



Přírodovědecká
fakulta
Faculty
of Science

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

STATEMENT OF THE BACHELOR/DIPLOMA* THESIS REVIEWER

Name of the student: Bc. Petra Havlíčková

Thesis title: Crystallographic study of newly characterized HAD phosphatase from *Thermococcus thio-reducens*

Supervisor: Doc. Mgr. Ivana Kutá Smatanová, Ph. D.

Reviewer: Oksana Degtjarik, Ph.D.

Reviewer's affiliation: Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel

	Point scale ¹	Points
(1) FORMAL REQUIREMENTS		
Extent of the thesis (for bachelor theses min. 18 pages, for masters theses min. 25 pages), balanced length of the thesis parts (recommended length of the theoretical part is max. 1/3 of the total length), logical structure of the thesis	0-3	3
Quality of the theoretical part (review) (number and relevancy of the references, recency of the references)	0-3	3
Accuracy in citing of the references (presence of uncited sources, uniform style of the references, use of correct journal titles and abbreviations)	0-3	3
Graphic layout of the text and of the figures/tables	0-3	3
Quality of the annotation	0-3	3
Language and stylistics, complying with the valid terminology	0-3	3
Accuracy and completeness of figures/tables legends (clarity without reading the rest of the text, explanation of the symbols and labeling, indication of the units)	0-3	3

* Choose one

¹ Mark as: 0-unsatisfactory, 1-satisfactory, 2-average, 3-excellent.

Formal requirements – points in total		21
(2) PRACTICAL REQUIREMENTS		
Clarity and fulfillment of the aims	0-3	3
Ability to understand the results, their interpretation, and clarity of the results, discussion, and conclusions	0-3	3
Discussion quality – interpretation of the results and their discussion with the literature (absence of discussion with the literature is not acceptable)	0-3	2
Logic in the course of the experimental work	0-3	3
Completeness of the description of the used techniques	0-3	2
Experimental difficulty of the thesis, independence in experimental work	0-3	3
Quality of experimental data presentation	0-3	3
The use of up-to-date techniques	0-3	3
Contribution of the thesis to the knowledge in the field and possibility to publish the results (after eventual supplementary experiments)	0-3	3
Practical requirements – points in total		25
POINTS IN TOTAL (MAX/AWARDED)	48	46

Comments of the reviewer on the student and the thesis:

The Master thesis of Bc. Petra Havlíčková is dealing with structural characterization of newly isolated HAD phosphatase from hyperthermophilic archeon *Thermococcus thio-reducens*. The work is written in very good English with only minor number of typos, is well structured and has clearly defined aims. The thesis is very diverse methodologically, including protein production, crystallization, determination of protein structure, enzymatic activity assay and theoretical docking studies. The topic of the thesis is of high relevance, the produced results are publishable and significantly contribute to the knowledge of catalytic enzymes that could be potentially used for biological degradation of environmental pollutants.

Suggestions and questions, to which the student has to answer during the defense. Mistakes, which the students should avoid in the future:

Questions:

1. The diffraction image (Figure 6, p. 16) indicates presence of multiple crystal lattices. Did it cause difficulties with data processing? Have you detected a presence of twinning?
2. T82 is enzyme isolated from hyperthermophile. In your work you compare the structure of T82 with the homologous enzymes that are active at ambient temperature. Could you speculate what structural features enable T82 to convert the substrate at such extreme high temperatures?
3. Have you tried/are you planning to obtain a crystal structure of T82 in complex with the substrate discovered by the docking studies? How would you introduce the substrate into the protein crystal structure?

Remarks:

1. Figure 6, p.16 lacks reference in the text.
2. p. 19 "Non-protein positive $2Fo-Fc$ electron density..." Instead of $2Fo-Fc$ should be $Fo-Fc$.
3. p. 21, p. 22 and p. 26 has references to wrong figures.

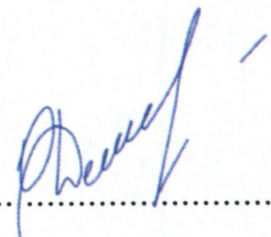
Conclusion:

I definitely

recommend / ~~do not recommend~~*

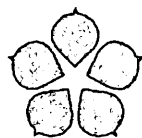
the thesis for the defense and I suggest the grade 1 (Excellent) .²

In **Rehovot** date **17.05.2019**



.....

² You can suggest a grade, which can be modified during the defense based on the presentation. However, if the reviewer is not present at the defense, the grade will not be counted. Grades: excellent (1). Very good (2), Good (3), Unsatisfactory/failed (4).



Přírodovědecká
fakulta
Faculty
of Science

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

POSUDEK OPONENTA NA BAKALÁŘSKOU/DIPLOMOVOU* PRÁCI

Autor práce: Bc. Petra Havlíčková
Název práce: HAD phosphatase from *Thermococcus thio-reducens*
Školitel práce: Doc. Mgr. Ivana Kutá Smatanová, Ph. D.
Oponent práce: Mgr. Tomáš Klumpler, Ph.D.
Pracoviště oponenta: Masarykova univerzita

	Bodový rozsah hodnocení ¹	Body
(1) FORMÁLNÍ POŽADAVKY		
Celkový rozsah práce (pro bakalářské práce min. 18 stran, pro diplomové práce min. 25 stran), vyváženost rozsahů jednotlivých částí, logická struktura práce (u experimentálních prací doporučení pro teoretickou část do 1/3 celkového rozsahu)	0-3	3
Kvalita literární rešerše (počet použitých původních pramenných zdrojů, vhodnost výběru, aktuálnost zdrojů)	0-3	3
Správnost používání citačních odkazů (přítomnost necitovaných údajů, dodržování jednotného stylu citací, používání oficiálních zkratk časopisů)	0-3	2
Grafická úprava textu a obrázků	0-3	1
Úroveň souhrnu/anotace (i v angličtině)	0-3	3
Jazyková a stylistická úroveň, respektování platného názvosloví	0-3	2
Správnost a úplnost popisů u obrázků a tabulek (srozumitelnost bez zřetele k ostatnímu textu, vysvětlení značek, jednotky uváděných veličin)	0-3	2
Formální požadavky - body celkem		16
(2) VĚCNÉ POŽADAVKY		
Splnění cílů práce	0-3	3
Schopnost porozumět výsledkům, jejich interpretace a jasný popis, srozumitelnost diskuze a závěrů	0-3	3
Úroveň diskuse - interpretace výsledků, zařazení do kontextu	0-3	3

* Nehodící se škrtněte
¹ Bodový rozsah hodnocení: 0-nevyhovující, 1-vyhovující, 2-průměrné, 3-excelentní. U teoretických prací hodnotíte jenom (1) Formální požadavky, u experimentálních prací i (2) Věcné požadavky a u prací v cizím jazyce i (3) Jazykovou úroveň práce v cizím jazyce.

v literatuře (absence diskuze výsledků s literaturou je nepřijatelná)		
Logika postupu při vlastní výzkumné práci	0-3	3
Úplnost popisu použitých metodik	0-3	2
Experimentální náročnost práce, samostatnost při práci	0-3	3
Úroveň zpracování experimentálních dat	0-3	3
Aktuálnost použitých metod	0-3	3
Přínos práce pro obor a publikovatelnost výsledků (po případném doplnění)	0-3	3
Věcné požadavky u experimentálních prací - body celkem		26

(3) PRÁCE V CIZÍM JAZYCE

Jazyková a stylistická úroveň	0-3 ²	2
--------------------------------------	------------------	---

CÉLKEM BODŮ (MAX/ZISKANÝCH)	48/51²	44/51³
------------------------------------	--------------------------	--------------------------

Komentář oponenta:

Předložená diplomová práce se v adekvátní šíři zabývá strukturní charakterizací fosfatázy Tt82 z hypertermofilního organismu *Thermococcus thio-reducens*. Typické krystalografické cíle práce jako je krystalizace, vyřešení a analýza krystalové struktury jsou doplněny o dokovací studii a fosfatázovou esej s vybranými substráty enzymu. Všechny cíle se autorce podařilo splnit.

V úvodu autorka seznámí čtenáře se strukturně-funkčními poznatky o nadrovině haloacid dehalogenáz, popisuje konzervované motivy aktivního místa či zajímavý fenomén „squiggle“ a „flap“ elementů. Úvod také obsahuje shrnutí metod proteinové krystalografie.

Těžiště diplomové práce se nachází v její experimentální části, která obsahuje celou řadu zajímavých výsledků. Od úspěšného vytvoření klonovacího vektoru a transformace produkčního kmene, purifikace enzymu, přes krystalizaci a určení struktury s atomárním rozlišením 1.75Å až po funkční a strukturní charakterizaci a interpretaci výsledků.

Připomínky a dotazy, na které má student/-ka reagovat při obhajobě:

1. Na obrázku 6. na straně 16 je ukázka difrakčního obrazce s kruhem vymezujícím rozlišení 1.75Å. Na první pohled se zdá, že velké množství reflexí leží v oblasti s výrazně lepším rozlišením. Mohla by autorka doložit, z jakého důvodu nebyly nakonec použity?

2. Ve finální krystalové struktuře Tt82 je v aktivním místě koordinován hořčíkový iont. Molekula vody i dvojmocný hořčíkový iont mají stejný počet elektronů - deset. Na základě jaké úvahy bylo rozhodnuto, že se jedná o hořčíkový iont a ne o molekulu vody? Potažmo dá se problém řešit i experimentálně - jak?

3. V závěrečné fosfatázové eseji se popisuje úspěšná defosforylace dvou potenciálních substrátů enzymu, přitom nadějných substrátů bylo pomocí dokování *in silico* autorkou navrženo minimálně šest. Bylo v rámci tohoto projektu testováno substrátů více, popř. s jakými výsledky?

² Vyberte jednu z hodnot: 48 bodů pro experimentální práce, 51 bodů pro experimentální práce v cizím jazyce

³ Zadejte počet přidělených bodů.

Chyby, na které si má dávat student v budoucnu pozor:

1. Text obsahuje odkazy na nejspíš nesprávně očíslované obrázky (např. strana 21 odkaz na obrázek č. 3d, strana 22 obrázek 2 a 3).
2. Pravděpodobně nebyly použity nástroje pro kontrolu pravopisu, což vedlo k řadě překlepů – první se objevují již v obsahu práce či při definici jejích hlavních cílů.
3. Pravděpodobně nebyl použit software ke správě citací – což vedlo k překlepům v soupisu literatury či k odkazu na články nesouvisející s tématem věty.
4. Obecně vyšší grafické kvality by se dalo dosáhnout použitím vektorové grafiky pro popisky v obrázcích či použitím editoru matematických výrazů. K zvýrazňování důležitých oblastí na sekvencích zase použití méně tučné linie, které by zcela neznemožnila číst sousední písmena sekvenčního motivu (obrázek 8).

Závěr:

Práci

d o p o r u č u j i

k obhajobě a navrhuji známku 2.⁴

V Brně dne 6.5.2019



podpis

⁴ Je možné navrhnout známku s tím, že navržená známka může být upravená při obhajobě (pokud se oponent nezúčastní obhajoby, v posudku navržená známka se do výsledné známky nezapočítává). Znamky: výborně (1), velmi dobře (2), dobře (3), nevyhověl (4).