



A. Višnjevac\*

Institut Ruđer Bošković  
Bijenička c. 54, 10 000 Zagreb

## Hot Topics in Contemporary Crystallography 2014–2024

# Deseti rođendan jedine hrvatske kristalografske škole



HRVATSKA  
UDRUGA  
KRISTALOGRAFA  
CROATIAN  
ASSOCIATION of  
CRYSTALLOGRAPHERS



HrZZ  
Hrvatska zaklada  
za znanost

### Sažetak

Autor, ujedno i idejni začetnik i voditelj organizacijskog tima, predstavlja vlastito viđenje evolucije jedine hrvatske kristalografske škole, koja u trenutku nastanka ovog teksta slavi desetu obljetnicu i šest priređenih izdanja. Istaknute su okolnosti i razlozi zbog kojih je škola pokrenuta te razvoj razmišljanja organizacijskog tima i sazrijevanje programskog koncepta. Autor iskreno piše i o poteškoćama i pogreškama u pristupu koje su pratile organizaciju škole tokom njezinih prvih deset godina. Tekst je dopunjen osnovnim objašnjenjima stručnih termina, metoda i tehnika koje se spominju te popisom relevantnih literaturnih izvora za zainteresirane čitatelje.

### Uvod

Problem nedostatka sustavne poduke kristalografije u kurikulumu diplomskih studija na javnim sveučilištima i visokim školama diljem Europe rezultirao je pojavom velikog broja ljetnih škola, tečajeva i radionica, koje pokušavaju popuniti tu prazninu u javnom obrazovnom sustavu, nudeći studentima diplomskih i poslijediplomskih studija zgusnute edukativne programe u području kristalografije, vrlo različite kvalitete. Po iznimnoj kvaliteti predavača i programa te vrhunskom organizacijom, iz mnoštva konkurenata osobito su se izdvojile škola Britanske kristalografske zajednice (*BCA Durham Crystallography School*) te čuvena Međunarodna kristalografska škola u Ericceu. Akutni problem nedostatka sustavne poduke u području kristalografije ponukao je i Europsku kristalografsku zajednicu (ECA) da još 2014. pokrene ambiciozno zamišljenu Europsku kristalografsku školu, koja bi se svake godine održavala drugdje, ali bi imala zadane programske konture kojih bi se organizatori trebali držati. Unatoč velikoj potpori ECA-e, taj zahtjevni pothvat, čini se, još nije prebolio svoje dječje bolesti, niti našao svoje mjesto pod suncem na zahtjevnom tržištu srodnih projekata. Sve u svemu, mogli bismo reći da škola i radionica koje nude poduku u području kristalografije ima mnogo, ali da je zapravo malo njih zaista kvalitetno. Mi u Hrvatskoj udružiti kristalografa (HUK) odavno smo uočili taj problem, no trebalo nam je vremena da se osmijelimo upustiti u projekt organizacije ozbiljne međunarodne škole u Hrvatskoj. Prilika se

ukazala nakon što smo, sad već daleke 2012., prihvatili ponudu ECA-e da u Hrvatskoj priredimo 29. europski kristalografski kongres (ECM29).

### Početak

Ove godine, upravo u vrijeme kad pišem ovaj tekst, Hrvatska udruga kristalografa (HUK)<sup>1</sup> obilježava desetu obljetnicu pokretanja prve i, do današnjeg dana, jedine hrvatske kristalografske škole – *Hot Topics in Contemporary Crystallography (HTCC)*, čije je prvo izdanje (HTCC1) održano od 10. do 15. svibnja 2014. u Šibeniku. Te godine obilježavali smo 100-tu obljetnicu Nobelove nagrade Maxu von Laueu za otkriće difrakcije rendgenskih zraka na monokristalima, a UN ju je, tim povodom, proglasio Svjetskom godinom kristalografije (IYCr 2014). HTCC1 je bio zamišljen kao središnji događaj kojim će se obilježiti svjetska godina kristalografije u Hrvatskoj, no perspektiva škole nije bila sasvim jasna. Naime, u svijetu je u tom trenutku postojao (a postoji i danas) velik broj radionica, ljetnih škola i tečajeva kristalografije u širokom rasponu kvalitete i popularnosti. Naći svoje mjesto pod suncem u toj situaciji nije lako, osobito ako organizaciju provodite u zemlji s vrlo malom kristalografskom zajednicom i skromnom infrastrukturom za kristalografska istraživanja, pa onda posljedično i relativno neprepoznatoj na svjetskoj kristalografskoj karti. Promišljajući budućnost, mi smo svega toga bili savršeno svjesni. HTCC1 je, međutim, i organizacijski i financijski, proveden vrlo uspješno, uz sudjelovanje 27 studenata i šest svjetski poznatih predavača, stručnjaka koji su u svojim područjima, bez ikakvog pretjerivanja, među vodećima u svijetu. Tako smo imali zadovoljstvo ugostiti prof. Dietmara Stalkea sa Sveučilišta u Göttingenu, prof. Howarda Flacka sa Sveučilišta u Ženevi (po kojem je nazvan čuveni parametar koji pokazuje vjerodostojnost određivanja pravog enantiomera u optički čistim kristalima),<sup>2</sup> prof. Elspeth Garman sa Sveučilišta u Oxfordu, prof. Hans-Beata Bürgija sa Sveučilišta u Zürichu te dr. Regine Herbst-Irmer, jednu od najvećih svjetskih autoriteta za rješavanje problema sraslih kristala, sa Sveučilišta u Göttingenu.<sup>3</sup> Skup su financijski poduprli ECA i Međunarodni savez kristalografa (IUCr), što nam je omogućilo osigurati potporu za sudjelovanje značajnog broja doktoranada i poslijedoktoranada. Na skup je, na svoju inicijativu, a kao poseban gost organizacijskog odbora, došao i prof. Andreas Roodt, tadašnji predsjednik Europske kristalografske zajednice.

U godinama koje su slijedile, Hrvatska udruga kristalografa imala je iznimnu čast, ali i veliku odgovornost, organizirati u Hrvatskoj dva velika međunarodna kristalografska događaja: 29. europski kristalografski kongres (ECM29) u Rovinju 2015. te Treću europsku kristalografsku školu (ECS3) u Bolu na Braču 2016. ECM29 je, kako je to, uostalom, na svečanosti otvaranja skupa istaknuo i prof. Santiago García-Granda (onda član izvršnog odbora ECA-e, a danas predsjednik IUCr-a), doslovno, postavio Hrvatsku na kri-

\* Dr. sc. Aleksandar Višnjevac, viši znanstveni suradnik IRB-a i predsjednik Hrvatske udruge kristalografa, e-pošta: [aleksandar.visnjevac@irb.hr](mailto:aleksandar.visnjevac@irb.hr)



Slika 1 – Sudionici prvog HTCC-a u Šibeniku, 2014

stalografsku kartu Europe i svijeta.<sup>4</sup> Napore organizatora, na čelu s mojom malenkosću, prepoznali su ECA i IUCr, ali i cijela međunarodna kristalografska javnost.

ECM29 je okupio čak 1052 registrirana sudionika, što je rekord europskih kristalografskih kongresa koji nije potučen do današnjeg dana (u kolovozu ove godine održava se njegovo 34-to izdanje u Padovi). Organizacijski odbor ECM29 je za prigodu održavanja tog skupa, uz pomoć službene agencije za organizaciju kongresa, Globtour Eventa, potpuno preuređio staru tvornicu duhana u Rovinju, čime je kreiran jedinstveni konvencijski prostor, a u teškim pregovorima s Maistra d. d, vlasnikom većine hotelskih kapaciteta u Rovinju, usprkos terminu kongresa u visokoj sezoni, osigurao smještajne kapacitete dostatne za sve zainteresirane sudionike. Zbog raspršenosti smještajnih kapaciteta, u vrijeme održavanja ECM29 organizirali smo i dvije ECM-ove redovne lokalne autobusne linije s redovitim polascima desetak puta tijekom dana, te je, zahvaljujući nama, tih dana Rovinju imao svojevrsan gradski prijevoz. Naredne godine priredili smo, također na poziv ECA-e, Treću europsku kristalografsku školu (ECS3) u Bolu na Braču. Organizacijski tim bio je u pouzdanim rukama HUK-ove rizničarke dr. Jasminke Popović, i škola je, s preko 100 sudionika, nadmašila sva očekivanja.

Razumljivo je da HUK, sa svojih dvadesetak članova, nije imao kapacitete za zahtjevnu organizaciju vlastite kristalografske škole (HTCC) u godinama kad je sve snage trebalo usmjeriti na organizaciju ECM-a i ECS-a te opravdati povjerenje koje nam je ukazao Izvršni odbor ECA-e, povjerivši nam priređivanje tih velikih i važnih skupova. No već 2017. godina donijela je drugo izdanje HTCC-a.

## Sazrijevanje

HTCC2 je održan u Poreču od 22. do 26. travnja 2017., uz djelovanje 20 studenata iz desetak europskih zemalja. Znanstveni koncept HTCC2 zrcalio je sazrijevanje organizacije i pokazao sasvim jasnu usmjerenost prema istinski najnovijim dostignućima u kristalografiji i znanostima o strukturi. Dok je HTCC1, uz vrhunske predavače, ipak bio usmjeren na, više ili manje, temeljne kristalografske teme, HTCC2 je donio neusporedivo uzbudljiviji sadržaj: serijsku kristalografiju (*serial crystallography*),<sup>5</sup> kristalografiju pod ekstremnim uvjetima<sup>6</sup> te studij gustoće naboja (*charge density*).<sup>7</sup> Predavači su ponovno bili *crème de la crème*. Uz prof. Henryja Chapmana sa Sveučilišta u Hamburgu i dr. Ilme Schlichting s Max Planck instituta u Heidelbergu, s nama je bio prof. Simon Parsons iz Edinburgha kao i prof. Pierro Macchi iz Berna, da spomenem samo najveće zvijezde. Prvi modul polaznicima škole dao je uvid u jednu od najnaprednijih tehnika u proučavanju makromolekularnih struktura – serijsku (femtosekundnu) kristalografiju i njezinu izvedbu na XFEL-u (*X-ray free electron laser*).

Ta fascinantna metoda omogućuje prikupljanje rendgenskih podataka na iznimno malim kristalima, koje nije moguće "snimiti" uz pomoć sinkrotronskog zračenja. Tajna je u snopu rendgenskog zračenja na XFEL-u, toliko snažnom da njegov udar doslovce sprži kristal. Stoga se cjeloviti set podataka skuplja na seriji malih kristala, od kojih svaki preživi samo jedan udar snopa. Metoda je donijela važan iskorak u strukturnoj biologiji, upravo zato što za uzorke rabi iznimno male kristale koje je znatno lakše pripremiti nego one čija je veličina prikladna za snimanje na sinkrotronu ili laboratorijskom difrakcijskom uređaju. U skladu s HUK-ovim nastojanjem da, uz izvrsnost, promovira i vlastite znanstvenike na međunarodnom planu, dali smo u okviru trećeg modula (*charge density*) na HTCC2 priliku i našem dr. Krešimiru Molčanovu da održi predavanje u ovom iznimnom društvu. Dr. Molčanov je povjerenje posve opravdao održavši zapaženo izlaganje pod naslovom "Structure-properties relationship derived from X-ray charge density: unusual chemical bonds bordering intra- and intermolecular", u kojem je predstavio primjenu metode gustoće naboja na vlastitim sustavima. K. Molčanov je zaslužen za uvođenje metode gustoće naboja u Hrvatsku, i danas je jedan od vodećih europskih stručnjaka u tom području. Koncept koji smo predstavili na HTCC2 imao je sve odlike jedinstvene kristalografske škole na visokoj razini, namijenjene iznimno motiviranim mladim znanstvenicima na razini postdoca, pa i višoj, obrađujući područja u strukturnim znanostima koja se snažno razvijaju tek u posljednjih 20-ak godina ili čak manje od toga. U teoriji, to je morala biti formula za uspjeh. U stvarnosti, zabilježili smo znatno slabiji odziv nego na HTCC1. Po mojem mišljenju, pogriješili smo jer smo zanemarili važnost interaktivnih sadržaja, angažmana studenata i jer smo dopustili predavačima da težište, umjesto na edukativni element, stave na svoje vlastite rezultate.



Slika 2 – Prof. Simon Parsons objašnjava načela kristalografskog eksperimenta pod visokim tlakom na HTCC2

Na HTCC3<sup>8</sup> ipak smo odlučili, više-manje, zadržati programski sadržaj s HTCC2, ali promijeniti pristup, povećati udio interaktivnih sadržaja, osvježiti popis predavača te se aktivno uključiti u kreiranje programskog sadržaja u iterativnim pregovorima s predavačima (što se pokazalo sjajnim, pa smo takav pristup zadržali do danas). HTCC3 je održan u Bolu na Braču od 23. do 27. rujna 2018. Kristalografiju pri ekstremnim uvjetima (tlaka i temperatura) studentima je, uz prof. Simona Parsonsa, koji je rado prihvatio naš poziv da ponovno predaje na HTCC-u, predstavila i prof. Elena Boldireva sa Sveučilišta u Novosibirsku. Na HTCC3 smo napravili i eksperimentalni iskorak, uključivši u program škole i najsuvremenije metode istraživanja materijala analizom totalnog raspršenja na praškastom uzorku (PDF – *pair distribution function*). Bio je to prvi odmak od kristalografije na monokristalu na HTCC-u, ali s dobrim razlogom. Naime, ta sasvim nova metoda koristi totalno raspršeno zračenje, poglavito informaciju dostupnu u pozadinskom raspršenju, da precizno odredi međuatomske razmake.<sup>9</sup> Na HTCC3 smo imali rekordan odziv studenata, čak 31, iako smo ograničenje, da bismo zadržali optimalnu kvalitetu nastave, odavno postavili na 30. Bio je pravi trenutak za razmišljanje o budućnosti škole. Ja sam smatrao nužnim u program HTCC-a uvrstiti makromolekularnu kristalografiju, ali bio sam svjestan da ju je, iz niza razloga, nemoguće kombinirati, unutar jednog izdanja škole, s temama vezanim, primjerice, za istraživanje materijala. Stoga smo razmatrali različite mogućnosti, poput izmjenjivanja strukturne biologije i znanosti o materijalima na budućim HTCC-ima te odlučili da cijelo sljedeće izdanje posvetimo makromolekularnoj kristalografiji, odnosno strukturnoj biologiji.



**Slika 3** – Organizatori HTCC3 u Bolu na Braču 2018 (s lijeva na desno): Igor Sablijić, Jasminka Popović, Aleksandar Višnjevac, Ana Šantić i Zoran Štefanić

## Prekretnica

HTCC4,<sup>10</sup> održan u Mlinima kod Dubrovnika od 1. do 6. listopada 2019., donio je brojne novosti u organizaciji i provedbi škole. Program je produljen za jedan dan (na četiri puna radna dana), uvedeni su studentski poster i kratka usmena priopćenja, u program su uvršteni praktični i interaktivni sadržaji (demonstracije, okrugli stolovi) te je odlučeno da će dio identiteta škole ubuduće biti i samo mjesto održavanja, za koje je izabran Dubrovnik. I programski i organizacijski, HTCC4 je pokazao da je škola zašla u novu, zreliju fazu i da smo, učivši na vlastitom iskustvu, došli do koncepta koji je zanimljiv našoj ciljanoj publici – motiviranim doktorandima, poslijedoktorandima, ali i samostalnim znanstvenicima u ranijim razdobljima samostalne karijere. HTCC4 je, u programskom smislu, zadržao koncept napredne kristalografske škole, usredotočene, ovaj put, na poučavanje najnovijih tehnika i metoda određivanja makromolekularnih struktura. Škola je

podijeljena na četiri modula (*Hot Topics, HT*): XFEL u serijskoj femtosekundnoj kristalografiji (*HT1*),<sup>5</sup> elektronska mikroskopija (*cryo-EM*) (*HT2*),<sup>11</sup> NMR u istraživanju makromolekularnih struktura (*HT3*)<sup>12</sup> te računalne simulacije (*HT4*), a svakom je od njih posvećen jedan puni radni dan. Serijsku kristalografiju su nam predstavili jedan od pionira te metode Henry Chapman, koji se vratio na HTCC nakon dvije godine, i njegovi suradnici Saša Bajt i Thomas White. Henry Chapman je, spomenimo i to ovdje, neposredno nakon HTCC4, 16. rujna 2019., na moj prijedlog i poziv Skupštine, postao počasni član Hrvatske udruge kristalografa. Taj je sjajni trojac osmislio i proveo sveobuhvatnu prezentaciju primjene XFEL-a u serijskoj kristalografiji, uključujući demonstraciju pripreme uzorka za eksperiment te mini-radionicu na kojoj su studenti samostalno, uz nadzor i asistenciju sva tri predavača, proveli cjelovitu obradu eksperimentalnih podataka XFEL-a na modelnom uzorku. Elektronska mikroskopija podrazumijeva brzo smrzavanje otopine neke biološke makromolekule i bombardiranje tako smrznutog uzorka elektronima, što na koncu daje mikroskopsku sliku individualne molekule. *Cryo-EM* sad već omogućuje određivanje makromolekularnih struktura i iznad mitske rezolucijske granice od 2 Å, a potpuno isključuje kristalizaciju, i dalje usko grlo u određivanju makromolekularnih struktura metodama difrakcije rendgenskog zračenja. Tu smo metodu uvrstili u program HTCC4 kao drugi modul, potpuno svjesni određene kompeticije između mikroskopičara i kristalografa, ali sa željom da škola reflektira realnu sliku suvremenih trendova u strukturnoj biologiji. Elektronsku mikroskopiju predstavili su dr. Jürgen Plitzko s Max Planck Instituta i dr. Carrie Bernecky, s Austrijskog instituta za znanost i tehnologiju (ISTA). Sljedeći programski koncept HTCC4, koji je kristalografiju kao okosnicu zamijenio strukturnim istraživanjima makromolekula u širem smislu, odlučili smo jedan cijeli dan na školi posvetiti primjeni NMR-a u istraživanju makromolekula. Naime, primjena supravodljivih magneta visokog polja u NMR uređajima novije generacije te, posljedično, povećanje osjetljivosti eksperimenta i razlučivosti rezultata omogućilo je da NMR postane moćan alat u strukturnom istraživanju proteina i nukleinskih kiselina, možda ne baš uz bok kristalografiji i elektronskoj mikroskopiji, ali svakako ne predaleko od njih. Prof. Oliver Zerbe sa Sveučilišta u Zürichu predstavio je tematiku temeljito i na iznimno zanimljiv način, potpuno sam. I napokon, četvrti modul bio je u potpunosti posvećen primjeni računalnih metoda u rasvjetljavanju detalja makromolekularnih struktura. Prof. Franca Fraternali s King's Collegea u Londonu i dr. Chris Oostenbrink, ravnatelj Instituta za molekularno modeliranje i simulacije u Beču, bili su odličan tim i predstavili najvažnije računalne metode tijekom prijepodneva, putem uvodnih predavanja, a zatim, u popodnevni satima, putem dvosatne radionice, dizajnirane tako da zainteresiranog polaznika inicira u svijet (makro)molekularnih simulacija. HTCC4 je uveo još jednu novost – kratka (25-minutna) pozvana predavanja priznatih međunarodnih eksperata. U okviru tog dijela programa govorili su prof. Udo Heinemann s Max Delbrück centra za molekularnu medicinu u Berlinu, počasni član Hrvatske udruge kristalografa, i prof. Areej Abuhhammad sa Sveučilišta u Ammanu.

## Makromolekule

HTCC4 je, s 30 studenata i 11 predavača, bio velik uspjeh. Izvrsnim potezima pokazali su se uvođenje studentskih prezentacija i postera, a anonimna anketa koju smo po prvi put proveli među studentima naglasila je potrebu uvođenja još jednog važnog modula u budućnosti – kristalizacije makromolekula. To nije neobično. Kristalizacija je usko grlo u procesu određivanja 3D struktura bioloških makromolekula i sustavna poduka o sve brojnijim i naprednijim tehnikama kristalizacija nameće se kao nasušna potreba. Odlučili smo se ozbiljno pozabaviti tom temom, no te i druge planove za organizaciju petog izdanja škole potpuno je poremetila pandemija Corona virusa te je HTCC5,<sup>13</sup> također potpuno posvećena makromolekularnoj kristalografiji, održana



Slika 4 – Sudionici HTCC4 na terasi Hotela Astartea u Mlinima kraj Dubrovnika

nakon gotovo četiri godine, od 16. do 21. travnja 2023. u hotelu Sheraton u Mlinima. Vratili smo se proljetnom terminu, osvježili koncept, uveli modul posvećen kristalizaciji i izbacili nekristalografske metode – cryoEM i NMR u istraživanju molekularnih struktura, zamijenivši ih novim, konzervativnijim konceptom koji kronološki oslikava proces određivanja makromolekularnih struktura metodama rendgenske difrakcije na monokristalu, od pripreme uzoraka do publiciranja i vizualizacije 3D struktura. Zgusnuli smo program i povećali broj studenata koji usmeno prezentiraju svoje rezultate, pa je tipičan radni dan na HTCC5 trajao od 8:30 ujutro do 23:00. Na prvi pogled izgleda gotovo okrutno, ali uz sadržajan, uzbudljiv i fokusiran program te dovoljno duge pauze između aktivnosti, takav se, intenzivni, tečaj pokazao motivirajućim. Ne krijem da sam nadahnuće za takav radni ritam dobio pohađajući nedavno bez sumnje najbolju svjetsku školu makromolekularne kristalografije – onu u Cold Spring Harboru, gdje se predavanja, demonstracije, diskusije i laboratorijski rad, odvijaju, doslovce, danonoćno.



Slika 5 – Demonstracija uživo kristalizacije membranskih proteina metodom tekuće kubične faze (*Liquid Cubic Phase*) na HTCC5

Prvi radni dan na HTCC5 bio je u cijelosti posvećen kristalizaciji, drugi dan procesuiranju eksperimentalnih podataka i rješavanju struktura, treći dan smo se bavili problemima publiciranja riješenih struktura i radu s bazama podataka, dok se četvrti modul (četvrtog radnog dana) bavio vizualizacijom makromolekularnih struktura. Važno je reći da je HTCC5 priređen u vrlo zahtjevnim okolnostima, djelomice u sjeni postpandemijskog straha od pu-

tovanja, i da bi ga bilo teško, ako ne i nemoguće, prirediti bez potpore Hrvatske zaklade za znanost, koja je kroz moj projekt “Biomimetički supramolekularni ‘bowl’ i ‘funnel’ sustavi za selektivno prepoznavanje DNA/RNA” u okviru diseminacijskih aktivnosti, u značajnom iznosu sufinancirala organizaciju ove škole (kao i one sljedeće, HTCC6). Strogo smo se držali načela izvrsnosti u izboru predavača i nismo pogriješili. Prof. Elspeth Garman (koja je neposredno nakon HTCC5 postala i počasna članica Hrvatske udruge kristalografa), prof. Areej Abuhammad (Sveučilište u Ammanu), prof. Terese Bergfors (Sveučilište u Uppsali) i prof. Martin Caffrey (Trinity College, Dublin) su serijom predavanja, vježbi i demonstracija cjelovito prikazali mogućnosti koje danas stoje na raspolaganju strukturnim biologima kad je u pitanju priprava monokristala. Martin Caffrey izveo je svoju dobro znanu demonstraciju kristalizacije membranskih proteina metodom tekuće kubične faze (LCP).<sup>14</sup> Tu prezentaciju sam prvi put vidio u Cold Spring Harboru te odlučio pozvati prof. Caffreya da ovu iznimno instruktivnu demonstraciju predstavi i na HTCC-u. Nakon kratkog razmišljanja, prihvatio je poziv i, na zadovoljstvo studenata, bio predavač i na HTCC5 i na HTCC6. U elegantnom konferencijskom centru hotela Sheraton instalirali smo pravi mini laboratorij za kristalizacije makromolekula. Pomoću videomikroskopa, na glavnom ekranu projiciralo se “pecanje” kristala, a studenti su imali prigodu i sami se okušati pod budnim očima svih ostalih sudionika. Drugi dan, posvećen procesuiranju podataka i rješavanju kristalnih struktura, počeo je s dva predavanja koja su na mene, a i na studente, ostavila izniman dojam. Lakoća kojom prof. Edward Low sa Sveučilišta u Oxfordu pojašnjava složenu teorijsku podlogu difrakcije rendgenskog zračenja na monokristalu i obrade podataka upravo je impresivna. Zajedno s njim kroz ovaj, drugi modul HTCC5 vodili su nas ljudi koji kreiraju CCP4, jedan od najpopularnijih svjetskih programskih paketa za obradu podataka i rješavanje makromolekulskih struktura, na čelu s Eugeneom Krissinelom.<sup>15</sup> Zahtjevan nadzirani višesatni praktični rad, uz demonstraciju i vođenje cijelog procesa na velikom ekranu, oduševio je studente, od kojih je nekima upravo ta CCP4 radionica bila glavni motiv prijave na školu. Kristalografske baze podataka, Cambridge Structural Database (CSD)<sup>16</sup> i Protein Data Bank (PDB),<sup>17</sup> predstavili su sami razvojni programeri iz njihovih matičnih institucija. Dok je CSD banka podataka malih molekula, u PDB-u se pohranjuju 3D strukture bioloških makromolekula, i to ne samo one dobijene metodama rendgenske difrakcije na monokristalu nego li i one dobivene elektronskom mikroskopijom i NMR-om. Naši su predavači, na moj prijedlog, osobitu pažnju posvetili zonama preklapanja malih i velikih molekula, primjerice istraživanju dockinga – načina i mjesta vezivanja malih molekula na proteine i lance nukleinskih kiselina. Nastavljajući dobru praksu pružanja prilike našim znanstvenicima da svoje

znanje prenesu na međunarodnoj pozornici, završni modul na HTCC5 – vizualizaciju makromolekulskih struktura povjerali smo HUK-ovom dr. Zoranu Štefaniću, ilustratoru nekoliko sveučilišnih udžbenika,<sup>18</sup> koji svoje zapažene znanstvene ilustracije radi u PyMOL-u<sup>19</sup> i Inkscape-u.<sup>20</sup>



Slika 6 – Kristalizacijski robot Douglas Instruments u punom pogonu na HTCC5

Šesto izdanje HTCC<sup>21</sup> održano je u Dubrovniku od 7. do 12. travnja 2024. u akademisu Academia, prvom utjelovljenju onoga što bi trebalo postati jedinstvenim hrvatskim formatom akademskog centra koji kombinira studentski i komercijalni smještaj, ugostiteljsku ponudu i sportske, rekreacijske i kongresne sadržaje, sve na jednom mjestu. Koncept škole je uglavnom slijedio shemu koju smo realizirali na prethodnom izdanju, s tim da smo ovaj put uvrstili modul posvećen difrakcijskom eksperimentu na različitim platformama i izbacili iz programa vizualizaciju makromolekula. Tako su, tijekom četiri radna dana na HTCC6, obrađene četiri teme: kristalizacija (HT1), prikupljanje podataka (HT2), obrada podataka te rješavanje strukture (HT3) i baze podataka (HT4). Poseban dodatak programu, prenesen također iz programa HTCC5, bila je aktivnost pod imenom “Bring your sample”, koja je studentima omogućila da donesu svoje loše kristalizirane uzorke te modificiraju uvjete kristalizacije primjenjujući tehniku sijanja kristala (*seeding*) i uz pomoć robota za kristalizaciju *Douglas Instruments* koji je bio instaliran na licu mjesta. Neki studenti su dobro iskoristili ovu izvršnu priliku da bi unaprijedili svoje znanje, ali i radili na vlastitim problematičnim uzorcima. Čini mi se da je uvrštenje modula o difrakcijskom eksperimentu bio pun pogodak. Dobio je velik broj pohvala u anonimnoj anketi koju smo proveli među studentima i izazvao iznimnu zainteresiranost. Uvodno teorijsko predavanje kombinirano s detaljnim predstavljanjem difrakcijskog eksperimenta na kućnom uređaju održao je HUK-ov dr. Krešimir Molčanov. Imao je nezahvalnu ulogu zamijeniti sjajnog prof. Edwarda Lowea, ali je pokazao da je itekako dorastao zadatku. Iskusna sinkrotronska znanstvenica (*beamline scientist*) dr. Annie Heroux sa sinkrotrona Elettra u Trstu, održala je odlično predavanje koje je obilovalo praktičnim savjetima za pripremu i transport uzoraka i provedbu samog eksperimenta na sinkrotronu. Njezin kolega dr. Nicola Demitri uključio se u predavanje izravno s Elettre te, putem velikog ekrana u izravnom prijenosu, simulirao cijeli eksperiment. Na koncu, imali smo ponovno prof. Henryja Chapmana i njegov tim, koji su nam predstavili teorijsku podlogu i praktične elemente serijske kristalografije, istinskog “hot topic” u struktur-

nim određivanjima makromolekula (*vide supra*, HTCC4).<sup>5</sup> Treći modul (HT3) bavio se procesuiranjem podataka i rješavanjem kristalnih struktura pomoću programskog paketa CCP4<sup>14</sup> i ponovno je obilovao, ne samo odličnim predavanjima s teorijskom podlogom, nego, prije svega, vođenim i interaktivnim sadržajima. HT4 (Baze podataka) je, kao i na HTCC5, bio posvećen predstavljanju najvažnijih kristalografskih baza podataka (PDB i CSD) s osobitim naglaskom na mogućnosti za ekstrahiranje važnih strukturnih informacija iz ogromne količine podataka pohranjenih u njima. Kao izvrstan primjer za to kako se novo znanje može izvesti analizom postojećeg, imali smo, po prvi put na HTCC-u, i predavanje o AlphaFoldu,<sup>22</sup> sekundarnoj bazi podataka makromolekularnih struktura, ekskluzivno riješenih metodama umjetne inteligencije, odnosno temeljem strukturnih informacija pohranjenih u postojećim bazama eksperimentalnih podataka. Predavanje koje je održala dr. Paulyna Magaña iz PDB-a izazvalo je velik interes studenata.



Slika 7 – Natjecanje u “pecanju” kristala pod budnim okom prof. Elspeth Garman na HTCC6

## Umjesto zaključka: perspektiva

Nakon punog desetljeća i šest uspješnih organizacija, *Hot Topics in Contemporary Crystallography* etablirala se kao ne samo jedina škola kristalografije u Hrvatskoj nego i međunarodno prepoznata visokokvalitetna škola kristalografije. Određena lutanja u traženju najboljeg koncepta, koja su pratila organizaciju kroz ovih proteklih deset godina, vjerojatno se događaju i drugima pri realizaciji sličnih pothvata. Naprosto, neke ideje treba testirati u praksi da bi se utvrdila njihova istinska vrijednost. Treba također imati hrabrosti za napuštanje “staze slonova” i iskorake u smjeru malo istraženih koncepta. Sve to, dakako, zahtijeva i vrijeme, pa mogu slobodno reći da danas, nakon punih deset godina ovog svojevrsnog eksperimenta, iako i dalje nisam siguran da imamo idealnu i cjelovitu formulu za visokokvalitetnu školu kristalografije, koja će stati uz bok Ericceu i Durhamu, uz to primjenjivu na hrvatske prilike, jesam sve bliži uvjerenju da smo, da tako kažem, tu negdje. Shvatili smo da je bila iluzija vjerovati da HUK, sa svega 26 članova može u bijedalnom ritmu organizirati dva potpuno različita tipa škole – jedne godine školu strukturne biologije, a sljedeće godine školu znanosti o materijalima. Na hridi iskustva se razbila i ideja o školi koja bi, u jednom izdanju, objedinila najnovija dostignuća u krajnje različitim područjima kristalografije. No naš desetogodišnji eksperiment ipak nije dao samo negativne rezultate. On je pokazao da ono što zaista možemo napraviti u našim uvjetima, za što imamo dovoljno znanja, i što prolazi na

tržištu kristalografskih škola i poduka u Europi pa i šire od toga te što je logistički i financijski održivo, jeste četvorodnevna ili petodnevna škola makromolekularne kristalografije u Dubrovniku, koja kombinira temeljne postulate makromolekularne kristalografije s najnovijim postignućima u razvoju njezinih metoda i tehnika (u omjeru, otprilike, pola-pola) i programskim konceptom prati cjeloviti kristalografski eksperiment: kristalizacija, prikupljanje podataka, obrada podataka te, na koncu, njihovo pohranjivanje u baze podataka i napredna uporaba tih baza. Možda ćemo, prema tome, novo desetljeće HTCC-a započeti s novim imenom koje će jasnije reflektirati novi optimizirani koncept za budućnost, možda nešto poput "Dubrovnik macromolecular crystallography school". Ponosni smo na proces koji je za nama i njegove rezultate. Veliki se rezultati ne rađaju preko noći. U svakom slučaju, volje, ambicije, entuzijazma, iskustva, ekspertize i kontakata nam ne nedostaje. Stoga vjerujemo da ćemo Hrvatsku, kroz sljedećih desetak godina, etablirati kao mjesto na kojem se održava jedna od najboljih europskih kristalografskih škola, i da će ta tradicija dugo trajati.

## Zahvale

Autor zahvaljuje Hrvatskoj zakladi za znanost, koja je prepoznala važnost diseminacije aktivnosti i znanja te kroz projekt "Biometrički supramolekularni 'bowl' i 'funnel' sustavi za selektivno prepoznavanje DNA/RNA" (calixDNA, IP-2020-02-3786) sudjelovala u financiranju HTCC5 i HTCC6. Također, izražavam zahvalnost Europskoj kristalografskoj zajednici (ECA) i Međunarodnom savezu kristalografa (IUCr) za kontinuiranu potporu organizaciji škole kroz dodjelu sredstava za studentske stipendije. Financijsku potporu pojedinim izdanjima škole dali su i Zaklada HAZU, Ministarstvo znanosti i obrazovanja RH, a logističku Institut Ruđer Bošković. Brojni su sponzori iz godine u godinu pružali nesebičnu financijsku potporu organizaciji te im izražavam svoju najdublju zahvalnost na tome. Na koncu, nesebični trud koji su u dosadašnju organizaciju škole uložili kolegice i kolege iz Hrvatske udruge kristalografa te predavači i tutori zavređuje ne samo moju zahvalnost nego i divljenje. Svi su oni, zajedno sa mnom, cijeli ovaj posao radili i rade volonterski.

## Referencije

- URL: <https://hrvatska-udruga-kristalografa.hr>, 11. 5. 2024.
- H. D. Flack, G. Bernardinelli, Absolute structure and absolute configuration, *Acta Cryst.* **A55** (1999) 908–915, doi: <https://doi.org/10.1107/S0108767399004262>.
- O problemu srastanja monokristala (twinning) R. Herbst-Irmer objavila je niz publikacija od kojih bih izdvojio: R. Herbst-Irmer, Twinning in chemical crystallography – a practical guide, *Z. Kristallogr.* **231**(10) (2016) 573–581 i M. Sevana, M. Ruf, I. Uson, G. M. Sheldrick, R. Herbst-Irmer, Non-merohedral twinning: from minerals to proteins, *Acta Cryst.* **D75** (2019) 1040–1050, doi: <https://doi.org/10.1107/S2059798319010179>.
- Upućujem čitatelja na sveobuhvatan i sjajno napisan izvještaj s ECM29, objavljen nakon konferencije u BCA Crystallography News (str. 11 do 15) URL: <https://hrvatska-udruga-kristalografa.hr/wp-content/uploads/2014/01/BCA-News-December-2015.pdf>, 13.05.2024.
- (a) T. R. M. Barends, B. Stauch, V. Cherezov, I. Schlichting, *Nature Reviews Methods Primers*, **2** (2022) Article No. 59, doi: <https://doi.org/10.1038/s43586-022-00141-7>; (b) H. N. Chapman, X-Ray Free-Electron Lasers for the Structure and Dynamics of Macromolecules, *Annu. Rev. Biochem.* **88** (2019) 35–58, doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-110744>.
- (a) E. V. Boldyreva, High-pressure diffraction studies of molecular organic solids. A personal view, *Acta Cryst.* **A64** (2008) 218–231, doi: <https://doi.org/10.1107/S0108767307065786>; (b) A. Katrusiak, High-pressure crystallography, *Acta Cryst.* **A64** (2008) 135–148, doi: <https://doi.org/10.1107/S0108767307061181>.
- P. Macchi, Modern charge density studies: the entanglement of experiment and theory, *Crystall. Rev.* **19** (2013) 58–101, doi: <https://doi.org/10.1080/0889311X.2013.785538>.
- URL: <https://hrvatska-udruga-kristalografa.hr/htcc3/>, 14. 5. 2024.
- M. W. Terban, S. J. L. Billinge, Structural Analysis of Molecular Materials Using the Pair Distribution Function, *Chem. Rev.* **122** (1) (2022) 1208–1272, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00237>.
- URL: <https://hrvatska-udruga-kristalografa.hr/htcc4/>, 14. 5. 2024.
- H. R. Saibil, Cryo-EM in molecular and cellular biology, *Mol. Cell* **82** (2022) 274–284, doi: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.12.016>.
- (a) G. Wang, Z. Zhang, B. Jiang, X. Zhang, C. Li, M. Liu, Recent advances in protein NMR spectroscopy and their implications in protein therapeutics research, *Anal. Bioanal. Chem.* (2014) **406**, 2279–2288, doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7518-5>; (b) T. R. Alderson, L. E. Kay, NMR spectroscopy captures the essential role of dynamics in regulating biomolecular function, *Cell*, **184** (2021) 577–595, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.12.034>.
- URL: <https://hrvatska-udruga-kristalografa.hr/htcc5/>, 14. 5. 2024.
- M. Caffrey, V. Cherezov, Crystallizing membrane proteins using lipidic mesophases, *Nature Protocols*, **4** (2009) 706–731, doi: <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.31>.
- J. Agirre et al., The CCP4 suite: integrative software for macromolecular crystallography, *Acta Cryst.* **D79** (2023) 449–461, doi: <https://doi.org/10.1107/S2059798323003595>.
- C. R. Groom, I. J. Bruno, M. P. Lightfoot, S. C. Ward, *Acta Cryst.* **B72** (2016) 171–179, doi: <https://doi.org/10.1107/S2052520616003954>.
- URL: <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/>, 14. 5. 2024.
- (a) M. Mintas, K. Wittine, Z. Štefanić, *Novi lijekovi protiv raka*, Zagreb: Školska knjiga, 2018; (b) K. Wittine, Z. Štefanić, M. Mintas, *Personalizirana terapija karcinoma*. Zagreb: Medicinska naklada, 2021.
- URL: <https://pymol.org/>, 13. 5. 2024.
- URL: <https://inkscape.org/>, 13. 5. 2024.
- URL: [https://htcc6.org](https://htcc6.org/), 14. 5. 2024.
- J. Jumper, et al., Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, *Nature* **596** (2021) 583–589, doi: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.