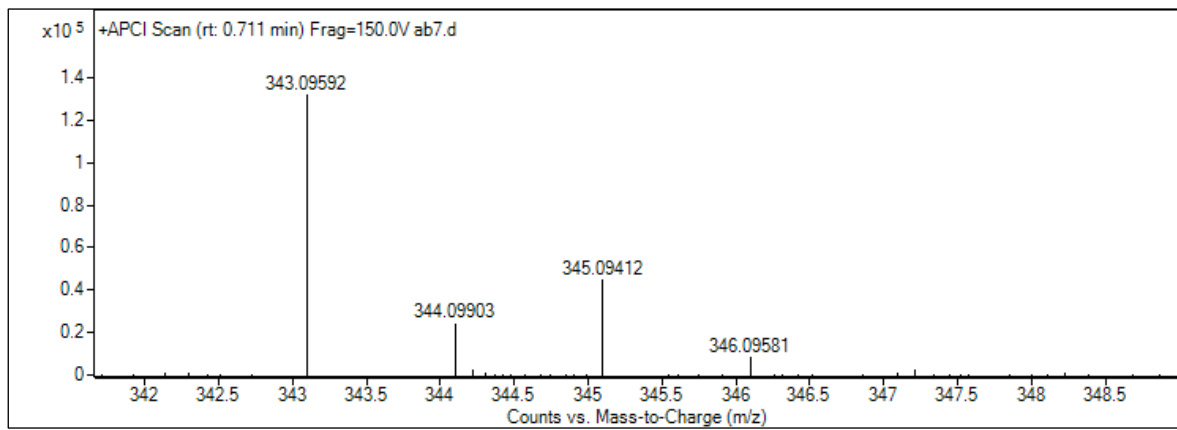
Şekil 4.37. ab7 bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu



Şekil 4.38. ab7 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu

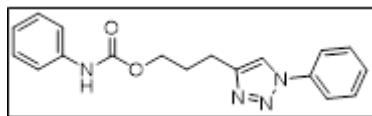


Şekil 4.39. ab7 bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu



Şekil 4.40. ab7 bileşiğinin HR-APCI-TOF spektrumu

4.2.8. ab8 (3-(1-fenil-1*H*-1, 2, 3-triazol-4-il)propil fenilkarbamat) bileşğinin yapı aydınlatması



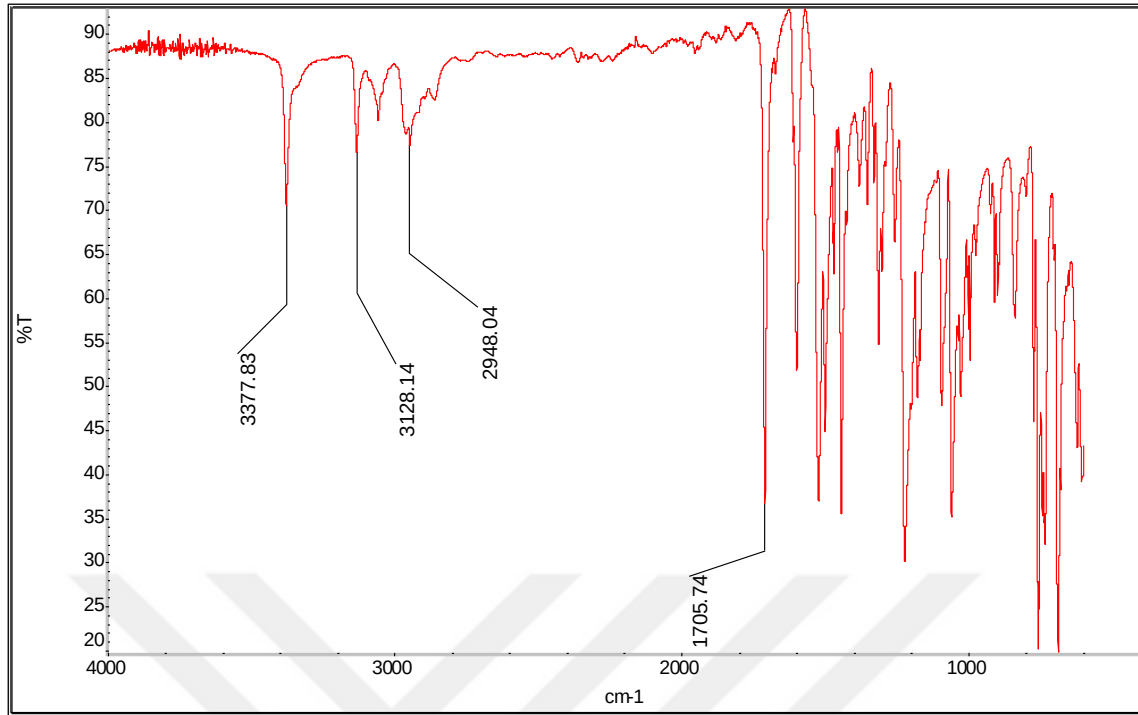
Bileşik ab8 %40'lık etil asetat/hekzan çözücü sistemi ile silika jel dolgusu kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı, katılar DCM/hekzan ile kristallendirildi.

IR (ATR, cm^{-1}): 3377 N-H gerilme, 3128 aromatik C-H gerilme, 2948 alifatik C-H gerilme, 1705 karbamat C=O gerilme bandları

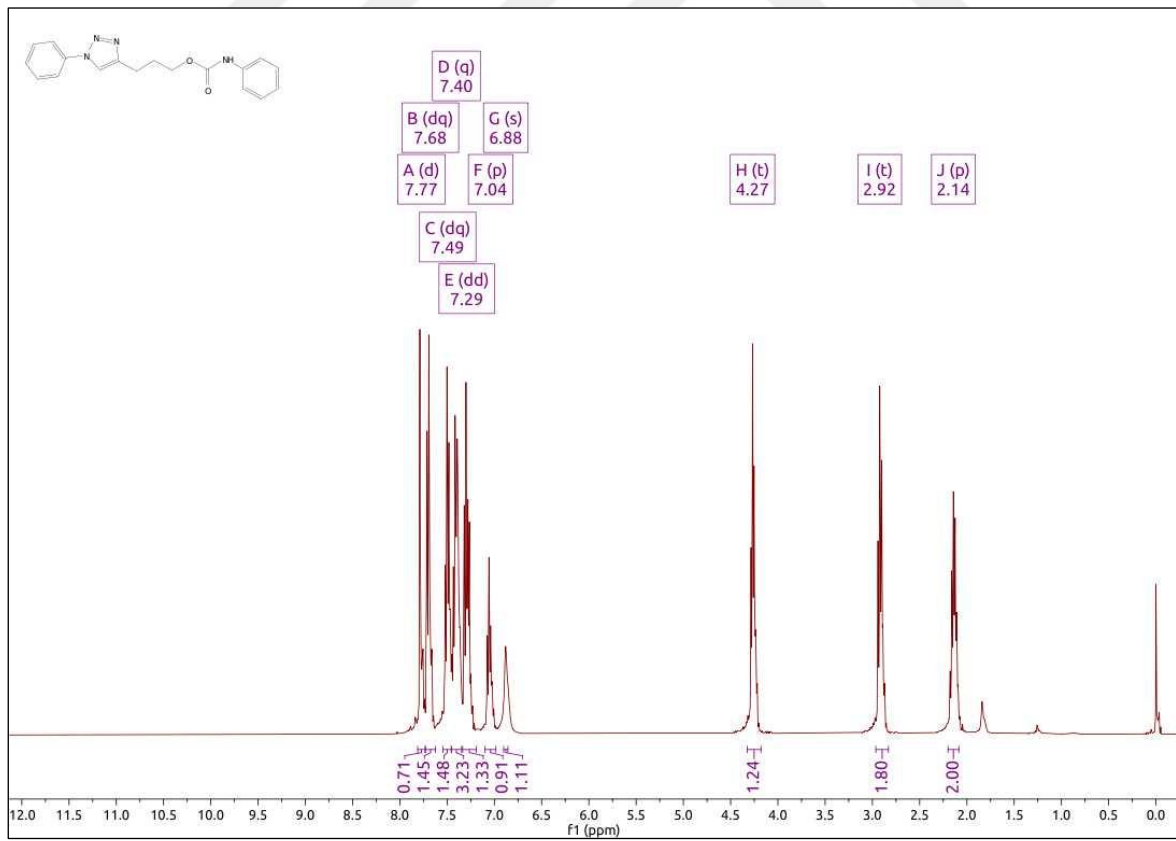
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.77 (d, $J = 13.4$ Hz, 1H, - $\text{C}_{\text{triazol}}\text{H}$), 7.68 (dq, $J = 12.3, 7.7$ Hz, 1H, - $\text{C}_{\text{aromatik}}\text{H}$), 7.49 (dq, $J = 13.1, 7.9$ Hz, 2H, - $\text{C}_{\text{aromatik}}\text{H}$), 7.40 (q, $J = 9.2$ Hz, 3H, - $\text{C}_{\text{aromatik}}\text{H}$), 7.29 (dd, $J = 14.1, 7.7$ Hz, 2H, - $\text{C}_{\text{aromatik}}\text{H}$), 7.04 (p, $J = 7.4$ Hz, 1H, - $\text{C}_{\text{aromatik}}\text{H}$), 6.88 (s, 1H, -NH), 4.27 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, -O- CH_2), 2.92 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, - $\text{C}_{\text{triazol}}\text{-CH}_2$), 2.14 ppm (m, $J = 6.5$ Hz, 2H, -C- CH_2 -C-).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 153.6, 147.7, 137.9, 137.1, 129.7, 129.0, 128.6, 123.4, 120.4, 119.3, 118.6, 64.2, 28.6, 22.1 ppm

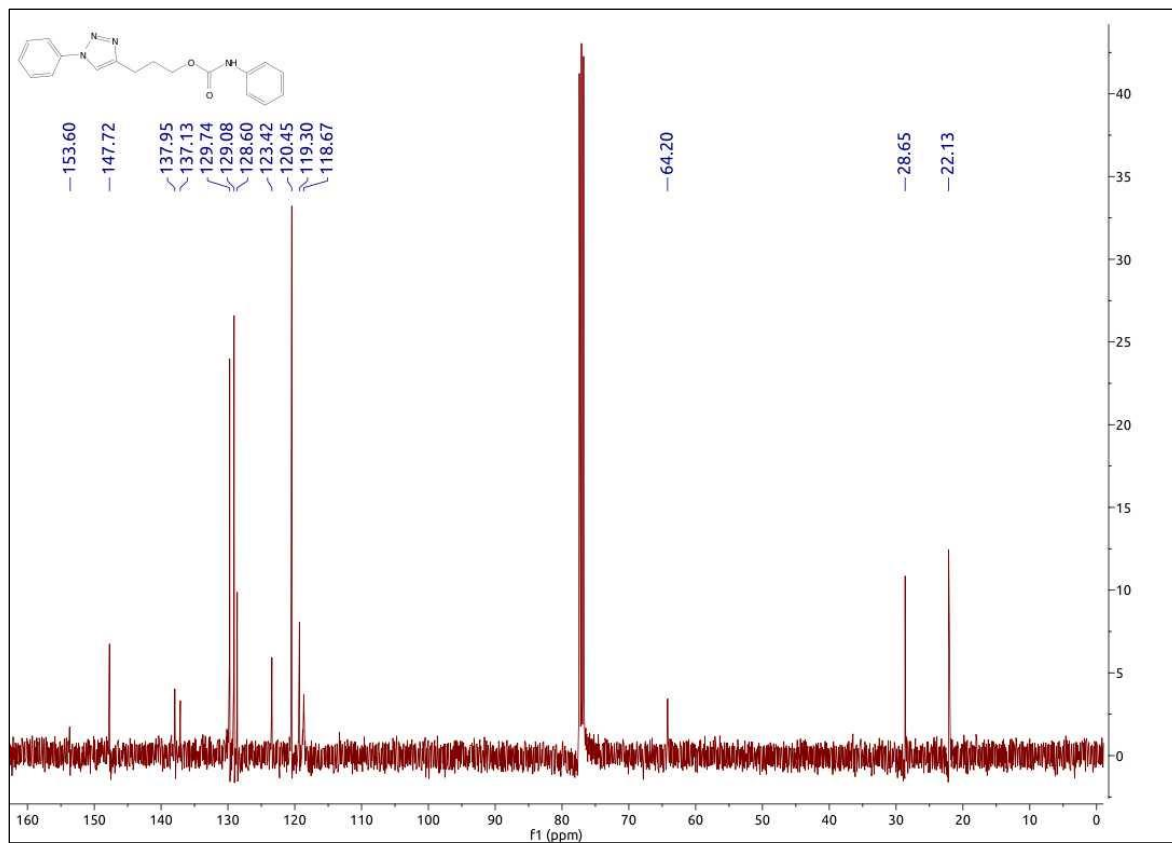
HRMS (APCI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ (hesaplanan) $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_2^+$: 323.15025; (bulunan): 323.15016



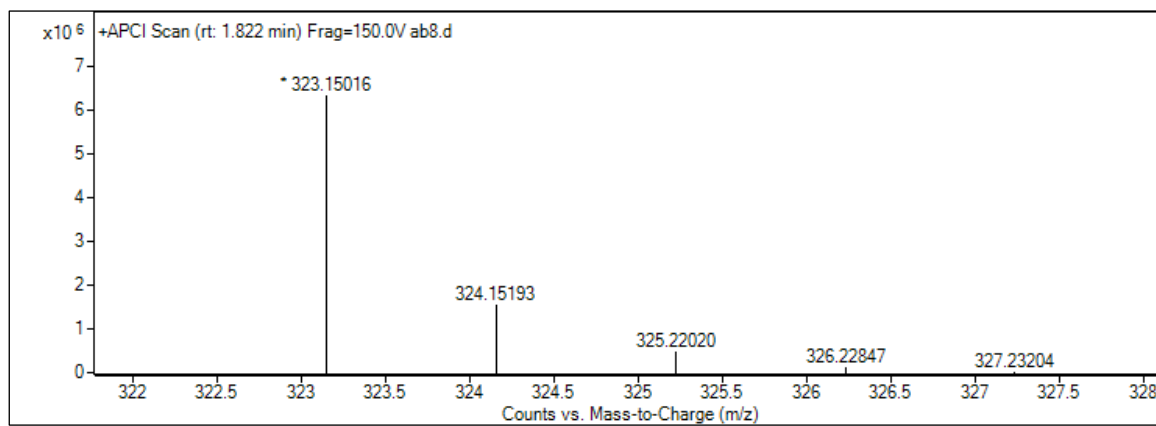
Şekil 4.41. ab8 bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu



Şekil 4.42. ab8 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu

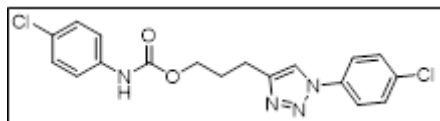


Şekil 4.43. ab8 bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu



Şekil 4.44. ab8 bileşiğinin HR-APCI-TOF spektrumu

4.2.9. ab9 (3-(1-(4-klorofenil)-1*H*-1, 2, 3-triazol-4-il)propil (4-klorofenik)karbamat) bileşiminin yapı aydınlatması



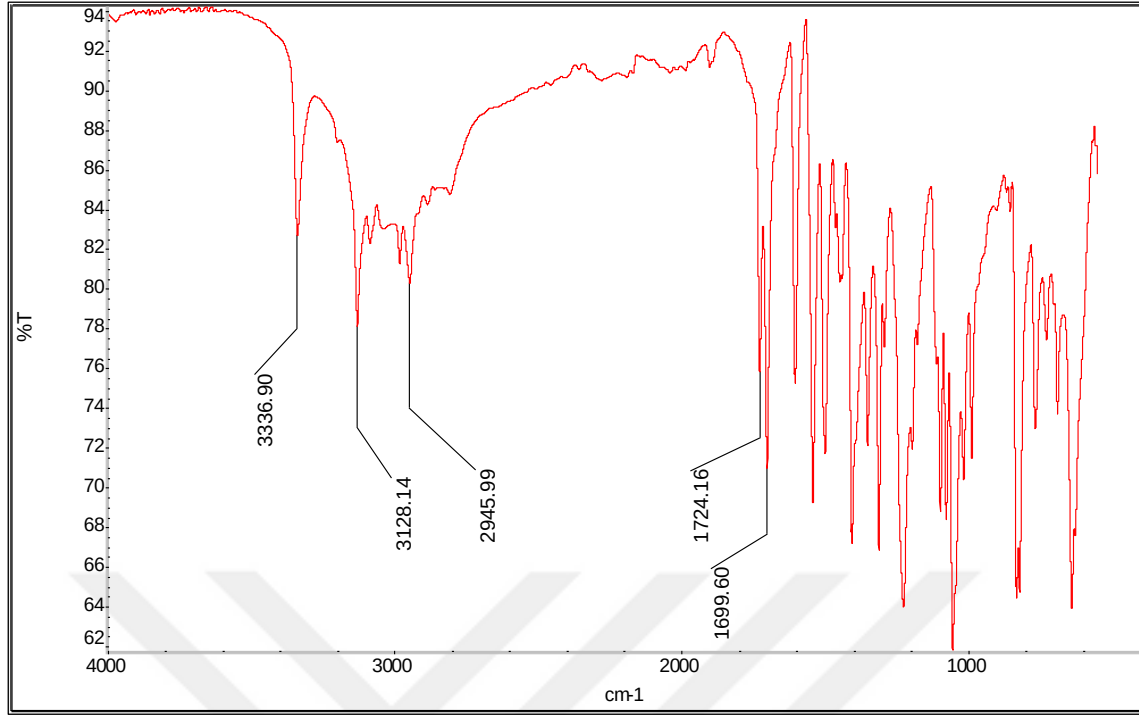
Bileşik ab9 %40'lık etil asetat/hekzan çözücü sistemi ile silika jel dolgusu kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı, katılar DCM/hekzan ile kristallendirildi.

IR (ATR, cm^{-1}): 3336 N-H gerilme, 3128 aromatik C-H gerilme, 2945 alifatik C-H gerilme, 1724 ve 1699 karbamat C=O (izomerizasyon ve/veya tautomeriasyondan kaynaklı iki band) gerilme bandları.

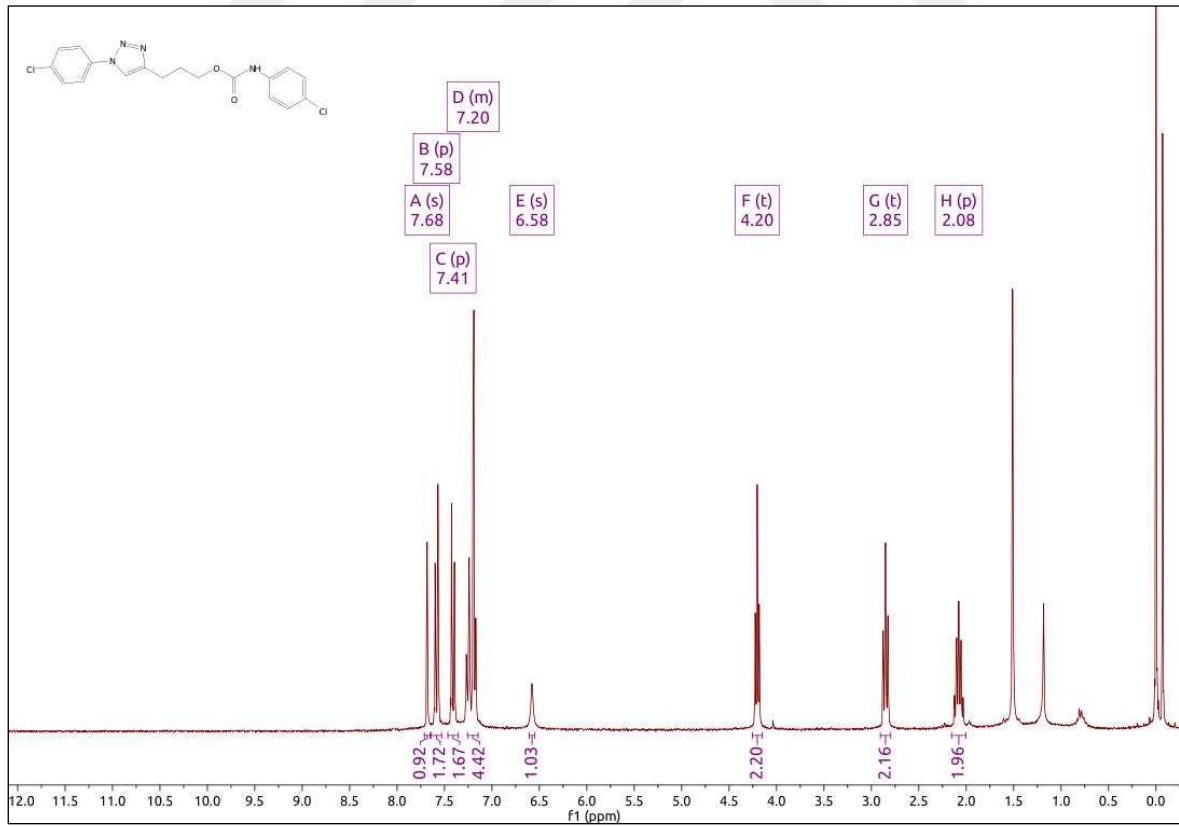
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.68 (s, 1H, $-\text{C}_{\text{triazol}}\text{H}$), 7.58 (p, $J = 2.8$ Hz, 2H, $-\text{C}_{\text{aromatik}}\text{H}$), 7.41 (p, $J = 2.8$ Hz, 2H, $-\text{C}_{\text{aromatik}}\text{H}$), 7.26 – 7.15 (m, 4H, $-\text{C}_{\text{aromatik}}\text{H}$), 6.58 (s, 1H, $-\text{NH}$), 4.20 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2$), 2.85 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, $-\text{C}_{\text{triazol}}-\text{CH}_2$), 2.08 ppm (p, $J = 7.0$ Hz, 2H, $-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-$).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 153.5, 148.0, 136.5, 135.7, 134.4, 130.0, 129.2, 121.6, 119.2, 64.5, 28.6, 22.2 ppm

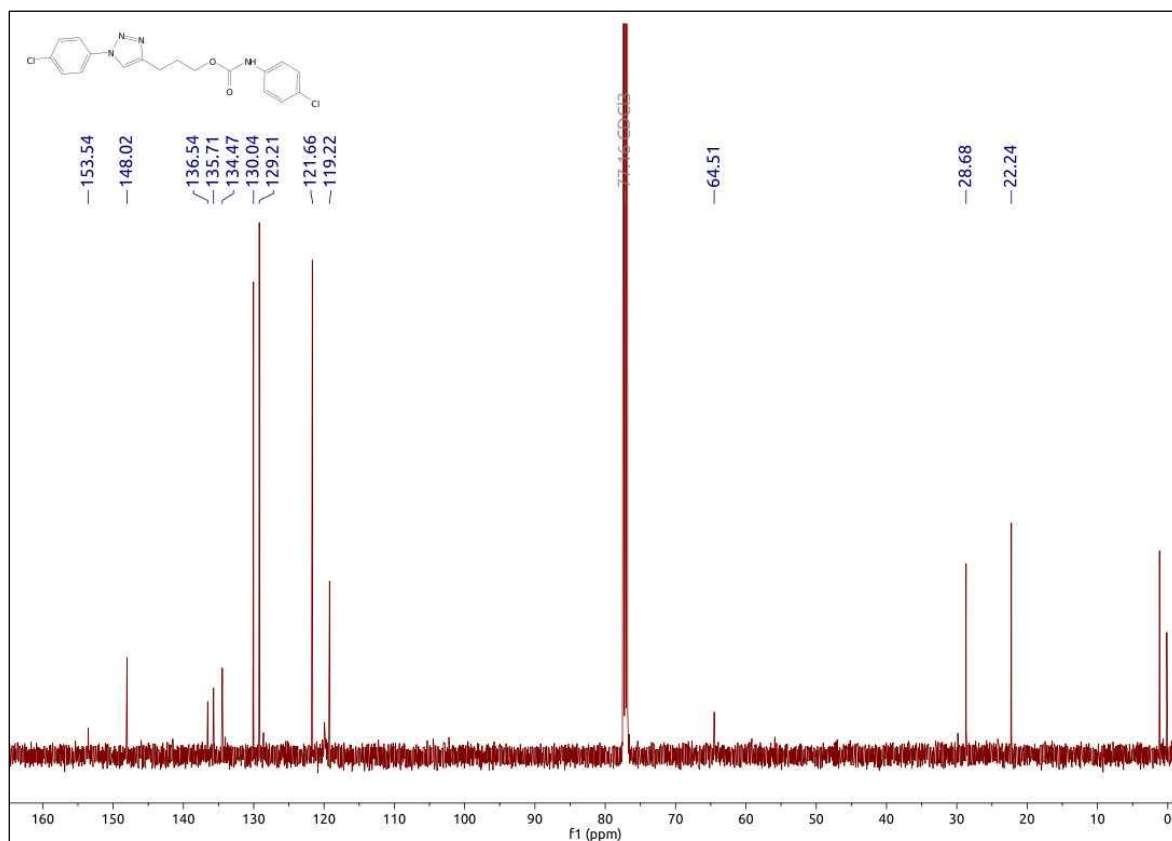
HRMS (APCI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ hesaplanan $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_2^+$: 391.07231; bulunan: 391.07235



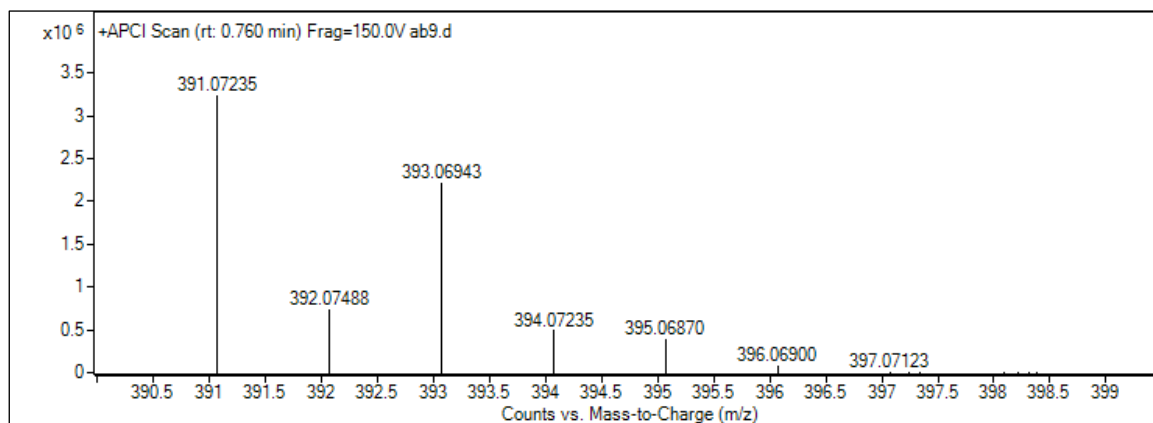
Şekil 4.45. ab9 bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu



Şekil 4.46. ab9 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu

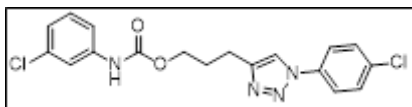


Şekil 4.47. ab9 bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu



Şekil 4.48. ab9 bileşiğinin HR-APCI-TOF spektrumu

4.2.10. ab10 (3-(1-(4-klorofenil)-1*H*-1, 2, 3-triazol-4-il)propil (3-klorofenil)karbamat) bileşiminin yapı aydınlatması



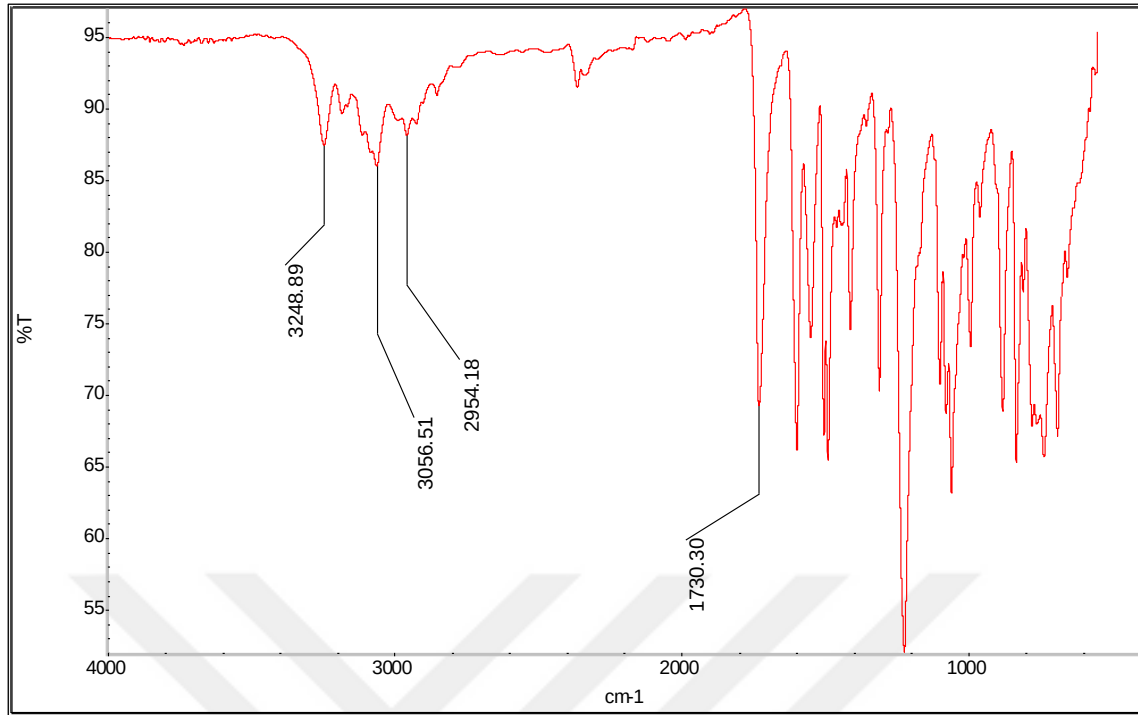
Bileşik ab10 %40'lık etil asetat/hekzan çözücü sistemi ile silika jel dolgusu kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı, katılar DCM/hekzan ile kristallendirildi.

IR (ATR, cm^{-1}): 3248 N-H gerilme, 3056 aromatik C-H gerilme, 2954 alifatik C-H gerilme, 1730 karbamat C=O gerilme bandları.

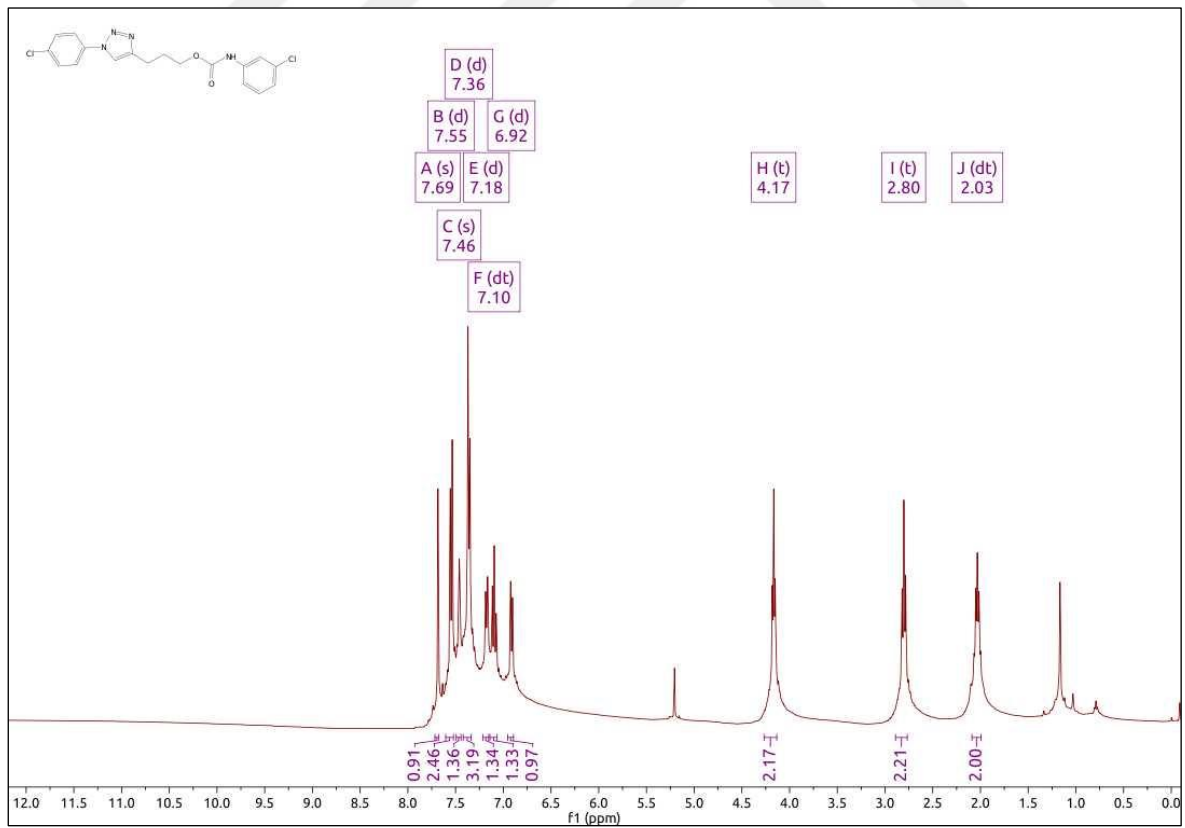
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.69 (s, 1H, $-\text{C}_{\text{triazolH}}$), 7.55 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, $-\text{C}_{\text{aromatikH}}$), 7.46 (s, 1H, $-\text{C}_{\text{aromatikH}}$), 7.36 (d, $J = 8.4$ Hz, 3H, $-\text{C}_{\text{aromatikH}}$), 7.18 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, $-\text{C}_{\text{aromatikH}}$), 7.10 (dt, $J = 1853.7, 7.9$ Hz, 1H, $-\text{C}_{\text{aromatikH}}$), 6.92 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, $-\text{NH}$), 4.17 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2$), 2.80 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, $-\text{C}_{\text{triazol}}-\text{CH}_2$), 2.03 ppm (dt, $J = 13.3, 6.4$ Hz, 2H, $-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-$).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 153.4, 147.9, 137.9, 136.4, 135.5, 130.8, 129.0, 128.6, 120.6, 119.1, 118.3, 64.3, 28.5, 22.1 ppm

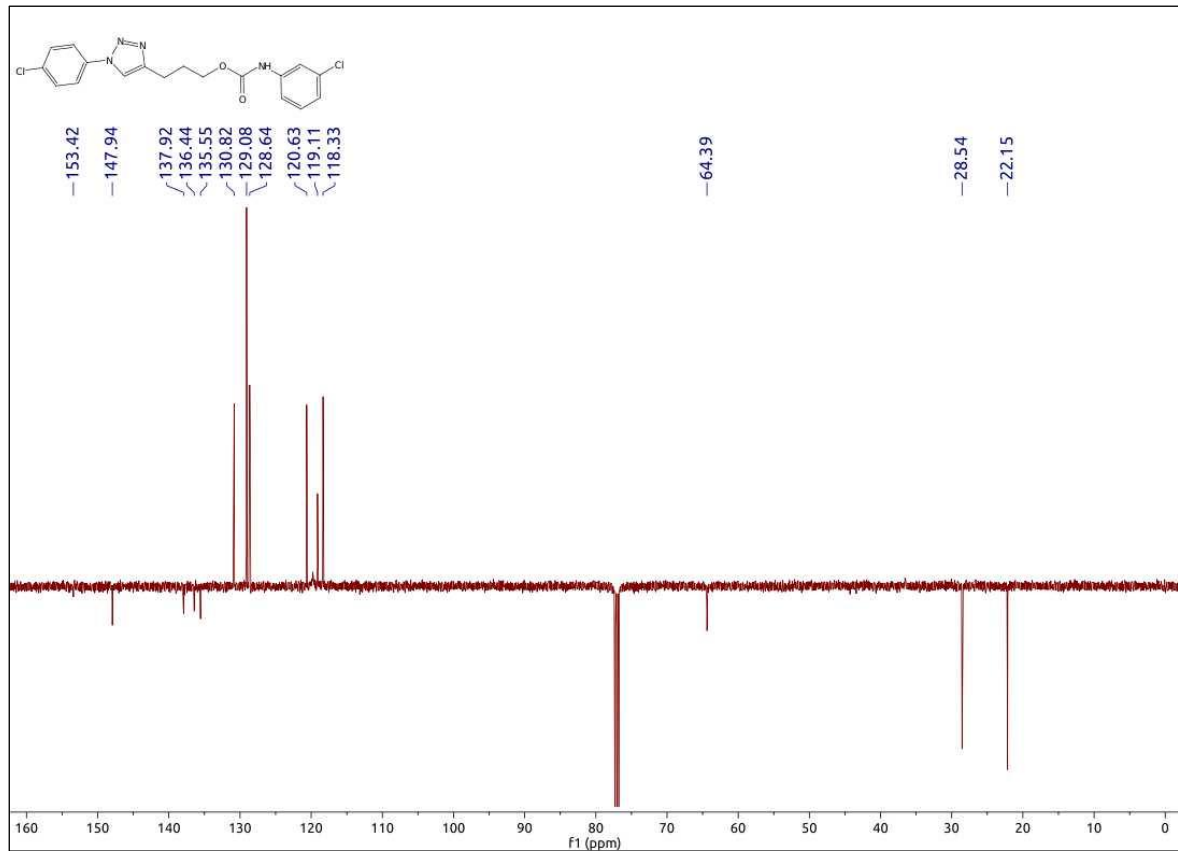
HRMS (APCI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ hesaplanan $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_2^+$: 391.07231; bulunan: 391.07195.



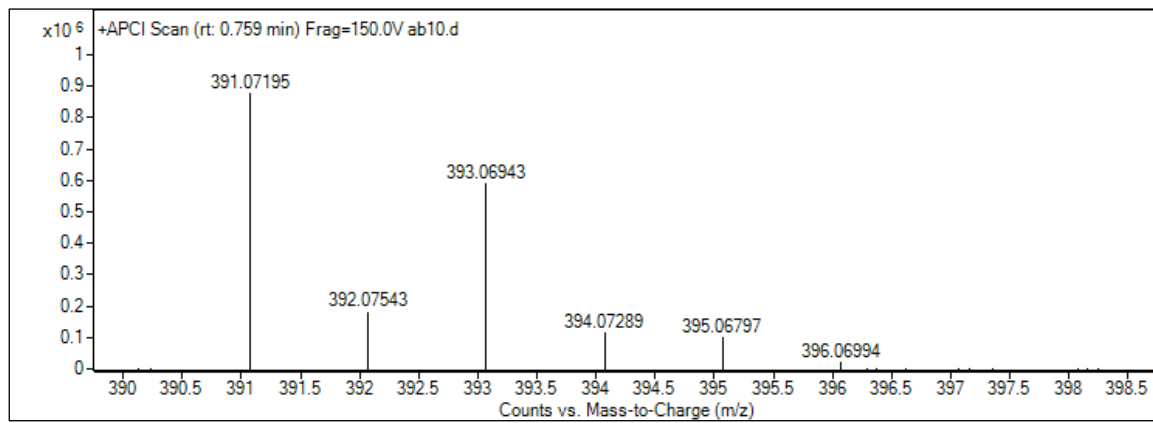
Şekil 4.49. ab10 bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu



Şekil 4.50. ab10 bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu

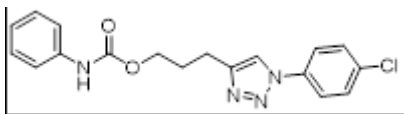


Şekil 4.51. ab10 bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu



Şekil 4.52. ab10 bileşiğinin HR-APCI-TOF spektrumu

4.2.11. ab11 (3-(1-(4-klorofenil)-1*H*-1, 2, 3-triazol-4-il)propil fenilkarbamat) bileşığının yapı aydınlatması



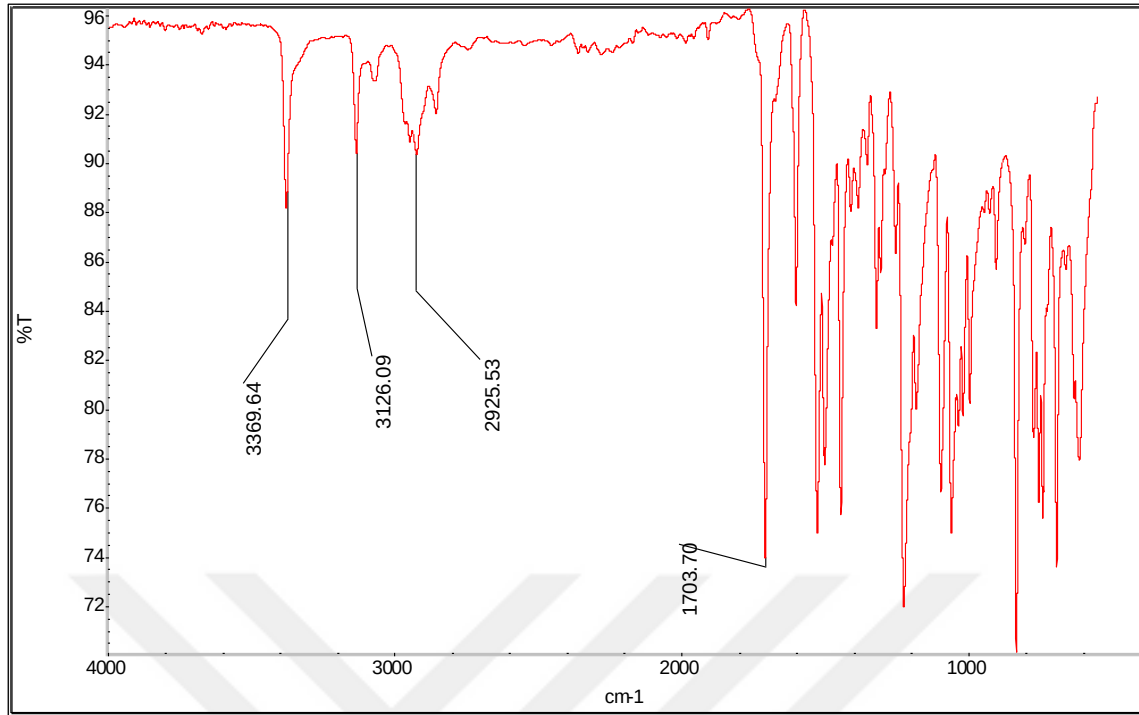
Bileşik ab11 %40'lık etil asetat/hekzan çözücü sistemi ile silika jel dolgusu kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı, katılar DCM/hekzan ile kristallendirildi.

IR (ATR, cm^{-1}): 3369 N-H gerilme, 3126 aromatik C-H gerilme, 2925 alifatik C-H gerilme, 1703 karbamat C=O gerilme bandları.

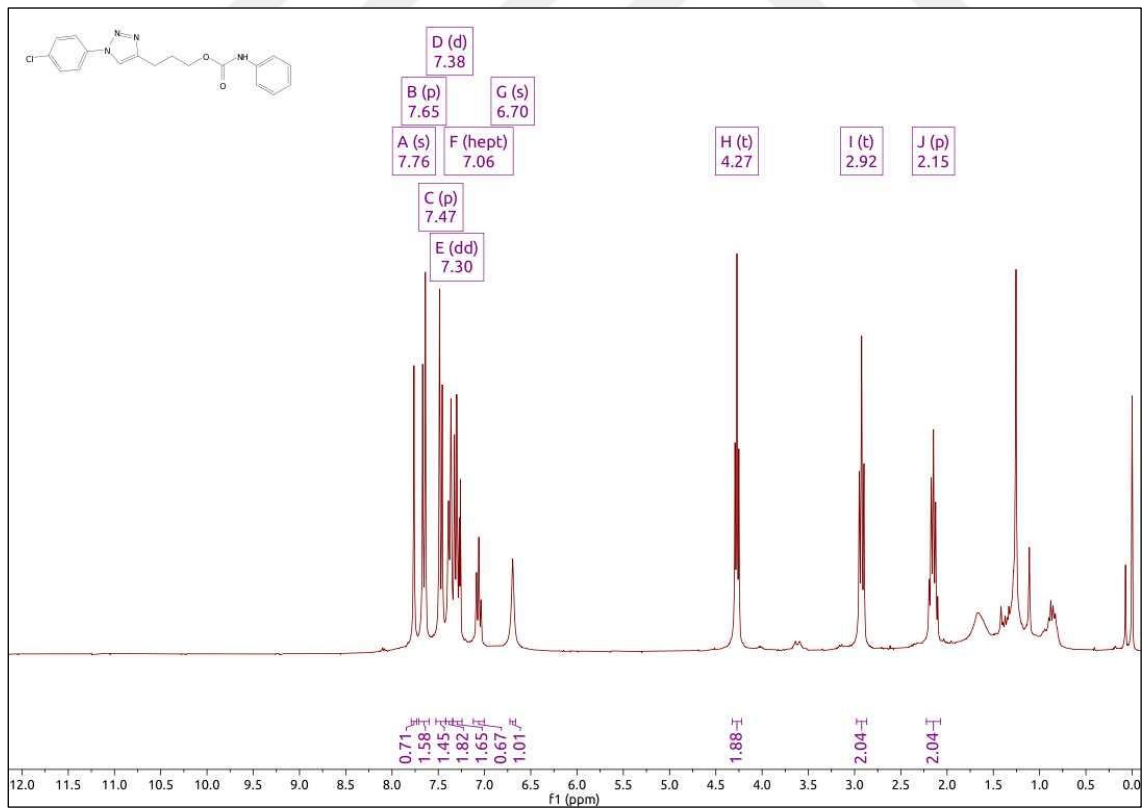
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.76 (s, 1H, - $\text{C}_{\text{triazol}}\text{H}$), 7.65 (p, $J = 3.0$ Hz, 2H, - $\text{C}_{\text{aromatik}}\text{H}$), 7.47 (p, $J = 2.8$ Hz, 1H, - $\text{C}_{\text{aromatik}}\text{H}$), 7.38 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, - $\text{C}_{\text{aromatik}}\text{H}$), 7.30 (dd, $J = 8.7$, 7.0 Hz, 2H, - $\text{C}_{\text{aromatik}}\text{H}$), 7.06 (hept, $J = 1.3$ Hz, 1H, - $\text{C}_{\text{aromatik}}\text{H}$), 6.70 (s, 1H, -NH), 4.27 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, -O- CH_2), 2.92 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, - $\text{C}_{\text{triazol}}\text{-CH}_2$), 2.15 ppm (p, $J = 6.8$ Hz, 2H, -C- CH_2 -C-).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ 154.0, 147.9, 139.6, 136.0, 133.0, 130.3, 129.1, 122.7, 121.9, 120.8, 118.6, 63.9, 28.6, 22.0 ppm

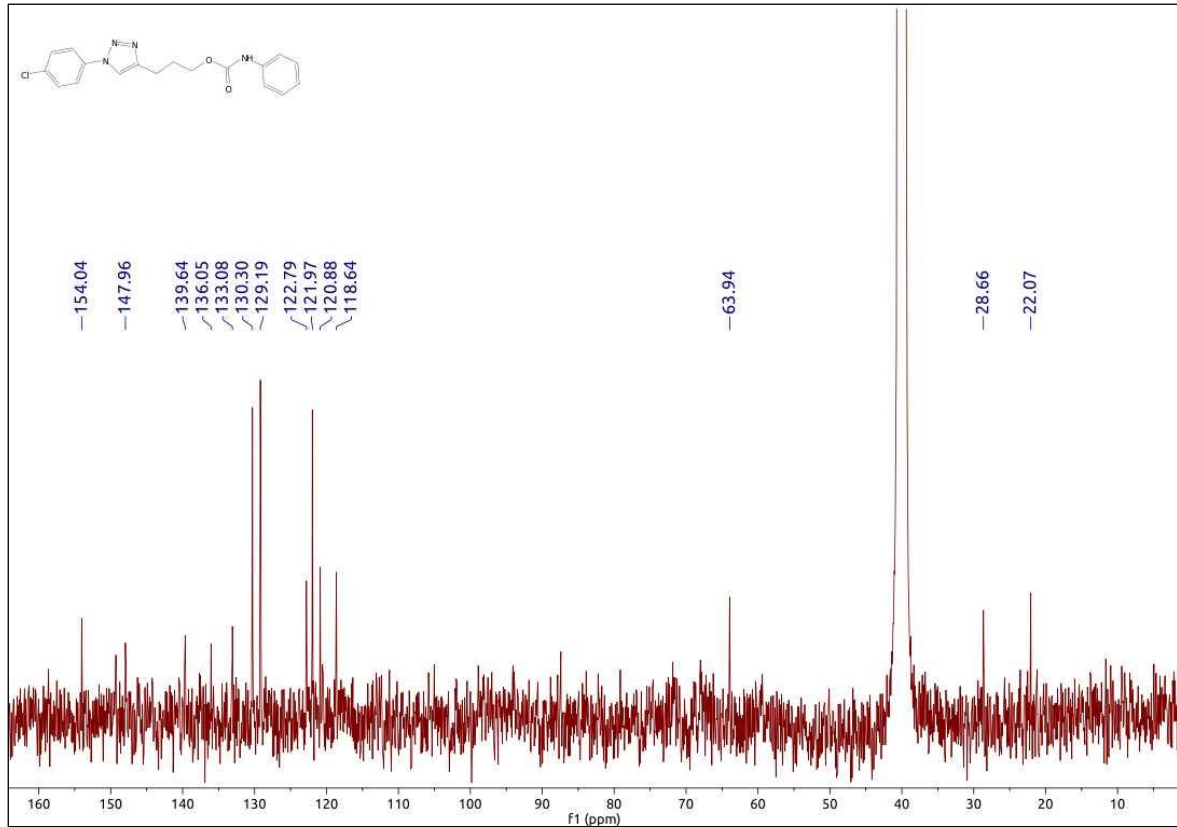
HRMS (APCI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ hesaplanan $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{O}_2^+$: 357.11130; bulunan: 357.11196.



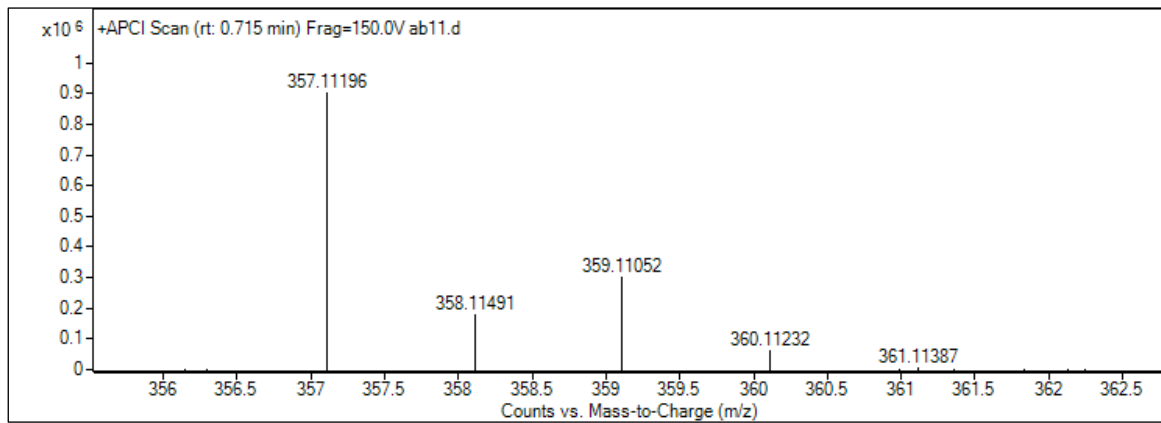
Şekil 4.53. ab11 bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu



Şekil 4.54. ab11 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu

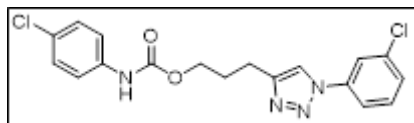


Şekil 4.55. ab11 bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu



Şekil 4.56. ab11 bileşiğinin HR-APCI-TOF spektrumu

4.2.12. ab12 (3-(1-(3-klorofenil)-1H-1, 2, 3-triazol-4-il)propil (4-klorofenil)karbamat) bileşiminin yapı aydınlatması



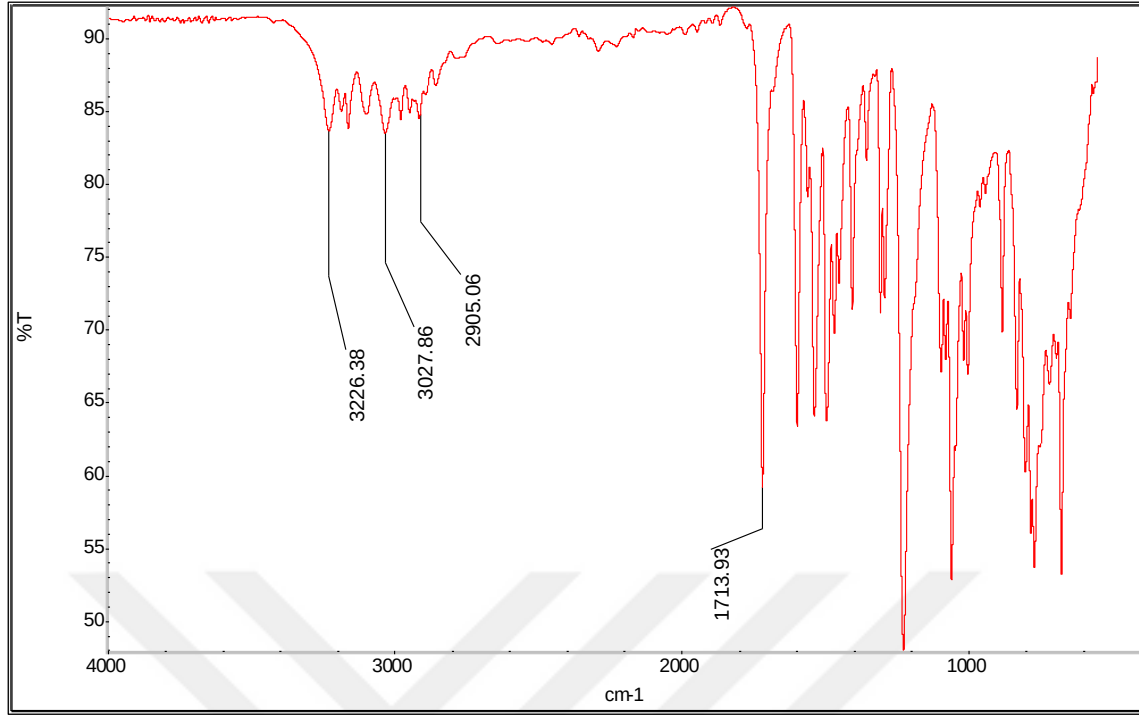
Bileşik ab12 %40'lık etil asetat/hekzan çözücü sistemi ile silika jel dolgusu kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı, katılar DCM/hekzan ile kristallendirildi.

IR (ATR, cm^{-1}): 3226 N-H gerilme, 3027 aromatik C-H gerilme, 2905 alifatik C-H gerilme, 1713 karbamat C=O gerilme bandları.

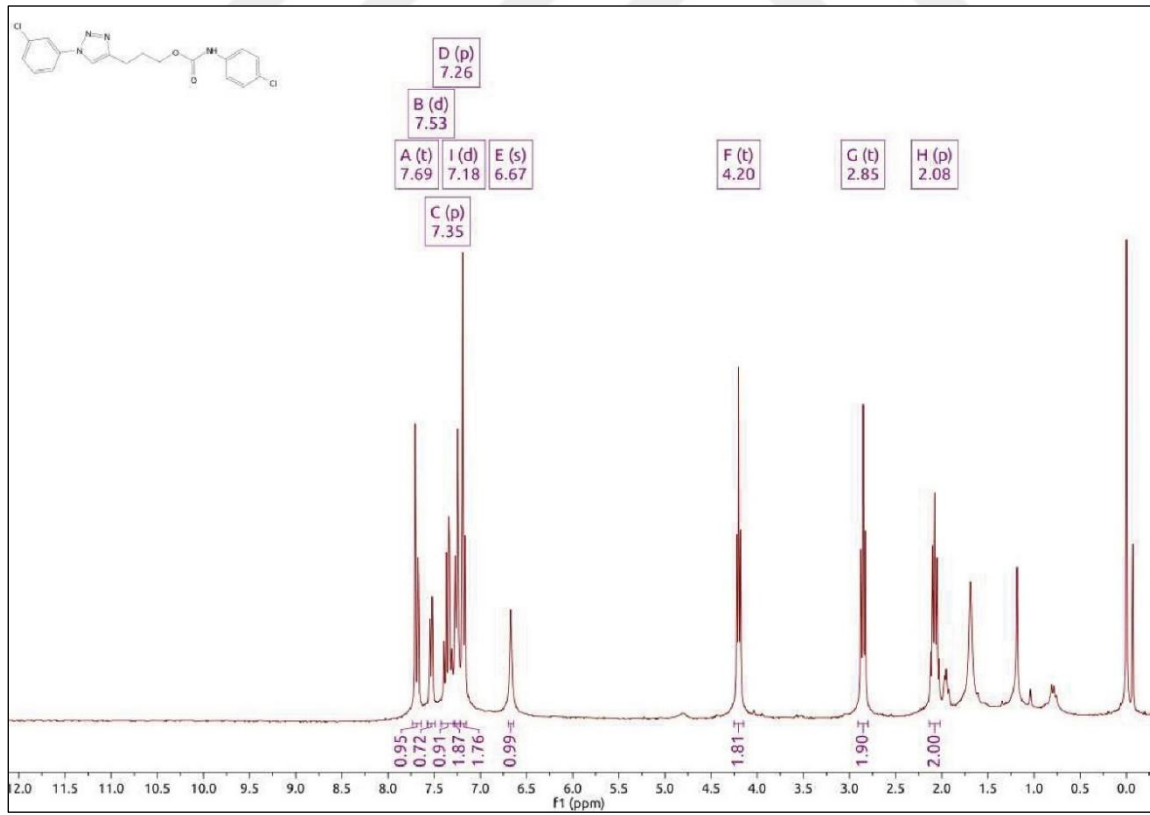
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.69 (t, $J = 10.5$ Hz, 1H, $-\text{C}_{\text{triazolH}}$), 7.53 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, $-\text{C}_{\text{aromatikH}}$), 7.35 (p, $J = 8.1$ Hz, 2H, $-\text{C}_{\text{aromatikH}}$), 7.26 (p, $J = 8.6$ Hz, 3H, $-\text{C}_{\text{aromatikH}}$), 7.18 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, $-\text{C}_{\text{aromatikH}}$), 6.67 (s, 1H, $-\text{NH}$), 4.20 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2$), 2.85 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, $-\text{C}_{\text{triazol}}-\text{CH}_2$), 2.08 ppm (p, $J = 6.8$ Hz, 2H, $-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-$).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 153.7, 148.3, 138.2, 136.7, 135.9, 131.2, 129.4, 129.0, 121.0, 119.5, 118.7, 64.7, 28.9, 22.5 ppm

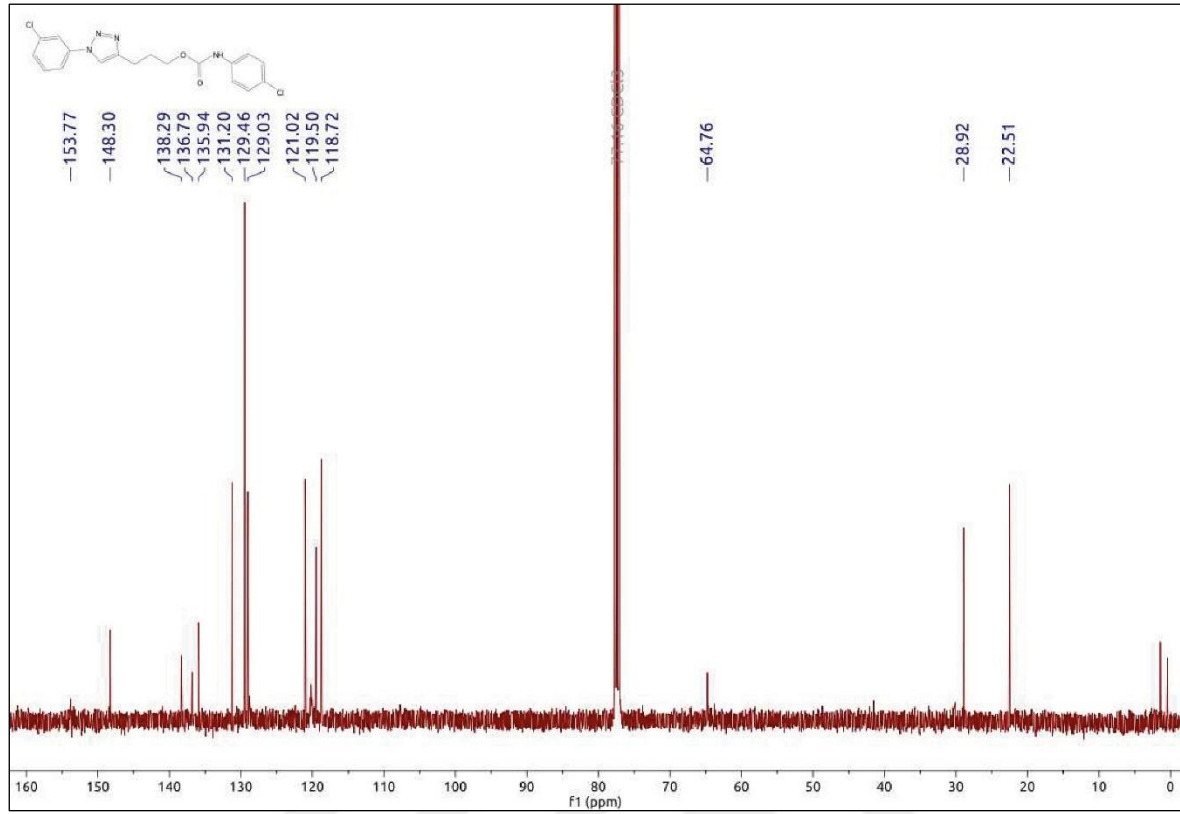
HRMS (APCI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ hesaplanan $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_2^+$: 391.07231; bulunan: 391.07287.



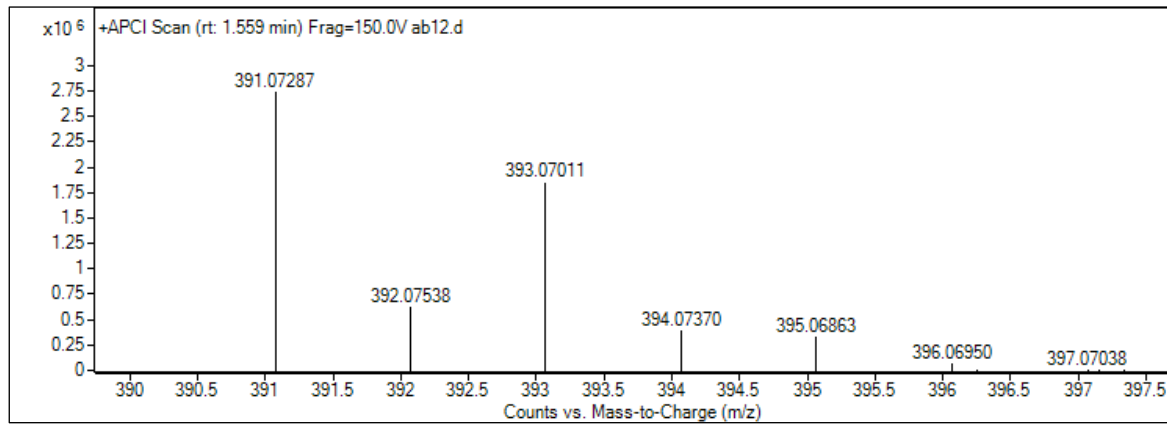
Şekil 4.57. ab12 bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu



Şekil 4.58. ab12 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu

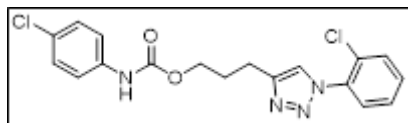


Şekil 4.59. ab12 bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu



Şekil 4.60. ab12 bileşiğinin HR-APCI-TOF spektrumu

4.2.13. ab13 bileşiğinin(3-(1-(2-klorofenil)-1H-1, 2, 3-triazol-4-il)propil (4-klorofenil)karbamat) yapı aydınlatması ve karakterizasyonu



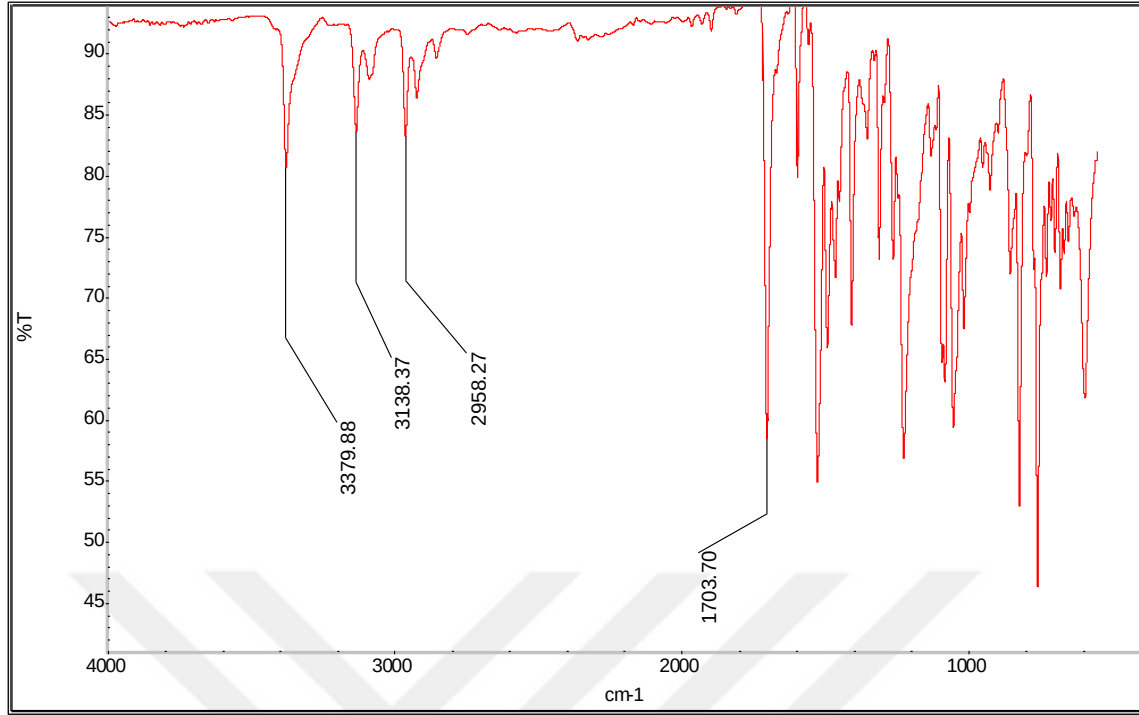
Bileşik ab13 %40'lık etil asetat/hekzan çözücü sistemi ile silika jel dolgusu kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı, katılar DCM/hekzan ile kristallendirildi.

IR (ATR, cm^{-1}): 3379 N-H gerilme, 3183 aromatik C-H gerilme, 2958 alifatik C-H gerilme, 1703 karbamat C=O gerilme bandları.

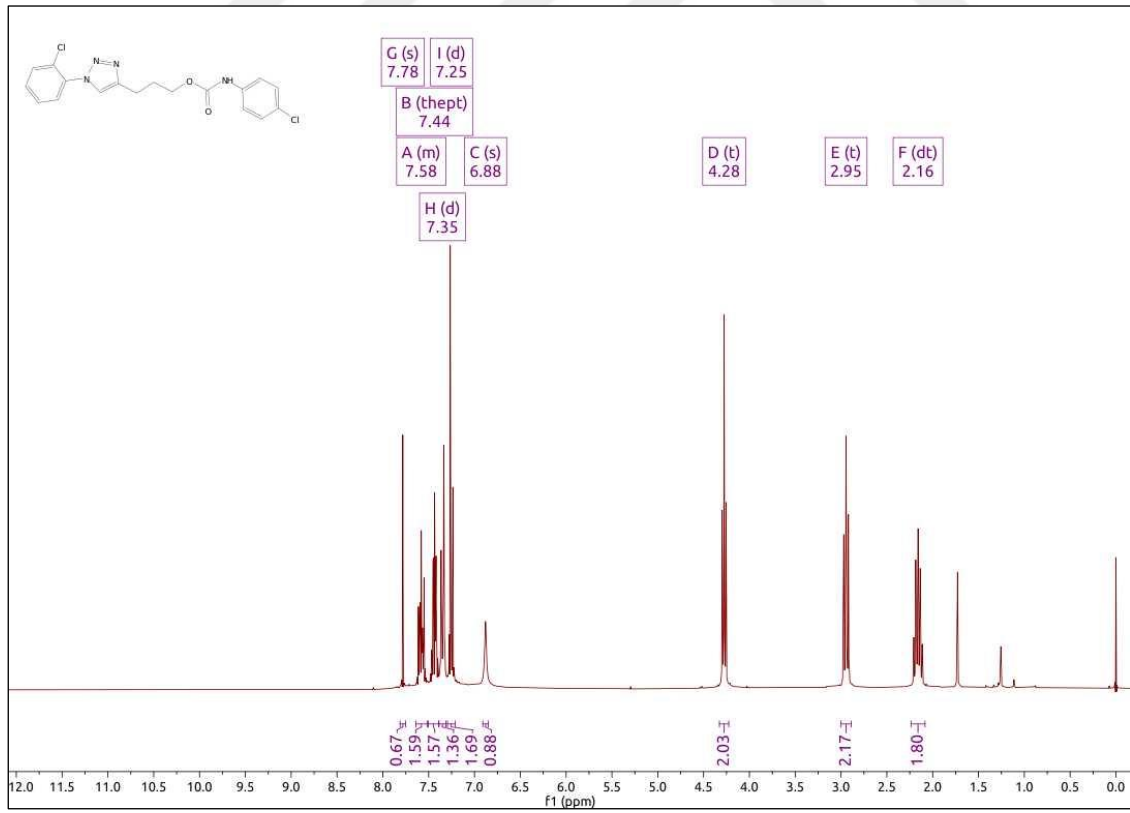
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.78 (s, 1H, -C_{triazol}H), 7.58 (m, $J = 3.1, 2.4, 1.9, 1.5$ Hz, 2H, -C_{aromatik}H), 7.44 (thept, $J = 4.7, 2.8$ Hz, 2H, -C_{aromatik}H), 7.35 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, -C_{aromatik}H), 7.25 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, -C_{aromatik}H), 6.88 (s, 1H, -NH), 4.28 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, -O-CH₂), 2.95 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, -C_{triazol}-CH₂), 2.16 ppm (dt, $J = 13.6, 6.6$ Hz, 2H, -C-CH₂-C-).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 153.5, 146.7, 136.6, 134.9, 130.7, 130.6, 129.0, 128.5, 128.2, 127.9, 127.7, 123.1, 119.8, 64.3, 29.7, 28.6, 22.0 ppm

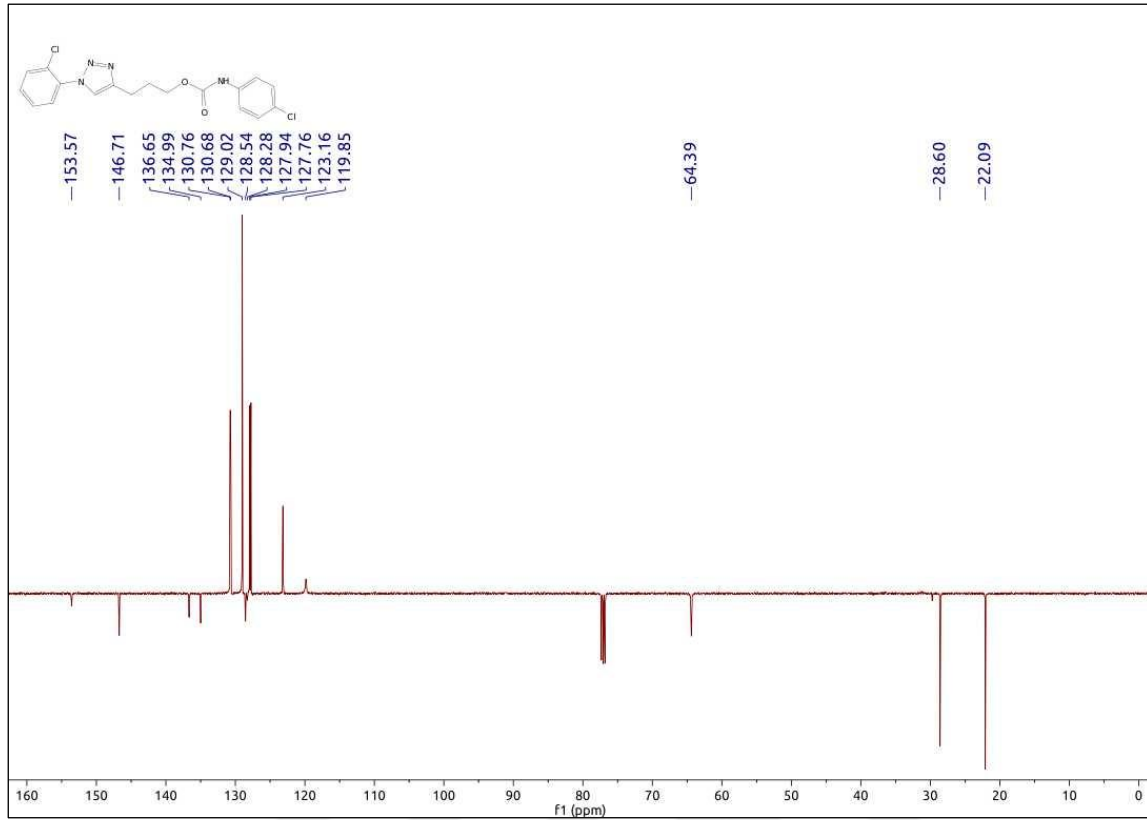
HRMS (APCI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ hesaplanan $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_2^+$: 391.07231; bulunan: 391.07273.



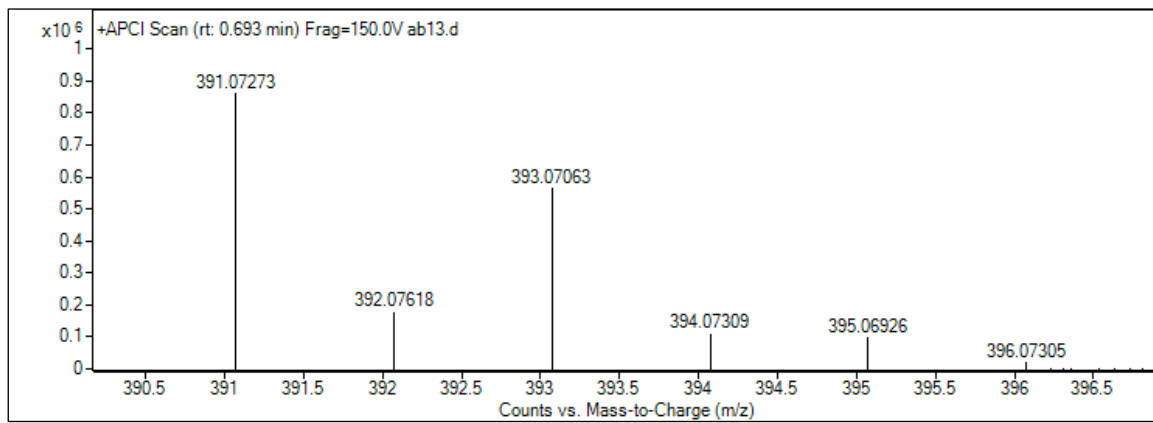
Şekil 4.61. ab13 bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu



Şekil 4.62. ab13 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu

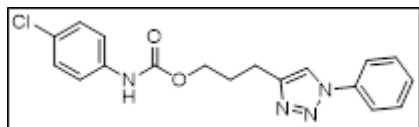


Şekil 4.63. ab13 bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu



Şekil 4.64. ab13 bileşiğinin HR-APCI-TOF spektrumu

4.2.14. ab14 (3-(1-fenil-1H-1, 2, 3-triazol-4-il)propil (4-klorofenil)karbamat) bileşığının yapı aydınlatması



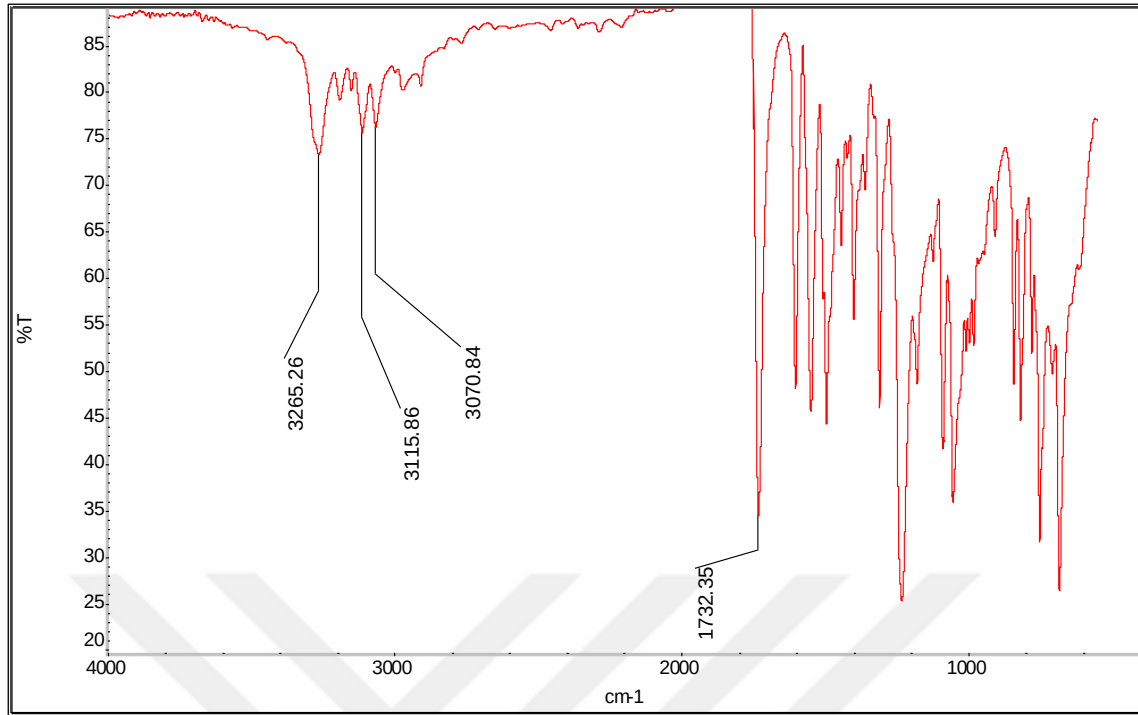
Bileşik ab14 %40'luk etil asetat/hekzan çözücü sistemi ile silika jel dolgusu kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı, katılar DCM/hekzan ile kristallendirildi.

IR (ATR, cm^{-1}): 3265 N-H gerilme, 3115 aromatik C-H gerilme, 3070 alifatik C-H gerilme, 1732 karbamat C=O gerilme bandları.

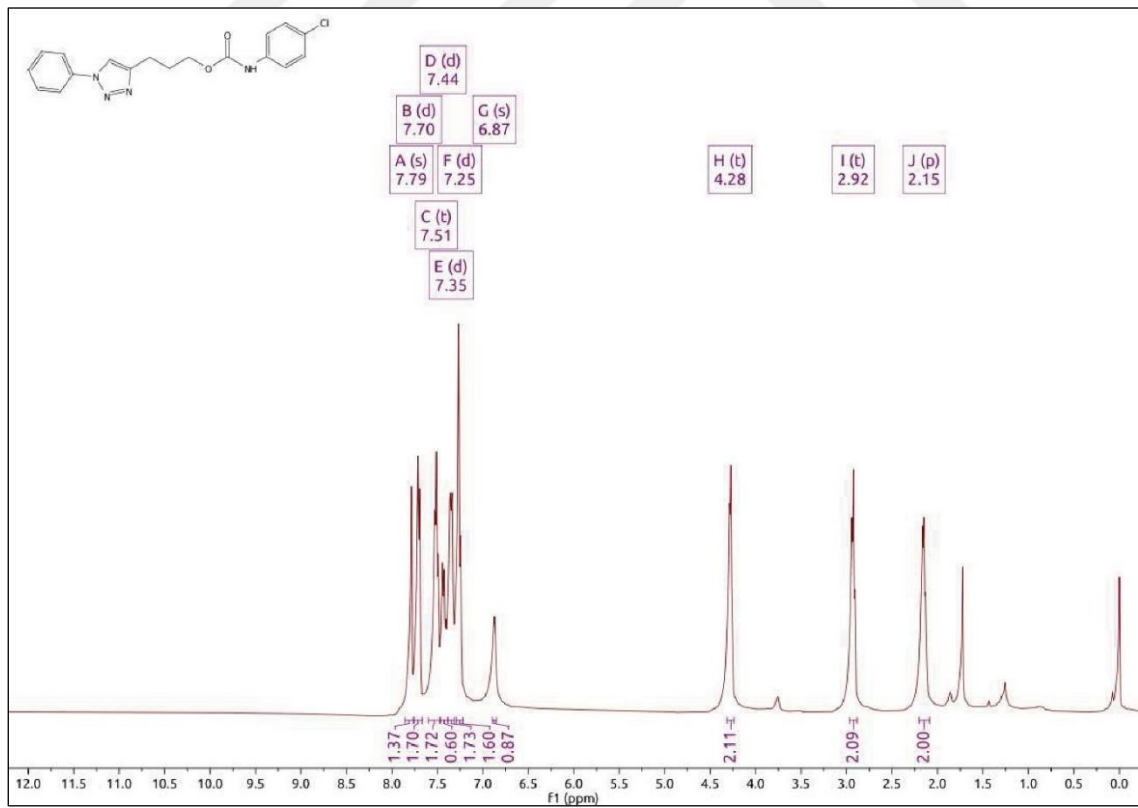
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.79 (s, 1H, - $\text{C}_{\text{triazolH}}$), 7.70 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, - $\text{C}_{\text{aromatikH}}$), 7.51 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, - $\text{C}_{\text{aromatikH}}$), 7.44 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, - $\text{C}_{\text{aromatikH}}$), 7.35 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, - $\text{C}_{\text{aromatikH}}$), 7.25 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, - $\text{C}_{\text{aromatikH}}$), 6.87 (s, 1H, -NH), 4.28 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, -O- CH_2), 2.92 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, - $\text{C}_{\text{triazol-CH}_2}$), 2.15 ppm (p, $J = 6.8$ Hz, 2H, -C- CH_2 -C-).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ 153.9, 147.7, 139.0, 138.6, 137.2, 130.3, 129.1, 128.8, 126.4, 125.9, 120.7, 120.3, 120.0, 64.1, 28.6, 22.0 ppm

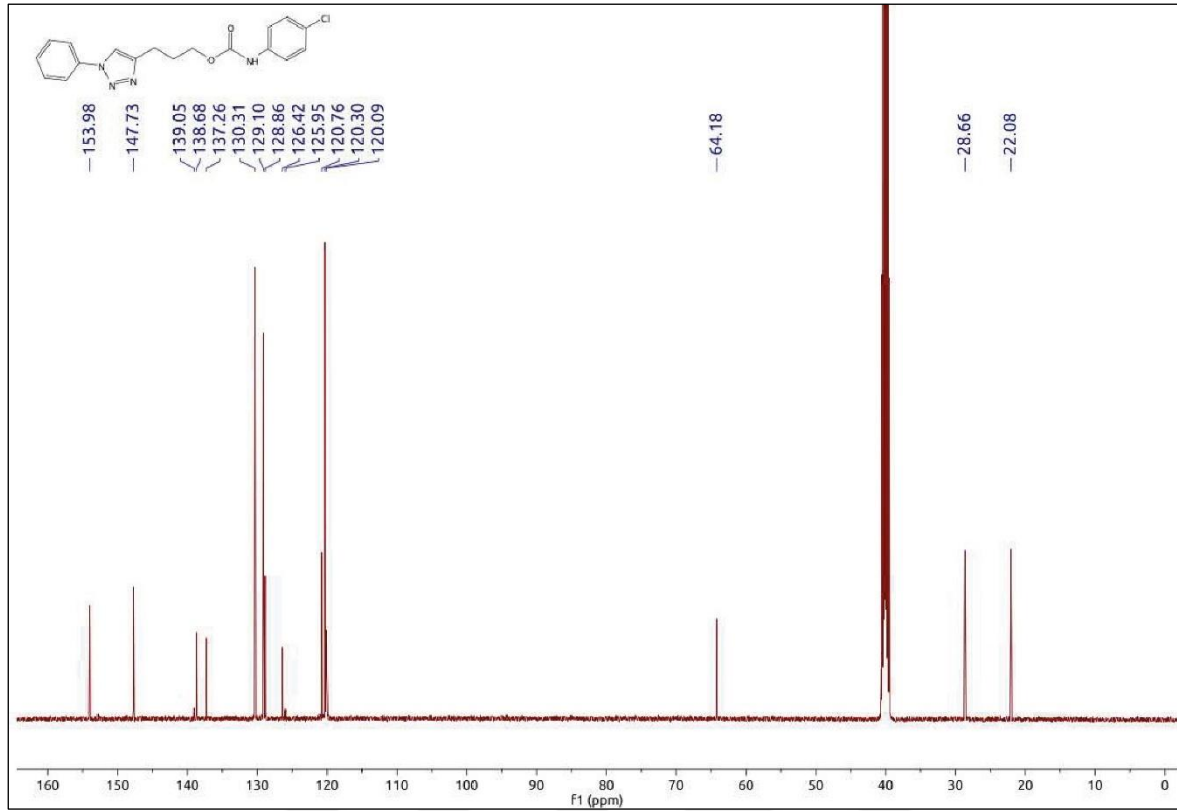
HRMS (APCI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ hesaplanan $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{O}_2^+$: 357.11128, bulunan: 357.11118.



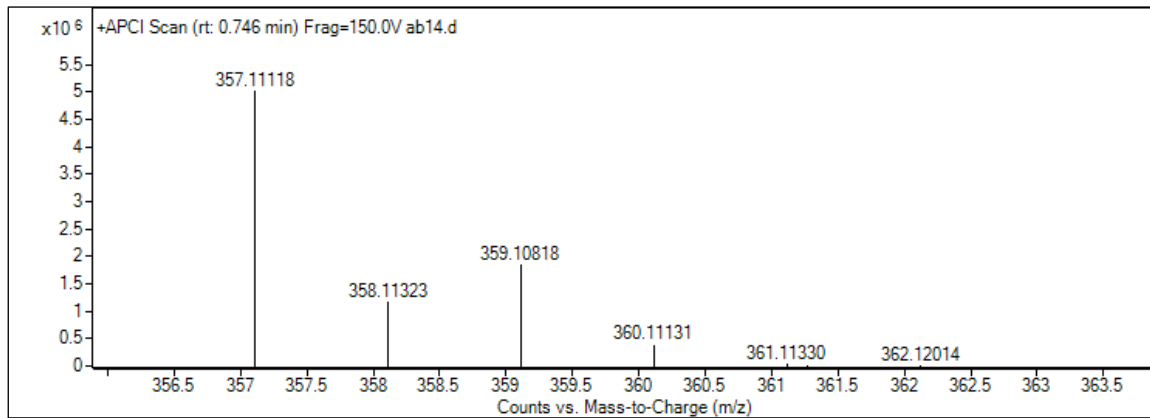
Şekil 4.65. ab14 bileşiğinin FT-IR-ATR spektrumu



Şekil 4.66. ab14 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu



Şekil 4.67. ab14 bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 4.68. ab14 bileşiğinin HR-APCI-TOF spektrumu

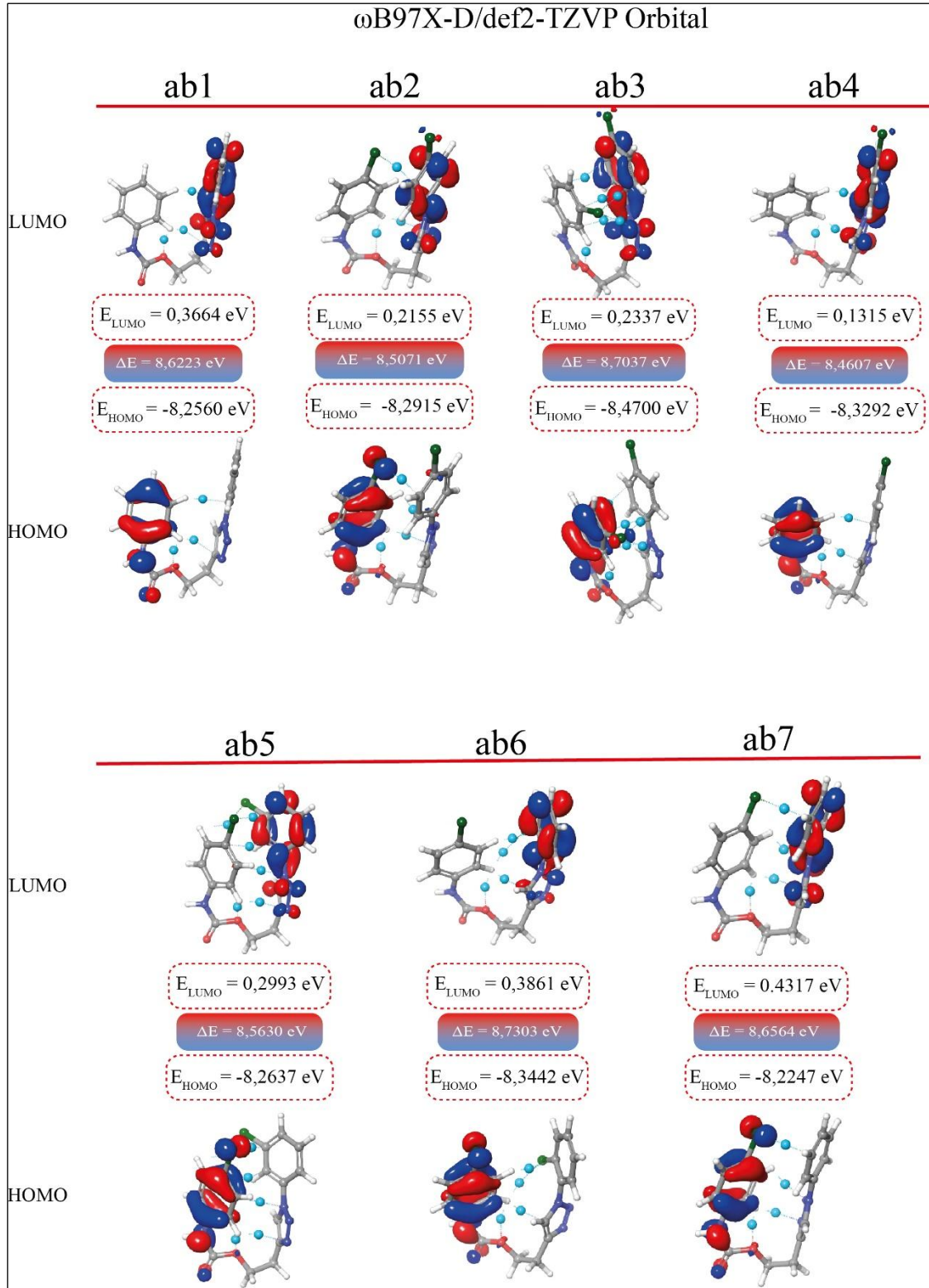
ab1-14 bileşik serisindeki her bir bileşiğin elde edildiği doğrulanmış ve yapısal verileri FT-IR, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR ve HR-APCI-TOF yöntemleri ile ortaya konmuştur. Çıkış bileşikler olan 1, 2, 3-triazolalkol bileşiklerinde özellikle FT-IR ve ^1H -NMR yöntemlerinde gözlenen -OH protonu nihai bileşiklerimizde bulunmayışı sentezin hedeflendiği şekilde alkol grubunun ve izosiyanatlarla karbamat oluşturacak şekilde katıldığının net bir göstergesidir. Çıkış bileşiklerinde görülen ve özellikle alifatik metilen köprülerinde ^1H -

NMR ve ^{13}C -NMR ile tespit edilen sinyallerin neredeyse hiç değişime uğramadan varlığını sürdürmesi sentez reaksiyonunun bileşiklerin yapısal bütünlüğünü koruyarak yine hedeflendiği gibi gerçekleştirildiğini göstermektedir. ab1-14 serisini oluşturan bileşiklerimiz HR-APCI-TOF analizinde de elde edilen son derece düşük kütle hata payları ile, ileri biyolojik testler için gerekli sağlığa sahip olduğunu açıkça doğrulamıştır.

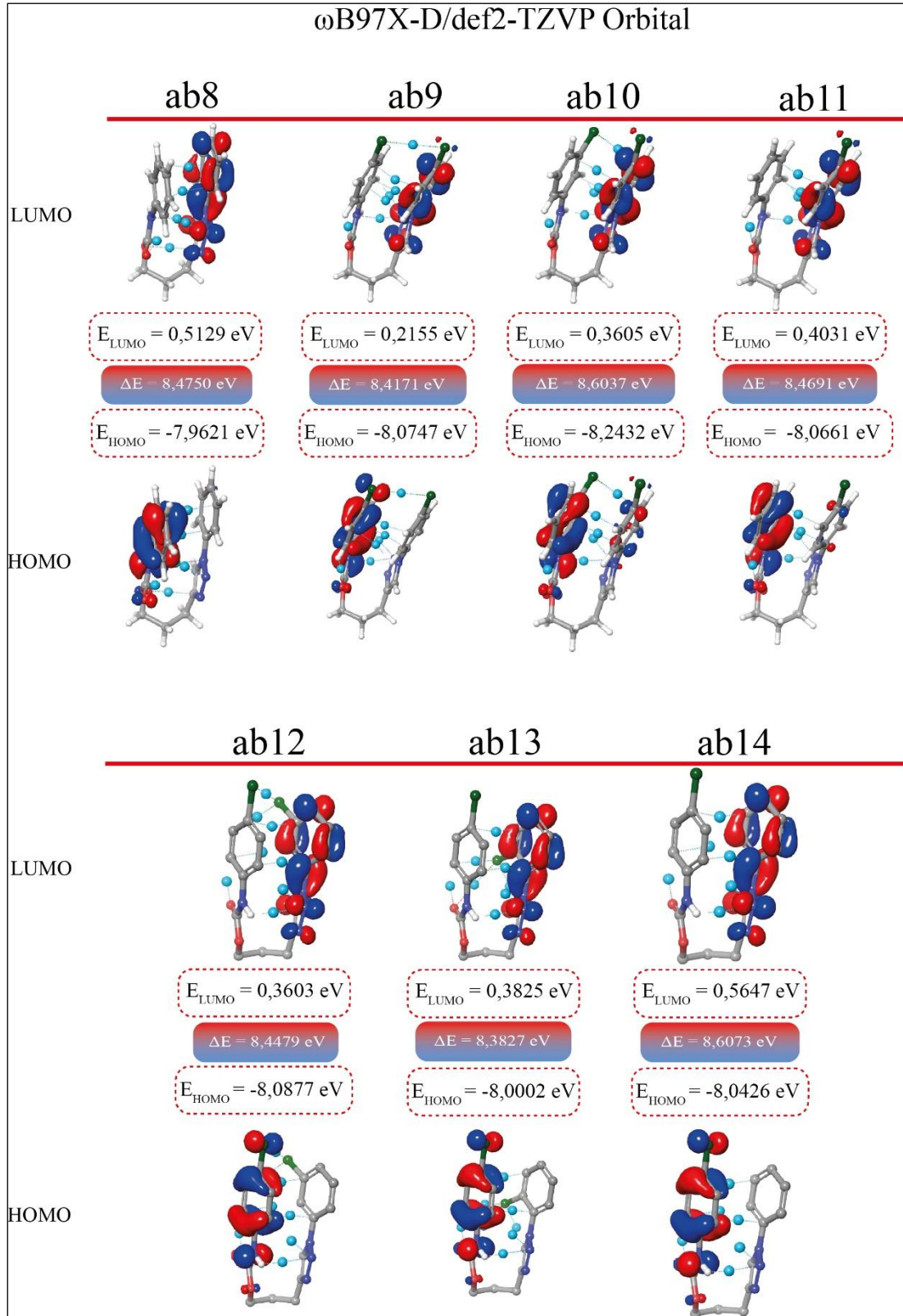
4.3. Hesaplamalı Yöntemler

4.3.1. DFT hesaplamaları

Detaylı konformasyon taraması sonucunda elde edilen yapıların geometri optimizasyonu ve ardından tek nokta enerji ile elektronik yapıları bileşiklerin hepsinin benzer konformasyonlarda kararlı olduğunu ancak bu konformasyonda kalma eğilimlerinin küçük farklarla birbirinden ayrıldığını gösterdi. ab Serisinin tamamında en düşük enerjili konformasyonda en yüksek dolu moleküler orbitalleri (HOMO) ve en düşük boş moleküler orbital (LUMO) orbitalleri birbirileri ile karşı karşıya konumlanmaktadır. Bunun anlamı HOMO sınır orbitali bir kolda yer alırken, LUMO sınır orbitali diğer kolda ama aynı boşluğa bakan faz loblarıyla örtüşme gerçekleştirerek konumlanmasıdır. Bu elektronun, yan zincirdeki σ -bağ dizisinden geçmeden boşluk üzerinden atlayabileceği kısa bir tünel oluşturmaya anlamına gelir. Molekül içi etkileşimlerin ve ortak kütle merkezlerinin bu aralıkta toplanması da bunu açıklamaktadır. Görselde HOMO sınır orbitallerinin bileşiklerin genelinde karbamat kısmına bağlı fenil grubu üzerinde toplandığı, LUMO sınır orbitallerinin ise 1, 2, 3-triazol halkası ve ona bağlı fenil grubu üzerinde toplandığı tespit edilmiştir. Triazol grubundaki aromatik yapı ve delokalizasyon oluşturan elektron çekici heteroatomların bu bölgede toplanması LUMO orbitallerinin bu bölgelerde toplanmasını açıklamaktadır. Ayrıca triazoldeki π^* ve fenildeki π^* orbitallerinin benzer simetriye sahip olması durumu, orbital karışımı sonucu tümleşik bir LUMO ortaya çıkarmıştır. HOMO orbitalinde ise bu durum tam tersi yöndedir ve karbamat grubu etrafında sadece azot atomu üzerinde küçük loblar görülmektedir.



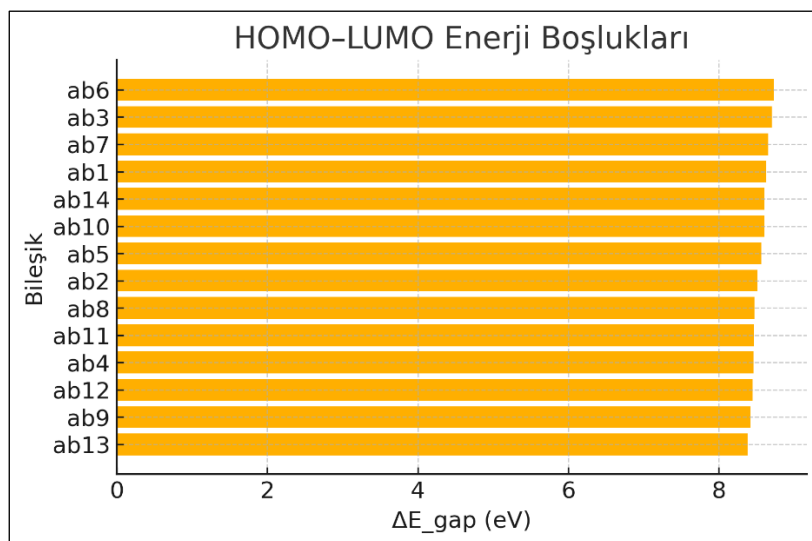
Şekil 4.69. ab1-7 bileşiklerinin DFT çalışmasında elde edilen en düşük enerjili konformasyonları ve HOMO-LUMO orbitalleri enerji seviyeleri ile birlikte gösterilmiştir



Şekil 4.70. ab8-14 bileşiklerinin DFT çalışmasında elde edilen en düşük enerjili konformasyonları ve HOMO-LUMO orbitalleri enerji seviyeleri ile birlikte gösterilmiştir

$\Delta E_{\text{boşluk}}$ ile HOMO-LUMO arasındaki boşluklar incelendiğinde bileşikler “sert” sınıfına sokacak derece yüksek değer elde edilmiştir. Bu durum bileşik serimizin genelinde, HOMO orbitallerindeki elektron bulutunun kolay dağılmayacağını gösterir ve konformasyonun LUMO’ya ulaşılabilir durumda olmasıyla; HOMO için yüksek elektrofil karakter, LUMO için ise yüksek nükleofil karakter ile hızlı etkileşim olanağı yaratarak biyolojik hedeflerle yüksek non-kovalent etkileşim isteği oluşturabileceği anlamına gelir. Biyolojik süreçlerde meydana gelebilecek kovalent etkileşime de kısmen kapı aralayan bu özellikler serimizin hiç bir bileşiğinde buna uygun grup olmaması nedeniyle yüksek enerji gerektiren ve kendilinden gerçekleşmesi imkânsız olan durumlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Bileşiklerimizi protein-ligand etkileşimi için sadece non-kovalent etkileşimler bazında değerlendirmemizin de başlıca nedenlerinden biri olan bu durum kovalent bağlanmanın biyolojik süreçlerdeki tahmin edilemez etkisi ve bileşiklerin endüstriyel kullanımında insan ile teması halinde bulunma durumlarında hem insan sağlığı hem de çevre sağlığı açısından bileşiklerimizi avantajlı kılan bir diğer unsurdur. Bu durum ayrıca bileşik serisini redoks deaktif kılan bir etken olarak kararlı kıldığı için endüstriyel kullanım potansiyeli değerlendirilirken “raf ömrü” sorununu ortadan kaldırma olasılığına işaret eder.

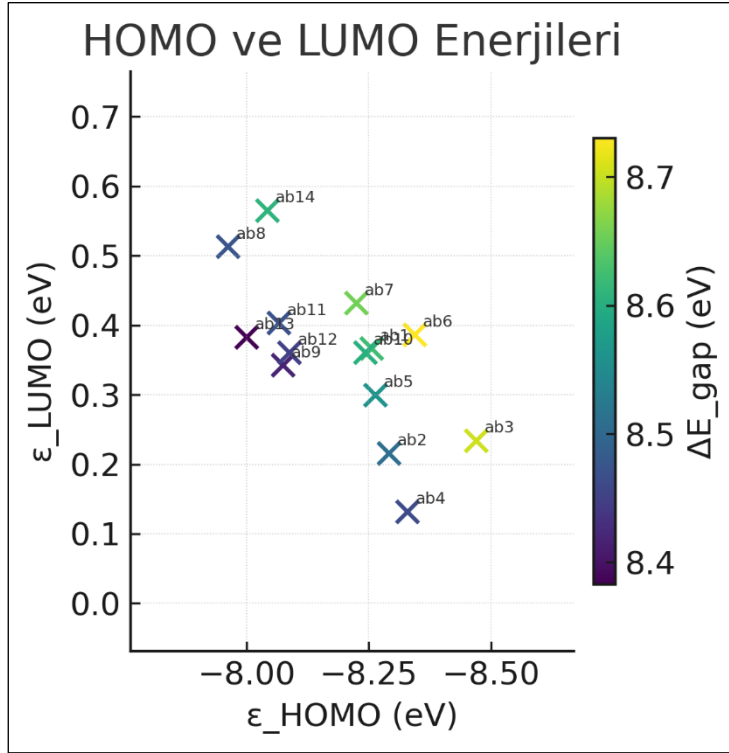
Bileşiklerin HOMO-LUMO enerji seviyeleri farkı, Şekil 4.71’de görüleceği gibi kendi aralarında değerlendirildiğinde 14 bileşiğin sınır orbital boşluklarının 8.38 – 8.73 eV aralığında kümелendiğini göstererek serinin elektronik yapısının oldukça dar bir pencerede kaldığını ortaya koymaktadır. Yapı iskeleti değişmeden klor atomlarının aromatik halkalardaki konumlarının değişmesi durumunda beklenen bir durumdur. En küçük bant aralığına sahip ab13 (8.38 eV), termodinamik olarak en az kararlı ve dolayısıyla elektron alma-verme süreçlerine en yatkın adaydır; bu özellik, ışık soğurumu veya moleküler elektronik uygulamalarında daha düşük eşik gerilime olanak tanıyabilir. Buna karşılık ab6 (8.73 eV) serinin en geniş boşluğuna sahip olup kimyasal olarak daha inert bir profil sergilemektedir. İki bileşik arasındaki farkın nedeni ise üç karbonlu yan zincirin dihedral açılarla bükülmeye daha müsait olmasından dolayı elektronik yapıda molekül içi etkileşimleri değiştirmesi olarak yorumlanmıştır.



Şekil 4.71. ab1-14 Serisinin HOMO ve LUMO arasındaki enerji farklarının ($\Delta E_{\text{boşluk}}$) karşılaştırılması

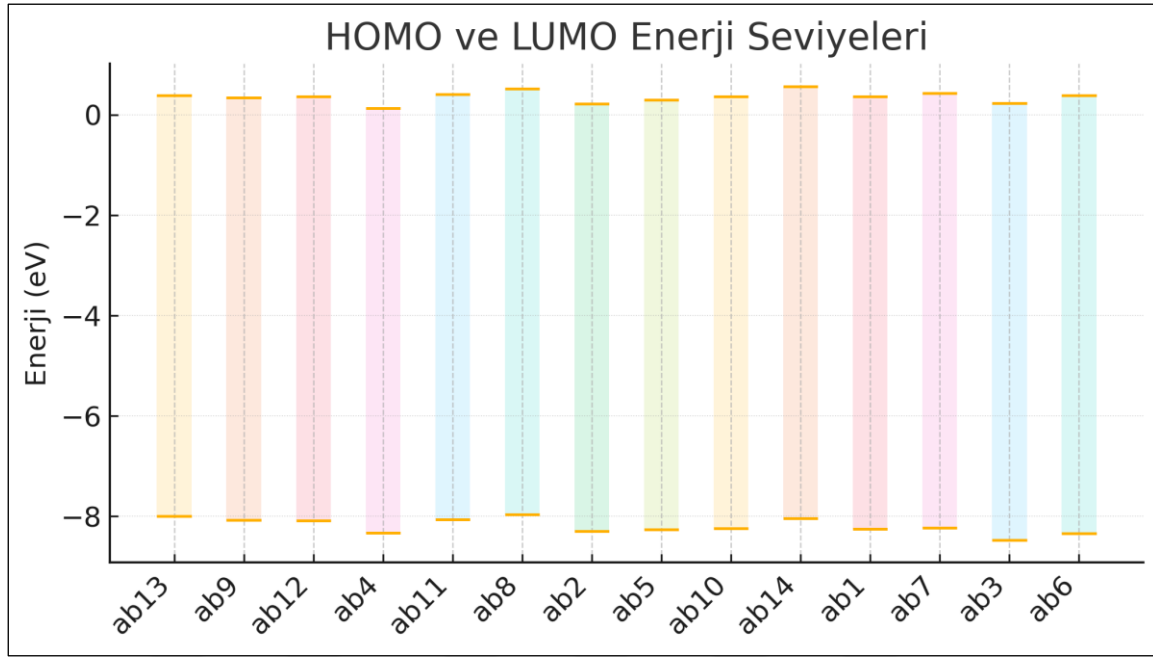
Şekil 4.72’de HOMO–LUMO saçılım grafiğinin $\Delta E_{\text{boşluk}}$ ile ilişkisi görülen serideki bileşiklerin sınır orbital enerjilerinin doğrusal bir korelasyon izlediği (Pearson $r \approx 0.6$) görülmüştür. Bileşiklerdeki klor süstitüsyonunun HOMO ve LUMO’yu birlikte—yani “global” bir enerji kaydırması şeklinde—etkilediğini açıktır. LUMO enerjisi yükseldikçe HOMO’nun da paralel biçimde daha az negatifleşmesi, çekirdek iskeletin konjuge yapısının korunduğunu ve klor gruplarının diferansiyel yerine eş yönlü stabilizasyon-destabilizasyon yarattığı tespit edilmiştir. En uçta konumlanan ab14 ($\epsilon_{\text{LUMO}} \approx 0.57$ eV, $\epsilon_{\text{HOMO}} \approx -7.92$ eV) ve ab4 ($\epsilon_{\text{LUMO}} \approx 0.13$ eV, $\epsilon_{\text{HOMO}} \approx -8.34$ eV) bileşikler, sırasıyla en düşük ve en yüksek indirgeyici karakteri temsil ederek fotofiziksel veya elektrokimyasal çalışmalar için iki stratejik sınır noktası sunar. Renk skalasıyla kodlanan $\Delta E_{\text{boşluk}}$ değerlerinin dar (≈ 0.3 eV) fakat sistematik dağılımı, elektron-çekici klor atomunun aromatik halkalardaki konumunun bant aralığına ince ayar yapmakta etkili olduğunu, ancak temel iskelette bant genişliğini dramatik biçimde açıp kapatan bir etkisinin bulunmadığını açıkça gösterir. Yan zincir uzunluğunun daha kısa olduğu ab1-7 bileşikler grafiğin alt kısmında sağ tarafta toplanırken, yan zinciri daha uzun olan ab8-14 bileşikler grafiğin solunda ve üstünde toplanmıştır. Uzun zincirli ab8-14 bileşikler dar bir LUMO sınır orbital enerji seviyesinde kümelenirken kısa zincirli ab1-7 varyasyonları daha geniş bir LUMO enerji seviyesi arasında saçılmış ve net bir küme oluşturamamıştır. HOMO enerjilerinde ise iki grup arasında seviye farkı çizgisel olarak dikkat çekmiş ve aynı hizada toplanmıştır. Bu bilgiler doğrultusunda LUMO seveleri daha geniş saçılım gösteren ab1-7 bileşiğinin elektron alma durumlarının büyük oranda

değiştirdiği, ab8-14 grubunu ise belirli bir aralıkta elektron alma eğimini grubun geneline yaydığı sonucu çıkarılabilir.



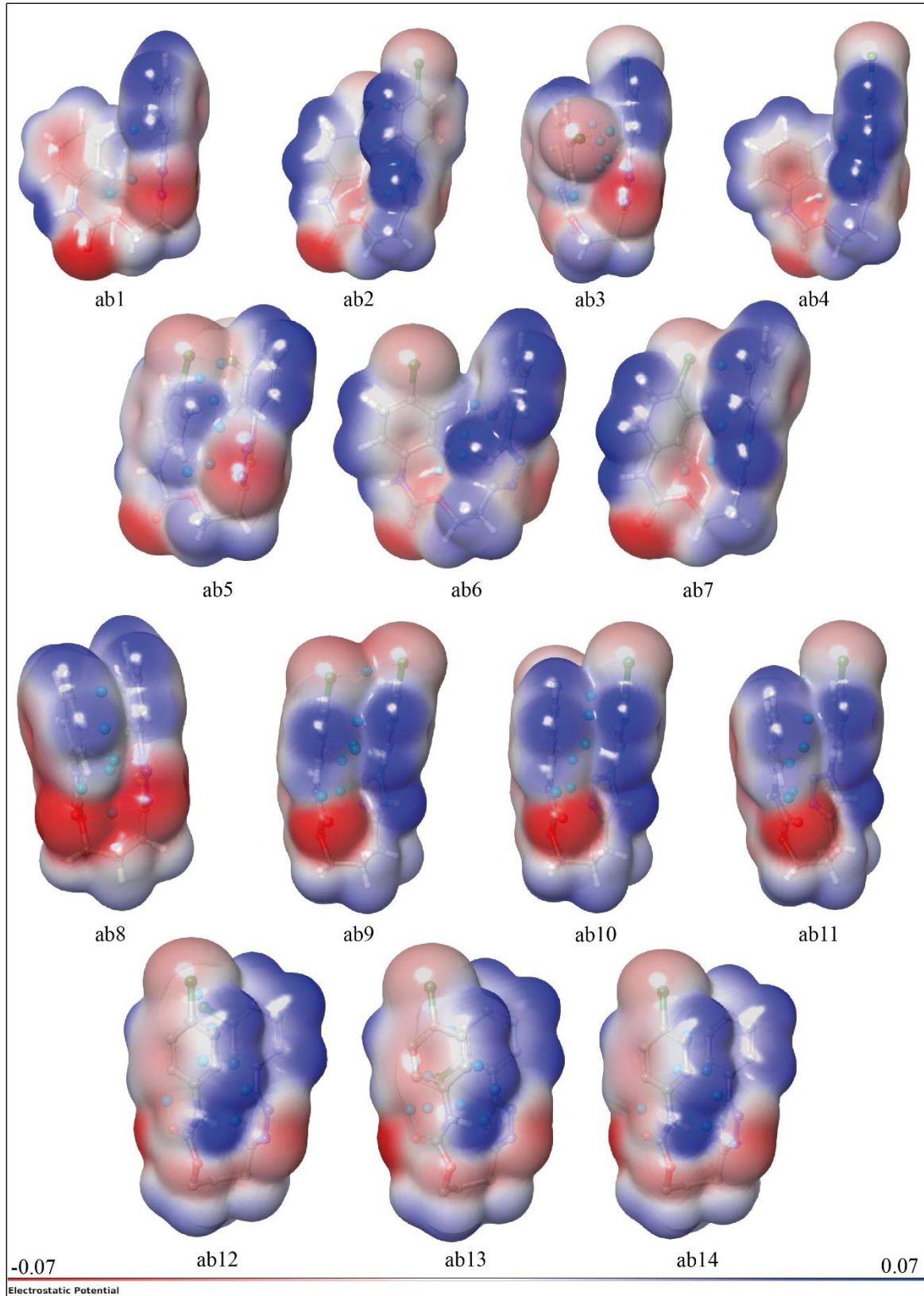
Şekil 4.72. ab1-14 bileşiklerinin HOMO–LUMO saçılım grafiği ve ΔE ilişkisi

Şekil 4.73'te görülen ab1-14 serisinin HOMO/LUMO seviye diyagramı, bileşiklerin frontier orbital mimarisini $\Delta E_{\text{boşluk}}$ artışına göre sıralı bir perspektifte sunarak elektron yoğunluğu ve boşluk fonksiyonunun nasıl birlikte evrildiğini net biçimde ortaya koymaktadır. HOMO bantları -8.34 ± 0.18 eV aralığında dar bir dağılım sergilerken LUMO seviyelerinin 0.12 – 0.57 eV'ye uzanan daha geniş bir varyans göstermesi, bant aralığındaki temel katkının esasen LUMO'nun yukarı-aşağı modülasyonundan kaynaklandığını doğrular. Böylece serinin oksidatif kararlılığı neredeyse sabit kalırken indirgenebilirliğin (ve dolayısıyla elektron-alıcı karakterin) aromatik halkalardaki farklı konumlarda klor atomu ile hassas biçimde ayarlanabildiği gösterir. $\Delta E_{\text{boşluk}}$ sütunlarının yarı saydam doldurulması, en reaktif ab13 (8.38 eV) ile en inert ab6 (8.73 eV) arasında yalnızca ~ 0.35 eV'lik bir pencere bulunduğunu gösterir. Enerji seviyelerinin birbirine paralel yükselip alçalması, π -iskeletteki konjugasyon uzunluğunun korunurken aromatik halkalarda farklı konumlarda klor substitüsyonunun hem HOMO'yu hem LUMO'yu farklı genlikte kaydırıldığını; dolayısıyla bant aralığını “gererek” değil “kaydırarak” düzenlediğini gösterir.

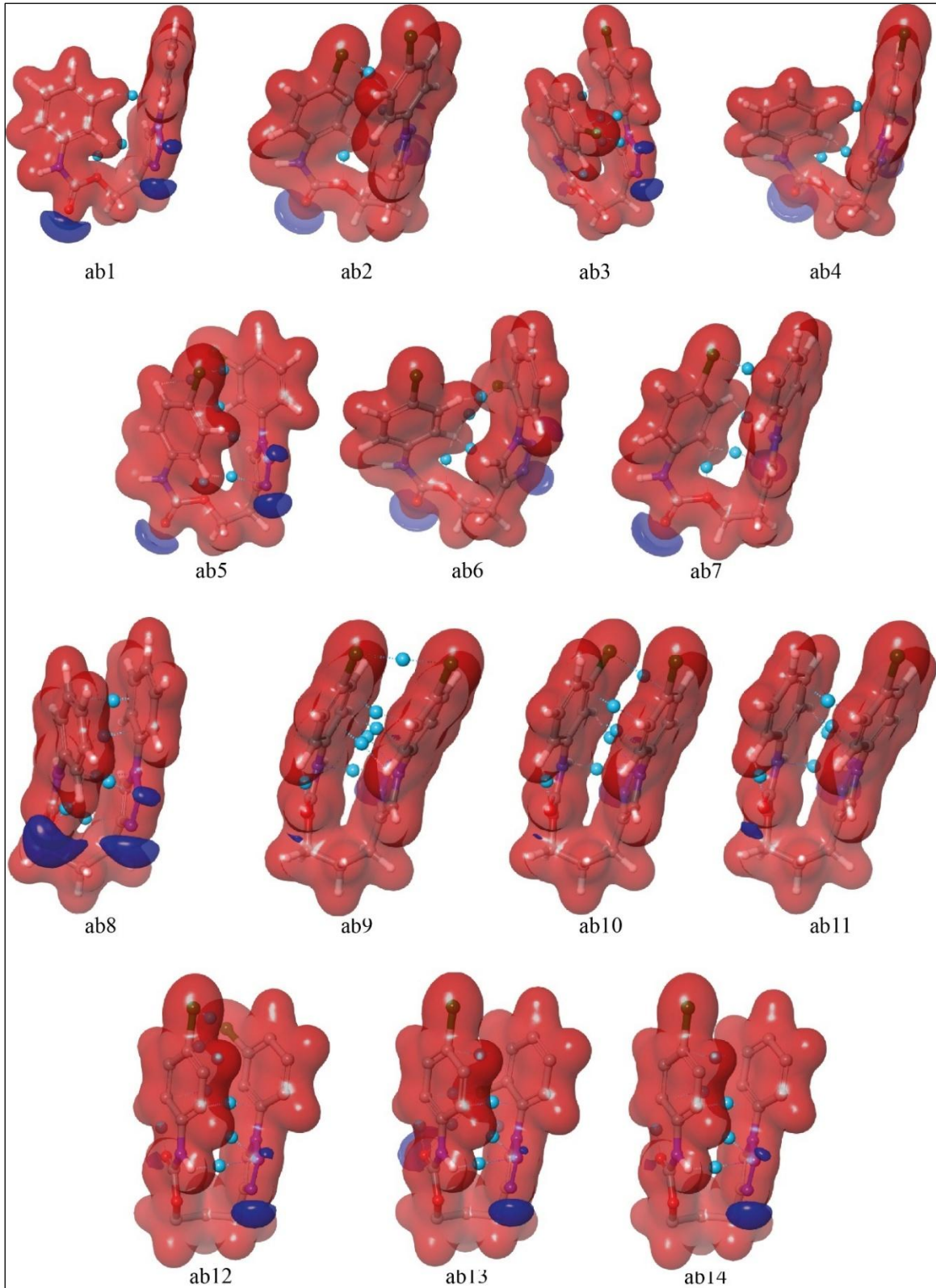


Şekil 4.73. ab1-14 serisinin HOMO/LUMO seviye diyagramı

Elektron yoğunluğu haritası Şekil 4.74'dan incelendiğinde homojen dağılımın olduğu tespit edilmiştir ve Şekil 4.75'da görülen elektrostatik potansiyel haritasıyla daha yakından bakıldığında bileşiklerin hepsinde karbonil oksijeni ve 1, 2, 3-triazol azotları üzerinde mavi bulutlarla gösterilen yoğunlaşmalar olduğu görülmüştür.



Şekil 4.74. ab1-14 Bileşiklerinin elektron yoğunluğu dağılımı gösterimi

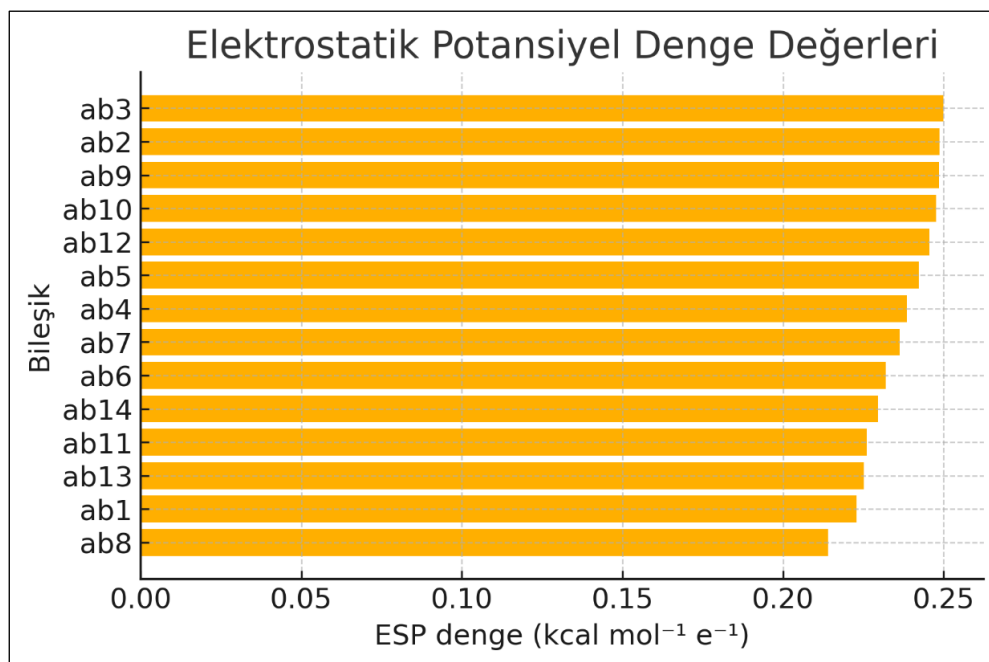


Şekil 4.75. ab1-14 Bileşiklerinin elektrostatik potansiyellerinin (ESP) gösterimi

Elektrostatik potansiyel olarak Şekil 4.75’de de açıkça görülebileceği gibi en geniş yoğunlukta mavi buluta sahip olan ab8 bileşiğidir ve bu onu elektrostatik bakımdan diğer

bileşiklerden daha dengesiz kılmaktadır. Bu bileşikte karbamat grubuna bağlı fenil halkasında herhangi bir sübstitüsyon bulunmamaktadır ve bu durum elektrostatik potansiyeli “serbest bırakmış” görünmektedir. ab3 Bileşiği ise bunun tam tersi bir içerikle son derece düşük yoğunlukta mavi bulut kümelerini üzerinde barındırmasıyla dikkat çekmektedir. Elektrostatik bakımdan en dengeli olarak ifade edilen ab3’ün en belirgin özelliği karbonil üzerindeki (Şekil 4.75’te arkaya baktığı ve küçük boyutlu olduğu için çok belirgin değildir) elektrostatik potansiyel yoğunluğun düşük olmasıdır. Bu bileşikte karbonil oksijeni ile karbamata bağlı fenil halkasındaki -meta konumlu klor atomu birbirine zıt yonde bakmaktadır ve bu konumlanma belirleyici olmuş görünmektedir.

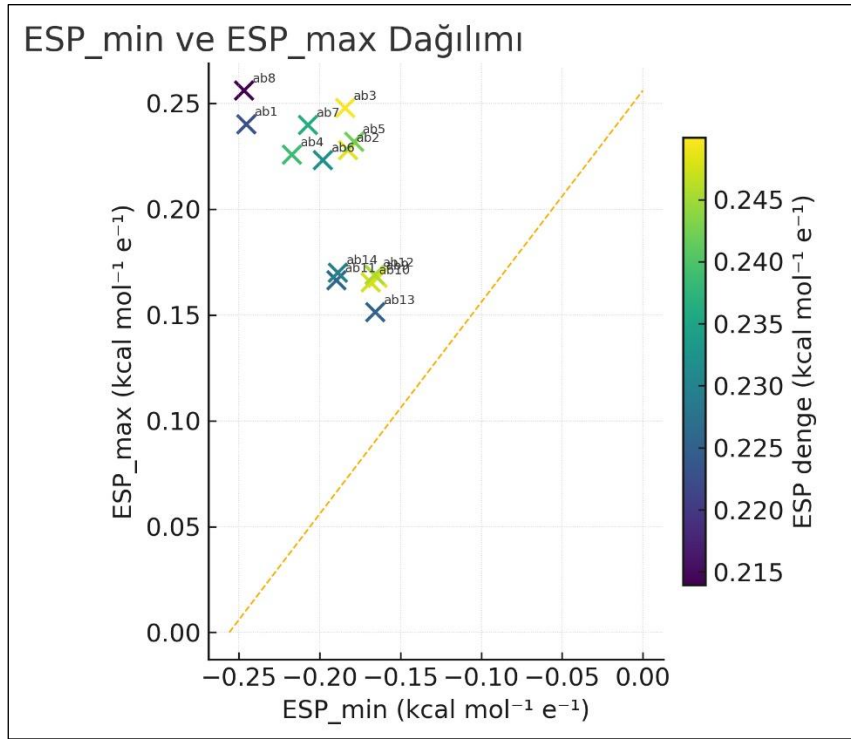
Elektrostatik potansiyel denge değerleri Şekil 4.76’de incelendiğinde denge değerinin 14 bileşikte yalnızca $0.214 - 0.250 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ e}^{-1}$ aralığında değiştiğini (toplam yayılma $\approx 0.036 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ e}^{-1}$; $\approx \%17$ görelî fark) göstermektedir. Serinin en “dengesiz” üyesi ab8 ($0.214 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ e}^{-1}$) pozitif–negatif yüzey potansiyelleri arasında en yüksek net ayrımı sergilerken, ab3 ($0.250 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ e}^{-1}$) en dengeli elektrostatik profile sahip olduğunu sayısal olarak da göstermektedir. Bu dar fakat sistematik yayılma, çekirdek iskeletin elektronik homojenliğini korurken uç gruplardaki klor atomlarının yüzey kutuplaşmasını ince bir “ayar düğmesi” gibi modüle ettiğini işaret eder. Serinin elektrostatik bakımdan en dengesiz ikinci bileşiğinin ab1 olması, elektrostatik dengenin karbamat gruna bağlı fenil halkasında sübstitüsyon bulunmaması ile doğrudan ilişkili olduğunu ve karbonil oksijeninin elektrostatik potansiyelinin bu bölgedeki sübstitüsyon ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.76. Elektrostatik denge değerlerinin bileşiklere göre dağılımı

Elektrostatik potansiyel değerlerinin Şekil 4.93'te gösterilen dağılımda yan zincir uzunluğuna göre yine kümelenme bulunmaktadır (ab8 hariç). Elektrostatik potansiyelin en yüksek olduğu bileşikler ab1-7 bileşikler (ve ab8) iken zincir uzunluğu fazla olan ab8-14 grubu saçılım grafiğinde ESP_{maks} ve ESP_{min} eksenlerinin orta konumunda yer almaktadır. Bu ab serisi kendi içinde değerlendirildiğinde ab1-7 grubunun elektrostatik potansiyelin en fazla ve en düşük olduğu durumlarda aşırı ucu temsil ettiğini, ab8-14 grubunun ise dengeli olarak kümelendiğini gösterir. Ayrıca $ESP_{min} - ESP_{maks}$ saçılım grafiği, bileşiklerin yüzeyinde oluşan pozitif-negatif potansiyel penceresinin büyüklüğünün oldukça iyi tanımlı bir doğrusal trend izlediğini ortaya koymaktadır (Pearson $r \approx 0.8$). Yani negatif alan derinleştikçe ($ESP_{min} -0.25 \rightarrow -0.15$ kcal mol⁻¹ e⁻¹ arası) karşılık gelen pozitif alan da simetrik olarak güçlenmekte ($ESP_{maks} 0.15 \rightarrow 0.26$ kcal mol⁻¹ e⁻¹); bu, yük dağılımının fonksiyonel gruplar tarafından “eş yönlü” stabilize edildiğini ve çekirdek iskeletin elektrostatik asimetrisinin sınırlı kaldığını gösterir. ΔE_{gap} 'in renk ölçeğiyle birlikte incelendiği Şekil 4.77'de, en geniş orbital boşluğa sahip bileşiklerin > 8.65 eV; sarı-turuncu tonlarla ab3 ve ab7 olduğu, aynı zamanda en yüksek ESP_{maks} değerlerini sunduğu, buna karşılık nispeten dar bant aralıklı bileşiklerin < 8.45 eV; mor-lacivert, ab8, ab1 -ki bu bileşikler aynı zamanda elektrostatik bakımdan en denge bileşiklerdir- negatif potansiyel ceplerini derinleştirerek yük dengesini koruduğu görülmüştür. Bu karşılıklı telafi, elektrostatik pencereyi genişletirken sınır orbital

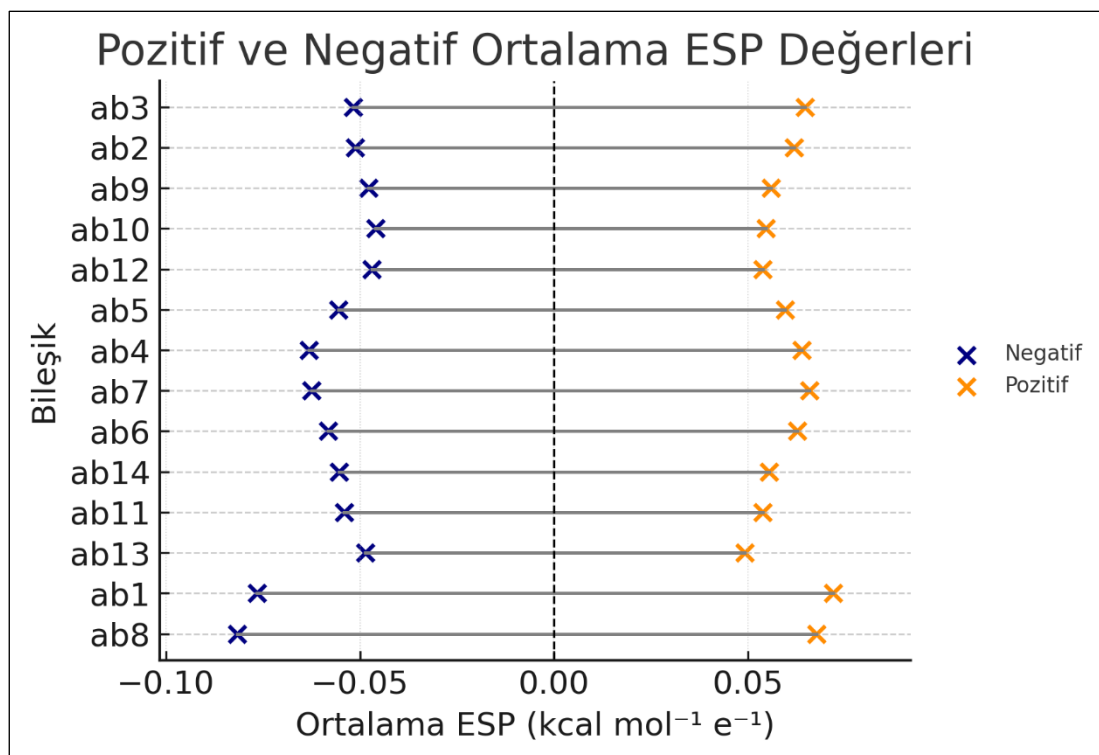
kararlılığını da artıran çift yönlü ayar kolu olarak klor atomunun fenil halkasında konumunun işlevsel olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.77. Elektrostatik potansiyelin en yüksek ve en düşük değerleri denge değeri ile birlikte saçılım grafiği

Elektrostatik potansiyel değerlerinin negatif ve pozitif oluşu değerlere daha yakından bakmamızı sağlayan Şekil 4.78’de görüldüğü gibi her bileşik için ortalama pozitif (turuncu) ve negatif (lacivert) elektrostatik potansiyelleri tek eksen üzerinde karşı karşıya getirerek yüzeydeki yük yoğunluğu dağılımının doğrudan kıyaslanabilmesidir. Çubuk uzunluklarının dar bir aralıkta (yaklaşık 0.10–0.17 kcal mol⁻¹ e⁻¹) yoğunlaştığı görülmesi, bu konjugasyon iskeletinin polariteyi belirli bir tonda ve aralıkta “kilitlerken” klor gruplarının konumlarının yalnızca ince ayar yaptığına işaret eder. En geniş ayrımı sergileyen ab8 ($|\langle \text{ESP}^+ \rangle - \langle \text{ESP}^- \rangle| \approx 0.17$) yüzeyinde belirgin bir p–n kutuplaşması oluştururken, ab3’te bu mesafe ~0.10 kcal mol⁻¹ e⁻¹’ye düşer; böylece ligand–hedef etkileşimlerinde elektrostatik “tutunma noktası” sunma kapasitesi uçtan uca %40 oranında değiştirilebilmektedir. Bu bileşiklerin sahip olduğu dar sınır değerleri ve birbirine benzer özelliklerine rağmen biyolojik süreçlerde birbirinden çok daha farklı seviyelerde etki göstermeleri anlamına gelir. Grafikteki yatay yerleşim, negatif yüklerin her zaman pozitiflerden daha şiddetli (solda) olduğunu göstererek potansiyel manzaranın asimetrik ama orantılı kaldığını vurgular; bu da redoks veya iyonik

bağlanma süreçlerinde yük transferinin öncelikle negatif cepler üzerinden yönlendirileceğini düşündürür. Klor sübstitüsyonu içermeyen sadece yan zincir uzunluğu birbirinden farklı olan ab1 ve ab8 bileşiklerinin diğer bileşiklerden ayrıştığı grafikte gözlenmektedir. Klor sübstitüsyonun olduğu diğer bileşiklerde ise klor atomun konumu yüzey negatif ve pozitif değerleri üzerinde doğrudan etkilidir ve korelasyon halinde olduğu açıktır.



Şekil 4.78. ab1-14 Bileşiklerinin pozitif ve negatif ortalama elektrostatik potansiyel değerinin karşılaştırılması

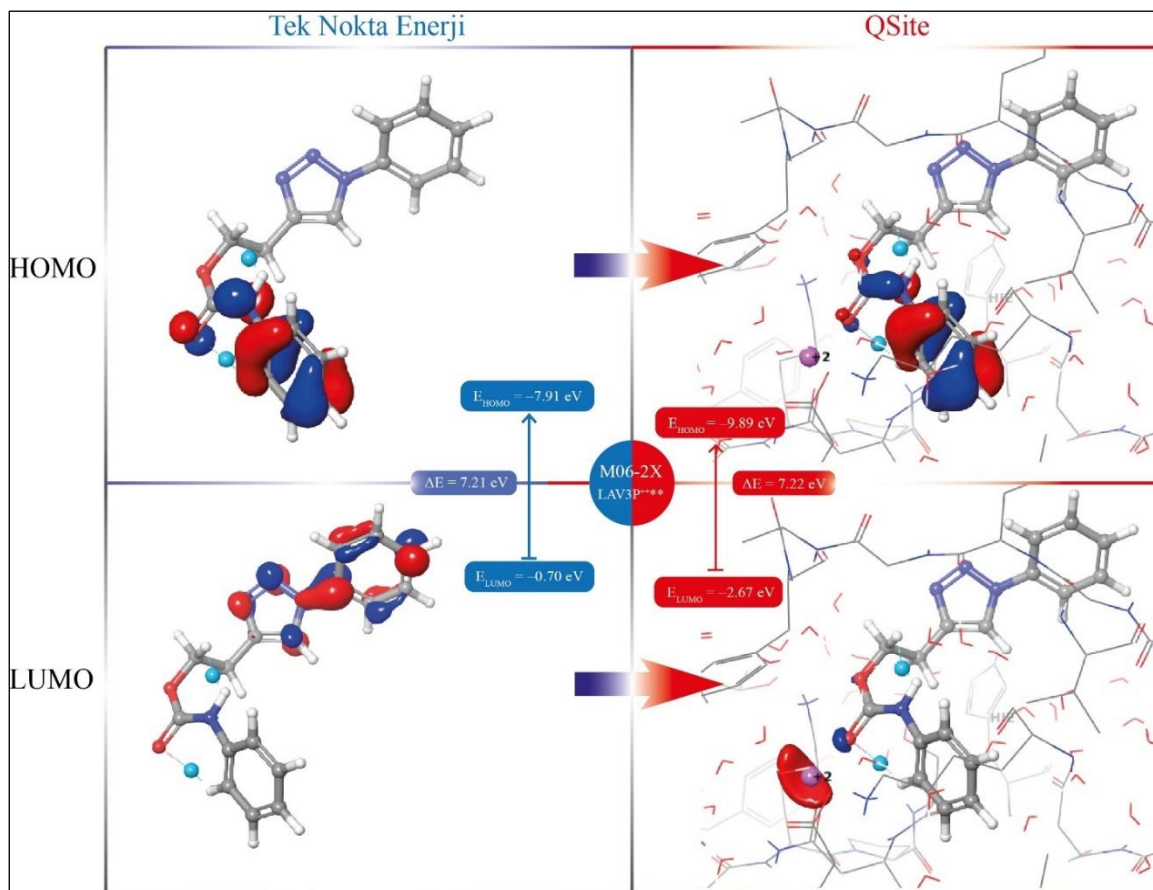
4.3.2. QM/MM moleküler kenetlenme

ab1-14 Bileşiklerinin tamamı *fusarium oxysporum* organizmasından Fmk1 proteinin makine öğrenimi ve derin öğrenme yöntemleri ile oluşturulmuş yapısına, bileşiklerin en kararlı 50 konformasyonu kullanarak hem protein yapı hem de ligandlar esnek olarak ele alınarak kenetlendi. Bileşiklerin en kararlı konformasyonlarının taramasında her bir bileşik için en düşük enerjili kompleks QM/MM hibrit algoritma kullanılarak yeniden modellendi. Bu değerlendirme sonucunda bileşiklerin protein yapıdaki komplekslerinin kararlılığı, protein yapıdaki sınır orbitallerinin enerjileri ile birlikte değerlendirilirken bileşiklerin protein yapı içerisindeki konformasyonlarının her biri proteinden bağımsız tek nokta enerji hesaplaması ile kuantum mekaniği kullanılarak kenetlenmenin elektron konfigürasyonu üzerindeki etkisi

analiz edildi. Bu değişimin analizi ise klasik fizik tabanlı bağlanma enerjisi verilerinin okunmasından çok daha etkili ve gerçek etkileşim sürekliliği konusunda önemli bilgiler veren içgörüler sağladı.

ab1 bileşiminin QM/MM kenetlenme çalışmasıyla elde edilen orbital değişimi Şekil 4.79'deki gibi spesifik farklar içeriyordu. Bu farkların başında Fmk1 protein yapısının varlığında LUMO enerji seviyelerindeki marjinal değişimdi. Kuantum mekaniği çerçevesinde Mg^{2+} ve ligandlar eş merkezler etrafında korelesyon gösteren elektron dağılımı ile LUMO enerji seviyesi elektron boşluğu olan Mg^{2+} üzerine toplanmıştır. HOMO orbitallerinde göreceli olarak net bir farkın olmaması ab1 bileşiminin karbamat grubu tarafının elektronik özelliklerini koruma eğiliminde olduğunu göstermektedir. $\Delta E_{\text{boşluk}}$ değerinde görülen değerin neredeyse hiç değişmemesi ise bileşimi bu bu protein yapıya bağlandığı konformasyonda elektron alma-verme eğiliminde net bir değişim olmadığını göstermektedir. HOMO ve LUMO enerjilerindeki düşüşte enerji farkının değişmemesi yani $\Delta E_{\text{boşluk}}$ değerinde bir değişim olmaması bileşikteki “sertlik” seviyesinin korunarak daha elektronegatif, oksidasyona dirençli ve indirgenmeye istekli hâle gelmesini sağlayarak protein-ligand etkileşimlerinde sürekliliği sağlayarak Fmk1 proteinin aktif bölgesinin sürekli işgaline zemin hazırlar.

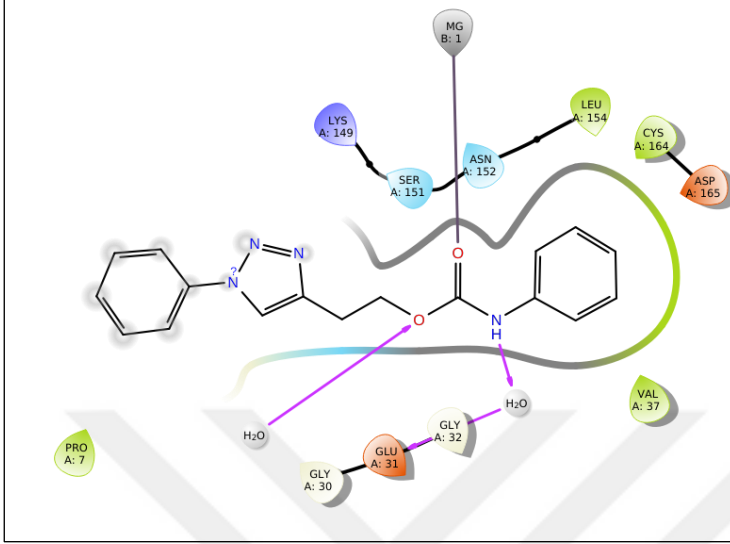
ab1 için en kararlı konformasyonun belirlendiği DFT çalışmasında elde edilen $\Delta E_{\text{boşluk}}$ değerinin QM/MM kenetlenme çalışmasında daha düşük olduğu bileşimin bu konformasyonda ve protein yapı içerisinde elektronik çerçevesinde yüksek seviyeli bir değişim ile “yumuşadığını” yani reaktivite yeteneğinin arttığını gösterir. Bu de protein yapı ile etkileşim sürekliliği hakkında fikir verirken Mg^{2+} atomu ile olan etkileşiminin zamanla artabileceğini gösterir. En kararlı konformasyondaki HOMO ve LUMO enerji seviyelerinin protein-ligand etkileşimi ile düşmesi de bileşimin reaktivitesinin arttığına işaret eder. $\Delta E_{\text{boşluk}}$ değerinin en kararlı konformasyonda çok daha yüksek olması da bileşimin bu konformasyonda ve protein yapı içerisinde tepkime yatkınlığının arttığını gösterir.



Şekil 4.79. ab1 Bileşiğinin Fmk1 proteinine moleküler kenetlenme çalışmasında değişen elektron konfigürasyonu

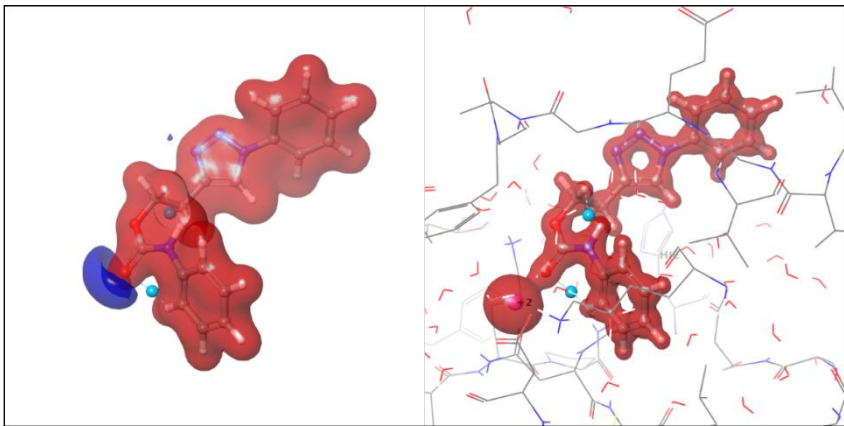
ab1 Bileşiğinin etkileşimleri amino asit kalıntıları üzerindeki etkileri ile değerlendirildiğinde Şekil 4.80’da Fmk1 protein yapısının aktif bölge kalıntıları içerisinde dipol-dipol etkileşimleri kaynaklı hidrofobik etkileşimlerin ağırlıklı olduğu tespit edildi. Mg^{2+} atomu ile en kararlı konformasyonun DFT çalışmasında elektrostatik potansiyeli üzerinde toplayan karbamat grubundaki karbonilin koordinasyon oluşturduğu tespit edildi. Bunun dışında karbamat fonksiyonel grubu çevresindeki çözücü su molekülleri ile hidrojen bağları yaparak bölgedeki kararlılığı yerleşimine dair önemli bilgiler sağladı. Bileşiğin elektron delokalizasyonunun ve konjugasyonun yoğun olarak bulunduğu 1, 2, 3-triazol kısmı ise aktif bölge yarığından dışarı doğru bakarak çözücü etkileşimine açık haldedir. 1, 2, 3-triazol ve ona bağlı fenil halkasının bölgesel olarak apolar bir yapı oluşturması karbamat grubu protein yapı ile doğrudan etkileşirken aktif bölge yarığının girişini kapatarak sahip olduğunu inert yapı ile ab1’i Mg^{2+} üzerine doğru yönlendirmiş görülmektedir. 1, 2, 3-Triazol ve ona bağlı fenil grubunun çevredeki su molekülleri ile etkileşim olanağının bölgesel apolar yapısı ile mümkün olmaması (triazoldeki üçüncü azot buna müsair olsada bağlanma şeklinin bunu

engellediği açıktır) çözücü etkileşiminden kaçış olarak sonuçlanması ile etkileşim kuvvetinin artması kaçınılmazdır.



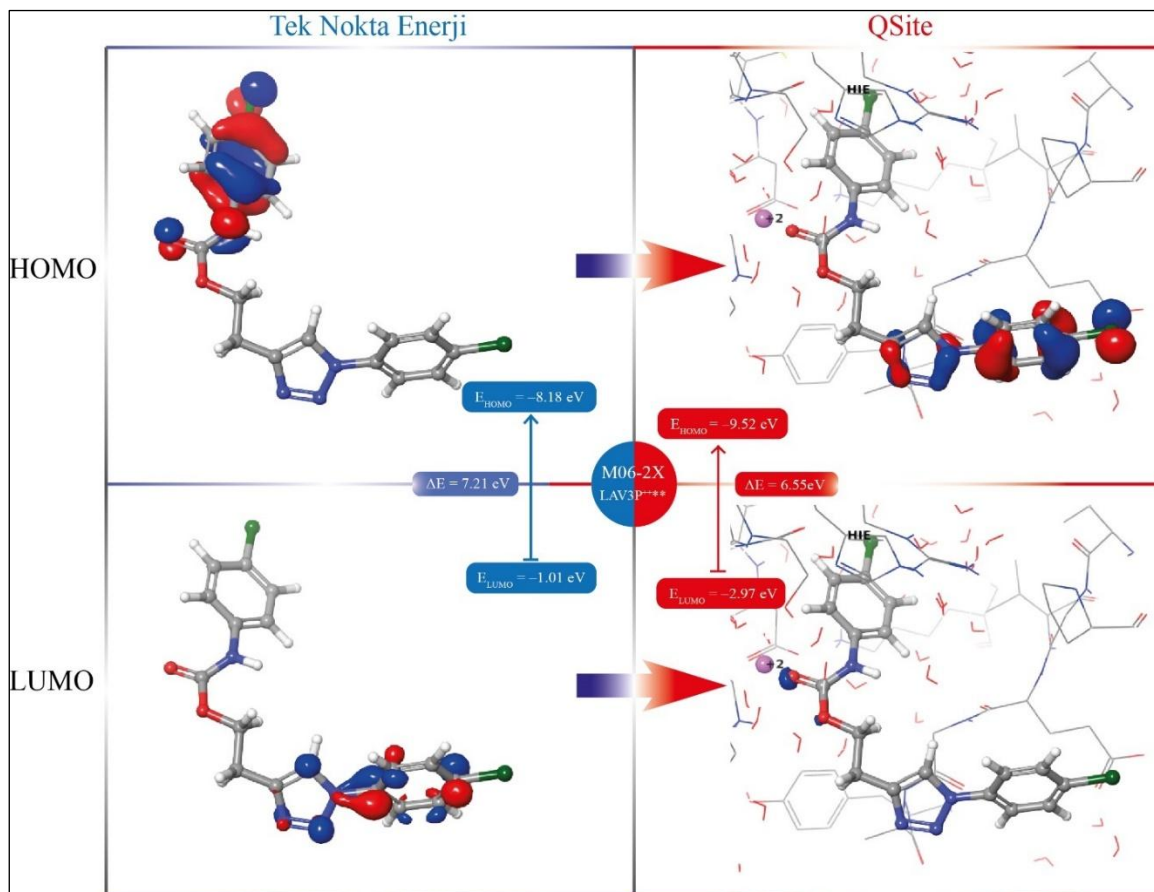
Şekil 4.80. ab1 Bileşiğinin Fmk1 proteini aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü

ab1 Bileşiğinin elektrostatik potansiyelindeki değişim ise Şekil 4.81’de görüldüğü gibi marjinaldir. Burada tüm negatif yüklerin Mg^{2+} ’daki elektron boşlukluklarına hücum ederek bileşiğin geneline yayılan yük dağılımını tamamen değiştirmiş ve M^{2+} ’yı da içerisine alarak etkileşim kabiliyetini arttırmıştır. Tek nokta enerji hesaplamasındaki elektrostatik potansiyel dağılımı ana hatları ile en kararlı konformasyona benzerken protein yapıda metal koordinasyonu sonucu marjinal bir değişim söz konusudur.



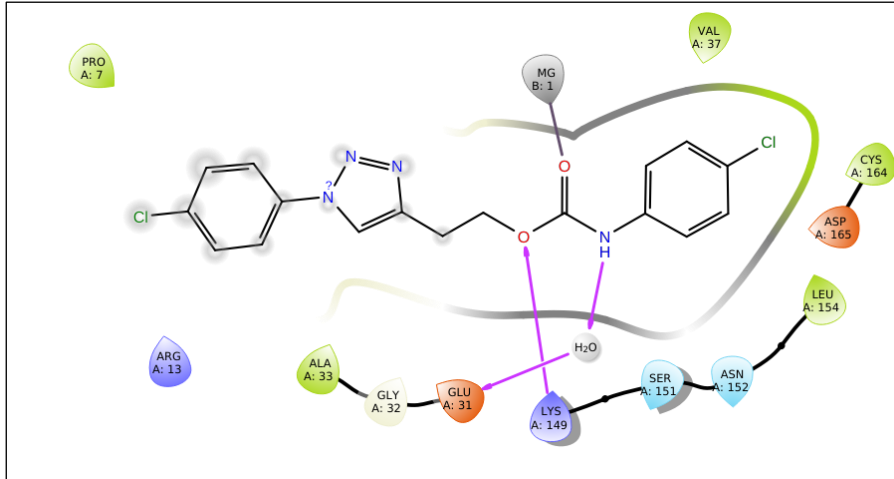
Şekil 4.81. Aynı konformasyonlarda ab1 bileşiğinin QSite (sağda) ve tek nokta enerji hesabı (solda) ile belirlenen elektrostatik potansiyel haritası

ab2 bileşiği protein yapı içerisinde ve aynı konformasyonun tek nokta enerjisi hesabında diğer bileşiklerle benzer değerler sergilemektedir. ab2 bileşiğinde de etkileşimlerin LUMO orbitali elektron konfigürasyonunda marjinal değişimler yarattığı Şekil 4.82’de görüldüğü gibi oldukça nettir. Ancak bu bileşikte LUMO sınır orbitallerinin konumları ve büyüklüğü net şekilde birbirinden farklı olarak $\Delta E_{\text{boşluk}}$ değerlerinde daha dar bir perspektif çizerek daha güçlü bir etkileşim göstermiştir.



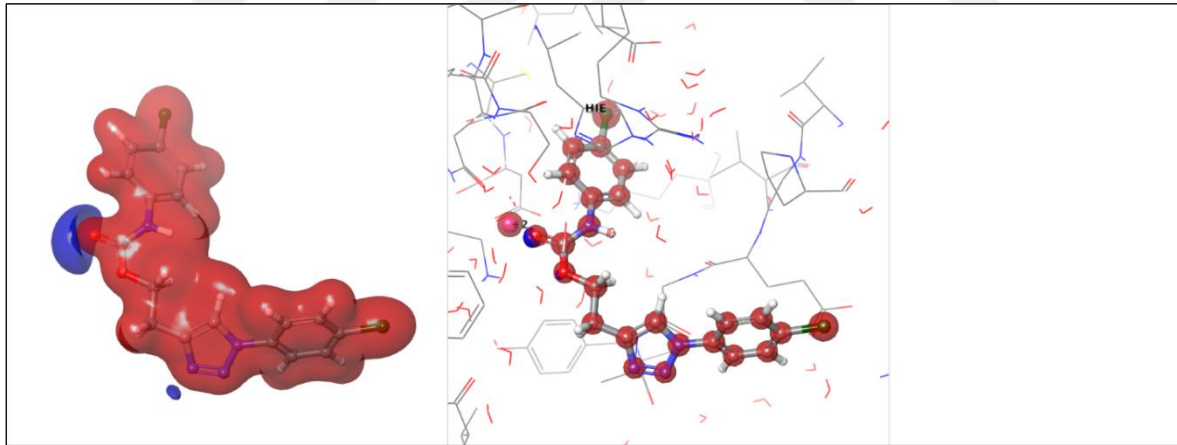
Şekil 4.82. ab2 Bileşiğinin Fmk1 proteinine moleküler kenetlenme çalışmasında değişen elektron konfigürasyonu

ab2 bileşiğinin Şekil 4.83’da görülen iki boyutlu etkileşim haritasında metal koordinasyonu beklendiği gibi karbamat karbonilinden gerçekleşirken bileşiğin pozisyonu standart bir yerleşim göstererek ab1 bileşiği ile iskelet yapısı bakımından aynıdır. Tek fark Fmk1 protein yapısının işlevini yerine getirmesinde önemli bir kalıntı olan ve Mg^{2+} atomu ile de koordinasyon halinde olan Lys149 ile hidrojen bağı etkileşiminin fazladan stabilite ve bölgede kalıcılık sağlama potansiyeli arttırmasıdır.



Şekil 4.83. ab2 bileşiğinin Fmk1 proteini aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü

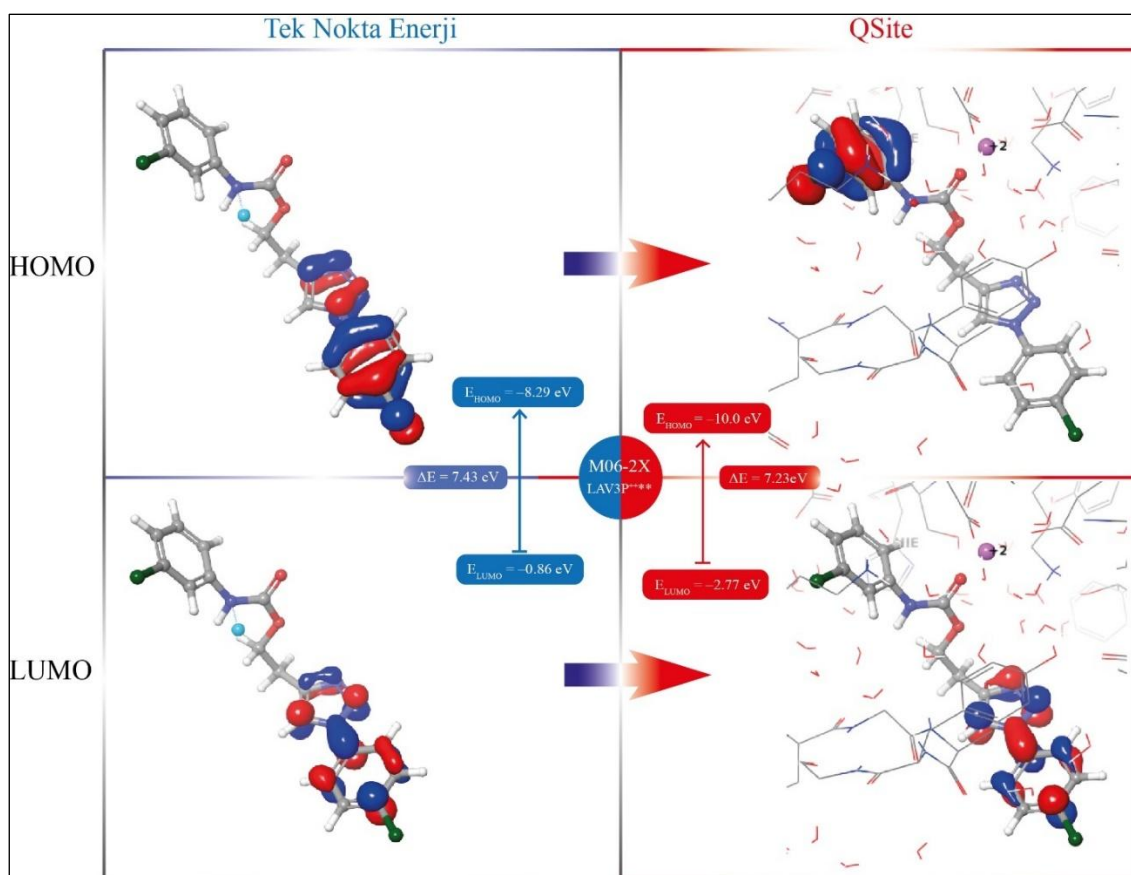
ab2 bileşiğinin elektrostatik potansiyel haritasındaki değişim ise çok daha marjinaldir ve bileşiğin elektrostatik potansiyeli çok büyük oranda boşalarak protein yapı ile etkileşimlere katkı sağlamış görülmektedir. Şekil 4.84'te görüleceği gibi bileşikteki atomlar arasındaki bağlarda elektrostatik potansiyel tamamen yok olmuştur.



Şekil 4.84. Aynı konformasyonlarda ab2 bileşiğinin QSite(sağda) ve tek nokta enerji hesabı(solda) ile belirlenen elektrostatik potansiyel haritası

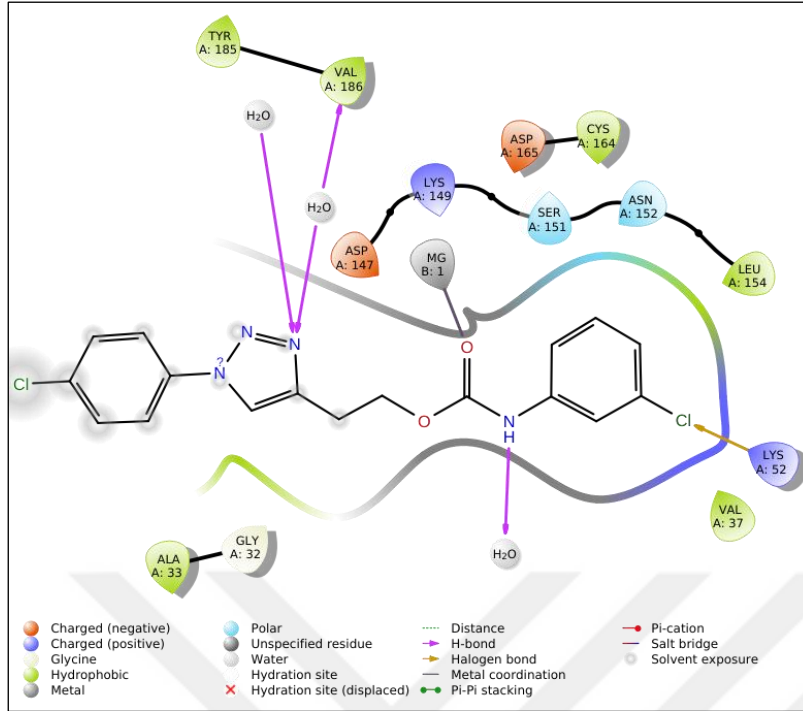
ab3 bileşiğinde Şekil 4.85'te görüldüğü gibi elektron konfigürasyonu HOMO sınır orbitallerindeki marjinal değişimlerle gerçekleştiği görünmektedir. Bunun sebebi karbamat grubuna bağlı fenil halkasında klor atomunun meta- konumda bulunarak klor atomunun elektron çekici etkisinin bağlanma profilinde ince ayar yapmasıdır. Karbonil grubundan gerçekleşen metal koordinasyonu etkileşimi bu klor atomunun pozisyonu klora göre orto ve para karbonda elektron yoğunluğunu arttırmasıdır. Bu nedenle meta- konumdan bağlı

karbamat grubunda metal koordinasyonun etkisi sınırlı kalmıştır. Bu etki sınırlaması protein içerisinde ve dışında $\Delta E_{\text{boşluk}}$ değerinde sınırlı fark göstererek ligandın etkisinin sınırlı kalmasına da neden olmuştur. LUMO sınır orbitallerinde enerjileri değişsede bileşik üzerindeki konumlarının sınırlı değişimi protein ligand etkileşiminin de sınırlı kaldığını göstermiştir.



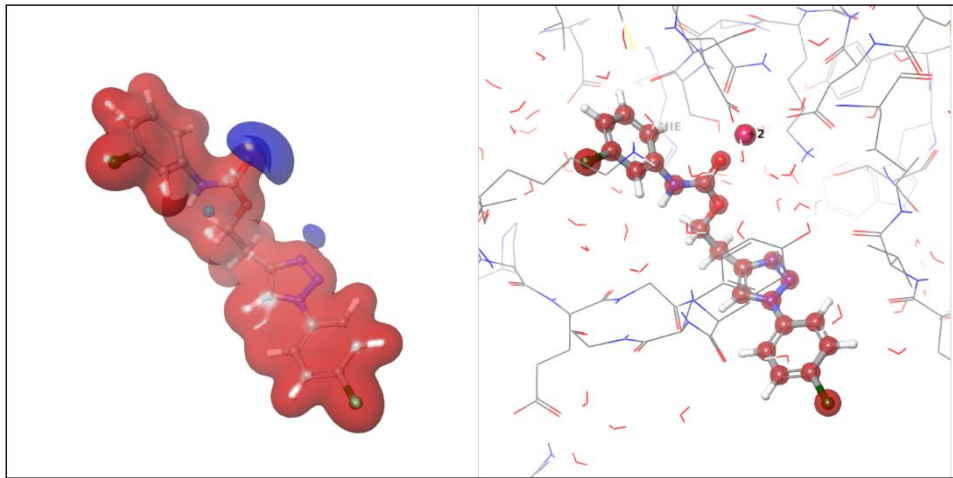
Şekil 4.85. ab3 bileşiğinin Fmk1 proteinine moleküler kenetlenme çalışmasında değişen elektron konfigürasyonu

ab3 Bileşiğinin Fmk1 proteinin aktif bölge yarığındaki yerleşimi diğer bileşik pozları ile büyük oranda aynıdır ancak Şekil 4.86'de görülebileceği gibi 1, 2, 3-triazol halkasının üçüncü azotu su molekülleri ile hidrojen bağı yapmaktadır. Bu etkileşim bileşiğin aktif bölge yarığındaki Mg^{2+} ile olan uzaklığını olumsuz etkileyerek bileşiği aktif bölge yarığında dışarı itme eğiliminin ortaya çıkardığı ve elektronik yapıdaki istenmeyen değişimlerin etkisini açıklamaktadır. Lys52 kritik kalıntısı ile halojen bağı etkileşiminin kurulması etkileşim bakımından bileşiğin konumunu desteklese de bu karbamat grubunun dar bir ağza sıkışması hidrofobik etkileşimler yönünden bileşiğin etkisini sönmülmektedir.



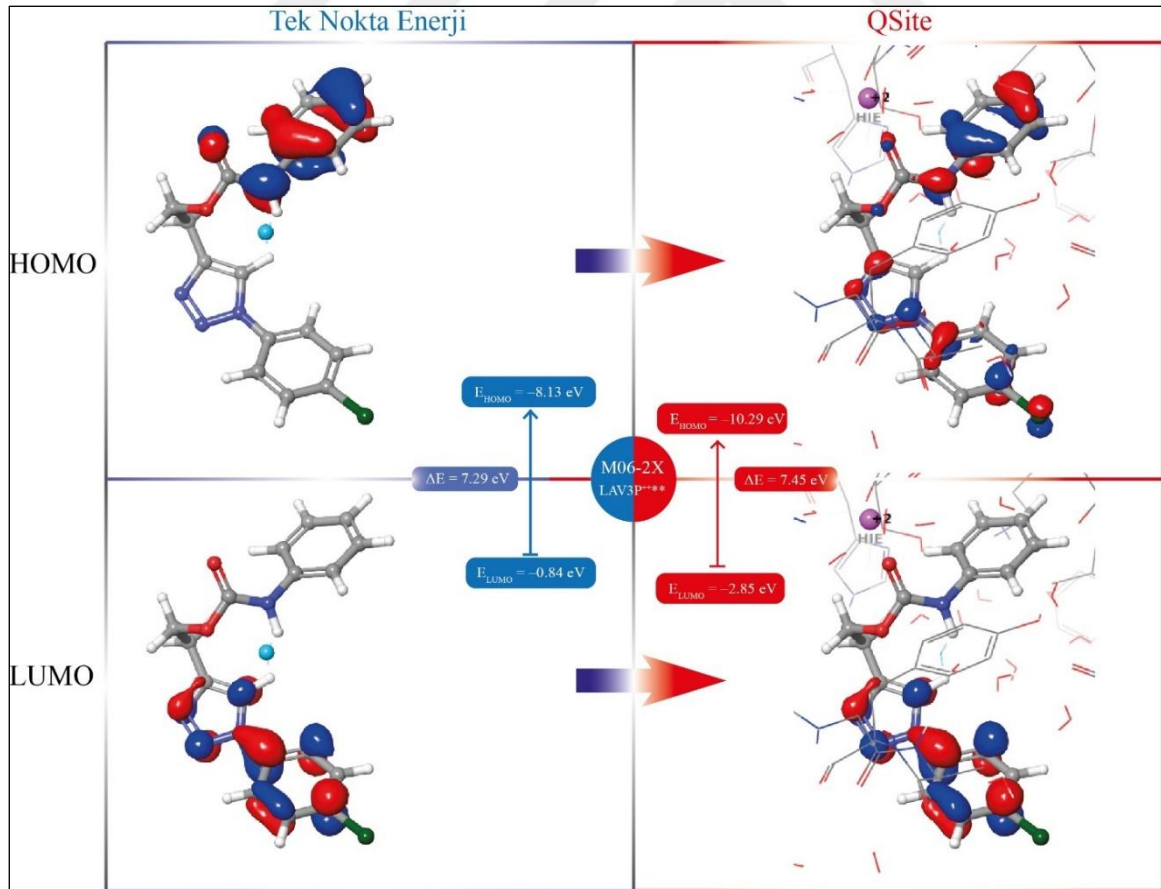
Şekil 4.86. ab3 bileşiğinin Fmk1 proteini aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü

Bileşiğin Şekil 4.87’de görülen elektrostatik potansiyelin bileşik üzerindeki dağılımına bakıldığında klor atomlarının elektron çekici etkisi ile Mg^{2+} ’daki elektrostatik potansiyelin aktarımı yerine kendi üzerine topladığı görülmektedir. Atomlar arasındaki bağlar üzerinde kaybolan elektrostatik potansiyelin Mg^{2+} ve klor atomları üzerinde dağıldığı olarak bileşiğin etkileşiminin diğer bileşiklere göre daha az olmasına neden olmuş olabilir.



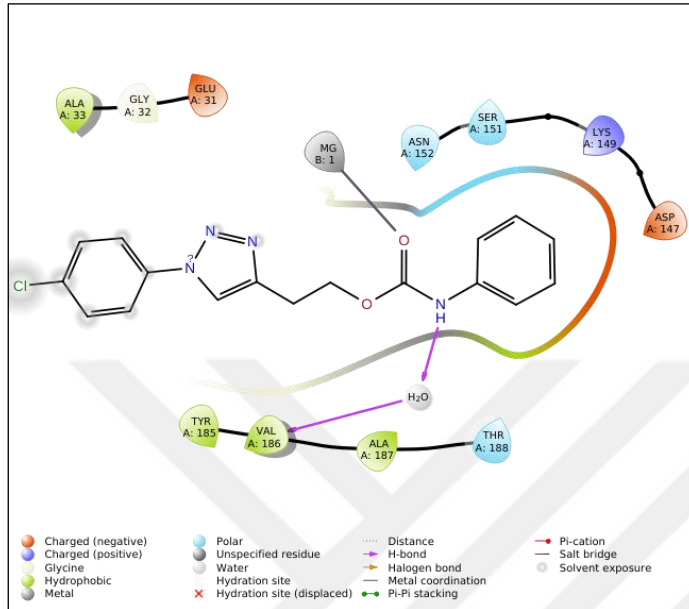
Şekil 4.87. Aynı konformasyonlarda ab3 bileşiğinin QSite(sağda) ve tek nokta enerji hesabı(solda) ile belirlenen elektrostatik potansiyel haritası

ab4 bileşiği hem enerji seviyeleri arasında fark hem de sınır orbitallerinin yayılımı bakımından protein içerisinde ve dışında açık bir değişim göstermemesinden dolayı zayıf bir etkileşim sergilediği Şekil 4.88’de açıktır. Bu durum ab1-14 serisinin genelleşmiş bileşik yerleşiminde karbamat grubunun elektron yoğunluğunun 1, 2, 3-triazol tarafındaki fenile para- konumundan bağlı olan klor atomu ile yakından ilgilidir. Karbamat karbonilinin Mg^{2+} ile olan etkileşiminin bu bölgedeki elektron yoğunluğunu diğer taraftaki klor atomunun elektron çekici etkisinden dolayı değiştirememesi sonucu elektron konfigürasyonu denge halinde değişmeden kalmıştır. Yani bileşiğin diğer tarafından talep edilen elektronlar karbonil ve metal atomu ilişkisi tarafından kesintiye uğratarak etkileşimin sınırlı kalmasına neden olmuştur. ab4 bileşiği şuana kadar ki diğer bileşiklerin aksine sınırlı değişen elektron konfigürasyonunun yanında aynı konformasyondaki tek nokta enerji ve protein yapıda $\Delta E_{boşluk}$ değerindeki farkın “sertlik” yönünde artması ile reaktivitesinde yüksek bir düşüş bileşiğin düşük bir afinite ile protein yapı içerisinde konumlanmasına neden olmuş görünmektedir.



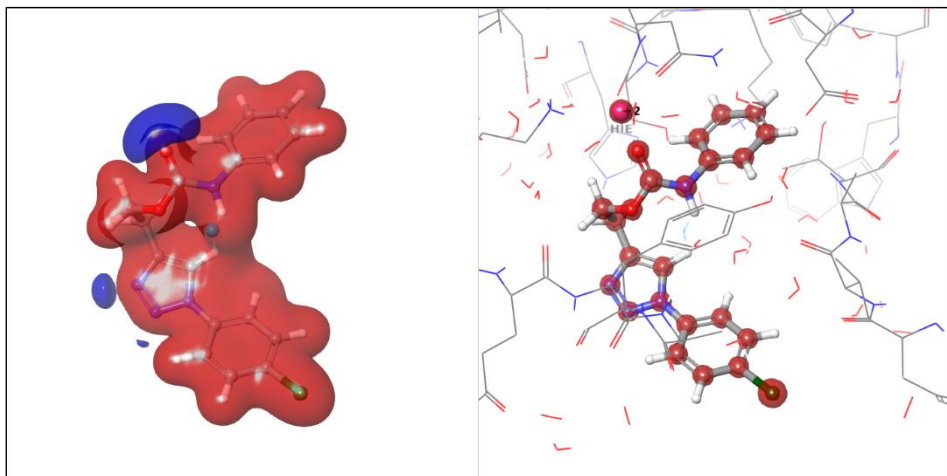
Şekil 4.88. ab4 bileşiğinin Fmk1 proteinine moleküler kenetlenme çalışmasında değişen elektron konfigürasyonu

ab4 bileşiğinin Şekil 4.89’de görülen aktif bölge yarığına yerleşimi 1, 2, 3-triazol grubunun olduğu taraftaki aşırı çözücü etkileşimi zayıf etkileşim ve Mg^{2+} atomundan uzağa sürüklenme potansiyeli net bir şekilde göstermektedir.



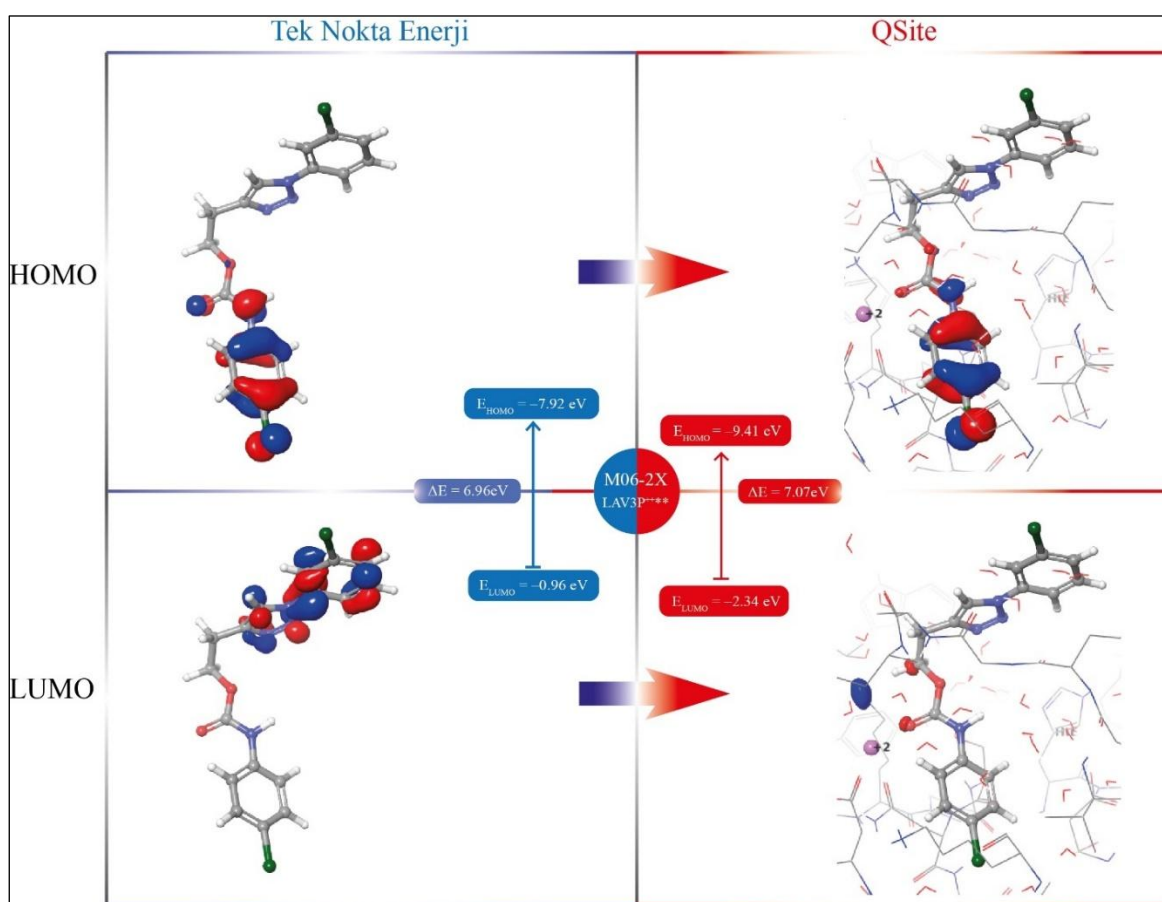
Şekil 4.89. ab4 bileşiğinin Fmk1 proteini aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü

Elektrostatik potansiyel haritası gösterdiği marjinal değişimle Şekil 4.90’da görülmektedir ancak yük dağılımı ab3’tekinе benzer şekilde karbamat tarafındaki aromatik halkadan akan elektronların kesilmesi 1, 2, 3-triazol halkasına bağlı fenil grubunda klorun elektron çekici etkisi ve orto- para- için zayıf yöntendirici etkisi söz konusudur.



Şekil 4.90. Aynı konformasyonlarda ab4 bileşiğinin QSite(sağda) ve tek nokta enerji hesabı(solda) ile belirlenen elektrostatik potansiyel haritası

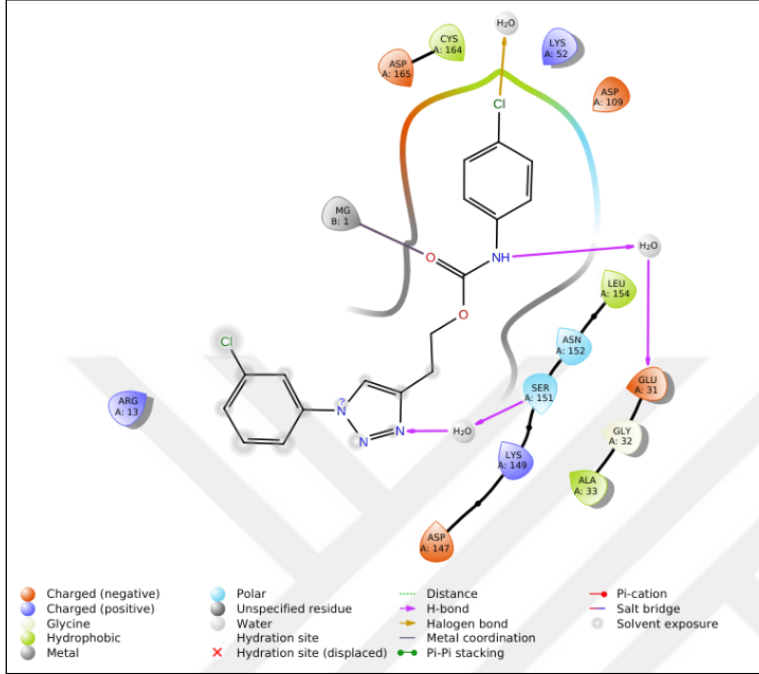
ab5 bileşiği, ab1 bileşiğine benzer değerler göstermiştir ancak ab1'den daha az afiniteye sahip olduğu LUMO sınır orbitallerinin Şekil 4.91'de görülen yapılarından açıkça bellidir. HOMO orbitallerindeki sınırlı değişime nazaran LUMO orbitallerindeki marjinal değişim Mg^{2+} metal koordinasyonunu güçlendirmiştir. Bu durumda karbamat grubuna bağlı fenil halkasındaki klor atomunun elektron çekici etkisinin ve zayıf orto- para- yöntedirme etkisinin tam karşı grubtaki 1, 2, 3-triazol grubuna bağlı fenil halkasında para- konumda bulunan klor atomunun molekül merkezini oluşturan karbamat karbonilinde sinerjik bir etki ile afinite artışına neden olduğu düşünülebilir.



Şekil 4.91. ab5 bileşiğinin Fmk1 proteinine moleküler kenetlenme çalışmasında değişen elektron konfigürasyonu

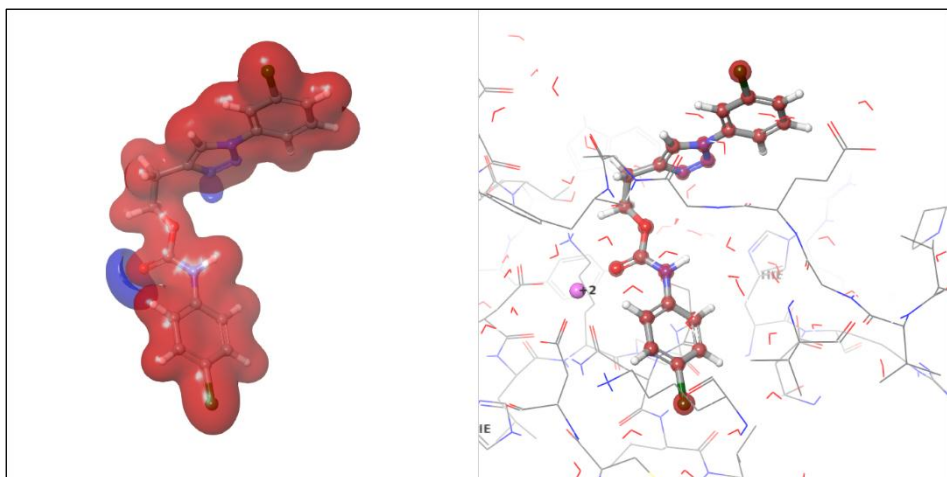
ab5 bileşiğinin Fmk1 protein aktif bölge yarığı içerisindeki konumlanması da şimdiye kadar anlatılan diğer bileşiklerden farklı olarak 1, 2, 3-triazol grubunun Mg^{2+} 'ın tam tersi bir yöne bakacak şekilde hafif bir eğri çizerek şekilde konumlandığı tespit edilmiştir. Konumlanmanın molekül iskeletindeki açısı ve klor atomunun 1, 2, 3-triazol'e göre meta-konumlanması avantaj sağlamış görünmektedir. Fenil halkasında meta- konumlanan klor

atomu bir “kanca” gibi protein yapıyı hafifçe tutar pozisyonundadır. Karbamat grubunun ve ona bağlı aromatik halkanın geniş bir aralıkta pozisyonlanması bileşiğin güçlü fiziksel-mekanik özelliklerle tutunmasını sağlamıştır.



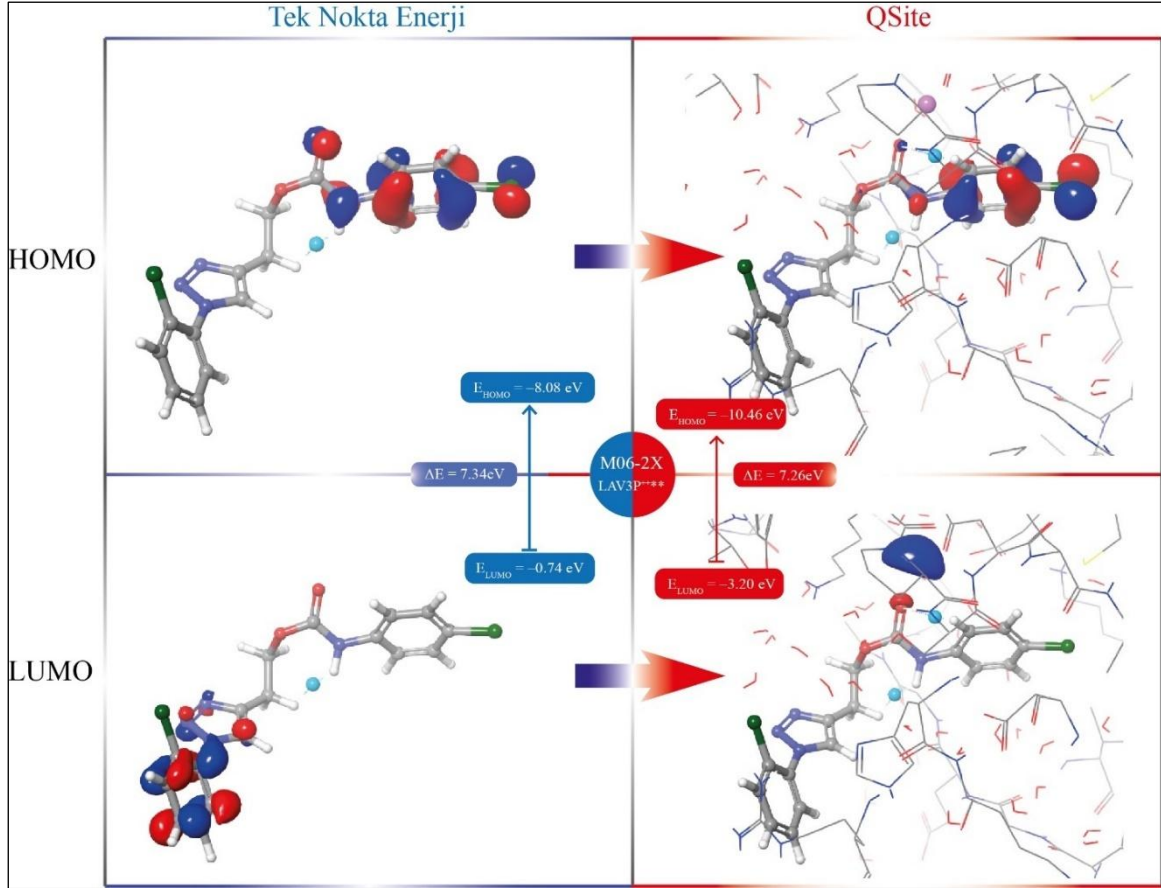
Şekil 4.92. ab5 bileşiğinin Fmk1 proteini aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü

ab5 bileşiğinin elektrostatik potansiyeli de protein yapı içerisinde marjinal bir değişim geçirmiştir. Şekil 4.93’te protein yapının içerisindeki ab5 bileşiğinin atomları üzerindeki neredeyse hiç elektrostatik potansiyel kalmamıştır ve klor atomları üzerinde toplanma diğer benzer özellikteki bileşiklerden çok daha küçük boyutludur. Alifatik zincir üzerindeki atomlar ve karbamat grubu üzerinde ise elektrostatik potansiyelin neredeyse tamamen kaybolduğu görülmektedir. Bunun nedeninin, metal koordinasyonu sağlayan fenil halkalarındaki klor atomu konumlanmasındaki sinerjik etki olarak değerlendirilmiştir.



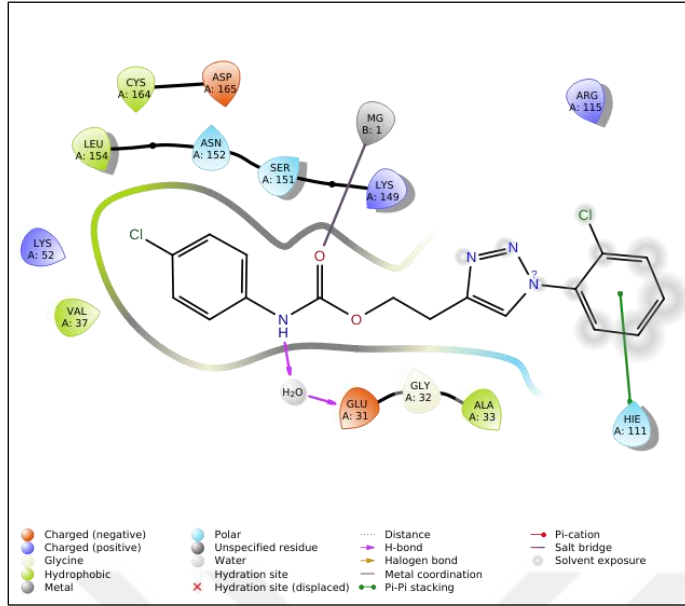
Şekil 4.93. Aynı konformasyonlarda ab5 bileşiğinin QSite(sağda) ve tek nokta enerji hesabı(solda) ile belirlenen elektrostatik potansiyel haritası

ab6 bileşiği nitelikleri bakımından ab5 bileşiğine çok benzese de LUMO sınır orbitalleri ile değişen elektronik konfigürasyonunun protein yapıya yayılması yönünden daha üstün özelliklerde kenetlenme sağlamış görünmektedir. Bileşiğin $\Delta E_{\text{boşluk}}$ değeri tek nokta enerji hesabında ve protein yapı içerisinde Qsite ile elde edilen değerleri bakımından yakındır ancak HOMO ve LUMO sınır orbitallerinin her ikisinde de enerji düşüşü Qsite’da tek nokta enerji hesabında elde edilenden marjinal derecede daha düşüktür. ab6 bileşiğinin bir diğer özelliği tek nokta enerji hesabında karbonil oksijeni üzerinde toplanan iki büyük lobun metal etkileşimi ile yok olmasına rağmen ona bağlı para-klorofenil halkasındaki lobları büyük oranda korumasıdır. Bu değişen elektron konfigürasyonunun bölgesel kaldığını gösterirken LUMO orbitalleri protein yapının içerisindeyken metal atomu çevresinde büyük bir lob ile yerleşmiştir. Tüm bu elektronik özellikler ab6 bileşiğini oldukça iyi bir afinitye sahip etkili bağlanma için uygun sinerjik etkileri üzerinde barındıran bir bileşik olarak göstermektedir.



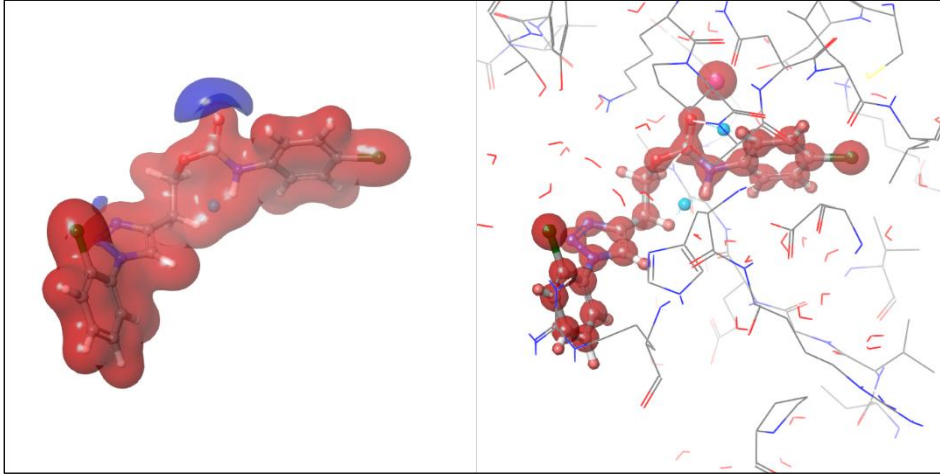
Şekil 4.94. ab6 bileşiğinin Fmk1 proteinine moleküler kenetlenme çalışmasında değişen elektron konfigürasyonu

ab6 bileşiğinin Fmk1 aktif bölge yarığındaki konumlanmasının görüldüğü Şekil 4.95'te bileşiğin diğer bileşikler gibi kenetlendiği, sahip olduğu aynı karbon iskeleti sayesinde olsa da çözücü etkileşiminin olduğu 1, 2, 3-triazol bölgesinde Hie111(His111) kalıntısı ile π - π etkileşimi görülmektedir. Karbamat grubunun olduğu tarafta ise azota bağlı hidrojen su molekülünü köprü olarak kullanarak Glu31 kalıntısı ile hidrojen bağı yapmaktadır. Bu etkileşimin tam karşı tarafında bulunan Mg^{2+} koordinasyonu bileşiğin bu bölgesini protein yapının içine iki yönden gömülü tutmaktadır. Bileşik sahip olduğu bu iki grup tarafından aynı anda kurulan bu etkileşim ile iyi bir afinite sağlamış görünmektedir.



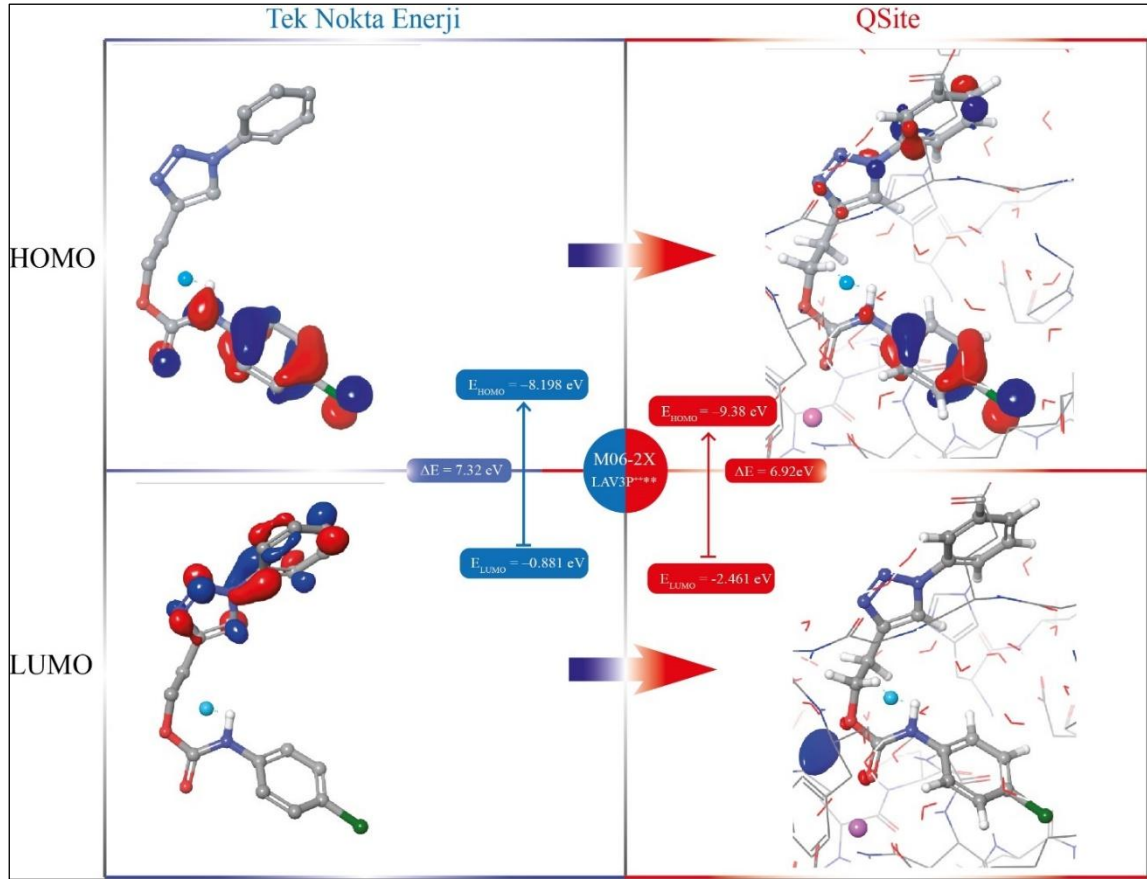
Şekil 4.95. ab6 bileşiğinin Fmk1 proteini aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü

Bileşik ab6'nın Şekil 4.96'de görülen elektrostatik potansiyel dağılımında marjinal bir değişim vardır ve değişim özellikle 1, 2, 3-triazol grubu üzerinde küçülen loblarla görülmektedir. Bu elektrostatik potansiyel aktarımının bu bölgeden ağırlıklı olarak gerçekleştiğine dair güçlü bir kanıttır. Elektrostatik potansiyel dağılımında karbamat karbonili ile Mg^{2+} 'nin etkileşimi karbamat tarafında bulunan para kloro grubunun zayıf etkinlik azaltıcı özelliği ile birleşerek elektrostatik potansiyeli molekülün bu kısmında toplamış görülmektedir. Triazol kısmında 1, 2, 3-triazole bağlı fenil halkasının orto-konumundaki klor atomu yine zayıf etkinlik arttırıcı özelliği ile elektrostatik potansiyelin protein varlığında molekül boyunca değişimini sinerjik olarak arttırmıştır. Çözücü varlığı ile desteklenen elektrostatik potansiyeldeki değişim Mg^{2+} atomu ile koordinasyon yetisini arttırırken bileşiği aktif bölge yarığına sabitlemiştir.



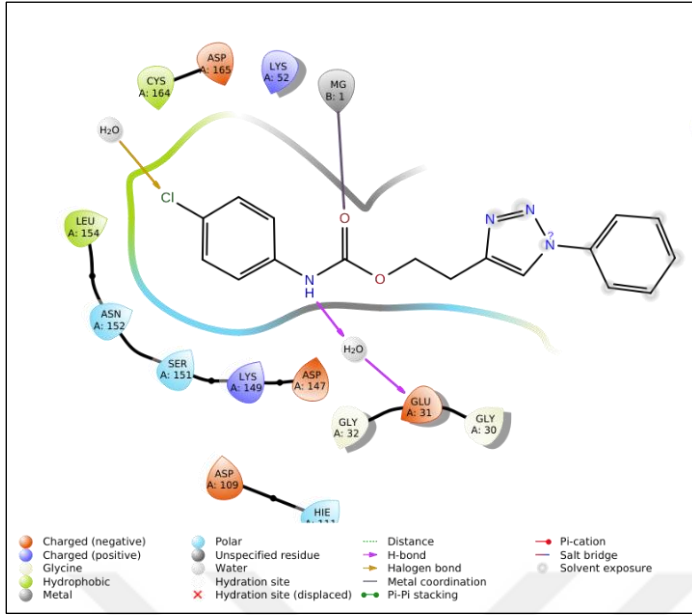
Şekil 4.96. Aynı konformasyonlarda ab6 bileşiğinin QSite(sağda) ve tek nokta enerji hesabı(solda) ile belirlenen elektrostatik potansiyel haritası

ab7 bileşiğinin Şekil 4.97’de görülen sınır orbitallerinde ve sınır orbital enerji değerlerine bakıldığında LUMO enerjisinin protein yapı etkisindeki $\Delta E_{\text{boşluk}}$ değerindeki düşüş bileşiğin protein ile iyi bir etkileşime sahip olduğu göstermektedir. HOMO sınır orbitallerinin karbonil oksijeni üzerindeki değişimi Mg^{2+} ile etkileşimin güçlü olduğunu gösterirken LUMO sınır orbitallerindeki marjinal değişim bileşiğin elektron konfigürasyonun protein-ligand etkileşimleri lehine değiştiğini gösterir. $\Delta E_{\text{boşluk}}$ değeri bileşiğin protein yapı içerisinde “yumuşadığını” gösterirken etkileşimlere daha da açık hale geldiğini gösteren önemli bir veridir. Molekülün 1, 2, 3-triazol kısmındaki fenil halkasının her hangi bir sübstitüsyon içermemesi buradaki elektron delokalizasyonunun ve konjugüsyonun devamlılığını protein yapı ile gerçekleşen hidrofobik etkileşimlerle arttırarak bu bölgeyi biraz daha elektron verici hale getirmiş olabilir. Bu durum Qsite ile elde edilen HOMO sınır orbitali loblarının bir kısmının bu bölgede toplanmasını açıklamaktadır. Molekülde LUMO orbitallerinin karbamat kısmına yakın toplanması ve karbamat grubunun karbonil oksijeninin Mg^{2+} ile etkileşiminde etkili olan itici güçler hakkında fikir verir.



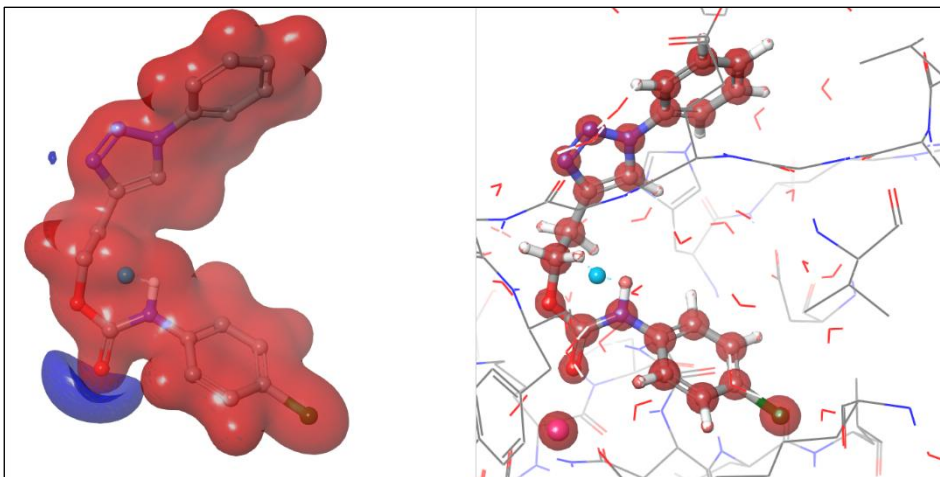
Şekil 4.97. ab7 bileşiğinin Fmk1 proteinine moleküler kenetlenme çalışmasında değişen elektron konfigürasyonu

ab7 bileşiğinin Şekil 4.98’de 1, 2, 3-triazol tarafında görülen aktif bölge cebinin dışına taşmaktadır. Bu olumsuz etkiye rağmen ab7 bileşiği karbamat tarafında metal koordinasyonu ve para klorofenilde klor atomunun yapmış olduğu halojen bağı ile iyi bir tutunma sağlanmış gözükmektedir. Glu31 kalıntısı ile su molekülünün köprü olarak kullanıldığı bir hidrojen bağının azota bağlı hidrojen ile hidrojen bağı yapması bu etkiyi desteklemiştir.



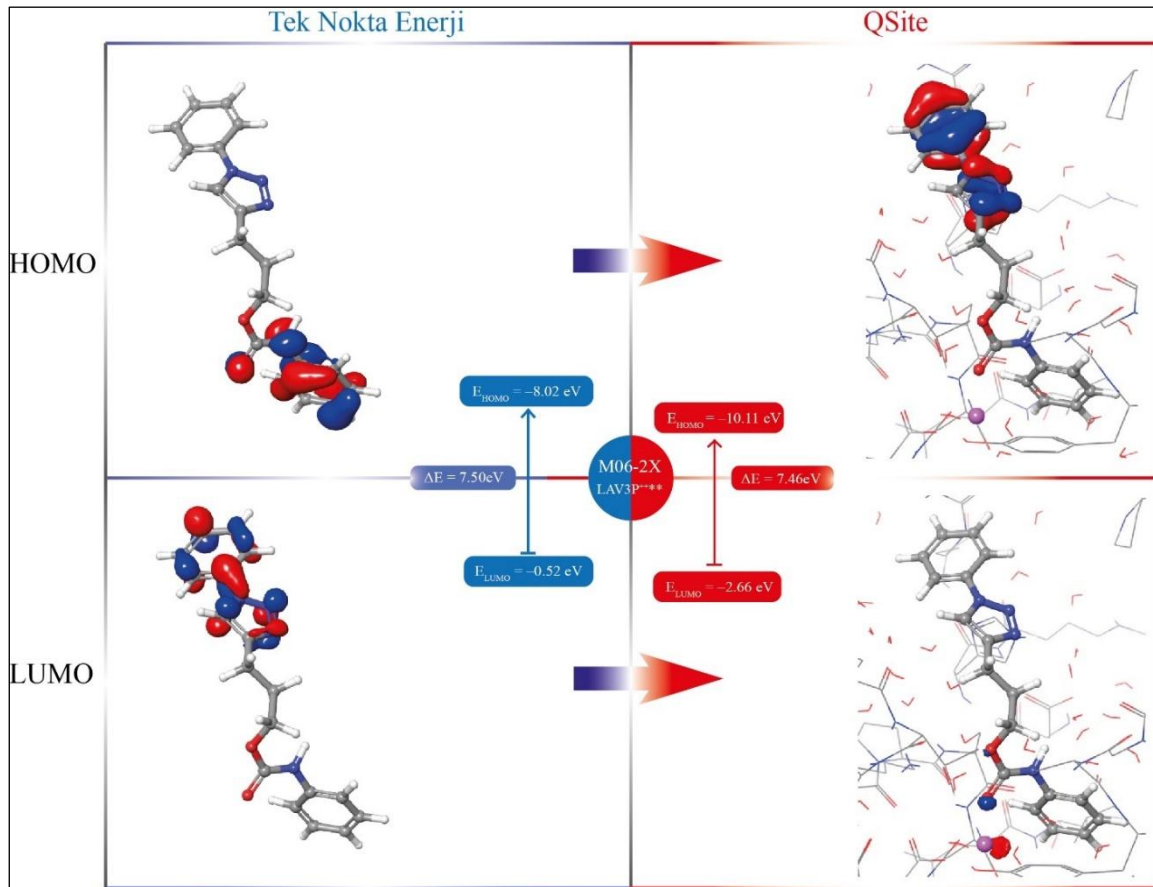
Şekil 4.98. ab7 bileşiğinin Fmk1 proteini aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü

Bileşiğin elektrostatik potansiyeli protein yapı içerisinde marjinal değişikliklere uğrayarak Mg^{2+} atomunu da içine alan bağlar üzerindeki elektrostatik potansiyelin “süpürülerek” koordinasyon etkileşimine destek verdiği Şekil 4.99’de görülmektedir. Klor atomu üzerindeki lobun büyüklüğü ve metal atomu üzerindeki lob oluşumu metalin elektron boşluklarının okteheral geometri elemanlarından biri haline gelmiş ab7 bileşiği tarafından doldurulmuş olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 4.99. Aynı konformasyonlarda ab7 bileşiğinin QSite(sağda) ve tek nokta enerji hesabı(solda) ile belirlenen elektrostatik potansiyel haritası

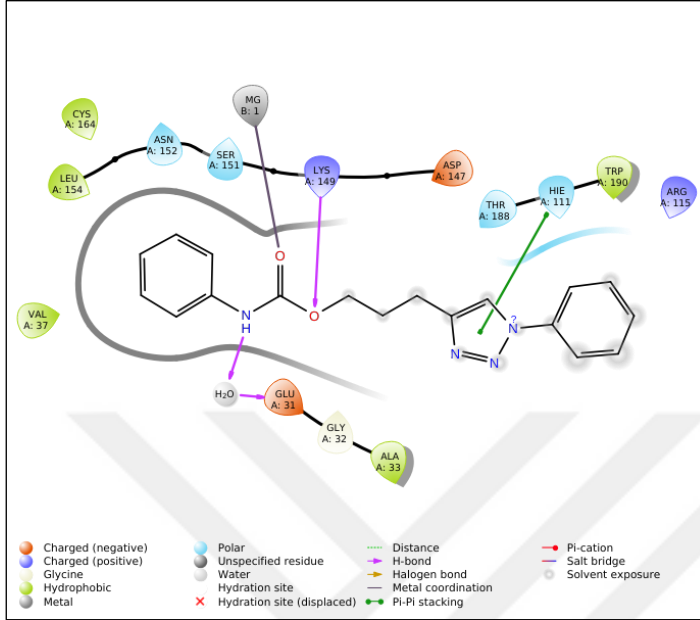
Yan zincir uzunluğu üç karbon olan serideki süstitüsyon içermeyen ab8 bileşiği, yan zincir uzunluğu iki karbon olan süstitüsyon içermeyen ab1 bileşiği ile çok benzer özellikler sergilemektedir ancak ondan daha inert bir elektron konfigürasyonuna sahip olduğu ab1 bileşiğinden biraz daha geniş bir $\Delta E_{\text{boşluk}}$ 'a sahip olması ile ondan daha az afinite gösterdiği açıktır. Bu durum Şekil 4.100'da görülmektedir. Bileşiğin HOMO sınır orbitallerinin tek nokta enerji ve QSite hesaplamasında bileşiğin tamamen farklı konumlarda olması protein yapı ile etkileşimin hesaba katıldığı QSite'da karbamat grubunun elektron verme eğiliminin ortan kalktığı görülmüştür. Karbamat karbonundaki oksijenin Mg^{2+} ile koordinasyonu sonucunda LUMO sınır orbitallerini içerir hale helmesi bu durumu net bir şekilde açıklar.



Şekil 4.100. ab8 bileşiğinin Fmk1 proteinine moleküler kenetlenme çalışmasında değişen elektron konfigürasyonu

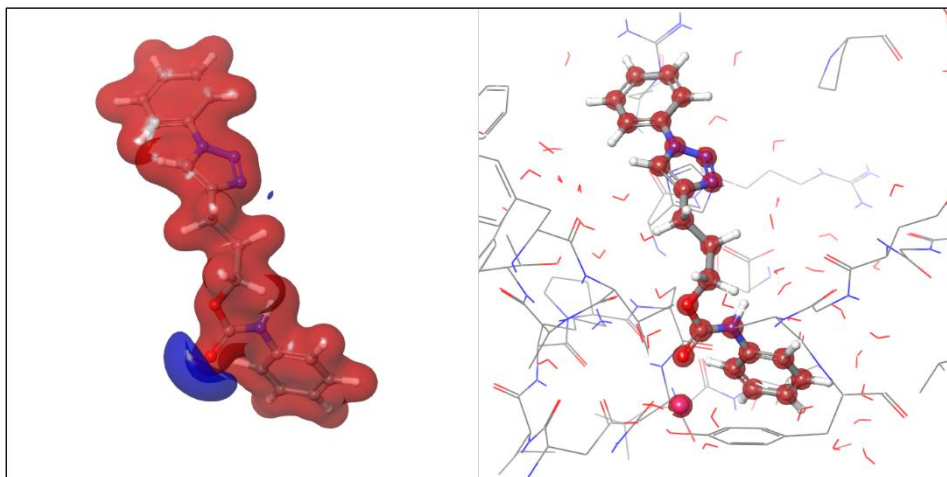
ab8 bileşiği Şekil 4.101'de görülen 2D görüntüsü ile Lys149 kalıntısıyla yaptığı hidrojen bağı nedeniyle diğer bileşiklerden ayrılır. Hie(His)111 kalıntısıyla gerçekleşen π - π etkileşimi çözücü etkileşimi olan ve aktif bölgeden dışarı bakan taraf olan 1, 2, 3-triazol tarafını bölgede tutma eğilimindedir. Glu31 ile diğer bileşiklerde de görülen karbamat

gubundaki hidrojenin su molekülünü köprü olarak kullanarak hidrojen bağı yapması bileşiği aktif bölge cebine bu kısımdan sabitlemiştir.



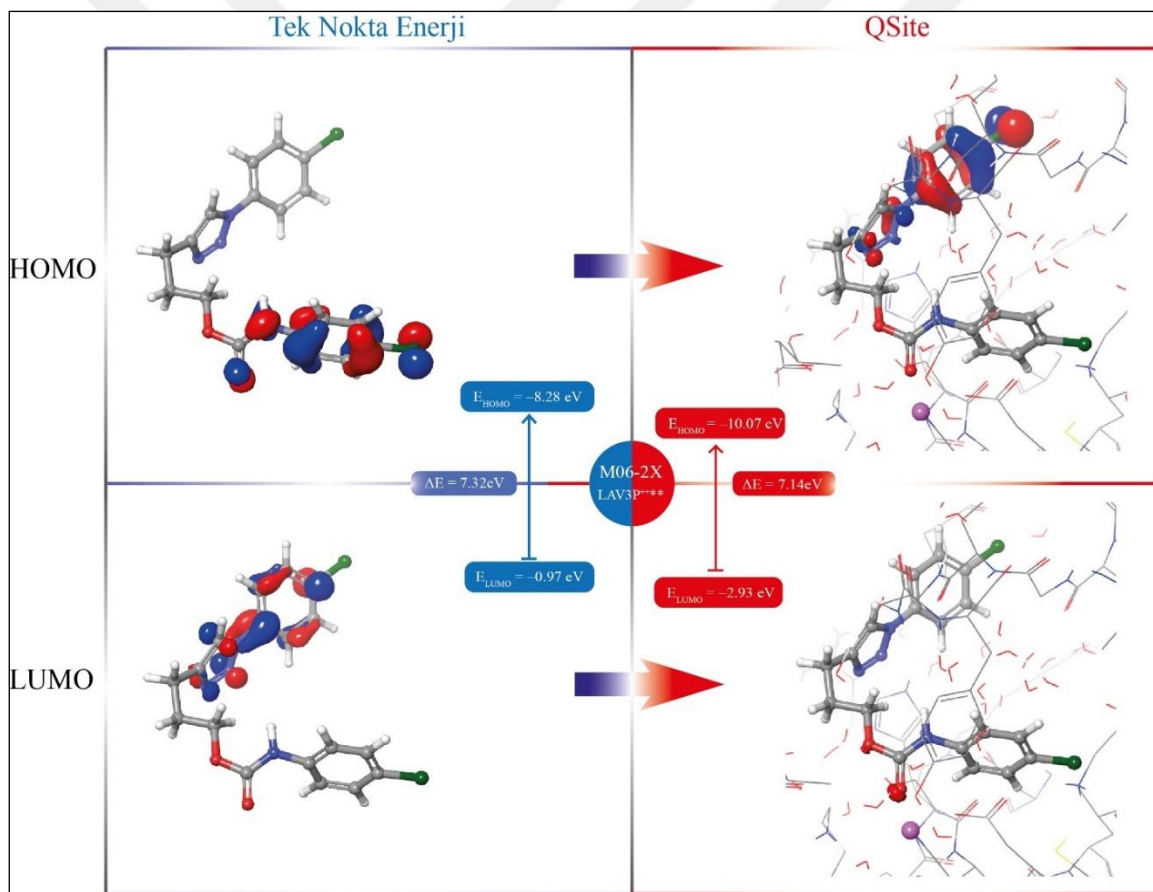
Şekil 4.101. ab8 bileşiğinin Fmk1 proteini aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü

Bileşiğin elektrostatik potansiyel haritasında protein yapı ile birlikte büyük değişimler olduğu ve metal atomu üzerinde elektrostatik potansiyeli gösteren lobun boyutu ile dengeli bir protein-ligand etkileşimi elde edildiği Şekil 4.102’de tespit edilmiştir.



Şekil 4.102. Aynı konformasyonlarda ab8 bileşiğinin QSite(sağda) ve tek nokta enerji hesabı(solda) ile belirlenen elektrostatik potansiyel haritası

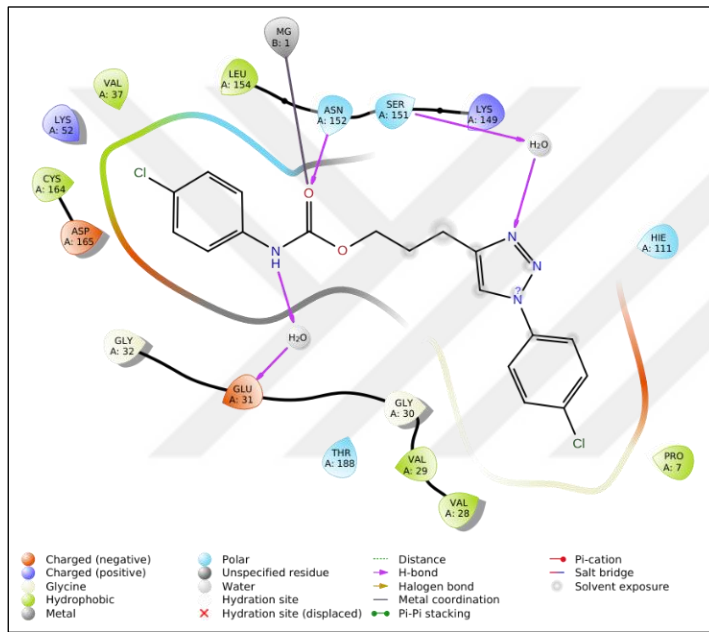
ab9 bileşiğinin Şekil 4.103’de görüldüğü gibi protein yapının etkisiyle HOMO ve LUMO sınır orbitalleri tamamen yer değiştirmiştir. Tek nokta enerji hesaplamasında karbonil oksijeni üzerinde görülen loblar protein yapının etkisiyle yok olmuştur. Sınır orbitalleri ise yerdeğştirerek molekülün elektronik yapısının protein yapı etkisi ile tamamen değiştirdiğini gösterir. $\Delta E_{\text{boşluk}}$ değeri tek nokta enerji ve QSite hesaplamasında nedeysye aynı kalmıştır ancak diğer bileşiklerde de görülen HOMO ve LUMO enerji seviyelerinde protein yapı etkisiyle büyük bir değişim meydana gelmiş ve bileşiğin reaktivitesi göreceli olarak artmıştır. Bunun yanında molekülde değişen LUMO sınır orbital loblarının küçülme durumu Mg^{2+} koordinasyonu ile elektron alma eğiliminin kaybolduğunu ve protein yapı ile iyi bir afinite sağladığını göstermektedir.



Şekil 4.103.ab9 bileşiğinin Fmk1 proteinine moleküler kenetlenme çalışmasında değişen elektron konfigürasyonu

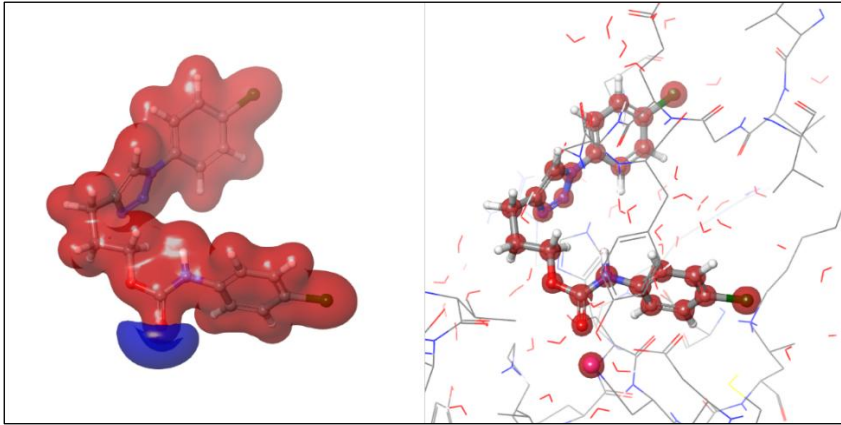
Bileşik ab9’un Fmk1 proteini ile gerçekleştirdiği etkileşimlerin iki boyutlu gösterimi olan Şekil 4.104’te diğer bileşiklerden farklı olarak Mg^{2+} koordinasyonunun yanında oktehdral geometriye katılan ve koordinasyon küresinin bir parçası olan Asn152 ile de karbonil

oksijeni ile hidrojen bağı yapmıştır. Glu31 kalıntısı ile karbamat grubundaki hidrojen ile su molekülünü köprü olarak kullanarak hidrojen bağı yapmaktadır. Yine diğer ab1-14 serisi bileşiklerden farklı olarak 1, 2, 3-triazol halkasındaki üç konumundaki azot atomu Ser151 kalıntısı ile su molekülünü köprü olarak kullanarak hidrojen bağı yapmaktadır. Bileşiğin protein-ligand etkileşiminde konumlanması alifatik zincirden dihedral açığı daha keskin yapmasıyla farklılık gösterir. Bu farklı açı bileşiğin 1, 2, 3-triazol grubunu ve ona bağlı fenil halkasının aktif bölge cebinde başka bir oyuk bölgeye doğru yönelmesini sağlayarak etkileşim gücünü arttırmaktadır.



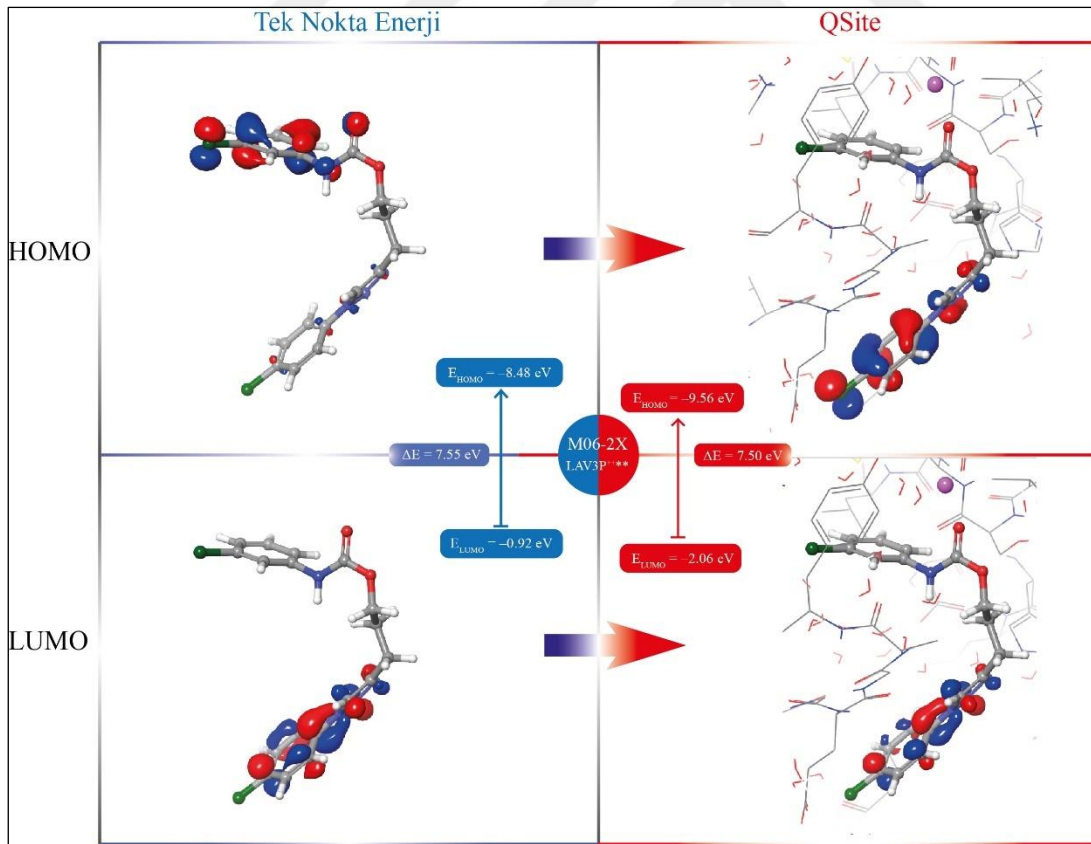
Şekil 4.104. ab9 bileşiğinin Fmk1 proteini aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü

Bileşik ab9 protein yapı ile etkileşimi ile elektrostatik potansiyel haritasını Şekil 4.105’de görüldüğü gibi büyük oranda değiştirmiş ve bağlar üzerindeki elektrostatik potansiyel Mg^{2+} üzerinde dağılmıştır. Klor atomları üzerindeki elektrostatik potansiyel yoğunluğu ise kısmen aynı kalmıştır.



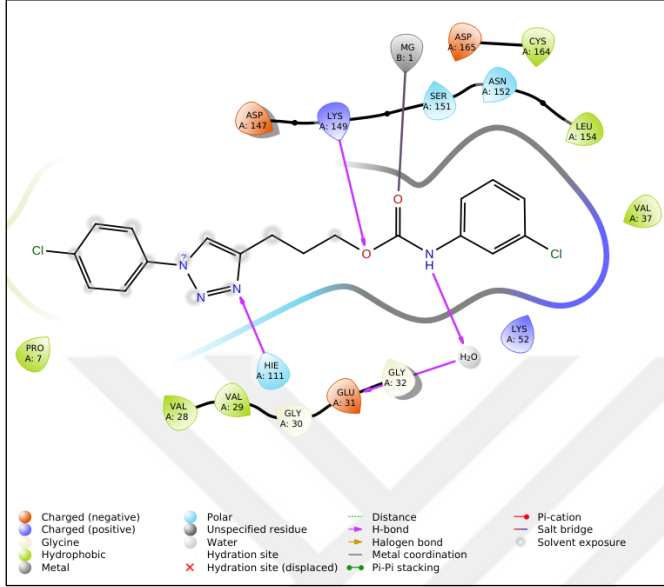
Şekil 4.105. Aynı konformasyonlarda ab9 bileşiğinin QSite(sağda) ve tek nokta enerji hesabı(solda) ile belirlenen elektrostatik potansiyel haritası

HOMO sınır orbitallerinde ve $\Delta E_{\text{boşluk}}$ değerleri Şekil 4.105'te görüldüğü gibi ab1-14 serisindeki diğer bileşiklerle çok benzer olan ab10 bileşiğinin HOMO sınır orbital loplarında Mg^{2+} ile koordinasyonu ve protein yapının etkisiyle değişime uğramıştır.



Şekil 4.106. ab10 bileşiğinin Fmk1 proteinine moleküler kenetlenme çalışmasında değişen elektron konfigürasyonu

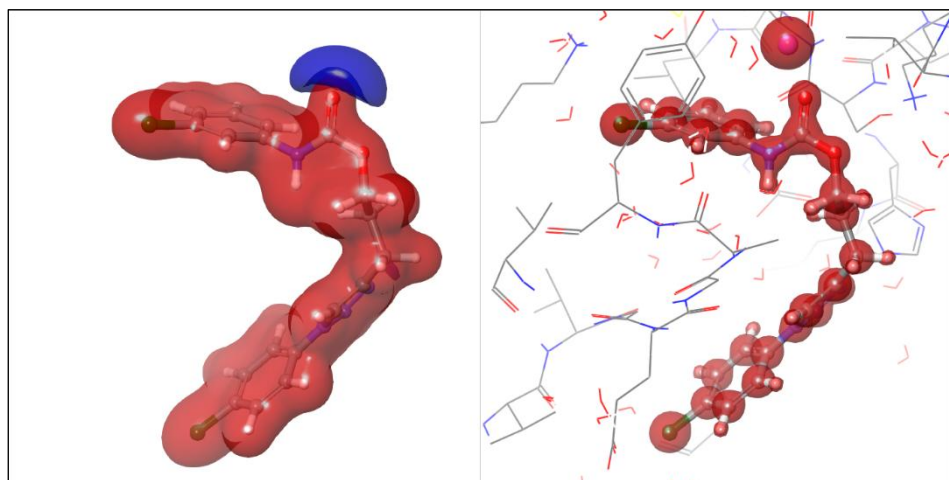
ab10 bileşiğinin Fmk1 aktif bölge yarığındaki Şekil 4.107’de görülen iki boyutlu görüntüsü oktehdral koordinasyonun bir üyesi olan Lys149 ile karbamat oksijeninin yaptığı hidrojen bağı ile diğer bileşiklerden ayrılmaktadır.



Şekil 4.107. ab10 bileşiğinin Fmk1 proteini aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü

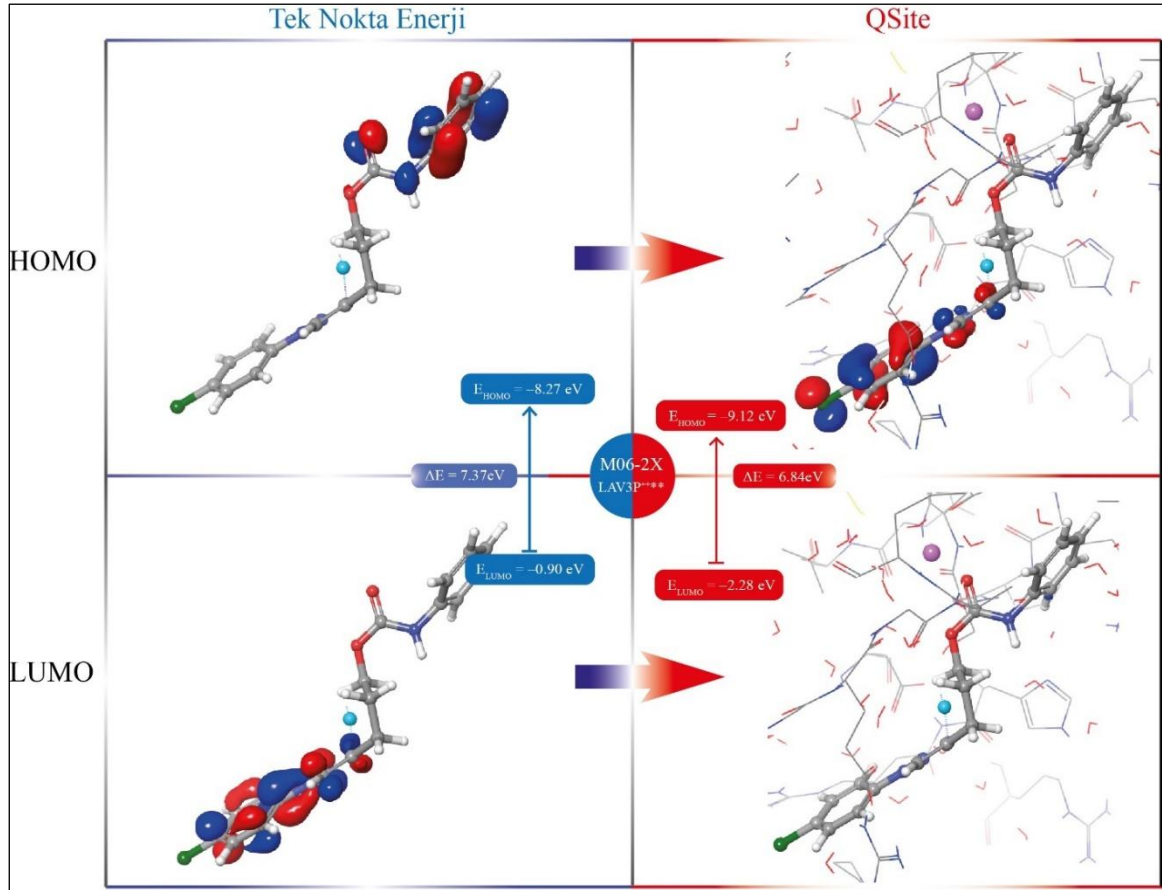
Elektrostatik potansiyel haritasında tek nokta enerji ve QSite çalışmasında diğer ab1-14 serisi bileşiklerden çok daha büyük bir değişim gerçekleşmiştir. Mg^{2+} atomu üzerinde diğer bütün bileşiklerden daha büyük bir elektrostatik potansiyel minimumu Mg^{2+} üzerinde toplanmıştır. Karbamat karbonili üzerinde, Mg^{2+} atomu üzerine yönelmiş şekilde karbonildeki π bağı üzerine kadar yüksek yoğunlukta bulunmaktadır. Molekülün diğer atomlar arasındaki bağlarda ise elektrostatik potansiyel, protein yapı ile etkileşim ile büyük oranda yok olmuştur. Molekül üzerindeki genel elektrostatik potansiyel haritası karbamat grubu üzerinde yoğunlaşan bu durum elektrostatik potansiyelin ab 10 bileşiğini hem ab1-14 serisi içerisindeki en yüksek etkinliğe sahip bileşik olarak ön plana çıkarırken hem de karbamat fonksiyonel grubunun Fmk1 üzerindeki etkisinin elektrostatik potansiyelin molekül üzerindeki dağılımı ile doğrudan bağlantılı olabileceğini göstermiştir. Klor atomlarının fenil halkalarındaki konumları karbamat tarafında meta- konumunda, 1, 2, 3-triazol grubunun bağlı olduğu tarafta ise para- konumda bulunmaktadır. Bu yerleşimde özellikle 1, 2, 3-triazol grubunun bulunduğu tarafta sinerjik etki yaratacak potansiyelde görülmektedir. Klor atomları üzerindeki elektrostatik potansiyel toplanması bağlar üzerinde geri çekilme ile metal koordinasyonu kaynaklı görülmektedir. Bu durum diğer bileşiklerde

rastlanmayan Lys148 kalıntısı ile karbamat oksijeninin hidrojen bağı etkilişimi kaynaklı olduğu açıktır. Karbamat grubu üzerinde yoğun elektrostatik potansiyel karbamat oksijeninin elektron çifti sağlayan (δ^-) akseptör olarak davranmasından kaynaklanmaktadır ve elektrostatik potansiyeli karbamat grubu üzerinde yoğunlaştırarak ab10 bileşiğini Fmk1 proteini üzerinde en etkili bileşik olarak ön plana çıkarır. Elektrostatik potansiyel dağılımını etkileyen bir başka unsur da klor sübstitüentleri ve yan zincir karbon uzunluğunun üç karbondan olarak meta- ve para- kombinasyonun bir arada bulunmasıdır.



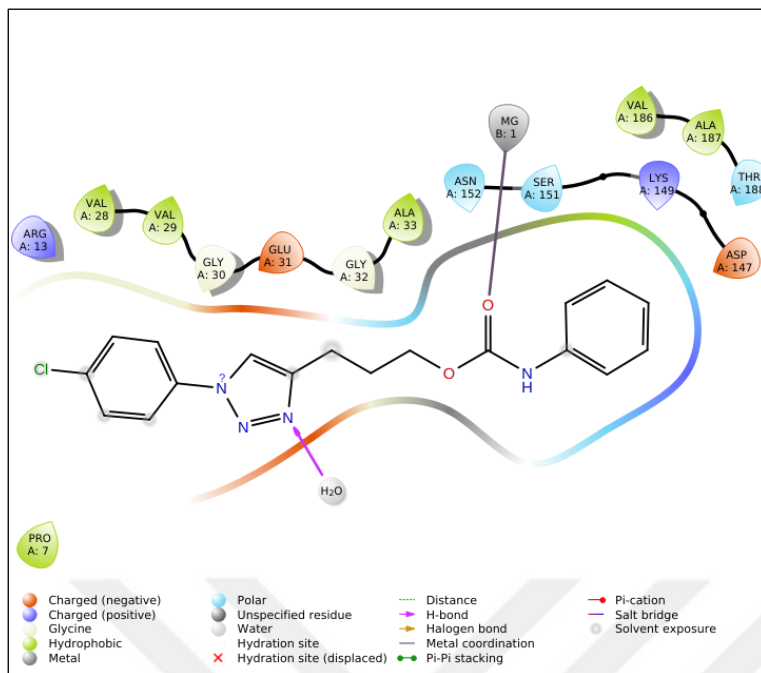
Şekil 4.108. Aynı konformasyonlarda ab10 bileşiğinin QSite(sağda) ve tek nokta enerji hesabı(solda) ile belirlenen elektrostatik potansiyel haritası

Bileşik serisinde ab11 Şekil 4.109’de $\Delta E_{\text{boşluk}}$ değeri ile protein yapının etkisiyle daha “yumuşak” ve etkileşime açık hale gelmiştir. $\Delta E_{\text{boşluk}}$ değeri de QSite’da tek nokta enerji hesaplamasından daha dar bir aralıktadır. HOMO sınır orbitalinin karbonil oksijeni üzerinde Mg^{2+} etkileşimi ile farklılık göstermektedir. Elektron verme potansiyeli olan HOMO sınır orbitalleri protein yapı ile gerçekleşen etkileşimlerle yerdeğiştirmiş görünmektedir. Bu durum bileşiğin tek nokta enerji hesaplamasındaki HOMO sınır orbital bölgelerinden non-kovalent etkileşimlere açık olduğu anlamına gelir ve Şekil 4.110’da görüldüğü gibi aktif bölge yarığına yerleşmesi hidrofobik etkileşimler vasıtasıyla konfigürasyon değişimine neden olmuştur. LUMO sınır orbitalleri elektron alıcılı eğilimine çözücü etkileşimi ile sınırlama getirmiş ve LUMO orbital loblarının diğer bileşiklerde olduğu gibi etkileşim süreçlerin LUMO sınır orbital bölgeleri üzerinden “ana kaynak” olarak sınırlamıştır.



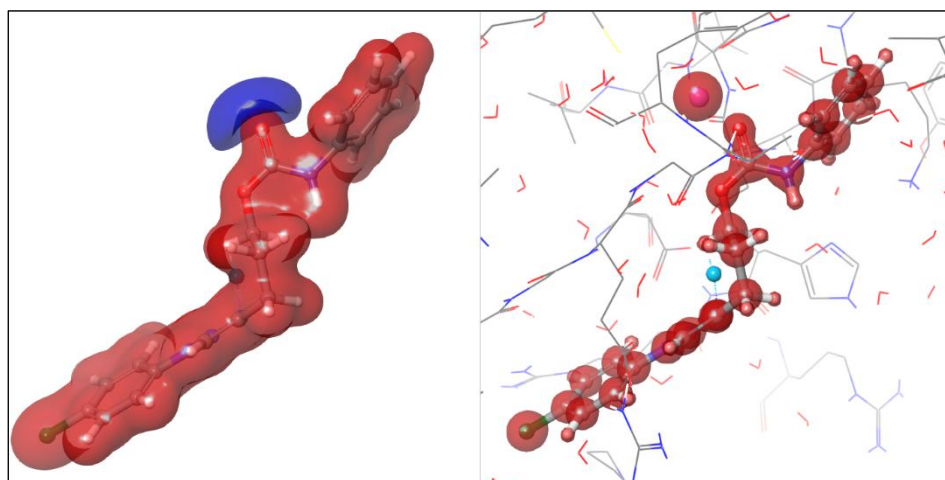
Şekil 4.109. ab11 bileşiğinin Fmk1 proteinine moleküler kenetlenme çalışmasında değişen elektron konfigürasyonu

Bileşik ab11 serideki diğer bileşiklerle benzer konformasyonda kenetlenme sağlamıştır ve aktif bölge cebine yerleşimi birbirleri ile benzerdir. Mg^{2+} atomu ile koordinasyon etkileşimin birincil gücünü oluştururken karbamat grubunun olduğu taraf hidrofobik etkileşimlerle cebin derinliklerine yatay uzanır.



Şekil 4.110. ab11 bileşiğinin Fmk1 proteini aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü

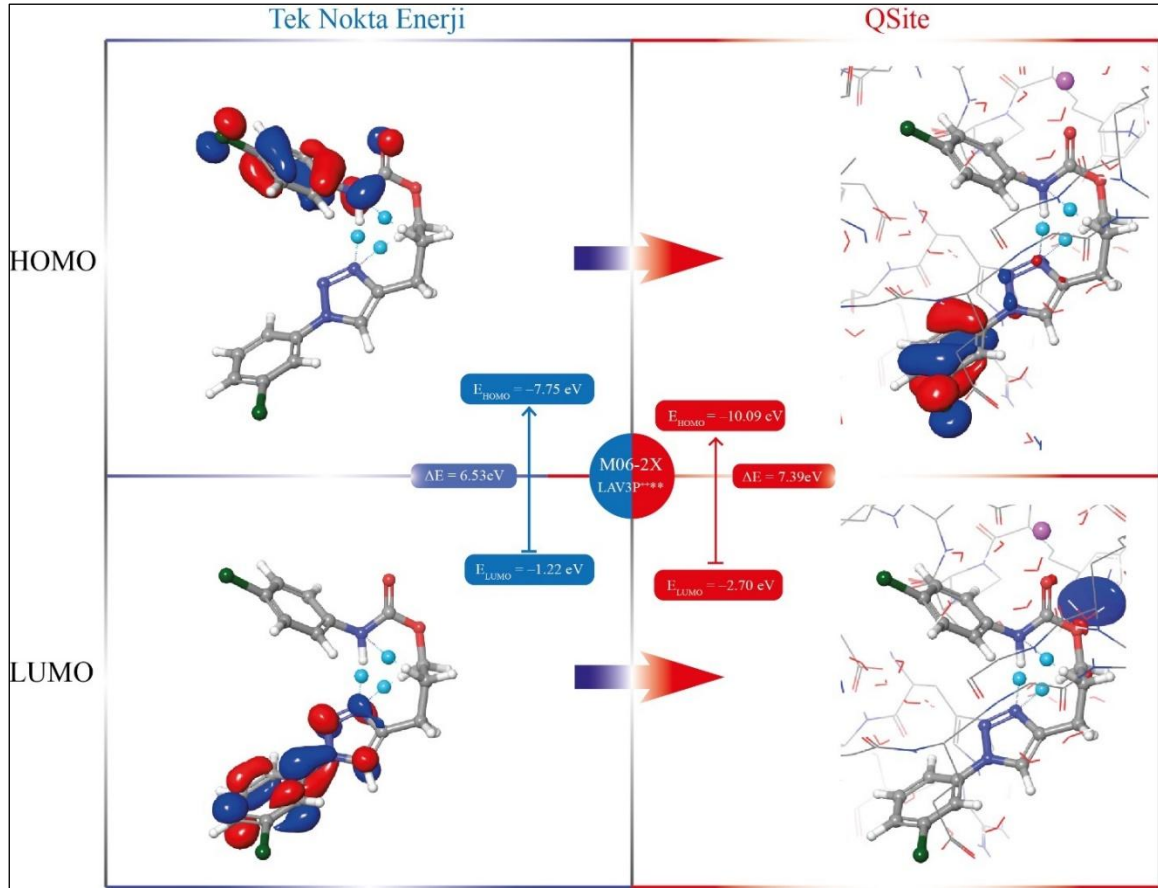
Bileşik ab11 bileşiğinin elektrostatik potansiyel haritasında dağılım klor sbstitüenti içeren, özellikle meta- ve para- ayırt edici özelliklerine sahip olması bakımından diğer bileşiklerle benzerdir. Karbamat grubu bir kere daha protein etkileşimi ile elektrostatik potansiyeli üzerine toplamıştır.



Şekil 4.111. Aynı konformasyonlarda ab11 bileşiğinin QSite(sağda) ve tek nokta enerji hesabı(solda) ile belirlenen elektrostatik potansiyel haritası

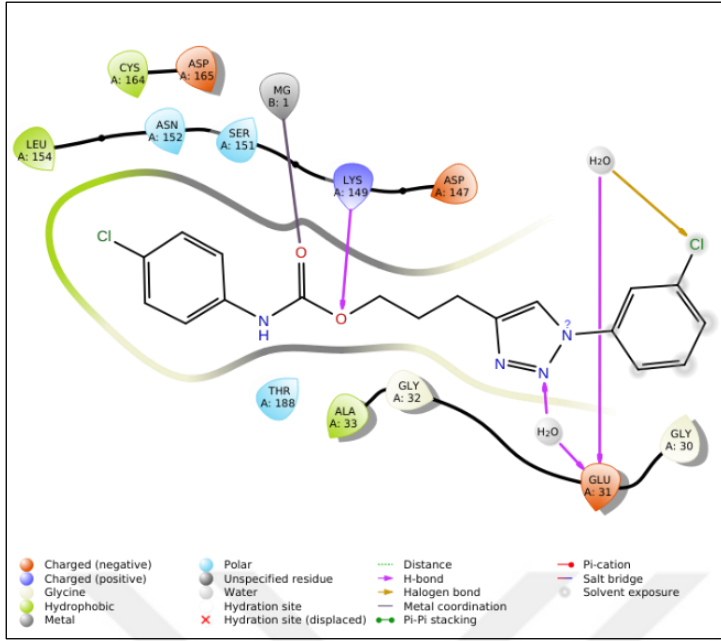
Tek nokta enerji ve Qsite hesaplamalarında bileşiklerin genelinin benzer konfigürasyon değişimi Şekil 4.112’de de ab12 bileşiğini kapsamakta ve ab12 bileşiği benzer özellikler

göstermektedir. Bileşiğin sahip olduğu kenetlenme konformasyonun diğer bileşiklerden farklı ve DFT çalışmasındaki en kararlı konformasyona yakın olması HOMO ve LUMO enerji seviyelerini büyük ölçüde farklılaştırılmıştır ve tek nokta enerji hesaplamasında HOMO enerji seviyesinin yükselmesine neden olurken LUMO enerji seviyesinde düşmeye neden olmuştur. Bu ab12 bileşiğinin elektron konfigürasyonunun diğer bileşiklerden farklı olarak farklı afinite özellikleri göstermeye açık olduğu anlamına gelir. QSite hesaplaması ile enerji seviyeleri protein yapı ile etkileşimler hesaba katıldığında serideki diğer bileşiklerin enerji seviyeleri benzer duruma gelmiştir. Bu durum $\Delta E_{\text{boşluk}}$ değerinde QSite hesaplamasında büyük bir fark olarak hesaplanmasına neden olmuştur. Normalden daha “yumuşak”, yani daha reaktif hale gelen ab12 bileşiğinin protein yapı ile etkileşim potansiyeli sahip olduğu daha farklı konformasyonla diğer bileşiklerden daha düşük bir potansiyele sahip olabilir. Bu durum yine Şekil 4.112’de görüldüğü gibi ab12 bileşiği en düşük enerjili konformasyon olarak tespit edilen yapıya yakındır ve protein yapıyla etkileşim, molekülü “U” formunun açılarak protein yapıyla etkileşime geçmesini sağlayamamıştır. Bu durumdan molekül içi etkileşimlerin triazol halkasındaki üçüncü azot atomu ile karbamat grubundaki azotun hidrojeni arasındaki etkileşimin baskın olmasının sorumlu olduğu Şekil 4.112’de net bir şekilde görülmektedir.



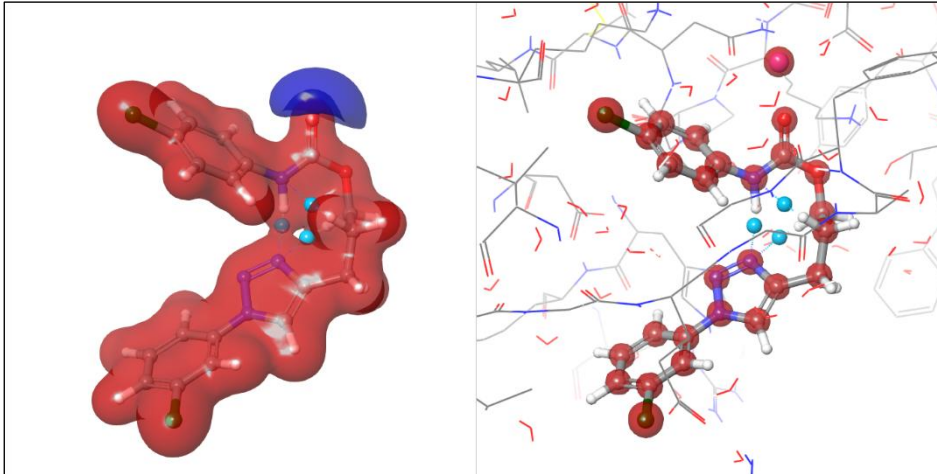
Şekil 4.112. ab12 bileşiğinin Fmk1 proteinine moleküler kenetlenme çalışmasında değişen elektron konfigürasyonu

Şekil 4.113’da görülen ab12 bileşiğinin protein-ligand etkileşiminde farklı etkileşimler yaptığı tespit edilmiştir. Karbonil oksijeni ile etkileşim yine metal koordinasyonu ile olsa da Glu31 ile etkileşim üç boyutlu yerleşimden anlaşılabilceği şekilde çözücü dışına çıkan kısmı oluşturan 1, 2, 3-triazol halkasının bulunduğu kısımda 1, 2, 3-triazol halkasının ikinci (ortanca) azot atomu-su-Glu31-su-klor atomu şeklindeki ağ ile karakterizedir. Oluşan bu ağ bileşiğin elektronik özelliklerine bakıldığında protein-ligand etkileşimde stabilize edici değil destabilize edici olma potansiyelini daha çok taşımaktadır.



Şekil 4.113. ab12 bileşiğinin Fmk1 proteini aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü

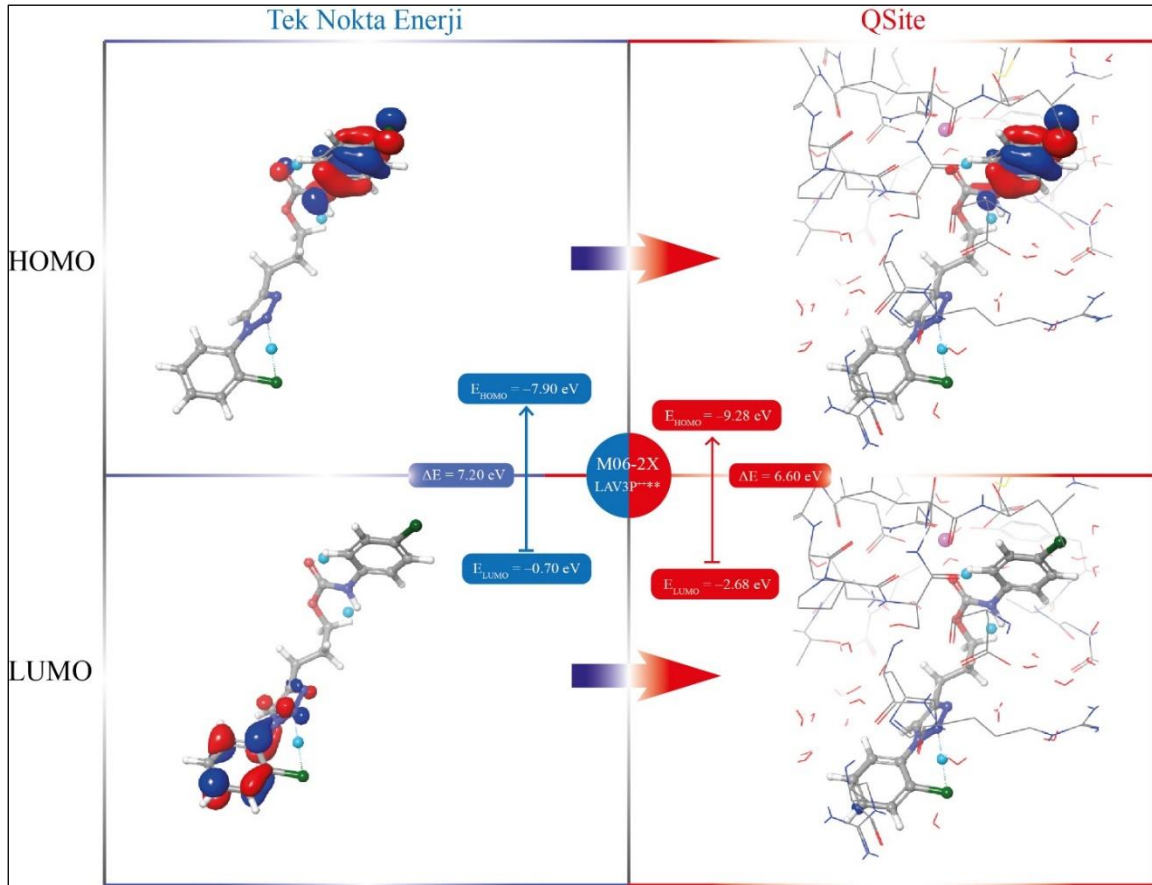
Elektrostatik potansiyel haritası Şekil 4.114'te görülen bileşik ab12, serideki düşük elektrostatik potansiyel dağılımına sahiptir. Bu durum yine molekül içi etkileşimlerin etkisiyle konformasyonel farklılaşmadan kaynaklanmaktadır. Molekül içi etkileşimlerin konformasyonel farklılaşmaya etkisi non-kovalent etkileşimlerin molekül içerisinde de etkisini göstermesinden kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.114. Aynı konformasyonlarda ab12 bileşiğinin QSite(sağda) ve tek nokta enerji hesabı(solda) ile belirlenen elektrostatik potansiyel haritası

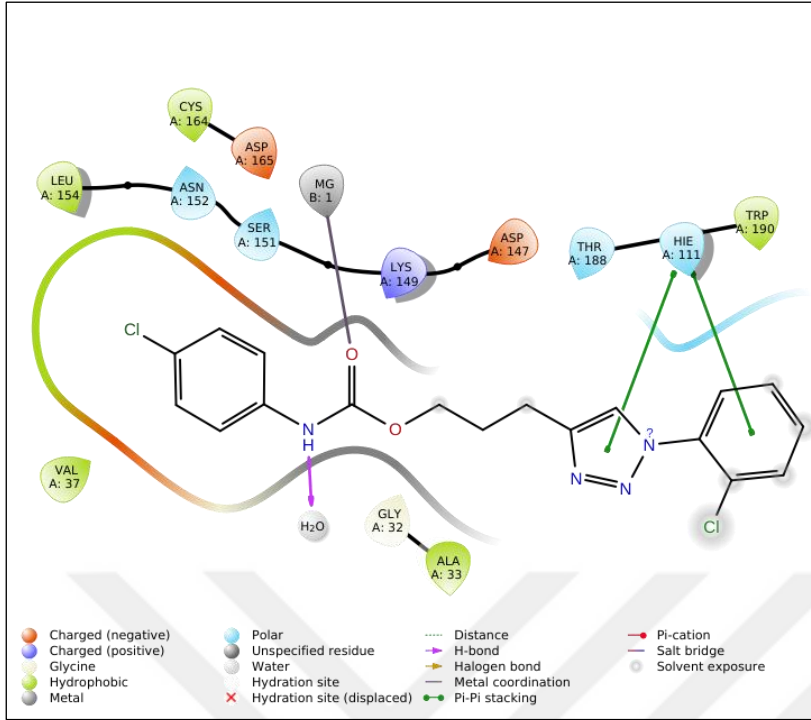
Bileşik ab13 diğer bileşiklerle benzer bir konformasyon ve etkileşim ile Fmk1 protein yapısı aktif bölgesine Şekil 4.115'de görüldüğü gibi kenetlenmiştir. HOMO sınır orbital bölgesinin

değişmemesi bileşiğin hidrojen bağı donor özelliklerinin değişmediği ancak Mg^{2+} koordinasyonunun yine diğer bileşiklerdeki gibi oldukça güçlü şekilde koordinasyona katıldığı tespit edildi. Bileşiklerin LUMO sınır orbitalleri ise büyük bir değişim ile klor grubunun protein yapı ile gerçekleştirmiş olduğu protein etkileşimi ile değişen elektron konfigürasyonuna işaret etmektedir. $\Delta E_{boşluk}$ değeri ise tek nokta enerji ve QSite hesaplamasında büyük değişimlerle bileşiğin elektronik yapısının “yumuşadığını” etkileşime daha açık hale geldiği gösterdi. Şekil 4.116’de Hie(His)111 kalıntısı ile 1, 2, 3-triazol ve ona bağlı aromatik halkanın yaptığı π - π etkileşimi aromatik halkalardaki elektron delokalizasyonunun etkileşimle paylaşılması ile anlamlıdır.



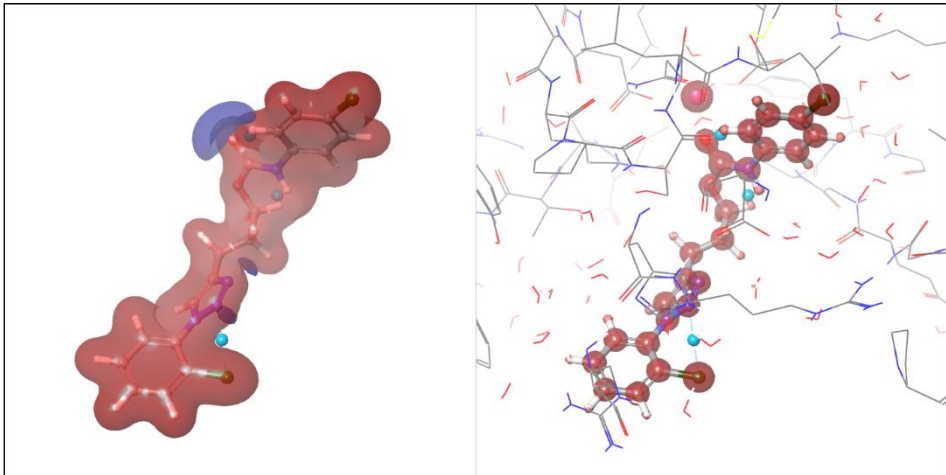
Şekil 4.115. ab13 bileşiğinin Fmk1 proteinine moleküler kenetlenme çalışmasında değişen elektron konfigürasyonu

Bileşik ab13 Fmk1 protein yapıyla Şekil 4.116’de görülen ve serideki diğer bileşiklerle benzer olan etkileşimler yapmaktadır. Bileşiğin 1, 2, 3-triazol grubunun Hie(His)111 ile yaptığı etkileşime rağmen karbamat grubundaki oksijenin akseptör özelliği ile hidrojen bağı yapmaması bileşiğin Fmk1 proteini ile yaptığı etkileşimi sınırlama potansiyeli barındırır.



Şekil 4.116. ab13 bileşiğinin Fmk1 proteini aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü

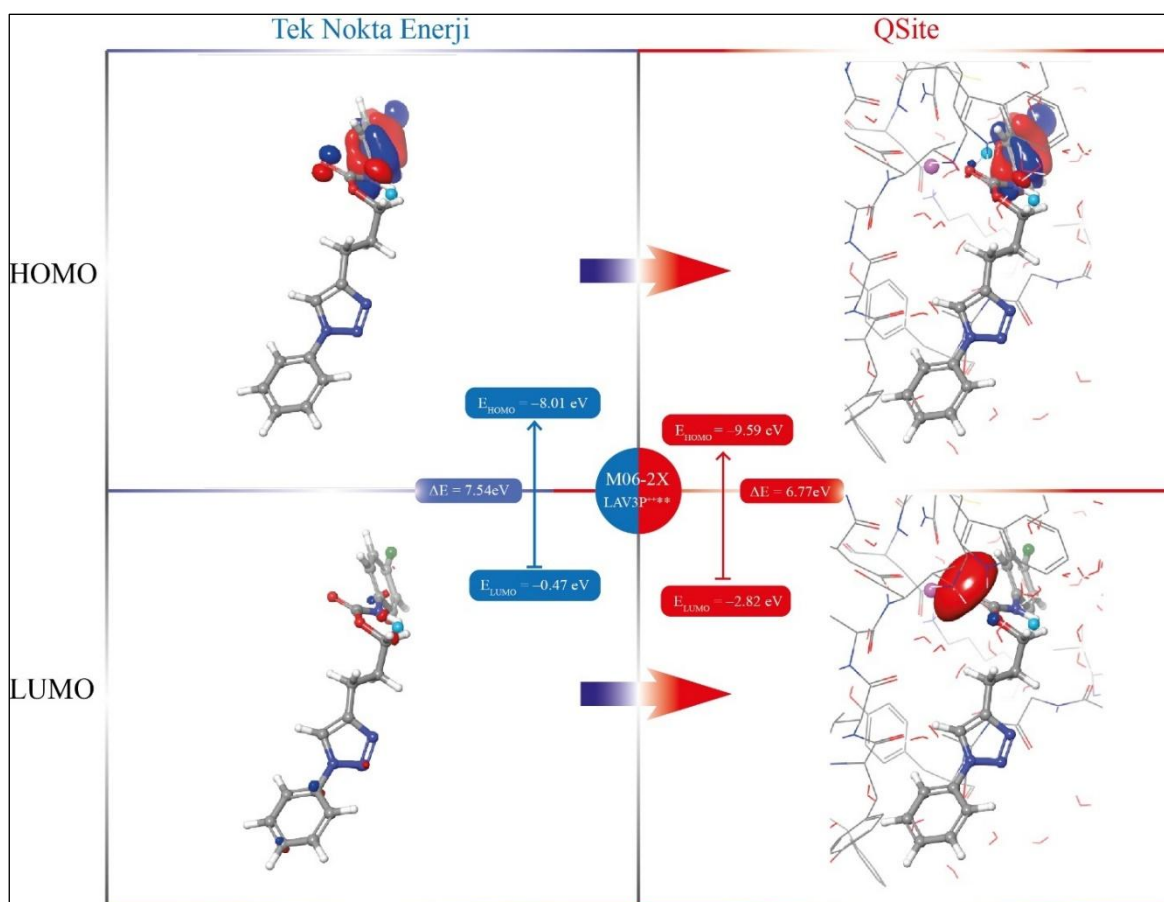
Bileşiğin elektrostatik potansiyel haritasına Şekil 4.117’de görüldüğü gibi büyük değişimler vardır ancak klor atomları üzerindeki yoğunlaşma, etkinliği ve elektrostatik potansiyelin protein yapılarla etkileşimlerini sınırlamaktadır.



Şekil 4.117. Aynı konformasyonlarda ab13 bileşiğinin QSite(sağda) ve tek nokta enerji hesabı(solda) ile belirlenen elektrostatik potansiyel haritası

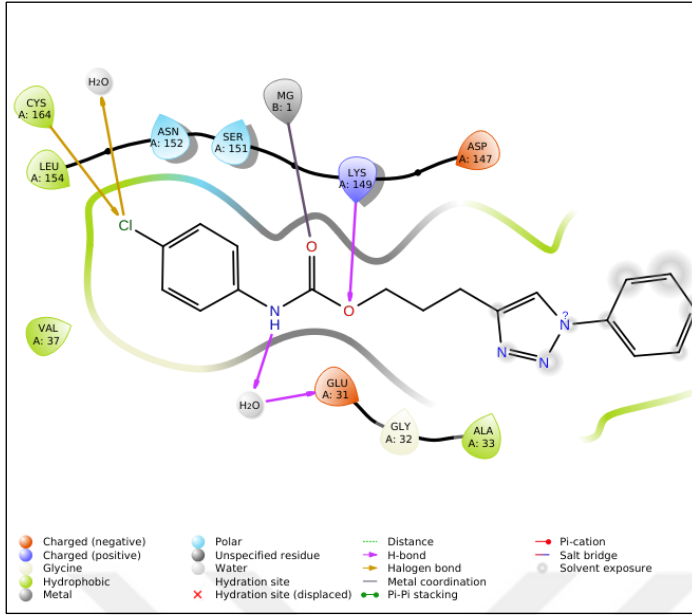
Serideki diğer bileşiklerle benzer elektronik özellikleri tek nokta enerji ve QSite hesaplamasında Şekil 4.118’de görüldüğü gibi gösteren ab14 bileşiği özellikle ab1 bileşiği

ile benzer özellikler göstermektedir. Sadece yan zincir uzunlukları farklı olan, bir karbon daha uzun yan zincir içeren ab14 bileşiği HOMO ve LUMO sınır orbitallerindeki büyük değişimin ab1 bileşiği ile de benzer olmasına rağmen $\Delta E_{\text{boşluk}}$ değerinin ab14 bileşiğinde çok daha düşük bir değer alması ile inertliğini bir dereceye kadar kaybetmiş ve daha reaktif olmuştur.



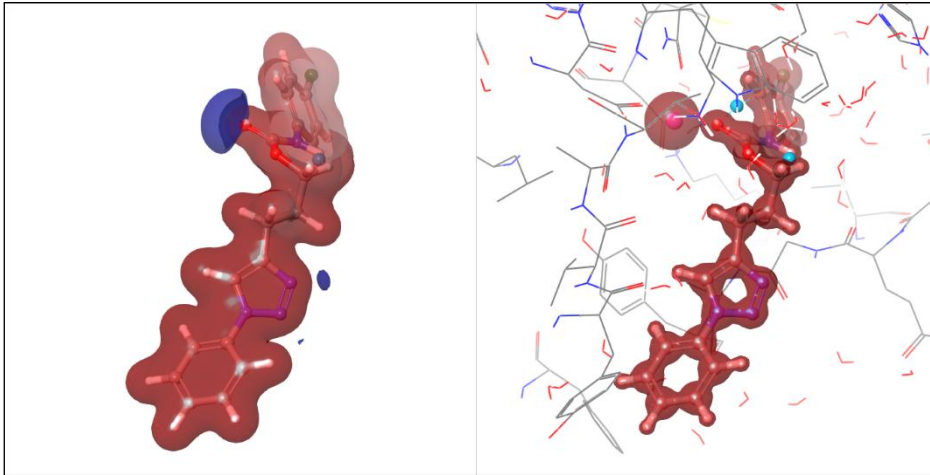
Şekil 4.118. ab14 bileşiğinin Fmk1 proteinine moleküler kenetlenme çalışmasında değişen elektron konfigürasyonu

Bileşik ab14'ün Şekil 4.119'de görüldüğü gibi 1, 2, 3-triazol tarafında çözücü etkileşimi yüksek olan bir bölge içermesine rağmen karbamat grubunun olduğu bölgede diğer bileşiklerle benzer etkileşimler yapmaktadır. Önemli etkileşimlerin başında karbamat grubundaki oksijenin akseptör etkisi ile okteedral geometriya katılan kalıntılardan Lys149 ile hidrojen bağı yapması gelmektedir. Bu ab10 bileşiğinin yaptığı önemli etkileşimlerle benzerdir. Klor atomu ile gerçekleşen halojen bağı bileşiğin kenetlenmesini karbamat bölgesinde güçlendirmektedir.



Şekil 4.119. ab14 bileşiğinin Fmk1 proteini aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü

Bileşiğin Şekil 4.120’de görülen elektrostatik potansiyel haritasında yine ab10 bileşiği ile benzer bir durum olarak karbamat grubu üzerinde yoğunlaşma tespit edilmiştir. Bu benzerlik diğer yapısal benzerliklerle birlikte bileşiği Fmk1 protein yapısı üzerinde etkili kılabilir.



Şekil 4.120. Aynı konformasyonlarda ab14 bileşiğinin QSite(sağda) ve tek nokta enerji hesabı(solda) ile belirlenen elektrostatik potansiyel haritası

ab1-14 bileşik serisinin Fmk1 protein yapısının aktif bölgesine yapılan moleküler kenetlenme çalışmasında elde edilen bilgilerde klor süstitüsyonun fenil üzerindeki konumunun önemini göstermektedir. Klor atomu zayıf etkinlik artırıcı özelliği ile elektron delokalizasyonunda orto- ve para- yönlendirici etkisinde 1, 2, 3-triazol grubunun fenil

halkasından bağlandığı durumda fenil halkasına para- konumunda yerleştiğinde ve karbamat grubunda elektrostatik potansiyelin karbamat üzerine yayılmasını sağlayan karbamata bağlı fenil halkasındaki meta- konumunda sinerjik etki sağlamakta ve Fmk1 proteinine güçlü afinite sergilemektedir. Bu nedenle bileşik serimiz içerisinde Fmk1 aktif bölge cebine en yüksek afinite potansiyeli ile bağlanan kombinasyonun ab5 ve ab10 bileşiklerinin sahip olması beklenebilir. Bunun yanında karbamat grubu tarafında elektron delokalizasyonun kesintiye uğramaması sayesinde, triazol tarafındaki fenil halkasında para- konumda bulunan klorun yine zayıf orto- ve para- yönlendire etkisi üzerinde olan konumdaki 1, 2, 3-triazol halkasındaki halka akımını güçlendirerek potansiyel bir afinite artışına neden olabilir. Bileşik serisinde HOMO ve LUMO enerji seviye farklarını ifade eden $\Delta E_{\text{boşluk}}$ değerinin tek nokta enerji hesaplamasına göre protein yapı etkisinde daha fazla küçülmesi yan zincir uzunluğu üç alifatik karbondan oluşan ab8-14 arasında olan bileşiklerin daha reaktif hale geçmesi deneysel koşullarda etkinlik potansiyelini az miktarda artırma potansiyeli barındırır. Bileşik serisinin en düşük enerjili konformasyonlarında elde edilen $\Delta E_{\text{boşluk}}$ değerleriyle protein yapı içerisinde düşüş göstermiştir. Bu durum bileşiklerin protein yapı içerisinde daha reaktif hale gelme potansiyellerinin olduğunu ve dolayısıyla oluşan komplekslerin kararlı olma durumu için olumlu bir bakış açısı sunmaktadır.

Bileşik serisinin tamamında elektronik yapı ve elektrostatik potansiyel, proteindeki Mg^{2+} atomunun karbonil oksijeni ile yaptığı koordinasyonla ve uygun konumdaki klor atomunun sinerjik etki göstermesi özellikle ab10 bileşiğinin kritik kalıntılarla etkileşimi ile birleştiğinde yüksek etkileşim potansiyeli sağlamaktadır. Bileşik serisi içerisindeki ab10 bileşiği karbamat grubu üzerinde toplanan elektrostatik potansiyelin sayesinde bu gruptaki oksijenin akseptör etkisini arttırmış ve Lys149 kalıntısı ile hidrojen bağı yapması ayırt edici bir özellik kazandırmıştır. Lys149 kalıntısı protein - Mg^{2+} ligand arasında oluşan okteedral geometrili koordinasyonun protein ayaklarında birini oluşturan bir kalıntı olduğundan bu kalıntı ile etkileşim Fmk1 protein yapısının etkileşimini aktif bölge yarığını işgal ederek substrat bağlanmasının engellenmesi yanında protein yapının işlevini de önemli ölçüde bozma potansiyeli ile kritik bir etkileşimdir.

Bileşik serisinin protein yapıdaki aktif bölge cebine, karbamat grubu ile protein yapı içerisine gömülü iken 1, 2, 3-triazol grubunun olduğu taraf çözücü etkileşimine sahiptir veya bu konumlarda zayıf etkileşimler yapmaktadır. Çözücü etkileşiminin olduğu bölgede konjugasyonun fazla olması hidrofobik özelliklerle zaten protein yapı içerisinde gömülü

olan tarafın içeri doğru itilme potansiyeli bileşik serisi genelinde Fmk1 proteini ile etkileşimi arttıran ve aktif bölge cebinde kalıcılık sağlayan Mg^{2+} koordinasyonun dışındaki etkidir.

Karbamat grubununa bağlı fenil halkasındaki klor atomunun para- konumlanması olduğu bileşiklerde halojen bağına rastlanması zayıf etkileşimler ile kısmen destek sağlamaktadır.

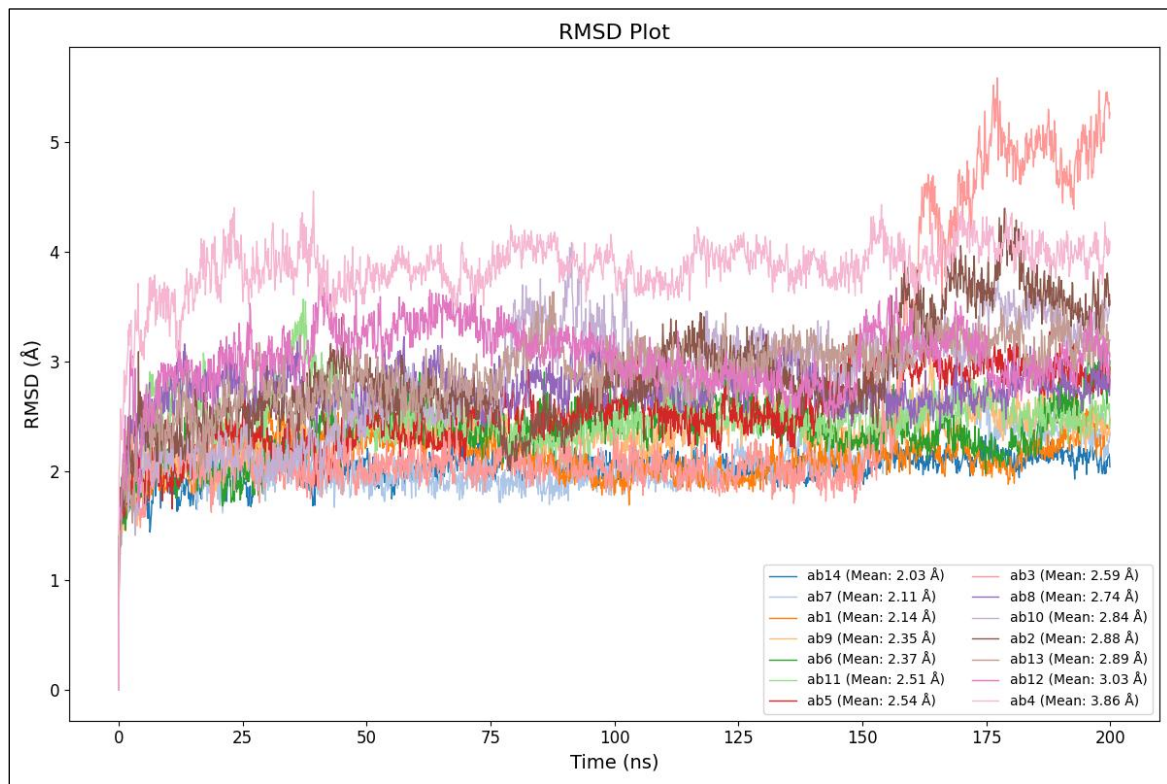
4.3.3. Moleküler dinamik çalışması

QM/MM kenetlenme ile Fmk1 aktif bölgesi ve ab1-14 bileşik serisindeki tüm bileşiklerin oluşturduğu kompleksler etkileşim sürekliliğini ve bileşiklerin protein yapı üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi için 200 ns moleküler dinamik çalışmasına tabi tutulmuştur. Moleküler dinamik çalışmasında kenetlenme çalışmasında elde edilen komplekslerin tamamının 200 ns boyunca bozulmadan kaldığı ve bileşiklerin her birinin bölgede kaldığı tespit edilmiştir.

Atomik pozisyonların kök ortalama kare sapması (rmsd)

Protein-ligand komplekslerinin moleküler dinamik simülasyonu boyunca hareketi, komplekslerin ilk frame'i ilerleyen her bir frame üzerine hizalanarak atomik pozisyonların ne kadar değiştiğine dair sayısal bir ölçüt için RMSD değerleri hesaplanmıştır. Komplekslerin RMSD değerlerindeki değişim komplekslerin ilk pozisyonlarından ne kadar saptığını göstererek ab1-14 serisinin Fmk1 protein yapısının üzerindeki stabile edici etkisinin bir ölçütünü gösterir. Düşük sapma değerleri az yer değiştiren atomik pozisyonların aktif bölgedeki ligandın cep içerisinden çıkma olasılığını düşürürerek uzun zaman sürelerince aktif bölgenin substrata ulaşmasını engeller. Aktif bölge cebinin ligand tarafından işgalinin süresinin uzun olması güçlü inhibisyonun önemli özelliklerinden biri olarak görülür. Şekil 4.121'da ab1-14 serisindeki tüm bileşiklerin oluşturduğu komplekslerin moleküler dinamik simülasyonu boyunca değişen RMSD değerlerinin olduğunu simülasyon boyunca gösterilmiştir. Elde edilen değerlerde bileşiklerin plato seviyesi oluşturması protein-ligand kompleksinin stabil haline geldiğinin birincil göstergesi olarak simülasyon süresinin yeterliliğini belirler. Şekil 4.121'daki grafikte çok yüksek ortalama değerlere sahip olmasının yanında serideki bileşiklerin geneli 50 ns'dan sonra stabildir. Bileşiklerin RMSD değerlerinde ab2'nin oluşturduğu kompleks simülasyon sonrasında yükselen bir trend göstermiştir. Bileşikler arasında düşük RMSD seviyelerindeki

ab14, ab7, ab1, ab9 ve ab6 bileşikleri Fmk1 proteini üzerinde hareketi sınırlayıcı bir etkinliğe sahip görünmektedir. Bu sınırlama, bileşiklerin Mg^{+2} ile koordinasyon oluşturduğu düşünüldüğünde etkileşimin patojenin fizyolojik süreçlerinde etkileşimi devam ettireceği protein yapıdaki hareket sınırlaması nedeni ile devam edeceğine dair önemli bir bulgudur. Bileşik serisindeki ab4 ve ab12 ise bu sınırlamanın tam tersi, fazladan hareketliliğe sahiptir. Bu hareketliliğin Fmk1 proteini üzerindeki etkisinin proteinin doğal hareketinden farklı konformasyonlara neden olarak düşük enerji olanların fizyolojik süreçlerde hakim olma potansiyeli protein dinamiklerinin ileri analizi ile belirlenebilir.

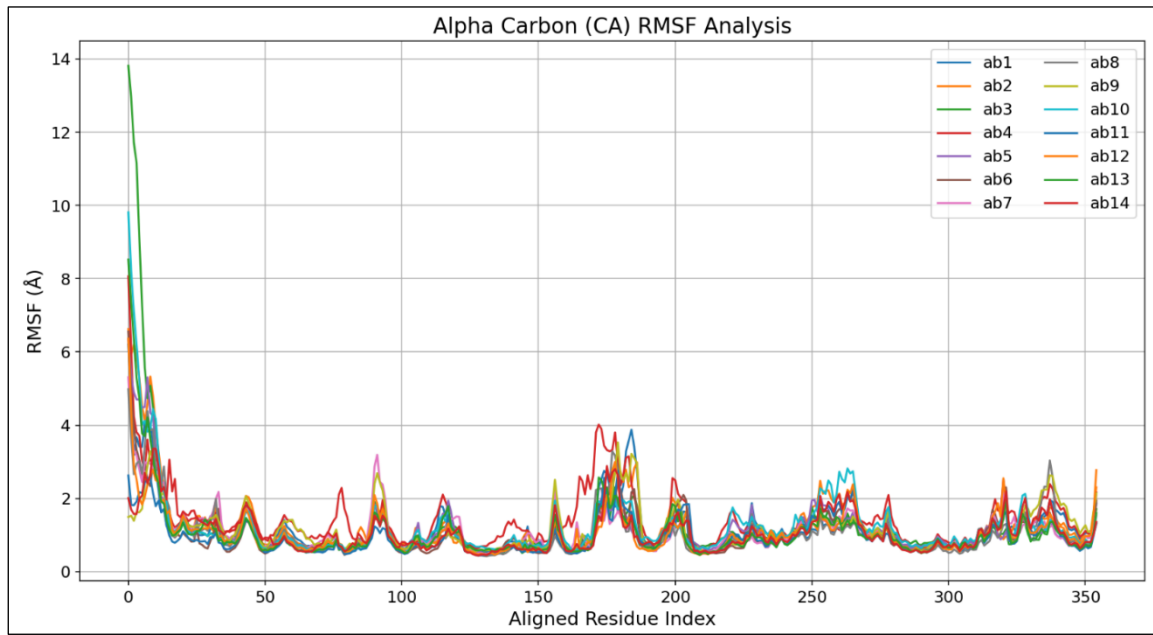


Şekil 4.121. 200 ns simülasyonlarda ab1-14 serisi bileşiklerinin RMSD grafikleri

Kök ortalama kare dalgalanması (RMSF)

RMSF verileri protein yapıdaki yerel dalgalanmaları ve hareketleri belirlemek için kullanılarak protein omurgasının ve hareketli uçların ne ölçüde dalgalandığının ölçüsünü gösteren değerlerdir. Sarmal yapılar gibi sert bölgelerin az dalgalanması beklenirken, serbest uçlar gibi bölgelerin daha fazla dalgalanması beklenir. Fmk1 protein yapısı RMSF grafiğinde görüldüğü gibi çoğunlukla sert bir yapıya sahiptir ve oldukça az dalgalanma göstermiştir. Sarmal yapıların protein yapı etrafında dolanarak oluşturduğu bütünlüklü

yapıda beklenen bir durumdur. Protein yapıda 175 kalıntı numaralarının oluşturduğu bölge protein yapının aktif bölgesini oluşturması bakımından hareketli olduğu **Şekil 4.122’de** açıkça görülmektedir. Aktif bölge, protein yapılarda “iş yaparken” hareket ederek değişen bölgesel konformasyonu ile enzimatik reaksiyonların katalizlenmesinde etkili olur. Fmk1 proteininde de hem bağlanma bölgesi hem de aktif bölge bu bölgededir. Bundan dolayı bu bölgedeki dalgalanmanın engellenmesi bölgedeki bileşiğin proteini terketmesini zorlaştıracaktır. Bu durumu bileşiklerin büyük bir kısmı net olarak düşük dalgalanma oranları ile sağlarken ab14 ve ab11 bileşikler biraz daha dalgalı bir hareket yapmıştır.



Şekil 4.122. 200 ns simülasyonlarda ab1-14 serisi bileşiklerinin RMSF grafikleri

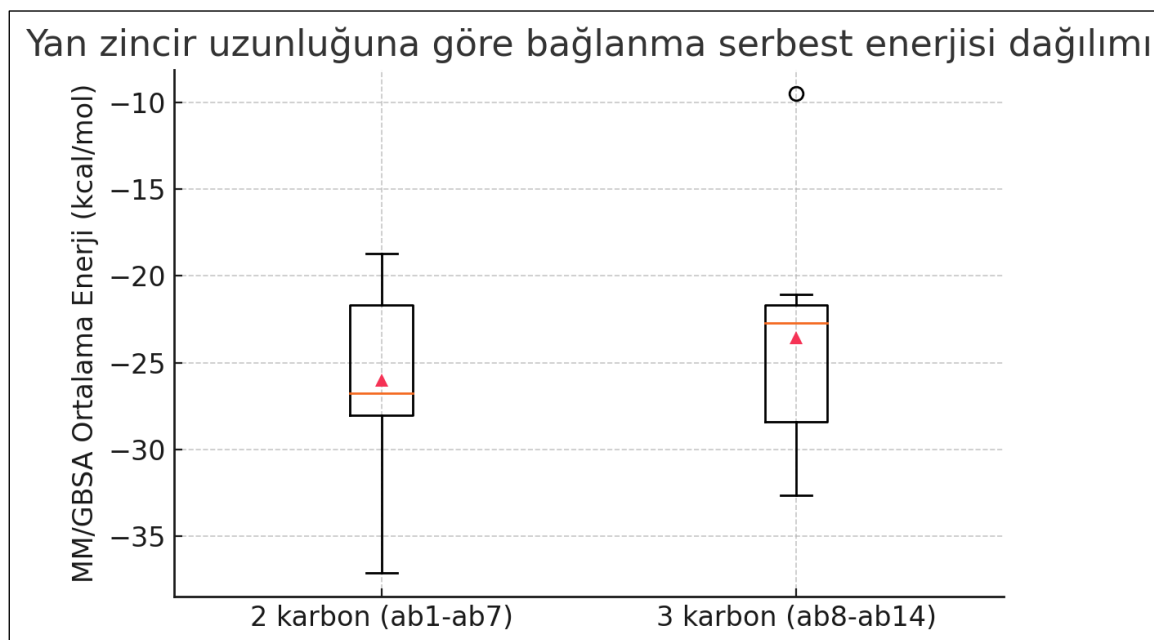
4.3.4. Protein dinamikleri ve serbest enerji ilişkisi

MM/GBSA hesaplamalarından elde edilen enerji değerli moleküler dinamik simülasyonlarının her bir frame’inde yer alan protein-ligand kompleksi için hesaplanmıştır. Toplamda iki bin frame’den oluşan simülasyonlarda enerji değerlerinin ortalaması alınmış ve standart sapması hesaplanmıştır. Buradaki standart sapma hesaplaması yöntemin doğruluğunu ve sonuçların kesinliğini göstermekten daha çok protein-ligand kompleksinin serbest enerjisinin ortalama değerlerinden simülasyon boyunca uzaklaşmasının bir ölçüsü olarak kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. MM/GBSA enerji ortalamaları ve standart sapma değerleri

Bileşik	MM/GBSA enerji ortalaması (kcal/mol)	Standart Sapma (ortalama değerden uzaklaşma yoğunluğu)
ab1	-37, 09	8, 35
ab2	-27, 87	7, 16
ab3	-18, 72	5, 91
ab4	-24, 54	6, 13
ab5	-28, 20	4, 97
ab6	-26, 76	6, 21
ab7	-18, 79	7, 81
ab8	-30, 18	6, 73
ab9	-32, 62	7, 46
ab10	-21, 07	6, 85
ab11	-9, 52	5, 77
ab12	-22, 73	7,90
ab13	-22, 25	6, 59
ab14	-26, 64	6, 25

Serbest enerji değerleri boyut indirgeme ile konformasyon uzayının analizi yapılmadan tek başına değerlendirildiğinde yan zincir uzunluğuna bağlı olarak ab1-7 bileşiklerinin (yan zincir uzunluğu iki karbon) enerji ortalaması -25, 99 kcal/mol iken ab8-14 bileşiklerinin (yan zincir uzunluğu üç karbon) enerji ortalaması -23, 57 kcal/mol'dür. Enerji değerlerinin dağılımı yan zincir uzunluğuna göre dağılımı Şekil 4.123'te grafiksel olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.123. MM/GBSA enerji hesaplamasında yan zincir uzunluğuna göre dağılım

Ancak yan zincir uzunluğu iki karbon olan bileşiklerin üç karbon olan bileşiklere göre genel değerlendirmede daha avantajlı serbest enerji değerlerine sahip olması istatistiksel olarak

birbirinden anlamlı bir fark içermemektedir. Her bileşik için Fmk1-bağlı ortalama serbest enerji ve çerçeve varyasyonu elde edildiğinde; iki grup, bileşik düzeyi ortalamalar üzerinden Welch t-testi, Mann-Whitney U, Levene, Hedges g ve ± 3 kcal mol⁻¹ sınırlarında çift yönlü TOST eşdeğerlik analizleri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Welch t-testi ($t = -0.65$, $p = 0.53$) ve Mann-Whitney U ($U = 21$, $p = 0.71$) yan zincir uzamasının bağlanma enerjisini istatistiksel olarak değiştirmedeğini göstermiştir. Etki büyüklüğü küçük (Hedges g = -0.33) ve eşdeğerlik kanıtlanamadı ($p_{TOST} = 0.91$). Aykırı ab11 çıkarıldığında ise fark ≈ 0 kcal mol⁻¹'e inmiştir.

İstatistiksel olarak sadece serbest enerji değerleri üzerinden elde edilen bilgiler doğrultusunda protein dinamiklerinin analizi olmadan yan zincir uzunluğunun bağlanma afinitesinde bir fark olamadığı, çalışmanın sadece kompleks kararlılığı üzerinden değerlendirilemeyeceği, konformasyonel kararlılıklarının dikkate alınması gerektiği tespit edilmiştir.

Bileşik serimizin Fmk1 proteini ile oluşturduğu, özellikle oktehdral geometrideki koordinasyonun stabilitesini değerlendirmek, protein dinamiklerinin doğasını anlayarak değişen protein konformasyonu ile oluşturduğu metastabil konformasyonlar ve farklı konformasyonları tespit etmek için difüzyon haritası boyut indirgeme yöntemi serbest enerji verileri ile ilişkili olarak analiz edilmiştir. Protein yapıya herhangi bir ligand bağlı değilken (apo form) gerçekleşen hareket ile serimizdeki bileşikler bağlıyken gerçekleşen hareketlerin karşılaştırılması protein yapının işlevselliği hakkında iç görüler elde etmemizi sağlamıştır.

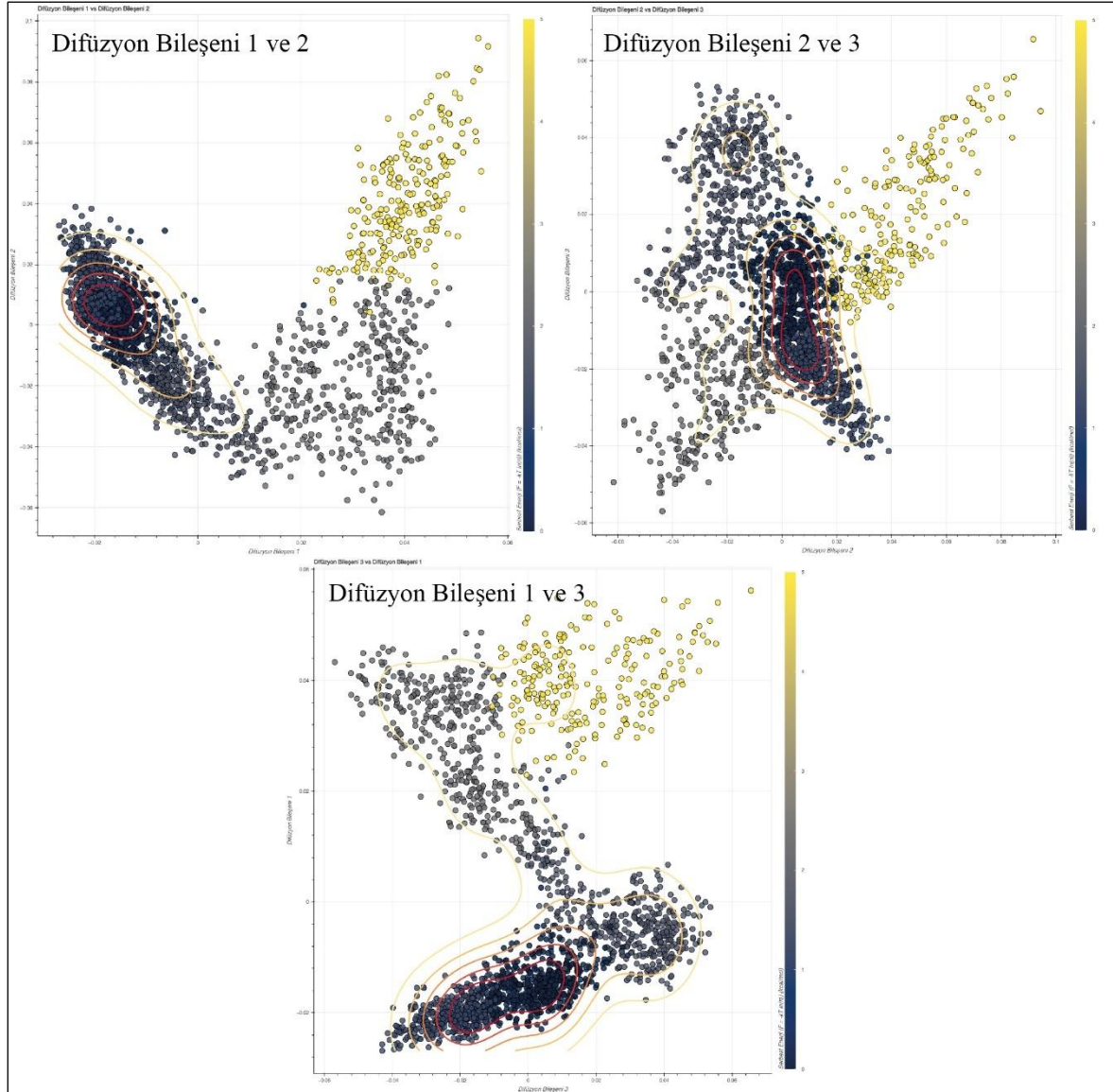
Az sayıdaki konformasyon kümelenmesi protein yapının sınırlanarak proteinin işlevinin yerine getirilemez şekilde bileşiklerimiz tarafından sınırlanarak aynı konformasyonel hareketi sürekli tekrarlayarak doğal hareketini yapamaz hale gelme potansiyeli olduğunu göstermektedir. Serbestlik derecesinin çok fazla olarak tanımlanabileceği ve birden fazla konformasyon kümelenmesinin belirlendiği komplekslerde Fmk1 proteinin doğal işlevinden çok daha farklı bir hareket ile ATP'den fosfat koparmasını imkânsız kıldığı sonucuna varılmıştır.

Apo form yapısı ile benzer hareketlerin gerçekleştiğinin tespiti ise aktif bölge yarığının fizyolojik koşullarda kısa sürede bölgedeki bileşik ile ilişkisini tıpkı ATP molekülüne yaptığı gibi kısa sürede bitirip doğal işleyişine devam etme potansiyelini gösterir. Bu aşamada Fmk1

protein yapısının ona bağlanan bileşik serimizdeki bileşiğin derişimine bağı olarak kısa sürede ilaç bileşiğini “tüketerek” ATP molekülüne tekrar ilgi göstermesi söz konusu olur ve Fmk1 işlevini devam ettirerek alt basamak sinyaline devam eder.

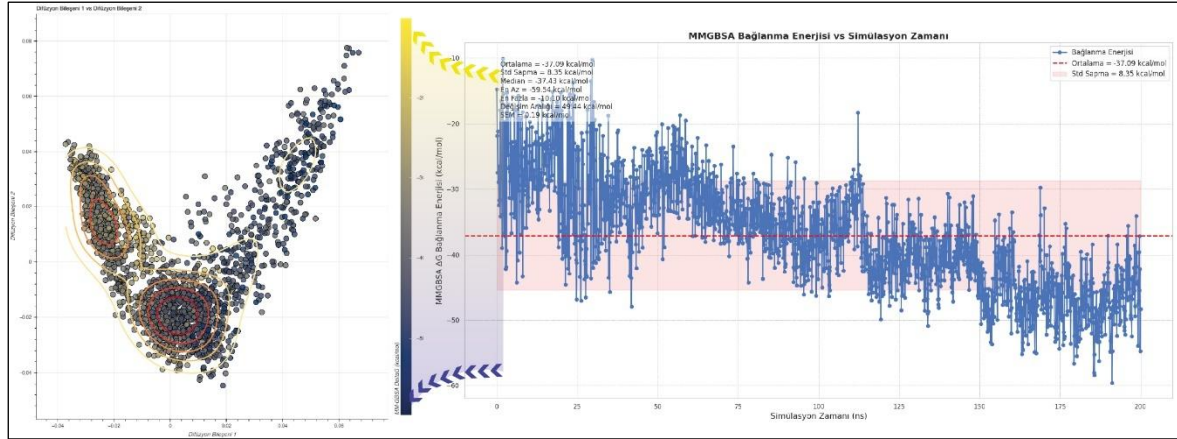
MM/GBSA hesaplaması ile elde edilen serbest enerji değerleri ise bileşik kompleksinin simülasyon boyunca kompleks kararlılığı hakkında fikir verir. Bu verilerin difüzyon haritalarındaki karşılığının konformasyon kümelenmelerinin düşük enerjili olması bu konformasyonun uzun zaman aralıklarında gerçekleşen olaylarda tercih edilen konformasyon olacağına dair çok önemli bir potansiyel kanıttır. Kümelenmelerin serbest enerji verilerinde görel olarak yüksek enerjili olması ile metastabil (yarı kararlı) konformasyonları temsil eder.

MM/GBSA hesaplaması ile simülasyonun her frame’i için elde edilen değerlerin dağılımında enerji düşüşünün trend ile belirgin olması kompleks kararlılığının yüksek olduğuna dair önemli bir işarettir. Böyle bir durumda ise bileşiklerin Fmk1 aktif bölge yarığına güçlü bir şekilde tutunduğunu ve bu bölgeden çıkarak Mg^{2+} ile koordinasyonun bozulmasının zor olduğunu gösterir. Dolayısıyla bu, aktif bölgenin uzun süre bileşikler tarafından işgal edilmiş şekilde kalarak ATP molekülünün bağlanmasını imkânsız kılması anlamına geldiği için önemli bir inhibisyon şartını da sağlamış olur. Şekil 4.124’te görülen apo formun konformasyon uzayında ATP molekülü ile ilişkisi görevini tek bir kararlı konformasyon tarafında gerçekleştirildiği görülmektedir. İçerisinde herhangi bir ligand bulunmadığı için MM/GBSA hesaplaması olmayan grafiklerde düşük enerjili konformasyonlar, simülasyon boyunca protein yapının oluşturduğu konformasyonların gerçekleşme sıklıklarına (olasılık yoğunluğuna) $F = -k T \ln(\pi)$ ’ye göre hesaplanmıştır, boyut indirgeme ise aynen uygulanmıştır.



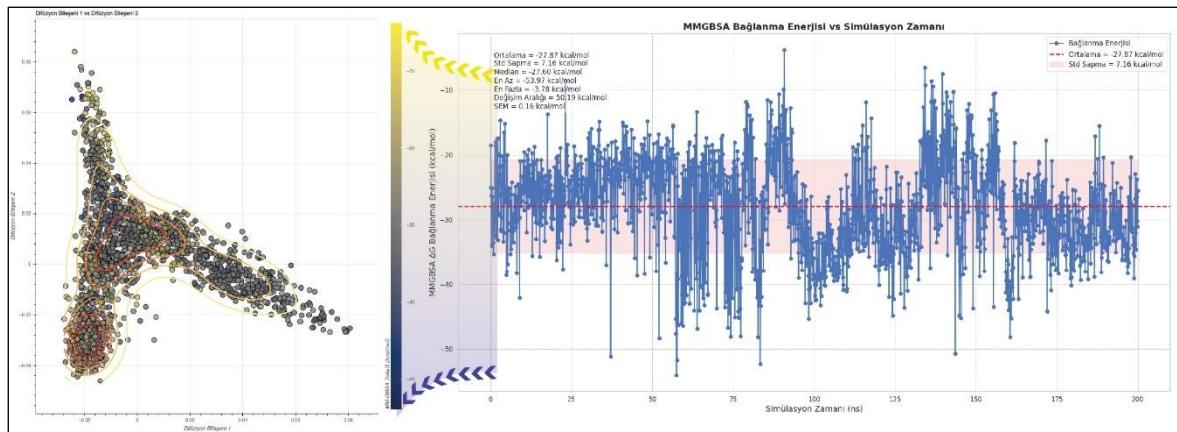
Şekil 4.124. Fmk1 protein yapının apo form difüzyon haritası boyut indirgemesi

ab1 bileşiğinin, Fmk1 ile oluşturduğu komplekste iki farklı kararlı konformasyonu simülasyon boyunca düşük enerjili olarak göstermiştir. Serbest enerji alçalan bir trend ile artmakta olan kompleks kararlılığını gösterirken ab1 bileşiğinin aktif bölgede kalma potansiyelini net olarak arttırmaktadır. Difüzyon bileşenleri ile serbest enerji değerlerinin apo form verileri ile karşılaştırılmasında ab1 bileşiğinin kısmi bir inhibisyon yapma potansiyeli olduğu, bileşiğin aktif bölgede kalma potansiyelinin tek başına tespit edilen bir parametre olması bakımından yüksek inhibisyon yapması zor görünmektedir. Bunun da temel sebebi kompleks kararlılığı artsa da konformasyon uzayında meydana gelebilecek değişimlerin ab1 bileşiğini aktif bölgeden çıkarma potansiyeli olmasıdır.



Şekil 4.125. Fmk1 protein yapının ab1 ile oluşturduğu kompleksin difüzyon haritası boyut indirgemesinin MM/GBSA verileri ile bütünleşmiş grafiği

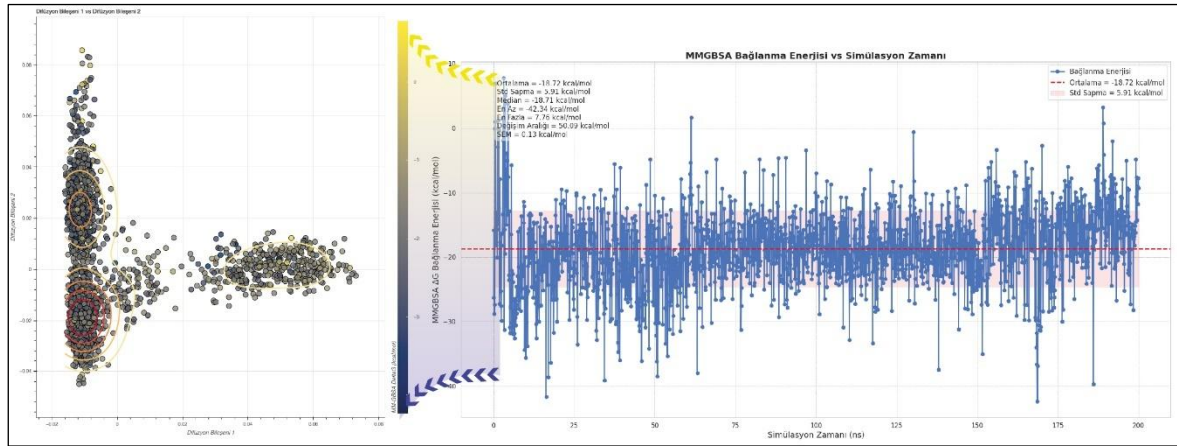
ab2'nin oluşturduğu kompleks iki farklı kümelenmeyi düşük enerjili konformasyonlarla göstermektedir. Ancak ab1 bileşiğinden farklı olarak iki farklı kümelenme arasında düşük enerjili konformasyonları içeren bir köprü bulunmaktadır. Bu durum iki farklı düşük enerjili konformasyon arasında geçiş potansiyelini artırır. MM/GBSA hesaplamalarında ise enerji değerleri çok fazla dalgalanarak düşük enerjiye sahip frame'lerdeki konformasyonların kalıcı olmadığını göstermektedir. Bu durum ab2 bileşiğinin Fmk1 üzerinde inhibe edici etki potansiyelinin sınırlı olduğunu gösterir.



Şekil 4.126. Fmk1 protein yapının ab2 ile oluşturduğu kompleksin difüzyon haritası boyut indirgemesinin MM/GBSA verileri ile bütünleşmiş grafiği

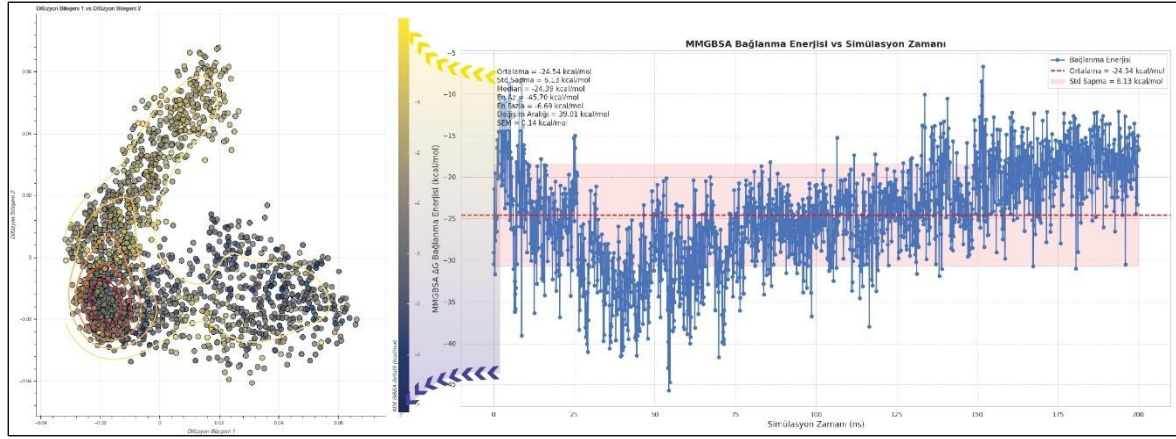
Bileşik ab3'ün Fmk1 ile oluşturduğu kompleks büyük oranda ab2 bileşiğinin oluşturduğu kompleksle benzer veriler üretmiştir ancak difüzyon haritasında ek olarak düşük yoğunluklu bir küme ile metastabil konformasyonu göstermektedir. Bu konformasyon uzayında yüksek

enerji bariyerleri ile korunan, ek bir konformasyonun oluşma potansiyeli şimdiye kadarki bileşiklerden biraz daha artan inhibisyon oranını gösterir. MM/GBSA enerji değerlerindeki stabil ancak diğer bileşiklerden daha yüksek ortalama değerler protein-ligand kompleksinin bozulma eğiliminde olabileceğine işaret eder. Tüm bu veriler birleştğinde yine düşük inhibisyon potansiyeline işaret etse de ab1 ve ab2 bileşiklerinden biraz daha iyi bir inhibisyon beklenebilir.



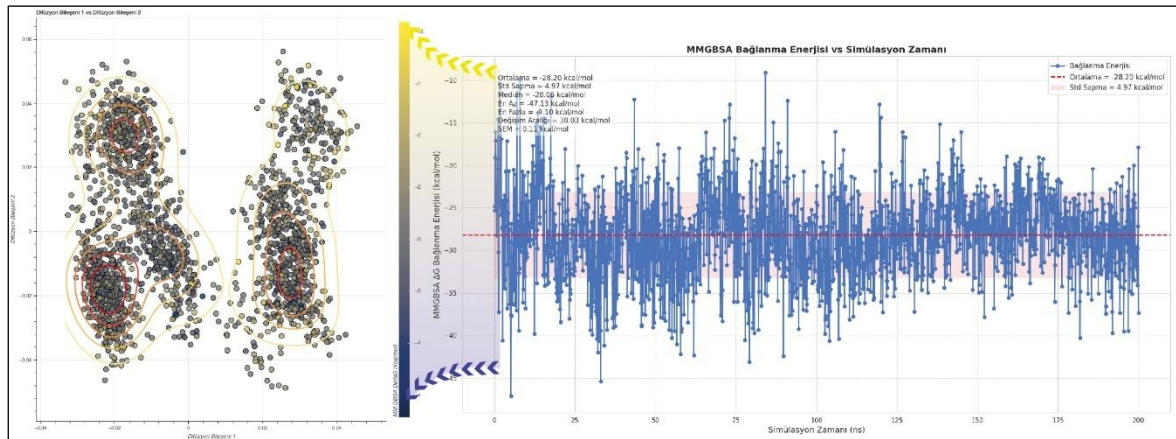
Şekil 4.127. Fmk1 protein yapının ab3 ile oluşturduğu kompleksin difüzyon haritası boyut indirgemesinin MM/GBSA verileri ile bütünleşmiş grafiği

Bileşik ab4'ün oluşturduğu kompleks apo form yapısı ile temel benzerlikleriyle hala aktif bölgenin işlevsel olabileceğine dair veriler üretmiştir. Bu durumun en belirgin göstergesi tek bir temel konformasyonda apo formdaki düşük enerjili tek konformasyona benzer dağılım göstermesidir. Bunun yanında MM/GBSA hesaplamasındaki yükselen trend kompleks kararlılığının giderek bozulacağı izlenimi vermektedir. Enerji değerlerinin simülasyonun son 50 ns'lik kısmında standart sapma bandının bile üzerine olması, band içerisine girecek kadar düşük enerjilerin kalıcı olmaması bileşiğin inhibisyon potansiyelini sınırlamakta ve fizyolojik koşullarda etkisinin sınırlı olmasına neden olacak potansiyeldedir.



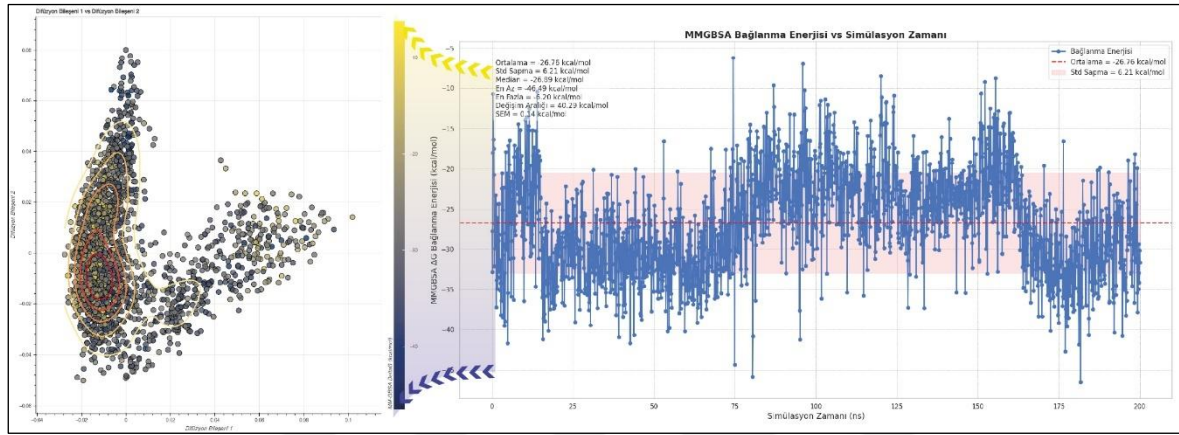
Şekil 4.128. Fmk1 protein yapının ab4 ile oluşturduğu kompleksin difüzyon haritası boyut indirgemesinin MM/GBSA verileri ile bütünleşmiş grafiği

Bileşik ab5'in Fmk1 proteini ile oluşturduğu kompleks moleküler dinamik simülasyon verileri difüzyon haritası grafiği ile artan konformasyon çeşitliliği ile artan inhibisyon potansiyeline işaret etmektedir. MM/GBSA hesaplaması verileri düşük enerji değerlerini tüm simülasyon süresince gösterir ve dar bir aralıkta dalgalanır. Elde edilen ortalama enerji değerlerinin düşük olması ve difüzyon haritasında elde edilen pek çok düşük enerjili konformasyon Fmk1 proteinin ab5 bileşiği tarafından doğal işleyişindeki konformasyonlardan çok farklı konformasyonlarda bulunma eğiliminde olduğunu gösterir. Bu konformasyonlar toplamda üç yoğun küme ile karakterize görünmektedir ve bunun yanında düşük enerjili kısmi bir kümelenme bulunmaktadır. Konformasyon uzayında konformasyon arasında yüksek enerji bariyerleri olduğu ve birbiri arasında geçişin oldukça zor olması inhibisyon potansiyelini gösteren bir başka inhibisyon koşulunu gösterir.



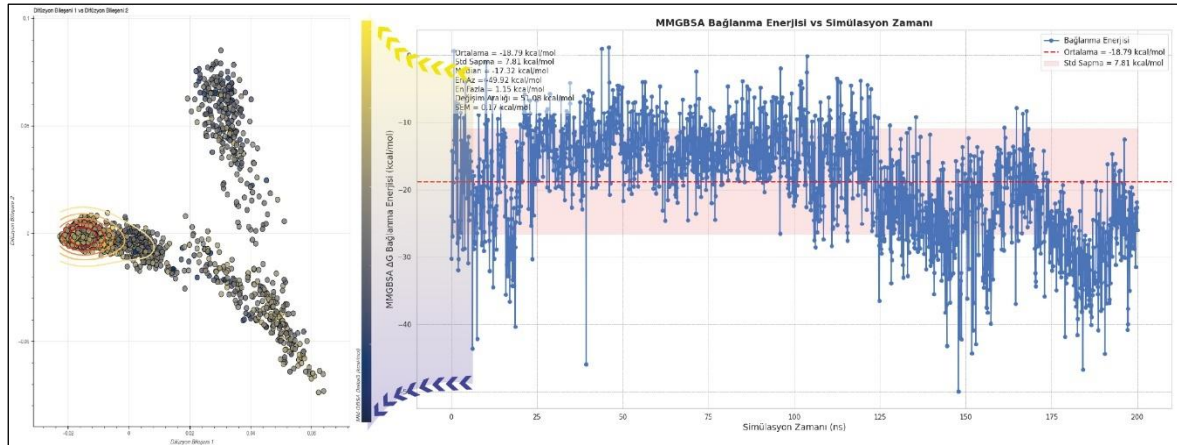
Şekil 4.129. Fmk1 protein yapının ab5 ile oluşturduğu kompleksin difüzyon haritası boyut indirgemesinin MM/GBSA verileri ile bütünleşmiş grafiği

Bileşik ab6 tek bir kararlı konformasyon ile Fmk1 protein yapısı ile etkileşim halindedir. MM/GBSA enerji hesaplaması düşük bir ortalamaya sahip olsa da belirli zaman aralıklarında dağılmaktadır. Bu dalgalanma 50 ns aralıkla periyodiktir. Bileşiğin oluşturduğu kompleksin oldukça net tek bir kararlı konformasyonla apo form yapısına benzemesi ancak apo form grafiğinden daha yoğun bir küme bulundurması konformasyonel sınırlama ile kısmi inhibisyona işaret etme potansiyeli vardır.



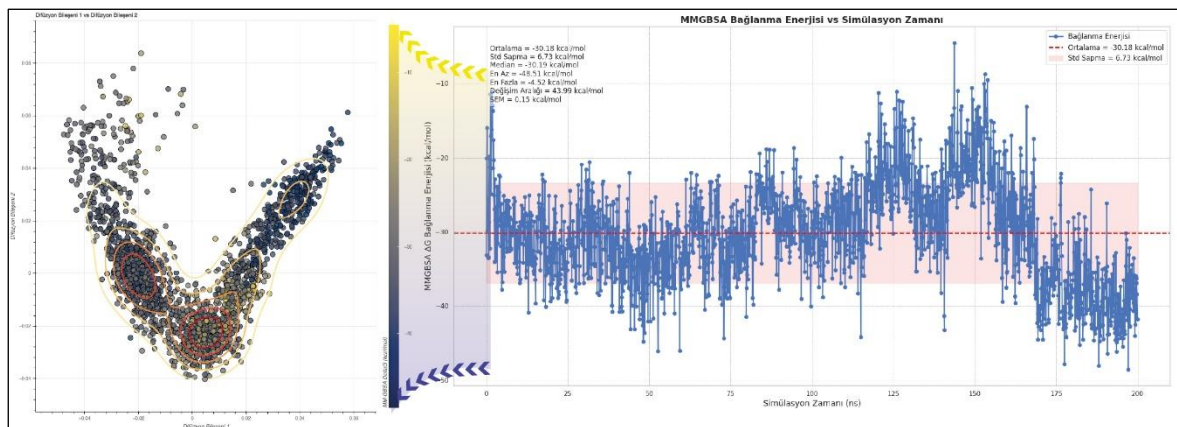
Şekil 4.130. Fmk1 protein yapısının ab6 ile oluşturduğu kompleksin difüzyon haritası boyut indirgemesinin MM/GBSA verileri ile bütünleşmiş grafiği

Bileşik ab7 ve Fmk1 proteinin oluşturduğu kompleks çok yoğun iki konformasyonel küme ile karakterizedir. Çok güçlü inhibisyona hem konformasyonel sınırlama hem de apo formdan farklı konformasyonla potansiyel oluşturan bileşik düşüş trendindeki MM/GBSA enerji değerleri ile karakterize görünmektedir. Çok yoğun olan konformasyonel kümelenmeyi düşük enerjili kısmi bir kümelenme ile gösteren bileşik ab serisinde güçlü inhibisyon potansiyeli barındıran tek bileşik olma potansiyelini gösterir.



Şekil 4.131. Fmk1 protein yapının ab7 ile oluşturduğu kompleksin difüzyon haritası boyut indirgemesinin MM/GBSA verileri ile bütünleşmiş grafiği

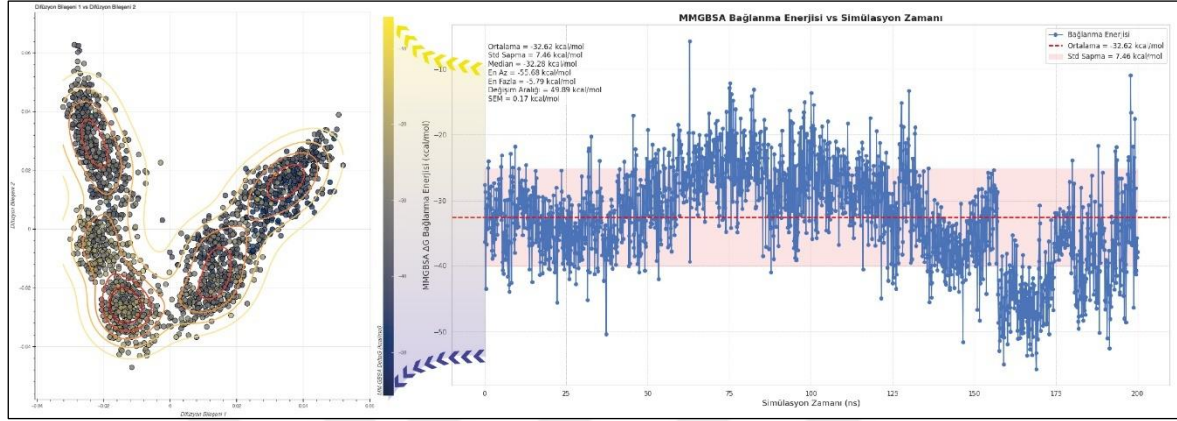
Birden çok düşük enerjili yüksek yoğunluklu kümelenmeyi gösteren ab8-Fmk1 kompleksi difüzyon haritası oldukça düşük MM/GBSA değerleri ile kararlı bir kompleks oluşturarak protein-ligand kompleksini uzun süre koruyacağını göstererek yüksek inhibisyon potansiyelini ortaya koyar. İki düşük enerjili konformasyonel kümelenmenin arasındaki kesişim bölgesindeki biraz daha yüksek enerjili kümelenme ile üç farklı konformasyon gösteren kompleks protein yapıyı doğal işleyişinin dışına çıkararak bu konformasyon uzayında kararlı kılmaktadır.



Şekil 4.132. Fmk1 protein yapının ab8 ile oluşturduğu kompleksin difüzyon haritası boyut indirgemesinin MM/GBSA verileri ile bütünleşmiş grafiği

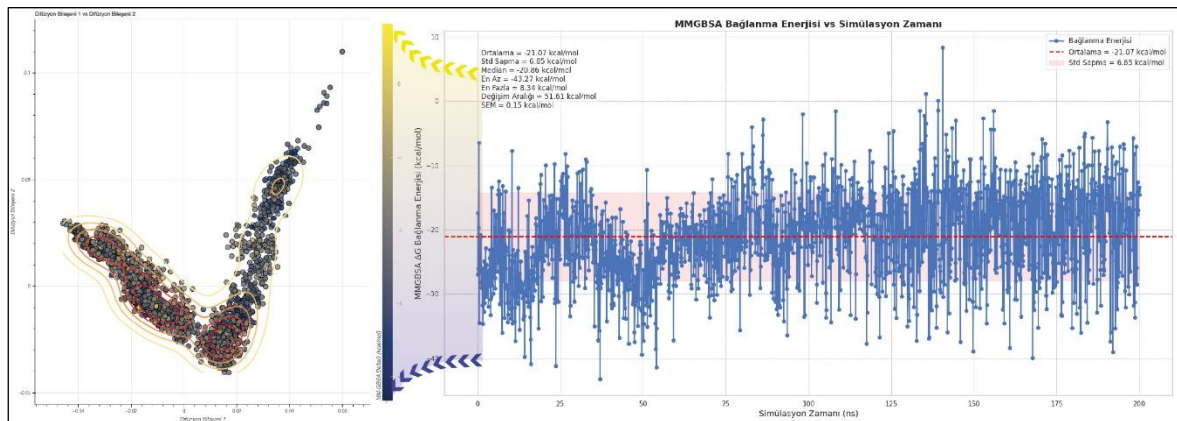
ab9 bileşiği çok fazla kararlı konformasyona düşük enerjili yoğun kümelerle işaret etmektedir. Dört farklı yüksek kararlılık seviyesindeki temel konformasyonu gösteren difüzyon haritası grafiği MM/GBSA hesaplamaları ile elde edilen düşük enerji değerlerin

alçalan trendiyle yüksek inhibisyon potansiyelini net olarak göstermektedir. Yüksek enerji bariyerleri ile sınırlanan bu kararlı konformasyonun fazla sayıda olması protein yapının doğal işleyişinin dışındaki hareketinin ab9 bileşiği tarafından kararlı kılındığını net olarak göstermektedir.



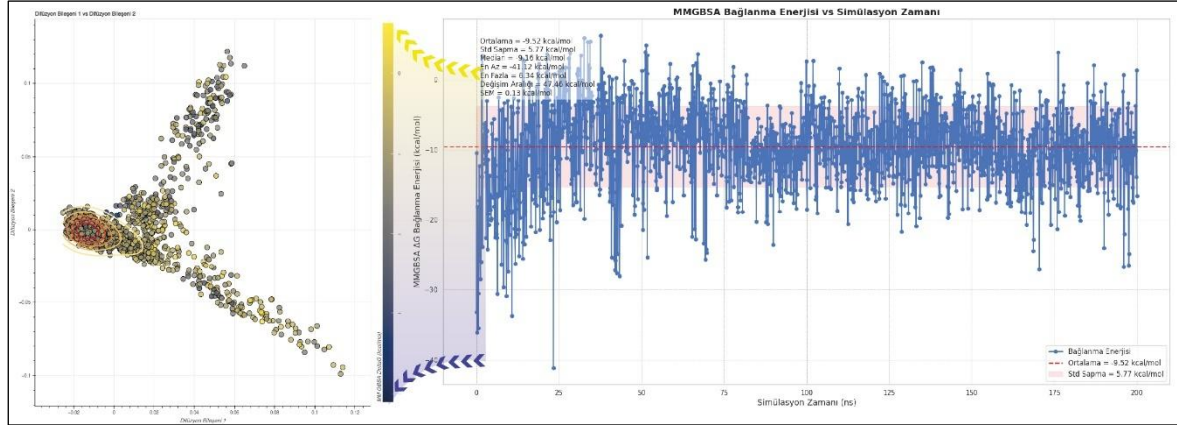
Şekil 4.133. Fmk1 protein yapının ab9 ile oluşturduğu kompleksin difüzyon haritası boyut indirgemesinin MM/GBSA verileri ile bütünleşmiş grafiği

Bileşik ab10'un Fmk1 proteini ile oluşturduğu kompleksin verileri ab9 bileşiğine benzerdir ancak konformasyon uzayındaki düşük enerjili konformasyon kümelenmelerinin daha yoğun olması daha yüksek inhibisyon potansiyeli olduğunu gösterir. Bunun yanında MM/GBSA hesaplaması ile dar aralıktan geniş bir aralıkta frekans göstermesine rağmen aynı hızda ve ortalama değerin tam ortasında stabildir.



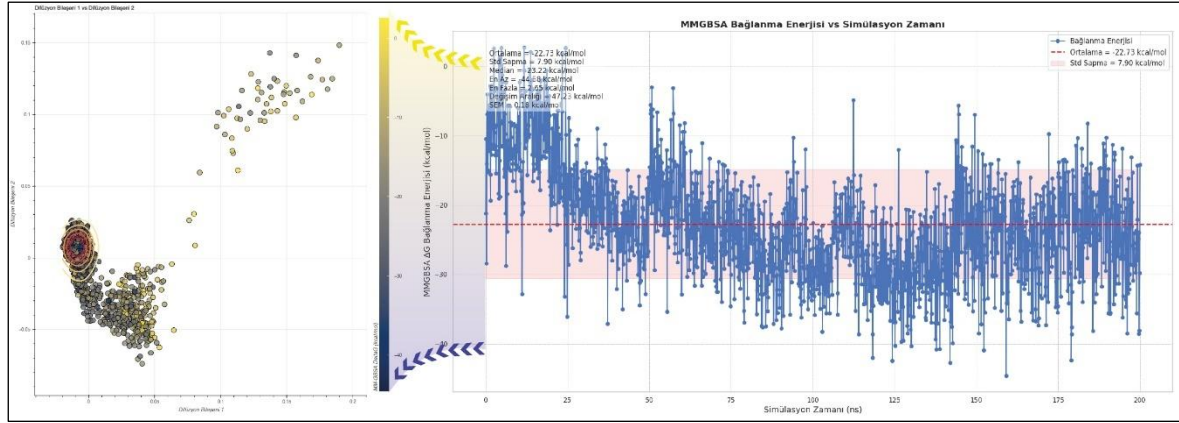
Şekil 4.134. Fmk1 protein yapının ab10 ile oluşturduğu kompleksin difüzyon haritası boyut indirgemesinin MM/GBSA verileri ile bütünleşmiş grafiği

Bileşik ab11 diğer bileşiklerin tamamından farklı olarak yüksek enerjili tek bir konformasyona işaret etmekte ve bu da MM/GBSA hesaplamalarından elde edilen enerji değerlerindeki görece olarak oldukça yüksek değerlerle kompleks kararlılığının bozulma eğiliminde olduğunu göstermektedir.



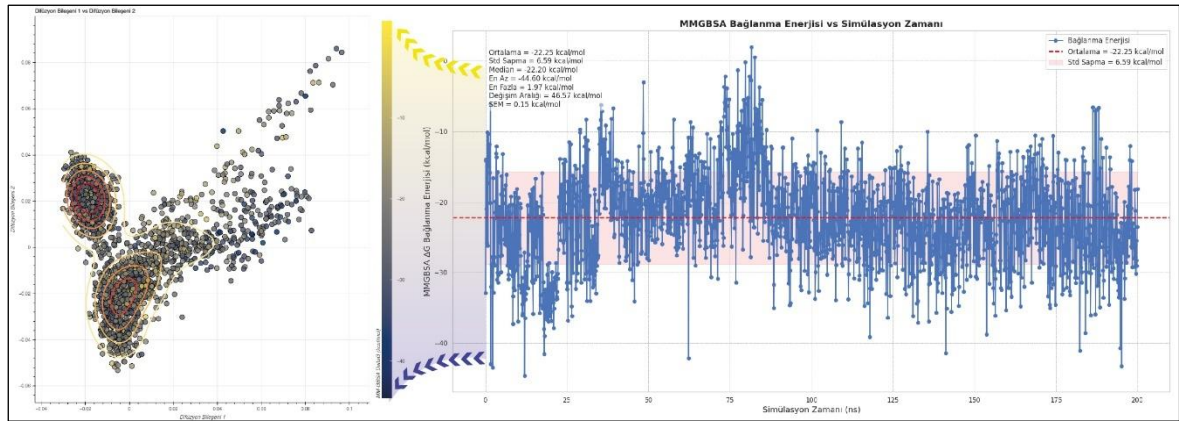
Şekil 4.135. Fmk1 protein yapının ab11 ile oluşturduğu kompleksin difüzyon haritası boyut indirgemesinin MM/GBSA verileri ile bütünleşmiş grafiği

ab12 bileşiği Fmk1 protein yapısıyla oluşturduğu komplekste tek bir düşük enerjili konformasyon kümesini oldukça yoğun içermektedir ve bu konformasyonel kısıtlama ile inhibisyon potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. MM/GBSA enerji hesaplamaları ile serbest enerjideki düşüş trendi aktif bölge yarığındaki ligandın bağlanma stabilitesini arttıran bir etki içerdiğini gösterir ve bu aktif bölge yarığının fazladan meşgul edilmesi ile substrat bağlanımı oranını düşürür. Konformasyon uzayındaki sınırlı perspektif MM/GBSA hesaplamalarından elde edilen enerji değerleri ile güçlü bir inhibisyon potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.136. Fmk1 protein yapının ab12 ile oluşturduğu kompleksin difüzyon haritası boyut indirgemesinin MM/GBSA verileri ile bütünleşmiş grafiği

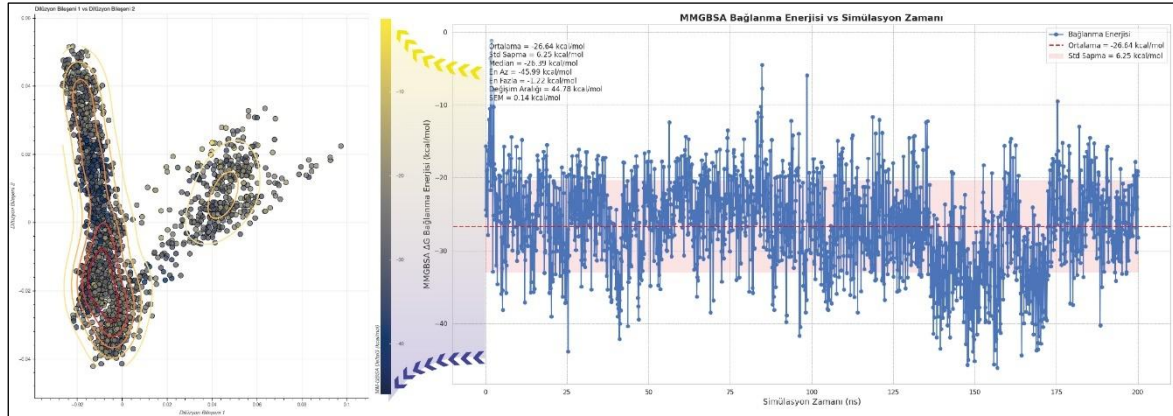
Bileşik ab13 düşük enerjili yoğun konformasyon kümelenmeleri ile MM/GBSA hesaplamalarında düşük enerjili plato seviyeleri ile güçlü inhibisyon potansiyeline sahiptir. İki düşük enerjili konformasyon kümelenmesi arasındaki boşluk yüksek enerji bariyerleri ile sınırlanan iki farklı konformasyonun fiziksel koşullarda neredeyse eşit olasılıklarda tercih edilebileceğini gösterirken bu iki konformasyondan birinin oldukça yoğun difüzyon bileşenlerine sahip olması inhibisyon şartlarında olasılığa bağlı tahmin edilmesi güç bir potansiyel olduğunu da gösterebilir.



Şekil 4.137. Fmk1 protein yapının ab13 ile oluşturduğu kompleksin difüzyon haritası boyut indirgemesinin MM/GBSA verileri ile bütünleşmiş grafiği

Bileşik ab14 difüzyon bileşenleri tek bir düşük enerjili konformasyon kümesine işaret ederken apo form difüzyon bileşenlerine benzerliği ile düşük inhibisyon potansiyeline sahiptir. Konformasyon uzayında sınırlamaya sahip olmadığı düşük enerjili konformasyon kümelenmesinin yukarıya doğru yayılımından açıkça bellidir ve bu da aktif bölgenin hala

doğal işleyişini sürdürme potansiyeline sahip olduğunu gösterir. MM/GBSA enerji değerlerinin düşük değerlerde bulunması ve bu seviyede stabil olması protein yapının konformasyon uzayındaki hareketinin bu seviye ve yönde kalıcı olduğuna işaret ederek inhibisyon potansiyelinin düşük olması beklentisini güçlendirmektedir.



Şekil 4.138. Fmk1 protein yapının ab14 ile oluşturduğu kompleksin difüzyon haritası boyut indirgemesinin MM/GBSA verileri ile bütünleşmiş grafiği

Difüzyon bileşenlerinin MM/GBSA ile bütünleşik olarak analizinde genel olarak ab8-14 aralığının yüksek inhibisyon potansiyeli yan zincir uzunluğundaki artan karbon sayısı ile ilişkili olduğu göstermiştir. Difüzyon bileşenlerindeki MM/GBSA enerji değerleri ile eşleşmiş konformasyonlarda inhibisyon potansiyelinin mekanizması karışık sinyaller verse de daha çok konformasyonel sınırlamalarla gerçekleşen bir etkinin olduğu görülmüştür ancak protein yapıyı doğal hareketinden uzaklaştırma eğilimine sahip bileşiklerde bulunmaktadır.

4.4. *in vitro* Deneyler

4.4.1. *Fusarium oxysporum*'a karşı etkinlik

Bilimsel iş birliği kapsamında Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi'nden Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yusuf BAYAR tarafından *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* üzerinde *in vitro* gerçekleştirilen deneyler gerçekleştirilmiştir:

Hedef bileşiklerin *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*'ye karşı antifungal aktiviteleri değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar Propamocarb-HCl (P+) ile karşılaştırılmıştır.

Sonuçlar Çizelge 4.2’de gösterilmiştir. *In vitro* yapılan testler sonucunda, tüm hedef bileşiklerin bitki patojenine karşı belirli düzeylerde inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre, konsantrasyona bağlı olarak en yüksek antifungal aktivite ab10 (%54.79, %48.22, %44.76) bileşiğinde gözlemlenmiştir. Bu bileşik, özellikle yüksek konsantrasyonda Propamocarb-HCl’ye en yakın inhibitör etkiye sahip bileşik olarak öne çıkmaktadır. Bunun yanı sıra, ab8 (%43.01, %41.55, %40.15), ab7 (%42.77, %40.82, %39.00) ve ab13 (%46.60, %31.13, %29.36) bileşikleri de dikkate değer düzeyde antifungal aktivite göstermiştir. Orta derecede inhibisyon oranına sahip bileşikler arasında ab6 (%32.66, %30.71, %28.74), ab9 (%36.33, %36.25, %34.50) ve Ab12 (%38.45, %36.32, %31.26) bulunmaktadır. Bu bileşiklerin aktivitesi, yüksek etkiye sahip bileşiklerden daha düşük olmakla birlikte, patojen üzerinde belirgin bir antifungal etki sergiledikleri görülmüştür. Buna karşın, ab1, ab2, ab4, ab5, ab11 ve ab14 gibi bileşikler nispeten daha düşük inhibisyon oranlarına sahiptir ve genellikle %30’un altında bir antifungal etki göstermektedir. Özellikle ab2 (%26.83, %17.68, %15.48) en düşük inhibitör etkiye sahip bileşiklerden biri olarak dikkat çekmektedir.

Çizelge 4.2. DMSO ile hazırlanan ab1-14 bileşikleri çözeltilerinin derişime bağlı *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* inhibisyon oranları.

Bileşik	İnhibisyon Oranı (%) ^a		
	10 ⁻² M	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M
ab1	25.89±1.81	25.15±1.37	24.82±3.19
ab2	26.83±2.63	17.68±0.75	15.48±2.88
ab3	32.68±0.23	31.03±0.51	30.46±1.28
ab4	27.19±0.62	26.74±1.45	24.99±1.50
ab5	31.03±2.83	22, 98±1.29	22.02±2.78
ab6	32.66±2.68	30.71±2.12	28.74±2.48
ab7	42.77±1.02	40.82±0.80	39.00±1.23
ab8	43.01±1.28	41.55±1.45	40.15±4.86
ab9	36.33±2.93	36.25±2.99	34.50±0.74
ab10	54.79±1.73	48.22±3.15	44.76±1.46
ab11	32.28±3.56	28.91±2.18	25.96±2.93
ab12	38.45±3.48	36.32±2.36	31.26±2.74
ab13	46.60±1.52	31.13±3.66	29.36±3.14
ab14	27.34±0.83	26.28±1.93	25.88±2.99
Propamokarb-HCl (P+)	65.11±2.05	65.11±2.05	65.11±2.05
N- (Control)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

^a üç tekrarın ortalama değeri ± standart sapma.

Tüm bileşikler incelendiğinde, genel olarak antifungal etkinin konsantrasyon bağımlı olduğu gözlemlenmiştir. Konsantrasyon azaldıkça inhibitör etkinlik düşüş göstermektedir. Ancak ab10 ve ab8 gibi bazı bileşikler, düşük konsantrasyonlarda bile yüksek antifungal etki

göstermeye devam etmektedir. Sonuç olarak, ab10, ab8, ab7 ve ab13 en güçlü antifungal aktiviteye sahip bileşikler olarak belirlenmiş ve potansiyel biyofungisit adayları olarak öne çıkmıştır. Bu bileşiklerin daha ileri toksisite ve etki mekanizması çalışmalarına tabi tutulması gerekmektedir.

4.4.2. Bitki büyümesini teşvik eden bakteriler (PGPR) üzerine etki

Bilimsel iş birlikleri kapsamında ab1-14 serisi bileşiklerinin endüstriyel, geniş kapsamlı ve ticari kullanımına yönelik olarak, başta tarım alanları olmak üzere çevreye etki potansiyelleri bitki büyümesini teşvik eden *Bacillus aryabhattai*, *Bacillus subtilis*, *Pantoea vagans*, *Chryseobacterium lathyr*, *Bacillus (Priestia) megaterium*, *Pseudomonas brassicacearum*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas vancoverensis* bakterileri türleri üzerinde Ankara Hacı Bayram Veli Üniversitesi Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Hatice ÖĞÜTCÜ tarafından geniş kapsamlı *in vitro* deneyler gerçekleştirilmiştir.

Yapılan çalışma sonucunda PGPR özelliğinde olan bakterilerin sentezlenen bileşiklerden etkilenmediği veya çok az etkilendiği saptanmıştır. Bileşiklerden ab2, ab3, ab4 ve ab12'nin *B. subtilis*'de etkili olmadığı belirlenmiştir. *B. megaterium*'da; ab1, ab2, ab3, ab4, ab5, ab7, ab8, ab11, ab13, ab14'ün ve *B. aryabhattai*'de ise; ab1, ab2, ab3, ab4, ab11, ab12'nin ve *Chryseobacterium lathyr*'de ise tüm bileşiklerin herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. *Pantoea vagans*'da; ab5, ab14'ünve *Pseudomonas brassicacearum*'da ab1, ab2, ab3, ab5, ab7, ab8, ab12, ab13, ab14'ün etki göstermediği saptanmıştır. İlaveten *Pseudomonas koreensis* ve *Pseudomonas vancoverensis*'de tüm bileşiklerin farklı oranlarda (12 mm-30 mm) inhibisyon aktivitesinin olduğu belirlenmiştir.

Fusarium oxysporum'a karşı pozitif kontrol bileşiğine karşı yakın etki gösteren ab10 bileşiği derişime bağlı sınırlı zone çağı ile bu bakteriler üzerinde kısmi etki yapmıştır. Diğer etkili bileşikler olan ab7, ab8 ve ab13 ise bu bakteriler üzerinde ab10 bileşiğinden çok daha sınırlı etkiler yapmaktadırlar.

Çizelge 4.3. Sentezlenen ab1-7 serisi bileşiklerinin antimikrobiyal aktivite sonuçları

		Bileşiklerin Oluşturduğu Zon Çapları (mm)						
Bakteriler	Derişim (µg/ml)	ab1	ab2	ab3	ab4	ab5	ab6	ab 7
<i>Bacillus subtilis</i>	10 ⁻²	16	-	-	-	15	20	17
	10 ⁻³	-	-	-	-	15	15	15
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	14	12	15
<i>B.megaterium</i>	10 ⁻²	-	-	-	-	-	15	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	15	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	10	-
<i>B. aryabhatai</i>	10 ⁻²	-	-	-	-	20	17	15
	10 ⁻³	-	-	-	-	15	16	15
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	15	16	14
<i>C. lathyri</i>	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. vagans</i>	10 ⁻²	23	20	20	20	-	15	20
	10 ⁻³	20	17	15	18	-	14	15
	10 ⁻⁴	20	15	12	-	-	13	13
<i>P.brassicacearum</i>	10 ⁻²	-	-	-	15	-	15	-
	10 ⁻³	-	-	-	14	-	11	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. koreensis</i>	10 ⁻²	15	20	25	30	20	20	18
	10 ⁻³	15	20	15	21	20	18	18
	10 ⁻⁴	15	18	15	20	13	17	12
<i>Pseudomonas vancouverensis</i>	10 ⁻²	25	23	25	25	20	20	18
	10 ⁻³	25	21	22	20	17	20	17
	10 ⁻⁴	25	20	-	20	16	19	15

Çizelge 4.4. Sentezlenen ab8-14 serisi bileşiklerinin antimikrobiyal aktivite sonuçları

		Bileşiklerin Oluşturduğu Zon Çapları (mm)						
Bakteriler	Derişim (µg/ml)	ab 8	ab 9	ab10	ab11	ab12	ab13	ab14
<i>Bacillus subtilis</i>	10 ⁻²	15	15	14	12	-	16	15
	10 ⁻³	13	13	12	11	-	16	14
	10 ⁻⁴	12	12	12	10	-	15	14
<i>B.megaterium</i>	10 ⁻²	-	14	25	-	20	-	-
	10 ⁻³	-	13	16	-	20	-	-
	10 ⁻⁴	-	12	16	-	15	-	-
<i>B. aryabhatai</i>	10 ⁻²	20	15	13	-	-	15	20
	10 ⁻³	20	15	13	-	-	12	20
	10 ⁻⁴	18	14	-	-	-	12	20
<i>C. lathyri</i>	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. vagans</i>	10 ⁻²	20	23	24	15	22	15	-
	10 ⁻³	20	20	20	15	20	15	-
	10 ⁻⁴	18	20	15	14	20	13	-
<i>P.brassicacearum</i>	10 ⁻²	-	17	14	17	-	-	-
	10 ⁻³	-	15	12	15	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	14	12	13	-	-	-
<i>P. koreensis</i>	10 ⁻²	15	20	20	25	23	20	25
	10 ⁻³	15	20	20	25	17	20	23
	10 ⁻⁴	12	18	19	20	16	15	15
<i>Pseudomonas vancouverensis</i>	10 ⁻²	23	23	25	21	20	20	25
	10 ⁻³	22	20	25	20	18	20	23
	10 ⁻⁴	18	20	23	20	18	18	20

Literatür incelenmesi sonucunda; *B.megaterium* [187, 188], *Bacillus subtilis* [189] *Pseudomonas* spp. [190–192] türlerinin PGPR özelliklerinin olduğu (azot fiksasyonu, fosfat çözücülüğü, IAA üretimi, siderofor üretimi, HCN üretimi) belirtilmiş olup bizim çalışmamızda da bu türlerden *B.megaterium*'e karşı ab1, ab2, ab3, ab4, ab7, ab8, ab11, ab13 ve ab14 bileşiklerinin, *Bacillus subtilis*'e karşı ab2, ab3, ab4 ve ab12 bileşiklerinin, *B. aryabhatai*'e karşı ab1, ab2, ab3, ab4, ab11 ve ab12 bileşiklerinin inhibisyon aktivitelerinin olmadığı tespit edilmiştir.





5. TARTIŞMA

Bileşik serisi ab1-14'ün sentezlenmesi başarılı şekilde gerçekleşirken, başta karbamat fonksiyonel grubunun ^{13}C -NMR verilerinde görülen 155-170 ppm arasındaki sinyal konum itibariyle karbamat grubundaki karbonil karbonun literatürdeki konumları ile uyumludur [193]. ^{13}C -NMR ile karbamat fonksiyonel grubunun başarılı şekilde sentezlendiğini gösteren bu bilgi çıkış bileşiklerimiz olan hidroksil grubu içeren bileşiklerin ^1H -NMR'daki yayvan hidroksi pikinin tamamen kaybolmasıyla reaksiyonun istenen konumdan gerçekleştiğini net şekilde gösterir. Çıkış bileşiklerindeki alifatik karbon ve hidrojenlerin konumlarındaki NMR verilerinde nihai ürünlerimiz olan triazolkarbamat bileşiklerinde de aynı konumlarda görülmesi yapısal bütünlüğün korunarak gerçekleşen reaksiyonların kanıtlarındandır. Aromatik bölgelerde gözlenen NMR sinyalleri hem karbon hem de hidrojenlerin konumları bakımından yüksek kesinlikli konumsal doğrulamayı her bir bileşiğimiz için sağlamaktadır. HRMS (APCI-TOF) verilerinde bileşiklerimizin elde edildiğine dair kütle hatalarının ppm mertebesinde olduğunun tespiti bileşiklerin elde edildiklerini net bir şekilde ortaya koyar.

Bileşiklerin sentezindeki değişen verimler DFT hesaplamaları ile elde edilen kararlı konformasyonlarla ve elektronik yapıyla yüksek uyum içerisindeydi. Gözle görülür şekilde düşük verimle elde edilen ab3 ve ab10 bileşiklerinin ortak özelliği klorun karbamat grubuna bağlı fenil halkasında meta konumunda ve triazole bağlı fenil halkasında para konumunda klor bulunmasıdır. DFT çalışmasında özellikle molekül içi etkileşimlerin karbamat grubunun dihedral açısı bükülmesini desteklemesiyle oldukça fazla sayıdadır. Karbamat grubunun alifatik karbon zincirinde bükülmeye oldukça müsait bir yapı oluşturması bileşiklerin birbirine bakan aromatik halkaların konumlarından çok daha fazla uyum içerisindedir. Birbirine molekül içi etkileşimlerle yönelmiş iki uçta bulunan aromatik halkaları HOMO-LUMO sınır orbitallerini de karşılıklı olarak üzerlerinde barındırmaları sağlanmış görünmektedir. Bileşik serisindeki ab3 ve ab10 bileşikleri haricindeki bileşiklerde de görülen bu durum özellikle karbamat grubunun olduğu taraftaki fenil halkasında yan zincir uzunluğu iki karbon olan bileşiklerde hafif sapmalarla belirgindir.

Bileşiklerin tamamında olan düşük çözünürlük, saflaştırma işleminde zorluklar yarattığından ve bileşiğin saf olarak elde edilmesini, yan üründen ayrılmasını zorlaştırması bakımından önemlidir. DFT çalışması ile gerçekleştirilen yüksek seviyeli optimizasyon bileşiklerin katlanmış konformasyonun yüksek kararlılığını onaylarken, bileşiklerin

katlanmış konformasyonlarını sabit tutan molekül içi etkileşimlerin çözücü moleküllerinin bileşiğin etrafını sarmasını zorlaştıracak şekilde yorumlanmıştır. Düşük verimlerle elde edilen bileşiklerimizin reaksiyon ortamında çok daha fazla miktarda olduğu ince tabaka kromatografisinde açıkça görülmüştür ancak düşük çözünürlük nedeniyle saflaştırma işleminin gerçekleştirilmesi zorlaşmıştır. Bileşiklerin, başta saflaştırma ve yapı aydınlatma girişimlerinin bir gereği olarak çok geniş perspektifte pek çok çözücü ile çözünürlüğü değerlendirildi. Bu değerlendirme sırasında alifatik zincir uzunluğu iki karbon olan bileşiklerde yüksek polarlık içeren çözücüler (DCM, asetonitril, kloroform ve bunun gibi) de dahil çözünürlük sınırlı kalmıştır. Metil alkol ve etil alkol gibi alkolik çözücülerde çözünürlükleri çok daha fazladır. Tetrahidrofuran (THF) içerisinde de çözünürlüğü bir miktar bulunmaktaydı. Yan zincir uzunluğu üç karbon içeren bileşiklerde çözünürlük beklenildiği üzere daha fazladır. Kloroform ve DCM başta olmak üzere polar çözücülerde de tam çözünme gözlemlendi. Tüm bu verilerle değerlendirildiğinde alifatik zincir uzunluğu iki karbon olan ab1-7 bileşiklerinin alkol türevleri ve THF'deki çözünürlüğü kararlı konformasyonlardaki molekül içi etkileşimlerin bahsedilen çözücüler tarafından kırılarak molekülün etrafının çözücü molekülleri ile sarılma olanağı oluşturması olarak yorumlanmıştır [194–196]. Bu çözücü moleküllerinin ortak özelliklerine bakıldığında ise içerdikleri oksijen atomu sayesinde DCM ve diğer polar çözücülere kıyasla (daha apolar olmalarına rağmen) hidrojen bağı veya halojen bağı yapabilme kapasitelerinin daha fazla olduğu açıktır. DFT çalışmasında özellikle bileşiklerin tamamında görülen “U” şekilli, katlanmış kararlı konformasyonların klor atomundan halojen bağı yaparak molekül içi etkileşimlerin kırılması ile daha düz bir konformasyona açıldığı düşünülebilir. Alifatik zincir uzunluğu üç karbon olan bileşiklerde ise molekül içi etkileşimlerin kırılması uzamış olan alifatik zincirin serbestlik derecesinin artması sonucu etkileşimlerin daha kolay kırılma potansiyeli ile açıklanır. DFT çalışmasında $\Delta E_{\text{boşluk}}$ değerindeki yüksek değer aralığı bileşiklerin “sert” olduğu ve inert yapıları konformasyonlarını koruma eğiliminde olduklarını göstererek çözünürlük faktöründeki açıklamamızı destekler [197, 198]. Bu veriler ışığında fenil halkalarına klor substitüsyonu yerine atom çapı daha büyük substitüsyonlar kullanılması çözünürlüğü ve verimi arttırabilir sonucuna varılmıştır. Bunun dışında benzer atom çapına sahip ancak elektronik yapısı molekül içi etkileşimlere daha az izin veren grupların kullanımı da başta biyolojik etkinlikler olmak üzere bileşiğin kullanımı ve deney alanlarını değiştirmeden aynı veya çok benzer özellikler sergilemesini sağlayabilir.

Bileşiklerin DFT çalışması alifatik zincir uzunluğundaki değişimin $\Delta E_{\text{boşluk}}$ başta olmak üzere parametreler üzerinde büyük bir değişim yaratmasa da bileşiklerin elektrostatik potansiyel, elektron yoğunluğu, HOMO ve LUMO sınır orbitallerinin enerjileri bakımında kendi aralarında çapraz korelasyona sahip olduklarını göstermiştir. Klor sübstitüsyonun fenil halkalarındaki konumları elektronik yapının genelinde ince ayar yaparak özellikle Fmk1 proteini ile olan etkileşimlerde belirgin özellikler sergilemesini sağlamıştır. Bu özelliklerin başında QM/MM kenetlenme çalışmasında belirlenen birbiriyle neredeyse aynı olan bağlanma konformasyonlarına rağmen tek nokta enerji ve QSite uygulamasında değişen elektronik yapı karakteri gelmektedir. Özellikle LUMO sınır orbitali konumlarındaki değişimlerden anlaşılacağı üzere etkileşimler triazol grubu ve ona bağlı fenil halkasındaki elektronik yapıyı büyük oranda değiştirmiş ve en yüksek değişim alifatik zincir uzunluğu üç karbon olan bileşiklerin meta sübstitüe olan bileşikler olarak tespit edilmiştir. Moleküler kenetlenme çalışmasında elektronik yapısındaki değişimle karakterize afinite potansiyeli hangi fenil halkasında olduğu fark etmeksizin klor atomunun pozisyonunun meta>orto>para şeklinde genel bir sıralamaya sahip görünmektedir. Bu sıralama kendi içerisinde meta konumundaki klor atomunun karbamat grubuna bağlı fenil halkasında olması bakımında ayırım göstermektedir.

Bir ligandın protein yapıya afinitesinin yüksek olmasının o proteine etkisi üzerinde tek başına gerçekçi bir fark yaratmaması ve etkileşim sürekliliği ile dinamik süreçlerin incelenmesi gerekliliği QM/MM kenetlenme çalışmaları ile oluşturulan Fmk1-ligand komplekslerin moleküler dinamik simülasyonları ile incelenmesini gerekli kılmıştır [132, 136, 180, 199]. Kompleks kararlılığı ve sürekliliğine ışık tutan çalışmada hiçbir ligandın Fmk1 proteinden ayrılmaması ve devamlı etkileşim halinde bulunması tüm bileşiklerin Fmk1 protein yapısına QM/MM kenetlenme çalışmasındaki bilgilere oldukça paralel şekilde afinitesi olduğunu göstermiştir. Buna rağmen moleküler dinamik çalışması moleküler mekanik prensiplerini kullanması bakımından QM/MM kenetlenme çalışmasından ayrı incelenmiştir.

Protein yapının RMSD değerleri ile incelenmesi moleküler dinamik simülasyonun ilk başladığı andan itibaren bazı bileşiklerin yüksek sapma değerleri ile karakterize olarak söz konusu bileşiğin aktif bölge içerisinde atılmasına neden olma potansiyelini gösterir. Bu durum en çok ab4 ve 12'de belirgindir. RMSF grafiklerinde ise ab11 ve ab14 bileşikleri Fmk1 proteini üzerinde fazladan dalgalanmalara neden olmuştur. Bu iki veri birlikte

değerlendirdiğinde bu bileşiklerin düşük inhibisyon potansiyellerine sahip olması beklenebilir ve bu durum MM/GBSA enerji değerleri ile bütünleştirilmiş difüzyon haritalarına yansımıştır. Sadece ab12 ve ab7 bileşiklerinin *in vitro* sonuçları hesaplamalı çalışmalarla doğrudan ve net olarak açıklanamamaktadır. Bu tutarsızlık ab12 bileşiğinin MM/GBSA hesaplamalarında tespit edilen ortalama değer standard sapmasının yüksek olmasıyla, moleküler dinamik simülasyonu boyunca geniş bir dağılım sergileyerek fizyolojik koşullarda daha kararsız olmasının muhtemel olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Yani gerçek enerji değeri kararsız olmasını sağlayacak aşırı bir uçta yer alıyor olabilir. Bileşiklerden ab7 ise Mg^{+2} ile oluşturduğu koordinasyon itibari ile farklı çalışmalarla etkisi açıklanabilir.

MM/GBSA hesaplamaları ile elde edilen enerji değerleri tek başlarına değerlendirildiğinde Mg^{2+} ile oluşan koordinasyonun gücü hakkında bilgi verir. Buna göre Fmk1 proteinin en güçlü kompleksleri ab1 ve ab8 bileşikleriyle gerçekleşmiştir. Bu bileşikler klor atomu içermemesi, yani sadece fenil halkalarına sahip olmalarını bakımından bir ortak özellik barındırır. Bu durum ab1 ve ab8 bileşiklerinin QM/MM kenetlenme çalışmalarında elektronik özelliklerdeki büyük ölçüde değişmesi ile uyum içindedir. Moleküler mekanik ve kuantum mekaniği birbirinden ayrı prensiplerle çalışmalarına rağmen birbirleriyle uyumlu bilgiler üreterek elektron çekici klor atomu bulunmayan bileşiklerdeki ağırlıklı olarak karbamat grubu üzerinden değişen elektronik yapı özelliklerini işaret etmektedir [200–202]. Karbamat grubundaki karbonik oksijeni üzerinden gerçekleşen Mg^{2+} koordinasyonu en çok bu iki bileşikte belirgindir.

Bileşiklerdeki fonksiyonel grubu birbirine bağlayan köprü karbon zinciri uzunluğunun MM/GBSA enerjileri tek başlarına değerlendirildiğinde anlamlı olarak birbirinden farklı değildir. MM/GBSA hesaplamalarına göre bileşik serimizin iki farklı uzunluktaki karbon zincirine sahip grubu görece aynı veya benzer etkiyi yapmaktadır. Ancak difüzyon haritaları ile protein dinamikleri değerlendirildiğinde iki grup arasında belirgin fark olduğu görülür. Aktif bölge cebinde bulunan bileşiğin oluşturduğu kompleksin, bileşiğin protein yapı dinamikleri üzerindeki etkisi belirlenmeden değerlendirilmesinin açıkça korelasyonun tespit edilememesine neden olacağı bu durum, üç karbon içeren zincir uzunluğundaki bileşiklerin Fmk1 protein yapısına özgü şekilde daha etkili bir inhibisyon yaptığını göstermektedir [203–205]. Boyut indirgemeli analizi iki temel konformasyona sahip ab1 bileşiğinin düşük enerji bariyerlerinin sık aşılması sonucu gerçekleştireceği hareket ile bileşik ab1'i cepten dışarı

itebilir. Bileşik ab1'in neden olduğu düşük enerjili konformasyonlardan birisinin Fmk1 apo form difüzyon bileşenlerine benzemesi protein yapının doğal işleyişini sürdürme eğiliminde olduğunu göstermektedir. Bileşik serisinde alifatik zincirde iki karbon içeren bileşiklerden sadece ab5 inhibisyon şartlarını sağlayabilir gibi görünmektedir. Bunun başlıca nedeni de protein yapıyı olağan işleyişinden çok fazla düşük enerjili konformasyona geçirme eğilimini düşük enerji bariyerlerinin kolayca aşılmasını sağlama yoluyla yapmasıdır. Yani Fmk1 proteini doğal işleyişinin çok dışına çıkarak uzun süre işlevini yapar halde kalamayacaktır. Bu durum kompleks kararlılığının -28, 20 kcal/mol değeri ile değerlendirildiğinde ab1-7 bileşikleri arasında en iyi inhibisyonu yapma potansiyeline sahip olduğu açıktır. Ancak alifatik zinciri üç karbon içeren serideki diğer bileşiklerle mukayese edilebilir bir potansiyel barındırması mümkün gözükmemektedir.

Bileşik serisinde ab7-14 bileşiklerini oluşturan alifatik zincirlerinde üç karbon içerenler ise MM/GBSA enerji değerleri ile bütünleştirilmiş difüzyon haritalarında ab9 bileşiği hariç tam bir konformasyonel sınırlamayı göstermektedir. Düşük enerjili konformasyonların çok yoğun kümelenmesi bazı belirli konformasyonların dışına çıkılmasının bileşikler tarafından açıkça engellendiği görüşü ile oldukça tutarlıdır [206]. Bileşikler aktif bölgede, QM/MM kenetlenme çalışmasında tespit edilen, sahip oldukları elektron yoğunluğuyla karbamat grubu üzerinden Mg^{2+} ile paylaşarak güçlü şekilde hareketini engellemektedir ve Fmk1 proteinini belirli bir konformasyonda tutmaktadır.

Bileşik serimizden MM/GBSA ile bütünleşmiş difüzyon haritası ile en yüksek inhibisyon potansiyeli ab10 ve ab13 olarak belirlenmiştir. İki bileşiğin difüzyon haritası boyut indirgemesi benzer özelliklerinin başında iki farklı düşük enerjili konformasyon kümesinin yüksek enerji bariyerleri ile ayrılmasıdır.

Sentezlenen bileşiklerin *Fusarium oxysporum* organizması ve bitki büyümesini teşvik eden bakteriler üzerinde gerçekleştirilen *in vitro* çalışmaları hesaplamalı çalışmalarla elde edilen bilgileri büyük oranda desteklemektedir. *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*'a etkisi değerlendirilen bileşiklerimiz arasında en yüksek etki alifatik karbon zincirinde üç karbon içeren bileşikler olduğu tespit edilmiştir. En yüksek inhibisyon, 10^{-2} M düzeyinde $54,8 \pm 1,7$ ile ab10'da gözlenmiş; bu değer Propamokarb-HCl'nin referans aktivitesinin yaklaşık %84'üne karşılık gelerek, serideki en umut verici adayın ab10 olduğunu hesaplamalı çalışmalarla paralel şekilde göstermiştir. Yakından takip eden ab8 ($43,0 \pm 1,3$) ve ab7

(%42, $8 \pm 1, 0$), ortama daha düşük molar girdilerde dahi görelî olarak yüksek etkinliklerini sürdürerek (10^{-4} M'de sırasıyla %40, $2 \pm 4, 9$ ve %39, $0 \pm 1, 2$) güçlü doz-tepkime sürekliliği sergilemiştir. Bu süreklilik, fungusidal etki mekanizmasının konsantrasyon eşiğine bağımlı olmadığını, muhtemelen hedef enzim veya membran bileşenine yüksek afinite ile bağlanıldığını düşündürmektedir. Aynı zamanda hesaplamalı çalışmalardaki yüksek uyum, bileşiklerin MAPK yolağında Fmk1'i doğrudan hedeflediğini ve bu enzim üzerinden organizmanın hayat döngüsüne etki ettiğine dair de önemli bir kanıt sağlamaktadır.

ab13'ün 10^{-2} M'de %46, $6 \pm 1, 5$ iken 10^{-3} M'de %31, $1 \pm 3, 7$ 'ye düşmesi ve daha seyrek konsantrasyonda neredeyse sabitlenmesi, serinin geri kalanından ayrışan belirgin bir duyarlılık eşiğine işaret etmektedir. Bu durum, bileşiğin çözünürlük sınırlamaları veya hücre zarı penetrasyonunda bir tıkanma noktasına sahip olabileceğini gündeme getirerek Fmk1 ile ilişkili hesaplamalı yaklaşımlarda elde edilen ab13 bileşik ilişkisini doğrular. Yani ab13 bileşiği hesaplamaları çalışmalarda elde edilen bilgilerdeki yüksek afinitesini gösterirken belirli bir derişim eşiğinin altında hücre içerisine girmekte zorlanacağı için etkisi giderek zayıflar. Öte yandan ab2 ve ab5 gibi orta düzey başlangıç aktivitesi gösteren bileşiklerdeki keskin düşüş, metabolik stabilite gibi farmakokinetik parametrelerde optimizasyon ihtiyacını vurgulamaktadır. Bu durumun başlıca nedenleri arasında yine DFT çalışması ile belirlenen bileşiklerin çözünürlükleri hakkında yorumlarla paralelliktir.

Yapısal açıdan bakıldığında, en yüksek potensiyel sergileyen ab10, ab8 ve ab7'nin meta-ve para- klor substituenti içermesi, elektron çekici grup etkisinin hedef enzime bağlanmayı kolaylaştırdığı literatür bulgularıyla uyumludur. Triazol halkasının güçlü hidrojen bağlayıcı karakteri ve karbamat köprüsünün lipofilik kütle merkezi oluşturması, hücre zarını geçerken bileşik-membran etkileşimini optimize ederek içsel hücre ölümü baskısını artırmış olabilir. Bu çift yönlü etki, MAPK yolaklarından Fmk1 homologlarına kadar geniş bir hedef paneli üzerinde çoklu müdahaleyi mümkün kılarak direnç gelişimini büyük oranda engelleme potansiyeline sahiptir. Böyle bir durumda patojen, herhangi tekil mutasyonla tüm etki ağını bypass edemeyecektir.

Bununla birlikte, Propamokarb-HCl'nin hâlen tüm konsantrasyon aralığında açık üstünlüğü (%65, $1 \pm 2, 1$) koruduğu göz önüne alındığında, yeni bileşiklerin gerçekçi bir rekabet oluşturması için tespit edilen inhibitör etkinliğinin yanında çevreye olan sınırlı olumsuz etkisi ile marjinal fayda sağlayabilir. Özellikle ab10'un referans moleküle yaklaşan etkinliği,

küçük yapısal modifikasyonlarla da hedefe tam parite sağlanabileceğini işaret etmektedir. Diğer adayların ise, kombinatorial stratejilerde yardımcı ajan olarak kullanılıp sinerjik etki yaratma potansiyeli taşıdığı değerlendirilebilir. Bileşik ab10 ise DFT çalışması ile belirlenen çözünürlük artırıcı özelliklerle ile yapısal olarak korunarak klor atomunun başka bir halojenle değiştirilmesi yoluyla etkinliği çözünürlüğe paralel olarak artırılabilir.

Sonuç olarak, 1, 2, 3-triazoilkarbamat kütüphanesinde özellikle ab10 ve onu takip eden ab8-ab7 ikilisi, *Fusarium oxysporum*'a karşı referans moleküle yaklaşan etkinlikleriyle gelecek çalışmalar için öncelikli lider bileşikler olarak öne çıkmaktadır. Bu adayların hesaplamalı yaklaşımlarla elde edilen etki mekanizma tayin çalışmaları ve *in planta* doğrulamaları, sürdürülebilir bitki koruma stratejilerine yenilikçi çözümler sunma potansiyelini desteklemektedir.

Bitki büyümesini teşvik eden bakteriler üzerindeki çalışmalar ise bileşik serimizin çevre sağlığı üzerinde ve büyük çaplı kullanım güvenliği konusunda kapsamlı bir araştırma sonuçları sunmuştur. Bileşiklerimiz *Bacillus aryabhatai*, *Bacillus subtilis*, *Pantoea vagans*, *Chryseobacterium lathyr*, *Bacillus (Priestia) megaterium*, *Pseudomonas brassicacearum*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas vancouverensis* bakterilerine karşı yapılan çok kapsamlı deneylerde bu organizmalara karşı ya çok az etki ettiğini ya da hiç etki etmediğini açıkça göstermektedir. Bu kapsamlı çalışmalar bileşiklerimin doğrudan Fmk1 protein yapısı ve MAPK yolağını da hedeflediği yönünde çıkarımlar yapmamızı sağlamıştır. Bitki büyümesini teşvik eden bu bakterilerin yaşam döngülerine hâkim olan proteinlere ve MAPK ile benzer yolakları incelediğimizde aynı veya benzer görevleri yerine getiren proteinlerin serin/treonin protein kinaz enzimleri olduğunu tespit ettik [207–209]. Fmk1 protein yapısının O-fosfo-L-treonil oluşumunu ATP'den kopardığı fosfat grubu ile sağlaması bakterilerde treonin protein kinaz enzimleri tarafından benzer prensiplerle gerçekleştirilir. Bu organizmaların treonin kinaz enzimlerinin *Fusarium oxysporum*'da bulunan Fmk1 protein yapısına sekans benzerlikleri ise Çizelge 4.5'te görüldüğü gibi son derece düşüktür.

Çizelge 5.1. *Fusarium oxysporum*'da bulunan Fmk1 proteini ile aynı görevi bitki büyümesini teşvik eden bakterilerde gerçekleştiren proteinlerin sekans benzerliği

Organizma	Benzer Protein (UniProt Kodu)	Sekans Benzerliği (%)
<i>Bacillus aryabhattai</i>	Serin/treonin protein kinaz (UniProt A0A0J6Q4S5)	%30
<i>Bacillus subtilis</i>	Serin/treonin-protein kinaz PrkC	%32
<i>Pantoea vagans</i>	HipA toksin kinazı (Ser/Thr kinaz; UniProt A0A0B1REV0)	%25
<i>Bacillus (Priestia) megaterium</i>	Serin/treonin protein kinaz (PrkC-benzeri; UniProt A0A2B2DVM3)	%33
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	PpkA tip Ser/Thr protein kinazı (RefSeq WP_083367535.1)	%25
<i>Pseudomonas koreensis</i>	Serin/treonin protein kinaz (gen F7R09_00050; RefSeq KAB0499593.1)	%~25
<i>Pseudomonas vancouverensis</i>	Serin/treonin protein kinaz (gen F7R09_00050; RefSeq KAB0499593.1)	%~25

Bitki büyümesini teşvik eden bakterilerde Fmk1 proteini ile aynı veya benzer işlev gören yapıların benzerlik oranlarının %30 üzerine çıkamaması ve ab1-14 bileşik serimizin bu organizmalar üzerindeki sınırlı olan etkisi beraber değerlendirildiğinde, bileşiklerimizin *Fusarium oxysporum*'da Fmk1 proteinine karşı yüksek seçiciliği olduğunu gösterir. Bitki büyümesini teşvik eden bu organizmalarda, Fmk1 proteinine karşı yüksek etki görülmesine rağmen sınırlı etki gözlenmesi yüksek seçiciliğin bir göstergesi olarak yorumlanırken, bileşiklerimizin tasarımına yönelik başarılı hedef seçimimizi de doğrular. Bu aynı zamanda *Fusarium oxysporum* üzerine ticari bileşiklerle benzer etkinin kanıtlanmasının yanında fungus türlerinden Fmk1 proteine benzer proteinleri hayat döngüsünde barındıranların etkileneceğinken genel patojen fungus türlerle de mücadelede rol oynayabileceğini gösterir.

Bileşik serimizin seçiciliğine yönelik bu bulgunun yanında bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin bileşik serimizden fazla etkilenebilmesi, tarla ve mahsul verimliliği konusunda olumsuz belirleyiciler arasında olmayacağını gösterir. Bu, geniş çaplı ve endüstriyel kullanımda Propamokarb-HCl gibi bileşiklerle benzer etkilerle, Propamokarb-HCl'in aksine sınırlı çevre zararını beraberinde getirme potansiyeli sunar.

6. SONUÇ

Çalışmamız kapsamında on dört yeni triazoilkarbamat hibrit bileşiği başarılı şekilde sentezlenmiş, yapı aydınlatması gerçekleştirilmiştir. Bu bileşiklerin moleküler mekanik tabanlı genişletilmiş konformasyon taraması yapılmış, her bir bileşik için en düşük enerji konformasyonlar belirlenmiş ve bu yapılara DFT tabanlı optimizasyon yapılmıştır. DFT çalışmasında kullanılan geometri optimizasyonu M06-2X-D3/def2-SVP seviyesinde gerçekleştirilmiştir daha sonra Tek Nokta Enerji hesaplaması ile elektronik yapısı ωB97X-D/def2-TZVP seviyesinde çalışılmıştır. HOMO-LUMO sınır orbitallerinin, elektron yoğunluğunun ve elektrostatik potansiyellerin bileşiklerin en kararlı konformasyonları ile değerlendirilmesi yapılmıştır. Bileşiklerin *Fusarium oxysporum* üzerindeki etkilerinin *in vitro* çalışmalarda elde edilen sonuçlarla ilişkisini incelemek için *Fusarium oxysporum* hayat döngüsünde önemli bir biyosinyalleşme basamağında bulunan Fmk1 proteini derin öğrenmeye dayalı bir yapay zekâ aracı olan ESMFold ile yapısal olarak belirlenmiş, aynı teknolojiye dayalı benzer bir araç olan AlphaFold 3 kullanılarak doğrulanmıştır. Elde edilen yüksek benzerlik sonucu kullanım kısıtlaması olmayan ESMFold yapısı kullanılarak moleküler kenetlenme hesaplaması esnek kenetlenme protokolüne tabi tutulmuştur. Kuantum mekaniksel son pozisyon güncellemesi aktif bölgenin büyük bir bölümü kuantum mekaniğiyle M06-2X/ LAV3P++** seviyesinde ve diğer atomlar moleküler mekanik kullanılacak şekilde yapılmıştır. Bileşik serimizin *Fusarium oxysporum*'a yaptığı etkinin Fmk1 proteini üzerinden nasıl gerçekleştiğini ve etkilendiğini görmek için uygulanan moleküler kenetlenme çalışmasında elde edilen kompleksler; kararlılıklarının belirlenmesi, etkileşim sürekliliklerinin tespiti, bileşiklerin etkilerinin serbest enerji ilişkileri ile protein dinamikleri arasında bağlantı kurmak için moleküler dinamik simülasyonları gerçekleştirilmiştir. Moleküler dinamik simülasyonları RMSD ve RMSF temel değerlendirilmelerinden sonra MM/GBSA hesaplamalarına tabi tutuldu. Hesaplama iki bin frame'den oluşan simülasyonların her bir frame'i için gerçekleştirilerek difüzyon bileşenleri ile belirlenen konformasyon uzayında birbiriyle benzer protein konformasyonlarının yoğunluğunun belirlenmesi için difüzyon haritası grafiklerine aktarıldı. Elde edilen tüm veriler bir bütün halinde, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yusuf BAYAR tarafından *Fusarium oxysporum*'a karşı inhibisyon çalışması ve Sayın Prof. Dr. Hatice ÖĞÜTCÜ tarafından bitki büyümesini teşvik eden bakteriler üzerindeki etkisinin kapsamlı şekilde incelendiği *in vitro* çalışmalarla değerlendirildi.

Çalışma sonucunda yeni triazoilkarbamat hibrit bileşiklerinin sentezlendiği yüksek kesinlikle doğrulandı. Bileşiklerin elektronik yapısı DFT çalışmasıyla belirlendi. Kararlı konformasyonlarının katlanmış bir yapıda olması sonucu HOMO ve LUMO sınır orbitalleri aynı boşluğa bakan faz loblarıyla örtüşme gerçekleştirerek konumlanmıştır ve molekül içi etkileşimleri yoğundur. Bu durum, molekül içi etkileşimler kırılmadan bileşiklerin çözücünde çözünerek saflaştırma işlemlerinde zorlukla kullanılmasının temel nedenidir. Bileşiklerin polar çözücüler tarafından çözünmemesinin nedeninin molekül içi etkileşimlerin kırılmaması olduğu tespit edilmiştir. Alkol ve tetrahidrofuran çözücülerinde artan çözünürlüğün çözücü moleküllerinin oluşturduğu hidrojen veya halojen bağlarının molekül içi etkileşimleri kırarak arttırdığı sonucuna varılmıştır. Bu durum hem DFT çalışmasının fiziksel koşullardaki doğruluğunu gösterirken hem de bileşiklerin çözünürlüğü düşük olmasının nedenini açıklığa kavuşturmuştur. HOMO ve LUMO sınır orbitalleri $\Delta E_{\text{boşluk}}$ değeri 8, 4 eV-8, 7 eV arasında çok dar bir aralıkta değişmektedir. Yan zincir uzunluğundaki değişimle $\Delta E_{\text{boşluk}}$ değeri arasında herhangi bir korelasyon yoktur. Ancak $\Delta E_{\text{boşluk}}$ değerleri QM/MM kenetlenme çalışması ile değişkenlik göstermiştir. Kenetlenme çalışmasından en düşük enerjili konformasyon protein yapı dışarısında değerlendirildiğinde ise $\Delta E_{\text{boşluk}}$ bileşiklerin tamamında “yumuşama” yani $\Delta E_{\text{boşluk}}$ aralığının daralması eğilimindedir. Yani Fmk1 protein yapısı içerisinde bileşiklerimizin inertliği azalmış, reaksiyon yatkınlığı artmıştır. Elektrostatik potansiyel ise büyük değişimlerle bileşiklerimizdeki karbamat grubunun karbonil oksijeninin Mg^{2+} ile koordinasyonu sonucu protein ve ligand arasında paylaşılmıştır. Moleküler dinamik simülasyonlarında RMSD ve RMSF verileri, *Fusarium oxysporum* organizması üzerindeki *in vitro* etkinliğinin küçük bir bölümünü açıklar. Bileşik serisi içerisinde ab4, ab11, ab12 ve ab14 bileşiklerinin düşük potansiyelli olduğunu gösterir. MM/GBSA enerji değerleri ile bütünleştirilmiş difüzyon haritası grafiklerinde ise ab1-7 bileşikler ile düşük inhibisyon potansiyeli göstermiştir. Bileşikler arasında alifatik zincir uzunluğunda iki karbon bulunan ab7 bileşiği *in vitro* verilerle uyumlu olmayan sonuçlarla istisna oluşturur ancak bu ab7 bileşiğinin Fmk1 protein yapısındaki Mg^{2+} ile koordinasyonun MM/GBSA verileri ile diğer bileşiklerden düşük enerji değeri alması bu etkinin koordinasyonun fiziksel koşullarda beklenenden yüksek olabileceği şeklinde yorumlanarak açıklanabilir. Bileşik serisinde ab8-14 bileşikleri alifatik gruplarında üç karbon içermeleri bakımından *in vitro* çalışmada elde edilen genel örüntü ile uyumludur. Bu bileşikler yüksek konformasyonel sınırlama ile protein yapıyı hem iş yapamaz hale getirmiş hem de konformasyon uzayında sınırlamaya neden olarak bileşiğin aktif bölgeden çıkamayacağı sınırlamalara maruz bırakmıştır. Difüzyon bileşenleri serbest enerji değerleri

ile birlikte değerlendirildiğinde ab8, ab10, ab13 bileşikler çok yüksek konformasyonel sınırlama ile inhibisyon yapar. Bileşiklerden ab12 benzer konformasyonel sınırlama ile diğer bileşiklerden daha düşük bir inhibisyona yapar. Bileşik ab9 ise diğer bileşiklerden farklı olarak inhibitör işlevini konformasyonel sınırlama değil proteini iş yapamaz hale gelecek seviyede farklı konformasyonlara sevk ederek yapar. Deneysel çalışmalarda ab10, ab8, ab13 ve ab7 bileşiklerinin inhibisyon oranları 10^{-2} M derişimde sırasıyla %54, 8 ± 1 , 7, 46.60 ± 1.52 %43, 0 ± 1 , 3 ve %42, 8 ± 1 , 0 olarak tespit edilerek önder bileşiklerimizdir. Ancak ab13 doz yanıt eğrişinde düşük derişimlerde etkisini kaybetmesi ile geri plandadır. Bitki büyümesini teşvik eden bakteriler üzerinde yapılan *in vitro* deneyler bileşiklerimizin çevre üzerine olan sınırlı olumsuz etkisini net bir şekilde gösterir. Bileşiklerimizin bu organizmalar üzerindeki sınırlı etkisinin *Fusarium oxysporum*'da hedeflenen Fmk1 proteinine benzer proteinler içermemesidir ve bileşik serimizin fungusit olarak yüksek seçiciliğinin kanıtıdır.

Çalışma kapsamında sentezlenen bileşikler düşük verimlerle elde edilmiştir. Bileşiklerin her biri reaksiyon ortamında yüksek miktarda bulunsalar da düşük çözünürlükleri ve yan üründen ayırlamama durumları nedeni ile saflaştırma adımında büyük zorluklara sebebiyet vermiştir. Bileşiklerin tamamının düşük çözünürlüklü oluşu endüstriyel uygulama boyutuna geçmeyi marjinal fayda sağlamadıkları sürece imkânsız kılacaktır. Bileşiklerin oldukça inert olduklarının DFT hesaplamaları ile tespit edilmesi, bozulmaya dirençli olduklarını gösteren önemli bir delildir ve hidroliz olma durumlarını büyük oranda imkânsız kılmaktadır. Bileşiklerimizin bu konu ile ilgili deneysel çalışması yoktur ve teorik yaklaşımlar kuantum mekaniğinde yüksek seviyeli hesaplamalara tabi olsalar bile deneysel veri olmadan mevcut teknoloji ile yetersiz bilgi sunabilir. Bileşiklerimizin bozulma ürünlerinin yüksek kanserojen özelliklerdeki kloroanilin türevleri olması bu konunun önemini göstermektedir. Bileşiklerimizin hidroliz olması durumunda ortaya çıkabilecek kloroanilin türevlerinden özellikle 2-kloroanilin kansere neden olduğu bilinen bir maddedir. Tüm bunlar çalışmamızın sınırlamalarını oluştururken gelecekteki geliştirme aşamalarına ışık tutar.

Bileşiklerin çözünürlüğünün düşük olmasının nedeninin molekül içi etkileşimlerden kaynaklandığının tespiti ile etkileşimlerin olmayacağı süstitüentlerin klor yerine tercih edilmesi ile kolaylıkla sağlanabilir. Klor yerine kullanılacak aromatik halkalara oluşturulacak bifenil benzeri yapılar moleküler kenetlenme çalışma ile tespit edilen ve protein yapının dışında kalarak çözücü etkileşimine sahip taraflarında oldukların inhibisyon etkisinde büyük değışim görmeden çözünürlük artışı sağlanabilir. Eklenecek olan aromatik

halkalar düz yapıları ve elektron yoğunlukları ile molekül içi etkileşimleri engelleyebilir. Klor yerine atom çapı daha büyük olan brom gibi bir sübstitüentin kullanılması molekül içi etkileşimlerde fenil gruplarının birbirine doğru konumlanmasını önleyebilir. Bu durum katlanmış konformasyonu daha liner hale getirebilir ve çözünürlük artışı sağlanabilir.

Bu çalışmada, mevcut kısıtlılıklar ve bunların olası giderilme stratejileri kapsamlı biçimde tartışılmış; sentezlediğimiz triazoilkarbamat hibritlerinin patojen mantar türleri üzerindeki genel etkinliği ile özellikle *Fusarium oxysporum*'a karşı inhibisyon potansiyeli ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler, çevre sağlığı açısından “zararsız” kabul edilebilecek bu bileşiklerin biyolojik etkinlik bakımından ticari fungusitlerle karşılaştırılabilir sonuçlar verdiğini göstermiştir. Çalışma kapsamında ayrıca Fmk1 proteininin yapısal ve fonksiyonel özellikleri ile inhibisyon koşulları literatürde ilk kez bu denli ayrıntılı olarak ortaya konmuştur. Bununla birlikte, fungusit özellikleri açısından önem taşıyan iki yaygın fonksiyonel grubun triazoilkarbamat çerçevesi içinde ilk kez bu amaç için birleştirilmesiyle, güçlü fungusit özellikler sergileyen yeni hibrit bileşiklerin potansiyelleri gösterilmiştir. Bu sonuçlar, hibrit moleküllerin ileri optimizasyon ve farklı patojenlere yönelik genişletilmiş uygulamalar için de sağlam bir bilimsel temel sunduğunu göstermekte ve bilimsel anlayışın gıda sorunlarını çözmeye yönelik etkisine de yüksek katkı yapmaktadır.

KAYNAKLAR

1. İnternet: In Brief to The State of Food and Agriculture 2023. (t.y). Web: <https://openknowledge.fao.org/items/07bbf706-2cef-4ed0-969d-ee86d525c531>, Son Erişim Tarihi: 24/11/2024.
2. Oerke, E.-C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31–43.
3. Fisher, M. C., Henk, D. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L. and Gurr, S. J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, 484(7393), 186–194.
4. Nnadi, N. E. and Carter, D. A. (2021). Climate change and the emergence of fungal pathogens. *PLOS Pathogens*, 17(4), e1009503.
5. Chanda, A., Maghrawy, H., Sayour, H., Gummadidala, P. M. and Gomaa, O. M. (2020). Impact of climate change on plant-associated fungi. İçinde E.-S. Ewis Omran and A. M. Negm (Ed.), *Climate change impacts on agriculture and food security in Egypt: Land and water resources—smart farming—livestock, fishery, and aquaculture*. New York: Springer International Publishing, 83–96.
6. Ayaz, M., Li, C.-H., Ali, Q., Zhao, W., Chi, Y.-K., Shafiq, M., Ali, F., Yu, X.-Y., Yu, Q., Zhao, J.-T., Yu, J.-W., Qi, R.-D. and Huang, W.-K. (2023). Bacterial and fungal biocontrol agents for plant disease protection: Journey from lab to field, current status, challenges, and global perspectives. *Molecules*, 28(18), 18.
7. Mann, C. W. G., Sawyer, A., Gardiner, D. M., Mitter, N., Carroll, B. J. and Eamens, A. L. (2023). RNA-based control of fungal pathogens in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15), 15.
8. Stukenbrock, E. and Gurr, S. (2023). Address the growing urgency of fungal disease in crops. *Nature*, 617(7959), 31–34.
9. El-Baky, N. A. and Amara, A. A. A. F. (2021). Recent approaches towards control of fungal diseases in plants: An updated review. *Journal of Fungi*, 7(11), 11.
10. Zhao, J.-H., Liu, Q.-Y., Xie, Z.-M. and Guo, H.-S. (2024). Exploring the challenges of RNAi-based strategies for crop protection. *Advanced Biotechnology*, 2(3), 23.
11. Bonaterra, A., Badosa, E., Daranas, N., Francés, J., Roselló, G. and Montesinos, E. (2022). Bacteria as biological control agents of plant diseases. *Microorganisms*, 10(9), 9.
12. Balusamy, S. R., Joshi, A. S., Perumalsamy, H., Mijakovic, I. and Singh, P. (2023). Advancing sustainable agriculture: A critical review of smart and eco-friendly nanomaterial applications. *Journal of Nanobiotechnology*, 21(1), 372.

13. Lewis, K. A., Tzilivakis, J., Warner, D. J. and Green, A. (2016). An international database for pesticide risk assessments and management. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 22(4), 1050–1064.
14. Saeedian Moghadam, E., Bonyasi, F., Bayati, B., Sadeghi Moghadam, M. and Amini, M. (2024). Recent advances in design and development of diazole and diazine based fungicides (2014–2023). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(28), 15427–15448.
15. Van Der Kerk, G. J. M. (1969). The development of synthetic fungicides; trends and prospects. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 75(1), 5–20.
16. Ul Haq, I., Sarwar, M. K., Faraz, A. and Latif, M. Z. (2020). Synthetic chemicals: Major component of plant disease management. İçinde I. Ul Haq and S. Ijaz (Ed.), *Plant disease management strategies for sustainable agriculture through traditional and modern approaches*. New York: Springer International Publishing, 53–81.
17. Woods, M., McAlister, J. A. and Geddes-McAlister, J. (2023). A One Health approach to overcoming fungal disease and antifungal resistance. *WIREs Mechanisms of Disease*, 15(4), e1610.
18. Lockhart, S. R., Chowdhary, A. and Gold, J. A. W. (2023). The rapid emergence of antifungal-resistant human-pathogenic fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 21(12), 818–832.
19. de Mello, F. E., Lopes-Caitar, V. S., Prudente, H., Xavier-Valencio, S. A., Franzenburg, S., Mehl, A., Marcelino-Guimaraes, F. C., Verreet, J.-A., Balbi-Peña, M. I. and Godoy, C. V. (2021). Sensitivity of *Cercospora* spp. from soybean to quinone outside inhibitors and methyl benzimidazole carbamate fungicides in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 46(1), 69–80.
20. Wu, W., Chen, M., Wang, R., Tu, H., Yang, M. and Ouyang, G. (2019). Novel pyrimidine derivatives containing an amide moiety: Design, synthesis, and antifungal activity. *Chemical Papers*, 73(3), 719–729.
21. Fan, L., Luo, Z., Li, Y., Liu, X., Fan, J., Xue, W., Tang, L. and Li, Y. (2020). Synthesis and antifungal activity of imidazo[1,2-b]pyridazine derivatives against phytopathogenic fungi. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 30(14), 127139.
22. Chen, L., Zhao, B., Fan, Z., Liu, X., Wu, Q., Li, H. and Wang, H. (2018). Synthesis of novel 3,4-chloroisothiazole-based imidazoles as fungicides and evaluation of their mode of action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(28), 7319–7327.
23. Sun, C., Zhang, S., Qian, P., Li, Y., Ren, W., Deng, H. and Jiang, L. (2021). Synthesis and fungicidal activity of novel benzimidazole derivatives bearing pyrimidine-thioether moiety against *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*, 77(12), 5529–5536.
24. Dong, C., Gao, W., Li, X., Sun, S., Huo, J., Wang, Y., Ren, D., Zhang, J. and Chen, L. (2021). Synthesis of pyrazole-4-carboxamides as potential fungicide candidates. *Molecular Diversity*, 25(4), 2379–2388.

25. Toda, M., Beer, K. D., Kuivila, K. M., Chiller, T. M. and Jackson, B. R. (2021). Trends in agricultural triazole fungicide use in the United States, 1992–2016 and possible implications for antifungal-resistant fungi in human disease. *Environmental Health Perspectives*, 129(5), 055001.
26. Liu, X., Sun, Y., Liu, L., Duan, X., You, S., Yu, B., Pan, X., Guan, X., Lin, R. and Song, L. (2024). Green synthesis and antifungal activities of novel N-aryl carbamate derivatives. *Molecules*, 29(15), 15.
27. Sun, J., Pang, C., Cheng, X., Yang, B., Jin, B., Jin, L., Qi, Y., Sun, Y., Chen, X., Liu, W., Cao, H. and Chen, Y. (2023). Investigation of the antifungal activity of the dicarboximide fungicide iprodione against *Bipolaris maydis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 190, 105319.
28. Peyton, L. R., Gallagher, S. and Hashemzadeh, M. (2015). Triazole antifungals: A review. *Drugs of Today (Barcelona, Spain: 1998)*, 51(12), 705–718.
29. Roman, D. L., Voiculescu, D. I., Filip, M., Ostafe, V. and Isvoran, A. (2021). Effects of triazole fungicides on soil microbiota and on the activities of enzymes found in soil: A review. *Agriculture*, 11(9), 9.
30. Lucas, J. A., Hawkins, N. J. and Fraaije, B. A. (2015). The evolution of fungicide resistance. În: S. Sariaslani and G. M. Gadd (Ed.), *Advances in Applied Microbiology* (C. 90). New York: Academic Press, 29–92.
31. Marzi, M., Farjam, M., Kazeminejad, Z., Shiroudi, A., Kouhpayeh, A. and Zarenezhad, E. (2022). A recent overview of 1,2,3-triazole-containing hybrids as novel antifungal agents: Focusing on synthesis, mechanism of action, and structure-activity relationship (SAR). *Journal of Chemistry*, 2022(1), 7884316.
32. Lauria, A., Delisi, R., Mingoia, F., Terenzi, A., Martorana, A., Barone, G. and Almerico, A. M. (2014). 1,2,3-Triazole in heterocyclic compounds, endowed with biological activity, through 1,3-dipolar cycloadditions. *European Journal of Organic Chemistry*, 2014(16), 3289–3306.
33. Sathish Kumar, S. and Kavitha, H. P. (2013). Synthesis and biological applications of triazole derivatives – A review. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 10(1), 40–65.
34. Palmer, M. H., Hoffmann, S. V., Jones, N. C., Head, A. R. and Lichtenberger, D. L. (2011). The electronic states of 1,2,3-triazole studied by vacuum ultraviolet photoabsorption and ultraviolet photoelectron spectroscopy, and a comparison with ab initio configuration interaction methods. *The Journal of Chemical Physics*, 134(8), 084309.
35. Saqib, M., Izadi, F., Isierhienrhien, L. U., Ončák, M. and Denifl, S. (2023). Decomposition of triazole and 3-nitrotriazole upon low-energy electron attachment. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 25(20), 13892–13901.
36. de Miguel, G., Wielopolski, M., Schuster, D. I., Fazio, M. A., Lee, O. P., Haley, C. K., Ortiz, A. L., Echegoyen, L., Clark, T. and Guldi, D. M. (2011). Triazole bridges as versatile linkers in electron donor–acceptor conjugates. *Journal of the American Chemical Society*, 133(33), 13036–13054.

37. Hotha, S. and Kashyap, S. (2006). "Click chemistry" inspired synthesis of pseudo-oligosaccharides and amino acid glycoconjugates. *The Journal of Organic Chemistry*, 71(2), 852–852.
38. Guo, H.-Y., Chen, Z.-A., Shen, Q.-K. and Quan, Z.-S. (2021). Application of triazoles in the structural modification of natural products. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 36(1), 1115–1144.
39. Lin, H. and Walsh, C. T. (2004). A chemoenzymatic approach to glycopeptide antibiotics. *Journal of the American Chemical Society*, 126(43), 13998–14003.
40. Li, H., Aneja, R. and Chaiken, I. (2013). Click chemistry in peptide-based drug design. *Molecules*, 18(8), 8.
41. Umashankara, M., McFadden, K., Zentner, I., Schön, A., Rajagopal, S., Tuzer, F., Kuriakose, S. A., Contarino, M., LaLonde, J., Freire, E. and Chaiken, I. (2010). The active core in a triazole peptide dual-site antagonist of HIV-1 gp120. *ChemMedChem*, 5(11), 1871–1879.
42. Sykam, K., Donempudi, S. and Basak, P. (2022). 1,2,3-Triazole rich polymers for flame retardant application: A review. *Journal of Applied Polymer Science*, 139(32), e52771.
43. Conte, G., Ely, F. and Gallardo, H. (2005). An investigation of the synthesis of chiral LCs based on the [1,2,3]-triazole ring. *Liquid Crystals*, 32(10), 1213–1222.
44. Helms, B., Mynar, J. L., Hawker, C. J. and Fréchet, J. M. J. (2004). Dendronized linear polymers via "click chemistry". *Journal of the American Chemical Society*, 126(46), 15020–15021.
45. Lee, J. W., Kim, J. H. and Kim, B.-K. (2006). Synthesis of azide-functionalized PAMAM dendrons at the focal point and their application for synthesis of PAMAM-like dendrimers. *Tetrahedron Letters*, 47(16), 2683–2686.
46. Massarotti, A., Aprile, S., Mercalli, V., Del Grosso, E., Grosa, G., Sorba, G. and Tron, G. C. (2014). Are 1,4- and 1,5-disubstituted 1,2,3-triazoles good pharmacophoric groups? *ChemMedChem*, 9(11), 2497–2508.
47. Kolb, H. C. and Sharpless, K. B. (2003). The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discovery Today*, 8(24), 1128–1137.
48. Yin, W., Ye, M., Marshall, N., Tan, J. B., Paull, E., Nie, Z., Trzoss, M., Krilov, G., Feng, S., Pelletier, R., Bell, J., Skrdla, P., Calkins, D., Grimes, M., Wright, D. H. and Akinsanya, K. (2023). SGR-1505 is a potent MALT1 protease inhibitor with a potential best-in-class profile. *Blood*, 142, 2997.
49. İnternet: Delving into the latest updates on SGR-1505 with Synapse. (t.y.). Synapse. Web: <https://synapse.patsnap.com/drug/796400993af345ecbcbf96d089840c5b?csrfToken=>, Son Erişim Tarihi: 03 Mayıs 2025.

50. Plotnik, J. P., Richardson, A. E., Yang, H., Rojas, E., Bontcheva, V., Dowell, C., Parsons, S., Wilson, A., Ravanmehr, V., Will, C., Jung, P., Zhu, H., Partha, S. K., Panchal, S. C., Mali, R. S., Kohlhapp, F. J., McClure, R. A., Ramathal, C. Y., George, M. D. And Pappano, W. N. (2024). Inhibition of MALT1 and BCL2 induces synergistic antitumor activity in models of B-cell lymphoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, 23(7), 949–960.
51. Huisgen, R. (1963). 1,3-Dipolar cycloadditions. Past and future. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 2(10), 565–598.
52. Hein, J. E. and Fokin, V. V. (2010). Copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: New reactivity of copper(I) acetylides. *Chemical Society Reviews*, 39(4), 1302–1315.
53. Boren, B. C., Narayan, S., Rasmussen, L. K., Zhang, L., Zhao, H., Lin, Z., Jia, G. and Fokin, V. V. (2008). Ruthenium-catalyzed azide–alkyne cycloaddition: Scope and mechanism. *Journal of the American Chemical Society*, 130(44), 14900–14900.
54. Shuvaev, A., Feoktistov, M., Teslenko, F. and Fershtat, L. (t.y.). Electrochemical approach toward mesoionic 1,2,3-triazole 1-imines. *Advanced Synthesis & Catalysis*, n/a(n/a).
55. Gomes, C. B., Balaguez, R. A., Larroza, A., Smaniotto, T. A., Domingues, M., Casaril, A. M., Silva, M. S., Rodrigues, O. E. D., Savegnago, L. and Alves, D. (2020). Organocatalysis in the synthesis of 1,2,3-triazoyl-zidovudine derivatives: Synthesis and preliminary antioxidant activity. *ChemistrySelect*, 5(39), 12255–12260.
56. Ashok, D., Reddy, M. R., Dharavath, R., Ramakrishna, K., Nagaraju, N. and Sarasija, M. (2020). Microwave-assisted synthesis of some new 1,2,3-triazole derivatives and their antimicrobial activity. *Journal of Chemical Sciences*, 132(1), 47.
57. Kolb, H. C., Finn, M. G. and Sharpless, K. B. (2001). Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 40(11), 2004–2021.
58. Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V. and Sharpless, K. B. (2002). A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie International Edition*, 41(14), 2596–2599.
59. Tornøe, C. W., Christensen, C. and Meldal, M. (2002). Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-Triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *The Journal of Organic Chemistry*, 67(9), 3057–3064.
60. Kantaria, T., Kantaria, T., Titvinidze, G., Otinashvili, G., Kupatadze, N., Zavrashvili, N., Tugushi, D. and Katsarava, R. (2018). New 1,2,3-triazole containing polyesters via click step-growth polymerization and nanoparticles made of them. *International Journal of Polymer Science*, 2018(1), 6798258.
61. Dheer, D., Singh, V. and Shankar, R. (2017). Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: Current developments. *Bioorganic Chemistry*, 71, 30–54.

62. Cox, E. D. and Cook, J. M. (1995). The Pictet-Spengler condensation: A new direction for an old reaction. *Chemical Reviews*, 95(6), 1797–1842.
63. Huo, X.-Y., Guo, L., Chen, X.-F., Zhou, Y.-T., Zhang, J., Han, X.-Q. and Dai, B. (2018). Design, synthesis, and antifungal activity of novel aryl-1,2,3-triazole- β -carboline hybrids. *Molecules*, 23(6), 6.
64. Dai, Z.-C., Chen, Y.-F., Zhang, M., Li, S.-K., Yang, T.-T., Shen, L., Wang, J.-X., Qian, S.-S., Zhu, H.-L. and Ye, Y.-H. (2014). Synthesis and antifungal activity of 1,2,3-triazole phenylhydrazone derivatives. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 13(2), 477–486.
65. Jiang, Y.-Q., Jia, S.-H., Li, X.-Y., Sun, Y.-M., Li, W., Zhang, W.-W. and Xu, G.-Q. (2017). Design, synthesis, and antifungal evaluation of novel benzoxazole derivatives containing a 1,2,3-triazole moiety. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 64(10), 1197–1202.
66. Jiang, Y., Zhu, C.-H., Xia, Z.-H. and Zhao, H.-Q. (2024). Novel quinoxalinone-1,2,3-triazole derivatives as potential antifungal agents for plant anthrax disease: Design, synthesis, antifungal activity and SAR study. *Advanced Agrochem*, 3(3), 222–228.
67. Fukuto, T. R. (1990). Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health Perspectives*, 87, 245–254.
68. Matošević, A. and Bosak, A. (2020). Carbamate group as structural motif in drugs: A review of carbamate derivatives used as therapeutic agents. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 71(4), 285–299.
69. Ghosh, A. K. and Brindisi, M. (2015). Organic carbamates in drug design and medicinal chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(7), 2895–2940.
70. King, K., Hauser, A.-T., Melesina, J., Sippl, W. and Jung, M. (2018). Carbamates as potential prodrugs and a new warhead for HDAC inhibition. *Molecules*, 23(2), 2.
71. International Programme on Chemical Safety and World Health Organization. (1986). *Carbamate pesticides: A general introduction*. World Health Organization.
72. Smith, M. J. and Bucher, G. (2012). Tools to study the degradation and loss of the N-phenyl carbamate chlorpropham—A comprehensive review. *Environment International*, 49, 38–50.
73. Wolfe, N. L., Zepp, R. G. and Paris, D. F. (1978). Carbaryl, propham and chlorpropham: A comparison of the rates of hydrolysis and photolysis with the rate of biolysis. *Water Research*, 12(8), 565–571.
74. David, B., Lhote, M., Faure, V. and Boule, P. (1998). Ultrasonic and photochemical degradation of chlorpropham and 3-chloroaniline in aqueous solution. *Water Research*, 32(8), 2451–2461.
75. Zaater, M. F. A. (1990). *Environmental fate and transformations of aniline-based herbicides with special reference to chlorpropham*. Unpublished Doctoral Dissertation, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom, 22-35.

76. European Food Safety Authority (EFSA), Arena, M., Auteri, D., Barmaz, S., Bellisai, G., Brancato, A., Brocca, D., Bura, L., Byers, H., Chiusolo, A., Court Marques, D., Crivellente, F., De Lentdecker, C., De Maglie, M., Egsmose, M., Erdos, Z., Fait, G., Ferreira, L., Goumenou, M. and Villamar-Bouza, L. (2017). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance chlorpropham. *EFSA Journal*, 15(7), e04903.
77. Takagaki, M., Ozaki, M., Fujimoto, S. and Fukumoto, S. (2014). Development of a novel fungicide, pyribencarb. *Journal of Pesticide Science*, 39(3), 177–178.
78. Li, H., Hu, S., Sun, F., Sun, Q., Wang, N., Li, B., Zou, N., Lin, J., Mu, W. and Pang, X. (2023). Residual analysis of QoI fungicides in multiple (six) types of aquatic organisms by UPLC-MS/MS under acutely toxic conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(5), 12075–12084.
79. Ichinari, D., Nagaki, A. and Yoshida, J. (2017). Generation of hazardous methyl azide and its application to synthesis of a key-intermediate of picarbutrazox, a new potent pesticide in flow. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(23), 6224–6228.
80. Wan, F.-X., Wang, J.-H., Shi, Y.-H., Niu, L.-Z. and Jiang, L. (2018). Design, synthesis and antifungal activity of novel benzoylcarbamates bearing a pyridine moiety. *Applied Sciences*, 8(12), 12.
81. Fischer, E. (1894). Einfluss der configuration auf die wirkung der enzyme. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 27(3), 2985–2993.
82. Pagadala, N. S., Syed, K. and Tuszynski, J. (2017). Software for molecular docking: A review. *Biophysical Reviews*, 9(2), 91–102.
83. Fan, J., Fu, A. and Zhang, L. (2019). Progress in molecular docking. *Quantitative Biology*, 7(2), 83–89.
84. Koshland, D. E. (1958). Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 44(2), 98–104.
85. Blow, D. M., Birktoft, J. J. and Hartley, B. S. (1969). Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature*, 221(5178), 337–340.
86. Zhou, Z., Zhen, J., Karpowich, N. K., Law, C. J., Reith, M. E. A. and Wang, D.-N. (2009). Antidepressant specificity of serotonin transporter suggested by three LeuT–SSRI structures. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(6), 652–657.
87. Nabuurs, S. B., Wagener, M. and de Vlieg, J. (2007). A flexible approach to induced fit docking. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(26), 6507–6518.
88. Karplus, M. and McCammon, J. A. (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature Structural Biology*, 9(9), 646–652.
89. McCammon, J. A., Gelin, B. R. and Karplus, M. (1977). Dynamics of folded proteins. *Nature*, 267(5612), 585–590.

90. McCammon, J. A., Gelin, B. R., Karplus, M. and Wolynes, P. G. (1976). The hinge-bending mode in lysozyme. *Nature*, 262(5566), 325–326.
91. Warshel, A. and Levitt, M. (1976). Theoretical studies of enzymic reactions: Dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. *Journal of Molecular Biology*, 103(2), 227–249.
92. Senn, H. M. and Thiel, W. (2009). QM/MM methods for biomolecular systems. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(7), 1198–1229.
93. Field, M. J., Bash, P. A. and Karplus, M. (1990). A combined quantum mechanical and molecular mechanical potential for molecular dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 11(6), 700–733.
94. Gerstein, M., Lesk, A. M. and Chothia, C. (1994). Structural mechanisms for domain movements in proteins. *Biochemistry*, 33(22), 6739–6749.
95. Hayward, S. (1999). Structural principles governing domain motions in proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 36(4), 425–435.
96. Hinsen, K., Thomas, A. and Field, M. J. (1999). Analysis of domain motions in large proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 34(3), 369–382.
97. Schulz, G. E. (1991). Domain motions in proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 1(6), 883–888.
98. Amadei, A., Linssen, A. B. M. and Berendsen, H. J. C. (1993). Essential dynamics of proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 17(4), 412–425.
99. Kitao, A. (2022). Principal component analysis and related methods for investigating the dynamics of biological macromolecules. *J*, 5(2), 2.
100. Sittel, F. and Stock, G. (2018). Perspective: Identification of collective variables and metastable states of protein dynamics. *The Journal of Chemical Physics*, 149(15), 150901.
101. Carreras, M. and Coenders, G. (2020). Principal component analysis of financial statements: A compositional approach. *Revista de Métodos Cuantitativos Para La Economía y La Empresa*, 29, 18–37.
102. Becht, E., McInnes, L., Healy, J., Dutertre, C.-A., Kwok, I. W. H., Ng, L. G., Ginhoux, F. and Newell, E. W. (2019). Dimensionality reduction for visualizing single-cell data using UMAP. *Nature Biotechnology*, 37(1), 38–44.
103. Conceição, M., Krone-Martins, A., Silva, A. da, and Moliné, Á. (2024). Fast emulation of cosmological density fields based on dimensionality reduction and supervised machine learning. *Astronomy & Astrophysics*, 681, A123.
104. Korda, M. and Mezić, I. (2018). Linear predictors for nonlinear dynamical systems: Koopman operator meets model predictive control. *Automatica*, 93, 149–160.

105. Coifman, R. R., Kevrekidis, I. G., Lafon, S., Maggioni, M. and Nadler, B. (2008). Diffusion maps, reduction coordinates, and low dimensional representation of stochastic systems. *Multiscale Modeling & Simulation*, 7(2), 842–864.
106. Kundu, S., Barsoum, S., Ariza, J., Nolan, A. L., Latimer, C. S., Keene, C. D., Bassar, P. J. and Benjamini, D. (2023). Mapping the individual human cortex using multidimensional MRI and unsupervised learning. *Brain Communications*, 5(6), fcd258.
107. Gelß, P., Klus, S., Eisert, J. and Schütte, C. (2019). Multidimensional approximation of nonlinear dynamical systems. *Journal of Computational and Nonlinear Dynamics*, 14, 061006.
108. Ferguson, A. L., Panagiotopoulos, A. Z., Kevrekidis, I. G. and Debenedetti, P. G. (2011). Nonlinear dimensionality reduction in molecular simulation: The diffusion map approach. *Chemical Physics Letters*, 509(1), 1–11.
109. Rodriguez-Nieva, J. F. and Scheurer, M. S. (2019). Identifying topological order through unsupervised machine learning. *Nature Physics*, 15(8), 790–795.
110. Sornsang, A., Dangniam, N., Palittapongarnpim, P. and Chotibut, T. (2021). Quantum diffusion map for nonlinear dimensionality reduction. *Physical Review A*, 104(5), 052410.
111. McInnes, L., Healy, J. and Melville, J. (2020). UMAP: Uniform manifold approximation and projection for dimension reduction. *arXiv*, arXiv:1802.03426.
112. Molchanov, S. A. (1975). Diffusion processes and Riemannian geometry. *Russian Mathematical Surveys*, 30(1), 1.
113. Ruppeiner, G. (1995). Riemannian geometry in thermodynamic fluctuation theory. *Reviews of Modern Physics*, 67(3), 605–659.
114. Cao, J., Spielmann, M., Qiu, X., Huang, X., Ibrahim, D. M., Hill, A. J., Zhang, F., Mundlos, S., Christiansen, L., Steemers, F. J., Trapnell, C. and Shendure, J. (2019). The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis. *Nature*, 566(7745), 496–502.
115. Packer, J. S., Zhu, Q., Huynh, C., Sivaramakrishnan, P., Preston, E., Dueck, H., Stefanik, D., Tan, K., Trapnell, C., Kim, J., Waterston, R. H. and Murray, J. I. (2019). A lineage-resolved molecular atlas of *C. elegans* embryogenesis at single-cell resolution. *Science*, 365(6459), eaax1971.
116. Diaz-Papkovich, A., Anderson-Trocmé, L. and Gravel, S. (2019). Revealing multi-scale population structure in large cohorts. *bioRxiv*, 423632.
117. Trozzi, F., Wang, X. and Tao, P. (2021). UMAP as a dimensionality reduction tool for molecular dynamics simulations of biomacromolecules: A comparison study. *The Journal of Physical Chemistry B*, 125(19), 5022–5034.

118. Ali, M., Jones, M. W., Xie, X. and Williams, M. (2019). TimeCluster: Dimension reduction applied to temporal data for visual analytics. *The Visual Computer*, 35(6), 1013–1026.
119. Oide, M. and Sugita, Y. (2022). Protein folding intermediates on the dimensionality reduced landscape with UMAP and native contact likelihood. *The Journal of Chemical Physics*, 157(7), 075101.
120. Di Pietro, A., García-MacEira, F. I., Mègelecz, E. and Roncero, M. I. (2001). A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Molecular Microbiology*, 39(5), 1140–1152.
121. Jackson, E., Li, J., Weerasinghe, T. and Li, X. (2024). The ubiquitous wilt-inducing pathogen *Fusarium oxysporum*—A review of genes studied with mutant analysis. *Pathogens*, 13(10), 10.
122. Ding, Z., Li, M., Sun, F., Xi, P., Sun, L., Zhang, L. and Jiang, Z. (2015). Mitogen-activated protein kinases are associated with the regulation of physiological traits and virulence in *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*. *PLOS ONE*, 10(4), e0122634.
123. Pérez-Nadales, E. and Di Pietro, A. (2011). The membrane mucin Msb2 regulates invasive growth and plant infection in *Fusarium oxysporum*. *The Plant Cell*, 23(3), 1171–1185.
124. Reinhardt, R. and Leonard, T. A. (2023). A critical evaluation of protein kinase regulation by activation loop autophosphorylation. *eLife*, 12, e88210.
125. Amuzu, P., Pan, X., Hou, X., Sun, J., Jakada, M. A., Odigie, E., Xu, D., Lai, D. and Zhou, L. (2024). Recent updates on the secondary metabolites from *Fusarium* fungi and their biological activities (covering 2019 to 2024). *Journal of Fungi*, 10(11), 11.
126. Sun, Y., Zhang, X., Chai, Z., Li, Y., Ren, Z., Wang, M., Ma, Z., Wang, Y. and Feng, J. (2024). Involvement of FoVEL1 and FoLAE1 in conidiation, virulence and secondary metabolism of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Niveum*. *Journal of Integrative Agriculture*.
127. Cicco, L., Perna, F. M., Falcicchio, A., Altomare, A., Messa, F., Salomone, A., Capriati, V. and Vitale, P. (2022). 1,3-Dipolar cycloaddition of alkanone enolates with azides in deep eutectic solvents for the metal-free regioselective synthesis of densely functionalized 1,2,3-triazoles. *European Journal of Organic Chemistry*, 2022(36), e202200843.
128. Kalin, T. N., Kilic, D., Arslan, F., Colak, O. and Altundas, A. (2020). Synthesis, molecular modeling studies, ADME prediction of arachidonic acid carbamate derivatives, and evaluation of their acetylcholinesterase activity. *Drug Development Research*, 81(2), 232–241.
129. Zhao, Y. and Truhlar, D. G. (2008). Density functionals with broad applicability in chemistry. *Accounts of Chemical Research*, 41(2), 157–167.
130. Schrödinger Release 2023-4: Maestro [Software]. (2023). Schrödinger, LLC, New York, NY.

131. Ortaakarsu, A. B. and Medetalibeyoğlu, H. (2024). Computational drug repurposing effort for identifying novel hits for the treatment of diseases such as endometriosis, uterine fibroids, and prostate cancer. *Turkish Journal of Chemistry*, 48(2), 402–421.
132. Medetalibeyoğlu, H., Atalay, A., Sağlamtaş, R., Manap, S., Ortaakarsu, A. B., Ekinci, E., Yüksek, H. and Tüzün, B. (2025). Synthesis, design, and cholinesterase inhibitory activity of novel 1,2,4-triazole Schiff bases: A combined experimental and computational approach. *International Journal of Biological Macromolecules*, 306, 141350.
133. Bakir Boga, O., Ortaakarsu, A. B., Kadirustaoglu, B. and Basaran Kurbanoglu, E. (2023). Phytochemical profiling, in vitro biological activities and in silico molecular docking studies of the crude extract of *Crambe orientalis*, an endemic plant in Turkey. *Chemistry & Biodiversity*, 20(3), e202201142.
134. Kızıлтаş, H., Ortaakarsu, A. B., Bingöl, Z., Gören, A. C., Pınar, S. M. and Gülçin, İ. (t.y.). Sage (*Salvia macrochlamys*): LC-HRMS for phytochemical analysis, cytotoxicity, enzyme inhibition, antioxidant activity, molecular docking and molecular dynamics simulations. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 1(23), 1–19.
135. Manap, S., Medetalibeyoğlu, H., Kılıç, A., Karataş, O. F., Tüzün, B., Alkan, M., Ortaakarsu, A. B., Atalay, A., Beytur, M. and Yüksek, H. (2023). Synthesis, molecular modeling investigation, molecular dynamic and ADME prediction of some novel Mannich bases derived from 1,2,4-triazole, and assessment of their anticancer activity. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1–15.
136. İnternet: Schrödinger Release 2023-4: LigPrep [Software]. (2023). Schrödinger, LLC, New York, NY. Web: <https://www.schrodinger.com/life-science/download/release-notes/release-2023-4/>, Son Erişim Tarihi: 22/04/2025.
137. İnternet: Schrödinger Release 2023-4: LigPrep [Software]. (2023). Schrödinger, LLC, New York, NY. Web: <https://www.schrodinger.com/life-science/download/release-notes/release-2023-4/>, Son Erişim Tarihi: 22/04/2025.
138. Segorbe, D., Di Pietro, A., Pérez-Nadales, E. and Turrà, D. (2017). Three *Fusarium oxysporum* mitogen-activated protein kinases (MAPKs) have distinct and complementary roles in stress adaptation and cross-kingdom pathogenicity. *Molecular Plant Pathology*, 18(7), 912–924.
139. Bhagat, N., Mansotra, R., Patel, K., Ambardar, S. and Vakhlu, J. (2024). Molecular warfare between pathogenic *Fusarium oxysporum* R1 and host *Crocus sativus* L. unraveled by dual transcriptomics. *Plant Cell Reports*, 43(2), 42.
140. İnternet: Schrödinger Release 2023-4: LigPrep [Software]. (2023). Schrödinger, LLC, New York, NY. Web: <https://www.schrodinger.com/life-science/download/release-notes/release-2023-4/>, Son Erişim Tarihi: 22/04/2025.
141. Lu, C., Wu, C., Ghoreishi, D., Chen, W., Wang, L., Damm, W., Ross, G. A., Dahlgren, M. K., Russell, E., Von Bargen, C. D., Abel, R., Friesner, R. A. and Harder, E. D. (2021). OPLS4: Improving force field accuracy on challenging regimes of chemical space. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 17(7), 4291–4300.

142. Aamir, M., Singh, V. K., Dubey, M. K., Meena, M., Kashyap, S. P., Katari, S. K., Upadhyay, R. S., Umamaheswari, A. and Singh, S. (2018). In silico prediction, characterization, molecular docking, and dynamic studies on fungal SDRs as novel targets for searching potential fungicides against *Fusarium* wilt in tomato. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1038.
143. Nayana R U, K., Ashraf, S., Sevugapperumal, N., N, S., Fatimah, N. and Raish, M. (2025). Molecular docking and comparative transcriptome analysis of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* grown in 2,4-di-tert-butyl phenol amended medium deciphers the antifungal action of 2,4-di-tert-butyl phenol. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 136, 102523.
144. Gontia-Mishra, I., Singh, V. K., Tripathi, N., Sasidharan, S. and Tiwari, S. (2014). Computational identification, homology modelling and docking analysis of phytase protein from *Fusarium oxysporum*. *Biologia*, 69(10), 1283–1294.
145. Kaddouri, Y., Abridach, F., Ouahhoud, S., Benabbes, R., El Kodadi, M., Alsalme, A., Al-Zaqri, N., Warad, I. and Touzani, R. (2021). Synthesis, characterization, reaction mechanism prediction and biological study of mono, bis and tetrakis pyrazole derivatives against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedinis* with conceptual DFT and ligand-protein docking studies. *Bioorganic Chemistry*, 110, 104696.
146. Evans, R., O'Neill, M., Pritzel, A., Antropova, N., Senior, A., Green, T., Židek, A., Bates, R., Blackwell, S., Yim, J., Ronneberger, O., Bodenstein, S., Zielinski, M., Bridgland, A., Potapenko, A., Cowie, A., Tunyasuvunakool, K., Jain, R., Clancy, E. and Hassabis, D. (2022). Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer. *bioRxiv*, 2021.10.04.463034.
147. İnternet: Press release: The Nobel Prize in Chemistry 2024. (t.y.). *NobelPrize.Org*. Web: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2024/press-release/>, Son Erişim Tarihi: 03 Mayıs 2025.
148. Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., Ronneberger, O., Willmore, L., Ballard, A. J., Bambrick, J., Bodenstein, S. W., Evans, D. A., Hung, C.-C., O'Neill, M., Reiman, D., Tunyasuvunakool, K., Wu, Z., Žemgulytė, A., Arvaniti, E. and Jumper, J. M. (2024). Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, 630(8016), 493–500.
149. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J. and Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589.
150. İnternet: AlphaFold 3 predicts the structure and interactions of all of life's molecules. (2024, Mayıs 8). *Google*. Web: <https://blog.google/technology/ai/google-deepmind-isomorphic-alphafold-3-ai-model/> Son Erişim Tarihi: 03 Mayıs 2025,
151. Marcu, Ş.-B., Tăbîrcă, S. and Tangney, M. (2022). An overview of Alphafold's breakthrough. *Frontiers in Artificial Intelligence*, 5, 875587.

152. Lin, Z., Akin, H., Rao, R., Hie, B., Zhu, Z., Lu, W., Smetanin, N., Verkuil, R., Kabeli, O., Shmueli, Y., dos Santos Costa, A., Fazel-Zarandi, M., Sercu, T., Candido, S. and Rives, A. (2023). Evolutionary-scale prediction of atomic-level protein structure with a language model. *Science*, 379(6637), 1123–1130.
153. Zamanos, A., Ioannakis, G. and Emiris, I. Z. (2024). HydraProt: A new deep learning tool for fast and accurate prediction of water molecule positions for protein structures. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 64(7), 2594–2611.
154. İnternet: Schrödinger Release 2023-4: Protein Preparation Wizard; Epik; Impact; Prime [Software]. (2023). *Schrödinger, LLC, New York, NY*. Web: <https://www.schrodinger.com/life-science/download/release-notes/release-2023-4>, Son Erişim Tarihi: 22/05/2025.
155. On the determination of molecular fields. —II. From the equation of state of a gas. (1924). *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 106(738), 463–477.
156. Rostkowski, M., Olsson, M. H., Søndergaard, C. R. and Jensen, J. H. (2011). Graphical analysis of pH-dependent properties of proteins predicted using PROPKA. *BMC Structural Biology*, 11(1), 6.
157. İnternet: Schrödinger Release 2023-4: Induced Fit Docking protocol; Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2023; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2023. (t.y.). [Software]. Web: <https://www.schrodinger.com/life-science/download/release-notes/release-2023-4>, Son Erişim Tarihi: 22/05/2025.
158. İnternet: Schrödinger Release 2023-4: Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2023. (t.y.). [Software]. Web: <https://www.schrodinger.com/life-science/download/release-notes/release-2023-4>, Son Erişim Tarihi: 22/05/2025.
159. İnternet: Schrödinger Release 2023-4: QSite, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2023. (t.y.). [Software]. Web: <https://www.schrodinger.com/life-science/download/release-notes/release-2023-4>, Son Erişim Tarihi: 22/05/2025.
160. Walker, M., Harvey, A. J. A., Sen, A. and Dessent, C. E. H. (2013). Performance of M06, M06-2X, and M06-HF density functionals for conformationally flexible anionic clusters. *The Journal of Physical Chemistry A*, 117(47), 12590–12600.
161. Hohenstein, E. G., Chill, S. T. and Sherrill, C. D. (2008). Assessment of the performance of the M05-2X and M06-2X exchange-correlation functionals for noncovalent interactions in biomolecules. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 4(12), 1996–2000.
162. Mark, P. and Nilsson, L. (2001). Structure and dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E water models at 298 K. *The Journal of Physical Chemistry A*, 105(43), 9954–9960.
163. Liu, J., Wang, C., Kong, L., Yang, Y., Cui, X., Li, K. and Nian, H. (2023). Rho2 involved in development, stress response and pathogenicity of *Fusarium oxysporum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(10), 272.

164. İnternet: Schrödinger Release 2023-4: Desmond Molecular Dynamics System, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2023. Maestro-Desmond Interoperability Tools, Schrödinger, New York, NY, 2023. (t.y.). [Software]. Web: <https://www.schrodinger.com/life-science/download/release-notes/release-2023-4>, Son Erişim Tarihi: 22/05/2025.
165. Evans, D. J. and Holian, B. L. (1985). The Nose-Hoover thermostat. *Journal of Chemical Physics*, 83(8), 4069–4074.
166. Martyna, G. J., Tobias, D. J. and Klein, M. L. (1994). Constant pressure molecular dynamics algorithms. *The Journal of Chemical Physics*, 101(5), 4177–4189.
167. Genheden, S. and Ryde, U. (2015). The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 10(5), 449–461.
168. İnternet: Schrödinger Release 2023-4: Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2023. (t.y.). [Software]. Web: <https://www.schrodinger.com/life-science/download/release-notes/release-2023-4>, Son Erişim Tarihi: 22/05/2025.
169. Li, J., Abel, R., Zhu, K., Cao, Y., Zhao, S. and Friesner, R. A. (2011). The VSGB 2.0 model: A next generation energy model for high resolution protein structure modeling. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 79(10), 2794–2812.
170. Pearson, K. (1901). On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 2(11), 559–572.
171. Zelnik-Manor, L. and Perona, P. (2004). Self-tuning spectral clustering. *Proceedings of the 18th International Conference on Neural Information Processing Systems*, 1601–1608.
172. Ankerst, M., Breunig, M. M., Kriegel, H.-P. and Sander, J. (1999). OPTICS: Ordering points to identify the clustering structure. *SIGMOD Record*, 28(2), 49–60.
173. Harris, C. R., Millman, K. J., Van Der Walt, S. J., Gommers, R., Virtanen, P., Cournapeau, D., Wieser, E., Taylor, J., Berg, S., Smith, N. J., Kern, R., Picus, M., Hoyer, S., Van Kerkwijk, M. H., Brett, M., Haldane, A., Del Río, J. F., Wiebe, M., Peterson, P. and Oliphant, T. E. (2020). Array programming with NumPy. *Nature*, 585(7825), 357–362.
174. Michaud-Agrawal, N., Denning, E. J., Woolf, T. B. and Beckstein, O. (2011). MDAAnalysis: A toolkit for the analysis of molecular dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 32(10), 2319–2327.
175. Abraham, A., Pedregosa, F., Eickenberg, M., Gervais, P., Mueller, A., Kossaifi, J., Gramfort, A., Thirion, B. and Varoquaux, G. (2014). Machine learning for neuroimaging with scikit-learn. *Frontiers in Neuroinformatics*, 8.
176. Pedregosa, F., Varoquaux, G., Gramfort, A., Michel, V., Thirion, B., Grisel, O., Blondel, M., Prettenhofer, P., Weiss, R. and Dubourg, V. (2011). Scikit-learn: Machine learning in Python. *The Journal of Machine Learning Research*, 12, 2825–2830.

177. McKinney, W. (2011). pandas: A foundational Python library for data analysis and statistics. *Python for High Performance and Scientific Computing*, 14(9), 1–9.
178. Scherer, M. K., Trendelkamp-Schroer, B., Paul, F., Pérez-Hernández, G., Hoffmann, M., Plattner, N., Wehmeyer, C., Prinz, J.-H. and Noé, F. (2015). PyEMMA 2: A Software Package for Estimation, Validation, and Analysis of Markov Models. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 11(11), 5525–5542.
179. Ortaakarsu, A. B., Boğa, Ö. B. ve Kurbanoğlu, E. B. (2025). *Cardaria draba* subspecies *Shalepensis* exerts in vitro and in silico inhibition of α -glucosidase, TRP1, and DLD-1 proliferation. *Scientific Reports*, 15(1), 10402.
180. Bao, A., Jiang, W., Xie, X., Wang, D., Deng, Z., Wang, J., Li, W., Tang, X. and Yan, Y. (2024). Design, Synthesis, Bioactive Evaluation, and Molecular Dynamics Simulation of Novel 4H-Pyrano[3,2-c]pyridine Analogues as Potential Sterol 14 α -Demethylase (CYP51) Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 67(10), 7954–7972.
181. Revathi, S. and Ghatak, T. (2023). N-Heterocyclic Imine-Supported Bimetallic Cu(II) Catalyst for Azide-Alkyne Cycloaddition: Solvent-free, Reductant-free, ppm-level Catalysis to Access 1,4-Disubstituted Triazoles. *Chemistry – An Asian Journal*, 18(10), e202300156.
182. Pathigoolla, A., Pola, R. P. and Sureshan, K. M. (2013). A versatile solvent-free azide–alkyne click reaction catalyzed by in situ generated copper nanoparticles. *Applied Catalysis A: General*, 453, 151–158.
183. Feldman, A. K., Colasson, B. and Fokin, V. V. (2004). One-Pot Synthesis of 1,4-Disubstituted 1,2,3-Triazoles from In Situ Generated Azides. *Organic Letters*, 6(22), 3897–3899.
184. Kafle, A. and Handy, S. T. (2017). A one-pot, copper-catalyzed azidation/click reaction of aryl and heteroaryl bromides in an environmentally friendly deep eutectic solvent. *Tetrahedron*, 73(50), 7024–7030.
185. Bistrovic, A., Krstulovic, L., Harej, A., Grbčić, P., Sedić, M., Koštrun, S., Pavelić, S. K., Bajić, M. and Raić-Malić, S. (2018). Design, synthesis and biological evaluation of novel benzimidazole amidines as potent multi-target inhibitors for the treatment of non-small cell lung cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 1616–1634.
186. Ji, S. H., Gururani, M. A. and Chun, S.-C. (2014). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological Research*, 169(1), 83–98.
187. Kumar, A., Maurya, B. R. and Raghuwanshi, R. (2014). Isolation and characterization of PGPR and their effect on growth, yield and nutrient content in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), 121–128.

188. Khan, N., Bano, A., Rahman, M. A., Guo, J., Kang, Z. and Babar, M. A. (2019). Comparative Physiological and Metabolic Analysis Reveals a Complex Mechanism Involved in Drought Tolerance in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Induced by PGPR and PGRs. *Scientific Reports*, 9(1), 2097.
189. Sharma, S., Kaur, M. and Prashad, D. (2014). Isolation of fluorescent *Pseudomonas* strain from temperate zone of Himachal Pradesh and their evaluation as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *The Bioscan*, 9(1), 323–328.
190. Dalal, J. and Kulkarni, N. (2015). Effect of endophytic treatments on plant growth performance and disease incidences in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) Cultivar JS-335 against challenge inoculation with *R. solani*. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 10(2), 99.
191. He, A., Niu, S., Yang, D., Ren, W., Zhao, L., Sun, Y., Meng, L., Zhao, Q., Paré, P. W. and Zhang, J. (2021). Two PGPR strains from the rhizosphere of *Haloxylon ammodendron* promoted growth and enhanced drought tolerance of ryegrass. *Plant Physiology and Biochemistry*, 161, 74–85.
192. Wada, S., Kushida, T., Itagaki, H., Shibue, T., Kadowaki, H., Arakawa, J. and Furukawa, Y. (2021). ¹³C NMR study on carbamate hydrolysis reactions in aqueous amine/CO₂ solutions. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 104, 103175.
193. Nagy, P. I. (2014). Competing Intramolecular vs. Intermolecular Hydrogen Bonds in Solution. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(11), 11.
194. Li, H., Han, J., Zhao, H., Liu, X., Ma, L., Sun, C., Yin, H. and Shi, Y. (2018). Investigation of the Intermolecular Hydrogen Bonding Effects on the Intramolecular Charge Transfer Process of Coumarin 340 in Tetrahydrofuran Solvent. *Journal of Cluster Science*, 29(4), 585–592.
195. Jiang, Z., Zhao, P., Li, J., Liu, X. and Hu, C. (2018). Effect of Tetrahydrofuran on the Solubilization and Depolymerization of Cellulose in a Biphasic System. *ChemSusChem*, 11(2), 397–405.
196. Ishikawa, M. and Hashimoto, Y. (2011). Improvement in Aqueous Solubility in Small Molecule Drug Discovery Programs by Disruption of Molecular Planarity and Symmetry. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(6), 1539–1554.
197. Zhang, Y., Fan, L., Su, C., Shu, Z. and Zhang, H. (2024). Application of machine learning in developing a quantitative structure–property relationship model for predicting the thermal decomposition temperature of nitrogen-rich energetic ionic salts. *RSC Advances*, 14(51), 37737–37751.
198. Harmankaya, A., Medetalibeyoğlu, H., Ortaakarsu, A. B., Atalay, A., Manap, S., Koca, E., Yıldız, Ç., Köçek, N. and Yüksek, H. (2025). Novel 2-methoxy-4-(((3-methyl-5-oxo-1,5-dihydro-4H-1,2,4-triazol-4-yl)-imino)-methyl)-phenyl benzoate as a potential drug candidate: Synthesis, spectroscopy, TD-DFT, NBO, TDM, FMO, MEP, molecular docking, and molecular dynamics studies. *Journal of Molecular Structure*, 1338, 142286.

199. Lodola, A., Capoferri, L., Rivara, S., Chudyk, E., Sirirak, J., Dyguda-Kazimierowicz, E., Sokalski, A., Mileni, M., Tarzia, G., Piomelli, D., Mor, M. and Mulholland, A. J. (2011). Understanding the role of carbamate reactivity in fatty acid amide hydrolase inhibition by QM/MM mechanistic modelling. *Chemical Communications*, 47(9), 2517–2519.
200. Goldblum, A. (1983). Structure-activity relationships of cholinesterase inhibitors. I. Quantum mechanical study of affinities of phenyl N-methyl carbamates. *Molecular Pharmacology*, 24(3), 437–443.
201. Douglas-Gallardo, O. A., Murillo-López, J. A., Oller, J., Mulholland, A. J. and Vöhringer-Martinez, E. (2022). Carbon Dioxide Fixation in RuBisCO Is Protonation-State-Dependent and Irreversible. *ACS Catalysis*, 12(15), 9418–9429.
202. Yasuda, I., Endo, K., Yamamoto, E., Hirano, Y. and Yasuoka, K. (2022). Differences in ligand-induced protein dynamics extracted from an unsupervised deep learning approach correlate with protein–ligand binding affinities. *Communications Biology*, 5(1), 1–9.
203. Aldeghi, M., Bodkin, M. J., Knapp, S. and Biggin, P. C. (2017). Statistical Analysis on the Performance of Molecular Mechanics Poisson–Boltzmann Surface Area versus Absolute Binding Free Energy Calculations: Bromodomains as a Case Study. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 57(9), 2203–2221.
204. Pantsar, T., Kaiser, P. D., Kudolo, M., Forster, M., Rothbauer, U. and Laufer, S. A. (2022). Decisive role of water and protein dynamics in residence time of p38 α MAP kinase inhibitors. *Nature Communications*, 13(1), 569.
205. Gerhardy, S., Ultsch, M., Tang, W., Green, E., Holden, J. K., Li, W., Estevez, A., Arthur, C., Tom, I., Rohou, A. and Kirchhofer, D. (2022). Allosteric inhibition of HTRA1 activity by a conformational lock mechanism to treat age-related macular degeneration. *Nature Communications*, 13(1), 5222.
206. Yan, J., Zou, W., Fang, J., Huang, X., Gao, F., He, Z., Zhang, K. and Zhao, N. (2015). Eukaryote-like Ser/Thr protein kinase PrkA modulates sporulation via regulating the transcriptional factor σ K in *Bacillus subtilis*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 382.
207. Motley, S. T. and Lory, S. (1999). Functional characterization of a serine/threonine protein kinase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 67(10), 5386–5394.
208. Jalmi, S. K. and Sinha, A. K. (2022). Ambiguities of PGPR-Induced Plant Signaling and Stress Management. *Frontiers in Microbiology*, 13, 899563.
209. Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessi res, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B. and Danchin, A. (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390(6657), 249–256.





Gazili olmak ayrıcalıktır...