

Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta
Katedra zoologie
Charles University, Faculty of Science
Department of Zoology

Doktorský studijní program: Zoologie
Doctoral study programme: Zoology

Autoreferát disertační práce
Summary of the Doctoral thesis



Biologie stárnutí anuálních ryb rodu *Nothobranchius*
The biology of aging in *Nothobranchius* fishes

Mgr. Jakub Žák

Školitel/Supervisor:

prof. RNDr. Martin Reichard, PhD.

Školitelka-konzultantka/Supervisor-consultant:

Mgr. Zuzana Musilová, PhD.

Praha, 2022

Abstrakt

Stárnutí lidské populace a následné bezprecedentní demografické změny ve společnosti vedly nevyhnutelně ke zvýšené pozornosti vědců k výzkumu stárnutí. Stárnutí je v biologii definováno jako pokles kvality fyziologických funkcí a rostoucí riziko úmrtí související s rostoucím věkem. Většina výzkumů stárnutí se provádí v laboratorním prostředí. Proto existuje velmi málo poznatků o biologii volně žijících populací u druhů, které jsou využívány jako modelové organismy v laboratoři. Nicméně jejich znalost je důležitá pro správnou interpretaci laboratorních výsledků. Tato disertační práce prostřednictvím šesti prvoautorských a pěti druhoautorských prací kombinuje poznatky z terénního a laboratorního výzkumu stárnutí (a životních strategií souvisejících se stárnutím) krátkověkého halančíka *Nothobranchius furzeri*. V práci je popsán rychlý vývin halančíka, který je schopný v přírodě dospět během 14 dní od vylíhnutí, a také jeho extrémně rychlý růst v přírodě. Obě tyto životní strategie zásadně ovlivňují stárnutí organismu. Další část dizertace popisuje, jak prostředí ovlivňuje stárnutí. Nejprve byly zjištěny preferované tělesné teploty halančíků rodu *Nothobranchius*, charakterizovány denní výkyvy prostředí a chování v divokých populacích. Na základě těchto poznatků byl testován vliv ekologicky relevantních teplotních fluktuací na stárnutí. Halančíci z prostředí s cirkadiánní teplotní fluktuací žili déle a měli vyšší relativní plodnost než halančíci chovaní ve stabilní teplotě. Toto zásadní zjištění může zpochybnit přesnost experimentálních výsledků získaných během chovu za stabilních teplot. Další experimenty porovnály reprodukční stárnutí u volně žijících halančíků a u halančíků v zajetí. Bylo zjištěno, že volně žijící halančíci nežijí dostatečně dlouho na to, aby se u nich projevilo reprodukční stárnutí. Naopak u halančíků chovaných v zajetí se reprodukční stárnutí projevilo v pokročilém věku. Tato disertační práce jasně ukazuje, jak důležitá je znalost základní biologie druhu pro správné naplánování experimentů a jak důležité jsou poznatky získané studiem volně žijících populací pro interpretaci laboratorního výzkumu.

Abstract

The aging human population and consequent unprecedented demographic changes in society have inevitably led to more scientists focusing their research on aging. Senescence, in the narrowest biological sense, is age related decline in an organism's function and survival. The majority of senescence research is performed in the laboratory environment. The basic biology of wild counterparts of model organisms is therefore relatively unstudied, despite its importance for proper interpretation of laboratory outcomes. This dissertation, via a series of 6 first-authored and 5 second-authored papers, combines field and laboratory research on senescence and senescence-related life history traits using a short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. An age at the maturity of 14 days post hatching in wild *N. furzeri* is presented in this thesis as well as extremely fast growth of wild fish. Both life history traits have important consequences for senescence. The following section is focused on how the environment modulates senescence. In the first step, preferred body temperatures of Mozambican *Nothobranchius* fish were measured and descriptions of environmental and behavioural fluctuations within a 24 hours periodicity were completed. Based on this knowledge, ecologically relevant thermal fluctuations were simulated in captivity to test how this factor affects senescence. Fish experiencing fluctuations had superior survival and relative reproduction. This finding questions the precision of experimental results obtained under constant temperature. Another set of experiments compared the appearance of reproductive senescence in wild fish and in captivity. Wild fish do not live long enough to develop reproductive senescence while captive fish experienced reproductive senescence at advanced age. This dissertation clearly demonstrates how important accurate knowledge of fundamental species biology is for proper design of experiments as well as how important findings from wild populations are for interpretations of laboratory research.

1. Úvod

Lidstvo se nikdy nedoživalo tak vysokého věku jako dnes. To s sebou nevyhnutelně přináší nárůst lékařských a sociálních výzev jako je cukrovka, či rakovinná a neuropatologická onemocnění a obecné zvýšení nároků na péči o seniory (Vaupel, 2010). Vědci proto více začali směřovat svoji pozornost ke studiu a pochopení procesu senescence (tj. stárnutí v užším biologickém smyslu, kdy dochází k poklesu fyziologických funkcí s věkem) a způsobům, jak do tohoto procesu zasahovat.

Evoluční teorie zabývající se senescencí nám poskytují (alespoň částečnou) odpověď na otázku, proč k senescenci dochází (Kirkwood, 1977; Medawar, 1952; Williams, 1957). Teorie akumulace mutací (mutation accumulation) vychází z předpokladu, že síla přírodního výběru s věkem klesá, což následně vede k akumulaci negativních mutací působících až v pozdním věku (Medawar, 1952). Antagonistická pleiotropie (antagonistic pleiotropy) považuje negativní účinky pozdně působících mutací za vedlejší produkt pozitivně selektovaných pleiotropních alel zvyšující fitness v raném věku (Williams, 1957). Teorie jednorázového těla (disposable soma) předpokládá, že existuje kompromis v alokaci zdrojů mezi tělesnou (soma) a zárodečnou linií (germ line, Kirkwood, 1977). Přenos genů do následující generace je pro evoluci organismů nezbytný, a proto investice do zárodečné linie přináší vyšší dlouhodobé výhody než udržování těla (Kirkwood, 1977).

Senescence nabývá u mnohobuněčných organismů různých podob (Jones et al., 2014). Předpokládá se, že organismy s neukončeným růstem v dospělosti se senescenci zcela vyhnou nebo u nich dochází pouze k "zanedbatelné senescenci" (Vaupel et al., 2004). To vychází z předpokladu, že fitness (např. plodnost, konkurenceschopnost, dožití) těchto organismů přímo úměrně souvisí s jejich tělesnou velikostí, a přírodní výběr tak

upřednostňuje velké (a tedy staré) jedince před malými (Vaupel et al., 2004). Tyto předpoklady jsou v nápadném rozporu s tím, co je pozorováno u obvykle používaných modelových organismů, jako jsou octomilky, háďátka nebo myši, které v době dospělosti zastavují růst (Gerhard et al., 2004; Reznick et al., 2002). Potenciál organismů s neukončeným růstem vyhnout se senescenci z nich činí zajímavé modely pro zkoumání procesu senescence a způsobů, jak jej intervenovat.

Ryby (Teleostei/Actinopterygii) představují obzvláště rozmanitou skupinu obratlovců s neukončeným růstem (Reznick et al., 2002). Znalosti o tom, zda ryby prochází senescencí či nikoliv, jsou velmi omezené (Reznick et al., 2002). Mimořádně krátkověký halančík tyrkysový (*Nothobranchius furzeri*) se v nedávné době zařadil mezi slibné organismy pro výzkum senescence (Cellerino et al., 2016).

Halančík tyrkysový je obratlovec s nejkratší délkou dožití (obvykle < 1 rok), kterého lze úspěšně chovat v zajetí (Cellerino et al., 2016). Jeho přirozeným prostředím jsou periodicky vysychající tůň v jihoafrické savaně (Reichard & Polačik, 2019). Na toto prostředí je adaptován embryi odolnými proti vysychání, rapidním dospíváním, rychlým růstem a vysokou plodností (přehledně v Reichard & Polačik, 2019).

Rychlá životní strategie a neukončený růst tohoto druhu poskytují jedinečnou příležitost testovat, jak se tyto protikladné dispozice projeví na senescenci organismu. Předpokládá se, že rychlé životní tempo je spojeno s dřívějším nástupem a rychlejším tempem senescence (Jones et al., 2008). To, jak se tyto protichůdné předpoklady projevují na fenotypu stárnutí halančíka tyrkysového, je předmětem intenzivního zkoumání a také jádrem této disertační práce.

2. Cíle práce

Cíle této disertační práce lze rozdělit do pěti bodů:

- 1/ poskytnout hlubší vhled do evoluční ekologie ryb s přirozenou délkou života kratší než jeden rok;
- 2/ identifikovat základní ekologické a biologické požadavky halančíků, které souvisejí se stárnutím (z volné přírody: denní aktivita, rychlost růstu, věk v době dospělosti; z laboratoře teplotní nároky);
- 3/ popsat demografické stárnutí přírodních populací *N. furzeri*;
- 4/ otestovat vliv prostředí na průběh senescence u *N. furzeri*
 - (a) reprodukční stárnutí u volně žijících ryb vs. laboratorních ryb
 - (b) stabilní teplotní podmínky vs. přirozené teplotní fluktuaace;
- 5/ přijít s řešením problematických bodů laboratorního chovu halančíků
 - a) nahradit živou potravu (nyní standard) za peletované krmivo
 - b) přezkoumat histopatologii laboratorních halančíků

3. Materiál a metodika

K zodpovězení cílů bylo využito kombinace laboratorního a terénního výzkumu. Data pro tuto disertační práci byla shromážděna v rámci pětiměsíčního terénního výzkumu v Mosambiku, na který navazovala 30měsíční laboratorní experimentální práce. Nové poznatky o biologii divokých halančíků (reprodukční senescence u volně žijících populací, denní výkyvy v přirozeném prostředí a chování ryb) a v zajetí (teplotní nároky) byly následně zkoumány z pohledu senescence v laboratorních podmínkách (reprodukční senescence v zajetí; vliv kolísání teploty na senescenci *N. furzeri*). Během těchto laboratorních studií bylo zjištěno několik praktických aspektů, které vyžadovaly další rozpracování. Ty se týkaly nahrazení živé potravy, která je v současnosti uznávána jako dietetický "standard" pro halančíky rodu *Nothobranchius* (Polačik et al.,

2016) navzdory nutriční variabilitě a riziku přenosu nákazy. Dalším praktickým tématem byla revize histopatologie ryb rodu *Nothobranchius*, kde mohlo v některých předchozích biogerontologických studiích docházet k chybným diagnózám. Výše nastíněné cíle jsou řešeny 6 prvoautorskými a 5 druhouatorskými pracemi.

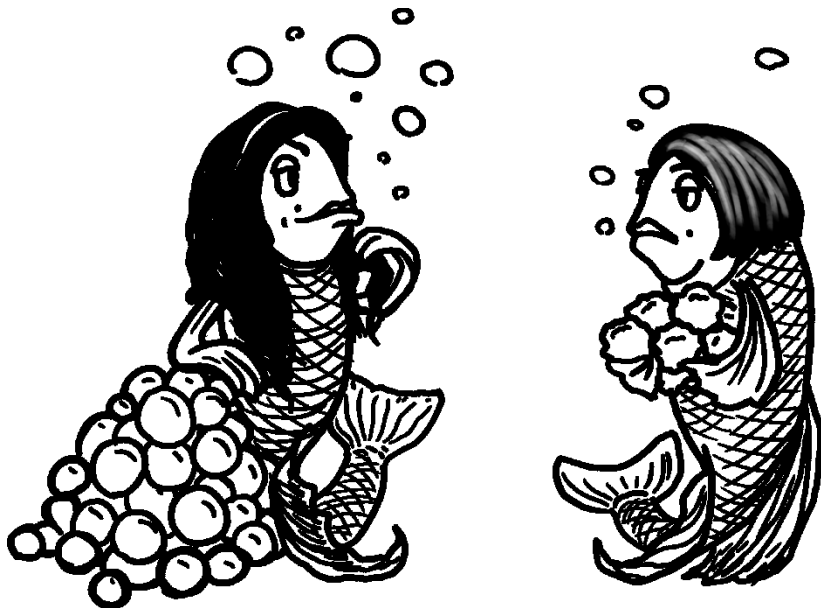
4. Výsledky a diskuze

Halančici rodu *Nothobranchius* nejsou jedinými zástupci ryb s délkou života kratší než jeden rok. **Článek 1** poskytuje systematický přehled diverzity krátkověkých ryb a popisuje jejich evoluční ekologii. Celkem bylo identifikováno na 60 druhů ryb s nejčastějšími zástupci v taxonomických řádech Gobiiformes a Clupeiformes. Takto krátkověké ryby obývají vysoce produktivní prostředí, které lze charakterizovat jako mělké teplé vody, typicky korálové útesy nebo pelagické vody. Jejich krátký život je často omezen predačním tlakem a jsou tak zásadní součástí trofické kaskády.

Klíčové principy stárnutí je obtížné odhalit bez správného pochopení základní biologie modelových organismů (Alfred & Baldwin, 2015; Reichard, 2016a). Rychlost dospívání a tempo tělesného růstu mají významné důsledky pro průběh senescence (Lee et al., 2013; Williams, 1957). **Článek 2** popisuje extrémně rychlé dospívání halančíka tyrkysového v přírodě, jelikož běžně dospívá do 14 dnů po vylíhnutí. Halančík tyrkysový je tak nejrychleji dospívajícím obratlovcem. Rychlost růstu volně žijících halančíků rodu *Nothobranchius* popisuje **článek 3** a poukazuje na mnohem rychlejší růst halančíků v přírodě než v zajetí. Pomalejší růst ryb v podmínkách zajetí je pro ryby netypický. Tyto extrémně rychlé životní strategie divokých *N. furzeri* naznačují, že se může stárnutí v zajetí a ve volné přírodě výrazně lišit. Bylo tedy nutné propojit empirické údaje o senescenci z volné přírody a laboratoře.

Výzkum senescence u volně žijících organismů je nezbytný pro správné pochopení evolučního původu senescence a pro pochopení vlivu prostředí na senescenci (Monaghan et al., 2008; Reichard, 2016a). **Článek 4** poskytuje první demografická data o délce dožití volně žijících populací *N. furzeri*. Početnost divoké populace halančíků klesá vyšším tempem než plocha tůní, které obývají. To je zcela v rozporu s obecným předpokladem, že vysychání tůní je hlavním environmentálním selekčním faktorem pro délku života halančíků. **Článek 5** popisuje, že s věkem nedochází k výraznému poklesu investice do reprodukce u volně žijících samic a samců *N. furzeri*.

Srovnání procesu stárnutí v přírodě a v zajetí může poskytnout důležité poznatky pro mechanistické pochopení tohoto fenoménu (Monaghan et al., 2008; Reichard, 2016a). Proto jsme navázali na předchozí zjištění z přírody



laboratorním pokusem zaměřeným na reprodukční senescenci *N. furzeri*

v laboratorních podmínkách. Tato studie (**Článek 6**) jasně prokázala, že pokles reprodukčních funkcí přichází ve velmi pokročilém věku, kdy v divokých populacích obvykle zbývá jen několik posledních přeživších. Rozpor v průběhu reprodukční senescence mezi divokými a laboratorními *N. furzeri* jsou v souladu s Medawarovou teorií, která předpokládá, že senescence se může projevit pouze v bezpečném prostředí při zamezení mortality vlivem vnějších podmínek (Medawar, 1952), což vysvětluje, proč jsou senescentní jedinci v přírodě extrémně vzácní. Díky kombinaci terénního výzkumu s laboratorními výsledky nyní máme poměrně ucelený přehled o reprodukční senescenci u *N. furzeri*.

Několik laboratorních studií v posledních dvou desetiletích zkoumalo, jak teplota prostředí ovlivňuje různé markery senescence u halančíků. (např. Valenzano et al., 2006b). V té době se nevědělo nic o teplotních nárocích tohoto druhu a experimenty byly provedeny za konstantních teplot ignorující přirozené teplotní výkyvy v průběhu 24 hodin (Reichard, 2016b). **Článek 8** popsal teplotní nároky *Nothobranchius* spp. a **článek 7** popisuje, jak cirkadiánní výkyvy prostředí synchronizují chování v divokých populacích halančíků. Tyto nové poznatky byly využity pro návržení zásadního experimentu (**Článek 9**), jehož cílem bylo v laboratoři porovnat průběh senescence při konstantní teplotě a ekologicky relevantním kolísání teploty. Experiment prokázal výrazně delší dožití a zlepšení reprodukce při teplotních výkyvech. Studie také ukázala, že laboratorní výsledky získané při konstantní teplotě mohou být zkreslené. Experiment zkoumající vliv tepelných fluktuací na senescenci pravděpodobně nebyl nikdy proveden u jiných obratlovců a poukázal na nový způsob modulace senescence.

V průběhu laboratorního výzkumu halančíků vyvstala řada otázek k vyřešení týkající se chovu tohoto druhu v laboratorních podmínkách. Standardizace potravy laboratorních halančíků je stále poměrně

opomíjeným tématem a to i přes znalost jejího vlivu na senescenci (Valenzano et al., 2006a) nebo reprodukci (Vrtílek & Reichard, 2015). Laboratorní halančici jsou v současnosti krmeni především larvami pakomárů (Polačik et al., 2016), což je nutričně variabilní strava potenciálně obsahující kontaminanty (Shari et al., 2014). **Článek 10** představuje protokol pro převedení halančičů z patentek na suché peletované krmivo. Jedná se o první krok při vývoji standardizovaného protokolu ke krmení laboratorních halančičů.

Řada histologických studií laboratorních ryb je zatížena chybnými diagnózami (Wolf et al., 2018). *Nothobranchius furzeri* byl považován za výjimečně náchylného ke spontánnímu vzniku "tumorů", což je mezi rybami spíše výjimečné (Ackerman & Gerhard, 2018). Nicméně takto vysoká incidence tumorů je neobvyklá (Hochberg & Noble, 2017). **Článek 11** nabízí přehled histopatologie halančičů a identifikuje možné chybné diagnózy objevující se v literatuře. Tento poslední příspěvek disertační práce zpochybňuje spontánní původ "tumorů" a interpretuje je jako imunitní reakci vůči bakteriálním původcům. V budoucnu by měla být věnována větší pozornost zoohygieně chovů a správné identifikaci histologických a histopatologických nálezů. Podrobnější informace o výše uvedených tématech lze nalézt v příslušných pracích.

5. Závěry

Hlavní dopad této disertační práce je trojí. 1/ bezrozporně potvrzuje reprodukční senescenci u ryb - obratlovců s neukončeným růstem; 2/ významně přispívá k poznání environmentálního vlivu na senescenci - role ekologicky relevantní teplotní fluktuace a vliv přírodních vs. laboratorních podmínek na reprodukční senescenci; 3/ přispívá k rigoróznějšímu využití halančičů rodu *Nothobranchius* protokolem ke krmení halančičů suchým

krmivem a také identifikací chybných diagnóz v histopatologii tohoto druhu. Dále popisuje nejrychlejší dospívání, které kdy bylo zaznamenáno u jakéhokoliv obratlovce, a představuje rozmanitost druhů ryb s přirozenou délkou dožití pod jeden rok. Všechny výše uvedené body zpochybnily dříve postulované hypotézy nebo běžnou praxi ve výzkumu využívajícím halančiky rodu *Nothobranchius* jako model. Prezentované poznatky mohou mít přímé důsledky pro další výzkum senescence.

Z obecného hlediska tato disertační práce zdůrazňuje, že prostředí významně moduluje senescenci, a že kombinace laboratorního a terénního výzkumu a znalost základní biologie modelového organismu jsou klíčové pro výzkum a interpretaci senescence stejně tak jako pro rigorózní navrhování experimentů.

6. Použitá literatura

- Ackerman, H. D., & Gerhard, G. S. (2018). Piscine Polemics; Small Tropical Fish Species as Models for Aging Research. *Comps Handbook of Models for Human Aging* (pp. 361–375). Elsevier Inc.
- Alfred, J., & Baldwin, I. T. (2015). New opportunities at the wild frontier. *eLife*, 4, e06956.
- Cellerino, A., Valenzano, D. R., & Reichard, M. (2016). From the bush to the bench: The annual *Nothobranchius* fishes as a new model system in biology. *Biological Reviews*, 91, 511–533.
- Gerhard, G. S., Malek, R. L., Keller, E., Murtha, J., & Cheng, K. C. (2004). Zebrafish, killifish, neither fish, both fish? *Journal of Gerontology*, 59, 873–875.
- Hochberg, M. E., & Noble, R. J. (2017). A framework for how environment contributes to cancer risk. *Ecology Letters*, 20, 117–134.
- Jones, O. R., Gaillard, J. M., Tuljapurkar, S., Alho, J. S., Armitrage, K. B.,

- Becker, P. H., ... Coulson, T. (2008). Senescence rates are determined by ranking on the fast – slow life-history continuum. *Ecology Letters*, 664–673.
- Jones, O. R., Scheuerlein, A., Salguero-Gómez, R., Camarda, C. G., Schaible, R., Casper, B. B., ... Vaupel, J. W. (2014). Diversity of ageing across the tree of life. *Nature*, 505, 169–173.
- Kirkwood, T. B. L. (1977). The evolution of aging. *Nature*, 270, 301–304.
- Lee, W. S., Monaghan, P., & Metcalfe, N. B. (2013). Experimental demonstration of the growth rate – lifespan trade-off. *Proceedings of the Royal Society B*, 280, 20122370.
- Medawar, P. B. (1952). *An unsolved problem in biology*. London: Levis.
- Monaghan, P., Charmantier, A., Nussey, D. H., & Ricklefs, R. E. (2008). The evolutionary ecology of senescence. *Functional Ecology*, 22, 371–378.
- Polačik, M., Blažek, R., & Reichard, M. (2016). Laboratory breeding of the short-lived annual killifish *Nothobranchius furzeri*. *Nature Protocols*, 11, 1396–1413.
- Reichard, M. (2016a). Evolutionary ecology of aging: Time to reconcile field and laboratory research. *Ecology and Evolution*, 6, 2988–3000.
- Reichard, M. (2016b). The evolutionary ecology of african annual fishes. In N. Berois, R. García, & R. O de Sá (Eds.), *Annual fishes: life history strategy, diversity, and evolution* (pp. 133–158). CRC Press.
- Reichard, M., & Polačik, M. (2019). *Nothobranchius furzeri*, an ‘instant’ fish from an ephemeral habitat. *eLife*, 8, 1–11.
- Reznick, D. N., Ghalambor, C., & Nunney, L. (2002). The evolution of senescence in fish. *Mechanisms of Ageing and Development*, 123, 773–789.
- Shari, M., Pasmans, F., Adriaensen, C., Laing, G. D., Paul, G., Janssens, J.,

- & Martel, A. (2014). Chironomidae bloodworms larvae as aquatic Amphibian food. *Zoo Biology*, *7*, 1–7.
- Valenzano, D. R., Terzibasi, E., Genade, T., Cattaneo, A., Domenici, L., & Cellarino, A. (2006a). Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Current Biology*, *16*, 296–300.
- Valenzano, D. R., Terzibasi Tozzini, E., Cattaneo, A., Domenici, L., & Cellarino, A. (2006b). Temperature affects longevity and age-related locomotor and cognitive decay in the short-lived fish: *Nothobranchius furzeri*. *Aging Cell*, *5*, 275–278.
- Vaupel, J. W. (2010). Biodemography of human ageing. *Nature*, *464*, 536–542.
- Vaupel, J. W., Baudisch, A., Dölling, M., Roach, D. A., & Gampe, J. (2004). The case for negative senescence. *Theoretical Population Biology*, *65*, 339–351.
- Vrřílek, M., & Reichard, M. (2015). Highly plastic resource allocation to growth and reproduction in females of an African annual fish. *Ecology of Freshwater Fish*, *24*, 616–628.
- Williams, G. C. (1957). Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence. *Evolution*, *11*, 398–411.
- Wolf, J. C., Wheeler, J. R., Wolf, C., & Wheeler, J. R. (2018). A critical review of histopathological findings associated with endocrine and non-endocrine hepatic toxicity in fish models. *Aquatic Toxicology*, *197*, 60–78.

1. Introduction

Humankind have never experienced such a long lifespan as we do today. Unprecedented medical and socially adverse consequences such as diabetes, cancer, dementia and increased demand for care of the elderly are therefore inevitable (Vaupel, 2010). Thus, the increased attention of scientists on understanding the senescence process (i.e. aging in the narrowest biological sense when an organism suffers from age-related physiological decline) and how to intervene is inevitable.

Evolutionary theories of senescence provide us with (at least partial) answers to why senescence occurs across the tree of life (Kirkwood, 1977; Medawar, 1952; Williams, 1957). The mutation accumulation theory of senescence is based on the assumption that the strength of natural selection declines with age which consequently leads to an accumulation of late acting negative mutations (Medawar, 1952). Antagonistic pleiotropy considers the negative effects of late acting mutations as a by-product of positively selected pleiotropic alleles acting positively early in life (Williams, 1957). Disposable soma theory assumes that there is a trade-off between resource allocation in soma and germ line cells (Kirkwood, 1977). The transfer of genes to each successive generation is essential for evolution of organisms and thus investment into the germline comes with higher long term benefits than maintenance of the somatic cells (Kirkwood, 1977).

There is huge diversity in senescence across multicellular organisms (Jones *et al.*, 2014). Organisms with indeterminate growth are predicted to completely avoid senescence or experience only “negligible senescence” (Vaupel *et al.*, 2004). This is based on the assumption that the fitness (e.g. fecundity, competitive ability, survival) of these organisms is positively related to their body size and thus natural selection would favour large (and consequently old) individuals over small ones (Vaupel *et al.*, 2004). These

assumptions are in striking contrast to what is observed in typically used model organisms such as fruit flies, roundworms or mice which cease growth at maturity (Gerhard *et al.*, 2004; Reznick *et al.*, 2002). Potential escape from senescence in organisms with indeterminate growth makes them exciting models for investigating the senescence process and how to intervene.

Fishes (Teleostei/Actinopterygii) represent a particularly rich group of vertebrates with indeterminate growth (Reznick *et al.*, 2002). There is, however, only limited knowledge on whether they suffer from senescence (Reznick *et al.*, 2002). Recently, an extremely short-lived killifish *Nothobranchius furzeri* was introduced as a promising model for senescence research (Cellerino *et al.*, 2016).

Nothobranchius furzeri has the shortest lifespan of any vertebrate (typically living less than a year) that can be successfully bred in captivity (Cellerino *et al.*, 2016). It originates from shallow periodically desiccating savanna pools in south-east Africa (Reichard & Polačik, 2019). The adaptations to this environment entail desiccation-resistant embryos, fast maturity, rapid growth and high fecundity (reviewed in Reichard & Polačik, 2019).

The fast pace of life in combination with a long period of indeterminate post-maturity growth of *N. furzeri* provides a unique opportunity to test the expression of senescence in an organism with these characteristics. A rapid lifecycle is expected to come with the cost of early and fast senescence (Jones *et al.*, 2008). How these conflicting assumptions express on the senescence phenotype of *N. furzeri* is being studied and is the core of this dissertation.

2. Aims of the study

The aims of this dissertation can be generally divided into five points:

1/ to provide insights into the wider evolutionary-ecological context of fishes with a natural lifespan shorter than one year;

2/ to identify essential ecological and life history traits of *N. furzeri* which are related to senescence in the wild (diurnal activity, growth rate, age at maturity) and the laboratory (thermal requirements)

3/ to describe actuarial senescence of *N. furzeri* in their natural habitat

4/ to test how the environment affects senescence of *Nothobranchius furzeri*

(a) reproductive senescence in wild fish vs in laboratory fish

(b) stable temperature conditions vs thermal fluctuations

5/ to address outstanding challenges of *Nothobranchius* laboratory husbandry and health indicators

a) establish a replacement for currently used live food with a pelleted diet

b) review histopathology of *Nothobranchius* in laboratory colonies

3. Material and methods

All these aspects were studied using a combination of field and laboratory research. Data for this dissertation were collected as part of a five-month fieldwork project in Mozambique that was followed by 30 months of laboratory experimental work. Novel insights on life histories in the wild (reproductive senescence in wild populations, daily fluctuations in natural environment and fish behaviour) and captivity (thermal requirements) were then further investigated in laboratory experiments (captive reproductive senescence; impact of temperature fluctuation on *N. furzeri* senescence). During these laboratory studies, several practical

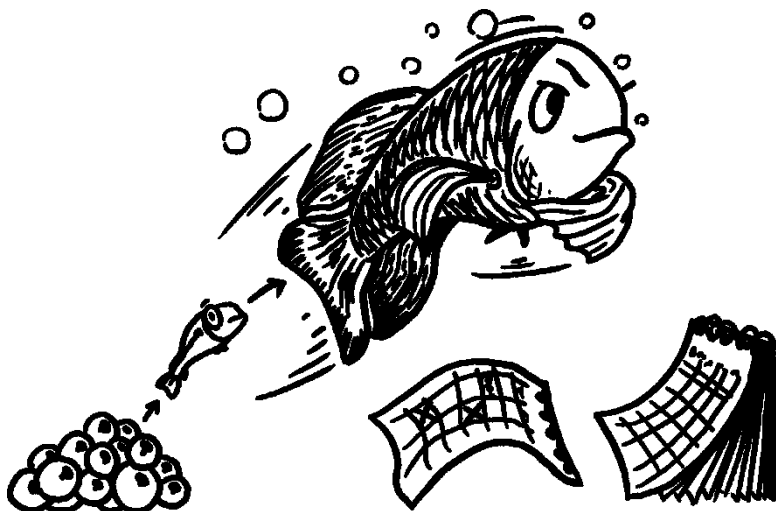
aspects that required further elaboration were identified. These were related to the replacement of live food which is currently recognized as the dietary “standard” for *Nothobranchius* fish (Polačik et al., 2016) but has several shortcomings for fish husbandry. Another topic was histopathology of *Nothobranchius* fishes, where misdiagnoses may have occurred in some previous studies on their senescence. The above outlined aims are addressed and developed by 6 first-author papers and 5 second-authored papers.

4. Results and Discussion

Killifish from the genus *Nothobranchius* are not the only fish species with a lifespan shorter than one year. **Paper 1** provides a systematic review of the diversity of short-lived fishes and synthesizes their common ecological and evolutionary patterns. About 60 fish species were identified with the most frequent occurrence in orders Gobiiformes and Clupeiformes. They live in highly productive environments characterized as shallow warm waters, typically coral reefs or pelagic waters. Their short lifespan is frequently constrained by strong predation and thus they are a crucial part of the trophic cascade.

The fundamental principles of senescence are difficult to reveal without proper understanding of model organisms’ essential life history traits (Alfred & Baldwin, 2015; Reichard, 2016a). Growth, and pace of maturation have significant consequences for senescence progression (Lee *et al.*, 2013; Williams, 1957). **Paper 2** describes the rapid maturation of wild *N. furzeri*, they commonly mature within 14 days post hatching thus they are the fastest maturing vertebrate. **Paper 3** estimated growth patterns in wild *Nothobranchius* species and shows that growth is much faster in the wild than in the captivity. Slower growth in captivity is in contrast to the majority of captive-bred fish species. The extremely rapid life cycles of

wild *N. furzeri* suggest that senescence in captivity and the wild may differ significantly. Thus, linking empirical data on senescence from wild and laboratory populations is necessary. contrast to the majority of captive-bred fish species. The extremely rapid life cycles of wild *N. furzeri* suggest that senescence in captivity and the wild may differ significantly. Thus, linking empirical data on senescence from wild and laboratory populations is necessary.



Describing expression of senescence in the wild is the main condition for proper understanding of its evolutionary origin and the environmental conditions that modulate it (Monaghan *et al.*, 2008; Reichard, 2016a). **Paper 4** provides the first demographic data on age-related survival (actuarial senescence) in wild populations of *N. furzeri*. It describes how fish abundance declined much faster than the pool area decreased. This resulted in lower fish density at later stages of the pool's existence, quite in contrast to the general expectation of pool desiccation being the main extrinsic selection driver for *Nothobranchius* lifespan. **Paper 5** shows age-

related allocation to reproduction in wild females and males of *N. furzeri* without a strong decline with increasing age.

Comparing senescence patterns between wild and captive populations may provide important insights for understanding the mechanisms of senescence (Monaghan *et al.*, 2008; Reichard, 2016a). We therefore followed up with a laboratory project on age-dependent reproduction of individually kept males and females of *Nothobranchius furzeri*. This study (**Paper 6**) clearly demonstrated that a decline in reproductive function comes at a very advanced age when only a few survivors remained in the wild populations. The contrasting findings from wild and captive *Nothobranchius furzeri* supports Medawar's theory which predicts that senescence may express only when extrinsic mortality is suddenly reduced (Medawar, 1952). This explains why senescent individuals are extremely rare in the wild. Thanks to the combination of field research with laboratory outcomes, we now possess a relatively complete picture of the overall pattern in reproductive senescence of *N. furzeri*.

Several laboratory studies in the past two decades investigated how ambient temperature affects various senescence markers of *Nothobranchius* spp. (e.g. Valenzano *et al.*, 2006b). At that time, nothing was known about the thermal requirements of this species and experiments were set at constant temperatures ignoring the diurnal temperature fluctuations in the natural habitat (Reichard, 2016b). **Paper 8** assessed thermal requirements of *Nothobranchius* spp. and **Paper 7** described how the circadian rhythm of environmental fluctuations synchronizes behaviour in wild populations. These novel insights were used to design a crucial experiment that aimed to compare senescence patterns under constant temperature with an ecologically relevant fluctuating thermal environment in the laboratory (**Paper 9**). The experiment demonstrated a significant improvement in

survival and reproduction under the thermal fluctuation conditions. The study also showed that laboratory findings under constant temperature may be biased. An experiment examining the effect of thermal fluctuation on senescence has probably never been conducted in another vertebrate and points to potential environmental intervention of senescence in vertebrates.

Some questions pertaining to the husbandry of this species under laboratory conditions remain. Standardization of diet is still a relatively neglected topic in *Nothobranchius* spp husbandry, despite pioneering diet experiments that aimed to modify senescence (Valenzano *et al.*, 2006a) or reproduction (Vrtílek & Reichard, 2015). *Nothobranchius* spp. in laboratory colonies are currently mainly fed with chironomid larvae (Polačik *et al.*, 2016), a nutritionally variable source also potentially containing contaminants (Shari *et al.*, 2014). **Paper 10** provides a protocol on how to replace a chironomid larvae diet with pelleted food. This is the first step in developing a standardized feeding protocol.

Many studies on the histology of laboratory fish are burdened by misdiagnoses (Wolf *et al.*, 2018). *Nothobranchius furzeri* was thought to be exceptionally prone to develop “tumours” which is rather exceptional among fishes (Ackerman & Gerhard, 2018). Nonetheless, the pattern was conspicuous as tumour incidence was unnaturally high (Hochberg & Noble, 2017). **Paper 11** offers an overview of *Nothobranchius* histopathology and identifies potential misdiagnoses appearing in the literature using *N. furzeri* as a model. This last paper of the dissertation questions the origin of “tumours” as spontaneous and interprets them as the result of an immune response towards bacterial infections. In the future, more attention should be devoted to the proper identification of histological and histopathological findings. More detailed information about the above-mentioned topics can be found in the corresponding papers.

5. Conclusion

The major impact of this dissertation is threefold. It 1/ indisputably presents empirical data on reproductive senescence in fish – a vertebrate with a long period of post-maturity growth; 2/ significantly increases our understanding of how environment controls senescence - role of ecologically relevant fluctuating temperature or influence of natural vs captive conditions on reproductive senescence; 3/ introduces more rigorous use of *Nothobranchius* fish in laboratory research by presenting a protocol for replacing live food with pellets as well as identifying misdiagnoses in histopathology of this species. In addition, it describes the earliest age at maturation found in any vertebrate and presents the diversity of fish species with an annual lifespan. All the above mentioned points challenged previously postulated hypotheses or common practice in research using *Nothobranchius* fishes as models and the presented findings may have direct consequences for senescence research in general.

In conclusion, this dissertation emphasizes that environment can significantly modulate senescence and that a combination of laboratory and field research as well as essential knowledge of the biology of a model organism is extremely important for designing experiments and interpreting their outcomes.

6. References

- Ackerman, H. D., & Gerhard, G. S. (2018). Piscine Polemics; Small Tropical Fish Species as Models for Aging Research. *Conns Handbook of Models for Human Aging* (pp. 361–375). Elsevier Inc.
- Alfred, J., & Baldwin, I. T. (2015). New opportunities at the wild frontier. *eLife*, 4, e06956.

- Cellerino, A., Valenzano, D. R., & Reichard, M. (2016). From the bush to the bench: The annual *Nothobranchius* fishes as a new model system in biology. *Biological Reviews*, *91*, 511–533.
- Gerhard, G. S., Malek, R. L., Keller, E., Murtha, J., & Cheng, K. C. (2004). Zebrafish, killifish, neither fish, both fish? *Journal of Gerontology*, *59*, 873–875.
- Hochberg, M. E., & Noble, R. J. (2017). A framework for how environment contributes to cancer risk. *Ecology Letters*, *20*, 117–134.
- Jones, O. R., Gaillard, J. M., Tuljapurkar, S., Alho, J. S., Armitrage, K. B., Becker, P. H., ... Coulson, T. (2008). Senescence rates are determined by ranking on the fast – slow life-history continuum. *Ecology Letters*, 664–673.
- Jones, O. R., Scheuerlein, A., Salguero-Gómez, R., Camarda, C. G., Schaible, R., Casper, B. B., ... Vaupel, J. W. (2014). Diversity of ageing across the tree of life. *Nature*, *505*, 169–173.
- Kirkwood, T. B. L. (1977). The evolution of aging. *Nature*, *270*, 301–304.
- Lee, W. S., Monaghan, P., & Metcalfe, N. B. (2013). Experimental demonstration of the growth rate – lifespan trade-off. *Proceedings of the Royal Society B*, *280*, 20122370.
- Medawar, P. B. (1952). *An unsolved problem in biology*. London: Levis.
- Monaghan, P., Charmantier, A., Nussey, D. H., & Ricklefs, R. E. (2008). The evolutionary ecology of senescence. *Functional Ecology*, *22*, 371–378.
- Polačik, M., Blažek, R., & Reichard, M. (2016). Laboratory breeding of the short-lived annual killifish *Nothobranchius furzeri*. *Nature Protocols*, *11*, 1396–1413.
- Reichard, M. (2016a). Evolutionary ecology of aging: Time to reconcile field and laboratory research. *Ecology and Evolution*, *6*, 2988–3000.

- Reichard, M. (2016b). The evolutionary ecology of african annual fishes. In N. Berois, R. García, & R. O de Sá (Eds.), *Annual fishes: life history strategy, diversity, and evolution* (pp. 133–158). CRC Press.
- Reichard, M., & Polačik, M. (2019). *Nothobranchius furzeri*, an ‘instant’ fish from an ephemeral habitat. *eLife*, 8, 1–11.
- Reznick, D. N., Ghalambor, C., & Nunney, L. (2002). The evolution of senescence in fish. *Mechanisms of Ageing and Development*, 123, 773–789.
- Shari, M., Pasmans, F., Adriaensen, C., Laing, G. D., Paul, G., Janssens, J., & Martel, A. (2014). Chironomidae bloodworms larvae as aquatic Amphibian food. *Zoo Biology*, 7, 1–7.
- Valenzano, D. R., Terzibasi, E., Genade, T., Cattaneo, A., Domenici, L., & Cellarino, A. (2006a). Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Current Biology*, 16, 296–300.
- Valenzano, D. R., Terzibasi Tozzini, E., Cattaneo, A., Domenici, L., & Cellarino, A. (2006b). Temperature affects longevity and age-related locomotor and cognitive decay in the short-lived fish: *Nothobranchius furzeri*. *Aging Cell*, 5, 275–278.
- Vaupel, J. W. (2010). Biodemography of human ageing. *Nature*, 464, 536–542.
- Vaupel, J. W., Baudisch, A., Dölling, M., Roach, D. A., & Gampe, J. (2004). The case for negative senescence. *Theoretical Population Biology*, 65, 339–351.
- Vrřílek, M., & Reichard, M. (2015). Highly plastic resource allocation to growth and reproduction in females of an African annual fish. *Ecology of Freshwater Fish*, 24, 616–628.
- Williams, G. C. (1957). Pleiotropy, natural selection and the evolution of

senescence. *Evolution*, *11*, 398–411.

Wolf, J. C., Wheeler, J. R., Wolf, C., & Wheeler, J. R. (2018). A critical review of histopathological findings associated with endocrine and non-endocrine hepatic toxicity in fish models. *Aquatic Toxicology*, *197*, 60–78.

Curriculum vitae

Name: Jakub Žák
Year of birth: 1991
Place of birth: Hradec Králové, Czech Republic
e-mail: fish.jakub.zak@gmail.com

EDUCATION

2017 –present Ph.D. degree programme
Charles University, Faculty of Science, Department of Zoology, (Czech Republic)
Thesis: The biology of aging in *Nothobranchius* fishes
Supervisor: Prof. RNDr. Martin Reichard, PhD.

2014-2017 Master's degree programme
Charles University, Faculty of Science, Department of Zoology, (Czech Republic)
Thesis: : The sexual segregation of fish in Rimov Reservoir (Czech Republic)
Supervisor: RNDr. Marie Prchalová, PhD.

2012-2015 Bachelor's degree programme
Faculty of Fisheries and Protection of Waters, University of South Bohemia in České Budějovice (Czech Republic)
Thesis: Influence of hormonal treatment on success of fertility of Weather loach (*Misgurnus fossilis*)
Supervisor: RNDr. Bořek Drozd, PhD

2011-2014 Bachelor's degree programme
Charles University, Faculty of Science, (Czech Republic)
Thesis: The methods of study habitats and microhabitats preferences of freshwater fishes of Central Europe
Supervisor: RNDr. Miroslav Švátora, CSc.

RESEARCH EXPERIENCE

2020 (8-10) John Fitzpatrick's lab, Department of Zoology, Stockholm University, Sweden
Supervisor: John Fitzpatrick
Two and half months internship focused on aggression motivation in livebearing fish pygmy halfbeak (*Desmogenys collettei*)

2017 (7-8) Tom van Dooren's lab, CEREEP-Ecotron IleDeFrance, Paris, France
Supervisor: Tom van Dooren
Two month internship focused on data collection for body colour and brain size analysis of annual killifish from the genus *Austrolebias*

Field experiences 5 months in Mozambique, 3 weeks in Tanzania, 2x two weeks in Netherlands, several short time field works in Slovakia and Czechia

AWARDS, GRANTS AND SCHOLARSHIPS

- Scholarship (2021) Erasmus+ mobility stipend for two and half months practical internship at Stockholm University, Sweden
- Grant (2021) Grant Agency of the Charles University, No:30121 Effect of caloric and protein restriction on aging of a short-lived fish *Nothobranchius furzeri*
- Grant (2021) Ministry of education youth and sports: “Projects of major infrastructures for research, development and innovations” CENAKVA LM2018099, Choosing the best diet for the aging fish model -turquoise killifish
Project Code: 2021-02-109
- Award (2020) Award for the best student poster, The Czech Fishery and Ichthyological Conference, RYBIKON 2020
- Award (2015) 3rd place in 5th season of regional competition of diploma thesis with environmental topic.
Name of awarded thesis: Influence of hormonal treatment on success of fertility of the Weather loach (*Misgurnus fossilis*)

PUBLICATIONS

Articles in journals with IF

- 20 Reichard, M., Blažek, R., **Žák, J.**, Cellierino, A., Polačik, M. (2022) The sources of sex differences in aging in annual fishes, *Journal of Animal Ecology*, 10.1111/1365-2656.13656
- 19 Polačik, M., Vrtilek, M., Reichard, M., **Žák, J.**, Blažek, R., & Podrabsky, J. (2021). Embryo ecology: Developmental synchrony and asynchrony in the embryonic development of wild annual fish populations. *Ecology and Evolution*, 11(9), 4945-4956.
- 18 Dyková, I., **Žák, J.**, Reichard, M., Součková, K., Slabý, O., Bystrý, V., & Blažek, R. (2021). Histopathology of laboratory-reared *Nothobranchius* fishes: Mycobacterial infections versus neoplastic lesions. *Journal of Fish Diseases*, 44(8), 1179-1190 .
- 17 **Žák, J.**, & Reichard, M. (2021). Reproductive senescence in a short-lived fish. *Journal of Animal Ecology*, 90(2), 492-502.
- 16 **Žák, J.** (2021). Diel pattern in common carp landings from angling competitions corresponds to their assumed foraging activity. *Fisheries Research*, 243, 106086.
- 15 Dyková, I., **Žák, J.**, Reichard, M., Součková, K., & Slabý, O. (2021). Swim bladder as a primary site of mycobacterial infection in *Nothobranchius* ‘belly sliders’. *Diseases of Aquatic Organisms*, 145, 111-117.

- 14 **Žák, J.**, Vrtílek, M., Polačik, M., Blažek, R., & Reichard, M. (2021). Short-lived fishes: Annual and multivoltine strategies. *Fish and Fisheries*, 22(3), 546-561.
- 13 **Žák, J.**, & M. Reichard, 2020. Fluctuating temperatures extend median lifespan, improve reproduction and reduce growth in turquoise killifish. *Experimental Gerontology* 140: 111073.
- 12 **Žák, J.**, Dyková, I., & Reichard, M. (2020). Good performance of turquoise killifish (*Nothobranchius furzeri*) on pelleted diet as a step towards husbandry standardization. *Scientific Reports*, 10(1), 8986.
- 11 **Žák, J.**, M. Prchalová, M. Šmejkal, P. Blabolil, M. Vašek, J. Matěna, M. Říha, J. Peterka, J. Seďa, & J. Kubečka, 2020. Sexual segregation in European cyprinids : consequence of response to predation risk influenced by sexual size dimorphism. *Hydrobiologia* 847: 1439–1451.
- 10 **Žák, J.**, Vrtílek, M., & Reichard, M. (2019). Diel schedules of locomotor, reproductive and feeding activity in wild populations of African annual killifish. *Biological Journal of the Linnean Society*, 128(2), 435-450.
- 9 Vrtílek, M., **Žák, J.**, Polačik, M., Blažek, R., & Reichard, M. (2019). Rapid growth and large body size in annual fish populations are compromised by density-dependent regulation. *Journal of Fish Biology*, 95(2), 673-678.
- 8 Vrtílek, M., **Žák, J.**, Blažek, R., Polačik, M., Cellerino, A., & Reichard, M. (2018). Limited scope for reproductive senescence in wild populations of a short-lived fish. *The Science of Nature*, 105(11), 1-8.
- 7 **Žák, J.**, Reichard, M., & Gvoždík, L. (2018). Limited differentiation of fundamental thermal niches within the killifish assemblage from shallow temporary waters. *Journal of Thermal Biology*, 78, 257-262.
- 6 Jůza, T., Blabolil, P., Baran, R., Draštík, V., Holubová, M., Kočvara, L., ... **Žák, J.**, Ketelaars, H. A. (2018). Comparison of two passive methods for sampling invasive round goby (*Neogobius melanostomus*) populations at different depths in artificial lakes. *Fisheries Research*, 207, 175-181.
- 5 Vrtílek, M., **Žák, J.**, Pšenička, M. & Reichard, M. 2018. Extremely rapid maturation of a wild African annual fish. *Current Biology* 28: R822–R824

- 4 **Žák, J.**, Jůza, T., Blabolil, P., Baran, R., Bartoň, D., Draštík, V., ... & Wagenvoort, A. J. (2018). Invasive round goby *Neogobius melanostomus* has sex-dependent locomotor activity and is under-represented in catches from passive fishing gear compared with seine catches. *Journal of Fish Biology*, 93(1), 147-152.
- 3 Jůza, T., Blabolil, P., Baran, R., Bartoň, D., Čech, M., Draštík, V., ... **Žák, J.**, Peterka, J. (2018). Collapse of the native ruffe (*Gymnocephalus cernua*) population in the Biesbosch lakes (the Netherlands) owing to round goby (*Neogobius melanostomus*) invasion. *Biological Invasions*, 20(6), 1523-1535.
- 2 Vrtílek, M., **Žák, J.**, Polačik, M., Blažek, R., & Reichard, M. (2018). Longitudinal demographic study of wild populations of African annual killifish. *Scientific Reports*, 8(1), 4774.
- 1 Pimakhin, A., Kouřil, J., Stejskal, V., & **Žák, J.** (2015). The effect of geographical origin of perch (*Perca fluviatilis* L. 1758) populations on growth rates under natural and aquaculture conditions: a review. *Journal of Applied Ichthyology*, 31, 56-63.

Book chapters

- 1 Reichard, M., Blažek, R., Dyková, I., **Žák, J.**, & Polačik, M. (2022). Challenges in keeping annual killifish. In *Laboratory Fish in Biomedical Research* (pp. 289-310). Academic Press.

POPULARIZATION OF SCIENCE

English	Animal Ecology in Focus (1)
Czech	e-Akvárium (5)
	Rybářství (1)
	www.mrk.cz (1)