

Stogodišnjica rendgenske kristalografije

KUI – 15/2013
Prispjelo 7. prosinca 2012.
Prihvaćeno 29. siječnja 2013.

B. Kojić-Prodić i K. Molčanov*

Institut Rudjer Bošković, Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb

*The important thing in science is not so much to obtain new facts
as to discover new ways of thinking about them.*

W. L. Bragg

Stogodišnjica rendgenske kristalografije veže se uz prvi pokus difrakcije rendgenskih zraka koji su s kristalom modre galice izveli njemački fizičari W. Friedrich i P. Knipping prema ideji i teorijskom predviđanju M. von Lauea 1912. Matematička formulacija pojave, kao i temeljne postavke znanosti o građi kristala – kristalografije, u to vrijeme vezane uz mineralogiju, pogodovale su razvitku metode za određivanje geometrijske strukture tvari na atomnoj razini. Već su 1913. otac i sin Bragg započeli stvarati temelje za primjenu rendgenske difrakcije u određivanju kristalnih struktura jednostavnih molekula. Povijesni primjeri određivanja struktura od kuhinjske soli do složenih, za život bitnih, (makro)molekula, kao globularnih proteina hemoglobina i mioglobina, DNA, vitamina B₁₂, te novog otkrića ribozima, ilustriraju razvojni put rendgenske strukturne analize. Otkriće trodimenzijskih struktura tih molekula metodom rendgenske difrakcije pokrenulo je nove znanstvene discipline poput molekularne biofizike, molekularne genetike, strukturne molekularne biologije, bioanorganske kao i organometalne kemije i niza drugih disciplina. Otkriće i razvoj rendgenske kristalografije revolucioniralo je naše spoznaje u svim područjima prirodnih znanosti: fizici, kemiji, biologiji, geološkim znanostima i znanosti o materijalima. Znanstvena javnost prepoznala je ta temeljna znanstvena postignuća (uključujući i otkriće X-zraka) dodijelivši Nobelove nagrade tridesetdevetorici znanstvenika i dvjema znanstvenicama. Eksplozivni razvoj znanosti i tehnologije tijekom 20. i 21. stoljeća temelji se na spoznajama o detaljnoj trodimenzijskoj građi molekula i njome predviđenih i objašnjenih fizičkih, kemijskih, bioloških i farmakoloških svojstava molekula. Jedan od svježih primjera, koji je bilo teško predvidjeti, uspješna je i nedovršena priča o grafenima, koja puni naslovnice vodećih znanstvenih časopisa kao što su *Science*, *Nature*, *Nature Materials*, *Nature Nanotechnology*, *Nature Chemistry* i *Nature Physics*. Suvremena kristalografska istraživanja pokrivaju široko područje znanosti i veoma su inovativna, te nije uputno predviđati u kojim će se smjerovima nastaviti razvijati.

Ključne riječi: *Rendgenska difrakcija, kristalografija, kemijska veza, bioznanosti, kemija materijala, povijest kemije*

Uvod

Otkriće rendgenskih zraka samo po sebi bilo je veoma značajno i okarakterizirano je kao jedna od najznačajnijih spoznaja našeg vremena. Međutim interpretacija difrakcije X-zraka u kristalu 1912. otvorila je brojne diskusije i nesuglasice znanstvenika. Ograničeno znanje o građi atoma i prirodi zračenja te potpuno nepoznavanje građe kristala bile su uzrokom oprečnih stavova. Istaknuti teorijski fizičar tog vremena Arnold Sommerfeld nije mogao pojmiti da deset godina nakon Röntgenova otkrića nije razjašnjena priroda X-zraka. Došlo je do brojnih rasprava između samog A. Sommerfelda, M. von Lauea i P. P. Ewalda. Štoviše, Sommerfeld nije bio sklon da Knipping izvede planirani pokus raspršenja rendgenskih zraka u kristalu jer ga je držao besmislenim. Eksperimenti oca i sina Bragga, koji su uslijedili nakon objave rada Friedricha, Knippinga i von Lauea¹ 1912. pospješili su istraživanja o svojstvima i prirodi rendgenskih zraka, pa su se pojavile tri inačice dinamičke teorije difrakcije predstavljene Darwinom, Ewaldom i von

Laueom, čije je provjeravanje i usklađivanje trajalo pedesetak godina.

U proteklih sto godina rendgenska difrakcija prerasla je u suvremenu i moćnu metodu, koja je pridonijela mnogim velikim otkrićima temeljenim na poznavanju trodimenzijske strukture (makro)molekula i radikalno utjecala na poimanje kemijske veze i spoznaje o mehanizmima životnih procesa. Povezivanje strukture molekula i njihovih svojstava nametnulo je interdisciplinarni pristup, i danas je teško zamisliti područje u kojem se ne primjenjuju rezultati rendgenske difrakcije. Tehnološki napredak potpomogao je unapređenje eksperimentalnih uređaja, razvoj elektroničkih računala i algoritama. Time je omogućen neprestan razvoj metode, što nam pruža nesagledive mogućnosti u širenju naših spoznaja.

Rendgenska kristalografija danas predstavlja široko područje istraživanja, i prikazivanje njezinog razvoja tijekom proteklog stoljeća nije jednostavan poduhvat. Izbor bitnih elemenata razvoja može biti subjektivan pogled autora i neminovno nosi ograničenja s obzirom na opsežnost prikaza. Stručnjaci u području kristalografije i oni koje zanimaju pojedinosti mogu se poslužiti prigodnom literaturom.²⁻⁸

* Autor za dopisivanje: dr. sc. Biserka Kojić-Prodić
e-pošta: kojic@irb.hr

Raznorodnost i interdisciplinarni pristup karakteristični za rendgensku kristalografiju nametnuli su potrebu za intenzivnom suradnjom i dobrom organizacijom diljem svijeta, koja je ostvarena u okviru Međunarodne kristalografske unije, velikim zalaganjem P. P. Ewalda, R. C. Evansa i Sir W. L. Bragga. Prvi sastanak Međunarodne kristalografske unije održan je na Sveučilištu u Harvardu, srpnja 1948. Ewald je bio prvi predsjednik, W. L. Bragg zamjenik, a počasni predsjednik M. von Laue. Ewald je također pokrenuo časopis *Acta Crystallographica*, u kojem je djelovao kao glavni urednik do 1960. Prijedlog za naziv časopisa potječe od ruskog suurednika A. V. Šubnikova.

Kako bi se uspostavila što bolja suradnja među svjetskim kristalografima, uz nacionalna udruženja utvrđene su i organizacije po kontinentima. Zbog nedostatka uvjeta i komunikacije zemlje Afrike, posebno Magreba i Južnoafričke Unije, vezane su uz Europsku kristalografsku udruhu. Hrvatska kristalografska zajednica osnovana je 1992. u okviru Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti te djeluje u sklopu europske i svjetske asocijacije (www.hazu.hr/kristalografi/IUCr/introduction.htm).⁹

Iz povijesnih razloga zanimljivo je spomenuti da je Ewald uredio i napisao veći dio knjige⁸ posvećene obilježavanju pedesetogodišnjice rendgenske difrakcije (1962.) i tom prigodom pisao o kristalografiji u Jugoslaviji, što navodimo izvorno:

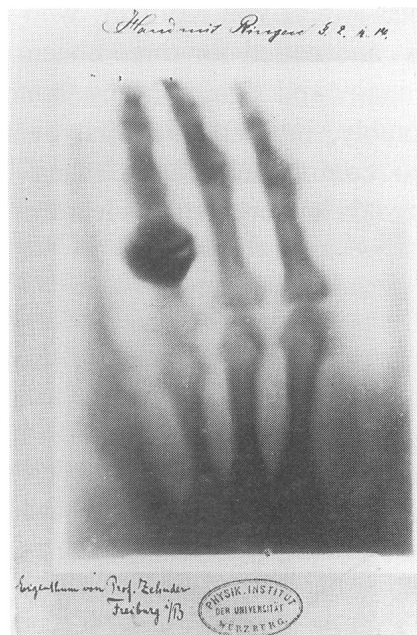
The first paper to be published was a powder diffraction study for the identification of bauxites by M. Karšulin, A. Tomić and A. Lahodny and dates from 1949. But the introduction of single-crystal methods and of Beevers-Lipson strips is due to D. Grdenić (1950) who received his training with A. I. Kitaigorodskii at the Institute for Organic Chemistry in Moscow. The centers of research are the physical, physicochemical and mineralogical institutes at the universities of Zagreb and Belgrade, the Institute for Nuclear Science in Belgrade and the industrial institute for light metals in Zagreb. In Prof. Grdenić's chemical institute 'Ruđer Bošković' of the Zagreb University inorganic and organo-metallic compounds are being investigated, while in the physics institute small angle scattering is applied to colloid systems.

* * *

The above discussion represents a fairly good sampling of the growth of diffraction methods in countries with a long tradition in crystallography and mineralogy, and in those where research is only recent. Among the countries not mentioned above are Belgium and India; Poland, Pakistan, Korea; and the Chinese Peoples Republic.

Povijest otkrića

Potaknut Maxwellovim otkrićem teorije elektromagnetskih valova, 8. 11. 1895. W. C. Röntgen¹⁰ iz Würtzburga otkrio je zračenje nepoznata porijekla i svojstava, koje je stoga nazvao X-zrakama. Kako bi učinio svoje otkriće uvjerljivijim sebi i drugima, zamolio je svoju suprugu Berthu da stavi ruku u snop "nepoznatih zraka" i zabilježio je na filmu. Slika Berthine šake s prstenom, snimljena 22. 12. 1895. (slika 1), obišla je brzo cijeli svijet, kao i stotinu godina poslije prigodom obilježavanja stogodišnjice Röntgenova otkrića.



Slika 1 – Radiografija šake gospođe Röntgen snimljena 1895. u Würtzburgu

Fig. 1 – A radiograph of Mrs. Röntgen's hand taken in Würzburg, 1895.

BEFORE LEAVING THE EXHIBITION
"SEE"
 THE WONDROUS
X RAYS
 The
 Greatest Scientific Discovery
 of the Age.

By the aid of the New Light you are
 enabled to see

"THROUGH A SHEET OF METAL"

"THROUGH A BLOCK OF WOOD"

AND ALSO

"Count the Coins within your Purse."

ADMISSION - 3d.
 OPEN ALL DAY.

X RAY PHOTOGRAPHS TAKEN.

Slika 2 – Oglas koji najavljuje "čuda X-zraka", tiskan je 1896.

Fig. 2 – An 1896 advertisement

Otkriće je imalo velik odjek jer je svima koji su ugledali snimku bila jasna snaga otkrića zraka, koje mogu pokazati finu građu živih i neživih tvari nevidljivu ljudskom oku (slike 1 i 2). Stoljetna želja čovjeka da vidi unutrašnjost ljudskog tijela, koju su ostvarivali skalpelom, ovjekovječena na skicama Leonarda da Vinci ili *Satu anatomije dr. Nicolaesa Tulpa* (slika 3), postala je realnost.

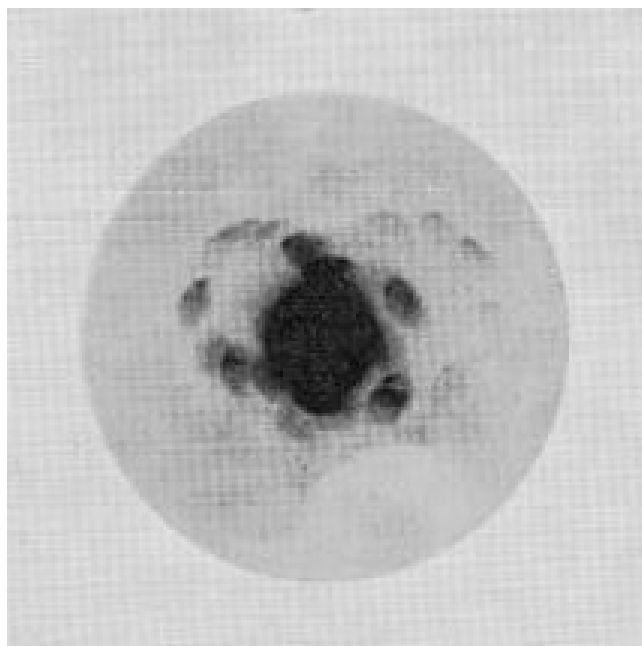


Slika 3 – Rembrandt van Rijn naslikao je 1632. Sat anatomije dr. Nicolaesa Tulpa, sliku pohranjenu u galeriji Mauritshuis, Den Haag

Fig. 3 – Rembrandt van Rijn painted in 1632 Anatomy Lesson of Dr. Nicolaes Tulp, The Mauritshuis Museum, Den Haag

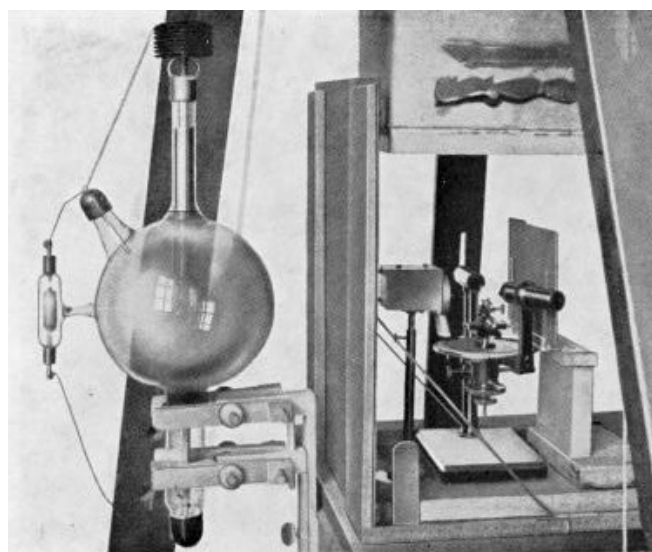
Svijet je spoznao snagu i domet Röntgenova otkrića¹⁰ i 1901. mu je dodijeljena Nobelova nagrada za fiziku, kojom je započelo nagrađivanje Nobelovim nagradama vrhunskih otkrića u području fizike. X-zrake su po njemu nazvane rendgensko zračenje. Iako je primjena tog zračenja bila svestrana, u medicini i brojnim tehnologijama već tri mjeseca nakon objave otkrića, ipak suvremenici nisu imali ni približnu ideju o dalekosežnosti otkrića. Veoma značajan korak prema takvoj spoznaji učinio je, sedamnaest godina nakon Röntgenova otkrića, Max von Laue smatrajući da kristal može raspršivati X-zrake. Njegova prva interpretacija bila je temeljena na kinematičkoj teoriji difrakcije. Širenjem spoznaja o prirodi i svojstvima X-zraka i von Laue se priklonio dinamičkoj teoriji. Nije neobično da je Max von Laue postavio teoriju o pojavi kojoj je još nedostajala eksperimentalna potvrda jer je uz kreativan um imao izvrsne učitelje. Doktorat je izradio pod mentorstvom M. Plancka i habilitaciju kod A. Sommerfelda. Prilikom vrednovanja von Laueova otkrića treba se prisjetiti da je u teorijama o građi atoma, osim postojećih Daltonova modela iz 1803. i Thomsonova modela s elektronom – “groždica u pudingu” iz 1897., ozbiljnije prepoznavanje subatomske čestice krenulo s modelima N. Bohra 1913. i deset godina poslije s Rutherfordovim modelom. Tek nakon djelomičnih modela razvojem kvantne teorije uspostavljen je moderni valni model, koji se još uvijek nadopunjuje. U tijeku je obilježavanje stogodišnjice modela atoma danskog fizičara Nielsa Bohra.

W. Friedrich i P. Knipping¹ izveli su pokus s kristalom modre galice (bakrov sulfat pentahidrat) želeći razriješiti nedoumicu o prirodi “nepoznatih” zraka (slike 4 i 5). Pokus je otkrio valnu prirodu zraka potvrdivši ideju von Lauea^{1,11} za koju mu je 1914. dodijeljena Nobelova nagrada. Veza uz otkriće i podjelu Nobelove nagrade Maxu von Laueu zabilježena je javna izjava samog dobitnika koji je držao da bi bilo ispravno dijeliti nagradu s Friedrichom i Knippingom. Dosljedno tome on je samoinicijativno podijelio novčani iznos nagrade s tim istraživačima. Nema sumnje



Slika 4 – Prva snimka rendgenske difrakcije u kristalu, koju su 1912. snimili Friedrich i Knipping (kristal miruje i obasjava se “bijelim rendgenskim zrakama”, metoda koja je nazvana po von Laueu)

Fig. 4 – The first photograph of diffraction of X-rays in a crystal, recorded in 1912 by Friedrich and Knipping (Laue method; white radiation – polychromatic radiation was used)



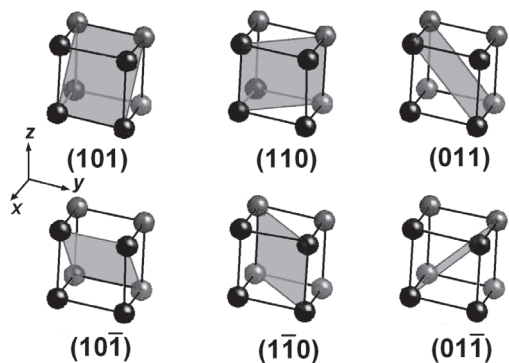
Slika 5 – Neznatno usavršen uređaj Friedricha i Knippinga: lijevo je rendgenska cijev ispred koje stoji sigurnosni zaslon i potom kolimator te nosač kristala i iza njega film za bilježenje difrakcije zračenja u kristalu

Fig. 5 – Somewhat advanced apparatus of Friedrich and Knipping: to the left is X-ray tube and in front of it is a protecting screen, collimator, a sample holder with a crystal, and finally a photographic film

da ga je uz iznimno kreativan um krasila i izuzetna osobnost.

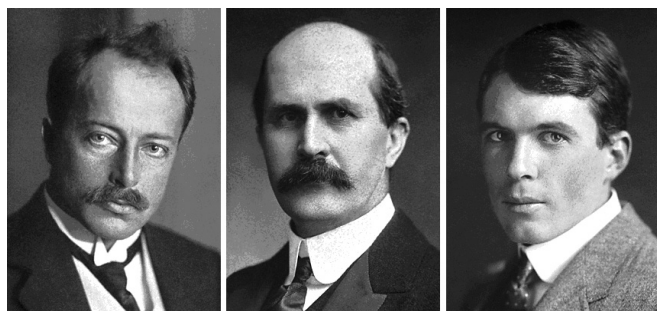
U studenom 1912. dvadesetdvogodišnji W. Lawrence Bragg objasnio je značenje složene Laueove snimke kristala kori-

steći se analogijom s vidljivom svjetlošću. On je zamislio da se rendgenske zrake raspršuju na "mrežnim ravninama" (slika 6) u kristalu¹² (Braggov zakon). Obiteljski tandem, sin W. L. Bragg i otac W. H. Bragg (slika 7) napravili su prvi spektrometar,¹³ kojim je W. L. Bragg 1913. odredio unutarnju građu kristala NaCl (kuhinjske soli), KCl, KBr i KI.¹⁴ Iste godine objavljene su i strukture dijamanta, kalcita i pirita.



Slika 6 – Mrežne ravnine u kristalu, s pripadajućim Millerovim indeksima

Fig. 6 – Lattice planes in a crystal, with their corresponding Miller indices



Slika 7 – Dobitnici Nobelovih nagrada za fiziku (s lijeva na desno): 1914. Max von Laue, 1915. William Henry Bragg (otac) i William Lawrence Bragg (sin, u 25. godini života postao je laureat)

Fig. 7 – Nobel Laureates for physics (from left to right): 1914. Max von Laue, 1915. William Henry Bragg (father) i William Lawrence Bragg (son, at age of 25 he was Nobel Laureate)

Već 1916. Debye i Scherrer¹⁵ te neovisno Hull¹⁶ (1917.) u Americi otkrili su metodu difrakcije u kristalnom prahu, koja ima iznimno veliku upotrebu u znanosti o materijalima i ogromnu primjenu u identifikaciji svih kristalnih tvari. Ta metoda razvila se kao neovisno područje rendgenske difrakcije u odnosu na metodu monokristala i znatno je pridonijela interdisciplinarnosti područja.

Ključna ideja u određivanju strukture iz difrakcijske slike potječe od W. H. Bragga,¹⁷ koji je povezo periodični raspored atoma u kristalu s Fourierovim redovima. Matematička obrada te pojave, ključna za rendgensku strukturalnu analizu, prepoznata je 1915. kao vrhunsko znanstveno otkriće te ocu i sinu Braggu donijela Nobelovu nagradu. Primjena te nove metode vodila je k temeljnoj reviziji ideja u mnogim područjima znanosti. Sažeto je to definirao 1968. W. L. Bragg:¹⁸ "Razvoj rendgenske kristalografije od

1912. nadmašio je naša prva očekivanja. Ne samo da je otkrio kako su atomi raspoređeni u različitim tvarima nego je rasvijetlio prirodu sila koje djeluju među njima kao i različita svojstva tvari. U mnogim slučajevima te nove spoznaje vodile su u reviziju ideja u drugim granama znanosti." Slobodno možemo reći da su istraživanja nakon 1968. premašila i Braggova predviđanja. Razumijevanje porijekla i mehanizama života te primjena tih spoznaja u medicini i farmakologiji, kao i u inženjerstvu novih materijala, pružaju uvjerljivu sliku razvoja metode, o čemu će biti riječ u odjeljku: *Otkrića postignuta rendgenskom difrakcijom izmijenila su postojeće spoznaje i otvorila vidike k vizijama bliske i dalje budućnosti.*

Teorijske osnove rendgenske difrakcije

Suvremene spoznaje o građi atoma omogućavaju jasno poimanje principa rendgenske difrakcije kao interakciju tvari i rendgenskog zračenja. Raspršenje zračenja zbiva se na elektronima atoma (Thomsonovo raspršenje) u kristalu. Rezultirajuće raspršeno zračenje ovisi o unutarnjem rasporedu atoma u kristalu-strukturi – definiranoj geometrijskim parametrima i snazi raspršenja na svakom atomu (broju elektrona i volumenu kojeg oni zauzimaju).

Kristal možemo opisati kao tvorevinu sastavljenu od periodičkog niza malih trodimenzijskih građevnih blokova, zvanih jedinične ćelije, koje su definirane trima neravninskim vektorima i kutovima među njima i opisane simetrijom (14 Bravaisovih rešetki). Zbog te periodičnosti, ako raspršenje sa svake jedinične ćelije nije u fazi, nećemo opaziti raspršenje zbog destruktivne interferencije. Stoga možemo razmatrati raspršenje samo na jediničnoj ćeliji. Kada volumen V na udaljenosti \mathbf{r} od ishodišta jedinične ćelije obasjamo snopom koji se širi u smjeru \mathbf{s}_0 ($s_0 = 1/\lambda$), amplituda raspršenog vala proporcionalna je s $V\rho(\mathbf{r})d\mathbf{r}$ [$\rho(\mathbf{r})$ predstavlja elektronsku gustoću u položaju definiranom vektorom \mathbf{r} , vektori su otisnuti masno kurzivom, dok su skalari kurzivom]. Kako bi se uzela u obzir interferencija sa zrakama raspršenim na elektronskoj gustoći na raznim položajima (atomima), moramo razmatrati i njihove faze (definirane s obzirom na ishodište jedinične ćelije). Kada dođe do raspršenja u smjeru \mathbf{s} , faza je određena s

$$2\pi \mathbf{S} \cdot \mathbf{r} \quad (\mathbf{S} \equiv \mathbf{s} - \mathbf{s}_0)$$

Ukupno raspršenje preko cijelog volumena jedinične ćelije V , normirano prema raspršenju slobodnog elektrona, predstavlja Fourierov transformat:

$$F(\mathbf{S}) = \iiint \rho(\mathbf{r}) \exp(2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}) dV$$

Veličina $F(\mathbf{S})$ zove se strukturalni faktor i temeljna je u rendgenskoj kristalografiji.

U rendgenskoj strukturalnoj analizi primjenjuje se Fourierova inverzija:

$$F(\mathbf{S}) = \mathcal{F}[\rho(\mathbf{r})]$$

$$\rho(\mathbf{r}) = \mathcal{F}[F(\mathbf{S})]$$

Bitan je problem što $F(\mathbf{S})$ predstavlja kompleksnu veličinu, gdje je

$$F(\mathbf{S}) = |F(\mathbf{S})| \exp(i\varphi\mathbf{S})$$

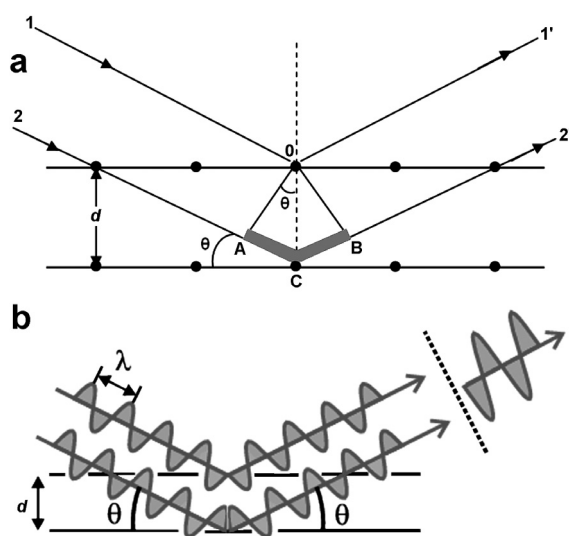
pri čemu mjerimo intenzitet raspršenog zračenja – amplitudu – proporcionalnu $|F(\mathbf{S})|^2$, dok fazu ne možemo izmjeriti

u difrakcijskom pokusu. Ključni problem u rendgenskoj strukturalnoj analizi poznat je kao “fazni problem”. Kako bismo izračunali elektronsku gustoću $\rho(\mathbf{r})$, čiji maksimumi predstavljaju položaj atoma u jediničnoj ćeliji, moramo riješiti fazni problem. Difrakcija u kristalu, zbog periodičnog svojstva, ograničena je samo na određene smjerove, koji su opisani Laueovim uvjetima: $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a} = nh$, $\mathbf{S} \cdot \mathbf{b} = nk$, $\mathbf{S} \cdot \mathbf{c} = nl$, pri čemu su h, k, l cijeli brojevi. Ewald¹⁹ je za tumačenje Laueovih uvjeta uveo pojam recipročne rešetke, što znatno pojednostavljuje računске postupke. U Laueovu pristupu kristal djeluje kao trodimenzijska optička rešetka u kojoj dolazi do ogiba.

Bragg je izveo mnogo jednostavniju jednadžbu prema analogiji s refleksijom svjetla, pri čemu “zrcala” predstavljaju nizovi jednako udaljenih ravnina zaposjednutih atomima u kristalnoj rešetci:

$$2 d_{hkl} \sin \theta = n \lambda$$

d_{hkl} je razmak između susjednih ravnina u rešetci dok h, k, l (identični onima u Laueovim uvjetima) definiraju ravnine u kristalnoj rešetci i nazivaju se Millerovi indeksi, a n predstavlja red refleksije u Braggovoj jednadžbi. Uobičajeno je u difrakciji povezati n i h, k, l , koji onda predstavljaju Laueove indekse. Braggov kut θ je kut upada i refleksije rendgenskih zraka prema ravninama kristalne rešetke (slika 8 a i b).



Slika 8 – Braggov zakon: a) dvije paralelne zrake 1 i 2 padaju na mrežne ravnine kristala pod kutom θ . Razmak između mrežnih ravnina je d . Dužine OA i OB predstavljaju okomice na zrake 1 i 2. Zraka 2 prijeđe malo dulji put od zrake 1, i to za $AC + CB$. b) Kada je razlika u duljini puta jednaka cjelobrojnom višekratniku valne duljine upadnih zraka (λ), “reflektirane” su zrake u fazi, pa dolazi do konstruktivne interferencije. Kut “refleksije” tada je jednak upadnom kutu θ .

Fig. 8 – Illustration of Bragg's law: a) two parallel beams 1 and 2 hit lattice planes at the angle θ . Distance between the lattice planes is d . OA and OB are normal to the beams 1 and 2. Path of beam 2 is longer than path of beam 1 for $AC + CB$. b) When the difference of the path length is a multiple of the wavelength (λ), “reflected” beams have the same phase, so constructive interference occurs. “Reflexion” angle is then equal to the incident angle θ .

Strukturalni faktori za velik broj refleksa Laueovih indeksa $\mathbf{h} = (h, k, l)$ daju željenu elektronsku gustoću [svih atoma (j) u jediničnoj ćeliji u položajima x_j, y_j, z_j]

$$\rho(\mathbf{r}) = 1/V \sum_{\mathbf{h}} F(\mathbf{h}) \exp(-2\pi i \mathbf{h} \cdot \mathbf{r}) = 1/V \sum_{\mathbf{h}} F(\mathbf{h}) \exp[-2\pi i (x \mathbf{a} + y \mathbf{b} + z \mathbf{c}) \cdot (h \mathbf{a}^* + k \mathbf{b}^* + l \mathbf{c}^*)]$$

pri čemu je $\mathbf{r} = x \mathbf{a} + y \mathbf{b} + z \mathbf{c}$ i $\mathbf{a}^*, \mathbf{b}^*, \mathbf{c}^*$ su vektori recipročne rešetke (matematički određene odnosima $\mathbf{a}^* \cdot \mathbf{a} = 1$, $\mathbf{b}^* \cdot \mathbf{b} = 1 \dots \mathbf{a}^* \cdot \mathbf{b} = 0 \dots$)

S teorijskog stanovišta, u rendgenskoj strukturalnoj analizi ključni je problem računanje faza strukturalnog faktora. Ovdje ćemo samo kratko opisati dva temeljna pristupa: a) prvi se temelji na primjeni vektorske metode za koju je nužno imati u strukturi teški atom (veće snage raspršenja npr. svakako veći od fosfora) ili pak veći dio molekule poznate geometrije (koji predstavlja znatan doprinos raspršenju) i b) primjeni “direktnih metoda” temeljenih na algebarskim relacijama, koje se povezuju s podacima o unutarnjoj simetriji kristala (mikroelementima simetrije – prostorne grupe) i s teorijom vjerojatnosti. U makromolekularnoj kristalografiji primjenjivale su se najprije različite kombinacije metoda teškog atoma, kao što su jednostruka izomorfna zamjena (SIR, *Single Isomorphous Replacement*) i višestruka izomorfna zamjena (MIR, *Multiple Isomorphous Replacement*). Upotreba sinkrotrona u kristalografiji omogućila je primjenu anomalne disperzije s više valnih duljina (MAD, *Multi Wavelength Anomalous Dispersion*) i jedne valne duljine (SAD, *Single Wavelength Anomalous Dispersion*) za određivanje faza. Mjerenje difrakcijskih intenziteta sinkrotronskim zračenjem uz primjenu dviju navedenih metoda za određivanje faza predstavlja velik napredak s obzirom na utrošak vremena i razinu razlučivanja (točnost) u određivanju struktura. Anomalna disperzija se primjenjuje kad su u samoj strukturi prisutni metali, sumpor ili fosfor, te kad se za tu primjenu u molekulu uvodi selenij (genetičkim se inženjerstvom sumpor u metioninu zamjenjuje selenijem ili halogenidni ioni).

Jednostavno rečeno, anomalno raspršenje rendgenskih zraka pojavljuje se kad je valna duljina upotrijebljenog zračenja kojim se obasjava kristal u blizini apsorpcijskog praga elementa s većom moći raspršenja (prisutnog u kristalu). Ako bismo željeli mjeriti anomalno raspršenje na lakom atomu kao npr. kisikovu atomu, učinak bi bio veoma malen i teško mjerljiv. Anomalna disperzija odražava se ne samo na vrijednost faktora raspršenja nego utječe i na vrijednost faze raspršenog vala. Stoga se faktor raspršenja opisuje kao kompleksna veličina:

$$f = f_0 + \Delta f' + i f''$$

pri čemu su posljednja dva člana realni i imaginarni dio korekcije za anomalnu disperziju, čije vrijednosti ovise o valnoj duljini i vrsti atoma koji raspršuje zračenje.

Jedna od posljedica te pojave je odstupanje od Friedelova zakona

$$F_{hkl} \neq F_{-h-k-l}$$

što je otkrio Bijvoet i upotrijebio za određivanje apsolutne konfiguracije molekula. Poznavanje apsolutne konfiguracije kiralnih molekula ima presudnu ulogu u proizvodnji lije-

kova i u razumijevanju bioloških procesa jer se molekule lijeve i desne konfiguracije razlikuju po svojstvima.

Kad u strukturi imamo atom većeg rednog broja s većim brojem elektrona, koji stoga ima jače raspršenje, i primijenimo zračenje čija je valna duljina blizu apsorpcijskog praga tog elementa, moći ćemo naći dovoljan broj parova refleksa koji odstupaju od Friedelova zakona. Kako na sinkrotronu možemo jednostavno mijenjati valnu duljinu zračenja, moći ćemo ovu pojavu primijeniti za određivanje faza strukturnih faktora (SAD/MAD) u proteinskoj kristalografiji, kao i za određivanje apsolutne konfiguracije kiralnih molekula.

U određivanju faza može se primijeniti pristup molekularne zamjene, u kojem se upotrebljavaju poznati strukturni fragment (traženje homolognih proteina ili većih podjedinica putem Protein Data Bank²⁰ i servera Phyre² (Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server),²¹ koji se kombiniraju s translacijskom i rotacijskom funkcijom koje lociraju poznate fragmente u nepoznatoj strukturi. Nekristalografska simetrija također se primjenjuje za popravljavanje približno određenih faza, a posebno je korisna u određivanju struktura virusa i poznata je pod imenom *Rossmann phasing*.²²

Za napredak u određivanju kristalnih struktura metodama rendgenske difrakcije i postizanja veće točnosti ključni su matematički postupci i algoritmi, koji su išli u korak s napretkom elektroničkih računala. Matematičke formulacije i učinkoviti algoritmi bitni su u razvoju softvera, koji moraju biti podržavani odgovarajućim razvojem računala. Kakav je preobražaj uslijedio u tom području napretkom eksperimentalnih metoda i računske podrške najbolje pokazuje primjer određivanja strukture vitamina B₁₂ (C₆₃H₈₈N₁₄PCo, ukupno 181 atom u molekuli) tijekom šezdesetih godina prošlog stoljeća, za što je bilo potrebno više od osam godina.²³ Danas se mjerenje difrakcijskih intenziteta i određivanje takve strukture može izvesti u nekoliko sati ili dana; vrijeme potrebno za objašnjenje funkcije molekule ovisi o kompleksnosti strukture, razini znanja i iskustva istraživača.

Matematički postupci koji su pridonijeli razvoju kristalografskog softvera su brzi Fourierov algoritam, metode najmanjih kvadrata, različite kombinacije Pattersonova pretraživanja (prema globalnom obliku molekule i njezinoj orijentaciji u kristalnoj rešetki) kao i pristup "maksimuma entropije". Danas postoji velik broj računalnih programa različitih grupa autora prilagođenih za određene postupke u tijeku određivanja kristalne strukture (makro)molekula. Zbog iznimno velikog broja računalnih programa, njihovo opisivanje razvoja i namjene bilo bi izvan općeg interesa čitatelja pa je ovom prilikom izostavljeno.

Nove i usavršene metode koje su pridonijele razvoju rendgenske kristalografije

Temeljne teorijske postavke rendgenske difrakcije bile su poznate već do 1920. i za napredak metode zaslužan je tehnologijom potpomognut razvoj instrumenata. To uključuje rendgenske cijevi, transformatore za dobivanje visokog napona, kamere, filmove, kasnije rendgenske difraktometre koji su konstruirani krajem šestog desetljeća 20.

stoljeća i detektore (CCD, *Charge-Coupled Device*) te sinkrotrone, koji se pojavljuju početkom 80-ih godina 20. stoljeća. Osim metode difrakcije u monokristalu, koja neprestano širi svoje mogućnosti, znanan je doprinos novih tehnologija na metodi rendgenske difrakcije s praškastim uzorcima. Ta metoda služi za identifikaciju svih kristalnih spojeva i njihovih smjesa i faza, kao i za točno određivanje konstanti kristalne rešetke, što ima veliko značenje u znanosti o materijalima i primjeni. Metoda također ima velike mogućnosti za utvrđivanje učinaka veličine kristalnog zrna i preferirane (usmjerene) orijentacije zrna na mehanička, apsorpcijska i druga svojstva te za izučavanje faznih prijelaza pri različitim temperaturama i tlakovima. Dugogodišnji razvoj metode praha omogućio je određivanje kristalne strukture molekula, posebice onih za koje je teško ili nemoguće uzgojiti monokristale,²⁴ što uključuje i manje makromolekule.²⁵

Ogroman napredak rendgenske kristalografije temelji se na uporabi moćnih računala koja su izravno uključena u tijek eksperimenata (*on-line*), kao što je mjerenje difrakcijskih intenziteta, i robota za kristalizaciju. Uloga računala je nezaobilazna i u obradi eksperimentalnih podataka i njihovoj interpretaciji: korekciji mjerenih difrakcijskih intenziteta, interpretaciji Fourierovih mapa elektronskih gustoća, poboljšanju eksperimentalnih modela strukture molekula, vizualizaciji trodimenzijske strukture i modeliranju (računalna grafika), pretraživanju datoteka za potrebe strukturne sistematike i molekularnog dizajna, izučavanje smatanja proteinskih molekula (*protein folding*), kao i praćenju odnosa strukture i aktivnosti. Primjena datoteka i molekularnog modeliranja u dizajnu lijekova široko je u primjeni i mnogima dobro poznata. Veoma rasprostranjene baze podataka o strukturnim podacima raznih molekula: Cambridge Structure Database, Protein Data Base, Nucleic Acid Database, Inorganic Crystal Structure Database, CRYSMET (strukture metala i intermetalnih spojeva) te The International Centre for Diffraction Data (*Powder Diffraction Files* – kristalografski podaci dobiveni metodom praha) već su desetljećima u optjecaju. Bioinformatika ima veliku ulogu u sistematizaciji o građi makromolekula i njihovih funkcija i svojstava. Rezultati tog rada su velik broj specijalnih baza koje su izvrsna nadogradnja uz Protein Data Base, Nucleic Acid Database, UniProt i InterPro. Većina tih baza i servera opremljena je raznim alatima koji olakšavaju navigaciju, izdvajanje željenih podataka i njihovu usporedbu, kao i vizualizaciju.

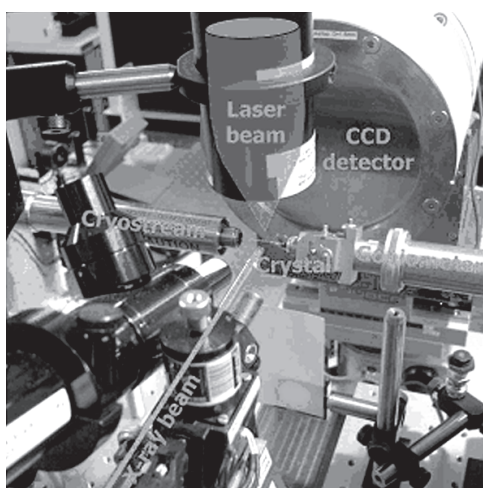
Upravo u svrsishodnom objedinjavanju svih dostupnih podataka i pronalaženju njihove vrijednosti važnu ulogu ima nedavno uveden pristup *cloud computing* u kojem je naglasak na algoritmima, računalima i elektroničkoj komunikaciji putem umrežavanja i brzog prijenosa. Veoma zoran i dobro odrađen primjer te primjene je traženje puta za učinkovito liječenje onkoloških pacijenata.

U određivanju makromolekularnih struktura za mjerenje difrakcijskih intenziteta potrebni su intenzivni snopovi visokog sjaja i dobre kolimacije. U tom pravcu mali napredak su bile rendgenske cijevi s rotacijskom anodom. Revolucionarni korak učinjen je ranih 80-ih godina 20. stoljeća upotrebom sinkrotrona. Ubrzani napredak tehnologije donio je novu generaciju sinkrotrona energije 8 GeV, koji opskrbljuju kristalografe dobro kolimiranim monokromatskim zračenjem velikog intenziteta (kojem po izboru mogu

mijenjati valnu duljinu) za difrakciju na malim (u promjeru oko 50 μm), slabo difraktirajućim kristalima te kristalima velikih jediničnih ćelija (u pravilu velikih molekula i njihovih ansambala) poput virusa, ribosoma i proteinskih heterogenih i oligomernih kompleksa.

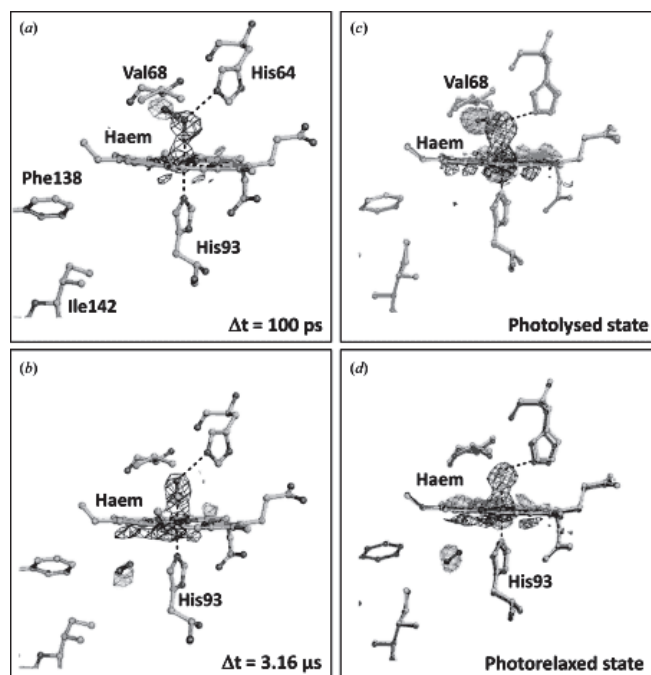
Primjenom anomalnog raspršenja zračenja (SAD i MAD) u određivanju faza strukturnih faktora, opisano u prethodnom odjeljku *Teorijske osnove rendgenske difrakcije*, znatno je pridonijelo pojednostavljenju tog složenog postupka.

Dinamička teorija rendgenske difrakcije, koja potpuno počiva na temeljima Maxwellove teorije elektromagnetizma, ima veliku primjenu u rendgenskoj interferometriji, topografiji kristala i u širokom području upotrebe sinkrotrona. Sinkrotroni su otvorili brojne mogućnosti za dinamičku kristalografiju, kojom se prate iznimno brze strukturne promjene molekula u vremenu. Proteini podliježu promjenama konformacije tijekom njihovih bioloških funkcija, ili/i dolazi do migracije protona ili elektrona. Stoga primjena te metode doprinosi razumijevanju veze između dinamike i funkcije i suštine samog mehanizma biološkog procesa.^{26–30} Promjene konformacije mogu imati nekoliko faza koje prate tijekom reakcije: polazna konformacija, put k prijelaznom stanju, aktivni oblik, te vraćanje u početno stanje. Svaku od tih faza nije moguće zamrznuti u kristalu i strukturno je karakterizirati. Stoga je razvijen niz modifikacija metode vremenski razlučene Laueove difrakcije (slika 9) gdje se bilježi niz brzih Laueovih snimaka upotrebom kratkih laserskih pulsova inducirajući kaskadu kratkoživućih promjena u proteinu i/ili njegovu kompleksu; prvi, ali i danas istraživani sustav je mioglobin i njegov kompleks s ugljikovim monoksidom (slika 10), na kojem je ilustriran cjelokupan razvoj metode.^{26–28} Fotosintetski reakcijski centri u bakterijama i biljkama su sustavi podesni za izučavanje tom metodom (fotoaktivni žuti protein²⁹ i bakteriorodopsin³⁰).



Slika 9 – Uređaj za mjerenje difrakcijskih intenziteta metodom Lauea s vremenskim razlučivanjem i primjenom laserske pobude na sinkrotronu u ESRF-u, Grenoble. Sinkrotronsko zračenje dobiveno trećom generacijom uređaja proizvodi rendgenske pulsove trajanja od oko 100 ps koji difrakcijom daju zadovoljavajuću Laueovu difrakcijsku sliku. Laserom se iniciraju kratkoživuće promjene u proteinu, čije se dinamičke slike bilježe i interpretiraju uz pomoć odgovarajućih softvera.²⁸

Fig. 9 – Pump-probe Laue setup on the beamline ID09-B at ESRF in Grenoble.²⁸



Slika 10 – Laueova metoda – promjene uzrokovane fotodisocijacijom ugljikovog monoksida u odnosu na hem-skupinu mioglobina i prate ih mape elektronske gustoće (preuzeto iz literaturnog izvora 26)

Fig. 10 – Laue-pump method – changes introduced by photodissociation of carbon monoxide in relation to haem-group are recorded and visible in electron density maps²⁶

Dinamički aspekt neobično je važan za rasvjetljavanje interakcija molekula praćenjem promjena u elektronskoj strukturi tijekom kemijskih reakcija malih i velikih molekula pridonoseći razumijevanju mehanizama kemijskih reakcija i života stanice (femtokemija i femtobiologija). Među prvim biološkim primjerima bilo je izučavanje *in situ* interakcije vezanja kisika u hemu u procesu disanja, pri čemu se neki detalji još uvijek istražuju najnovijim metodama. Tijekom unapređenja dinamičke kristalografije uz usavršavanje izvora zračenja nužno je koristiti kriotehniku.

Velik napredak u eksperimentalnim postupcima mjerenja difrakcijskih intenziteta za opće namjene je primjena kriotehnike. Hlađenjem kristala tekućim dušikom (do 90 K) ili helijem (3 – 5 K) za vrijeme mjerenja difrakcijskih intenziteta znatno se poboljšava njihova kvaliteta, a također omogućava mjerenje temperaturno ili na zraku nestabilnih uzoraka. Smrzavanje uzoraka smanjuje radijacijsko oštećenje i onemogućava "klizanje" kristala na nosaču iz zadanog položaja za vrijeme mjerenja. Time se produljuje "život" kristala izloženog zračenju i pridonosi boljem razlučivanju podataka; hlađenjem uzorka smanjuju se temperaturne vibracije atoma i time povećava razlika između mjenog difrakcijskog intenziteta i pozadinskog zračenja (veća razlika između signala i šuma). Time se koncentrira elektronska gustoća i točnije se može odrediti položaj atoma u jediničnoj ćeliji, što je posebno važno za atome male moći raspršenja, kao što je vodikov atom. Kriotehnike su nezaobilazne u studiju faznih prijelaza raznih spojeva³¹ koji su zanimljivi u znanosti o materijalima. Izučavanje prijenosa i raspodjele naboja temelji se na točnom određivanju elek-

tronske gustoće, pa je i u ovom području upotreba kriotehnike obavezna.

Analiza elektronske gustoće usmjerena na izučavanje raspodjele naboja razlikuje se proceduralno od standardne rendgenske strukturne analize i uz to mjerenja difrakcijskih intenziteta vrše se na temperaturama manjim od 20 K (upotrebom ukapljenog helija). Tako dobivene mape elektronske gustoće ukazuju na detalje elektronske strukture i njene promjene uzrokovane atomima u kemijskoj vezi. Osim podataka o karakteru intramolekularnih kontakata ti podaci omogućavaju izučavanje i intermolekularnih interakcija. Eksperimentalno dobiveni podaci usporedivi su s računima *ab initio* i oni pokazuju prekrivanje atomskih orbitala, usamljene elektronske parove, savijanje kemijske veze u napregnutim prstenovima, π -interakcije, polarizacijske učinke, kao i deformacije elektronske gustoće u vodikovim vezama. Razumljivo je da revizija različitih aspekata kemijske veze počiva na takvim studijama elektronske gustoće i da ima veliko značenje u kemiji, biologiji i fizici čvrstog stanja.

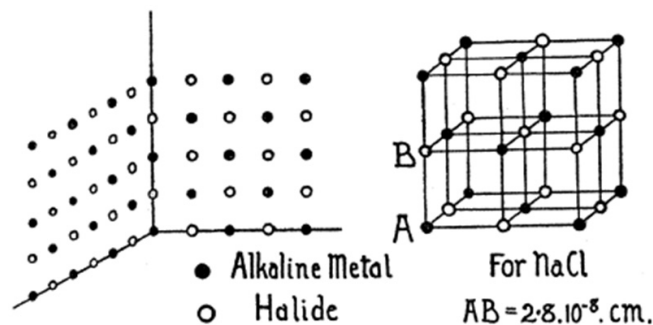
Otkrića postignuta rendgenskom difrakcijom koja su izmijenila postojeće spoznaje i otvorila vidike ka vizijama bliske i dalje budućnosti

Na samom početku primjene rendgenske difrakcije u određivanju struktura jednostavnih molekula pokazalo se da su mnogi koncepti o kemijskoj vezi bili neprikladni ili pogrešni. Odabrani su neki jednostavni povijesni primjeri, koji su predstavljali prekretnicu u načinu razmišljanja o prirodi kemijske veze i interakciji molekula. Opisani su primjeri koji su utvrdili postojanje ionske, kovalentne i aromatske veze.

Natrijev klorid bio je prva kristalna tvar čija struktura je određena na atomskoj razini: riješili su je 1913. otac i sin Bragg (slika 11).^{13,32} Određivanje kristalne strukture NaCl pokazalo je da se naizmjenično u kristalnoj rešetki izmjenjuju ioni natrija i klora, tako da je svaki kation okružen sa šest aniona i obrnuto. Sve su udaljenosti među ionima jednake, dakle ne postoji molekula NaCl niti neke naročite veze među atomima; na okupu ih drže samo elektrostatske privlačne sile. Iako se znalo da kuhinjska sol u vodi disocira na natrijeve i kloridne ione, zamišljalo se da u čvrstom stanju postoje molekule NaCl, u kojima su atom natrija i atom klora povezani kemijskom vezom. Braggov je rad pokazao da je takav koncept bio pogrešan.

Iste su godine otac i sin Bragg odredili kristalnu strukturu dijamanta³³ (slika 12), u kojoj je svaki ugljikov atom okružen s četiri bliska susjeda, raspoređena u obliku tetraedra. U ovakvom se pakiranju nalaze šupljine i njih se može objasniti kemijskim vezama između četverovalentnih atoma. Različita svojstva soli, kao i dijamanta, mogla su se konačno objasniti različitim kristalnim strukturama, koje su pak posljedica različite prirode privlačne sile među atomima.

Poznavanje kemijske veze i njezine prirode prije sto godina bilo je vrlo oskudno. Upravo su te dvije kristalne strukture ključni primjeri kako eksperimentalne spoznaje utječu na

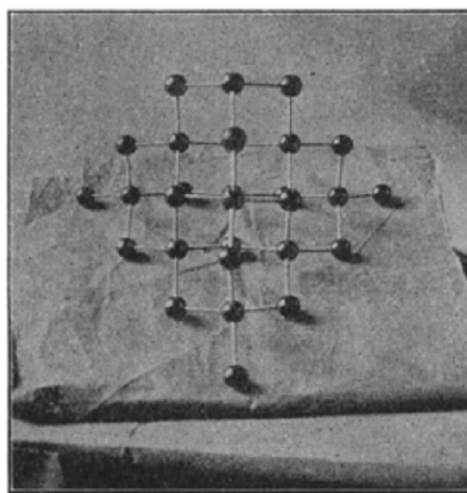
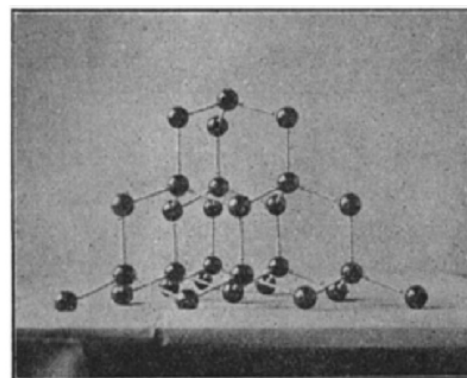


Slika 11 – Prvi prikaz unutarnje građe nekog kristala – struktura natrijeva klorida, koju su 1913. objavili otac i sin Bragg³²

Fig. 11 – The first scheme of internal structure of a crystal – sodium chloride, published by father and son, William and Lawrence Bragg in 1913³²

razvoj teorije kemijske veze. Model elektronskih parova i okteta postavio je već 1916. Gilbert N. Lewis, te je opisao dva osnovna tipa kemijske veze: ionsku i kovalentnu. Natrijev je klorid prototip ionskog spoja, dijamant je prototip kovalentnog.

Primjer aromatskog spoja, benzen, izolirao je iz rasvjetnog plina Faraday još 1825. i odredio mu kemijsku formulu C_6H_6 . Njegova kemijska svojstva, kao i svojstva sličnih spojeva, prilično se razlikuju od ostalih ugljikovodika, pa se svrstavaju u posebnu skupinu organskih spojeva. Budući da

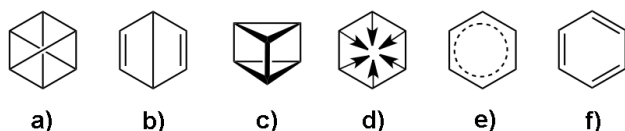


Slika 12 – Kristalna struktura dijamanta³³

Fig. 12 – Crystal structure of diamond³³

se tada o njihovoj građi još nije znalo ništa, nazvani su "aromatskima" i to su ime dobili zbog vrlo izražene zajedničke karakteristike – jakog mirisa.

Sredinom 1860-ih Friedrich August Kekulé von Stradonitz zaključio je da benzen sadrži šesteročlani prsten s trima naizmjeničnim dvostrukim vezama (slika 13; legenda kaže da je tu formulu "vidio" u snu pa da ju je zapisao čim se probudio). No, ako je zaista tako, *orto*-disupstituirani benzen trebao bi imati dva izomera: u jednome su supstituenti razdvojeni jednostrukom, a u drugome dvostrukom vezom. Ni Kekuléu, niti ikojem drugom kemičaru, nikako nije polazilo za rukom odvojiti ta dva spoja, i izgledalo je kao da s Kekuléovom formulom nešto nije u redu. Tijekom 19. stoljeća mnogi su kemičari predložili svoje strukturne formule benzena, koje su prikazane na slici 13. O prirodi aromatskih spojeva u to se vrijeme još ništa više nije moglo reći. Pitanje "Kako izgleda aromatski prsten?" početkom 20. stoljeća još je bilo otvoreno.

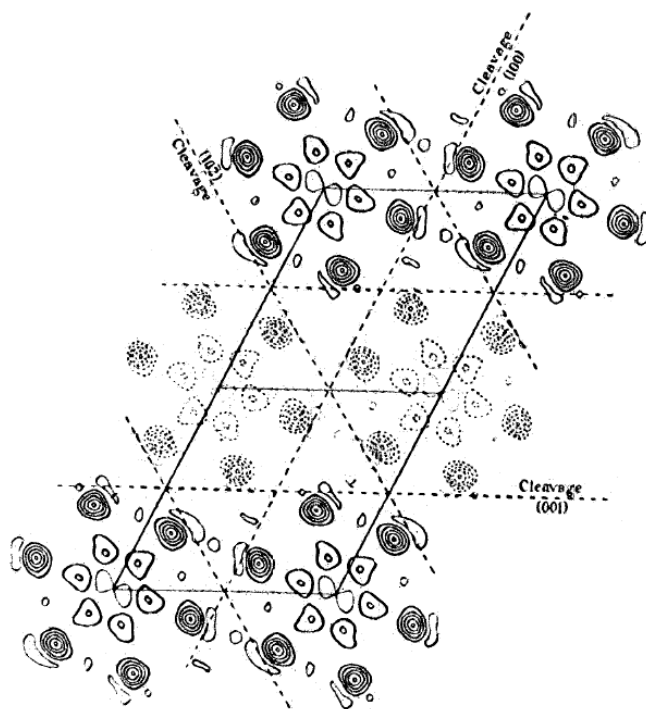


Slika 13 – Sheme benzenskog (aromatskog) prstena koje su predložili: a) Claus (1867.), b) Dewar (1967.), c) Ladenburg (1869.), d) Armstrong (1889.), e) Thiele (1899.) i f) Kekulé (1865.). Dewarov i Ladenburgov spoj pripremljeni su tijekom 20. stoljeća i danas su poznati kao Dewarov benzen i prizman.

Fig. 13 – Scheme of benzene (aromatic) ring proposed by a) Claus (1867), b) Dewar (1967), c) Ladenburg (1869), d) Armstrong (1889), e) Thiele (1899), f) Kekulé (1865). Dewar's and Ladenburg's compounds were prepared in the 20th century, and are today known as Dewar benzene and prismane.

Odgovor je dala tek rendgenska strukturna analiza. Krajem 1920-ih instrumenti i računske metode već su omogućavali određivanje kristalne strukture jednostavnijih aromatskih spojeva. Kathleen Lonsdale (1903. – 1971.), tada asistentica na University College of London, odredila je prve strukture organskih molekula. Prvi problem bio je odabrati prikladan spoj i pripremiti dovoljno velike kristale. Tadašnja tehnika zahtijevala je što manju molekulu s većom simetrijom, što je pomagalo određivanju faza strukturnih faktora. Benzen, iako najjednostavniji, nije bio prikladan jer je na sobnoj temperaturi tekućina. Bolji "kandidat" bio je heksametilbenzen, a određivanje njegove strukture bio je kompliciran i mukotrpan posao. Ipak, K. Lonsdale je uspjela dokazati da je aromatski prsten planaran, da su sve veze C–C u njemu jednako duge te da svi kutovi C–C–C iznose 120°. ³⁴ Dvije godine kasnije odredila je i strukturu heksaklorbenzena, ³⁵ koji sadrži identičan aromatski prsten. Ovaj je rad zanimljiv jer je u njemu prikazana raspodjela elektronske gustoće u kristalu (slika14).

Elektronsku strukturu aromatskog prstena protumačili su oko 1931. neovisno jedan od drugoga Pauling i Hückel; Pauling ju je zamislio kao "rezonantni hibrid" dviju Kekuléovih formula. Kada se preklape dvije Kekuléove strukture, dobije se prsten kod kojega su sve veze jednako duge, i po duljini su negdje na pola puta između jednostrukih i dvostrukih, upravo kao što je izračunala K. Lonsdale na temelju eksperimentalnih podataka.

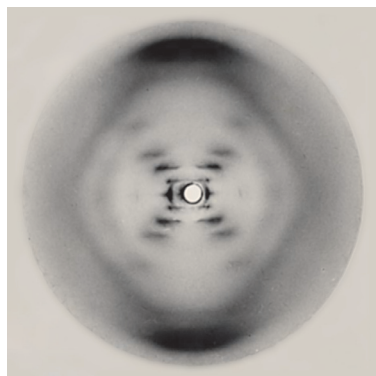


Slika 14 – Raspodjela elektronske gustoće u kristalu heksaklorbenzena. Maksimalni elektronske gustoće predstavljaju položaje atoma i proporcionalni su broju elektrona. Stoga se jači maksimumi mogu pripisati atomima klora, a slabiji atomima ugljika. Jasno se vidi pravilni šesterokut – aromatski prsten. ³⁵

Fig. 14 – Distribution of electron density in a hexachlorobenzene crystal. Electron density maxima correspond to atomic positions and are proportional to the number of electrons. Therefore stronger maxima should be attributed to chlorine, and the weaker to carbon atoms. A regular hexagon – the aromatic ring – is clearly visible. ³⁵

Veoma važan i zanimljiv primjer doprinosa rendgenske strukturne analize neposredno organskoj kemiji i znanosti o životu je određivanje apsolutne konfiguracije primjenom anomalne disperzije rendgenskog zračenja. J. M. Bijvoet ³⁶ je 1949., određivši apsolutnu konfiguraciju natrijeva rubidijeva tartarata, pokazao da je proizvoljno pripisana desna konfiguracija glicerinaldehida doista ispravna, čime su izbjegnute promjene do tada pripisanih konfiguracija prema glicerinaldehidu. Kako su molekule od presudne važnosti za život također kiralne, očito je Bijvoetovo otkriće bilo od velikog značenja i nije opravdano da je izbjeglo pozornosti Nobelova komiteta.

Struktura DNA s dvostrukom uzvojnicom određena iz rendgenograma 1953. definitivno je najveće otkriće 20. stoljeća, koje nas je dovelo do neslučenih spoznaja i time otvorilo posve nove znanstvene discipline poput molekularne genetike i strukturne molekularne biologije. Utjecaji tih spoznaja još su dalekosežniji u biologiji, medicini, farmakologiji, agronomiji, biotehnologiji, geologiji i drugim područjima. Rosalind Franklin i student Raymond Gosling snimili su kvalitetne difrakcijske fotografije vlakna DNA (slika 15) i utvrdili dvije forme: suha – forma A i vlažna – forma B, koje su upućivale na helikoidalnu strukturu DNA molekule ³⁷. Za dobivanje kvalitetnih snimaka R. Franklin je sama usavršila rendgenski uređaj, ali unatoč tome bilo je potrebno oko 100 sati izlaganja uzorka rendgenskom zračenju. M. Wilkins je bez znanja R. Franklin prosljedio slike

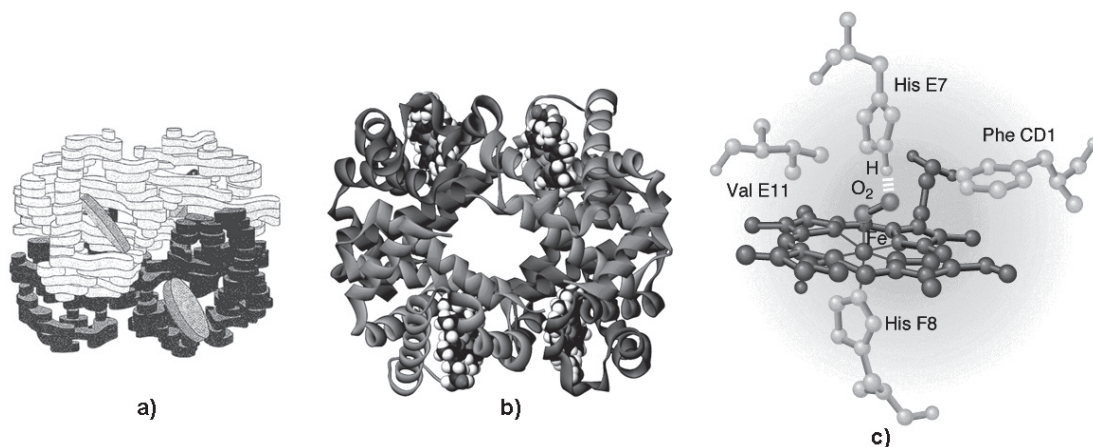


Slika 15 – Fotografiju rendgenske difrakcije niti DNA, koja ukazuje na strukturu molekule, s dvostrukom uzvojnicom, snimila je Rosalind Franklin³⁷

Fig. 15 – Fibre diffraction pattern of DNA suggesting a double helix structure was recorded by Rosalind Franklin³⁷

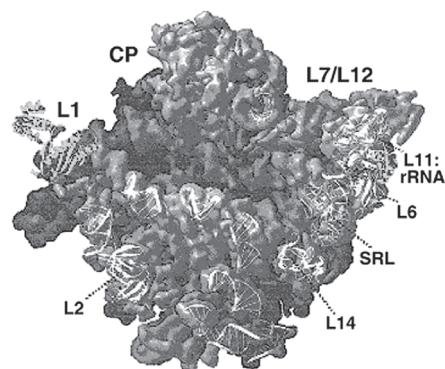
Watsonu i Cricku, kojima je poslužila kao osnova za postavljanje modela dvostruke uzvojnice.³⁸ Watson, Crick i Wilkins su za to otkriće 1962. podijelili Nobelovu nagradu; Rosalind Franklin, koja je umrla 1958., ostala je posve neopravdano gotovo zaboravljena.

Ključno otkriće vezano uz molekule života je prvo određivanje strukture proteinskih molekula hemoglobina i mioglobina. Max Perutz³⁹ je 1938. uspio dobiti prvu difrakcijsku sliku hemoglobina, dok je do otkrića cijele proteinske strukture došao mnogo godina kasnije (1960).⁴⁰ Tijekom svih tih godina trebalo je razviti mnoge eksperimentalne i računske tehnike kako bi se dobili točniji i brojniji difrakcijski intenziteti, što je od ključne važnosti za određivanje strukture proteinske molekule. Na temelju takve slike (slika 16) Perutz je dao osnove mehanizma procesa disanja. Postignuća na utvrđivanju struktura hemoglobina i mioglobina donijele su M. Perutz i J. Kendrewu Nobelovu nagradu 1962. Tek današnje metode dinamičke kristalografije pružaju uvid u tijek vremenskih promjena koje potpunije objašnjavaju mehanizam tog za život važnog procesa.²⁷



Slika 16 – Struktura hemoglobina: a) jedan od prvih modela s niskom rezolucijom (5,5 Å); sivi diskovi predstavljaju molekule hema; preuzeto iz ref. 40), b) moderniji računalni prikaz hemoglobina (proteinski dio je prikazan kao vrpca (α -uzvojnica), a molekule hema kao van der Waalsove kugle), c) vezanje molekule kisika na željezo iz hema

Fig. 16 – Structure of haemoglobin: a) one of the first low-resolution (5.5 Å) models (gray disks represent haeme moieties)⁴⁰, b) a more modern computer rendering of haemoglobin (protein part is represented as a ribbon (α -helix), and haeme molecules as van der Waals spheres), c) binding of an oxygen molecule to an iron atom from haeme

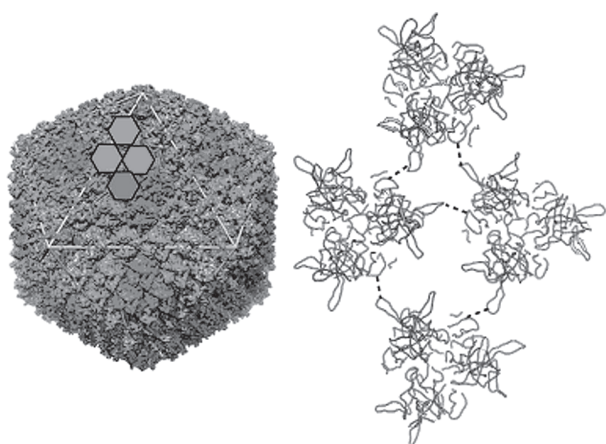


Slika 17 – Krunasti pogled podjedinice 50S ribozima s proteinima i dijelovima RNA^{41,42}

Fig. 17 – “Crown” view of the 50S subunit of ribozyme with ribbon representations of protein and RNA-fragment structures^{41,42}

Današnje metode i tehnike kojima raspolaže rendgenska strukturalna analiza omogućile su da je proteinska kristalografija jedna od ključnih metoda u karakterizaciji proteina i njihovih kompleksa i u izučavanju mehanizama njihova djelovanja u stanicama. Protein Data Bank²⁰ do sada pohranjuje 86487 proteinskih struktura (podatak uzet 27. 11. 2012). Odabrali smo pokazati strukture ribozima i dvaju virusa. Odabir je subjektivan jer su mogućnosti izbora velike. Naš kriterij bio je kompleksnost molekula i time velik izazov za određivanje strukture i nadasve biološka uloga odabranih “manekena”.

Metode suvremene kristalografije mogu doprijeti do suštine događaja u biološkim stanicama; izdvojeni primjeri to veoma očito dokazuju. Otkriće strukture bakterijskog ribozima (koji sadrži oko dvije trećine RNA i jednu trećinu proteinskih molekula), minitvornice proteina u stanici, jedno je od kapitalnih otkrića na razmeđu dvaju stoljeća. Istraživanja su trajala više od 40 godina dok se došlo do spoznaje o građi i osnovama njezine funkcije. Ribozim (slika 17) je vezan uz sintezu proteina u stanici i dokazano je da ima



Slika 18 – Shematski prikaz rasporeda glavnih proteina kapsida (heksoni i pentoni) u adenovirusu. Desno je prikazana interakcija promjenjivih proteinskih dijelova koji pomažu u stabilizaciji kapsida.²⁰

Fig. 18 – Schematic drawing of an adeno virus. Interaction of variable protein parts which help stabilization of the capsid is shown at right.²⁰

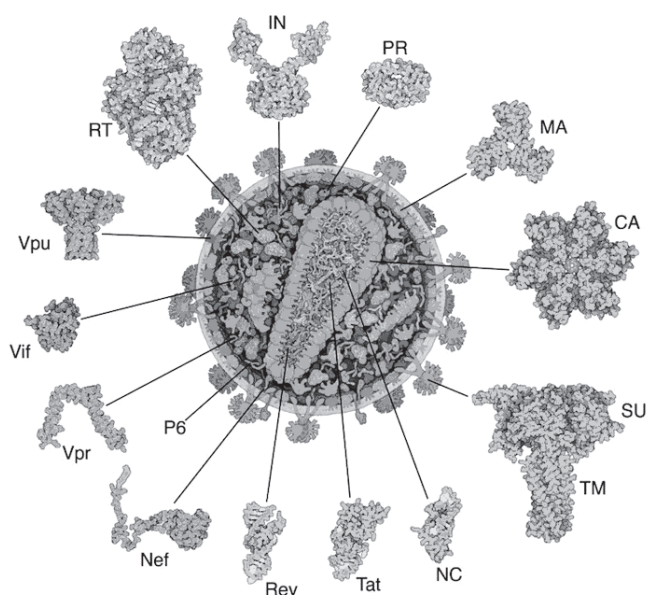
enzimsku ulogu, pa je stoga ispravno reći “ribozim”. Laureati Nobelove nagrade za kemiju u 2009. V. Ramakrishnan, T. Steitz i Ada Yonath otkrili su kako priroda zapis od četiri slova (A, C, G, T) pretvara u život. Izučavanje pokrenuto istraživačkom znatiželjom objasnilo je mehanizam jednog od temeljnih životnih procesa i istodobno pružilo mogućnost zaštite života blokiranjem funkcije ribozima u patogenim bakterijama. Poznavanje strukture i mehanizma ključno je za pripremu učinkovitih antibiotika i razumijevanje pojave rezistencije patogenih bakterija.

Ljudski adenovirus do sada je jedna od najvećih (150 MDa) struktura riješenih metodom rendgenske difrakcije s razlučivanjem od 3,5 Å i objavljena je 2012. Struktura⁴³ pokazuje položaj svih konstituenata gotovo na atomnoj razini, terciarnu strukturu i interakciju proteina s unutarnje i vanjske strane kapsida. Ti podaci su temelj za razumijevanje interakcije virusa i stanice domaćina.

Za proučavanje djelovanja virusa HIV-1 na stanice domaćina bila je ključna izolacija njegova enzima aspartil-proteaze,^{44,45} koja je najmanja od poznatih viralnih proteaza sa svega 99 aminokiselina. Trenutačno Protein Data Bank²⁰ pohranjuje više od 500 struktura varijanti tog enzima i mutanata, od čega su više od polovice kompleksi s inhibitorima ili lijekovima. Proteklo je 25 godina upornog i intenzivnog istraživanja strukturne biologije HIV-a, koje je dovelo do spoznaja o atomnoj građi ovog virusa i načinu njegova djelovanja na ljudski organizam. Današnja praksa pri iznalaženju učinkovitih terapeutika uključuje rendgensku strukturnu analizu proteina i potencijalnih lijekova, molekularno modeliranje, te molekularnu genetiku i proteomiku.

Quo vadis?

Kroz milijarde godina evolucije Priroda stvara učinkovite sustave i spojeve na zemlji kakve poznajemo danas. Jednim dijelom ljudska znatiželja ide za time da otkrije što više



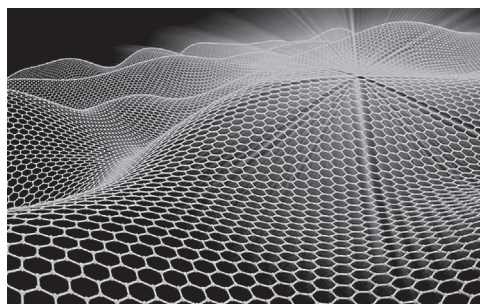
Slika 19 – Virus HIV-a sastavljen je od dvolančaste RNA, 15 tipova proteina karakterističnih za viruse i od nekoliko proteina stanice inficiranog domaćina, koji su zajedno okruženi dvostrukom lipidnom membranom. Zajedno, sve molekule pomažu virusu inficirati stanice imunostnog sustava i prisiliti ih da grade kopije virusa. Svaka molekula u virusu ima ulogu u tom procesu.²⁰

Fig. 19 – HIV (human immunodeficiency virus) is composed of two strands of RNA, 15 types of viral proteins, and a few proteins from the last host cell it infected, all surrounded by a lipid bilayer membrane. Together, these molecules allow the virus to infect cells of the immune system and force them to build new copies of the virus. Each molecule in the virus plays a role in this process, from the first steps of viral attachment to the final process of budding.²⁰

nepoznatog, ali znanstvenici izloženi pritisku otkrića što više primjenljivog znanja, sve se više okreću oponašanju prirode. Pojednostavljeno gledano, želimo imati neograničene izvore energije i “izmisliti” pametne molekule, koje će raditi sve ono što nam je potrebno. Potrebno je znati kako treba izgledati zamišljena molekula koja će nam “odradivati” upravo ono što želimo. Stoga rendgenska difrakcija postaje nezaobilazna metoda u toj utakmici za pametnim molekulama. Naravno, sintetski kemičari i fizičari čvrstog stanja, kao i teoretičari imaju pune ruke posla. Očito je da su interdisciplinarnost i multidisciplinarnost imperativ suvremene znanosti.

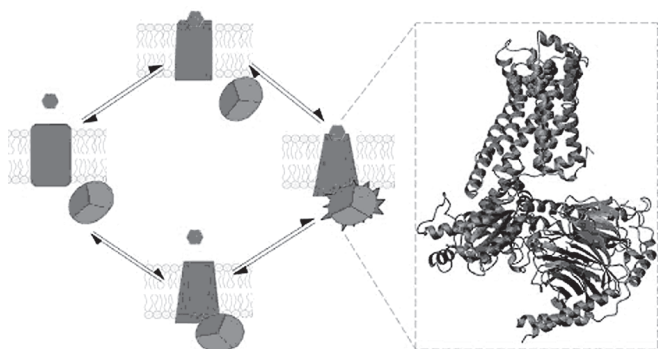
U području znanosti o novim materijalima zbiva se veoma mnogo uzbudljivih otkrića i veoma se teško odlučiti što odabrati prikazati da oduzme dah čitatelju. Kvantna računalna, koja su za sada samo misaoni proizvod, najbolje odražavaju ljudsku želju i znatiželju. Potrebno je napraviti materijal u kojemu će se moći kontrolirati prijenos elektrona i njihovih spinova (bez promjene energije sustava) primjenjujući temeljne principe kvantne fizike. Ništa manje nisu uzbudljiva istraživanja u kojima su silicijski čipovi zamijenjeni molekulama DNA na koje se mogu vezati različiti senzori i time programirati svojstva.

Novo čudo znanosti o materijalima je grafen – jednodimenzijski sloj grafita, koji nazivaju “čudesni materijal” jer je otporniji od dijamanta, a savitljiviji od gume. Modifikacijama grafena, koje se postižu uvođenjem raznih atoma na



Slika 20 – Univerzalna primjena – grafen može biti tranzistor, ali i učinkoviti filtar za vodu

Fig. 20 – Universal use – graphene can be a transistor but also an efficient water filter

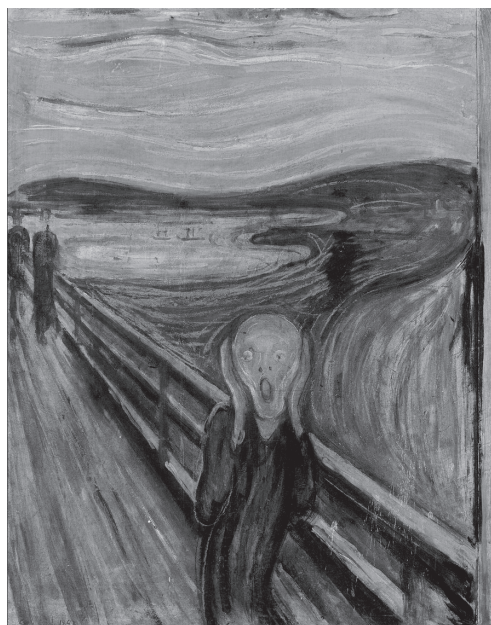


Slika 21 – Lijevo: model tercijarnog kompleksa preuzet iz referencije.⁴⁸ Termodinamički ciklus opisuje nastajanje kompleksa s hormonom (žuto), receptorom (modro) i G-proteinom (crveno). Desno: kristalna struktura aktivnog kompleksa prema koordinatama iz Protein Data Base, oznaka:3sn6.²⁰

Fig. 21 – Left: Ternary complex model adapted from.⁴⁸ A thermodynamic cycle describes the formation of a complex of ligand (yellow), receptor (blue) and G-protein (red). Right: Crystal structure of an active ternary complex. Ribbon model drawn from the coordinates from file 3sn6.pdb.²⁰

različita mjesta grafenskog sloja intermolekularnim interakcijama ili kovalentnim vezama, polučuju se materijali raznorodnih svojstava. Primjena tih hibrida ide od elektronike i računala do medicine. Priprava grafena i otkrivanje svojstava tog dvodimenzijskog materijala A. Geimu i K. Novoselovu donijeli su 2010. Nobelovu nagradu za fiziku. Gotovo svakodnevno se objavljuju hibridi grafena, koji pokazuju široku lepezu svojstava.

Teško je zaključiti ovaj “putokaz” u budućnost i ne spomenuti najnovije otkriće vezano uz određivanje strukture⁴⁶ i objašnjenje funkcije staničnih senzora⁴⁷ (receptora) GPCR (*G Protein Coupled Receptors*), koje je ove godine R. J. Lefkowitzu i B. K. Kobilki donijelo Nobelovu nagradu za kemiju. U okviru složenih staničnih procesa signalizacija je zasigurno jedan od najsloženijih. Nju prati kaskada povezanih događaja, koji predstavljaju odgovore stanica na vanjske podražaje. Kobilka i Lefkowitz sa suradnicima,^{46,47} uspjeli su izolirati događaj kad receptor prenosi signal s hormona, vezanog s vanjske strane stanice, na G-protein unutar stanice (slika 21). Istraživači su našli da u tijelu postoji ogroman broj takvih receptora, koji su zaduženi za prijenos signala. Osim toga postoje i multifunkcionalni re-



Slika 22 – Edvard Munch, Krik. “Priroda nije samo ono što je vidljivo oku. Ona uključuje unutarnju sliku duše.” (E. Munch)

Fig. 22 – Edvard Munch, The Scream. “Nature is not only all that is visible to the eye. It also includes the inner picture of the soul.”

ceptori, koji prepoznaju nekoliko različitih hormona. To istraživanje trajalo je više od dva desetljeća jer se radi o membranskim proteinima koji su eksperimentalno veoma zahtjevan problem: nisu topljivi u vodi, a osim toga se gibaju prilikom prijenosa signala, što oboje nalaže pripremu posebnih uvjeta za njihovu kristalizaciju. Dakle, kad vas netko preplaši ili nešto izazove tjeskobu u vama (slika 22) ili pak uživate u ukusnoj hrani, pokušajte pogoditi koji će se hormon kompleksirati s kojim od receptora da bi predali signal G-proteinu u vašim stanicama.

Napomena: Opsežniji prikaz ovog otkrića obilježenog Nobelovom nagradom za kemiju za 2012. godinu zabilježen je i u *Kem. Ind.*⁴⁹

Predviđanje u znanosti nije pametan poduhvat, što očito potvrđuje domet spomenutih istraživanja u ovom pregledu. Mogućnosti su velike i ljudski um i mašta su neograničeni.

ZAHVALA / ACKNOWLEDGMENT

Autori zahvaljuju izdavaču za korištenja ilustracije, ranije objavljene u članku S. Westenhoff, E. Nazarenko, E. Malmberg, J. Davidsson, G. Katona, R. Neutze, *Time-resolved structural studies of protein reaction dynamics: a smorgasbord of X-ray approaches*. Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry (RSC) for the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and the RSC and that any electronic version of the work includes a hyperlink to the article on the Royal Society of Chemistry website; dx.doi.org/10.1039/b704249c.

Zahvaljujemo prof. dr. Nenadu Banu, Institute of Molecular Biology and Biophysics, ETH Zürich, za sliku podjedinice 50S čestice ribosoma.

Popis simbola i kratica**List of symbols and abbreviations**

| | |
|----------------------|--|
| a, b, c | – parametri jedinične ćelije – unit cell parameters |
| a*, b*, c* | – vektori recipročne rešetke – reciprocal lattice vectors |
| d_{hkl} | – razmak između susjednih ravnina u rešetki – spacing between the planes in the lattice |
| F(S) | – strukturni faktor – structure factor |
| f | – faktor raspršenja – scattering factor |
| h, k, l | – Millerovi indeksi, Laueovi indeksi (h) – Miller indices, Laue indices (h) |
| n | – red refleksije – reflection order |
| r | – vektor položaja – position vector |
| S | – vektor raspršenja – scattering vector |
| s | – valni vektor raspršenog zračenja – scattered beam wave vector |
| s₀ | – valni vektor upadnog zračenja – incident beam wave vector |
| V | – obujam – volume |
| x, y, z | – atomske koordinate – atomic coordinates |
| θ | – Braggov kut – Bragg angle |
| λ | – valna duljina – wavelength |
| ρ | – elektronska gustoća – electron density |
| φ | – razlika faza – phase difference |
| MAD | – anomalna disperzija više valnih duljina – multi wavelength anomalous dispersion |
| MIR | – višestruka izomorfna zamjena – multiple isomorphous replacement |
| SAD | – anomalna disperzija jedne valne duljine – single wavelength anomalous dispersion |
| SIR | – jednostruka izomorfna zamjena – single isomorphous replacement |

Literatura**References**

1. W. Friedrich, P. Knipping, M. Laue, Sitzungsber. Math. Phys. Kl. K Bayer. Akad. Wiss. München (1912) 303–322.
2. B. Kojić-Prodić, J. Kroon, (Bio)Crystallography at the Turn of the Millennium, *Croat. Chem. Acta* **74** (2001) 1–35.
3. J. M. Bijvoet, W. G. Burgers, G. Hagg (ur.), Early Years Diffraction of X-rays by Crystals, Vol. 1 i 2, International Union of Crystallography i A. Oosthoek's Uitgeversmaatschappij N.V., Utrecht, 1969. i 1972.
4. A. Authier, Optical properties of X-rays – dynamical diffraction, *Acta Cryst.* **A68** 4. (2012) 40–56.
5. H. Kubbinga, Crystallography from Haüy to Laue: controversies on the molecular and atomistic nature of solids, *Acta Cryst.* **A68** (2012) 3–29.
6. D. Schwarzenbach, The success story of crystallography, *Acta Cryst.* **A68** (2012) 57–67.
7. M. Eckert, Disputed discovery: the beginnings of X-ray diffraction in crystals in 1912 and its repercussions, *Acta Cryst.* **A68** (2012) 30–39.
8. P. P. Ewald (ur.), Fifty Years of X-ray Diffraction, International Union of Crystallography, Chester, 1962.
9. Croatian Crystallographic Association, URL: www.hazu.hr/kristalografi/IUCr/introduction.htm (27. 11. 2012.).
10. W. C. Röntgen, Über eine neue Art von Strahlen (Vorläufige Mitteilung) Sitzungber. Phys. Med. Ges. Würzburg **9** (1895) 132–141.
11. M. Laue, Kritische Bemerkungen zu den Deutungen der Photographie von Friedrich und Knipping, *Phys. Z.* **14** (1913) 421–423.
12. W. L. Bragg, X-rays and crystals, *Nature* **90** (1912) 219, 360–361; *ibidem*, The specular reflections, 410.
13. W. H. Bragg, W. L. Bragg, The reflections of X-rays by crystals, *Proc. R. Soc. London A* **88** (1913) 428–438.
14. W. L. Bragg, The structure of some crystals indicated by their diffraction of X-rays, *Proc. R. Soc. London Ser. A* **89** (1914) 248–277.
15. P. Debye, P. Scherrer, Interferenzen an regellos orientierten Teilchen im Röntgenlicht, *Nachr. Akad. Ges. Wiss. Göttingen math. physik. Kl. Ila* (1916) 1–26.
16. A. W. Hull, A new method of X-ray crystal analysis, *Phys. Rev.* **10** (1917) 661–696.
17. W. H. Bragg, X-rays and crystal structure, *Phil. Trans. R. Soc. London A* **215** (1915) 253–274.
18. W. L. Bragg, X-ray crystallography, *Sci. Am.* **219** (1968) 58–70.
19. P. P. Ewald, Zur Theorie der Interferenzen der Röntgenstrahlen in Kristallen, *Phys. Z.* **14** (1913) 465–472.
20. Protein Data Bank, URL: www.rcsb.org (29. 1. 2013.).
21. L. A. Kelley, M. J. E. Sternberg, Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server, *Nature Protocols* **4** (2009) 363–371.
22. M. G. D. Rossmann, D. M. Blow, The detection of sub units within the crystallographic asymmetric unit, *Acta Cryst.* **15** (1962) 24–31.
23. D. C. Hodgkin, Les Prix Nobel en 1964, Nobel Foundation (1965) 71–91.
24. D. Xie, C. Baerlocher, L. B. McCusker, Combining precession electron diffraction data with X-ray powder diffraction data to facilitate structure solution, *J. Appl. Cryst.* **41** (2008) 1115–1121.
25. S. Basso, C. Besnard, J. P. Wright, I. Margiolaki, A. Fitch, P. Pattison, M. Schiltz, Features of the secondary structure of a protein molecule from powder diffraction data, *Acta Cryst.* **D66** (2010) 756–761.
26. S. Westenhoff, E. Nazarenko, E. Malmerberg, J. Davidsson, G. Katona, R. Neutze, Time-resolved structural studies of protein reaction dynamics: a smorgasboard of X-ray approaches, *Acta Cryst.* **A66** (2010) 207–219.
27. Z. Ren, V. Šrajcar, J. E. Knapp, W. E. Royer Jr., Cooperative macromolecular device revealed by meta-analysis of static and time-resolved structures, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109** (2012) 107–112.
28. D. Bourgeois, F. Schotte, M. Brunori, B. Vallone, Time-resolved methods in biophysics. 6. Time-resolved Laue crystallography as a tool to investigate photo-activated protein dynamics, *Photochem. Photobiol. Sci.* **6** (2007) 1047–1056.
29. F. Schotte, H.-S. Choa, V. R. I. Kaila, H. Kamikubo, N. Dashdor, E. R. Henry, T. J. Graber, R. Henning, M. Wulff, G. Hummer, M. Kataoka, P. A. Anfinrud, Watching a signaling protein function in real time via 100-ps time resolved Laue crystallography, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109** (2012) 19256–19261.

30. K. Moffat, Ultrafast time resolved crystallography, *Nature Struct. & Mol. Biol.* **5** (1998) 641–643; Laue diffraction, *Methods in Enzymology* **277** (1997) 433–447.
31. K. Molčanov, B. Kojić-Prodić, D. Babić, D. Pajić, N. Novosel, K. Zadro, Temperature induced reversible structural and magnetic changes in a crystal of tetrachlorosemiquinone anion radical, *CrystEngComm* **14** (2012) 7958–7964.
32. W. L. Bragg, The diffraction of X-rays by crystals, Nobel Prize Lecture, 6. 9. 1922.
33. W. H. Bragg, W. L. Bragg, The structure of the diamond, *Proc. R. Soc. London A* **89** (1913) 277–291.
34. K. Lonsdale, The structure of the benzene ring in hexamethylbenzene, *Proc. R. Soc. London A* **123** (1929) 494–515.
35. K. Lonsdale, An X-ray analysis of the structure of hexachlorobenzene, using the Fourier method, *Proc. R. Soc. London A* **133** (1931) 536–552.
36. J. M. Bijvoet, A. F. Peederman, A. J. van Bommel, Determination of absolute structure of optically active compounds by means of X-rays, *Nature (London)* **168** (1951) 271–272.
37. R. Franklin, R. G. Gosling, Molecular configuration in sodium thymonucleate, *Nature* **171** (1953) 740–741.
38. J. D. Watson, F. H. C. Crick, A structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature* **171** (1953) 737–738; *ibidem*, Genetical implication of the structure of deoxyribonucleic acid, 964–967.
39. J. D. Bernal, I. Fankuchen, M. F. Perutz, X-ray analysis of haemoglobin, *Nature* **141** (1938) 523.
40. M. F. Perutz, M. G. Rossmann, A. F. Cullis, H. Muirhead, G. Will, A. C. T. North, Structure of haemoglobin: A three-dimensional Fourier synthesis at 5.5 Å resolution, obtained by X-ray analysis, *Nature (London)* **185** (1960) 416–422.
41. N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, T. Steitz, Science, The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution, **289** (2000) 905–920.
42. P. Nissen, J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore, T. Steitz, The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis, *Science* **289** (2000) 920–230.
43. G. R. Nemerov, P. L. Stewart, V. S. Reddy, Structure of human adenovirus, *Current Opinion in Virology* **2** (2012) 115–121.
44. M. A. Navia, P. M. D Fitzgerlad, B. M. McKeever, C.-T. Leu, J. C. Heimbach, W. K. Herber, I. S. Sigal, P. L. Darke, J. P. Spinger, Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1, *Nature* **337** (1989) 615–620.
45. R. L. Lapatto, T. L. Bludell, A. Hemmings, J. Overington, A. Wildespin, S. Wood, J. R. Merson, P. J. Whittle, D. E. Danley, K. F. Geoghegan, S. J. Hawrylik, S. E. Lee, K. G. Sheld, P. J. Hobart, X-ray analysis of HIV-1 proteinase at 2.7 Å resolution confirms structural homology among retroviral enzymes, *Nature* **342** (1989) 299–302.
46. S. G. Rasmussen, B. T. DeVree, Y. Zou, A. C. Kruse, K. Y. Chung, T. S. Kobilka, F. S. Thian, P. S. Chae, E. Pardon, D. Calinski, J. M. Mathiesen, S. T. Shah, J. A. Lyons, M. Caffrey, S. H. Gellman, J. Steyaert, G. Skinotis, W. I. Weis, R. K. Sunahara, B. K. Kobilka, Crystal structure of β_2 -adrenergic receptor-Gs protein complex, *Nature* **477** (2011) 549–555.
47. A. De Lean, J. Stadel, R. L. Lefkowitz, A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled β -adrenergic receptor, *J. Biol. Chem.* **255** (1980) 7108–7117.
48. The Nobel Prize in Chemistry. URL: www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/ (29. 1. 2013.).
49. M. Močibob, I. Weygand-Đurašević, Nobelova nagrada za kemiju za 2012. godinu, *Osvrti, Kem. Ind.* **61** (11–12) (2012) 554–556.

SUMMARY

The 100th Anniversary of X-Ray Crystallography

B. Kojić-Prodić* and K. Molčanov

The important thing in science is not so much to obtain new facts as to discover new ways of thinking about them.

W. L. Bragg

The 100th anniversary of X-ray crystallography dates back to the first X-ray diffraction experiment on a crystal of copper sulphate pentahydrate. Max von Laue designed the theoretical background of the experiment, which was performed by German physicists W. Friedrich and P. Knipping in 1912. At that time, the mathematical formulation of the phenomenon and the fundamental concepts of crystallography were subjects of mineralogy. Altogether, they facilitated the development of methods for determination of the structure of matter at the atomic level. In 1913, father and son Bragg started to develop X-ray structure analysis for determination of crystal structures of simple molecules. Historic examples of structure determination starting from rock salt to complex, biologically important (macro)molecules, such as globular proteins haemoglobin and myoglobin, DNA, vitamin B₁₂ and the recent discovery of ribozyme, illustrate the development of X-ray structural analysis. The determination of 3D structures of these molecules by X-ray diffraction had opened new areas of scientific research, such as molecular biophysics, molecular genetics, structural molecular biology, bioinorganic chemistry, organometallic chemistry, and many others. The discovery and development of X-ray crystallography revolutionised our understanding of natural sciences – physics, chemistry, biology, and also science of materials. The scientific community recognised these fundamental achievements (including the discovery of X-rays) by awarding twenty-eight Nobel prizes to thirty-nine men and two women. The explosive growth of science and technology in the 20th and 21st centuries had been founded on the detailed knowledge of the three-dimensional structure of molecules, which was the basis for explaining and predicting the physical, chemical, biological and pharmacological properties of molecules. A most recent and striking example is the still unfinished story of graphenes, occupying the front pages of leading scientific journals, such as *Science*, *Nature*, *Nature Materials*, *Nature Nanotechnology*, *Nature Chemistry* and *Nature Physics*. Contemporary crystallographic research covers numerous scientific domains, and it is a very innovative area of science. Who would dare to be a prophet and foresee future findings?

Rudjer Bošković Institute, Bijenička cesta 54,
10 000 Zagreb, Croatia

Received December 7, 2012
Accepted January 29, 2013