



ARAŞTIRMA MAKALESI / RESEARCH ARTICLE

Gümüş Nanopartiküllerin Morfolojisinin Protein Etkileşimleri Üzerindeki Etkisi

The Effect of the Morphology of Silver Nanoparticles on Their Interactions with Proteins

Aysel Tomak , Ceyda Öksel Karakuş 

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü, İzmir, TÜRKİYE
Sorumlu Yazar / Corresponding Author*: ceydaoksel@iyte.edu.tr

Öz

Nanoteknolojideki gelişmelere paralel olarak biyomedikal uygulamalarda kullanılan nanopartiküllerin sayısında hızlı bir artış yaşanmıştır. Gümüş nanopartiküller, farklı metalik nanopartikül grupları arasında başta antibakteriyel etkinlik olmak üzere tıbbi uygulamaların gereksinimleriyle örtüşen çeşitli avantajlara sahip olmaları dolayısıyla öne çıkmakta ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Gümüş nanopartikülleri avantajlı kılan yapı ve yüzey özellikleri biyolojik ortam etkileşimleri sonucunda değişiklik gösterebilmekte ve bu değişimler dolayısıyla biyolojik aktivite ve foksionellik gibi nanopartikül özellikleri de doğrudan etkilenmektedir. Nanopartiküllerin biyolojik ortamlarda değişen yüzey özelliklerinin en büyük nedeninin yüzeylerine tutunan proteinler olduğu bilinmektedir. Ancak nanopartiküllerin morfolojik özelliklerinin etraflarında oluşan bu protein halkasının bileşimine ve miktarına olan etkisi tam olarak aydınlatılmamıştır. Bu çalışmada, partikül morfolojisinin nanopartikül-protein etkileşimleri üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla küresel ve prizma-benzeri yapıya sahip gümüş nanopartikülleri detaylı olarak karakterize edilmiş ve yüzeylerine tutunan proteinler sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemiyle analitik olarak tayin edilmiştir. Spesifik olarak, küresel ve prizmatik morfolojiye sahip gümüş nanopartikülleri protein eklentili hücre kültürü ortamı içerisinde farklı süre (15 dk, 2 sa ve 24 sa) ve sıcaklıklarda (22 °C ve 37 °C) inkübe edilmiş ve yüzeylerine tutunan proteinler tür ve miktar açısından karşılaştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Nanopartikül, Nanogümüş, Protein Korona, Jel Elektroforezi

Abstract

In parallel with the developments in nanotechnology, there has been a rapid increase in the number of nanoparticles used in biomedical applications. Silver nanoparticles stand out among different metallic nanoparticle groups because the advantages they offer (e.g., antibacterial activity) mostly overlap with the needs of medical applications. However, the structural features and surface properties that make silver nanoparticles advantageous in biomedical applications can be altered as a result of interactions with the biological environment, which, in turn, is reflected in the biological activity and functionality of nanoparticles. It is well-reported in the literature that the main factor responsible for the changing surface properties of nanoparticles in biological environments is the proteins attached to their surfaces, forming a so-called protein-corona layer around nanoparticles. However, the effect of the morphological properties of nanoparticles on the composition and amount of this protein corona layer formed has not been fully elucidated. In this study, the effect of silver nanoparticles' morphology on nanoparticle-protein interactions was investigated. To that end, silver nanoparticles of spherical and prismatic shape were characterized in detail and the proteins attached to their surfaces were determined qualitatively by the sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) method. More specifically, silver nanoparticles with spherical and prismatic morphology were incubated in protein-supplemented cell culture medium at different durations (15 min, 2 h and 24 h) and temperatures (22 °C and 37 °C), and the proteins attached to their surfaces were compared in terms of type and amount.

Keywords: Nanoparticles, Nanosilver, Protein Corona, Gel Electrophoresis

EXTENDED ABSTRACT

Introduction

Nanotechnology is an umbrella term that covers advanced work and concepts related to engineering and manipulating materials at the atomic scale [1]. Today, there are more than 10 thousand commercial products containing nanoparticles, the majority of which are in the medical and cosmetic industry. Despite the ongoing controversies concerning nanomaterial definition,

materials with at least one dimension in the range of 1-100 nm are considered nanomaterials. Some nanoparticles tend to aggregate and form larger clusters in colloidal solutions and it affects their cellular behavior. Another nanomaterial feature that changes in physiological environments is their surface characteristics. Specifically, proteins in the cellular environments attach to the surfaces of nanoparticles, forming a dense protein layer around them, and this greatly changes the biological

identity of nanoparticles [2]. This dynamic structure, called protein corona, varies depending on the intrinsic characteristics of nanoparticles and the surrounding medium.

Among all different nanoparticle classes, silver nanoparticles are widely used in biomedical applications due to their antibacterial, antioxidant, antiviral and antifungal capabilities [3, 4]. The effective and safe use of silver nanoparticles in industrial applications depends highly on the understanding and control of nanoparticle-protein interactions and the subsequent changes in their biological behaviour/fate. In this study, the proteins that bind to the surface of silver nanoparticles in serum-containing cell culture medium was analyzed in detail and the results of spherical nanoparticles were compared with those of prismatic shape. The ultimate aim here is to understand the effect of the morphological properties of silver nanoparticles on the composition and amount of protein corona layer formed around their surfaces in biological environments.

Materials and Methods

Nanoparticles and reagents. Silver nanoparticles with spherical (Catalog no. 796131) and prism-like morphology (Catalog no. 796484) were obtained from Sigma-Aldrich. Trizma base, brilliant G blue, glycerol, sodium dodecyl sulfate, acrylamide, n, n'-methylenebisacrylamide, glycine, aluminum sulfate hydrate, bromophenol blue, 2-mercaptoethanol, ammonium persulfate, n, n, n', n'-tetramethylethylenediamine, trichloroacetic acid and cell culture medium (DMEM, Dulbecco's modified eagle medium) were obtained from Sigma-Aldrich. Fetal bovine serum (FBS) was purchased from Hyclone, and phosphate saline buffer (PBS) was purchased from PAN Biotech. Hydrochloric acid, acetic acid, and ethanol were purchased from ISOLAB. Ortho-phosphoric acid (85%) and tert-amyl alcohol were purchased from Merck. The sheet ruler and prestained protein ladder (Catalog no. 26616) were purchased from Thermo Fisher Scientific.

Physicochemical characterization. Detailed characterization of silver nanoparticles was performed by Scanning Electron Microscopy (SEM), Transmission Electron Microscopy (TEM), Ultraviolet-Visible Light Spectrophotometry (UV-Vis-NIR) and Dynamic Light Scattering (DLS).

Sample preparation. Centrifugation was applied at 12500 rpm for 15 minutes to remove excess surfactants on silver nanoparticles. The precipitated part after centrifugation was redissolved in deionized water or PBS, depending on the type of analysis.

SDS-PAGE analysis. SDS-PAGE was used to separate and detect proteins attached to silver nanoparticles according to their molecular weight. Silver nanoparticles were incubated with 10% FBS-containing DMEM at room temperature for 15 minutes, 2 or 24 hours and centrifuged for 15 minutes. To remove unbound proteins from the medium, 3 cycles of washing were performed with PBS, heat treatment was applied with 1% sodium dodecyl sulfate solution at 95 °C for 5 minutes, and centrifugation was performed again to separate loosely and tightly bound proteins.

Results and Discussion

Silver nanoparticles were characterized by UV-Vis-NIR, SEM/STEM, TEM and DLS before and after protein corona formation. The obtained UV-Vis-NIR spectra was found consistent with the characteristic peaks of nanosilver present in the literature [5-7]. TEM images confirmed the presence of the protein corona layer around nanoparticles following incubation in a serum-containing cell culture medium. It was also apparent in TEM images that prismatic nanoparticles gained a spherical morphology after protein corona formation. Following

incubation, the aggregation tendency was increased for both morphologies, as evidenced by the increase in mean particle size. The resulting protein corona structure was found to be consistent with the literature [8, 9].

The proteins attached to the surface of silver nanoparticles caused a significant increase in the hydrodynamic diameter of nanoparticles that was calculated based on the movement of particles suspended in a liquid (assuming spherical geometry). The results indicated that the hydrodynamic diameter tripled after 2 hours of incubation and further increased 4-fold at the end of 24 hours. Similarly, the zeta potential of nanoparticles shifted to more negative values with increasing incubation time. In line with the literature, this change confirmed the significant effect of nanoparticle-protein interactions on changing surface properties and electrostatic balances of nano-systems [10-12]. DLS analysis was not performed with prismatic nanosilver, as it contradicted the spherical particle morphology assumption forming the basis of the DLS technique.

The proteins attached to the surface of the nanoparticles with weak and strong bonds were separated by the SDS-PAGE technique and estimated depending on their molecular weights. The main protein groups attached to the particle surface were albumin, α -2-HS-glycoprotein, α -1-antiproteinase and serotransferrin, mostly consistent with the published literature. In line with our findings, Shannahan and co-workers listed albumin, α -2-HS-glycoprotein and α -1-antiproteinase among the most common protein groups attached to the surfaces of silver nanoparticles [12]. Interestingly, Lai and co-workers reported that the most abundant protein groups in plasma, such as serum albumin, apolipoproteins and serotransferrin, were found in relatively low concentrations in the formed corona compared to fibrinogen and kininogen [13].

The number of attached proteins was estimated based on the band resolution and thickness. The protein density on the surface of the spherical nanoparticles was found to be higher when compared to the silver nanoparticles of prismatic shape incubated at 37 °C, but this difference decreased when incubation took place at room temperature. All these findings highlight the importance of both sample preparation conditions and nanoparticle morphology in determining protein interactions. Literature findings confirm that both material-specific physicochemical properties and methodological parameters have a significant impact on the detection of protein targets of nanoparticles [14-16].

Conclusion

In this study, the influence of nanoparticle morphology (i.e. particle shape) on nanoparticle-protein interactions was investigated by combining physicochemical characterization techniques with the SDS-PAGE protein separation analysis. Being based on the separation of proteins according to their migration distance and the corresponding molecular weight on the gel, the identity of unknown proteins can only be determined in a probabilistic manner with SDS-PAGE by comparing the size of the proteins present in the medium to those of identified by the technique. For more definite (and quantitative) protein identification, follow-up techniques such as liquid chromatography tandem mass / mass spectrometer are needed. While the scope of this study is limited to understanding the role of intrinsic material properties in driving corona formation, future studies will focus on the subsequent effects of the attached proteins on the biological activities of silver nanoparticles.

1. Giriş

Nanoteknoloji malzemelerin atomik boyutta işlenmesini ve modifikasyonu içeren mühendislik ve teknoloji çalışmalarının tümüne verilen addır [1]. Nanoteknoloji ürünü malzemeler yaklaşık 50 yıl önce hayatımıza girmiş ve tıp alanı başta olmak üzere çok çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılmak üzere özelleştirilmiştir [17, 18]. Günümüzde, büyük çoğunluğu tıp ve kozmetik sektöründe olmak üzere 10 binden fazla nanopartikül içeren ticari ürün olduğu düşünülmektedir.

En az bir boyutu 1-100 nanometre aralığında olan tüm malzemeler nanomalzeme olarak kabul edilmekle birlikte koloidal çözeltiler içerisinde nanopartiküller topaklanarak daha büyük kümeler oluşturma eğilimi göstermektedir [19]. Agregasyon olarak adlandırılan bu durumun sonucunda nanopartiküller işlevselliğini genel hatlarıyla korumakla birlikte hücre davranışları çeşitlilik göstermektedir. Fizyolojik ortamlarda değişen bir diğer nanomalzeme özelliği yüzey karakteristiğidir. Spesifik olarak, hücre ortamında bulunan proteinler nanopartiküllerin yüzeylerine gevşek veya sıkı bağlarla tutunarak etraflarında yoğun bir protein halkası oluşturmakta ve bu durum nanopartiküllerin biyolojik kimliğini büyük oranda değiştirmektedir [2]. *Protein taç* veya *protein korona* olarak adlandırılan bu dinamik yapı gerek nanopartiküllerin yapısal özelliklerine gerekse buldukları ortamın çevresel özelliklerine bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir.

Nanopartiküller, oluşum şekillerine (doğal veya sentetik), boyutlarına (0, 1, 2, veya 3 boyutlu), morfolojilerine (küresel, kübik, prizmatik, çubuk veya plaka şeklinde) veya yapısal bileşimlerine (organik, metalik veya karbon-yapılı) göre sınıflandırılabilir [20]. Tüm bu farklı nanopartikül sınıfları içerisinde gümüş nanopartiküller antibakteriyel, antioksidan, antiviral ve antifungal etkinlikleri dolayısıyla öne çıkmakta ve biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır [3, 4]. Gümüş nanopartikülleri biyomedikal uygulamalar açısından avantajlı kılan yapısal özellikleri biyolojik ortamlarda yüzeylerine makromoleküllerin tutunması sonrasında değişiklik gösterebilmektedir. Bu nedenle gümüş nanopartiküllerin endüstriyel uygulamalardaki etkin ve güvenli kullanımı ancak fizyolojik ortamda değişen fizikokimyasal özelliklerinin tespiti ve hassas kontrolü ile mümkün olmaktadır.

Literatürde gümüş nanopartiküllerin makromoleküller ile ilişkilerini ve bu etkileşimlerin toksite üzerindeki etkisini inceleyen pek çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Örneğin Podila ve çalışma ark. gümüş nanopartiküllerin kan plazmasında en yaygın olarak bulunan protein grubu albumin ile etkileşimlerini incelemiş ve nanopartikül yüzeyindeki farklı fonksiyonel grupların protein korona oluşumu üzerindeki etkisini farklı spektroskopik teknikler yardımıyla analiz etmiştir [21]. Devam niteliğindeki çalışmalarında iki farklı boyuta (20 ve 110 nm) ve iki farklı yüzey modifikasyonuna (sitrat ve polivinilpirolidon) sahip gümüş nanopartiküllerini hücre kültürü besiyeri içerisinde 1 saat inkübe etmiş ve yüzeylerinde tutunan protein gruplarını karşılaştırmıştır [12]. Tutunan proteinlerin miktarlarında ve türlerinde partikül boyutuna ve yüzey özelliklerine bağlı farklar gözlemlenmiş olsalar da dört temel protein grubunun (serum albümini, alfa-1 antiproteinaz, alfa-2-HS-glikoprotein ve apolipoprotein A-I) tüm nanopartikül örneklerinin yüzeyinde en fazla miktarda bulunduğunu tespit etmişlerdir. Benzer bir çalışmada Lai ve ark. üç farklı yüzey modifikasyonuna (sitrat, polietilenimin ve polivinilpirolidon) sahip 20 nm ölçüsündeki gümüş nanopartiküllerin plazma proteinleri ile etkileşimlerini incelemiş ve yüzey yükünün oluşan

protein taç yapısı üzerinde önemli bir etkisi olduğu sonucuna varmıştır [13]. Bir başka çalışmada Barbalinardo ve ark. sitrat ve tiyol kaplı nano-gümüşü hücre kültürü ortamında inkübe etmiş ve partiküllerin yüzeylerinde tutunan farklı protein gruplarının hücre etkileşimleri ve sitotoksite üzerindeki önemli etkisini fare embriyonik fibroblast hücreleri yardımıyla ortaya koymuştur [22].

Literatürdeki yayınlara bakıldığında nanogümüş-protein etkileşimlerinin incelendiği çalışmalarda çoğunlukla küresel morfolojiye sahip nanopartiküllerin kullanıldığı görülmektedir [23-25]. Alanda nispeten nadir bulunan ve morfolojik farkların araştırıldığı çalışmalardan birinde dört farklı geometride (küresel, prizmatik, küp ve tel formunda) sentezlenen gümüş nanopartiküllerin serum proteinleri ile ilişkisi incelenmiş ve pürüzsüz yüzeylere kıyasla keskin uçlarda daha fazla proteinin tuttuğu gösterilmiştir [26]. Aynı çalışma kapsamında pürüzlü nanopartikül yüzeylerine tutunan protein gruplarının molekül ağırlığı bakımından daha heterojen bir profile sahip olduğu ortaya koyulmuştur. Bu bulgular farklı nanopartikül gruplarını içeren çalışmaların sonuçları ile oldukça uyumludur [27, 28].

Bir önceki çalışmamızda gümüş nanopartiküllerin etraflarında oluşan protein yapısının çevresel koşullara bağlı değişimi detaylı olarak incelenmiştir [15]. Bu çalışma kapsamında ise gümüş nanopartiküllerin morfolojik yapılarının protein etkileşimleri üzerine etkisi incelenmiştir. Bulgular ışığında gümüş nanopartiküllerin şekillerinin nanopartikül-protein etkileşimlerini belirlemedeki rolünün aydınlatılması hedeflenmiştir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Materyal

Küresel gümüş nanopartikülleri (K-AgNP, Katalog no. 796131), ve prizma-benzeri morfolojiye sahip gümüş nanopartikülleri (P-AgNP, Katalog no. 796484) Sigma-Aldrich (Amerika) firmasından temin edilmiştir. Tüm malzemeler yüksek saflıkta olduğu için ek saflaştırma tekniklerine ihtiyaç duyulmamıştır.

2.2. Reaktifler

Trizma bazı, brilliant G mavis, gliserol, sodyum dodesil sülfat, akrilamid, n, n'- metilenbisakrila-mid, glisin, alüminyum sülfat hidrat, bromofenol mavis, 2-merkaptotanol, amonyum persülfat, n, n, n', n'-tetrametiletendiamin, trikloroasetik asit ve hücre kültürü besiyeri (DMEM, Dulbecco's modified eagle medium) Sigma-Aldrich (Amerika) firmasından temin edilmiştir. Fetal sığır serum (FBS) Hyclone firmasından, fosfat salin tamponu (PBS) ise PAN Biotech'ten (Almanya) satın alınmıştır. Hidroklorik asit, asetik asit ve etanol ISOLAB'dan satın alınmıştır. Orto-fosforik asit (%85) ve tert-amil alkol Merck firmasından satın alınmıştır. Sayfa cetveli ve önceden boyanmış protein merdiveni (katalog no. 26616) Thermo Fisher Scientific'ten satın alınmıştır.

2.3. Karakterizasyon

İki farklı morfolojiye sahip gümüş nanopartiküllerin detaylı yapısal ve morfolojik karakterizasyonu Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM), Geçirimli Elektron Mikroskopi (TEM) ve Morötesi-Görünür Işık Spektrofotometre (UV-VIS-NIR) teknikleri kullanılarak yapılmıştır. SEM görüntüleri, geri saçılmış elektron (BSE), ikincil elektron (SE) ve taramalı geçirimli elektron mikroskobu (STEM) dedektörleri ile 5-10 keV çalışma voltajı aralığında FEI QUANTA 250 FEG cihazı kullanılarak elde edilmiştir. Toplam 20 µL numune dispersiyonu Silisyum (Si) alttaş üzerine damlatılarak açık atmosferde kurumaya bırakılmıştır. Yeni hazırlanmış numuneler, iletken karbon yapışkan bant ile numune tutucuya yapıştırılmıştır.

Nanopartikül-lerin hidrodinamik çap ölçümleri dinamik ışık saçılımı (DLS) tekniğiyle (MALVERN Zetasizer Nano ZS) gerçekleştirilmiştir. TEM hariç tüm karakterizasyon testleri Tümüleşik Araştırma Merkezi bünyesinde yapılmıştır. TEM görüntüleri ise FEI Tecnaı G2 Spirit BioTwin cihazı ile Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda elde edilmiştir. 350-750 nm dalga boyu aralığında gümüş nanopartiküllerin absorptans ölçümleri için UV-Vis-NIR mikropılaka spektrofotometresi (Thermo Scientific Multiskan Sky Microplate) kullanılmıştır. Zeta potansiyel değerleri 25 °C'de tek kapiler hücrelerde pH 7.3'te ölçülmüştür.

2.4. Örnek hazırlama

Gümüş nanopartiküllerin üzerindeki fazla yüzey aktif maddeleri uzaklaştırmak için 15 dakika boyunca 12500 rpm hızında santrifüj işlemi uygulanmıştır. Santrifüj sonrası çöken kısım analiz türüne göre deiyonize su veya PBS içerisinde tekrar çözödürölmüştür. Örnek hazırlamaya bağlı farkları minimuma indirebilmek için tüm ölçümler en az üç kez tekrarlanmıştır.

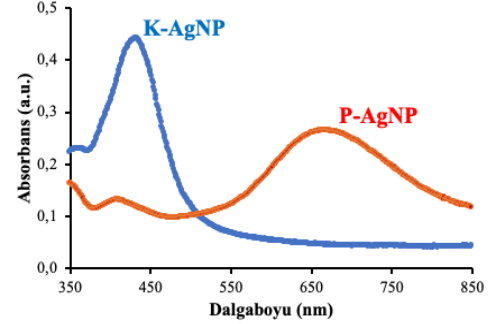
2.5. SDS-PAGE Analizi

Gümüş nanopartiküllerin üzerindeki proteinleri moleköl ağırlığına göre ayırılmak ve tespit etmek için SDS-PAGE kullanılmıştır. Literatürde SDS-PAGE ile nanopartiküllerin yüzeylerinde tutunan proteinlerin analiz edildiği çalışmalara bakıldığında izlenen metodolojinin (1) nanopartiküllerin protein içeren sıvılar ile artan inkübasyonu, (2) üç boyutlu yapıya sahip proteinlerin sodyum dodesil sülfat ile denatüre edilerek doğrusal hale getirilmesi, (3) 95 °C'ye kadar ısıtım uygulanması, (4) denatüre proteinlerin moleköl ağırlığına göre ayırılmıştır, (5) elektroforez işlemi sonucu elde edilen jelin Coomassie Brilliant Blue ile boyanması ve görüntöleme sistemi ile analizi adımlarından oluştuğu görölmektedir [29-34]. Güncel çalışmalarda SDS-PAGE ile elde edilen ön data, sıvı kromatografikütle spektrometresi gibi analitik kimya tekniklerinin bulgularıyla desteklenmekte ve bu sayede daha kantitatif sonuçlar elde edilmektedir [35-37].

Literatürdeki örnek çalışmalardan yola çıkarak %10 FBS ile desteklenmiş DMEM ile oda sıcaklığında 15 dakika, 2 saat veya 24 saat boyunca inkübe edilen gümüş nanopartiküllere 15 dakika boyunca santrifüj işlemi uygulanmıştır. Bağlanmayan proteinleri ortamdan uzaklaştırmak için PBS ile 3 tur yıkama yapılmış, %1 sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi ile 95 °C sıcaklıkta 5 dakika boyunca ısıtım uygulanmış, gevşek ve sıkı bağlı proteinleri ayırmak için tekrar santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Herhangi bir biyolojik sıvı ile inkübe edilmemiş gümüş nanopartikülleri ve inkübasyon ortamı sırasıyla negatif ve pozitif kontroller olarak kullanılmıştır. Yüzeyden kolayca uzaklaştırılabilen proteinler "gevşek bağlı" olarak isimlendirilirken yüzeye daha sıkı tutunduğu düşünölen ve bu nedenle zor ayırılmış proteinler "sıkı bağlı" olarak kabul edilmiştir. Ardından Bio-Rad Mini-PROTEAN jel sistemi kullanılarak %12 SDS-poliakrilamid jel içerisinde 100 V sabit voltajda yaklaşık 100 dakika boyunca 1 boyutlu elektroforez uygulaması gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işlemi sonrası jel trikloroasetik asit (TCA) içerisinde ve çalkalayıcı üzerinde 1 gece bırakılmış, ertesi gün 3 kez deiyonize su ile yıkanmış, Colloidal Coomassie Blue G-250 boyası ile boyanmış ve 1 saat 30 rpm'de çalkalanmıştır. Fazla boya, destaining solüsyonu ile jelden uzaklaştırılmıştır ve jel Versadoc (Bio-Rad) görüntöleme sistemi ile görselleştirilmiştir. Görüntöleme sonrası jel uzun süreli kullanım için 4 °C'de %1 asetik asit çözeltisi içinde saklanmıştır. Tüm adımlar en az iki kez tekrar edilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

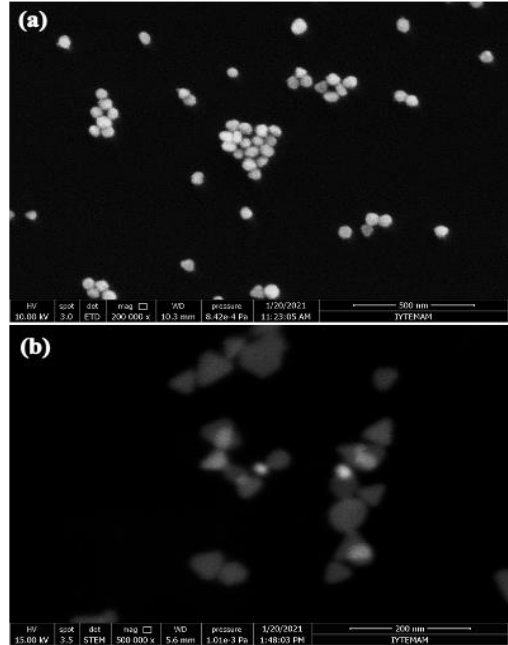
İlk adımda gümüş nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri, UV-Vis-NIR spektroskopisi, SEM ve DLS ile detaylı olarak karakterize edilmiştir. Küresel gümüş nanopartiküllerinin UV-Vis-NIR absorptans spektrumu 435 nm civarında bir bant sergilerken prizma-şeklindeki nanogümüş 420 nm ve 680 nm civarında iki plazmon bandına sahiptir (şekil 1).



şekil 1. Küresel (K-AgNP, mavi) ve prizmatik (P-AgNP, turuncu) nanogümüşe ait UV-Vis-NIR spektrumları

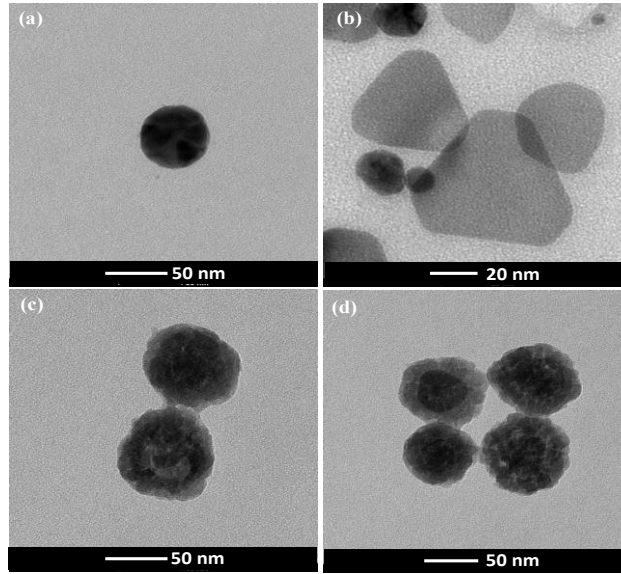
Figure 1. UV-Vis-NIR spectra of spherical (K-AgNP, blue) and prismatic (P-AgNP, orange) nanosilver

Küresel nanogümüşe ait SEM görüntüleri (şekil 2a), nanopartiküllerin ~ 49 nm çapında, küresel formda ve tek dağımlı olduğunu ortaya koymuştur. şekil 2b'deki STEM görüntüsü, prizma formundaki gümüş nanopartiküllerin daha geniş bir boyut dağılımına (30-55 nm) ve üçgen-benzeri bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Küresel nanogümüşe kıyasla prizmatik partiküller daha heterojen bir morfolojiye sahiptir.



şekil 2. (a) Küresel ve (b) Prizmatik nanogümüşe ait SEM görüntüsü. Görüntü ölçeği çubuğu: (a) 500 nm ve (b) 200 nm.

Figure 2. SEM image of (a) Spherical and (b) Prismatic nanosilver. Image scale bar: (a) 500 nm and (b) 200 nm.



Şekil 3. Küresel (a) ve prizmatik (b) nanogümüşe ait TEM görüntüleri; Serum katkılı hücre kültürü ortamında 24 saat inkübe edilmiş küresel (c) ve prizmatik (d) nanogümüşe ait TEM görüntüleri.

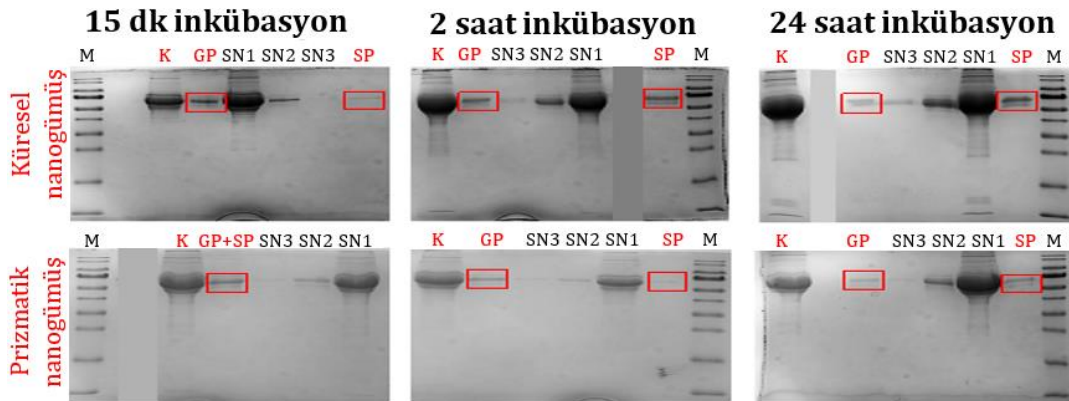
Figure 3. TEM images of spherical (a) and prismatic (b) nanosilver; TEM images of spherical (c) and prismatic (d) nanosilver incubated in serum-supplemented cell culture medium for 24 hours.

Ultra saf su ve PBS içerisinde gerçekleştirilen DLS ölçümlerinde parçacık boyutu sırasıyla 68.7 ± 1.2 nm ve 234.2 ± 3.1 nm olarak bulunmuştur. PBS ile seyreltilme durumunda hidrodinamik çapta görülen bu artış (69 nm'den 234 nm'ye) agregasyon oluşumunu işaret etmektedir.

Benzer şekilde hücre kültürü ortamında inkübasyon sonrası hidrodinamik çapta süreye paralel bir artış gözlenmiş ve 2 saat sonunda 196.8 ± 13.0 nm'ye çıkan boyut 24 saat sonunda 287.1 ± 10.3 nm'ye ulaşmıştır. Benzer şekilde inkübasyon süresi ve zeta potansiyel arasında pozitif bir korelasyon saptanmış ve inkübasyon öncesi -2.3 ± 0.7 mV olarak ölçülen zeta potansiyel değeri 24 saatlik inkübasyon sonrası -22.3 ± 2.0 mV'ye ulaşmıştır. Negativitede gözlenen bu değişim serum ortamında nanopartikül yüzeyindeki büyük değişimleri doğrular niteliktedir.

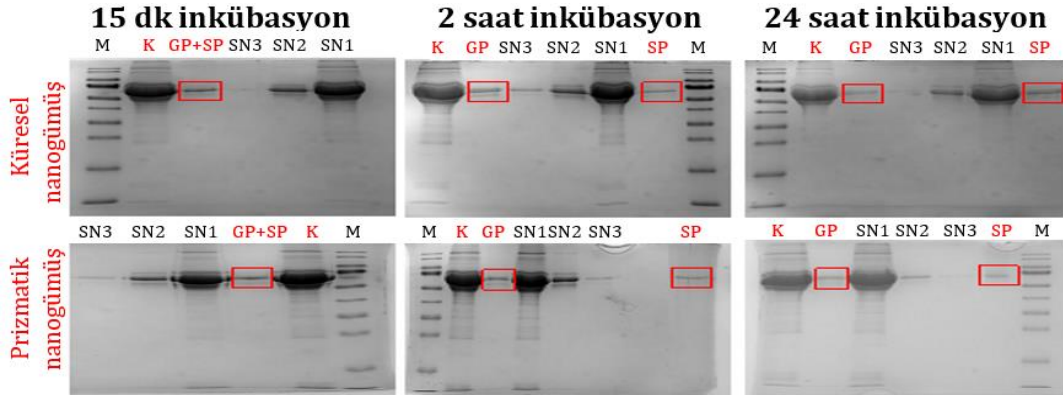
Serum içeren hücre kültürü ortamında gümüş nanopartiküllerin etraflarında oluşan protein yapısı TEM ile analiz edilmiş ve elde edilen TEM görüntüleri Şekil 3'te sunulmuştur. Bu kısımda herhangi bir hücre hattı kullanılmamış olup nanopartiküller hücre kültürü çalışmalarının gerçekleştirildiği koşullarda (37 °C, 24 sa vb.) serum eklentili DMEM ile inkübe edilmiş ve böylece *in vitro* çalışmalar sırasında değişen yüzey özelliklerin ve biyolojik kimliğin mimiklenmesi hedeflenmiştir. TEM ile ölçülen parçacık boyutu hücre kültürü ortamında 24 saatlik inkübasyon sonucu ~50 nm'den ~75 nm'ye yükselmiştir. Parçacık boyutunda gözlenen bu artış protein korona yapısının oluşumunu doğrulamaktadır.

Nanopartiküllerin yüzeyinde oluşan protein-korona kompleksi UV-Vis-NIR, TEM ve DLS ile doğrulandıktan sonra ikinci adımda yüzeye tutunan proteinlerin tayin edilmesi hedeflenmiştir.



Şekil 4. Küresel ve prizmatik nanogümüşün 37 °C'de inkübasyon süresinin (15 dk, 2 saat ve 24 saat) bir fonksiyonu olarak SDS-PAGE protein bağlanma modelleri (M: protein moleküler ağırlık belirteci, K: kontrol, GP: Gevşek bağlı protein, SN:Süpernatant, SP: Sıka bağlı protein)

Figure 4. SDS-PAGE protein binding patterns of spherical and prismatic nanosilver at 37 °C as a function of incubation time (15 min, 2 h, and 24 h) (M: protein molecular weight marker, K: control, GP: Loosely bound protein, SN:Supernatant, SP: Tightly bound protein)



Şekil 5. Küresel ve prizmatik nanogümüşün oda sıcaklığında inkübasyon süresinin (15 dk, 2 ve 24 saat) bir fonksiyonu olarak SDS-PAGE protein bağlanma modelleri (M: protein moleküler ağırlık belirteci, K: kontrol, GP: Gevşek bağlı protein, SN:Süpernatant, SP: Sıki bağlı protein)

Figure 5. SDS-PAGE protein binding patterns of spherical and prismatic nanosilver at room temperature as a function of incubation time (15 min, 2 h, and 24 h) (M: protein molecular weight marker, K: control, GP: Loosely bound protein, SN:Supernatant, SP: Tightly bound protein)

Bu amaçla anyonik bir deterjan olan SDS kullanılarak proteinlere negatif yük kazandırılmış, oluşturulan elektrik alanda proteinlerin anottan katoda hareket etmesi sağlanmış ve bu hareketin hızına bağlı olarak proteinlerin kimliği tahmin edilmiştir.

SDS-PAGE ile protein tayini öncesinde numune hazırlama koşullarının (örn. yıkama sayısı, ısıtma süresi, hücre kültürü ortamı, inkübasyon süresi ve sıcaklığı) gümüş nanopartiküllerin protein etkileşimleri üzerindeki etkisi detaylı olarak incelenmiş ve örnek hazırlama adımları optimize edilmiştir. Sürecin optimizasyonuna ilişkin sonuçlar yayınlanmış olup [38] optimize koşullar 95 °C'de 5 dakikalık ısıtma ve PBS tamponu ile üç döngü yıkama adımlarını içermektedir. Bu çalışma kapsamında inkübasyon süresinin (15 dk, 2 saat ve 24 saat) ve sıcaklığının (37 °C ve oda sıcaklığı) protein korona yapısının oluşumuna etkisi parçacık morfolojisini de göz önünde bulundurarak sinerjik bir biçimde incelenmiştir.

İlk adımda iki farklı morfolojiye sahip gümüş nanopartiküller %10 FBS katılı hücre kültürü ortamında 37 °C'de değişen sürelerde (15 dakika, 2 saat ve 24 saat) inkübe edilmiş ve yüzeye tutunan proteinler karşılaştırılmıştır (Şekil 4). Yüze tutunan proteinler bağlama kuvvetlerine bağlı olarak gevşek (GP) ve sıkı bağlı (SP) olarak iki ayrı grupta incelenmiştir. Yetersiz inkübasyon süresi dolayısıyla 15 dakikalık inkübasyon sonrası gevşek ve sıkı bağlı proteinlerin ayrıştırılması mümkün olamamış ve sonuçlar birlikte (GP ve SP) sunulmuştur. Genel olarak gevşek bağlanma eğilimi gösteren proteinler albümin, α -2-HS-glikoprotein, α -1-antiproteinaz, serotransferrin (MW: 40-80 kDa) olarak tahminlenirken prizmatik nanogümüşe bağlı temel protein grubunun ise albümin (MW: 60-70 kDa) olduğu düşünülmektedir. Her iki morfoloji için de yüzeye tutunan proteinlerin tipleri büyük benzerlik gösterirken bant kalınlığındaki azalmadan anlaşıldığı üzere prizmatik nanopartiküllerin yüzeyindeki protein yoğunluğu küresel morfolojiye kıyasla daha azdır.

İkinci adımda aynı analiz oda sıcaklığında tekrar edilmiş ve sıcaklığın protein etkileşimleri üzerine etkisi araştırılmıştır (Şekil 5). İnkübasyon sıcaklığındaki değişim sonrası tutunan protein profillerinde önemli bir değişim gözlenmezken, protein miktarları her iki morfolojiye sahip nanogümüş için de hafif bir azalma göstermiştir. Literatürdeki protein korona yapısının aydınlatılmasına ilişkin çalışmalar genel olarak 20-40°C

aralığında karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilmiş ve nanopartiküllerin protein adsorpsiyon kapasitesi ile inkübasyon sıcaklığı arasında doğrusal bir ilişki olduğu rapor edilmiştir [16]. Bu çalışmada protein profillerinde inkübasyon sıcaklığına bağlı yoğunluk değişimi gözlenmiştir.

4. Sonuçlar

Bu çalışma kapsamında serum katılı hücre kültürü ortamında küresel gümüş nanopartiküllerin yüzeyinde tutunan ve biyolojik kimliklerini değiştiren protein yapısı detaylı olarak analiz edilmiş ve sonuçlar prizma-benzeri morfolojiye sahip nanogümüş ile kıyaslanmıştır. İlk aşamada gümüş nanopartikülleri protein taç oluşumu öncesi ve sonrası UV-Vis-NIR, SEM/STEM, TEM ve DLS ile karakterize edilmiştir. Elde edilen UV-Vis-NIR spektrumları, literatürdeki nanogümüşe ait karakteristik pikler ile örtüşmektedir [5-7]. TEM görüntüleri inkübasyon sonrası nanopartikül çevresinde oluşan protein taç varlığını doğrulamaktadır. Prizmatik nanopartiküller protein taç oluşumu sonrası küresel bir morfoloji kazanmış ve her iki morfoloji için de boyut artışına bağlı topaklanma (aggregasyon) eğilimi gözlenmiştir. Oluşan protein taç yapısı literatür ile uyumlu bulunmuştur [8, 9].

Nanopartikül yüzeyine tutunan proteinler partikülün sıvı içerisindeki hareketinden ve küresel morfoloji varsayımından yola çıkarak hesaplanan hidrodinamik çap değerinde ciddi bir artış meydana getirmiştir. Spesifik olarak, 2 saatlik inkübasyon sonrası 3 katına çıkan hidrodinamik çap değeri 24 saatin sonunda 4 kattan fazla artış göstermiştir. Benzer şekilde nanopartiküllerin zeta potansiyeli de inkübasyon süresine bağlı olarak daha negatif değerlere kaymıştır. Literatürdeki çok sayıda benzer bulgular ile desteklenebilen bu değişim nanopartikül-protein etkileşimlerinin yüzey özellikleri ve elektrostatik dengeler üzerindeki büyük etkisini doğrulamaktadır [10-12]. Tekniğin temelini oluşturan küresel parçacık morfolojisi varsayımı ile çelişmesi dolayısıyla prizmatik nanogümüş ile DLS analizi gerçekleştirilmemiştir.

Karakterizasyon sonrası nanopartiküllerin yüzeyinde zayıf ve güçlü bağlarla tutunan proteinler SDS-PAGE tekniğiyle ayrıştırılmış ve moleküler ağırlıklarına bağlı olarak belirlenmiştir. Her iki morfolojiye sahip gümüş nanopartiküller için de yüzeyde tutunan temel protein grupları albümin, α -2-HS-glikoprotein, α -1-antiproteinaz, serotransferrin olarak

belirlenmiştir. Gümüş nanopartiküllerin yüzeylerinde tutunan bu temel protein grupları literatürdeki çalışmalar ile oldukça uyumludur. Örneğin Shannahan ve ark. gümüş nanopartiküllerin yüzeylerinde tutunan 11 temel protein grubu içerisinde albümin, α -2-HS-glikoprotein ve α -1-antiproteinazın yer aldığını ortaya koymuştur [12]. Buna karşılık Lai ve çalışma ark. serum albumini, apolipoproteinler ve serrotransferin gibi plazmada en bol bulunan protein gruplarının korona içerisinde fibrinojen ve kininojene kıyasla nispeten düşük konsantrasyonlarda bulduklarını rapor etmiştir [13].

Bant rezolüsyonu ve kalınlığına bağlı olarak tutunan proteinlerin miktarı tahminlenmiş ve 37 °C inkübasyon durumunda küresel nanopartiküllerin yüzeyindeki protein yoğunluğunun prizmatik partiküllere göre daha fazla olduğu düşünülmüştür. Ancak inkübasyonun oda sıcaklığında gerçekleştiği durumda aradaki bu fark azalmıştır. Tüm bu bulgular gerek numune hazırlama koşullarının gerekse nanopartikül morfolojisinin protein etkileşimleri üzerindeki etkisini ortaya koymaktadır. Literatürdeki çalışmalar gerek malzemelere özgü fizikokimyasal özelliklerin gerekse metodolojik parametrelerin nanopartiküllerin protein hedeflerinin tespitinde önemli bir etkisi olduğunu doğrulamaktadır [14-16].

Bu çalışmada, fizikokimyasal karakterizasyon teknikleri ve SDS-PAGE analizi yardımıyla partikül morfolojisinin nanopartikül-protein etkileşimleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Proteinlerin jel üzerindeki migrasyon mesafelerine ve buna karşılık gelen moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasına dayalı olarak, bilinmeyen proteinlerin kimliği SDS-PAGE ile tahmini olarak belirlenebilirken, daha kesin protein tanımlaması için sıvı kromatografi kütle / kütle spektrometresi (LC-MS/MS) gibi analitik tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmanın kapsamı nanopartikül morfolojisinin protein etkileşimleri üzerindeki etkisinin araştırılması ile sınırlı olup gelecek çalışmalarda gümüş nanopartiküllerin yüzeyinde tutunan proteinlerin biyolojik aktivitelere olan olası etkisi incelenecektir.

Etik kurul onayı ve çıkar çatışması beyanı

Hazırlanan makalede etik kurul izni alınmasına gerek yoktur. Hazırlanan makalede herhangi bir kişi/kurum ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Yazar katkılarının beyanı

Aysel TOMAK deney tasarımına ve analizlerin gerçekleştirilmesine katkıda bulunmuştur. Ceyda ÖKSEL KARAKUŞ fikir oluşturmaya, literatür taramasına, yazıma ve eleştirel incelemeye katkıda bulunmuştur.

Kaynaklar

- [1] Poole, C.P., Owens, F.J. 2003. Introduction to Nanotechnology.
- [2] Hulla, J., Sahu, S., Hayes, A. 2015. Nanotechnology: History and future. *Human & experimental toxicology*, Cilt. 34(12), s. 1318-1321. DOI: 10.1177/0960327115603588
- [3] Tran, L., M.A. Bañares, and R. Rallo, Modelling the toxicity of nanoparticles. 2017: Springer. DOI: 10.1007/978-3-319-47754-1
- [4] Tantra, R., et al., A method for assessing nanomaterial dispersion quality based on principal component analysis of particle size distribution data. *Particology*, 2015. 22: p. 30-38. DOI: 10.1016/j.partic.2014.10.004
- [5] Akhter, M.H., et al., Impact of protein corona on the biological identity of nanomedicine: understanding the fate of nanomaterials in the biological milieu. *Biomedicines*, 2021. 9(10): p. 1496. DOI: 10.3390/biomedicines9101496
- [6] Joudeh, N., Linke, D. 2022. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal of Nanobiotechnology*, Cilt. 20(1), s. 262. DOI: 10.1186/s12951-022-01477-8
- [7] Ravindran, A., Chandran, P., Khan, S.S. 2013. Biofunctionalized silver nanoparticles: advances and prospects. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Cilt. 105, s. 342-352. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.07.036

- [8] Rai, M., Yadav, A., Gade, A. 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances*, Cilt. 27(1), s. 76-83. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.09.002
- [9] Podila, R., et al., Effects of surface functional groups on the formation of nanoparticle-protein corona. *Applied physics letters*, 2012. 101(26): p. 263701. DOI: 10.1063/1.4772509
- [10] Shannahan, J.H., et al., Silver nanoparticle protein corona composition in cell culture media. *PLoS one*, 2013. 8(9): p. e74001. DOI: 10.1371/journal.pone.0074001
- [11] Lai, W., et al., Interaction of gold and silver nanoparticles with human plasma: Analysis of protein corona reveals specific binding patterns. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017. 152: p. 317-325. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.01.037
- [12] Barbalinardo, M., et al., Protein corona mediated uptake and cytotoxicity of silver nanoparticles in mouse embryonic fibroblast. *Small*, 2018. 14(34): p. 1801219. DOI: 10.1002/sml.201801219
- [13] Ban, D.K. and S. Paul, Protein corona over silver nanoparticles triggers conformational change of proteins and drop in bactericidal potential of nanoparticles: Polyethylene glycol capping as preventive strategy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2016. 146: p. 577-584. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.06.050
- [14] Spagnoletti, F.N., et al., Protein corona on biogenic silver nanoparticles provides higher stability and protects cells from toxicity in comparison to chemical nanoparticles. *Journal of Environmental Management*, 2021. 297: p. 113434. DOI: 10.1016/j.jenvman.2021.113434
- [15] Walkey, C.D., et al., Protein corona fingerprinting predicts the cellular interaction of gold and silver nanoparticles. *ACS nano*, 2014. 8(3): p. 2439-2455. DOI: 10.1021/nn406018q
- [16] Ashkarran, A.A., et al., Bacterial effects and protein corona evaluations: crucial ignored factors in the prediction of bio-efficacy of various forms of silver nanoparticles. *Chemical research in toxicology*, 2012. 25(6): p. 1231-1242. DOI: 10.1021/tx300083s
- [17] Fertsch-Gapp, S., et al., Binding of polystyrene and carbon black nanoparticles to blood serum proteins. *Inhalation Toxicology*, 2011. 23(8): p. 468-475. DOI: 10.3109/08958378.2011.583944
- [18] Podila, R. and J.M. Brown, Toxicity of engineered nanomaterials: a physicochemical perspective. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 2013. 27(1): p. 50-55. DOI: 10.1002/jbt.21442
- [19] Tomak, A., Cemel, S., Hanoglu, B. D., Winkler, D., Oksele Karakus, C. 2021. Nanoparticle-protein corona complex: understanding multiple interactions between environmental factors, corona formation, and biological activity. *Nanotoxicology*, Cilt. 15(10), s. 1331-1357. DOI: 10.1080/17435390.2022.2025467
- [20] Lundqvist, M., et al., The evolution of the protein corona around nanoparticles: a test study. *ACS nano*, 2011. 5(9): p. 7503-7509. DOI: 10.1021/nn202458g
- [21] Lundqvist, M., et al., Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. 105(38): p. 14265-14270. DOI: 10.1073/pnas.0805135105
- [22] Kharazian, B., N. Hadipour, and M. Eftehadi, Understanding the nanoparticle-protein corona complexes using computational and experimental methods. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2016. 75: p. 162-174. DOI: 10.1016/j.jbiocel.2016.02.008
- [23] Gräfe, C., et al., Intentional formation of a protein corona on nanoparticles: Serum concentration affects protein corona mass, surface charge, and nanoparticle-cell interaction. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2016. 75: p. 196-202. DOI: 10.1016/j.jbiocel.2015.11.005
- [24] Cedervall, T., et al., Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007. 104(7): p. 2050-2055. DOI: 10.1073/pnas.0608582104
- [25] Monopoli, M.P., et al., Formation and characterization of the nanoparticle-protein corona. *Nanomaterial Interfaces in Biology: Methods and Protocols*, 2013: p. 137-155. DOI: 10.1007/978-1-62703-462-3_11
- [26] Gossmann, R., et al., Comparative examination of adsorption of serum proteins on HSA-and PLGA-based nanoparticles using SDS-PAGE and LC-MS. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2015. 93: p. 80-87. DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.03.021
- [27] Di Silvio, D., et al., Technical tip: high-resolution isolation of nanoparticle-protein corona complexes from physiological fluids. *Nanoscale*, 2015. 7(28): p. 11980-11990. DOI: 10.1039/C5NR02618K
- [28] Madathiparambil Visalakshan, R., et al., The influence of nanoparticle shape on protein corona formation. *Small*, 2020. 16(25): p. 2000285. DOI: 10.1002/sml.202000285
- [29] Tomak, A., Yilancioglu, B., Winkler, D., Karakus, C. O. 2022. Protein corona formation on silver nanoparticles under different conditions. *Colloids*

- and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, Cilt. 651, DOI: 10.1016/j.colsurfa.2022.129666
- [30] Kopac, T. 2021. Protein corona, understanding the nanoparticle–protein interactions and future perspectives: A critical review. *International Journal of Biological Macromolecules*, Cilt. 169, s. 290-301. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.108
- [31] Tuan Anh, M. N., Nguyen, D. T. D., Ke Thanh, N. V., Phuong Phong, N. T., Nguyen, D. H., Nguyen-Le, M. T. 2020. Photochemical synthesis of silver nanodecahedrons under blue LED irradiation and their SERS activity. *Processes*, Cilt. 8(3), s. 292. DOI: 10.3390/pr8030292
- [32] Sharifi-Rad, M., Pohl, P. 2020. Synthesis of biogenic silver nanoparticles (AgCl-NPs) using a *pulicaria vulgaris* gaertn. aerial part extract and their application as antibacterial, antifungal and antioxidant agents. *Nanomaterials*, Cilt. 10(4), s. 638. DOI: 10.3390/nano10040638
- [33] Yu, P., Huang, J., & Tang, J. 2011. Observation of coalescence process of silver nanospheres during shape transformation to nanoprisms. *Nanoscale Res Lett*, Cilt. 6, s. 1-7. DOI: 10.1007/s11671-010-9808-6
- [34] Miclăuş, T., Beer, C., Chevallier, J., Scavenius, C., Bochenkov, V. E., Enghild, J. J., Sutherland, D. S. 2016. Dynamic protein coronas revealed as a modulator of silver nanoparticle sulphidation in vitro. *Nature Communications*, Cilt. 7(1), s. 11770. DOI: 10.1038/ncomms11770
- [35] Akhtar, M. J., Kumar, S., Alhadlaq, H. A., Alrokayan, S. A., Abu-Salah, K. M., Ahamed, M. 2016. Dose-dependent genotoxicity of copper oxide nanoparticles stimulated by reactive oxygen species in human lung epithelial cells. *Toxicology and industrial health*, Cilt. 32(5), s. 809-821. DOI: 10.1177/0748233713511512
- [36] Mohammad-Beigi, H., Hayashi, Y., Zeuthen, C. M., Eskandari, H., Scavenius, C., Juul-Madsen, K., Sutherland, D. S. 2020. Mapping and identification of soft corona proteins at nanoparticles and their impact on cellular association. *Nature Communications*, Cilt. 11(1), s. 4535. DOI: 10.1038/s41467-020-18237-7
- [37] Jurašin, D. D., Ćurlin, M., Capjak, I., Crnković, T., Lovrić, M., Babič, M., Gajović, S. 2016. Surface coating affects behavior of metallic nanoparticles in a biological environment. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, Cilt. 7(1), s. 246-262. DOI: :10.3762/bjnano.7.23
- [38] Braun, N.J., et al., Modification of the protein corona–nanoparticle complex by physiological factors. *Materials Science and Engineering: C*, 2016. 64: p. 34-42. DOI: 10.1016/j.msec.2016.03.0