

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**Interakce malých hairpin formujících RNA
molekul s povrchem grafenu**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Martin Vondrák

Studijní obor: Chemie

Vedoucí práce: Mgr. Martin Pykal, Ph.D.

OLOMOUC 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci

V Olomouci dne

.....

Podpis

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat především svému vedoucímu Mgr. Martinu Pykalovi, Ph.D. za jeho vedení, odborné rady, přátelský přístup a trpělivost v průběhu vypracování této práce. Také bych chtěl poděkovat moji rodině za jejich podporu v průběhu celého studia.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Martin Vondrák

Název práce: Interakce malých hairpin formujících RNA molekul s povrchem grafenu

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra analytické chemie

Vedoucí práce: Mgr. Martin Pykal, Ph.D.

Rok odevzdání práce: 2019

Anotace:

Hybridní systémy grafenu a nukleových kyselin se jeví jako slibné materiály pro výrobu citlivých biosenzorů. Jedna z cest pro jejich realizaci je využití bioaktivity RNA hairpinů. K zachování svoji funkčnosti avšak potřebují své nativní uspořádání a prostředí. Za tímto účelem je potřeba cíleně řídit konformaci RNA na povrchu grafenu. V této práci je prostřednictvím výpočetní chemie poskytnut atomární pohled na chování krátkých RNA molekul z rodiny GAGA tetraloopu na grafenu ve vodném prostředí. Volné molekulárně dynamické simulace i výpočty entalpií ukázaly, že přítomnost grafenu napomáhá k rozbalování hairpinu, tj. hairpin se na povrchu grafenu chová jinak, než ve vodném prostředí, kde si zachovává svůj nativní fold. Z toho důvodu, bez další modifikace, nebo funkcionalizace systému není možné tento systém využít k senzorickým aplikacím. Nicméně, znalost konformačního chování na mezifázi grafen/voda může otevřít nové možnosti pro využití grafenu, nebo jeho derivátů.

Klíčová slova: RNA, hairpin, grafen, molekulová dynamika, konformační chování

Počet stran: 55

Počet příloh: 1

Jazyk: čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Martin Vondrák

Title: Interaction of small hairpin-forming RNA molecules with graphene surface

Type of thesis: Bachelor's

Department: Department of Analytical Chemistry

Supervisor: Mgr. Martin Pykal, Ph.D.

The year of submission: 2019

Annotation:

Hybrid systems of the graphene and nucleic acids look like promising material for production of sensitive biosensors, where short hairpin-forming RNA molecules appear as suitable candidates for this application because of their biological relevance. The essential prerequisite for its applicability in sensing is that hairpins have to preserve its native fold to maintain the biological functionality. In this thesis the behavior of RNA on graphene was studied using the molecular dynamics simulations allowing the atomic resolution. It was shown that graphene induces the unfolding of short hairpins, which impedes their use in sensing in their existing form, i.e. without further modification. However, knowledge of the conformational behavior on the graphene/water interface may open a new horizons in the applicability of such a systems in biotechnologies.

Keywords: RNA, hairpin, graphene, molecular dynamics, conformational behavior

Number of pages: 55

Number of appendices: 1

Language: czech

Obsah

1 Úvod	1
2 Teoretická část	3
2.1 Grafen	3
2.1.1 Vlastnosti	3
2.1.2 Výroba	5
2.1.3 Aplikace	8
2.2 RNA hairpiny	10
2.2.1 GNRA hairpin	12
2.3 Interakce grafenu s nukleovými kyselinami	13
2.4 Metody	15
2.4.1 Molekulové modelování	15
2.4.2 Molekulová mechanika	16
2.4.3 Silové pole	16
2.4.4 Molekulová dynamika	21
3 Praktická část	26
3.1 Popis simulací	27
3.1.1 Simulované struktury	28
3.2 Výsledky a diskuze	32
3.2.1 Strukturní charakteristika RNA na grafenu	32
3.2.2 Entalpické změny	35
4 Závěr	38
Literatura	39
Přílohy	46

Seznam zkratek

2D	dvoudimenzionální
HOPG	vysoce orientovaný pyrolitický grafit
NMP	<i>N</i> -methylpyrrolidon
DMA	<i>N,N</i> -dimethylacetamid
CVD	depozice z plynné fáze
RNA	ribonukleová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
nt	nukleotid
A	adenin
G	guanin
C	cytosin
U	uracil
T	thymin
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
AFM	mikroskopie atomárních sil
ssDNA	jednovláknová deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina
QM	kvantová mechanika
MM	molekulová mechanika
vdW	van der Waals
LJ	Lennard-Jones
MD	molekulová dynamika
PBC	periodické okrajové podmínky
T-REMD	temperature replica exchange molecular dynamics
OPC	optimal point charge
SPC\ E	extended simple point charge

1. Úvod

V roce 2004 se otevřely dveře do nového odvětví fyziky a chemie, když vědci vedeni Andre Geimem a Konstantinem Novoselovem poprvé připravili a charakterizovali dvoudimenzionální formu uhlíku. Jednalo se o první dvoudimenzionální materiál vůbec, který byl pojmenován grafen. Tímto objevem bylo vyvráceno několik desítek let staré tvrzení, že dvoudimenzionální materiály jsou termodynamicky nestabilní. Záhy po objevu se zjistilo, že grafen je látka, která překonává v mnoha ohledech materiály využívající se v dnešní době. Není tedy divu, že od prvotního objevu grafenu uplynulo pouze 6 let a zmínění vědci obdrželi Nobelovu cenu za fyziku v roce 2010 za „průkopnické experimenty týkající se dvoudimenzionálního materiálu grafenu“.

Grafen je materiál lehký, pevný a s vynikajícími elektromagnetickými vlastnostmi, a proto se stal ideálním materiálem pro novou generaci technologií v mnoha odvětvích, jako jsou kompozitní materiály, elektrotechnika nebo biosenzorika. V právě oblasti biosenzoriky se vlastnosti grafenu jeví jako velice výhodné. V kombinaci s nukleovými kyselinami může poskytnout základ pro velice citlivé biosenzory. Jeden z možných kandidátů pro takovéto využití mohou být krátké hairpin formující motivy RNA, které vykazují specifické funkce ve svých původních uspořádáních.

Hairpiny jsou důležitou částí sekundární struktury RNA molekul. Slouží především jako místa ohybu vlákna RNA při skládání do funkční konformace, ale zároveň slouží i jako aktivní místo RNA molekuly při interakci s proteinem, chrání tRNA před degradací, stabilizuje terciální strukturu ribozymů, aj. V této práci konkrétně je využita hairpinová struktura o délce 8 a 10 nukleotidů (tj. oktamer a dekamer RNA), která obsahuje tetraloopovou sekvenci GAGA. Tento hairpin se vyskytuje v ribozomální RNA v sarcin/ricin loopu. Název tohoto loopu je odvozen od bílkovinných toxinů sarcinu a ricinu, které v tomto místě selektivně štěpí fosfodiesterovou vazbu v páteři RNA. Tuto skutečnost lze potenciálně využít pro vytvoření velmi citlivého senzoru, který by byl schopný detekovat zmíněné toxiny i při velmi nízkých koncentracích. Za tímto účelem je ovšem nutné cíleně řídit konformaci RNA

molekuly na grafenu tak, aby si zachovala svoji sekundární strukturu, která je klíčová pro interakci s toxiny.

K prozkoumání chování hairpinu na grafenu jsem využil výpočetních metod. Pomocí molekulárně dynamických výpočtů jsem provedl sérií simulací, kdy jsem ve vodném prostředí nechal RNA molekulu v hairpinové i rozbalené struktuře interagovat s povrchem grafenu. Zatímco samotná RNA se ve vodě samovolně sbaluje do hairpinu, tak simulace ukazují, že bude RNA v přítomnosti grafenu preferovat rozbalenou konformaci, tj. grafen indukuje rozbalování krátkých RNA hairpinů. Tento závěr ukazuje, že (nejen) pro výrobu citlivých biosenzorů pro bílkovinné toxiny je nutná další úprava, např. kovalentní modifikaci RNA molekuly tak, aby si zachovala svoji nativní formu a svoji bioaktivitu vůči zkoumaným látkám.

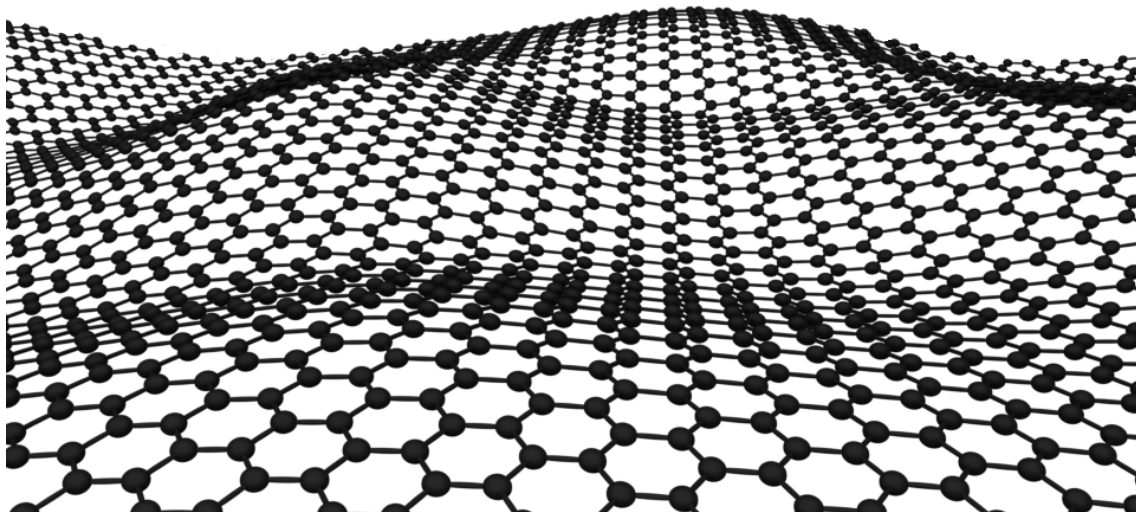
2. Teoretická část

2.1 Grafen

Dvoudimenzionální struktury za posledních 15 let doslova rozpoutaly revoluci v materiálových vědách. V roce 2004 vědecká skupina, která byla vedena vědci Andre Geimem a Konstantinem Novoselovem, publikovala práci popisující první izolaci 2D krystalu z grafitu. Tento krystal byl následně pojmenován grafen. [1] Důležitost objevu dokazuje i fakt, že zmíněným vědcům byla udělena Nobelova cena za fyziku v roce 2010 za „průkopnické experimenty týkajících se dvoudimenzionálního materiálu grafenu“. [2] Také je důležité poznamenat, že před objevem grafenu se přes 70 let předpokládala termodynamická nestabilita 2D krystalů a jednalo se tak o čistě teoretickou strukturu. [3, 4] O grafenu se také často mluví jako o tzv. "materiálu budoucnosti", neboť bylo provedeno nespočet experimentů dokazujících, že vlastnosti grafenu v mnoha ohledech překonávají současně používané materiály.

2.1.1 Vlastnosti

Grafen je planární alotrop uhlíku o tloušťce pouze jednoho atomu. Jednotlivé uhlíky jsou v sp^2 hybridizaci a jsou navzájem propojeny pevnými σ vazbami, které zejména zodpovídají za jeho neobyčejné mechanické vlastnosti. Jednotlivé atomy jsou poskládány do tvaru hexagonální mřížky, která připomíná tvar včelích pláství. I přes předpokládanou rovinnou strukturu bylo zjištěno, že grafen není dokonale planární. Bylo objeveno zvlnění v jeho struktuře s výchytkou asi ≈ 1 nm (pro představu viz obr. 1), které stojí právě za jeho stabilitou. [5] Zbývající nehybridizované p_z orbitály jsou důvodem výjimečných elektrických vlastností grafenu, neboť jsou kolmé na rovinu grafenu a tvoří delokalizovaný oblak π elektronů nad a pod rovinou grafenu. [6]



Obrázek 1: Model části molekuly grafenu

Grafen je jeden z nejpevnějších materiálů, které kdy byly testovány. Youngův model pružnosti pro strukturu bez defektů je 1 TPa a hodnota pevnosti v tahu činí 42 N m^{-2} , což je asi $100\times$ více než v případě oceli. [7] Velkou výhodou grafenu je i jeho specifický povrch, který má hodnotu $2630 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. [8] Pro lepší představu se tato hodnota srovnává s velikostí fotbalového hřiště, na jehož pokrytí by stačil pouze 1 gram grafenu. [9]

Mechanické vlastnosti nejsou jediné, které z grafenu dělají možný materiál budoucnosti. Co se týče jeho elektrických vlastností, grafen se řadí mezi polovodiče s nulovým zakázaným pásem. To znamená, že grafen je schopen vést proud bez nutnosti excitace elektronů z valenčního pásu do pásu vodivostního, ale zároveň se tyto dva energetické pásy nepřekrývají. [10] Delokalizovaný oblak π elektronů způsobuje některé zajímavé jevy, např. jednotlivé elektrony grafenu se chovají jako částice bez klidové hmotnosti (jejich rychlost dosahuje až $v \approx 10^6 \text{ m s}^{-1}$). Grafen je výborným vodičem elektrického proudu. V závislosti na způsobu výroby může teoreticky pohyblivost elektronů na grafenu dosahovat až $200\,000 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. [11, 12] Zmíněné hodnoty jsou však pro dokonalý krystal grafenu bez defektů, které by v uhlíkaté mřížce působily jako místa rozptylu elektronů, čímž by došlo ke zkrácení střední volné dráhy elektronů a k snížení vodivosti grafenu. [13]

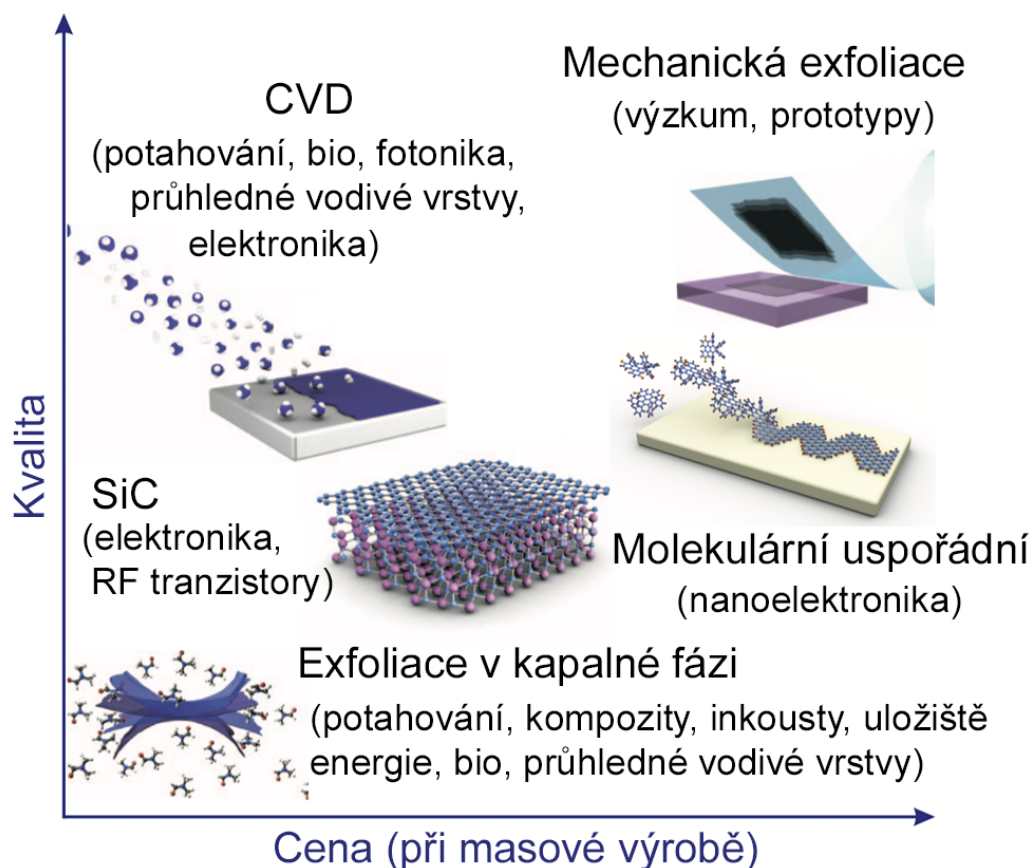
Kromě skvělé elektrické vodivosti je grafen i výborným vodičem tepla. Hodnota tepelné vodivosti grafenu je $5\,000\text{ W m}^{-1}\text{ K}^{-1}$. [14] Jako poslední z výčtu charakteristických vlastností grafenu je vhodné zmínit i jeho průhlednost. Jedna vrstva grafenu absorbuje pouze 2,3 % prošlého světla (nezávisle na vlnové délce dopadajících fotonů) a zároveň prakticky žádné světlo neodráží. [15]

O grafenu se mluví i v případě dvouvrstvé, nebo trojvrstvé struktury. Mez, kdy se přestává mluvit o grafenu a začne se spíše jednat o grafit je dána elektronovou strukturou daného uspořádání. Jak bylo uvedeno, jednovrstevný grafen je polovodič s nulovým zakázaným pásmem, zatímco grafit je považován za polokov s překryvem vodivostního a valenčního pásu asi 41 meV. Při nárůstu počtu vrstev u grafenu se zvětšuje i překryv energetických pásů. U dvouvrstvého grafenu je překryv pouze 1,6 meV, který s narůstajícím počtem vrstev se zvětšuje a u 11ti vrstvé struktury je pak rozdíl oproti 41 meV grafitu menší než 10 %. Obecně se tedy o grafenu hovoří do 10 vrstev. [16]

2.1.2 Výroba

Ještě před nedávnou dobou byl problém s masovou výrobou grafenu. Často byl totiž vysoký výtěžek vykoupen sníženou kvalitou krystalu, nebo nárůstem ceny výroby (viz obr. 2). V dnešní době je již vyvinuta celá škála příprav grafenu, které umožňují první komerčně dostupné aplikace.

První metoda, která byla použita k výrobě grafenu byla *mikromechanická exfoliace*. Jedná se o způsob výroby grafenu, kdy na vrstevnatou strukturu vysoce orientovaného pyrolitického grafitu HOPG (z anglického *highly oriented pyrolytic graphite*) je mechanicky aplikovaná síla např. pomocí lepící pásky. Takto získané krystaly se z pásky uchytí na podložní materiál, kterým je nejčastěji oxid křemičitý. Hlavní výhodou této metody je velikost (až $100\ \mu\text{m}$) a kvalita získaných krystalů grafenu. Na druhou stranu je tato metoda prakticky neaplikovatelná pro produkci ve větším měřítku z důvodu její nízké efektivity. [1]



Obrázek 2: Schématické zobrazení způsobů výroby grafenu vzhledem k jeho výsledné kvalitě a ceně (převzato a upraveno z [19])

Vedle mechanické exfoliace lze uvést také *exfoliaci grafitu v kapalně fázi*. Grafit se vystaví ultrazvuku v rozpouštědle, které díky povrchovému napětí stabilizuje jednotlivé molekuly grafenu. Tímto postupem lze získat koloidního roztok grafenu. V této oblasti bylo využito několik druhů rozpouštědel, ať už se jedná o látky obsahující fluor (např. hexafluorobenzen, pentafluoropyridin, apod.) [17], nebo rozpouštědla jako jsou *N*-methylpyrrolidon (NMP) nebo *N,N*-dimethylacetamidu (DMA) [18], a nebo lze po přidání surfaktantu využít i polární rozpouštědla. [19] Oproti mechanické exfoliaci je tato metoda schopná produkce grafenu ve větším množství.

Další z chemických cest pro přípravu grafenu je *redukce grafen oxidu*. Grafen oxid se nejprve získá z grafen oxidu, který je díky obsahu kyslíkatých polárních skupin hydrofilní. Ve vodě pomocí sonifikace lze grafen oxid jednodušeji rozdělit na jednotlivé vrstvy. Vzniklé molekuly grafen oxidu tvoří stabilní žlutohnědý koloidní roztok. Takto připravené částice lze

redukovat např. pomocí hydrazinu, kdy se po dostatečně dlouhé době začne na dně nádoby usazovat černě zbarvený grafen. [20] Kromě redukce chemickým činidlem lze z grafit oxidu získat grafen i metodou *termální exfoliace*, kdy grafit oxid je žhán v křemenné trubici v atmosféře argonu. [21] Nevýhoda redukce grafen oxidu je menší specifický povrch získaného grafenu, než je charakteristické pro čistý krystal bez defektů. Zároveň do dnešní doby nebyla nalezena optimální cesta, jak grafen oxid zcela zredukovat, takže na povrchu připraveného grafenu se vyskytují zbytkové kyslíkaté skupiny. Z tohoto důvodu se při této výrobě mluví spíše o redukováném grafen oxidu, než o čistém grafenu.

Vysoce kvalitního grafenu lze dosáhnout pomocí *termálního rozkladu SiC*. Tato metoda se často nazývá *epitaxní růst grafenu* a spočívá v sublimaci křemíkových atomů z krystalu SiC ve vakuu a za vysoké teploty (1100 - 1600 °C). Po sublimaci Si atomů zůstanou na povrchu krystalu SiC nesublímované atomy uhlíku, které za správných podmínek chlazení vytvoří vrstvu grafenu. Tato metoda je výhodná pro výrobu grafenu bez defektů ve větších laterálních rozměrech. Využití této metody v praxi ale brání vysoká cena a vysoká provozní teplota, která znemožňuje využití této technologie výroby v některých odvětvích. [22]

Další metoda, která má potenciál být využita ve větším měřítku je *depozice z plynné fáze CVD* (z anglického *chemical vapor deposition*) na kovový podklad. Vzniklé krystaly mohou dosahovat až centimetrových rozměrů. Zkoumané metody byly např. depozice ethynu na polykrystalické železo (při teplotě kolem 700 °C) za vzniku ostrůvků grafenu, nebo depozice ethynu na měď upevněné na SiO₂/Si podložce, za vzniku nehomogenně rozmístěného grafenu o tloušťce několika vrstev. Prozatímni velkou nevýhodou této metody je vznik četných defektů v konečné struktuře krystalu, protože depozice začíná na několika místech najednou a z těchto míst pak krystaly grafenu dále rostou až se postupem času setkají. Na těchto spojnicích se jednotlivé krystaly nedokonale kovalentně spojí a vzniknou četné defekty v podobě různých vakancí atomů a nearomatických kruhů. [23]

Výše uvedený výčet příprav grafenu není zdaleka kompletní. V dnešní době byly vyvinuty i méně používané cesty, jako je totální syntéza (např. Suzuki–Miyaura couplingem molekul 1,4-dijodo-2,3,5,6-tetrafenylbenzenu a 4-bromofenylboritou kyselinou) [24], nebo rozevírání uhlíkatých nanotrubiček [13].

2.1.3 Aplikace

Z důvodů neobvyklých vlastností má grafen velký aplikační potenciál v různých odvětvích a oborech. Jejich výčet může začít u filtrů na vodu [25], přes kompozitní materiály [26] až po optoelektroniku [27, 28], či elektroniku [29, 30], nebo jako základ v (bio)senzorice. [31]

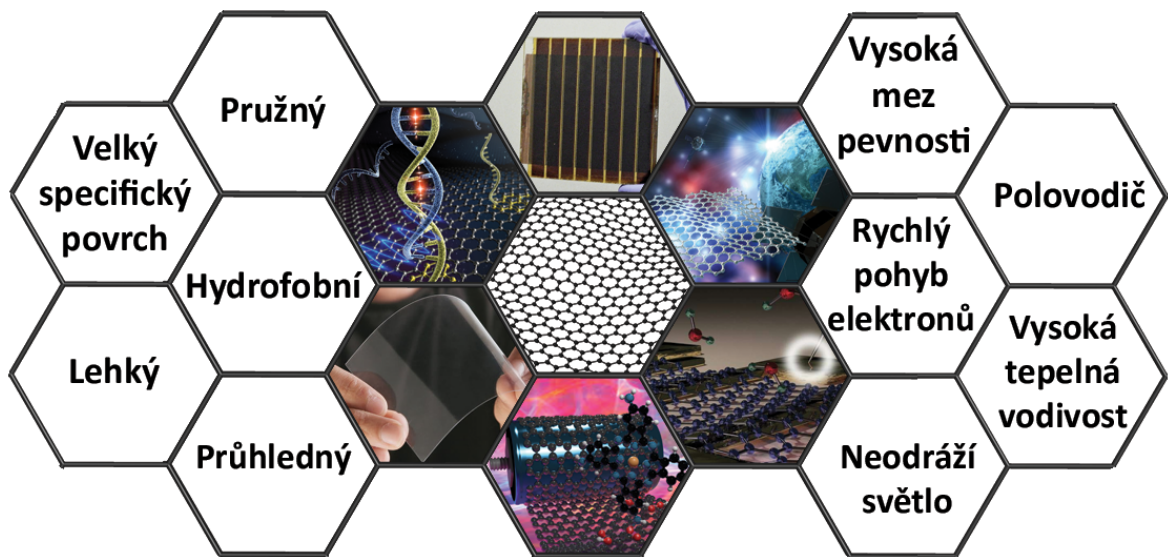
Mechanické vlastnosti grafenu se dají využít v kompozitních materiálech a v ochranných vrstvách. Odvětví mechanických aplikací se dnes již blíží komerčním aplikacím, protože není často vyžadována krystalická mřížka bez defektů a mnohdy lze využít i redukovaný grafen oxid. Grafen, jakožto inertní materiál, je možné využít v antikoročních vrstvách (výhoda této aplikace je možnost přímého růstu uhlíkové vrstvy na kovové podložce pomocí CVD metody). Také ho lze využít jako vrstvu zabraňující pohybu plynům, nebo jako přísávek do materiálů pro zvýšení vodivosti elektřiny a tepla. [32, 19]

Jedním z požadavků moderní doby je výroba lepších baterií. Grafen může být využitý např. pro vylepšení stávajících lithiových baterií, kdy zakomponováním grafenu do Li baterií lze zvýšit jejich životnost [33], nebo lze využít grafen jako vodivou náplň baterií a jako základ pro novou generaci elektrod [34]. Další z možných budoucích cest pro ukládání energie je zkombinování vlastností klasických chemických baterií a kondenzátorů do tzv. superkondenzátorů. Superkondenzátory jsou schopné pojmout velké množství energie a zároveň se nabíjet mnohem rychleji než konvenční baterie. I v této oblasti je grafen, a zejména jeho deriváty, jeden z možných materiálů pro výrobu elektrod superkondenzátorů díky jeho velkému specifickému povrchu, termické a chemické inertnosti a skvělé vodivosti tepla a elektřiny. [35, 36]

Díky jeho jedinečným elektromagnetickým vlastnostem se grafen může využívat v elektronických, či optoelektronických aplikacích. Výborná vodivost a zároveň propustnost světla jsou vyžadovány u optoelektronických zařízeních jako jsou např. (dotykové) obrazovky, světlo emitující diody a solární články. V solárních článcích může grafen sloužit jako vodič elektřiny nebo jako průhledná elektroda. [27] Díky mechanické flexibilitě a světelné propustnosti lze grafen využít např. v ohebných dotykových obrazovkách. [30] Jedinečnost grafenu byla v poslední době rozšířena i o první nekovový magnet, který si udrží své magnetické vlastnosti i za pokojové teploty, jenž umožňuje nové aplikace na poli spintroniky a magne-

ticky řízených nosičů látek. [37] Dusíkem dopovaným grafenem bylo poprvé možno řídit spinový stav atomů v molekule bez nutnosti použití vnějších zdrojů energie jako je např. světlo či magnetické záření. [38]

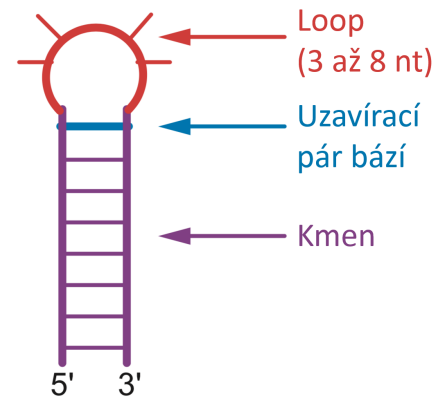
Další odvětví, ve kterém má grafen velký aplikační potenciál je biomedicína. Pro jeho široké možnosti kovaletních a nekovalentních modifikací, velký specifický povrch a jelikož se jedná se o lipofilní látku, uvažuje se o grafenu jako o možném nosiči bioaktivních látek v organismech. Byly ukázány experimenty, kdy se na funkcionalizovaný uhlíkatý 2D materiál naváže nekovalentně léčivo, které lze řízeně uvolnit změnou v prostředí (např. změnou pH). [39, 40]



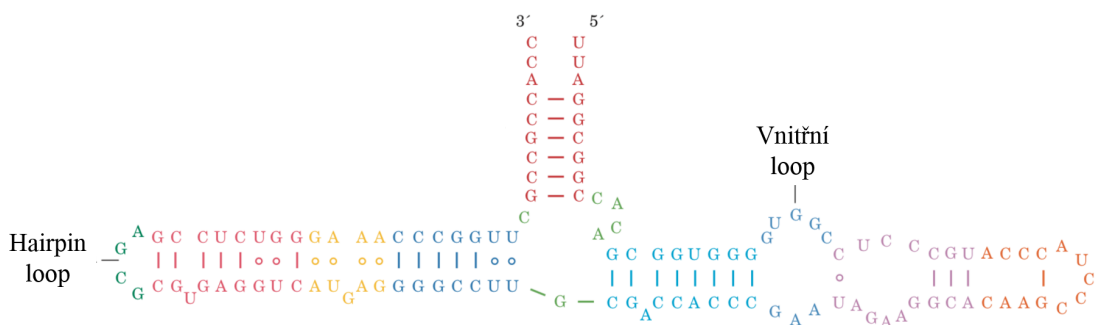
Obrázek 3: Schématické zobrazení vlastností a aplikací grafenu (obrázky převzaty z [41])

2.2 RNA hairpiny

RNA je polymerní molekula, která se skládá z nukleotidů (nt), které se odlišují obsaženou dusíkatou bází; adenin (A), guanin (G), cytosin (C) nebo uracil (U) (v případě DNA je uracil nahrazen thyminem (T)). RNA se účastní celé řady biologických procesů jako je např. kontrola genové exprese nebo syntéza proteinů. K důležitosti RNA přispělo i zjištění z 80. let minulého století, že RNA se účastní i některých enzymatických reakcí. [42] Oproti DNA, která má ve většině případů uspořádání dimerní dvoušrobovice, se molekula RNA vyskytuje v různých konformacích obsahující motivy umožňující vysokou variabilitu ve stavbě sekundárních a terciálních struktur. Jeden z nejčastějších strukturních motivů je tzv. *hairpin* (někdy překládáno i jako vlásenka, ale i v české literatuře se více vžil anglický originál). [43, 44]



Obrázek 4: Schéma hairpinového motivu (převzato z [44])



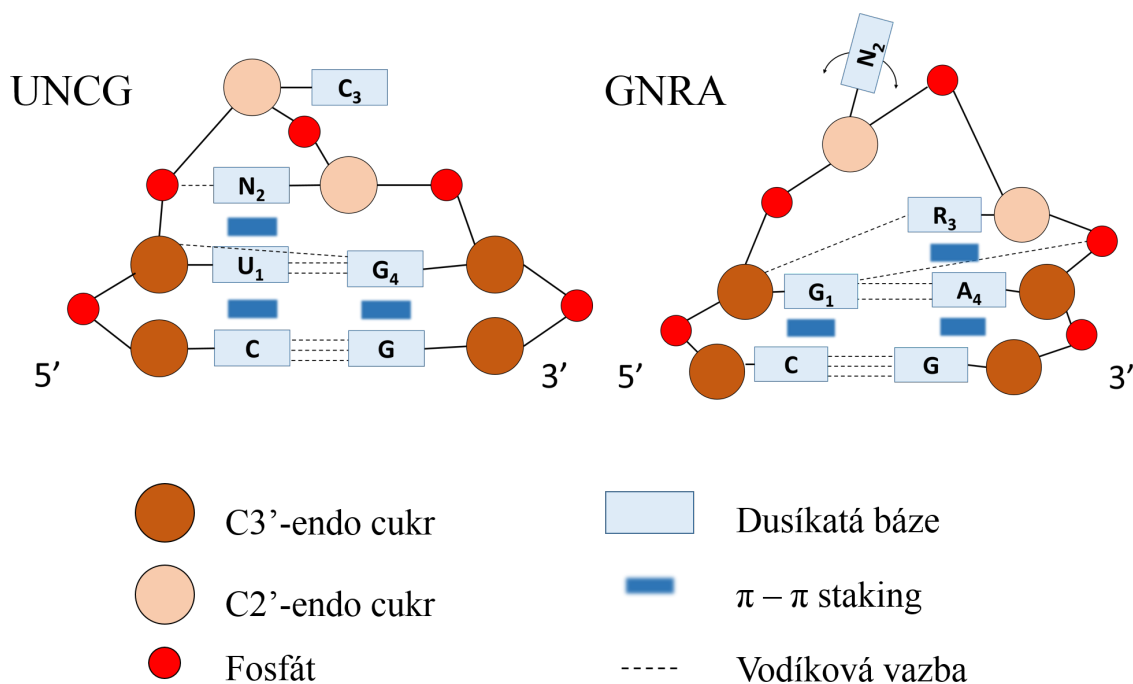
Obrázek 5: RNA molekula (převzato z [43])

Hairpiny představují jeden z nejčastěji se vyskytujících sekundárních motivů v RNA molekulách. [45] Hairpiny v RNA se skládají z kmene, který má kanonické párování mezi bázemi a tzv. loopu, který se může skládat ze 3 až 8 nekanonicky spárovaných nukleotidů (kromě vodíkových můstku mezi bázemi se zde vyskytuje i párování mezi bází a cukernou

složkou RNA a mezi bází a fosfátem v RNA). Loop a kmen odděluje uzavírací pár bází (viz obr. 4). Vysoce termodynamicky stabilní hairpiny slouží jako počátky skládání RNA do sekundární struktury [46], regulují degradaci mRNA [47], slouží jako místo interakce s proteiny a s RNA [48] a umožňují průběh enzymatické reakce samoštěpících RNA. [49]

Z důvodu pnutí, se v loopu musí nacházet minimálně 3 nukleotidy. Z experimentálních dat vyplynulo, že jedny z nejčastějších loopů jsou ty, které obsahují 4 nukleotidy, tzv. tetraloopy, které díky jejich kompaktnímu tvaru mají vysokou tepelnou stabilitu a zvyšují rezistenci RNA proti nukleasám. [49, 50] Zhruba 55 % všech loopů vyskytujících se v rRNA v 16S podjednotce jsou tetraloopy. [51] Pro jednotlivé nukleotidy v tetraloopu se využívá značení $L_1 - L_4$ (číslované z 5' konce). Ze všech možných kombinací jsou nejvíce zastoupené 2 typy: UNCG a GNRA, kde N značí jakýkoliv nukleotid a R nukleotid s bází odvozenou od purinu.

Oba druhy tetraloopy mají některé podobné vlastnosti. Např. nukleotidy L_1 a L_4 jsou ne-Watson-Crickovsky spárované mezi sebou. U obou tetraloopů, také dochází ke stackingu mezi bázemi (obecné interakce v obou tetraloopech jsou zobrazeny na obr. 6). [44, 49] Za zmínku také stojí, že byly provedeny měření mezi RNA získanými z příbuzných druhů organismů a bylo zjištěno, že v některých případech byl UNCG tetraloop nahrazen za GNRA (nebo obráceně). [52] V 16S rRNA, která je bohatá na tetraloopy, se jako uzavírací pár bází UNCG a GNRC tetraloopů velmi často vyskytovali cytosin (na 5' straně) a guanin (na 3' straně), které nejvíce stabilizují hairpinovou strukturu. [44]



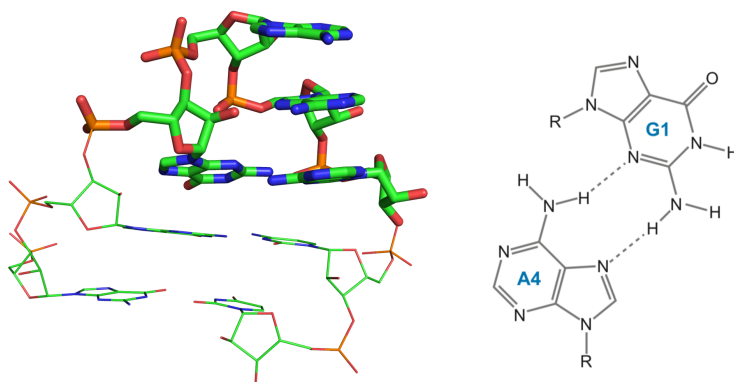
Obrázek 6: Schéma strukturních prvků a stabilizačních interakcí v UNCG a GNRA tetraloopech

2.2.1 GNRA hairpin

Na obr. 6 je zobrazena tvorba nekanonického párování mezi G_1 a A_4 , kdy obě báze jsou v *anti* poloze. Vodíkové vazby vznikají mezi heterodusíky a amino skupinami (viz obr. 7). [53] Dodatečnou stabilizaci do struktury dodává vodíková vazba mezi fosfátem a bází G_1 a stacking mezi bázemi G_1 , A_4 a uzavíracími bázemi. Termodynamická stabilita GNRA je menší než je tomu u tetraloopů UNCG. [54] Důvod, proč GNRA je zastoupen v obdobné míře jako UNCG i přes jeho menší stabilitu, je jeho větší flexibilita, která umožňuje účasti hairpinové struktury s GNRA tetraloopem v terciálním skládání RNA molekul. Při interakci s receptorem je totiž potřeba změna konformace, která u rigidní struktury UNCG tetraloopu není možná. [49, 55]

Hairpin s tetraloopem GAAA se nachází v samoštěpících intronech I. skupiny z prvku s latinským názvem *Tetrahymena thennophila*, kde stabilizuje skládání P4–P6 podjednotek interakcí s 11 nukleotidovou sekvencí tetraloopového receptoru. [56] V této práci je využíván tetraloop GAGA, který se nachází v sarcin/ricin loopu v 28S ribozomálních RNA. Název této smyčky je odvozen od toxinů ricinu, který z 3' strany depurinuje adenin, a sarcinu, který štěpí

páteř RNA u 3' guaninu. Tyto kovalentní modifikace způsobují inaktivaci celého ribozomu. [57]



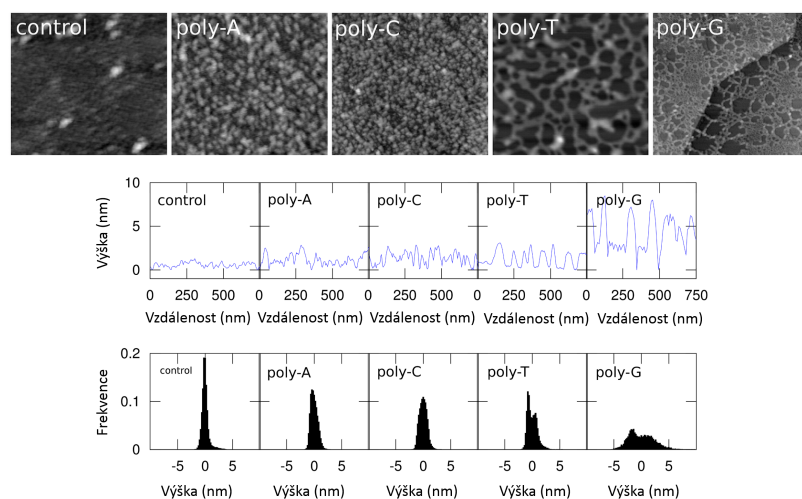
Obrázek 7: Struktura GAAA tetraloopu (PDB ID 2R8S [58]) a párování mezi 1. a 4. bází [44]

2.3 Interakce grafenu s nukleovými kyselinami

Síla interakce dusíkatých bází nacházejících se v DNA s grafenem ve vodném prostředí byla stanovena pomocí kalorimetrických měření. Bylo zjištěno, že afinita bází ke grafenu klesá od guaninu k thyminu v pořadí: $G > A > C \sim T$. [59] Pomocí metod výpočetní chemie bylo dále zjištěno, že ve vodném prostředí se díky $\pi - \pi$ interakcím dusíkaté báze váží silněji k polyaromatickým povrchům než k dalším dusíkatým bázím. [60]

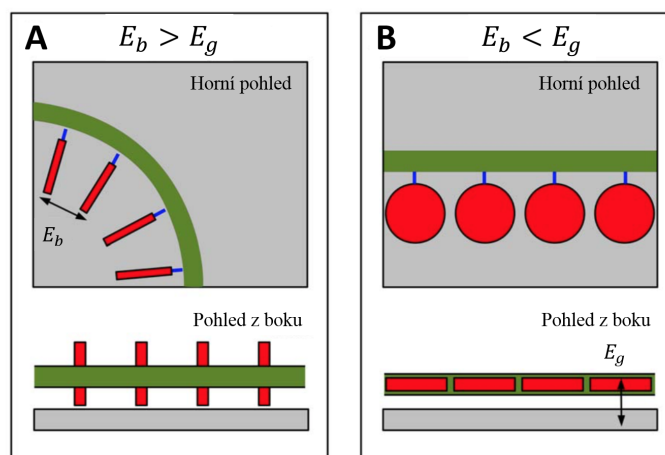
Ze studia adsorpce jednovláknové ssDNA (z anglického *single-stranded DNA*) na grafen se zjistilo, že ssDNA se na povrchu grafenu roztáhne a zaujme strukturu, která je řízena částečně interakcemi báze–báze a částečně interakcemi báze–grafen. Síla interakce mezi ssDNA a grafenem roste s počtem vrstev grafenu (růst síly interakce nabývá maxima při 7 vrstvách grafenu a dále se výrazně nemění). [61] Při interakci dvoušrobovice dsDNA (dvouvláknová DNA z anglického *double-stranded DNA*) s grafenem nedojde k zrušení nekovalentních vazeb v dimeru DNA. [61] Molekulárně dynamické výpočty ukázaly, že krátké dsDNA molekuly budou mít vertikální uspořádání vůči grafenu a budou v interakci s uhlíkatým povrchem skrze hydrofóbní konec kmene. [62, 63]

Pomocí mikroskopu atomárních sil byly zaznamenány vzory, které tvoří polynukleotidy poly-A, poly-C, poly-T a poly-G na povrchu grafenu. [64] Ukázalo se, že polynukleotidy poly-A a poly-C tvoří na povrchu grafenu sférické útvary, zatímco poly-T a poly-G tvoří struktury planární a zesíťované (snímky z mikroskopu atomárních sil společně s grafy zobrazující výšky jednotlivých ssDNA vrstev jsou ukázány na obr. 8).



Obrázek 8: AFM snímky polynukleotidů s grafickým zobrazením výšek struktur na grafenu. První 4 snímky zachycují plochu $750 \times 750 \text{ nm}^2$, snímek s poly-G zachycuje plochu $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ (převzato z [64])

Bylo navrženo, že tvar do jakého se polynukleotidy skládají, není řízeno typem heterocyklu, jelikož podobné uspořádání vždy tvoří dvojice polynukleotidů, kdy jedna obsahuje pyrimidin a jedna purin. Také z výše uvedených informací nemůže být důvod pro formování sférických, či zesíťovaných útvarů čistě velikosti afinity dané báze ke grafenu, protože guanin se váže na grafen nejsilněji, zatímco thymin nejslaběji, ale poly-G a poly-T tvoří obdobné rovinné útvary. Předpokládaný mechanismus tvorby sférických, či planárních útvarů polynukleotidů spočívá v soutěži mezi interakcemi báze–báze s báze–grafen. Pro zrušení vazby báze–báze a správné natočení polynukleotidu je potřeba do systému dodat energii E_b (energie odpovídající stackingu mezi bázemi). Následně vznikne vazba báze–grafen, která zpětně sníží celkovou energii o E_g . Pokud platí, že $E_b > E_g$ (pro poly-A a poly-C), tak polynukleotidy utvoří sférické útvary pro maximalizaci energie E_b . V případě, že $E_b < E_g$ (pro poly-G a poly-T), tak interakce polynukleotidů s grafenem je výhodnější, a vytvoří se rovinná síť (schématicky je tento děj zobrazen na obr. 9). [64]



Obrázek 9: Skládání polynukleotidů na grafenu (šedá barva) do sférických a zesít'ovaných útvarů (převzato a upraveno z [64])

Na poli studia systému skládajících se z biomolekul a grafenu, se RNA nedostává zatím takové pozornosti jako DNA a proteinům. Porovnáním počtu studií pomocí databáze Web of Science obsahující zároveň grafen a biomolekuly, lze zjistit, že za posledních 5 let se RNA vyskytuje pouze v 6 % studií, zatímco proteiny a DNA s grafenem jsou zastoupeny zhruba $8 \times$ více (47 % každá).

2.4 Metody

2.4.1 Molekulové modelování

V chemických oborech vedle experimentálního přístupu lze využívat i nástroje výpočetní chemie, kde se pro získání informací o vlastnostech molekul využívá kombinace matematických metod s fundamentálními znalostmi fyziky. Od velkého rozšíření výpočetních technologií v 50. letech minulého století si výpočetní chemie získala nezastupitelné místo v moderních vědách. Pomocí teoretického přístupu lze doplnit experimentální data o atomární pohled na studovaný děj, předpovědět vlastnosti látek ještě před jejich samotnou syntézou (např. při drug-designu, kdy se studuje, jak potenciální léčivo interaguje s aktivním místem biomolekuly [65]), nebo lze provést simulace systémů v těžko dosažitelných podmínkách (za vysokého tlaku nebo teplot, atd.), ať už z důvodů ekonomické, nebo časové náročnosti.

Jedním z důležitých faktorů ovlivňující volbu výpočetní metody je velikost počítaného systému. Pro studium malých molekul lze využít přesnější *ab initio* metody kvantové mechaniky (QM), kdy se počítají vlastnosti systému řešením Schrödingerovy rovnice. Tento přístup je ovšem časově náročný a při využití QM lze v přijatelném čase počítat systémy zhruba do 100 atomů. V případě, že chceme počítat systémy obsahující tisíce až milióny atomů (biomakromolekuly, nanomateriály, apod.), tak lze využít tzv. molekulovou mechaniku (MM), kdy se využívá aproximací, které umožní počítat s přijatelnou přesností vlastnosti molekul pomocí řešení klasických Newtonovských rovnic (tato metoda se také často označuje jako *metoda silového pole*). [66, 67] Jen pro doplnění uvedme, že existují *semiempirické metody*, které jsou stále založené na QM, ale urychlují výpočet aproximacemi (např. uvažování pouze valenčních elektronů při výpočtu) a využitím empirických parametrů (např. ionizační a excitační energie elektronů). [67]

2.4.2 Molekulová mechanika

Pokud je systém příliš velký pro využití kvantových výpočtů, tak je nutné využít molekulovou mechaniku, která zanedbává elektronovou strukturu molekul. Při této aproximaci je pak energie systému dána pouze polohou jader atomů. To umožní nahlížet na molekuly jako na soustavu kulovitých částic s bodovým nábojem, které jsou mezi sebou v klasickém přístupu spojeny harmonickým oscilátorem (v klasické fyzice se harmonický oscilátor používá pro popis elastické deformace pružin). I přes jisté úspěchy MM, kdy lze dosáhnout vysoké přesnosti (srovnatelné s QM), je její velkou nevýhodou, že nelze vypočítat vlastnosti molekul, které jsou závislé na distribuci elektronů v systému, tím pádem i chemické reakce.

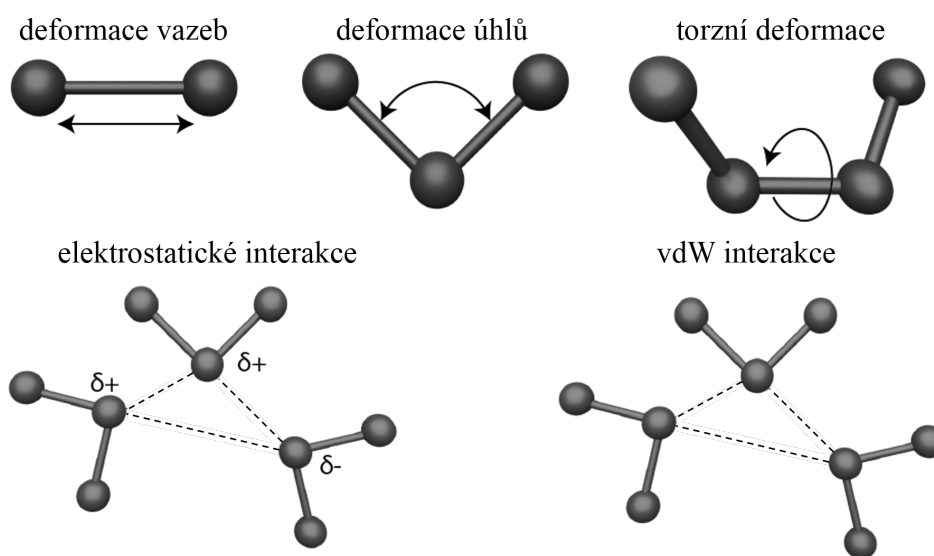
2.4.3 Silové pole

Pro výpočet energie systému metodou silového pole se využívá série funkcí, které obsahují empirické parametry, které lze určit z QM výpočtů, nebo z experimentálních dat. Souhrnně se tyto rovnice a příslušné parametry označují jako *silové pole* (i v české literatuře se lze často setkat s anglickým označením *force field*). Jednou z vlastností silového pole je tzv. *transferabilita* (nebo také *přenositelnost*), která spočívá v představě, že molekuly jsou se-

staveny z podobně se chovajících částí. Díky této představě lze využít jednu sadu parametrů a rovnic k modelování celé škály podobných molekul, než bychom museli parametrizovat každou molekulu zvlášť. Např. dobrých výsledků s jedním silovým polem lze dosáhnout pro všechny n -alkany.

Při využití silového pole je potřeba určit u jednotlivých atomů jejich *atomový typ*, který vedle základního určení o jaký atom se jedná, tak zahrnuje i hybridizaci a popřípadě lokální okolí atomu. Jako příklad uvedeme, že je vždy potřeba rozlišit sp^2 a sp^3 uhlíky, neboť každý zaujímá v prostoru jinou geometrii (trigonální a tetraedrickou) a je tedy potřeba pro každý z nich využít jiné parametry, jako je např. úhel mezi substituenty. [66]

Celková potenciální energie systému v silovém poli se získá pomocí zákonů klasické mechaniky a elektrostatiky. V nezákladnějším silovém poli je energie závislá na 5 složkách: deformace vazeb, deformace úhlů, torzní deformace a elektrostatické a van der Waalsovské interakce (ve stejném pořadí jsou jednotlivé příspěvky zobrazeny na obr. 10). [66]



Obrázek 10: Schématická reprezentace pěti základních příspěvků k potenciální energii systému

Součet jednotlivých energetických příspěvků lze zapsat rovnicí 1:

$$E_{\text{total}} = E_{\text{kovaletní}} + E_{\text{nekovaletní}} = E_{\text{vazeb}} + E_{\text{úhlů}} + E_{\text{torzí}} + E_{\text{vdW}} + E_{\text{els}} \quad (1)$$

Kovalentní příspěvky

První člen E_{vazeb} zahrnuje energii všech kovalentních vazeb mezi atomy. Pro popis blízký reálným vazbám se často využívá tzv. Morseho potenciál, který má tvar:

$$E_{\text{vazeb}} = D_e \{1 - \exp[-a(l - l_0)]\}^2, \quad (2)$$

kde D_e je hodnota energetického minima, a lze rozepsat do rovnice:

$$a = \omega \sqrt{\mu/2D_e}, \quad (3)$$

kde μ je redukovaná hmotnost a ω frekvence vibrace vazby. Frekvence vibrace vazby se dá vypočítat z tuhosti vazby k podle vztahu:

$$\omega = \sqrt{k/\mu}. \quad (4)$$

Poslední parametr l_0 je referenční délka vazby. Morseho potenciál popisuje chování vazeb v širokém rozsahu situací od rovnovážné délky vazby po její disociaci. Tento potenciál se ovšem často nevyužívá při výpočtech, protože výpočty s ním jsou časově náročné. Je potřeba znát 3 parametry a pro většinu případů stačí popisovat vazby při nižších energetických stavech, které jsou blízké nulové energetické hladině vazby. Z tohoto důvodu se využívá zjednodušení ve formě Hookova zákona, který popisuje vazby harmonickou funkcí:

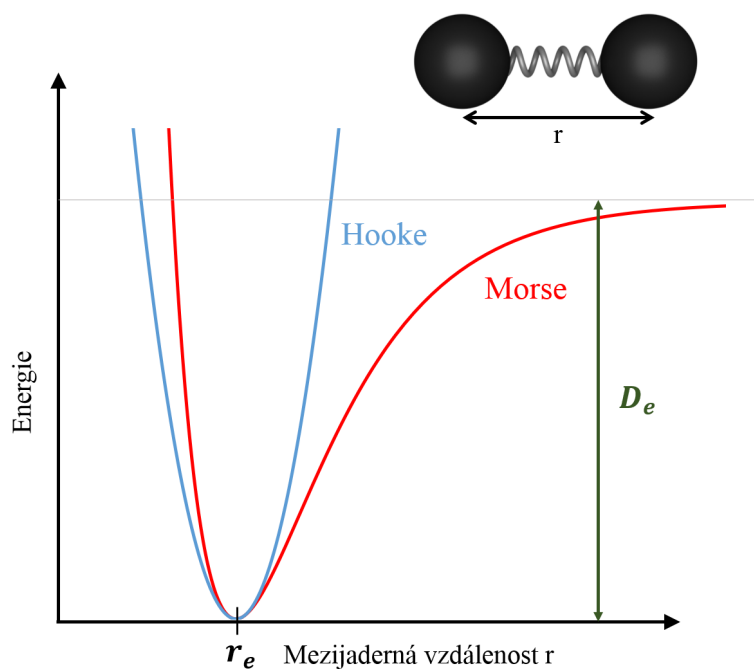
$$E_{\text{vazeb}} = \sum_{\text{vazby}} \frac{k_b}{2} (b - b_0)^2, \quad (5)$$

kde k_b je tuhost vazby. Potenciální energie vazeb se pak zvyšuje, čím větší je diference délky vazby l od referenční hodnoty l_0 . Jak ukazuje obr. 11, tak Hookův zákon je při nižších energiích dostačující aproximací.

Obdobně jako pro vazby se harmonická funkce dá použít pro popis deformace úhlů:

$$E_{\text{úhlů}} = \sum_{\text{úhly}} \frac{k_\theta}{2} (\theta - \theta_0)^2, \quad (6)$$

kde je značení obdobné jako u pnutí vazby. k_θ je tuhost úhlu a θ_0 je referenční hodnota úhlu. Pro představu energetické náročnosti na vychýlení vazby a úhlu od optimální hodnoty uvedme, že pro vychýlení vazby C–C o 1 Å je potřeba asi 300 kcal mol⁻¹, zatímco pro vychýlení úhlu mezi těmito vazbami o jeden stupeň je potřeba pouze 0,01 kcal mol⁻¹ [66].



Obrázek 11: Srovnání průběhu Morseho potenciál (červená) a harmonického oscilátoru (modrá)

Torzní energetický příspěvek pro nejběžnější silové pole pro studium biomolekul je vyjádřen goniometrickou funkcí:

$$E_{\text{torzí}} = \sum_{\text{torza}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\omega - \gamma)], \quad (7)$$

kde V_n je výška potenciálové bariéry, ω značí torzní úhel, n periodu a γ fázový posun, který určuje při jaké hodnotě torzního úhlu prochází funkce minimem.

Nekovalentní příspěvky

Nekovalentní příspěvky se skládají ze dvou příspěvků: z elektrostatických interakcí a z van der Waalsovských interakcí. První příspěvek je popsán pomocí Coulombova zákona:

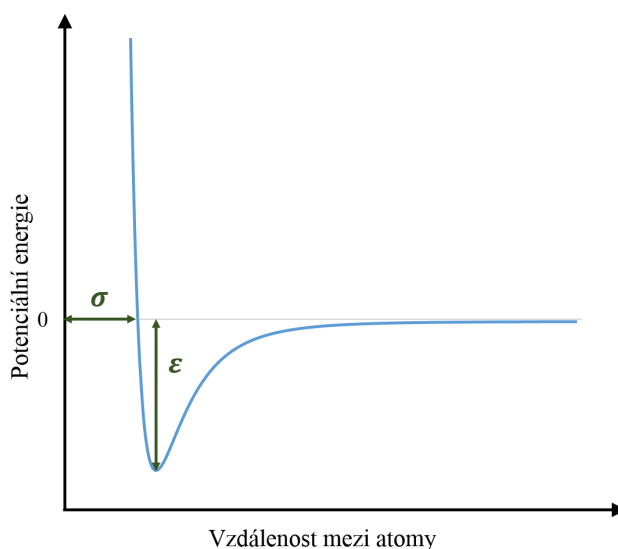
$$E_{\text{els}} = \sum_{i < j} \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \frac{q_i q_j}{r_{ij}}. \quad (8)$$

V této rovnici jsou q_i a q_j parciální náboje na atomech i a j , ϵ_0 je permitivita vakua, ϵ_r relativní permitivita prostředí a r_{ij} je vzdálenost mezi atomy.

Van der Waalsovy interakce se v MM popisují nejčastěji Lennard-Jonesovým potenciálem:

$$E_{\text{vdW}} = \sum_{i < j} 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right]. \quad (9)$$

Pro popis těchto interakcí je potřeba znát pouze dva parametry: parametr σ_{ij} se nazývá kolizní průměr a udává vzdálenou, kdy je energie nulová a ε_{ij} , který udává hloubku potenciálového minima (viz obr. 12). Výhodou LJ potenciálu je nižší výpočetní náročnost. [66]



Obrázek 12: Průběh LJ potenciálu

Nekovalentní interakce se počítají v základním provedení jen mezi jednotlivými páry částic, takže celková ne vazebná potenciální energie je dána součtem všech párových interakcí. V reálných systémech jsou ovšem tyto interakce ovlivněny i přítomností dalších částic. Zanesení interakcí silového pole, které se nepočítají jen mezi páry, ale zahrnují i třetí částici způsobí prudký nárůst výpočetní náročnosti. Např. v systému, který obsahuje 1000 částic je 499 500 unikátních párů, ale unikátních trojic je několikanásobně více, a to 166 167 000. [66]

Tento nedostatek lze předejit tím, že místo explicitního zahrnutí interakcí zahrnující více částic, a to pomocí tzv. *efektivního potenciálu*, který do párových interakcí implicitně vnáší důsledky mnohabodového efektu. Tento potenciál pak ovšem nepopisuje skutečnou interakci

mezi osamocenými částicemi. Např. polarizaci lze zanést do silového pole účelným zesílením elektrostatických interakcí. [66] Jedna z možností, jak lze do simulací zahrnout polarizaci je např. pomocí *Drudeho modelu*, který k atomu přidává bezhmotnou částici, která nese náboj. Tato částice je s atomem spojena harmonickou funkcí (někdy se této metodě přezdívá "metoda náboje na pružině"). Díky této částici je vytvářen dipól, který má možnost měnit svou velikost podle okolí. Jen pro doplnění uvedme, že existují i další metody pro zahrnutí explicitní polarizace do silového pole, jako je model indukovaného náboje, nebo model fluktuujících nábojů. [68]

2.4.4 Molekulová dynamika

Dynamický charakter systému lze pozorovat pomocí tzv. *molekulové dynamiky* (MD). Tato metoda je jedna ze dvou hlavních technik (pro doplnění uvedme, že 2. technika využívá matematickou metodu Monte Carlo), která generuje sérii časově korelovaných bodů ve fázovém prostoru. Tato série bodů se nazývá *trajektorie*. Při MD výpočtech, které využívají empirický potenciál (lze provádět i *ab initio* MD, ale tato metoda přesahuje rámec této práce) je trajektorie generována řešením Newtonova pohybového zákona sérií konečných časových kroků.

Newtonova pohybová rovnice má tvar (pro jednoduchost uvádíme vztah pro pohyb pouze ve směru osy x):

$$F_i = m_i \frac{d^2 x_i}{dt^2}, \quad (10)$$

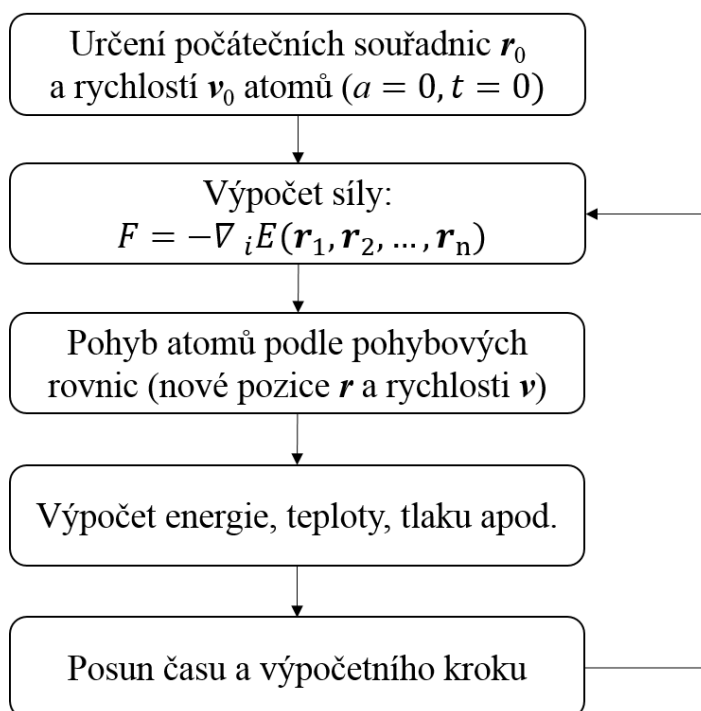
který popisuje pohyb (vyvolaný silou F_i) částic o hmotnosti m_i podél osy x . Síla působící na částici se vypočítá jako záporný gradient potenciální energie:

$$F_i = -\nabla_i E(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_n). \quad (11)$$

Potřebná potenciální energie E se vypočítá z empirických parametrů, které jsou součástí silového pole podle rovnic uvedených v předešlé podkapitole. Na počátku simulace je směr a rychlost pohybu částic vygenerován podle teploty z Maxwell-Boltzmannova rozdělení.

V mnoha částicových systémech, kdy všechny částice interagují mezi sebou je analyticky nemožné řešit vývoj systému v čase. Za tímto účelem se jako jeden z nejpoužívanějších algoritmů numerického řešení pohybových rovnic využívá matematická *metoda konečného*

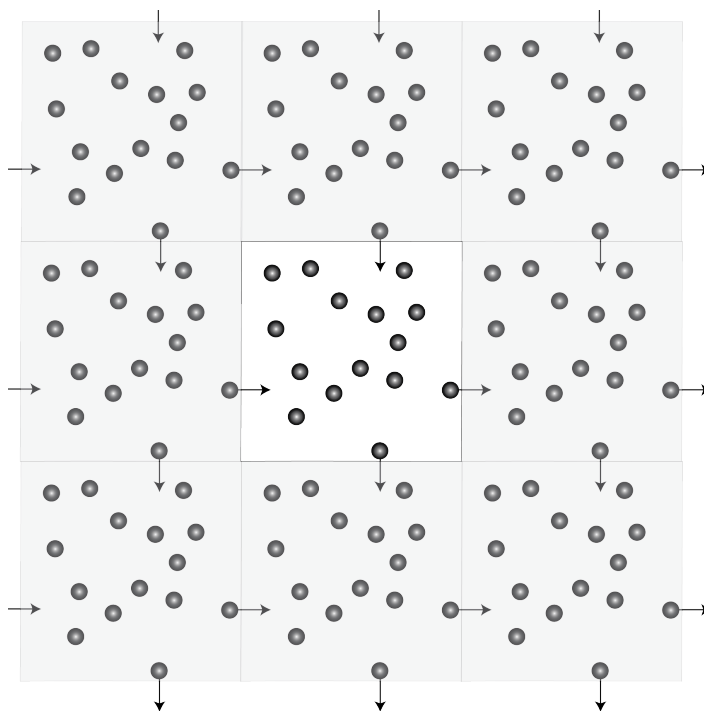
rozdílu (z anglického Finite Difference Method). Hlavní myšlenka této metody spočívá v rozdělení počítaného integrálů na malé úseky, které jsou odděleny časem δt . V čase t se celková síla působící na částici vypočítá jako vektorový součet všech interakcí s ostatními částicemi. Zrychlení (které je výsledkem vypočtené síly) se následně zkombinuje s pohybem, který částice měly v čase t k výpočtu polohy a rychlosti v následujícím časovém úseku $t + \delta t$ (za předpokladu konstantní síly během celé doby δt). [66, 69] Schématicky je algoritmus zobrazen na obr. 13.



Obrázek 13: Zjednodušené schéma algoritmu výpočtů v MD

Periodické okrajové podmínky

Jedním z běžných způsobů pro snížení výpočetní náročnosti velkého systému je aplikovat tzv. *periodické okrajové podmínky* (z anglického periodic boundary conditions se využívá zkratka PBC), kdy základní box, ve kterém probíhá simulace, je obklopen ve všech směrech jeho kopií (viz obr. 14). V praxi to znamená, že např. ideální krystal grafenu se simuluje jako nekonečná molekula, která nemá okraje ve dvou rozměrech. Také díky PBC je během celé simulace zachován stejný počet molekul v objemu celého simulačního boxu, protože ve chvíli, kdy jedna molekula opustí základní simulační box, tak z protější strany dojde k jejímu nahrazení ze sousedního boxu. [69]



Obrázek 14: Grafické zobrazení periodických okrajových podmínek

Výpočet změny entalpie ΔH

Při popisu systému je často jednou ze sledovaných veličin uvolněné, nebo pohlcené teplo. Při běžných pokusech v laboratořích (prováděných za konstantního tlaku) je vyměňované teplo rovno entalpii.

Díky tomu, že entalpie H je stavová veličina, tak její změnu během studovaného děje lze získat i teoreticky ze 2 nezávislých simulací. Entalpie je definovaná jako:

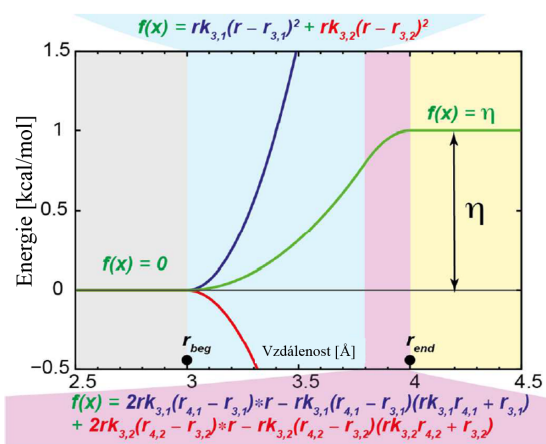
$$H = \langle U \rangle + p\langle V \rangle, \quad (12)$$

kde U je vnitřní energie, která je v MM reprezentována jako potenciální energie, p je vnější tlak a V objem. [70] ΔH pak lze získat z rozdílu entalpií dvou různých stavů (ze 2 různých simulací). Hlavní předpokladem je, že systémy 1 a 2 musí mít stejný počet atomů stejného atomového typu. [71]

HBfix

Bylo ukázáno, že zlepšení populací sbalené a rozbalené konformace studovaného RNA hairpinu (které byly získané z pokročilé techniky T-REMD simulací), jde docílit přidáním dodatečného potenciálu na nativní vodíkové můstky v hairpinové struktuře, tzv. *Hbfix*. [74] Takto modifikované silové pole bylo úspěšně aplikováno na skládání hairpinu s tetraloopem GAGA, který je (společně s HBfixem) využit i v této práci. [74]

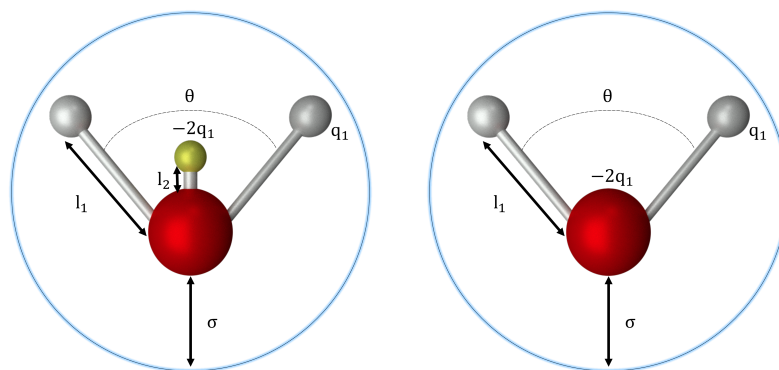
Hbfix je složen ze dvou funkcí, které mají opačný směr zakřivení. Tyto funkce se až na vymezenou oblast vzdáleností (určenou nastavitelnou vzdáleností mezi r_{beg} a r_{end}) sčítají do konstantní hodnoty potenciálu (0 před r_{beg} a η za r_{end} , kde η je opět nastavitelná energie stabilizující vodíkovou vazbu). Parametry $k_{3,1}$, $k_{3,2}$, $r_{3,1}$, $r_{4,1}$, $r_{3,2}$ a $r_{4,2}$ v obr. 15 představují pružné konstanty jednotlivých funkcí.



Obrázek 15: Průběh potenciálu HBfixu (zelená) (parametry HBfixu na obrázku jsou $r_{beg} = 3 \text{ \AA}$, $r_{end} = 4 \text{ \AA}$ a $\eta = 1 \text{ kcal/mol}$). Převzato z [74]

Model vody

Simulace v této práci byly provedeny ve vodném prostředí za využití OPC (optimal point charge) modelu vody. Tento rigidní model se skládá ze 4 bodů mezi kterými jsou rozmístěny 3 náboje. Pro srovnání uveďme i model SPC/E (extended simple point charge), který je jeden z nejpoužívanějších třibodových modelů. [80] Struktury modelů molekul vody jsou zobrazena na obr. 16 a jednotlivé parametry jsou uvedeny v tabulce 1.



Obrázek 16: Modely vody OPC (v levo) SPC/E (v pravo)

Model	σ_{LJ} [Å]	ϵ_{LJ}	l_1 [Å]	l_2 [Å]	θ [°]	q_1 [e]
OPC	3,16655	0,89036	0,8724	0,1594	103,6	0,6791
SPC/E	3,166	0,65	1	–	109,47	0,4238

Tabulka 1: Parametry OPC a SPC/E vody

Čtyřbodový OPC model přesněji popisuje distribuci náboje na molekule vody v kapalně fázi. Oproti třibodovému poskytuje OPC model lepší popis solventu, který více odpovídají experimentálně zjištěnému chování vody (viz tabulka 2). [73]

Model	μ [D]	ρ [g/cm ³]	ϵ_0	ΔH_{vap} [kcal/mol]
OPC	2,48	0,997 ± 0,004	10,57 ± 0,004	10,57 ± 0,004
SPC/E	2,352	0,994	68	10,43
Experiment	2,5 – 3	0,997	78,4	10,52

Tabulka 2: Srovnání modelových a experimentálně zjištěných vlastností vody (μ - dipólový moment, ρ - hustota, ϵ_0 - dielektrická konstanta, ΔH_{vap} - vypařovací teplo). Hodnoty převzaty z [73]

3. Praktická část

Jedno z možných budoucích uplatnění grafenu je v oblasti biosenzoriky biomolekul, nebo jako základ nosičů bioaktivních látek. Pro cílenou výrobu materiálu pro tyto aplikace je potřeba hlubší porozumění interakcí, které se dějí mezi uhlíkatým povrchem a biomolekulami. Tato práce využívá MD, která poskytuje atomární pohled na chování RNA molekul na grafenu. Výsledky jsou srovnány s experimentálními daty, které byly naměřeny v Regionálním centru pokročilých technologií a materiálů (RCPTM) a byly publikovány v příložené studii. Poznamenejme, že veškeré experimentální výsledky v praktické části této práce nebyly měřeny autorem a slouží pouze k ucelenějšímu pohledu na danou problematiku.

V této práci popisují strukturní vývoj RNA molekul a termodynamickou stabilitu hairpinů, které jsou umístěné na grafenu ve vodném prostředí. Při rozbalování hairpinové struktury dochází k zisku konformační volnosti (tedy i ke změně entropie), ale z předešlých poznatků je známo, že skládání RNA do hairpinu je entalpicky řízený proces a ztráta konformační volnosti se do konečné změny energie podílí menším dílem. [72] Díky této skutečnosti lze pro srovnání termodynamické stability jednotlivých konformací oligonukleotidů využít hodnot změn entalpií.

3.1 Popis simulací

Interakce hairpin-formujících RNA molekul s povrchem grafenu byly zkoumány v této práci pomocí MD simulací. Výpočty byly provedeny v softwarovém balíku Gromacs (verze 4.5.5) [75] s rozšířením Plumed 2.1.1 [76]. Využité bylo silové pole ff99bsc0 χ_{OL3} [77] s vdW modifikací fosfátových kyslíků [78] a přidaným HBfix potenciálem. [74] Grafenové uhlíky byly reprezentovány jako nenabitě Lennard-Jonesovi koule s Cheng a Steele interakčními parametry, které byly vyvinuty pro simulace grafitických materiálů. [79]

Grafen v simulacích byl simulován jako periodický s laterálními rozměry 8,5 nm \times 8,4 nm, které tedy odpovídaly i x a y rozměrům simulačního boxu. Rozměr z byl volen tak, aby byla vyloučena interakce s periodicky se opakující replikou.

Periodické okrajové podmínky byly aplikovány ve všech dimenzích a simulace probíhaly v NpT souboru, tj. za konstantního tlaku, počtu částic a při stejné teplotě. Výchozí struktury byly vždy nejprve minimalizovány a termalizovány z teploty 10 K na 300 K při tlaku 10^5 Pa. Pak následovaly volné simulace, které se pro různé systémy pohybovaly mezi 200–400 ns (délka volné simulace byla zvolena podle konečné konvergence a bude uvedena u jednotlivých simulací). Integrační krok byl zvolen 2 fs. Z konečné analýzy bylo vynecháno počátečních 100 ns, které sloužily pro ekvilibraci systému.

Všechny simulace využívaly jako solvent explicitní OPC model vody, [73] ve které byly umístěny Na⁺ ionty pro neutralizaci záporně nabitých fosfátů v molekule RNA.

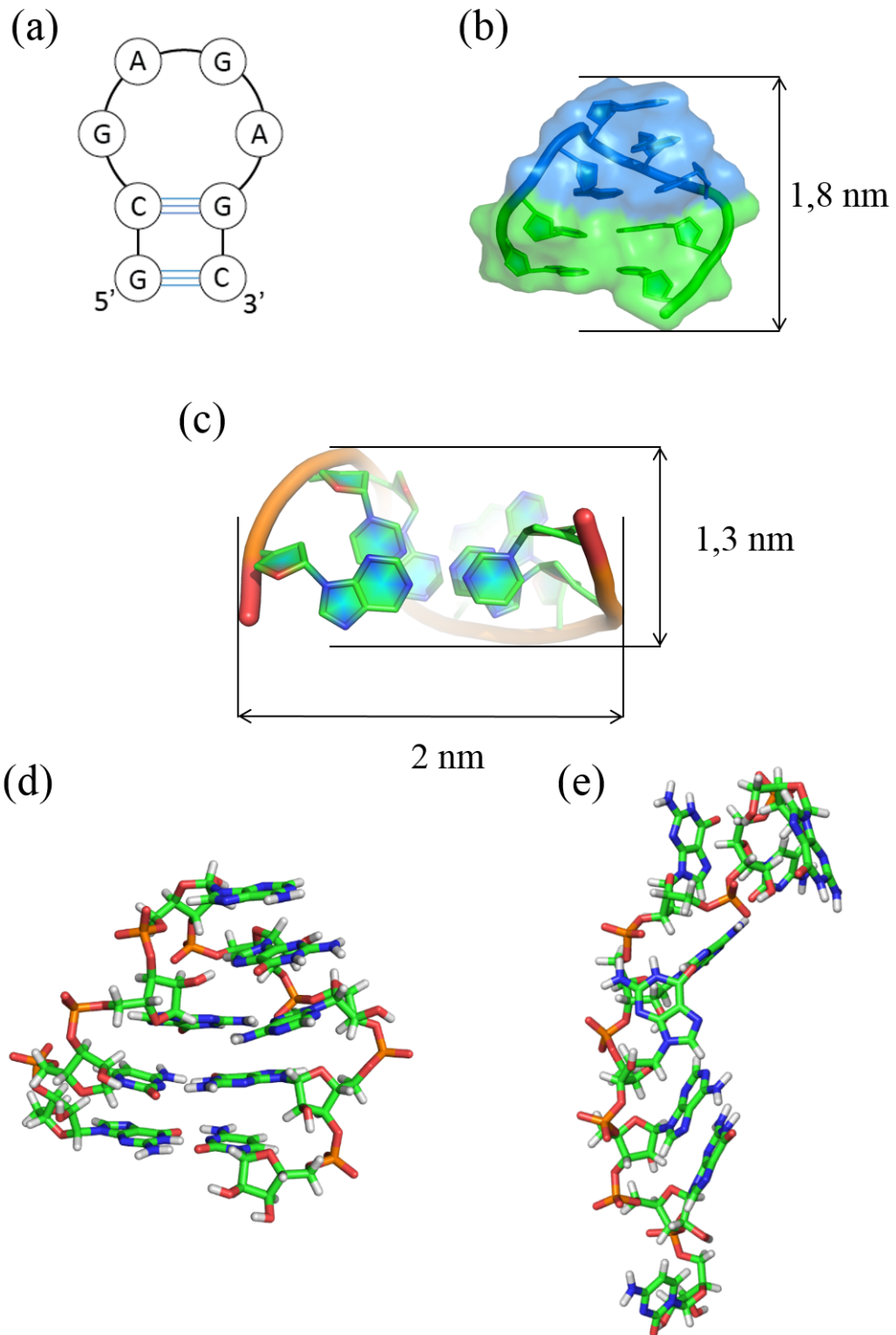
Entalpie z jednotlivých simulací byly získány pomocí nástroje *g_energy*, který je součástí softwarového balíku Gromacs. Rozdíl entalpií byl vždy počítán ze 2 nezávislých simulací (obsahující sbalený, nebo rozbalený stav RNA hairpinu), které obsahovaly stejný počet atomů o stejném typu.

3.1.1 Simulované struktury

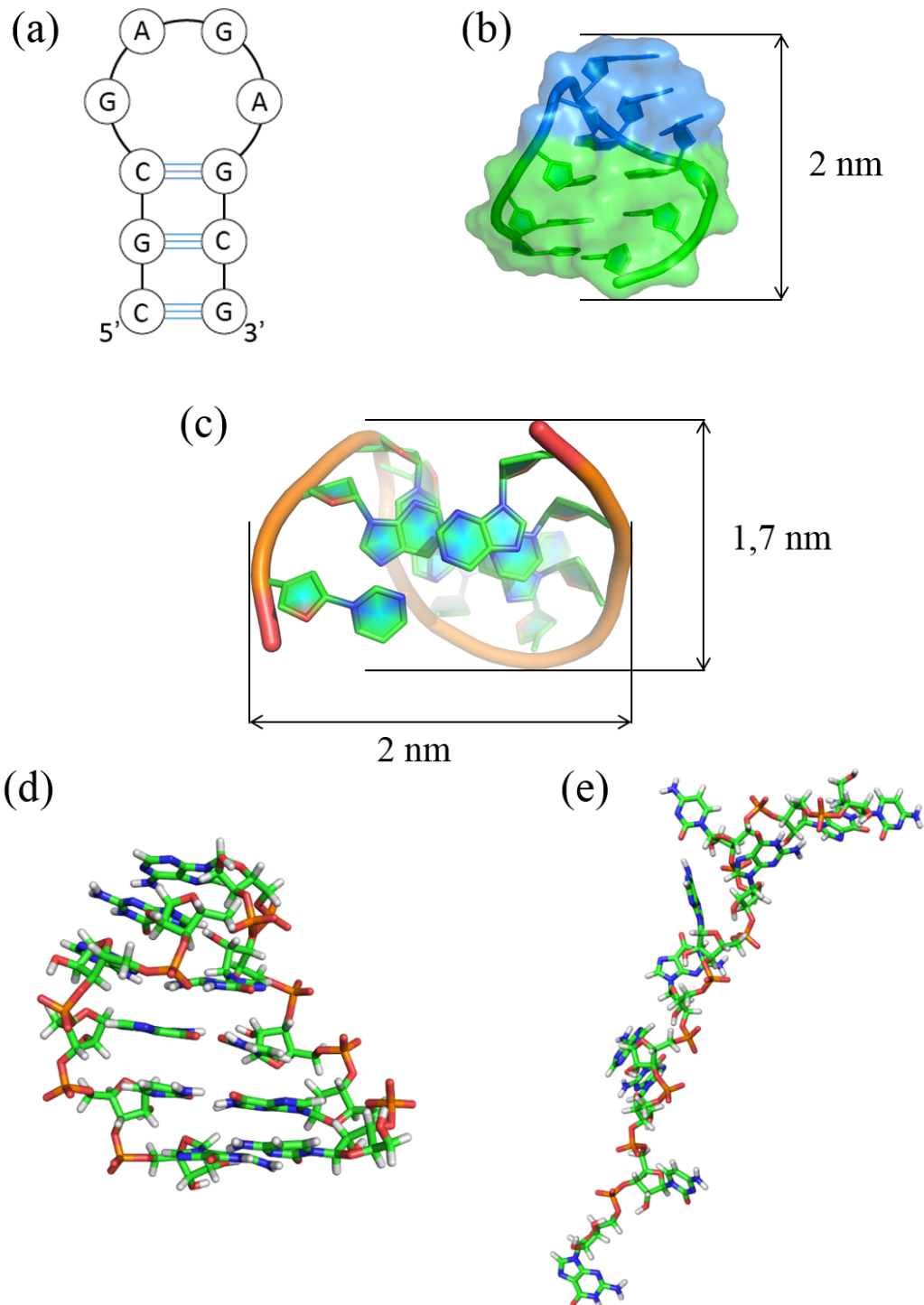
Tetraloop GAGA využitý v této práci byl odvozen z rentgenové struktury sarcin/ricin loopu v 28S ribozomální RNA z *E. coli* s rozlišením 1,04 Å (PDB ID 1Q9A, residua 2658-2661). [81] Nekanonické konce byly prodlouženy o 2 páry (poskytující hairpinovou sekvenci oktameru 5'-GC(GAGA)GC-3'), nebo o 3 páry bází (poskytující hairpinovou sekvenci dekameru 5'-CGC(GAGA)GCG-3'). Rozložené struktury byly získány pomocí MD simulací za vysoké teploty. [82] Podrobnější popis oktameru poskytuje obr. 17 a dekameru obr. 18. Pro lepší popis poznamenejme, že se i v české terminologii často využívá anglických výrazů *fold* (pro hairpinovou strukturu) a *unfold* (pro strukturu rozloženou).

Bylo provedeno celkově 12 simulací RNA oligonukleotidů, obsahující systém hairpinu ve vodě a systém hairpinu na grafenu. Následně byly studovány i systémy oktameru s dvouvrstevným grafenem a s grafenem na SiO₂ matrici. Simulace obsahující dekamer měly délku volné simulace 400 ns. Simulace s oktameru strukturou ve vodě a na 1 grafenu měly délku volné simulace 300 ns a doplňkové simulace s 2 grafeny a grafenem na oxidu křemičitém byly o délce 200 ns. V následujícím seznamu je uveden konkrétní výčet simulací s velikostí simulačních boxů výchozích systémů (graficky jsou výchozí struktury zobrazeny na obr. 19):

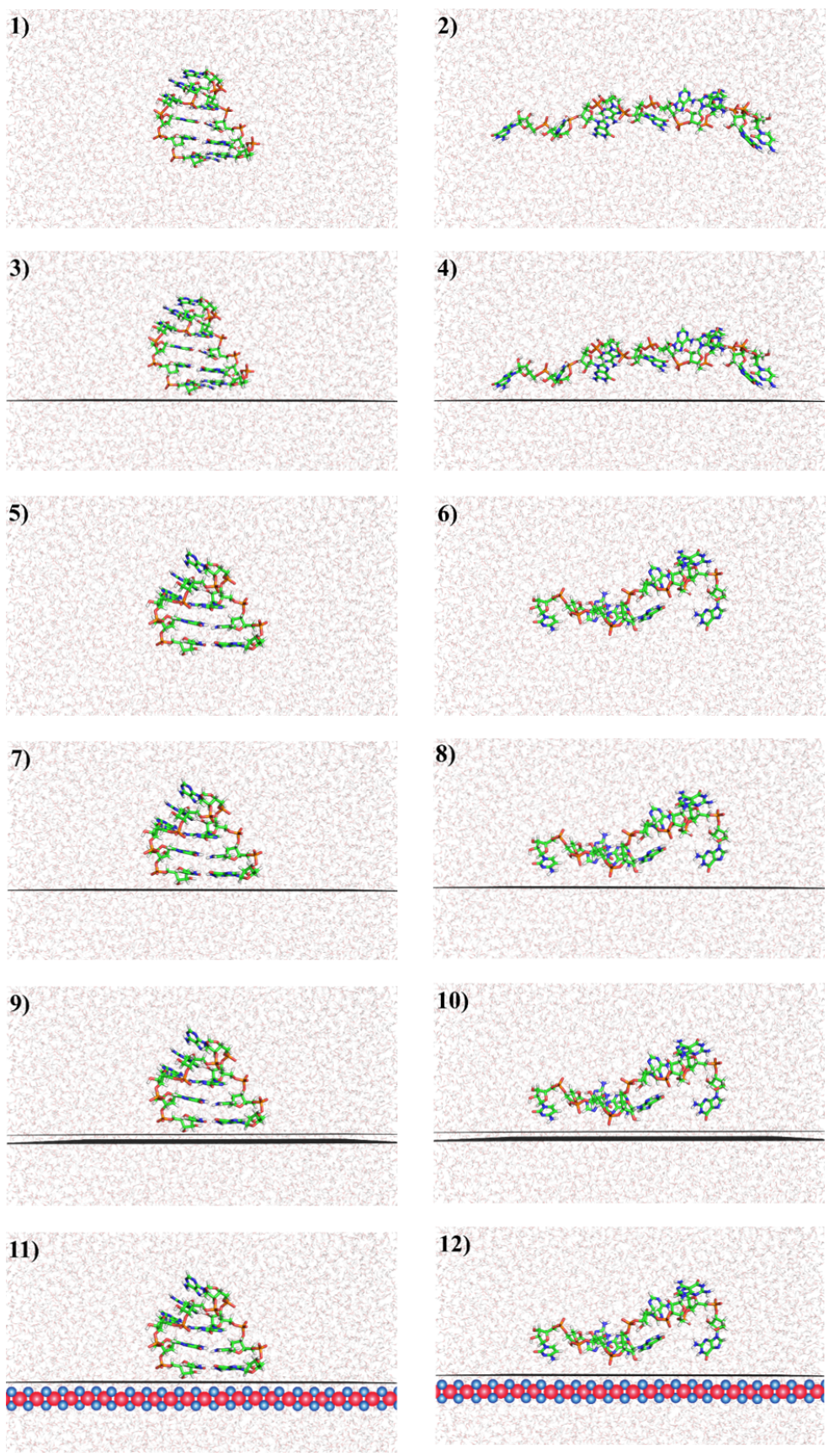
1. Složený dekamer ve vodě (bez grafenu) (8,5 × 8,5 × 8,5 nm)
2. Rozložený dekamer ve vodě (bez grafenu) (8,5 × 8,5 × 8,5 nm)
3. Složený dekamer na grafenu (8,5 × 8,4 × 5,5 nm)
4. Rozložený dekamer na grafenu (8,5 × 8,4 × 5,5 nm)
5. Složený oktamer ve vodě (bez grafenu) (6,5 × 6,5 × 6,5 nm)
6. Rozložený oktamer ve vodě (bez grafenu) (6,5 × 6,5 × 6,5 nm)
7. Složený oktamer na grafenu (8,5 × 8,4 × 5,5 nm)
8. Rozložený oktamer na grafenu (8,5 × 8,4 × 5,5 nm)
9. Složený oktamer na dvou grafenech (8,5 × 8,4 × 5,5nm)
10. Rozložený oktamer na dvou grafenech (8,5 × 8,4 × 5,5 nm)
11. Složený oktamer na grafenu umístěném na SiO₂ (8,5 × 8,4 × 5,5 nm)
12. Rozložený oktamer na grafenu umístěném na SiO₂ (8,5 × 8,4 × 5,5 nm)



Obrázek 17: Charakteristika oktameru hairpinu RNA **a)** sekundární struktura **b)** výška hairpinu (modrá barva znázorňuje tetraloop, zelená kmen A-RNA dvoušrovice) **c)** rozměry hydrofobického kontaktu **d)** složená struktura hairpinu **e)** rozložená struktura hairpinu



Obrázek 18: Charakteristika dekameru hairpinu RNA **a)** sekundární struktura **b)** výška hairpinu (modrá barva znázorňuje tetraloop, zelená kmen A-RNA dvoušrobovice) **c)** rozměry hydrofobického kontaktu **d)** složená struktura hairpinu **e)** rozložená struktura hairpinu



Obrázek 19: Schéma výchozích systémů pro jednotlivé simulace

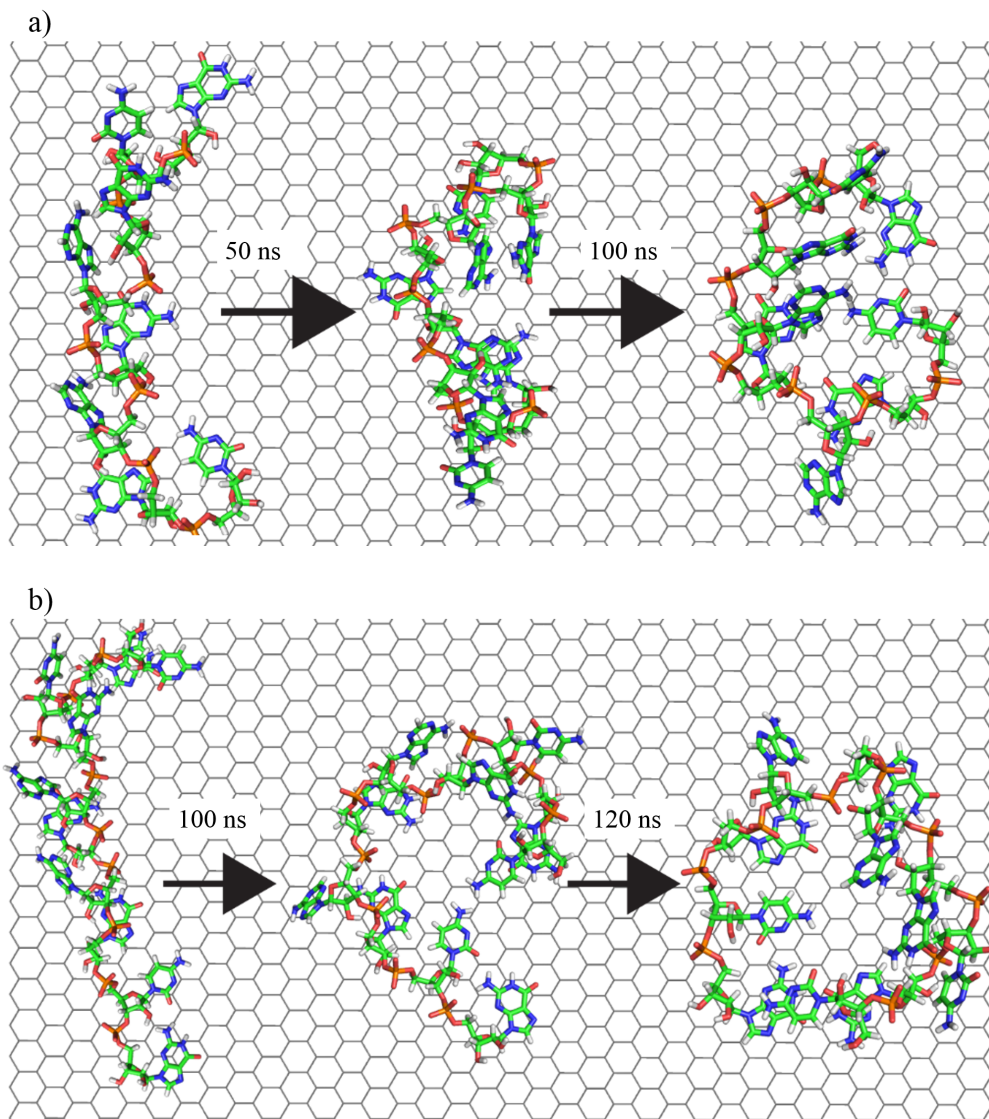
3.2 Výsledky a diskuze

V příložené studii byla provedena měření pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM) v kapalně fázi, které poskytly informace o chování RNA dekameru na grafenu. Na uhlíkatém povrchu byly pozorovány vznikající motivy z RNA, ovšem pouze z experimentálních dat nebylo možné určit konformaci, ve které se RNA na grafenu vyskytuje. Proto byly provedeny simulace, které mohly poskytnou nový pohled na danou problematiku. Jelikož byly provedeny simulace se sbalenou a rozbalenou strukturou na grafenu odděleně, tak jsme mohli získat teoretické výšky obou konformací a jejich srovnáním s výškami experimentálními se dalo jednoznačně určit, že RNA se na povrchu nachází ve své rozbalené formě.

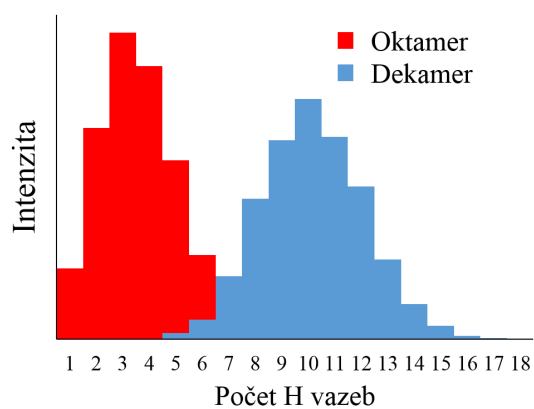
3.2.1 Strukturní charakteristika RNA na grafenu

Na našich časových škálách nebylo možné přímo pozorovat skládání nebo rozkládání hairpinu ve vodném prostředí, které probíhá na časových škálách dosahující μs až s . [44] Z tohoto důvodu nebylo možné pozorovat výrazné konformační změny v hairpinových strukturách, a proto byly jednotlivé simulace rozděleny na simulace obsahující sbalenou, nebo rozbalenou strukturu RNA.

Rozložené struktury v průběhu simulace stočily páteř RNA oběma konci k sobě a vytvořily struktury, které jsou zobrazeny na obr. 20. U oktameru došlo ke konečnému stočení po 100 ns a u dekamer po 120 ns a obě struktury byly následně stabilní v průběhu celé doby simulace. Takto stočené struktury byly v interakci s grafenem skrze $\pi - \pi$ vazby. Po utvoření struktury zobrazené na obr. 20 byl unfoldovaný oktamer v kontaktu s grafenem skrze 4 (11 % času), 5 (66 % času), nebo 6 (23 % času) bází. Ve struktuře oktameru se vyskytovaly nejčastěji 3 vodíkové vazby (na obr. 21 jsou graficky znázorněny poměry mezi počty vodíkových vazeb v simulaci). Dekamer byl s grafenem v interakci skrze menší počet bází než oktamer, a to skrze 3 (12 % času), 4 (53 % času), nebo 5 (35 % času). Ve struktuře dekameru se vyskytovalo nejčastěji 10 vodíkových vazeb (viz obr. 21). Přítomnost interakce báze–grafen se uvažovala, pokud báze byla od grafenu vzdálena do 0,7 nm a svírala s normálou roviny grafenu úhel $90 \pm 15^\circ$. Počet vodíkových vazeb byl získán pomocí nástroje *h_bonds*, který je obsažen v softwarovém balíku Gromacs.

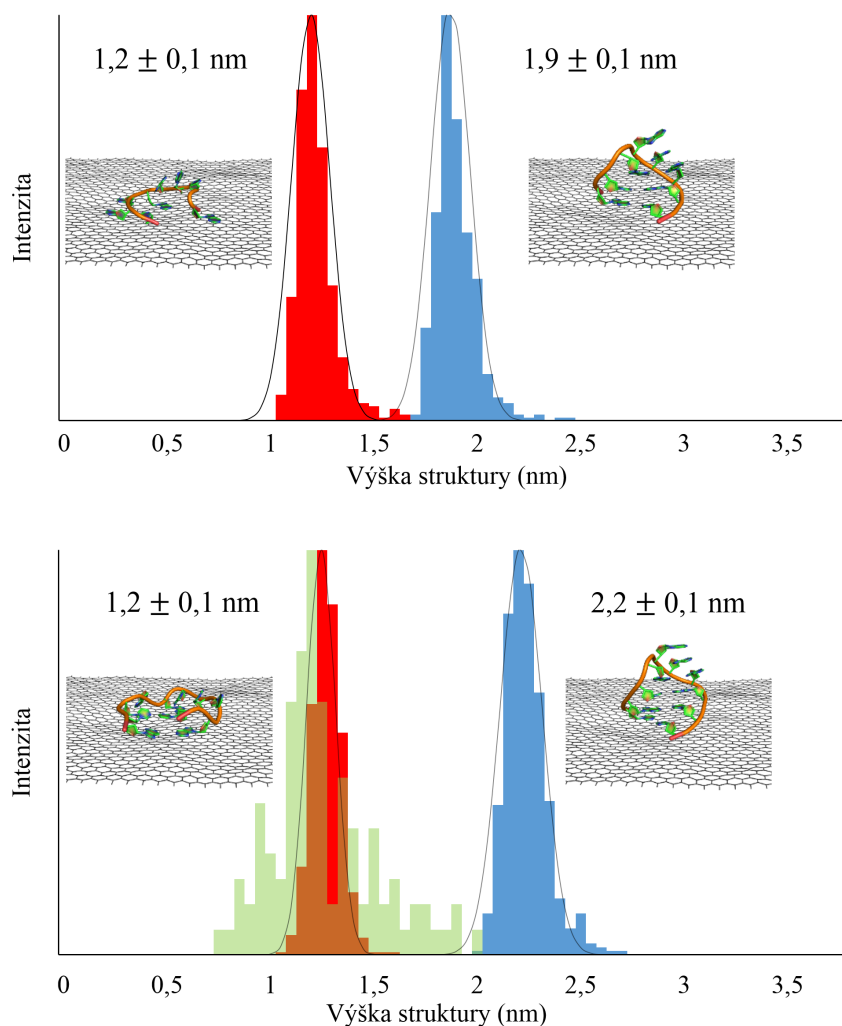


Obrázek 20: Strukturní vývoj rozložené struktury oktameru a dekameru v průběhu simulace



Obrázek 21: Poměr počtu vodíkových vazeb v rozbalené struktuře RNA na grafenu

Teoretické výšky pro oktamer a dekamer byly zaneseny do histogramů v obr. 22. Pro srovnání byly do histogramu s dekamerem zaneseny změřené výšky pomocí AFM v kapalné fázi (koncentrace RNA byla $c(\text{RNA}) = 2 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1}$).



Obrázek 22: Výšky oktameru (nahore) a dekameru (dole) na grafenu. Červená barva značí unfoldovanou strukturu a modrá foldovanou (teoretické výšky jsou proloženy Gaussovou křivkou normálního rozdělení). Zelená barva v histogramu dekamerů značí experimentální výšky

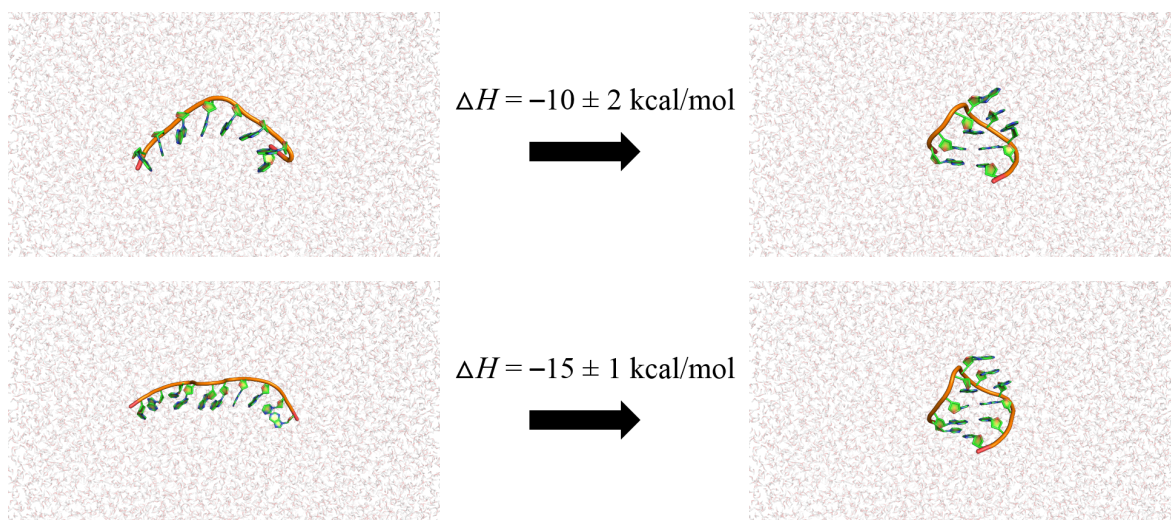
Na obr. 22 jde vidět, že experimentální výška ($1,2 \pm 0,2 \text{ nm}$) dekameru RNA na grafenu je srovnatelná s teoretickou výškou unfoldovaného dekameru ($1,2 \pm 0,1 \text{ nm}$). Z tohoto srovnání lze usuzovat, že se RNA na grafenu bude nacházet ve své rozbalené formě.

3.2.2 Entalpické změny

Jelikož je entalpie stavová veličina, tak i když nelze na našich časových škálách pozorovat přímé sbalení (nebo rozbalení) RNA do hairpinu, tak jsme mohli výslednou entalpii vypočítat jako rozdíl odpovídajících si systémů se složenou a rozloženou strukturou RNA hairpinu, ať už umístěného na grafenu nebo ve vodě.

RNA oligonukleotid ve vodě

Z experimentálních měření je známo, že námi vybraný tetraloop se ve vodném prostředí samovolně sbaluje. [83] Toto pozorování bylo podpořeno i našimi simulacemi, kde sbalený stav byl entalpicky výhodnější. Zjištěná změna entalpie byla $\Delta H = 10 \pm 2 \text{ kcal mol}^{-1}$ pro systém s oktamerem a $\Delta H = 15 \pm 1 \text{ kcal mol}^{-1}$ pro systém s dekamerem ve prospěch sbalené struktury. Můžeme vidět, že přidáním dalšího páru guaninu a cytosinu do hairpinové struktury dochází k její stabilizaci o 5 kcal mol^{-1} .

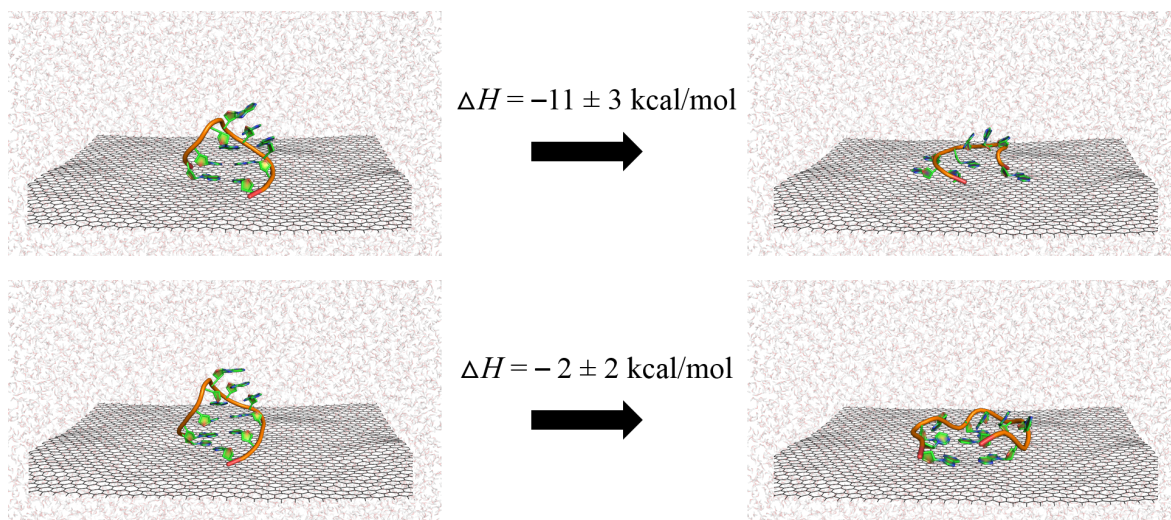


Obrázek 23: Změna entalpie v simulacích oktameru a dekameru RNA ve vodě

Nižší entalpie pro sbalené struktury naznačuje, že se oligonukleotidy RNA budou samovolně skládat do hairpinové struktury ve vodném prostředí. Tento závěr, který ve shodě s experimentálním měřením, kde se RNA taktéž samovolně skládá do hairpinu, podporuje správnost námi použitého silového pole a nastavení simulací.

RNA oligonukleotid na grafenu

Dále jsem se díval na změnu entalpie stejného procesu, který nyní probíhal na povrchu grafenu. Zjištěná změna entalpie mezi simulacemi sbaleného a rozbaleného oktameru na grafenu byla $\Delta H = 11 \pm 3 \text{ kcal mol}^{-1}$, kdy termodynamicky výhodnější byla rozbalená struktura. Změna entalpie pro dekamer na grafenu byla nižší. Zjištěná entalpická změna v simulacích s dekamerem byla $\Delta H = 2 \pm 2 \text{ kcal mol}^{-1}$, ve prospěch rozbalené struktury.



Obrázek 24: Změna entalpie v simulacích oktameru a dekameru RNA na grafenu

Nižší entalpie pro rozloženou strukturu oktameru i dekameru na grafenu naznačují, že se malé RNA molekuly budou na grafenu rozbalovat, což je opačný děj oproti systému ve vodě. Termodynamické údaje společně se strukturální charakteristikou implikují, že grafen napomáhá RNA molekulám se rozložit z hairpinové struktury a tím ztrácí svou původní funkčnost. Z toho vychází, že použití hairpinu ve své dosavadní podobě (bez dalších modifikací) není možné.

Následně jsme provedli dodatečné simulace, které měly dále prozkoumat roli substrátu nacházejícího se pod grafenem.

RNA oligonukleotid na grafenu umístěném na substrátu

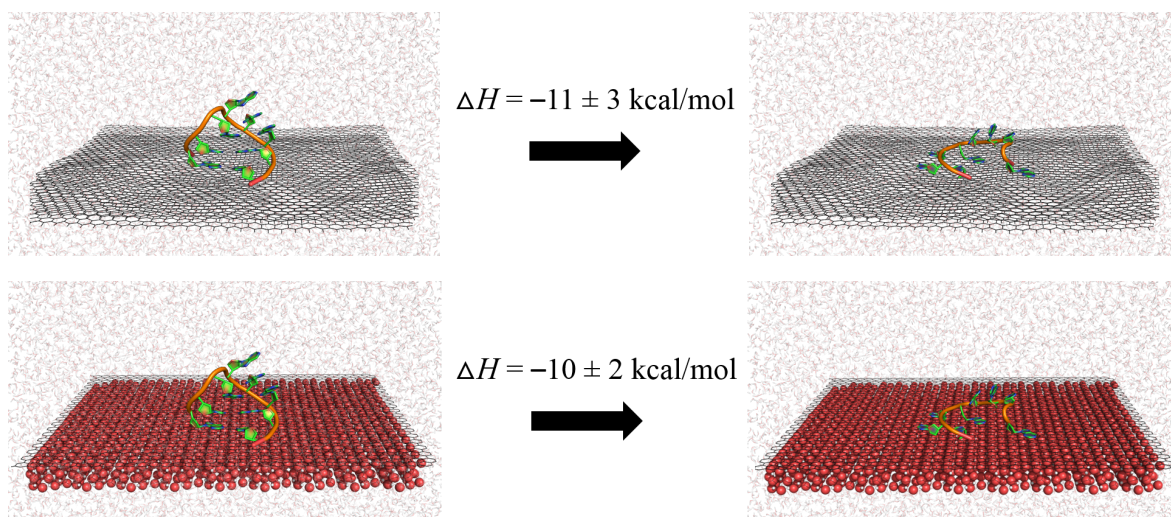
Pro doplnění jsme provedli simulace, kdy jsme umístili sbalený a rozbalený oktamer RNA na dvouvrstvý grafen. Výsledná změna entalpie mezi simulacemi byla $\Delta H = 11 \pm 3 \text{ kcal mol}^{-1}$

s termodynamicky stabilnější rozbalenou strukturou.

V našem modelu jsme nepozorovali rozdíl v diferenci entalpií mezi systémy s 1 a 2 grafeny, i když podle experimentálních výsledků by měla interakce mezi polynukleotidy a grafenem růst s počtem vrstev grafenu (při maximální interakci se 7 molekulami grafenu). [61] Interakce mezi RNA a grafenem je v našich simulacích zprostředkovávána pouze skrze vdW interakce, jejíž síla prudce klesá s rostoucí vzdáleností, kdy při zjištěné odchylce 3 kcal mol⁻¹ jsme nebyli schopni pozorovat rozdíl oproti simulaci s 1 grafenem.

Při přípravě grafenu metodou mechanické exfoliace se výsledná vrstva grafenu nejčastěji přichytí na substrát z oxidu křemičitého. Tato metoda byla využita i při přípravě grafenu se kterým byly provedeny experimentální měření v přiložené práci. Proto jsme provedli simulace sbaleného a rozbaleného oktameru na grafenu umístěném na SiO₂. I v tomto případě jsme pozorovali, že rozbalená forma je entalpicky preferovaným stavem. Vypočtená změna entalpie byla $\Delta H = 10 \pm 2$ kcal mol⁻¹. I v simulacích s grafenem umístěném na oxidu křemičitém nebyly zjištěné hodnoty příliš odlišné od hodnot zjištěných z předchozích simulací RNA na grafenu.

Ze těchto výsledků je možno usoudit, že náš systém není příliš sensitivní na vliv podložky, na které je grafen přichycen není marginální. Ovšem i v těchto simulacích se prokázalo, že se RNA bude vyskytovat na povrchu grafenu v rozbalené formě.



Obrázek 25: Změna entalpie v simulacích oktameru RNA na 2 grafenech a na grafenu umístěném na SiO₂

4. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo prozkoumat interakce mezi povrchem grafenu a malých RNA molekul. Za tímto účelem jsem použil molekulárně dynamické výpočty, jež poskytly užitečné informace do přiložené práce, která byla publikována v časopise *2D materials*. Bylo provedeno celkově 12 simulací s RNA molekulami o délce 8 a 10 nukleotidů obsahující GAGA tetraloop, který v RNA molekulách napomáhá k terciálnímu skládání, nebo vytváří aktivní místo pro interakci s proteiny. Simulace byly provedeny s oligonukleotidem ve vodném prostředí, na grafenu, na 2 grafenech a na grafenu, který byl přichycen na vrstvě SiO_2 .

Výsledky simulací zprostředkovaly atomární náhled na chování malých RNA molekul na grafenu a poskytly tak další důležité informace k měření, které bylo provedeno pomocí AFM v kapalně fázi. Experimentálně bylo zjištěno, že RNA na povrchu grafenu tvoří motivy. Ovšem pouze z experimentálního měření nebylo možné určit ve sledovaných strukturách konformaci RNA na grafenu. Právě díky možnosti provést simulace s rozbalenou i sbalenou RNA jsme mohli srovnáním experimentálních a teoretických výšek RNA jednoznačně určit, že se na povrchu grafenu bude RNA nacházet ve své rozbalené formě.

Fakt, že se malé RNA molekuly na grafenu rozbalují byl dále podpořen výpočtem změn entalpie. Změna entalpie v simulacích s oligonukleotidem ve vodném prostředí a bez přítomnosti grafenu byla ve shodě s dřívějším pozorováním, že RNA tvoří hairpiny samovolně. Naopak veškeré výpočty rozdílů entalpie systémů, které obsahovaly RNA molekulu umístěnou na grafenu ukazují, že se RNA na grafenu samovolně rozbaluje. Obdobný trend byl pozorován i v simulacích s RNA na 2 grafenech a na grafenu umístěném na SiO_2 .

Pomocí MD simulací bylo ukázáno, že krátké RNA molekuly se na grafenu rozbalují a ztrácí svoji funkcionalitu. Tím pádem, jelikož pro možnou senzorku biotoxinů je potřeba zachovat sekundární strukturu hairpinu RNA, tak je nutná další funkcionalizace, nebo modifikace systému. Avšak znalost konformačního chování RNA na mezifázi grafenu a vody může otevřít novou cestu pro využití grafenu.

Literatura

- [1] K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang¹, Y. Zhang, S. V. Dubonos, I. V. Grigorieva, A. A. Firsov, Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films, *Science*. 306(5696) (2004) 666-669.
- [2] The Nobel Prize, <https://www.nobelprize.org/prizes/physics/2010/summary/>, staženo 8. řjna 2018.
- [3] R. E. Peierls, Quelques propriétés typiques des corps solides, *Ann. I. H. Poincare*. 5 (1934) 177-222.
- [4] L. D. Landau, Zur Theorie der phasenumwandlungen, II. *Phys. Z. Sowjetunion*. 11 (1937) 26-35.
- [5] J. C. Meyer, A. K. Geim, M. I. Katsnelson, K. S. Novoselov, T. J. Booth, S. Roth, The structure of suspended graphene sheets, *Nature*. 446 (2007) 60-63.
- [6] M. J. Allen, V. C. Tung, R. B. Kaner, Honeycomb Carbon: A Review of Graphene, *Chem. Rev.* 110(1) (2010) 132-145.
- [7] C. Lee , X. Wei , J. W. Kysa, J. Hone, Measurement of the Elastic Properties and Intrinsic Strength of Monolayer Graphene, *Science*. 321(5887) (2008) 385-388.
- [8] M. D. Stoller, S. Park, Y. Zhu, J. An, R. S. Ruoff, Graphene-Based Ultracapacitors, *Nano Lett.* 8(10) (2008) 3498-3502.
- [9] Graphenea, Properties of Graphene. <https://www.graphenea.com/pages/graphene-properties>, staženo 8. řjna 2018.
- [10] K. S. Novoselov, A. K. Geim, The rise of graphene, *Nat. Mater.* 6 (2010) 183-191.
- [11] K.I. Bolotina, K.J. Sikes, Z. Jiang, M. Klima, G. Fudenberg, J. Hone, P. Kim, H.L. Stormer, Ultrahigh electron mobility in suspended graphene, *Solid State Commun.* 146(9) (2008) 351-355.
- [12] J. Chen, C. Jang, S. Xiao, M. Ishigami, M. S. Fuhrer, Intrinsic and extrinsic performance limits of graphene devices on SiO₂ *Nat. Nanotechnol.* 3 (2008) 206-209.

- [13] V. Singh, D. Joung, L. Zhai, S. Das, S. I. Khondaker, S. Seal, Graphene based materials: Past, present and future, *Prog. Mater. Sci.* 56(8) (2011) 1178-1271.
- [14] A. A. Balandin, S. Ghosh, W. Bao, I. Calizo, D. Teweldebrhan, F. Miao, C. N. Lau, Superior Thermal Conductivity of Single-Layer Graphene, *Nano Lett.* 8(3) (2008) 902-907.
- [15] R. R. Nair, P. Blake, A. N. Grigorenko, K. S. Novoselov, T. J. Booth, T. Stauber, N. M. R. Peres, A. K. Geim, Fine Structure Constant Defines Visual Transparency of Graphene, *Science.* 320(5881) (2008) 1308.
- [16] B. Partoens, F. M. Peeters, From graphene to graphite: Electronic structure around the *K* point, *Phys. Rev. B.* 74 (2006) 075404.
- [17] A. B. Bourlinos, V. Georgakilas, R. Zboril, T. A. Steriotis, A. K. Stubos, Liquid-Phase Exfoliation of Graphite Towards Solubilized Graphenes, *Small.* 5(16) (2009) 1841-1845.
- [18] Y. Hernandez, V. Nicolosi, M. Lotya, F. M. Blighe, Z. Sun, S. De, I. T. McGovern, B. Holland, M. Byrne, Y. K. Gun'Ko, J. J. Boland, P. Niraj, G. Duesberg, S. Krishnamurthy, R. Goodhue, J. Hutchison, V. Scardaci, A. C. Ferrari, J. N. Coleman, High-yield production of graphene by liquid-phase exfoliation of graphite, *Nat. Nanotechnol.* 3 (2008) 563-568.
- [19] K. S. Novoselov, V. I. Fal'ko, L. Colombo, P. R. Gellert, M. G. Schwab, K. Kim, A roadmap graphene, *Nature.* 490 (2012) 192-200.
- [20] S. Stankovich, D. A. Dikin, R. D. Piner, K. A. Kohlhaas, A. Kleinhammes, Y. Jia, Y. Wu, S. T. Nguyen, R. S. Ruoff, Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide, *Carbon.* 45(7) (2007) 1558-1565.
- [21] H. C. Schniepp, J. Li, M. J. McAllister, H. Sai, M. Herrera-Alonso,† D. H. Adamson, R. K. Prud'homme, R. Car, D. A. Saville, I. A. Aksay, Functionalized Single Graphene Sheets Derived from Splitting Graphite Oxide, *J. Phys. Chem. B.* 110(17) 2006 8535-8539.
- [22] C. Berger, Z. Song, X. Li, X. Wu, N. Brown, C. Naud, D. Mayau, T. Li, J. Hass, A. N. Marchenkov, E. H. Conrad, P. N. First, W. A de Heer, Electronic Confinement and Coherence in Patterned Epitaxial Graphene, *Science.* 312(5777) (2006) 1191-1196.
- [23] J. Plutnar, M. Pumera, Z. Sofer, The chemistry of CVD graphene, *J. Mater. Chem. C.* 6(23) (2018) 6082-6101.
- [24] X. Yang, X. Dou, A. Rouhanipour, L. Zhi, H. Joachim Räder, K. Müllen, Two-Dimensional Graphene Nanoribbons, *J. Am. Chem. Soc.* 130(13) (2008) 4216-4217.

- [25] Q. Yang, Y. Su, C. Chi, C. T. Cherian, K. Huang, V. G. Kravets, F. C. Wang, J. C. Zhang, A. Pratt, A. N. Grigorenko, F. Guinea, A. K. Geim, R. R. Nair, Ultrathin graphene-based membrane with precise molecular sieving and ultrafast solvent permeation, *Nat. Mater.* 16 (2017) 1198-1202.
- [26] X. Huang, Z. Yin, S. Wu, X. Qi, Q. He, Q. Zhang, Q. Yan, F. Boey, H. Zhang, Graphene-Based Materials: Synthesis, Characterization, Properties, and Applications, *Small.* 14(7) (2011) 1876-1902.
- [27] F. Bonaccorso, Z. Sun, T. Hasan, A. C. Ferrari, Graphene photonics and optoelectronics, *Nat. Photonics.* 4 (2010) 611-622.
- [28] V. Soriano, M. Midrio, G. Contestabile, I. Asselberghs, J. Van Campenhout, C. Huyghebaert, I. Goykhman, A. K. Ott, A. C. Ferrari, M. Romagnoli Graphene–silicon phase modulators with gigahertz bandwidth, *Nat. Photonics.* 12 (2018) 40-44.
- [29] D. Khokhriakov, A. W. Cummings, K. Song, M. Vila, B. Karpiak, A. Dankert, S. Roche, S. P. Dash, Tailoring emergent spin phenomena in Dirac material heterostructures, *Sci. Adv.* 4(9) 2018 eaat9349.
- [30] Phone of the Future, <https://graphene-flagship.eu/news/Pages/Future-Phone.aspx>, staženo 27. 11. 2018.
- [31] P. Suvarnapaet, S. Pechprasarn, Graphene-Based Materials for Biosensors: A Review, *Sensors.* 17(10) (2017) 2161.
- [32] R. J. Young, I. A. Kinloch, L. Gong, K. S. Novoselov, The mechanics of graphene nanocomposites: a review. *Compos. Sci. Technol.* 72(12) (2012) 1459-1476.
- [33] Y. Gao, Z. Yan, J. L. Gray, X. He, D. Wang, T. Chen, Q. Huang, Y. C. Li, H. Wang, S. H. Kim, T. E. Mallouk, D. Wang, Polymer–inorganic solid–electrolyte interphase for stable lithium metal batteries under lean electrolyte conditions, *Nat. Mater.* 18 (2019) 384-389.
- [34] S. B. Yang, X. L. Feng, S. Ivanovici, K. Mullen, Fabrication of graphene-encapsulated oxide nanoparticles: towards high-performance anodematerials for lithium storage. *Angew. Chem. Int. Ed.* 49(45) (2010) 8408-8411.
- [35] S. Ghosh, G. Sahoo, S. R. Polaki, N. G. Krishna, M. Kamruddin, T. Mathews, Enhanced supercapacitance of activated vertical graphene nanosheets in hybrid electrolyte, *J. Appl. Phys.*, 122 (2017) 214902.
- [36] A. Bakandritsos, D. D. Chronopoulos, P. Jakubec, M. Pykal, K. Čépe, T. Steriotis, S. Kalytchuk, M. Petr, R. Zbořil, M. Otyepka, High-Performance Supercapacitors

Based on a Zwitterionic Network of Covalently Functionalized Graphene with Iron Tetraaminophthalocyanine, *Adv. Funct. Mater.* 28(29) 2018 1801111.

- [37] J. Tuček, K. Holá, A. B. Bourlinos, P. Błóński, A. Bakandritsos, J. Ugolotti, M. Dubecký, F. Karlický, V. Ranc, K. Čépe, M. Otyepka, R. Zbořil, Room temperature organic magnets derived from sp^3 functionalized graphene, *Nat. Commun.* 8 (2017) 14525.
- [38] B. de la Torre, M. Švec, P. Hapala, J. Redondo, O. Krejčí, R Lo, D. Manna, A. Sarmah, D. Nachtigallová, J. Tuček, P. Błóński, M. Otyepka, R. Zbořil, P. Hobza, P. Jelínek, Non-covalent control of spin-state in metal-organic complex by positioning on N-doped graphene, *Nat. Commun.* 9 (2018) 2831.
- [39] X. Yang, Y. Wang, X. Huang, Y. Ma, Y. Huang, R. Yang, H. Duana, Y. Chen, Multi-functionalized graphene oxide based anticancer drug-carrier with dual-targeting function and pH-sensitivity, *J. Mater. Chem.* 21(10) (2011) 3448-3454.
- [40] A. N. Banerjee, Graphene and its derivatives as biomedical materials: future prospects and challenges, *Interface Focus.* 8(3) (2018) 20170056.
- [41] a) Phys.org, Zero gravity: Graphene for space applications. <https://phys.org/news/2017-07-gravity-graphene-space-applications.html>, staženo 20. března 2019. b) Phys.org, Waterproof graphene electronic circuits. <https://phys.org/news/2019-01-waterproof-graphene-electronic-circuits.html>, staženo 20. března 2019. c) Digital Trends, The key to smaller cameras that don't suck could lie in this incredible material. <https://www.digitaltrends.com/photography/graphene-cmos-sensor/>, staženo 20. března 2019. d) IEEE Spectrum, New Graphene Sensor is Less Noisy, More Sensitive. <https://spectrum.ieee.org/nanoclast/semiconductors/devices/electronic-noise-in-graphenebased-sensors-reduced-and-sensitivity-increased>, staženo 20. března 2019. e) Graphene Flagship, Graphene Interface Engineering for Large Area, High Efficiency Solar Cells. <https://graphene-flagship.eu/large-area-pscs>, staženo 20. března 2019. f) Regionálním centrem pokročilých technologií a materiálů, RCPTM Newsletter 3/2018, Olomouc, <https://www.rcptm.com/newsletter/03-2018-CZ.pdf>, staženo 20. března 2019.
- [42] K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaug, J. Sands, D. E. Gottschling, T. R. Cech, Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of tetrahymena, *Cell.* 31(1) (1982) 147-157.
- [43] D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level*, Wiley, Hoboken, 2012.
- [44] P. C. Bevilacqua, J. M. Blöse, Structures, Kinetics, Thermodynamics, and Biological Functions of RNA Hairpins, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 59 (2008) 79-103.

- [45] C. R. Woese, S. Winker, R. R. Gutell, Architecture of ribosomal RNA: constraints on the sequence of "tetra-loops", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87(21) (1990) 8467-8471.
- [46] C. Tuerk, P. Gauss, C. Thermes, D. R. Groebe, M. Gayles, N. Guild, G. Stormo, Y. d'Aubenton-Carafa, O. C. Uhlenbeck, I. Tinoco, CUUCGG hairpins: extraordinarily stable RNA secondary structures associated with various biochemical processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85(5) (1988) 1364-1368
- [47] R. D. Klausner, T. A. Rouault, J. B. Harford, Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism, *Cell* 72(1) (1993) 19-28.
- [48] S. R. Holbrook, RNA structure: the long and the short of it, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15(3) (2005) 302-308.
- [49] G. Varani, Exceptionally stable nucleic acid hairpins, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 24 (1995) 379-404.
- [50] D. J. Proctor, J. E. Schaak, J. M. Bevilacqua, C. J. Falzone, P. C. Bevilacqua, Isolation and Characterization of a Family of Stable RNA Tetraloops with the Motif YNMG That Participate in Tertiary Interactions, *Biochemistry.* 41(40) (2002) 12062-12075.
- [51] C. R. Woese, S. Winkers, R. R. Gutell, Architecture of ribosomal RNA: Constraints on the sequence of "tetra-loops", *Biochemistry.* 87(21) (1990) 8467-8471.
- [52] O. C. Uhlenbeck, Tetraloops and RNA folding, *Nature.* 346 (1990) 613-614.
- [53] Y. Li, G. Zon, W. D. Wilson, NMR and molecular modeling evidence for a G.A mismatch base pair in a purine-rich DNA duplex, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88(1) (1991) 26-30.
- [54] V. P. Antao, S. Y. Lai, I. Tinoco, A thermodynamic study of unusually stable RNA and DNA hairpins, *Nucleic Acids Res.* 19(21) (1991) 5901-5905.
- [55] L. Jaeger L, F. Michel, E. Westhof, Involvement of a GNRA tetraloop in long-range RNA tertiary interactions, *J. Mol. Bio.* 236(5) (1994) 1271-1276.
- [56] J. H. Cate, A. R. Gooding, E. Podell, K. Zhou, B. L. Golden, C. E. Kundrot, T. R. Cech, J. A. Doudna, Crystal Structure of a Group I Ribozyme Domain: Principles of RNA Packing, *Science.* 273(5282) (1996) 1678-1685.
- [57] C. C. Correll, K. Swinger, Common and distinctive features of GNRA tetraloops based on a GUAA tetraloop structure at 1.4 Å resolution, *RNA.* 9(3) (2003) 355-363.
- [58] J. D. Ye, V. Tereshko, S. S. Sidhu, S. Koide, A. A. Kossiakoff, J. A. Piccirilli, Synthetic antibodies for specific recognition and crystallization of structured RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(1) (2008) 82-87.

- [59] N. Varghese, U. Mogera, A. Govindaraj, A. Das, P. K. Maiti, A. K. Sood, C. N. R. Rao, Binding of DNA Nucleobases and Nucleosides with Graphene, *ChemPhysChem*. 10(1) (2009) 206-210.
- [60] V. Spiwok, P. Hobza, J. Rezáč, Free-Energy Simulations of Hydrogen Bonding versus Stacking of Nucleobases on a Graphene Surface, *J. Phys. Chem. C*. 115(40) (2011) 19455-19462.
- [61] S. Husale, S. Sahoo, A. Radenovic, F. Traversi, P. Annibale, A. Kis, ssDNA Binding Reveals the Atomic Structure of Graphene, *Langmuir*. 26(23) (2010) 18078-18082.
- [62] X. Zhao, Self-Assembly of DNA Segments on Graphene and Carbon Nanotube Arrays in Aqueous Solution: A Molecular Simulation Study, *J. Phys. Chem. C*. 115(14) (2011) 6181-6189.
- [63] S. Zeng, L. Chen, Y. Wang, J. Chen, Exploration on the mechanism of DNA adsorption on graphene and graphene oxide via molecular simulations, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 48(27) (2015) 275402-275409
- [64] S. Akca, A. Foroughi, D. Frochtzwajg, H. W. Ch. Postma, Competing Interactions in DNA Assembly on Graphene, *PLoS ONE*. 6(4) (2011) e18442.
- [65] K. K. Chaudhary, N. Mishra, A Review on Molecular Docking: Novel Tool for Drug Discovery, *JSM Chem*. 4(3) 2016 1029.
- [66] A. Leach, *Molecular Modelling: Principles and Applications* (2nd Edition), Pearson, Harlow 2001.
- [67] F. Jensen, *Introduction to Computational Chemistry*, Wiley, Chichester 2007.
- [68] P. E. M. Lopes, B. Roux, A. D. MacKerell Jr., Molecular modeling and dynamics studies with explicit inclusion of electronic polarizability. Theory and applications, *Theor. Chem. Acc*. 124(1-2) (2009) 11-28
- [69] M. Pykal, P. Jurečka, F. Karlický, M. Otyepka, Modelling of graphene functionalization, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18(9) (2016) 6351-6372.
- [70] P. Atkins, J. de Paula, *Physical chemistry* 9. edition, Oxford University Press, Oxford 2010.
- [71] A. Pérez-Villa, M. Darvas, G. Bussi, ATP dependent NS3 helicase interaction with RNA: insights from molecular simulations, *Nucleic Acids Res.* 18(43) (2015) 8725-8734.

- [72] S. Mohan, C. Hsiao, J. C. Bowman, R. Wartell, L. D. Williams, RNA Tetraloop Folding Reveals Tension between Backbone Restraints and Molecular Interactions, *J. Am. Chem. Soc.* 132(26) (2010) 12679-12689.
- [73] S. Izadi, R. Anandakrishnan, A. V. Onufriev, Anandakrishnan R, Onufriev, Building Water Models: A Different Approach, *J. Phys. Chem. Lett.* 5(21) (2014) 3863-3871.
- [74] P. Kührová, R. B. Best, S. Bottaro, G. Bussi, J. Špone, M. Otyepka, P. Banáš, Computer Folding of RNA Tetraloops: Identification of Key Force Field Deficiencies, *J. Chem. Theory Comput.* 12(9) (2016) 4534-4548.
- [75] D. V. D. Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, H. J. C. Berendsen, GROMACS: Fast, flexible, and free, *J. Comput. Chem.* 26(16) (2005) 1701-1718.
- [76] G. A. Tribello, M. Bonomi, D. Branduardi, C. Camilloni, G. Bussi, PLUMED 2: New feathers for an old bird, *Comput. Phys. Commun.* 185(2) (2014) 604-613.
- [77] M. Zgarbová, M. Otyepka, J. Šponer, A. Mládek, P. Banáš, T. E. Cheatham, P. Jurečka, Refinement of the Cornell et al. Nucleic Acids Force Field Based on Reference Quantum Chemical Calculations of Glycosidic Torsion Profiles, *J. Chem. Theory Comput.* 7(9) (2011) 2886-902.
- [78] T. Steinbrecher, J. Latzer, D. A. Case, Revised AMBER Parameters for Bioorganic Phosphates *J. Chem. Theory Comput.* 8(11) (2012) 4405-4412.
- [79] A. Cheng, W. A. Steele, Computer simulation of ammonia on graphite. I. Low temperature structure of monolayer and bilayer films, *J. Chem. Phys.* 92 (1990) 3858-3866.
- [80] H. J. C. Berendsen, J. R. Grigera, T. P. Straatsma, The Missing Term in Effective Pair Potentials. *J. Phys. Chem.* 91(24) (1987) 6269-6271
- [81] C. C. Correll, J. Beneken, M. J. Plantinga, M. Lubbers, Y. Chan, The common and the distinctive features of the bulged-G motif based on a 1.04 Å resolution RNA structure, *Nucleic Acids Res.* 31(23) (2003) 6806-6818.
- [82] P. Kührová, P. Banáš, R. B. Best, J. Šponer, M. Otyepka, Computer Folding of RNA Tetraloops? Are We There Yet?, *J. Chem. Theory Comput.* 9(4) (2013) 2115-2125.
- [83] J. P. Sheeny, A. R. Davis, B. M. Znoskot, Thermodynamic characterization of naturally occurring RNA tetraloops, *RNA.* 16(2) (2010) 417-429.

Přílohy

Příloha 1: Kopie studie Q. Li, J. P. Froning, M. Pykal, S. Zhang, Z. Wang, M. Vondrák, P. Banáš, K. Čépe, P. Jurečka, J. Šponer, R. Zbořil, M. Dong, M. Otyepka, RNA nanopatterning on graphene, *2D materials*. 5(3) (2018) 031006

2D Materials

OPEN ACCESS**LETTER**

RNA nanopatterning on graphene

RECEIVED
14 November 2017**REVISED**
29 March 2018**ACCEPTED FOR PUBLICATION**
13 April 2018**PUBLISHED**
27 April 2018

Original content from this work may be used under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 licence](#).

Any further distribution of this work must maintain attribution to the author(s) and the title of the work, journal citation and DOI.



Q Li^{1,2,4}, J P Froning^{3,4}, M Pykal^{3,4}, S Zhang², Z Wang², M Vondrák³, P Banáš³, K Čépe³, P Jurečka³, J Šponer³, R Zbořil³, M Dong^{3,5} and M Otyepka^{3,5}

¹ Key Laboratory Colloid and Interface Chemistry of Ministry of Education, School of Chemistry and Chemical Engineering, Shandong University, Jinan 250100, People's Republic of China

² Interdisciplinary Nanoscience Center (iNANO), Aarhus University, Aarhus C, DK-8000, Denmark

³ Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Palacký University Olomouc, Olomouc 77146, Czechia

⁴ These authors contributed equally to this work and should be considered as first authors.

⁵ Authors to whom any correspondence should be addressed.

E-mail: dong@inano.au.dk and michal.otyepka@upol.cz

Keywords: graphene, RNA, nanopatterning, liquid AFM, molecular dynamics

Supplementary material for this article is available [online](#)

Abstract

Graphene-based materials enable the sensing of diverse biomolecules using experimental approaches based on electrochemistry, spectroscopy, or other methods. Although basic sensing was achieved, it had until now not been possible to understand and control biomolecules' structural and morphological organization on graphene surfaces (i.e. their stacking, folding/unfolding, self-assembly, and nano-patterning). Here we present the insight into structural and morphological organization of biomolecules on graphene in water, using an RNA hairpin as a model system. We show that the key parameters governing the RNA's behavior on the graphene surface are the number of graphene layers, RNA concentration, and temperature. At high concentrations, the RNA forms a film on the graphene surface with entrapped nanobubbles. The density and the size of the bubbles depend on the number of graphene layers. At lower concentrations, unfolded RNA stacks on the graphene and forms molecular clusters on the surface. Such a control over the conformational behavior of interacting biomolecules at graphene/water interfaces would facilitate new applications of graphene derivatives in biotechnology and biomedicine.

1. Introduction

Graphene is an amazing 2D material with extraordinary properties such as high sensitivity and low electrical noise, which both have been successfully exploited in sensing and biosensing applications [1–7]. Applications based on the interactions of graphene with biomolecules are especially interesting and potentially useful in drug delivery, detection, DNA sequencing and analysis [6, 8–11], cell-bionic systems, neural signal imaging, and neural prostheses, among other things [12–14]. However, the development of such applications requires a deeper understanding of the interactions of graphene with biomolecules and their building blocks. This will enable the rational design of advanced techniques for, e.g. constructing more effective and sensitive (bio)sensors or optimized connections between graphene and living cells. It is

relevant for biotechnological or medical applications that the analysis of any biomacromolecule's conformational behavior (e.g. proteins and nucleic acids) and their interactions with graphene are based on studies conducted under physiological or near-physiological conditions. At least, such systems must be studied in water at ambient temperature. This requirement regarding the conditions significantly restricts the range of experimental techniques, which can be used to characterize the interaction behavior. Among the available experimental techniques, liquid mode atomic force microscopy (AFM) stands out because of its ability to provide direct nanoscopic insight [15, 16]. The topological information acquired from liquid mode AFM can be further interpreted with the aid of *in silico* molecular dynamics (MD) simulations. Methods for the atomistic MD simulation of biomacromolecules have become

sufficiently mature to provide very useful structural information about the conformational behavior of biomacromolecules [17–19].

Calorimetric experiments show that nucleobases adsorb on graphene and graphite in water environment, with binding affinities decreasing from guanine to thymine ($G > A > C \sim T$) [20, 21]. Theoretical calculations indicate that the main source of stabilization comes from dispersion interaction (π - π stacking) [22, 23]. It is worth noting that MD simulations suggest that graphene-base interaction is stronger than base-base stacking [24], which implies that nucleic acids may undergo conformational changes upon binding to graphene surface. AFM experiments with single stranded DNA containing thousands of nucleotides show that the DNA molecules adsorb to the graphene surface [25, 26]. However, these experiments were carried out using dried samples and cannot fully reflect behavior of DNA in its native water environment, where solvation/desolvation processes play important role due to the polyanionic nature of DNA. Theoretical calculations explicitly including water environment suggest that DNA can adsorb on the carbonaceous surface [27–30]. AFM experiments with dry single stranded DNA samples confirm that intramolecular stacking in the single strand competes with the π - π stacking to graphene [31]. On the other hand, double stranded DNA does not unfold on graphene [26], however, MD simulations suggest that DNA duplexes may stack on graphene by stem-ending base pairs [32]. It is worth noting that also inorganic polyanionic phosphonic acids form highly oriented domains on graphitic surfaces that are parallel aligned with the surface [33]. Interaction of RNA with graphene surface is unexplored with respect to DNA, despite the fact that short RNAs are gaining more and more attention due to their important biological role in gene expression regulation [34]. In addition, despite all the progress in this field any direct experiment addressing conformational behavior of nucleic acids on graphene in native water environment has not been presented yet.

We analyzed the behavior of 10-nucleotides-long RNA oligonucleotides on graphene surfaces in water. We chose this oligonucleotide because of its structural features: it is an autonomous RNA hairpin that folds in a context-independent manner, has a hydrophobic patch at the bottom of the A-RNA duplex, and contains a GNRA tetraloop tip (figure 1) that serves as a recognition spot in RNA–RNA and RNA–protein interactions [35, 36]. Moreover, hairpins including the GNRA tetraloop sequence exhibit high thermal stability [37, 38].

Our liquid AFM experiments revealed that the behavior of this RNA on graphene is complex and dependent on the RNA concentration, the temperature, and the number of graphene layers. In water, graphene caused the oligonucleotide to unfold; MD simulations indicated that the RNA nucleobases preferentially stacked with the graphene surface. That is,

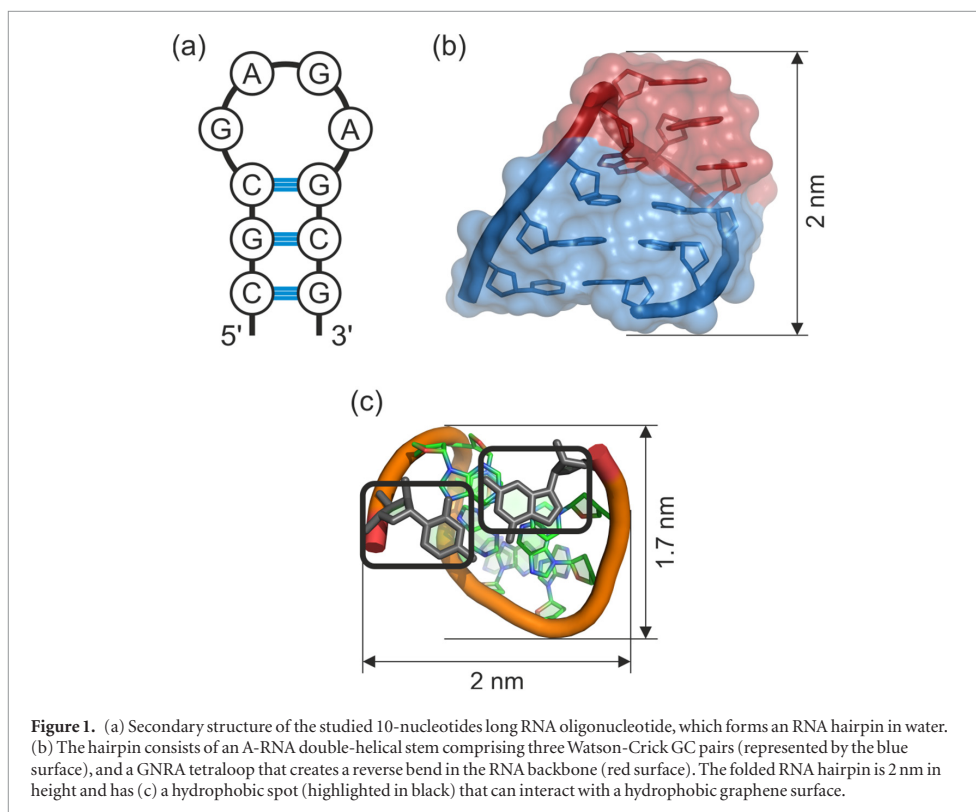
stacking interactions between the graphene surface and nucleobases appeared to outcompete internal interactions within the folded RNA. At higher concentrations, the RNA formed a homogenous uniform film on the graphene surface, entrapping nanobubbles in a self-assembled pattern. The pattern's properties depended on the number of graphene layers. As the number of layers increased, the nanobubbles became larger and more sparsely distributed. These observations clearly demonstrate that a prototypical RNA molecule exhibits complex behavior on graphene surfaces. Such behavior could influence signal harvesting from graphene-based biosensors because the observed unfolding might complicate processes such as the construction of graphene-RNA aptamer-based sensors. Besides the number of graphene layers, additional experiments identified several variables—the biomolecule concentration, temperature, and surface hydrophobicity—through which the behavior of biomolecules on graphene could be manipulated. Systems designed for applications in fields such as drug delivery, gene therapy, or ultrasound imaging would benefit from this degree of control.

2. Methods

2.1. Experimental details

Graphene flakes were prepared by mechanical exfoliation of natural graphite (Alfa Aesar, USA) and deposited on top of a Si substrate with a 300 nm thick SiO₂ layer under normal ambient conditions. The flakes were located by optical microscopy and their identity was confirmed by Raman spectroscopy. The RNA oligo 5'-CGC(GAGA)GCG-3' (DNA Technology, Denmark) was dissolved in DNA/RNA base-free water (Life Technologies, Denmark) to a concentration of 100 pmol μl^{-1} and stored at -20°C as 10 μl aliquots. In a typical measurement, 5 μl of RNA solution (100 pmol μl^{-1}) was deposited directly onto the graphene surface on the SiO₂ substrate without further treatment.

All AFM images were recorded using a commercial MultiMode VIII AFM instrument (Bruker, Santa Barbara, USA) operated in tapping mode unless stated otherwise. For AFM imaging in aqueous suspension, 5 μl of RNA solution (100 pmol μl^{-1}) was deposited directly onto the graphene surface on the SiO₂ substrate and incubated for 5 min at room temperature. Then, 40 μl DNA/RNA base-free water was deposited on the surface and liquid AFM was performed using silicon nitride cantilevers (OMCL-TR400PSA-1; Olympus). Immediately before ambient AFM imaging, the sample was dried with nitrogen. AFM imaging in air was performed using ultrasharp silicon cantilevers (OMCL-AC160TS-R3; Olympus) with a nominal spring constant of 26 N m^{-1} . For thermal control, the AFM scanner was equipped with a heating element that served as a suitable platform for the thermal response experiments. The resistive heating stage



provides a temperature range from room temperature (RT) to 100 °C with a resolution of 0.1 °C. All the AFM images and size distributions were analyzed using the commercial Scanning Probe Image Processor software package (SPIP, Image Metrology, Denmark).

For electron microscopy, the samples were dispersed in water, sonicated for 5 min and one drop put on copper grid with Holey carbon film. After drying in the air at room temperature were samples measured by high-resolution (HR) transmission electron microscope (TEM) Titan G2 (FEI) with Image corrector on accelerating voltage 80 kV. Images were taken with BM UltraScan CCD camera (Gatan). Energy dispersive spectrometry (EDS) was performed in scanning TEM (STEM) mode by Super-X system with four silicon drift detectors (Bruker). STEM images were taken with HAADF detector 3000 (Fishione).

2.2. Computational details

MD simulations were performed using the Gromacs 4.5.5 package [39] with the Plumed 2.1.1 extension [40]. The initial structure of the folded RNA hairpin tetraloop (TL) was derived from the x-ray structure of the sarcin/ricin loop with PDB ID 1Q9A [41], and was terminated by two and three GC pairs, respectively, to increase the fragment's stability, yielding the sequence 5'-GC(GAGA)GC-3' and 5'-CGC(GAGA)GCG-3'. The structure of the unfolded state was taken from a high temperature MD simulation [42]. Graphene was

treated as a periodic sheet (resulting in box dimensions of ca. 8.5×8.5 nm) consisting of uncharged Lennard-Jones (LJ) spheres with Cheng and Steele interaction parameters [43]. RNA was modeled using the ff99bsc0 χ_{OL3} force field [44] with revised van der Waals (vdW) parameters for phosphate oxygens [45] and an additional potential (HBfix) to improve the description of native hydrogen bonding [46]. Both corrections are crucial for a correct description of RNA and have been shown to provide the correct balance of folded/unfolded states in TL folding [46]. All systems were solvated using the OPC water model [47] and neutralized with Na⁺ ions [48]. Periodic boundary conditions were applied in the *xyz* dimensions. The particle mesh Ewald (PME) method (with a real space cutoff of 1 nm) was used to model long-range interactions. VdW interactions were truncated at 1 nm. The LINCS algorithm [49] was used to constrain bonds to hydrogen atoms. All MD simulations were performed in the NpT ensemble, using the velocity rescale thermostat [50] and the anisotropic Berendsen barostat for pressure regulation. We considered both folded and unfolded states of the RNA sequence to calculate enthalpy differences corresponding to the folding/unfolding process in water and on graphene (see figure S10 (stacks.iop.org/TDM/5/031006/mmedia) for an overview of the simulation setup). The initial structures used for enthalpy calculations were minimized and thermalized at 300 K and 1 bar with a

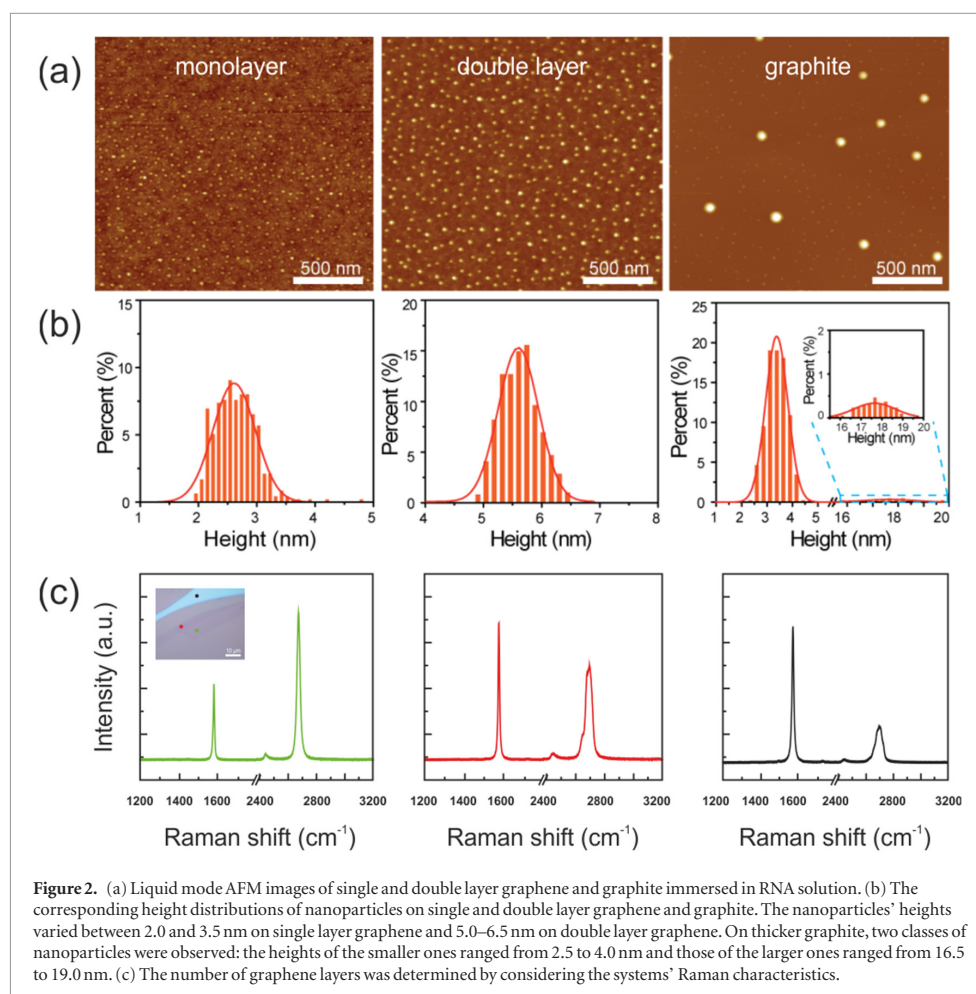


Figure 2. (a) Liquid mode AFM images of single and double layer graphene and graphite immersed in RNA solution. (b) The corresponding height distributions of nanoparticles on single and double layer graphene and graphite. The nanoparticles' heights varied between 2.0 and 3.5 nm on single layer graphene and 5.0–6.5 nm on double layer graphene. On thicker graphite, two classes of nanoparticles were observed: the heights of the smaller ones ranged from 2.5 to 4.0 nm and those of the larger ones ranged from 16.5 to 19.0 nm. (c) The number of graphene layers was determined by considering the systems' Raman characteristics.

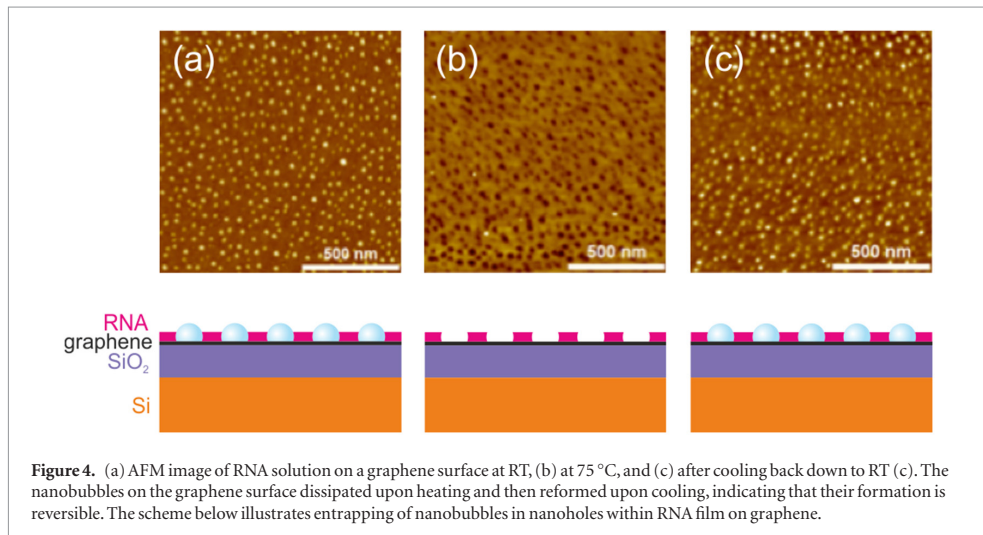
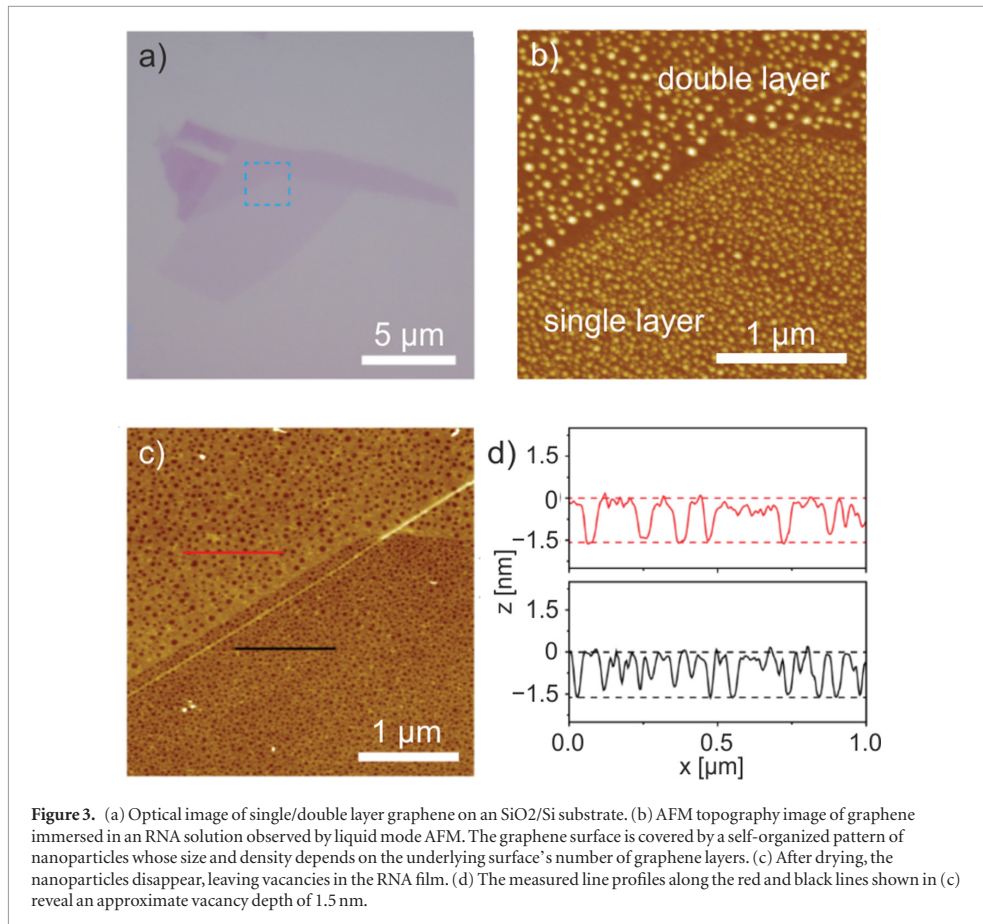
time step of 2 fs, followed by a 400 ns production run, of which the first 100 ns were treated as an equilibration stage and thus excluded from the final analysis. Average enthalpies were obtained using Gromacs' *g_energy* tool. Energy differences were recorded between independent simulations corresponding to different RNA conformations (folded and unfolded) with and without the presence of graphene. A necessary precondition for comparing the results of any two simulations was that they involve the same numbers of atoms of each type. This approach was successfully used by Pérez-Villa *et al* to study RNA/protein complexes [51]. To model RNA association, 9 unfolded 10-mer RNA molecules were placed in the vicinity of a graphene surface (their total net charge was neutralized by adding sodium counter ions) and simulated for 100 ns under the conditions described above.

3. Results

3.1. Self-organized pattern of RNA on the graphene

At the higher concentration of 100 pmol μl^{-1} , the studied RNA oligonucleotide formed a self-organized

pattern of nano-objects on the graphene surface (figure 2). Liquid mode AFM was employed for the topographical measurement and the visualization of the mechanically exfoliated single and double layer graphene and graphite while being immersed in the RNA solution. Further, AFM aided in the identification of the different patterns formed by nano-objects on the graphene/graphite surface (supporting figure S1). The self-organized pattern was rather homogeneously distributed over the graphene surface independent of the layer underneath. The number of layers, however, influenced both size and density of the nanoparticles (figure 2(a)). The height histograms of the particles' dimensions were evaluated for all three substrates, single and double layer graphene and graphite. The average particle height on single layer graphene was 2.6 ± 0.4 nm, while the nanoparticles on graphene bilayers were twice as large on average, 5.6 ± 0.3 nm (figure 2(b)). On graphite, two sizes of objects were observed with average heights of 3.3 ± 0.5 and 17.6 ± 1.1 nm arranged in a sparse network (figure 2(b) and supporting figure S2). Besides the dimension, the densities of the observed particles



were estimated from the same AFM pictures. As the number of graphene layers increased, the density of nanoparticles on the carbon flakes fell from 187 particles per μm^2 (ppsmi) for single layer graphene to 142 ppsmi for double layer graphene and ended with 104 ppsmi for the smaller particles on graphite. The

largest nanoparticles had a density of only 4 ppsmi. In an intermediate conclusion, the nanoparticles' height and average distance to their nearest neighbor seemed both to increase along with the number of graphene layers. The size and density variation of the nano-objects could not have been caused by experimental

conditions since the AFM pictures were taken at the same conditions at separate experiments and it was even observed in a single measurement on different layers (figure 3).

3.2. Nanobubbles entrapped by RNA film on top of graphene

In order to decipher the nature of the observed nano-objects we carried out additional experiments; liquid mode AFM experiments at elevated temperature, AFM experiments under ambient conditions and high-angle annular dark field (HAADF) of scanning transmission electron microscopy (STEM) followed by the elemental mapping by the corresponding energy dispersive x-ray spectroscopy (EDS) on dried samples. In the performed liquid AFM experiments at an elevated temperature, the nanoparticles disappeared upon heating to 75 °C (figure 4) and then reformed upon cooling back to room temperature (RT), indicating a reversible process of formation/disintegration of nano-objects. The well depth of the vacancies observed at 75 °C was 1.5 nm (supporting figure S3). This suggested that the observed nano-objects are not composed of biomolecules, but rather of gas residing at the interface. The higher temperature would cause the disintegration of these bubbles that could originally prevent access of the probe to the graphene surface in the liquid mode AFM. It is worth noting that the self-assembled pattern remained intact at the elevated temperature (figure 4), indicating that the graphene surface was covered with a rather well-packed network of RNA molecules.

Prior to the ambient AFM and STEM measurements, the RNA-graphene samples were dried with a dry nitrogen stream. During the drying process, the nanoparticles disappeared, leaving vacancies at the positions they had occupied, similarly to elevated temperature experiment, and thereby seeming to produce a negative of the previous pattern (figures 3(b) and (c)). The pattern was not a true negative since the remaining holes were 1.5 ± 0.2 nm deep matching the results from the AFM at an elevated temperature regardless of the number of graphene layers (figure 3(d) and supporting figure S4). This led us to the conclusion that the nanoparticles were nanobubbles made up from trapped gas adsorbed at the solid/liquid interface of water and graphene. During the drying process, this interface would disappear and nanobubbles would disintegrate. Similar nanobubbles had been observed in other AFM experiments [52], and their stability was attributed to the encapsulation of a Knudsen gas [53]. With the nanobubbles on one hand and a hole depth of 1.5 nm on the other, we further deduced that the observed pattern was incorporated in a layer of RNA molecules. This would mean, that the RNA molecules cover the entire accessible graphene/graphite surface forming a film on top of the surface. With the exception, where the formation of nanobubbles acts as a mask preventing parts of the graphene to

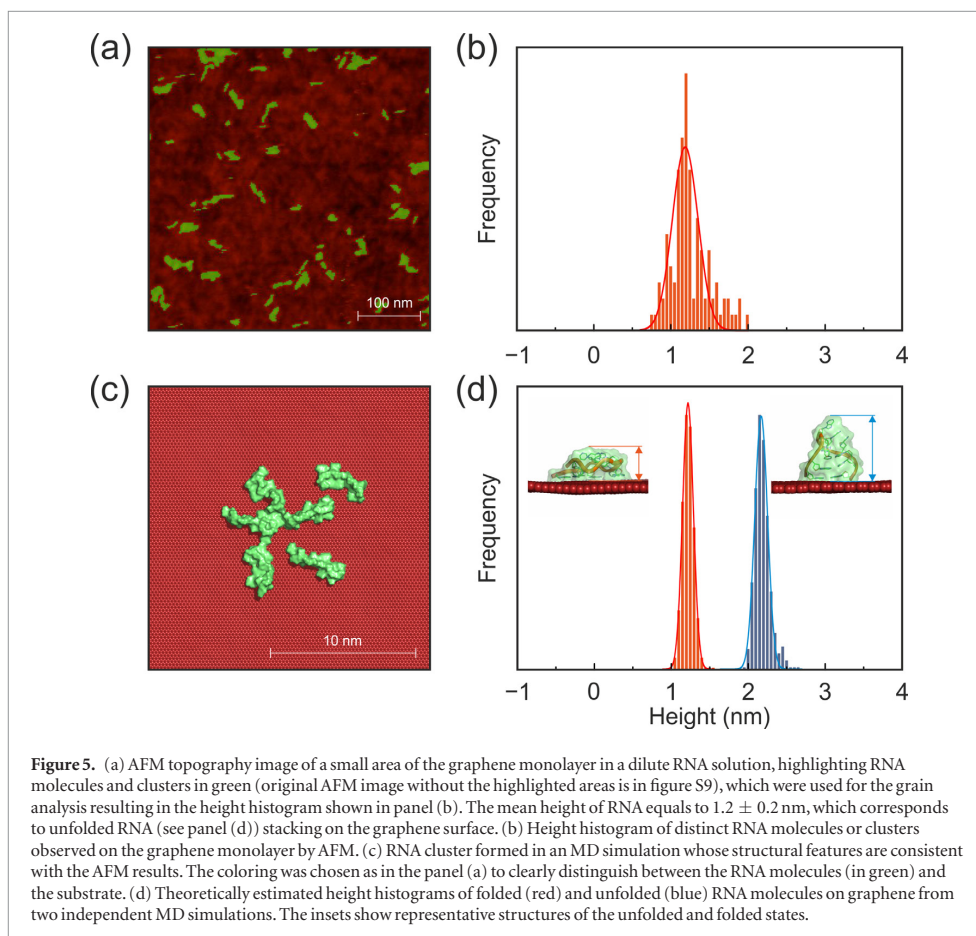
be covered. Therefore, the holes would already exist in the liquid phase, but not be visible in the AFM pictures because the probe would not penetrate the bubble surface due to a low loading force. And thus, the holes would be first visible in normal ambient conditions after the disintegration of the nanobubbles due to the drying. Such holes had been observed in previous experiments with dry samples of single stranded DNA on graphene [26], however, the mechanism of their appearance was unclear.

Since the SiO₂ substrate was not covered by the RNA film in any of our experiment, the thickness of the RNA/graphene flake could be measured. The obtained value 2.0 ± 0.2 nm agrees fairly well with a sum of RNA layer (1.2 ± 0.2 nm, see below) and single graphene layer (0.3 ± 0.2 nm), considering, moreover, the eventual graphene and SiO₂ roughness. It should be noted that the observed thickness of the RNA layer on graphene in water and in air did not differ significantly.

Additionally, the observed nano-objects were characterized by HAADF in STEM mode of HR-TEM and by the elemental mapping by EDS analysis (supporting figure S6). The elemental mapping identified the presence of phosphorus, carbon and oxygen covering the graphene surface and surrounding nano-objects. Taking these pictures under UHV conditions under an electron beam alters the behavior of RNA, but confirms presence of the RNA film on graphene surface.

3.3. RNA stacks unfolded to graphene surface

However, the formation of the well-packed RNA layer is only possible when there is enough material to form the homogenous film, i.e. if RNA concentration in solution is high enough. We repeated the liquid mode AFM experiment using the single layer graphene and a 50-fold diluted RNA solution ($c(\text{RNA}) = 2 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1}$). Under these conditions, we did not observe the self-assembled pattern discussed above (see figure 2(a)). The lower concentration was not only insufficient to form the homogenous RNA film but also unable to entrap gas nanobubbles on the graphene surface. Even though, we observed randomly and sparsely distributed nanoparticles, we did not see any other alien nano-objects in the system. The observed clusters were exclusively attached to the graphene surface rather than the SiO₂ support (supporting figure S1). We concluded that the nanoparticles were individual RNA molecules and small RNA clusters (remaining intact after drying); whereby average experimental height was 1.2 ± 0.2 nm. Regarding the experiments with higher concentration, this confirmed homogenous RNA layer and bubble hypothesis. Another indicator was that the stiffness mapping revealed that the observed features were softer than the substrate, although a Young's Modulus cannot be calculated due to the small dimensions of the formed objects (supporting figure S7).



3.4. Theoretical insight into the graphene induced RNA unfolding

To better understand the behavior of RNA molecules on graphene, we performed classical all-atom MD simulations of two differently sized oligonucleotides (10-nucleotides-long and shorter 8-nucleotides-long) in water and computed average enthalpies for its folded and unfolded states. Assuming that hairpin folding is an enthalpy-driven process [54], partly counterbalanced by an unfavorable entropy contribution that is connected with loss of conformational freedom upon hairpin folding (however, in total, the enthalpic contribution exceeds the entropic term), the enthalpy difference can serve for direct comparison of stability of individual RNA states. The simulated oligonucleotides preferentially adopted the folded hairpin conformation in water; the folded form was more thermodynamically stable than the unfolded form by $\Delta H = 15 \pm 1$ kcal mol⁻¹ for the 10-nucleotides-long RNA and by $\Delta H = 10 \pm 2$ kcal mol⁻¹ for a shorter (8-nucleotides-long) hairpin. Additional GC closing pair in 10-mer hairpin increased the stability of the folded form by approximately $\Delta H = 5$ kcal mol⁻¹ compared to 8-nucleotide RNA. This observation is consistent with previous

experimental findings suggesting that the studied oligonucleotide is an autonomously folding hairpin motif that is thermally stable at ambient temperature [55]. These results suggested that the chosen force field and MD simulation setup adequately described the studied system and could be used to help interpret the experimental results. We, therefore, performed additional simulations to study the RNA hairpin's behavior on graphene. The unfolded 10-nucleotides long RNA stacked on the graphene surface was more stable (by $\Delta H = 2 \pm 2$ kcal mol⁻¹) than the folded hairpin interacting with graphene. In the case of the shorter 8-mer hairpin, the enthalpy difference was 11 ± 3 kcal mol⁻¹ again in favor of the unfolded form. Moreover, in our simulations practically all bases were directly stacked to the graphene surface. Thus, the unfolded state may be further stabilized by reducing the hydrophobic surface of graphene exposed to water upon base stacking to this surface, i.e. by hydrophobic effect. All this suggests that the hairpin should be expected to unfold in the presence of graphene and bind to the graphene surface via π - π interactions [22]. The average height of the unfolded 10-nucleotide-long RNA on graphene was 1.2 ± 0.1 nm, which is consistent with the height observed in the AFM

experiments with dilute RNA (figures 5(b) and (d)). In another MD simulation with more RNA molecules, we observed the formation of contacts between individual unfolded oligonucleotides on the graphene surface, and the development of RNA clusters (figure 5(c)), which again agreed with the experimental observations. Approximately one half of the bases of individual RNA molecules forming the clusters stacked to the graphene surface and the other half created intermolecular contacts via stacking and hydrogen bonding interactions among RNA hairpins. Each RNA molecule formed ~ 7 hydrogen bonds with the neighboring RNA hairpins (for more details see supporting figure S8). These noncovalent interactions stabilized RNA clusters on the graphene surface.

Taken together, the experiments and simulations discussed above provide enough evidence that RNA forms stacking interactions with graphene surfaces in water, leading to the development of homogeneous RNA films consisting of clusters of interacting RNA oligonucleotides. These films entrap nanobubbles on the graphene confined by RNA film. Heights and lateral distributions depend on the number of underlying graphene layers. Both height and lateral size of the bubbles might be rationalized by combination of the Young–Laplace and Young equations, although, it is worth to note that the predictability of such macroscopic description is rather limited in case of nanobubbles containing Knudsen gas [53]. In addition, the nanobubbles observed in this study are even one order of magnitude smaller than the nanobubbles stabilized by the Knudsen gas. We hypothesize that the nanobubbles of such small size are stabilized by pinning to the RNA film, which is in turn sensitive to the number of graphene layers because of different hydrophobicity of such surface. The experiments were performed using graphene mounted on a hydrophilic SiO_2 surface. Because graphene exhibits partial wetting transparency [56], the hydrophobicity of the multilayer surface should increase with the number of graphene layers [57]. A corrugation of graphene surface also decreases with number of stacked graphene layers. However, the mechanism governing formation of nanobubbles entrapped in RNA film is not fully elucidated and deserves further analysis.

4. Conclusions

We analyzed the behavior of a prototypical RNA oligonucleotide on graphene in water by liquid mode AFM and interpreted the results with the assistance of all-atom MD simulations. The RNA molecules, which form thermally stable native folded hairpin structures in water, melt on the graphene surface. At sufficiently high concentrations, the unfolded RNA molecules form a film that entraps nanobubbles; at lower concentrations, they assemble into clusters of unfolded RNA oligonucleotides that are sparsely

distributed over graphene surface. The calculations suggested that the experimentally observed unfolding occurs because stacking interactions between RNA nucleobases and graphene outweigh the intramolecular interactions that stabilize the RNA hairpin in water. The height and distribution of nanobubbles over the graphene surface depended on the number of graphene layers, i.e. the hydrophobicity of the graphene surface. On single layer graphene, the bubbles were smaller and more densely distributed, while on graphite they were large and sparsely distributed over the surface. Biomacromolecules can thus display very specific behaviors upon contact with graphene surfaces in water, and their properties can vary with the surface hydrophobicity, concentration and temperature. These results and the implied possibility of manipulating the properties of surface-bound biomolecules should be borne in mind when developing graphene-based sensors or graphene-based nanocarriers for applications in areas such as drug delivery or gene therapy.

Acknowledgment

We acknowledge financial support from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Grants LO1305, CZ.1.05/2.1.00/19.0377 and the Research Infrastructure NanoEnviCz: project No. LM2015073), the ERC (Consolidator grant 683024 from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme awarded to MO), the Neuron fund, and the Danish National Research Foundation, Young Investigator Program from the Villum Foundation, Aarhus Universitets Forskningsfond (AUFF NOVA-project), the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 21528501) and EU H2020 RISE 2016 (MNR4SCell 734174 project).

ORCID iDs

S Zhang  <https://orcid.org/0000-0003-0170-6470>
M Dong  <https://orcid.org/0000-0002-2025-2171>
M Otyepka  <https://orcid.org/0000-0002-1066-5677>

References

- [1] Schedin F, Geim A K, Morozov S V, Hill E W, Blake P, Katsnelson M I and Novoselov K S 2007 *Nat. Mater.* **6** 652–5
- [2] Shao Y, Wang J, Wu H, Liu J, Aksay I A and Lin Y 2010 *Electroanalysis* **22** 1027–36
- [3] Pumera M, Ambrosi A, Bonanni A, Chng E L K and Poh H L 2010 *TrAC Trends Anal. Chem.* **29** 954–65
- [4] Georgakilas V, Otyepka M, Bourlinos A B, Chandra V, Kim N, Kemp K C, Hobza P, Zbořil R and Kim K S 2012 *Chem. Rev.* **112** 6156–214
- [5] Liu Y, Dong X and Chen P 2012 *Chem. Soc. Rev.* **41** 2283–307
- [6] Traversi F, Raillon C, Benameur S M, Liu K, Khlybov S, Tosun M, Krasnozhan D, Kis A and Radenovic A 2013 *Nat. Nanotechnol.* **8** 939–45
- [7] Dontschuk N *et al* 2015 *Nat. Commun.* **6** 6563
- [8] Yang K, Feng L, Shi X and Liu Z 2013 *Chem. Soc. Rev.* **42** 530–47
- [9] Venkatesan B M and Bashir R 2011 *Nat. Nanotechnol.* **6** 615–24

- [10] Xie P, Xiong Q, Fang Y, Qing Q and Lieber C M 2012 *Nat. Nanotechnol.* **7** 119–25
- [11] Min S K, Kim W Y, Cho Y and Kim K S 2011 *Nat. Nanotechnol.* **6** 162–5
- [12] Park S Y, Park J, Sim S H, Sung M G, Kim K S, Hong B H and Hong S 2011 *Adv. Mater.* **23** H263–7
- [13] Li N *et al* 2011 *Biomaterials* **32** 9374–82
- [14] Park D-W *et al* 2014 *Nat. Commun.* **5** 5258
- [15] Rajendran A, Endo M and Sugiyama H 2014 *Chem. Rev.* **114** 1493–520
- [16] Ares P, Fuentes-Perez M E, Herrero-Galan E, Valpuesta J M, Gil A, Gomez-Herrero J and Moreno-Herrero F 2016 *Nanoscale* **8** 11818–26
- [17] Orozco M 2014 *Chem. Soc. Rev.* **43** 5051–66
- [18] Karplus M and McCammon J A 2002 *Nat. Struct. Mol. Biol.* **9** 646–52
- [19] Šponer J, Banáš P, Jurečka P, Zgarbová M, Kührová P, Havrila M, Krepl M, Stadlbauer P and Otyepka M 2014 *J. Phys. Chem. Lett.* **5** 1771–82
- [20] Varghese N, Mogera U, Govindaraj A, Das A, Maiti P K, Sood A K and Rao C N R 2009 *ChemPhysChem* **10** 206–10
- [21] Sowerby S J, Cohn C A, Heckl W M and Holm N G 2001 *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98** 820–2
- [22] Antony J and Grimme S 2008 *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10** 2722–9
- [23] Gowtham S, Scheicher R, Ahuja R, Pandey R and Karna S 2007 *Phys. Rev. B* **76** 2–5
- [24] Spiwok V, Hobza P and Řezáč J 2011 *J. Phys. Chem. C* **115** 19455–62
- [25] Patil A J, Vickery J L, Scott T B and Mann S 2009 *Adv. Mater.* **21** 3159–64
- [26] Husale B S, Sahoo S, Radenovic A, Traversi F, Annibale P and Kis A 2010 *Langmuir* **26** 18078–82
- [27] Zhao X, Striolo A and Cummings P T 2005 *Biophys. J.* **89** 3856–62
- [28] Zhao X and Johnson J K 2007 *J. Am. Chem. Soc.* **129** 10438–45
- [29] Bobadilla A D and Seminario J M 2011 *J. Phys. Chem. C* **115** 3466–74
- [30] Nandy B, Santosh M and Maiti P K 2012 *J. Biosci.* **37** 457–74
- [31] Akca S, Foroughi A, Frochtzwaig D and Postma H W C 2011 *PLoS One* **6** e18442
- [32] Zhao X 2011 *J. Phys. Chem. C* **115** 6181–9
- [33] Fontes G N and Neves B R A 2005 *Langmuir* **21** 11113–8
- [34] Carthew R W and Sontheimer E J 2009 *Cell* **136** 642–55
- [35] Doherty E A, Batey R T, Masquida B and Doudna J A 2001 *Nat. Struct. Mol. Biol.* **8** 339–43
- [36] Nissen P, Ippolito J A, Ban N, Moore P B and Steitz T A 2001 *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98** 4899–903
- [37] Antao V P, Lai S Y and Tinoco J I 1991 *Nucl. Acids Res.* **19** 5901–5
- [38] Heus H A and Pardi A 1991 *Science* **253** 191
- [39] Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark A E and Berendsen H J C 2005 *J. Comput. Chem.* **26** 1701–18
- [40] Tribello G A, Bonomi M, Branduardi D, Camilloni C and Bussi G 2014 *Comput. Phys. Commun.* **185** 604–13
- [41] Correll C C, Beneken J, Plantinga M J, Lubbers M and Chan Y L 2003 *Nucl. Acids Res.* **31** 6806–18
- [42] Kührová P, Banáš P, Best R B, Šponer J and Otyepka M 2013 *J. Chem. Theory Comput.* **9** 2115–25
- [43] Cheng A and Steele W A 1990 *J. Chem. Phys.* **92** 3858–66
- [44] Zgarbová M, Otyepka M, Šponer J, Mládek A, Banáš P, Cheatham T E and Jurečka P 2011 *J. Chem. Theory Comput.* **7** 2886–902
- [45] Steinbrecher T, Latzer J and Case D A 2012 *J. Chem. Theory Comput.* **8** 4405–12
- [46] Kührová P, Best R B, Bottaro S, Bussi G, Šponer J, Otyepka M and Banáš P 2016 *J. Chem. Theory Comput.* **12** 4534–48
- [47] Izadi S, Anandkrishnan R and Onufriev A V 2014 *J. Phys. Chem. Lett.* **5** 3863–71
- [48] Joung I S and Cheatham T E 2008 *J. Phys. Chem. B* **112** 9020–41
- [49] Hess B, Bekker H, Berendsen H J C and Fraaije J G E M 1997 *J. Comput. Chem.* **18** 1463–72
- [50] Bussi G, Donadio D and Parrinello M 2007 *J. Chem. Phys.* **126** 014101
- [51] Pérez-Villa A, Darvas M and Bussi G 2015 *Nucl. Acids Res.* **43** 8725–34
- [52] Lohse D and Zhang X 2015 *Rev. Mod. Phys.* **87** 981–1035
- [53] Seddon J R T, Zandvliet H J W and Lohse D 2011 *Phys. Rev. Lett.* **107** 116101
- [54] Mohan S, Hsiao C, Bowman J C, Wartell R and Williams L D 2010 *J. Am. Chem. Soc.* **132** 12679–89
- [55] Sheehy J P, Davis A R and Znosko B M 2010 *RNA* **16** 417–29
- [56] Rafiee J, Mi X, Gullapalli H, Thomas A V, Yavari F, Shi Y, Ajayan P M and Koratkar N 2012 *Nat. Mater.* **11** 217–22
- [57] Shih C-J, Strano M S and Blankschtein D 2013 *Nat. Mater.* **12** 866–9