

Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta
Charles University in Prague, First Faculty of Medicine

Studijní program: P1516
Studijní obor: Biologie a patologie buňky

Autoreferát disertační práce
Summary of Ph.D. Thesis



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Zásobní buňky a jejich role ve fyziologii želvušek

**STORAGE CELLS AND THEIR ROLE IN
TARDIGRADE PHYSIOLOGY**

Mgr. Michaela Czerneková

Školitel/Supervisor:
doc. RNDr. Petr Svoboda, DrSc.

Konzultant/Co-supervisor:
prof. K.I. Jönsson

Praha, 2020

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Biologie a patologie buňky

Předseda oborové rady: doc. MUDr. Tomáš Kučera, Ph.D.

Školící pracoviště: Fyziologický ústav AV ČR, Kristianstad University, Silesian University

Školitel: doc. RNDr. Petr Svoboda, DrSc.

Konzultant: prof. K.I. Jönsson

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.



OBSAH/CONTENT

Abstrakt (česky).....	4
Abstract (english)	5
ČESKÝ ODDÍL	6
1. Úvod.....	6
2. Hypotézy a cíle práce	7
3. Materiál a metodika	7
3.1 Modelový organismus: <i>Richtersius cf. coronifer</i>	7
3.2 Studovaná oblast.....	8
3.3 Sběr dat a jejich analýza	8
4. Výsledky a diskuze	8
4.1 Mitóza zásobních buněk.....	8
4.2 Experimentálně indukovaná opakovaná anhydrobióza	9
4.2.1 Tvorba soudečku	10
4.2.2 Efekt dlouhotrvající desikace v kombinaci s teplotním stresem	10
4.3 Zásobní buňky druhu <i>Richtersius cf. coronifer</i>	11
4.3.1 Zásobní buňky v závislosti na přežití stresorů: desikace a teplotní stres	11
5. Závěry.....	12
ANGLICKÝ ODDÍL/ENGLISH SECTION	13
1. INTRODUCTION	13
2. HYPOTHESIS and AIMS OF THE STUDY.....	14
3. MATERIALS and METHODS	15
3.1 Model species: <i>Richtersius cf. coronifer</i>	15
3.2 Study population.....	15
3.3 Data analyses.....	15
4. RESULTS and DISCUSSION	16
4.1 Mitosis in storage cells.....	16
4.2 Experimentally-indzced repeated anhydrobiosis	16
4.2.1 Tun formation.....	17
4.2.2 The effect of long-term desiccation in combination with temperature stress.....	18
4.3 The storage cells of <i>Richtersius cf. coronifer</i>	19
4.3.1 Storage cells ultrastructure with regard to survival of stress conditions: desiccationn and heat stress	19
5. CONCLUSIONS.....	19
6. POUŽITÁ LITERATURA/REFERENCES	21

ZÁSObNÍ BUŇKY A JEJICH ROLE VE FYZIOLOGII ŽELVUŠEK

ABSTRAKT

Želvušky (kmen Tardigrada) dokáží tolerovat řadu stresových podmínek (například téměř úplnou dehydrataci, vystavení extrémně nízkým i vysokým teplotám, a dokonce i otevřenému vesmírnému prostoru). Spadají tak mezi nejodolnější a radiaci-nejresistentnější mnohobuněčné organismy. Jejich tělní dutina je vyplněna volnými zásobními buňkami (tzv. storage cells, SC). Jejich role při anhydrobióze želvušek je předmětem diskuzí. Hlavním cílem této práce je (i) analyzovat přítomnost mitózy u SC, (ii) najít faktory, které ovlivňují anhydrobiotické přežití želvušek a (iii) popsat ultrastrukturu SC a ultrastrukturu SC vystavených stresorům desikace a teplotnímu stresu. Modelovým druhem pro všechny studie je druh *R. cf. coronifer*. Jedinci tohoto druhu jsou jedi z nejhojněji probádaných s ohledem na anhydrobiózu. Pro tyto účely byla využita řada histochemických technik v kombinaci se SEM, TEM a konfokální mikroskopií.

Za prvé, frekvence mitotického dělení SC želvušek je častější u juvenilních jedinců než u dospělců, a koreluje s růstovou fází jedinců. Výskyt mitózy je častější u jedinců v procesu ekdyze, ale celkový mitotický index je nízký. Dále, želvušky druhu *R. cf. coronifer* přežijí maximum šesti po sobě následujících cyklů desikace/rehydratace. S každým cyklem dochází k signifikatnímu snížení přežití jedinců, a po pátém cyklu k signifikatnímu snížení počtu ZB a zvýšení množství nesprávně tvořených soudečků ("semi-tun"). Želvušky tohoto druhu přežijí 6 měsíců dlouhou dehydrataci. Avšak teplotní stres snižuje přežití desikovaných želvušek. V souvislosti s desikací bylo pozorováno jen několik ultrastrukturálních změn v buňkách: (i) změna množství pigmentových granul a lipidových váčků v epidermálních buňkách, (ii) celkově sraštění všech buněk, (iii) zvýšení heterochromatinu SC, (iv) změna v densitě a obsahu zásobního materiálu v SC, (v) částečná ztráta jádérka. SC aktivních jedinců obsahují velké jádro, rozlišitelné jádérko, ribosomy, mitochondrie, RER, GA, a velké autofagosomy. Lipidy a polysacharidy tvoří hlavní složku rezervního materiálu ZB. Závěrem, u želvušek druhu *R. cf. coronifer* lze ultrastrukturně rozlišit dva typy ZB: (i) typ I buňky, které jsou metabolicky aktivní a obsahují velké množství rezervního materiálu ve formě zásobních váčků, a typ II buňky, které reprezentují mladé, nediferencované stem-cell-like buňky.

Klíčová slova: zásobní buňky, storage cells, coelomocyty, mitóza, želvušky, anhydrobióza, kryptobióza, Tardigrada, Richtersius coronifer,

Adresa autorky: Michaela Czerneková, Jan Evangelista Purkyně University,
Přírodovědecká fakulta, Katedra Biologie, Za Válcovnou 1000/8, Ústí nad Labem, 40096
E-mail: michaela.czernekova@ujep.cz

STORAGE CELLS AND THEIR ROLE IN TARDIGRADE PHYSIOLOGY

ABSTRACT

Tardigrades possess remarkable tolerance to numerous stress conditions (e.g. almost complete desiccation, exposure to very low sub-zero temperature, heat stress and even exposure to space in low Earth orbit). Indeed, they are among the most radiation-resistant multi-cellular organisms. The body cavity of tardigrades is filled with the storage cells (SC). Their role in anhydrobiosis has been discussed. The main objectives of this work were to analyse (i) the occurrence of mitosis in SC, (ii) the factors constraining anhydrobiotic survival, and (iii) the general ultrastructure of SC and their ultrastructure concerning the stress conditions. Our model species, *R. cf. coronifer* is one of the most extensively studied tardigrades concerning anhydrobiosis. Comprehensive histochemical techniques were used in combination with SEM, TEM, and confocal microscopy.

First, mitotic divisions of tardigrade SC occur with a higher frequency in juveniles than in adults and correlate with animal growth. Mitosis is more frequent in moulting tardigrades, but the overall mitotic index is low. Furthermore, tardigrades of *R. cf. coronifer* can survive the maximum of 6 repeated desiccation cycles with significantly declining survival rate with repeated desiccations and significantly lower number of SC and more incorrectly formed tuns (“semi-tuns”) after the fifth desiccation cycle. Tardigrades of *R. cf. coronifer* survive 6 months of desiccation. Heat stress, however, decreases the survival rate of desiccated tardigrades. Only a few ultrastructural changes were observed concerning to desiccation: (i) change in pigmentation in epidermal cells, (ii) overall cellular shrinkage, (iii) increments of heterochromatin in SC, (iv) change in density and contents of reserve material in SC, (v) partially loss of nucleoli. The SC of active specimens contain a large nucleus, distinct nucleolus, ribosomes, mitochondria, RER, GA, large autophagosomes. Lipids and polysaccharides are the main stored material in SC. Finally, two cell-types with different ultrastructure were defined in tardigrades of *R. cf. coronifer*: (i) type I cells are metabolically active and store nutrients in form of reserve spheres and type II cells that might represent undifferentiated stem-cell-like cells.

Key words: storage cells, coelomocytes, mitosis, tardigrades, anhydrobiosis, tun formation, cryptobiosis, Tardigrada, Richtersius coronifer

Author's address: Michaela Czerneková, Jan Evangelista Purkyně University,
Department of Biology, Za Válcovnou 1000/8, Ústí nad Labem, 40096, Czechia
E-mail: michaela.czernekova@ujep.cz

ČESKÝ ODDÍL

1. Úvod

Želvušky (kmen Tardigrada) jsou mnohobuněční hydrofilní mikrometazoa (0.1–1.2 mm) ze skupiny Ecdysozoa (Jørgensen et al., 2018; Møbjerg et al., 2019). Jsou charakterizovány jako méně známá skupina bezobratlých (Nelson, 2002). Na druhou stranu jsou dobře známí schopností přežít řadu nepříznivých podmínek ve formě ametabolického stavu, kryptobiózy, který je předmětem řady studií (Wright et al., 1992; Welnicz et al., 2011). Přežijí kompletní desikaci po dobu 9–20 let (Westh and Ramløv, 1991; Jørgensen et al., 2007) a byly extrahovány z mechových vzorků zmrazených až 30 let (Tsujimoto et al., 2016). V anhydrobiotickém (desikovaném) stavu přežijí řadu extrémních environmentálních i laboratorních podmínek, jako například velmi nízké teploty (Hengherr et al., 2009, 2010), -80°C po dobu 30 let (Tsujimoto et al., 2016), a dokonce i teploty blízké absolutní nule (Ramløv a Westh, 2001), vysoký osmotický tlak (Heidemann et al., 2016), ponoření v alkoholech o různé polaritě (Ramløv a Westh, 2001; Guidetti et al., 2012), velmi vysoké teploty až k $+70^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 hodiny (Ramløv a Westh, 2001), biocidní plyn methyl bromid (Jönsson and Guidetti, 2001), nízký a vysoký hydrostatický tlak (Ono et al., 2008), gamma-ozáření několik tisíc greyů (Gy) (Jönsson et al., 2005; Horikawa et al., 2009), ozáření ve formě těžkých iontů ^4He (Horikawa et al., 2006), protonů (Nilsson et al., 2010), iontů železa a helia (Jönsson and Wojcik, 2017), vysoké dávky UV radiace (Jönsson et al., 2008; Altiero et al., 2011; Horikawa et al., 2013), a také vystavení podmínkám otevřeného vesmírného prostoru (Jönsson et al., 2008; Persson et al., 2011). Celkově želvušky patří mezi mnohobuněčné organismy s největší odolností vůči radiaci (Nilsson et al., 2013; Jönsson, 2019). Jejich výzkum má tak významný potenciál pro vývoj nových technologií v oblasti radio-protektce a kryoprezervace biologických materiálů. Jen několik málo studií využilo tohoto potenciálu pro studium efektu stresorů na živé organismy, zejména v oblasti biomedicíny (Guidetti et al., 2012) a jen v nedávné době byla provedena transfekce tardigrade-specifických proteinů (RvLEAM, mitochondrial heat soluble, a MAHS) do lidských buněk (Hep-2). Došlo tak ke zvýšení tolerance transfekovaných buněk vůči hyperosmotickému stresu (Tanaka et al., 2015). Dalším z tardigrade-specifických proteinů je Dsup asociovaný s DNA, který byl transfekován do lidských embryonálních buněk ledvin (HEK293), čímž došlo k redukci poškození DNA vlivem iradiace o 40 %, a zvýšení viability těchto buněk (Hashimoto et al., 2016; Chavez et al., 2019). Ačkoli existuje několik hypotéz vysvětlujících toleranci želvušek vůči těmto podmínkám, nejsou jednotné a studium je limitováno na jen několik málo studovaných druhů. Přesné mechanismy jejich odolnosti nejsou dosud objasněny.

Aktuálně je popsáno přibližně 1300 druhů (Degma, 2019), vyskytujících se ve sladkovodních, terestrických i mořských prostředích. Jejich výskyt je však vždy vázán na tenký vodní film. Želvušky tvoří hlavní složku mikrofauny v meších a lišejnicích (Halberg et al., 2009). Jejich tělo má pět tělních segmentů: hlavový a 4 trupové s párem končetin zakončených drápkou nebo přísavnými disky o různém počtu a tvaru (Møbjerg et al., 2019). Jedná se o poměrně komplexní živočichy s dobře vyvinutou svalovinou, nervovým systémem, trávicím ústrojím a specializovaným vylučovacím a rozmnožovacím ústrojím (Nelson et al., 2005; Halberg and Møbjerg, 2012). Nemají však dýchací ani oběhový systém. Výměna plynů je umožněná difúzí přes kutikulu a epidermis. Oběhovou funkci přebírají zásobní buňky (SC) coelomového typu (body cavity cells, storage cells; Ramazzotti a Maucci, 1983; Jönsson et al., 2019).

Obecně lze říct, že buněčná biologie želvušek je zanedbaná oblast výzkumu i přesto, že několik studií zaměřených na buněčnou biologii bylo publikováno (Walz, 1973; Węglarska, 1975; Dewel et al., 1993; Avdonina et al., 2007; Hyra et al., 2016a, b).

2. Hypotézy a cíle práce

SC želvušek jsou volně plovoucí buňky v lymfě tělní dutiny. U aktivních druhů jsou pasivně přesouvány tělní lymfou (Dewel et al., 1993; Reuner, 2010). Vyplňují tak prostor mezi orgány. Občas byla pozorována jejich adheze k bazální membráně jiných tkání (Węglarska, 1975; Dewel et al., 1993). Tyto buňky jsou zodpovědné za důležité fyziologické funkce (např. syntéza, shromažďování a transport živin) a jsou vysoce metabolicky aktivní (Szymańska, 1994; Poprawa, 2006; Hyra et al., 2016a, b). Jejich tvar a obsah zásobních látek se může měnit (Hyra et al., 2016a, b). Přesto dosud nebyly klasifikovány potenciálně různé typy SC jako je tomu u jiných buněk coelomocytového typu. Některé studie popisují důležitou úlohu těchto buněk při kryptobióze (Węglarska, 1975; Jönsson and Rebecchi, 2002; Reuner et al., 2010).

Jelikož jsou studie želvušek prováděny jen na několika málo druzích, informací o případné klasifikaci, ultrastruktuře a specifické funkci těchto buněk a jejich potenciální roli v odolnosti želvušek vůči extrémním stresorům je dosud nedostatek. Hlavním cílem mé disertační práce je přispět k poznání funkce zásobních buněk v souvislosti se stresovou tolerancí želvušek. Želvušky jsou někdy charakterizovány jako organismy s konstantním počtem buněk v jejich adultním stádiu života (Gabriel et al., 2007; Guidetti et al., 2012). Zároveň jen několik studií potvrdilo dělení některých buněk (Bertolani, 1970a, b; Gross et al., 2018). Podmínky, trigger faktory buněčného dělení a detaily buněčného cyklu nejsou dosud objasněny. I s ohledem na to, že dosud nebyla vytvořena primární buněčná kultura želvušek, prvním dílčím cílem bylo verifikovat schopnost dělení SC a zjistit, jaké fenotypické znaky jsou asociovány s buněčným dělením (**Paper I**). Dalšími cíly (**Paper II**) bylo analyzovat: (i) schopnost želvušek přežít mnohonásobné desikace/rehydratace-cykly, (ii) potenciální efekt každého desikačního cyklu na morfometrické znaky jedinců a jejich SC, (iii) výskyt buněčného dělení po každém z cyklů desikace/rehydratace. **Paper III** je studií morfologických a ultra-strukturních změn spojených s anhydrobiózou. Studie uvádí 3D-rekonstrukci soudečku (tun formation), ultrastrukturu kutikuly, epidermis a vnitřních orgánů a jejich tkání, a zásobních buněk. Studie je také první, která potvrzuje nezávislost schopnosti tvorby soudečků i během ekdyze želvušek. Cíle **Paper IV** byly (i) porovnat ultrastrukturu zásobních buněk v aktivním a desikovaném stavu želvušek, (ii) zjistit, jaký efekt na SC má teplotní stres. Celkem jsou součástí předkládané práce 3 základní témata, a to: 1) mitóza v zásobních buňkách a eutelie u želvušek (**Paper I a II**), 2) Anhydrobióza u druhu *R. cf. coronifer* (**Paper II, III, IV**), 3) Ultrastruktura zásobních buněk (**Paper III a IV**). Zásobní buňky jsou pojícím elementem všech publikovaných článků.

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1 Modelový organismus: *Richtersius cf. coronifer*

R. cf. coronifer (Richters, 1903; Eutardigrada, Macrobiotidae) je modelovým druhem všech prezentovaných studií. Jedná se o limno-terrestrický herbivorní druh s dokumentovanou

vysokou schopností tolerance dehydratace (Jönsson and Rebecchi, 2002; Jönsson et al., 2005, 2008). Tento druh je jedním z nejvíce studovaných druhů želvušek v oblasti anhydrobiózy (Westh and Ramløv, 1991; Jönsson and Guidetti, 2001; Jönsson et al., 2001, 2005; Ramløv and Westh, 2001; Ivarsson and Jönsson, 2004). Kromě své unikátní vlastnosti tolerance řady stresorů tento druh patří mezi jedny z největších (až 1000 µm).

3.2 Studovaná oblast

Jelikož vybraný modelový druh nelze dosud kultivovat v laboratorním prostředí, všichni jedinci v prezentovaných studiích byli izolováni z jejich přirozeného prostředí v oblasti ostrova Öland (jiho-východní část Švédska). Jedinci tohoto druhu žijí v meších (převážně druhu *Orthotrichum cupulatum* Hoffm. ex Brid.), které rostou na kamenných vápencových zídkách, a jsou vystaveny podmínkám rychlého vysoušení a změnám v humiditě (Jönsson et al., 2001).

3.3 Sběr a analýza dat

Pro pozorování mitózy (**Paper I, II**) byly želvušky fixovány a barveny *in toto* pomocí acetic-lactic orceinu (Tonzetich, 2004). U jedinců s nalezenými mitotickými buňkami byl počítán celkový počet zásobních buněk a poté vypočítán mitotický index (**Paper I, II**). Fenotypické znaky pro predikci mitózy v zásobních buňkách byly analyzovány u hydratovaných jedinců (**Paper I**) a v další studii (**Paper II**) také s ohledem na spojitost s opakovanou desikací. Shromážděná data pro charakteristiku fenotypických znaků obsahovala tato měření: délka buko-faryngeálního aparátu, obsah střev (prázdná, plná), vývojový stupeň vajíček v gonádách, ekdyze, počet, tvar a velikost oocytů (**Paper I and II**).

Soudečky (anhydrobiotický stav; **Paper III, IV**), rehydrované a teplotním stresem ovlivněné želvušky (**Paper IV**) byly analyzovány světelným mikroskopem, skenovacím a transmisním elektronovým mikroskopem (vytvořením semi- a ultratenkých řezů těl želvušek). Obsah polysacharidů, proteinů a lipidů v SC byl stanoven histochemickými barvicími technikami (PAS, Bonhag's metoda, Sudan Black-B barvení a BODIPY 494/503, Litwin, 1985). 3D-rekonstrukce soudeček byla vytvořena ze semi-tenkých řezů (500nm), které byly obarveny, vyfotografovány a zarovnány do správného pořadí a pozice (detaily popsány v **Paper III, Material and method** sekce). **Paper IV** obsahuje deskriptivní a experimentální část. Deskriptivní část je zaměřena na srovnání SC, resp. jejich ultrastruktury, mezi jedinci desikovanými a hydratovanými. Experimentální část je zaměřena na experiment vystavení želvušek dlouhodobé desikaci (6 měsíců) v kombinaci s teplotním šokem (50°C, 24h) s cílem zjistit efekt těchto stresorů na ultrastrukturu SC. **Paper IV** využívá konfokální mikroskopie pro zobrazení proliferujících a mrtvých buněk pomocí barvení s anti-phosphohistone H3-antibody a TUNEL assay.

4 VÝSLEDKY a DISKUZE

4.1 Mitóza zásobních buněk

Frekvence výskytu mitotických SC je větší u juvenilních než adultních jedinců. Navíc celkový počet SC je vyšší u adultních jedinců. Obě prezentované studie (**Paper I, II**), potvrdily

výskyt mitotických SC u 20% ze všech studovaných jedinců. Mitotický index (MI) SC je ovšem nízký (1.27% v **Paper I** a 1.60% v **Paper II**). Počet SC je rozdílný, a to jak při srovnání dospělců a juvenilních jedinců, ale také mezi jednotlivci. Želvušky druhu *R. cf. coronifer* mají v průměru 600 ± 209 SC (dospělci), and 425 ± 23 (juvenilní jedinci; **Paper I**). Celkově se počet SC pohybuje v rozmezí od 300 až 1100 u dospělců, 60 až 800 u juvenilních jedinců (**Paper I, II**). Jelikož je MI nízký, frekvence výskytu mitotických SC je vyšší u juvenilních jedinců, a jelikož mezi dospělci je častější výskyt mitotických SC spojen s ekdyzí jedinců, zdá se, že výskyt mitotických SC koreluje s růstem jedinců.

U juvenilů žádný z fenotypických znaků není prediktivní pro dělení SC, ale u dospělců je výskyt mitózy SC spojený s vývojem oocytů, procesem ekdyze a prázdnými střevy (**Paper I**). Výsledky (**Paper II**) nepotvrdily signifikantní korelaci výskytu mitózy ve SC a obsahem střev. Spojením výsledků z prezentovaných publikací (**Paper I, II, III, IV**) lze shrnout, že fyziologické procesy spojené s ekdyzí jsou nejsilnějším prediktorem pro výskyt mitózy v SC želvušek.

Mitóza SC zřejmě není spouštěna energetickým stresem cyklů desikací, a to z důvodu, že počet buněk (a také mitotických buněk) se signifikantně snižuje s každým následujícím desikačním cyklem (**Paper II**). Hlavní funkce SC je shromáždění zásobního materiálu (Węglarska, 1957; Rosati, 1968; Węglarska, 1975; Szymańska, 1994). Proto zmenšení počtu buněk může indikovat: (A) energetický stres (a případnou re-absorpci buněk), (B) poškození buněk (a případnou buněčnou smrt), nebo (C) fungování obou mechanismů dohromady.

Ačkoli SC se dělí, MI je velmi nízký. Zdá se tak, že většina SC plní specifickou funkci a nedělí se až do doby, než nastane specifický spouštěcí faktor (O'Farrel, 2001). Konkrétní faktory spouštějící mitózu v SC by měly být studovány v budoucnu.

4.2 Experimentálně-indukovaná opakovaná anhydrobióza

Želvušky druhu *R. cf. coronifer* přežijí maximum šesti po sobě jdoucích cyklů desikace/rehydratace, se signifikantně nižším přežitím po opakovaných desikacích (**Paper II**). Pátý cyklus desikace/rehydratace byl kritický s ohledem na signifikantně prudší snížení přežití a počtu SC. Předpokládá se, že SC jsou hlavní zásobou energie (Węglarska, 1975) a u některých druhů byla pozorována re-absorpce SC v závislosti na hladovění a anhydrobiózu (Reuner et al., 2010a). Zdá se tak, že želvušky dosáhly energetického limitu a neměly energetickou zásobu pro výstup z anhydrobiotického a vstup do hydratovaného stavu po pátém cyklu desikace/rehydratace. Ale narozdíl od předchozí studie (Jönsson and Rebecchi, 2002) nebyla pozorována redukce velikosti SC po několika cyklech desikace/dehydratace (**Paper II**). Dále ani obsah střev se nezměnil v důsledku opakovaných cyklů (**Paper II**). V souladu s tímto pozorováním ani další studie nepotvrdily signifikantní snížení počtu SC u hladovějících želvušek *R. cf. coronifer* (Jönsson et al., 2005; Jönsson et al., 2008). Proto se zdá, že želvušky tohoto druhu využívají jiný zdroj energie než jiné druhy želvušek a/nebo zdroje energie využívané při hladovění a anhydrobióze jsou odlišné.

U želvušek druhu *I. g. granulifer* byly jako zdroj energie pozorovány buňky střev (midgut cells; Hyra et al., 2016a). SC tohoto druhu shromažďují zejména polysacharidy (Hyra et al., 2016b), zatímto rezervní materiál SC druhu *R. cf. coronifer* je tvořen zejména lipidy a polysacharidy (**Paper III, IV**), což je podobné složení jako u SC druhů *H. exemplaris* and *M. polonicus* (Hyra et al., 2016a, b). V souvislosti s anhydrobiózou nebylo pozorováno snížení obsahu lipidů v SC (**Paper III, IV**). Namísto toho u druhu *R. cf. coronifer* dochází ke snížení

množství obsahu proteinů v SC v souvislosti s desikací a teplotním stresem (**Paper IV**), což je známkou degradace a/nebo utilizace proteinů během stresových podmínek.

Signifikantně více želvušek nebylo schopných tvořit správný soudeček po pátém desikačním cyklu. Kontrakce začala být nekompletní a jedinci tvořili tzv. polosoudečky („semi-tun“). Podobné pozorování bylo prezentováno ve studii Baumanna (Bauman; 1922). V této studii želvušky podrobené mnohonásobné desikaci neprodukovaly kutikulární sekreci, což vedlo k nesprávné kontrakci těla. Na základě těchto dat se zdá, že snížené přežití po mnohonásobných anhydrobiotických cyklech u želvušek druhu *R. cf. coronifer* není zapříčiněno jen nedostatkem energie, ale spíše akumulací buněčných poškození. Tato hypotéza má podporu v současné studii (Kuzmic et al., 2018), které potvrdila hromadění karbonylace během anhydrobiotického stavu. **Paper III** a **IV** potvrdily přítomnost autophagosomů a autofagie je tak pravděpodobně také významným mechanismem pro anhydrobiózu želvušek. Přesný mechanismus ovšem není znám.

4.2.1 Tvorba soudečku

3D rekonstrukce soudečku byla zaměřená na analýzu přeuspořádání vnitřních orgánů v rámci procesu tvorby soudečků (**Paper III**). Relokace vnitřních orgánů je závislá na rigidním bukálním aparátu, velikosti vaječníků limitované rigidní schránkou oocytů (**Paper III**). SC těsně obklopují vnitřní orgány a vyplňují tak téměř celý prostor mezi orgány (**Paper III, IV**).

Ačkoli byly v důsledku desikace všechny buňky zmenšené, studiem ultrastruktury nebyly pozorovány patrné poškození buněk a tkání (**Paper III**). U desikovaných jedinců byly pozorovány změny v pigmentaci (množství pigmentových granul) v epidermálních buňkách. Pigmentová granula mohou tak plnit funkce při toleranci desikace a mohou být v rámci procesu vstupu a/nebo výstupu do/z ametabolického stavu buď utilizována nebo denaturována (**Paper III**). Epidermální buňky obsahují taky lipidové vakuoly, dříve pozorovány u jiných druhů želvušek v souvislosti s uvolněním lipidů do vnějších kutikulárních vrstev a tvorbou bariéry pro výměnu vody (Baccetti and Rosati, 1971; Walz, 1982; Dewel et al., 1993). Kutikulární lipidy tak mohou být důležité pro odolnost želvušek vůči desikaci (**Paper III**).

4.2.2 Efekt dlouhotrvající desikace v kombinaci s teplotním stresem

Druhy *R. cf. coronifer* přežijí 6 měsíců v desikovaném stavu (**Paper III**). Desikace vede ke zmenšení buněk a změně jejich tvaru. Orgány jako RER a GA nejsou patrné v důsledku desikace a zvýšené elektrondenzitě cyto- a nukleoplasmu (**Paper III, IV**). Celá cytoplasma SC je vyplněna membránou obalenými váčky rezervního materiálu (**Paper IV**). Na základě studia ultrastruktury SC (**Paper III, IV**) nebylo pozorováno poškození ultrastruktury buněk.

V rámci studia ultrastruktury, metabolicky aktivní buňky, například epiteliální buňky nebo SC, nevykazují v jejich desikovaném stavu známky této aktivity. Membránou obalené váčky vznikající endocytózou v enterocytech nebyly u želvušek v desikovaném stavu pozorovány (**Paper III**). Tyto výsledky jsou v souladu s hypotézou existence sníženého (případně žádného) metabolismu v anhydrobiotickém stavu (e.g. Pigoń and Węglarska, 1955; Wright, 2001).

Desikované želvušky bez teplotního stresu jsou již po 3 hodinách zavodnění plně aktivní, zatímco teplotní stres způsobuje snížené přežití (40% přežití, **Paper IV**). Vzniklá poškození jsou spíše na molekulární úrovni složek esenciálních pro přežití buněk, jelikož čas pro obnovení

životních funkcí je delší u jedinců vystavených teplotnímu šoku. Odpovídá tomu i zvýšení heterochromatinu a změny v obsahu rezervního materiálu v SC v souvislosti s teplotním stresem. Teplotní stres tedy pravděpodobně způsobuje poškození složek opravného mechanismu a/nebo způsobuje tak závažná poškození, která již nelze opravit. Obecně jsou tyto výsledky v souladu s vitrifikační teorií. Teplotní stres a desikace ovšem působí změnu v obsahu rezervního materiálu v SC. Váčky s rezervním materiálem u jedinců bez teplotního stresu byly homogenní, zatímco u jedinců, vystavených teplotnímu stresu, byly váčky vyplněné granuly s nižší elektrondenzitou.

Rezervním materiálem v SC všech studovaných jedinců je zejména velké množství lipidů (**Paper III, IV**). Lipidy jsou klíčovou komponentou pro management teplotního stresu eukaryotických, zejména savčích, buněk (Balogh et al., 2013). U želvušek druhu *R. cf. coronifer* nebyly lipidy zužitkovány v procesu anhydrobiotických cyklů, a mohou tak tvořit hlavní energetickou rezervu např. u hladovějících jedinců. Lipidy mohou být také základem pro metabolické procesy, související s přípravou na anhydrobiózu a syntézou protektantů (**Paper III, IV**, Kinchin, 1993). Jelikož jsou lipidy součástí i desikovaných SC, mohou se podílet na prostorové konformaci buněk, které nemají žádný obsah vody v cytoplasmě (Womersley et al., 1982; Kinchin, 1993). Epidermální buňky želvušek druhu *R. cf. coronifer* rovněž obsahují velké množství lipidů (**Paper III**). Podobně tomu je i u jiných druhů, *M. tardigradum* and *M. hufelandi*, ve stavu jejich desikace (Dewel et al., 1993; Walz, 1982). Želvušky druhu *R. cf. coronifer* nemají voskovou vrstvu kutikuly, a tak velké zásoby lipidů mohou zásobovat kutikulu a pomáhat redukovat vypařování vody, jako tomu je u hlístic (Womersley et al., 1982).

4.3 Storage cells

SC desikovaných želvušek mají améboidní tvar (**Paper I, II, III, IV**). Velikost SC dospělců je 6 až 20 μm , zatímco jejich průměrná velikost v aktivním stavu je 13.7 μm (± 2.3 , $n=295$) a 10.53 μm (± 2.4 , $n=32$) u juvenilních jedinců (**Paper I, III**). Na rozdíl od dřívějších studií (Szymańska, 1994; Poprawa, 2006; Hyra et al., 2016b), SC druhu *R. cf. coronifer* neprodukují vitelogeniny (**Paper IV**).

U želvušek druhu *R. cf. coronifer* byly pozorovány 2 typy buněk s odlišnou ultrastrukturou (**Paper IV**). SC typ I je podobný SC u ostatních druhů skupiny Parachela, ale s jiným složením rezervního materiálu (**Paper IV**). Ultrastruktura tohoto typu se mění v závislosti na oogenezi jedinců. Obsahují jádérko s jadérkovou vakuolou o nízké elektrondenzitě, mnoho mitochondrií, cisteren RER a specifických váček rezervního materiálu. Přítomnost velkého množství mitochondrií indikuje vysokou metabolickou aktivitu těchto SC.

SC – typ II jsou nalezeny v menším množství a pouze u samic. Jejich ultrastruktura je podobná během všech oogenetických stádií. Mají méně organel a žádné jadérkové vakuoly. Mohou tak reprezentovat mladé nediferencované buňky, nebo dokonce kmenové buňky.

4.3.1 Storage cell – ultrastructura v závislosti na přežití stresových podmínek: desikace a teplotní stres

Jen několik málo odlišností bylo pozorováno v ultrastruktuře SC mezi hydratovanými a desikovanými jedinci. Přesto jsou tato pozorování v souladu s vitrifikační hypotézou, a to jak v rámci SC tak i jiných buněk. Nicméně srovnání ultrastruktury buněk živých a mrtvých jedinců

(v důsledku desikace a teplotního stresu) neodhalilo narušení ultrastrukturu buněk. Proto možná poškození vznikla na základě biochemických změn a struktury jsou chráněny před deformacemi.

5. ZÁVĚRY

1. SC mají zachovanou schopnost dělení v průběhu životního cyklu želvušek. Přítomnost mitózy koreluje s růstem jedinců. Vyšší frekvence výskytu mitotických SC je u juvenilních jedinců (38%) ve srovnání s dospělci (18%). Výskyt mitózy mezi adultními jedinci je častější u jedinců ve stavu ekdyze.
2. Mitotický index zásobních buněk je nízký (a vyšší u adultních jedinců ve srovnání s juvenilními jedinci). Přesto existuje variabilita v počtu buněk mezi jednotlivci, ale také mezi juvenilními stádii a dospělci. Želvušky by tak neměly být klasifikovány jako eutelické organismy.
3. Želvušky druhu *R. cf. coronifer* přežijí maximálně šest po sobě následujících cyklů - desikace/rehydratace. Počet jedinců, kteří přežijí, je signifikantně nižší s každým následujícím cyklem desikace. Také množství buněk, tím pádem také počet mitotických buněk, a schopnost tvořit soudeček se signifikantně snižuje s dalším desikačním cyklem.
4. Desikace jedinců vede ke zmenšení buněk a změně v jejich tvaru, ale nevede ke znatelným ultrastrukturním změnám organel a membrán. V důsledku dehydratace bylo pozorováno několik změn v ultrastruktuře buněk: (i) snížení množství pigmentových a lipidových granul v epidermálních buňkách, (ii) zvýšení heterochromatinu v SC, (iii) změna množství a obsahu zásobního materiálu v SC, (iv) částečná ztráta jádérka.
5. Kombinace stresorů: desikace a teplotní stress, signifikantně ovlivňuje přežití jedinců (nižší počet přežití). Přesto nebyly pozorovány ultrastrukturní poškození na buněčné úrovni, které by indikovaly poškození buněčných organel. Důvod sníženého přežití proto může být ovlivněn spíše změnami na molekulární úrovni. Jako reakce na desikaci a tepelný stress bylo pozorováno: (i) zvýšení heterochromatinu, (ii) částečná ztráta jádérka, a (iii) změny ve složení a množství zásobních granul v zásobních buňkách.
6. Obsah zásobního materiálu v SC je druhově-specifický. Hlavním rezervním materiálem SC druhu *R. cf. coronifer* jsou lipidy a polysacharidy.
7. Na základě odlišné ultrastruktury byly indetifikovány dva typy SC: SC-typ I je tvořen buňkami metabolicky aktivními, plnící specifickou funkci/specifické funkce. SC-typ II je reprezentován mladými nediferencovanými buňkami.

ANGLICKÝ ODDÍL/ENGLISH SECTION

1. INTRODUCTION

Tardigrades (Tardigrada), commonly called water bears, are multicellular hydrophilous micrometazoans (0.1 – 1.2 mm) belonging to Ecdysozoa (Jørgensen et al., 2018; Møbjerg et al., 2019). They are often described as a lesser-studied group as they have no impact on the human economy (Nelson, 2002). On the other hand, they are well-known for their ability to withstand a variety of extreme stress conditions (see below) by entering an ametabolic state called cryptobiosis (Wright et al., 1992; Wehnicz et al., 2011).

Tardigrades survive almost complete desiccation (Westh and Ramløv, 1991). They can remain in a desiccated cryptobiotic state for as much as 20 years (Jørgensen et al., 2007) and be retrieved from a moss sample frozen for over 30 years (Tsujimoto et al., 2016). Furthermore, anhydrobiotic (desiccated) tardigrades have been reported to survive and tolerate multiple extreme environmental conditions, such as very low sub-zero temperature exposure (Hengherr et al., 2009, 2010), at -80°C for up to three decades without loss of viability (Tsujimoto et al., 2016) and even the temperatures close to absolute zero (Ramløv and Westh, 1992; Guidetti et al., 2012); also temperatures as high as 70°C for 1h (Ramløv and Westh, 2001), high external osmotic pressure (Heidemann et al., 2016), the treatments with chemicals such as alcohols of varying polarity (Ramløv and Westh, 2001) and biocide methyl bromide gas (Jönsson and Guidetti, 2001); low and high hydrostatic pressure (up to 600-1200 MPa) (Ono et al., 2008; Horikawa et al., 2009), several thousand grey (Gy) of gamma irradiation (Jönsson et al., 2005; Horikawa et al., 2006), heavy ion irradiation in form of ⁴He (Horikawa et al., 2006), protons (Nilsson et al., 2010), alpha particles ⁴H (Horikawa et al., 2012), iron ions and helium ions (Jönsson and Wojcik, 2017), high doses of UV radiation, including UV_A (Jönsson et al., 2008), UV_B (Altiero et al., 2011), and UV_C (Horikawa et al., 2013), and exposure to space in low Earth orbit (Jönsson et al., 2008; Persson et al., 2011). Given this, they are amongst the most radiation resistant multi-cellular organisms (Nilsson et al., 2013; Jönsson, 2019).

Tardigrade research thus has valuable potential for its application to human fields, development of new technologies in radioprotection and cryopreservation of biological materials. Very few studies (Hashimoto and Kunieda, 2017; Jönsson, 2019) used tardigrades as model organisms in studies of the effects of various stressors on live organisms, especially in the biomedical sciences (Guidetti et al., 2012). Only recently transfection of tardigrade unique proteins, such as RvLEAM (mitochondrial heat-soluble) and MAHS, applied on human cells (Hep-2) increased their tolerance to hyperosmotic stress (Tanaka et al., 2015). Another tardigrade unique protein, Dsup associated with DNA and protecting DNA from hydroxy radicals was reported (Hashimoto et al., 2016; Chavez et al., 2019) and transfected. The human embryonic kidney cells (HEK293) transfected with Dsup had up to 40% reduced DNA damage from X-ray and improved viability compared to nontransfected cells.

Although several hypotheses explaining tardigrade tolerance to environmental stress have been formulated, they have not been united in a comprehensive theory yet mainly because the underlying molecular and physiological mechanisms are largely unknown. In total, there are ~1300 tardigrade species (Degma, 2019). Some of the tardigrade species live in oceans, but they mainly occur in freshwater, terrestrial or semi-terrestrial environments. They inhabit mostly mosses and lichens, where they constitute a major component of the microfauna (Halberg et al., 2009b).

Tardigrade bodies have five segments, head and four trunk segments, each with a pair of lobopod legs, usually terminating with claws and/or sucking discs of varying number and shape (Møbjerg et al., 2019). They are relatively complex invertebrates with well-developed musculature and nervous system, as well as a complex alimentary canal and specialized excretory and reproductive system (Nelson et al., 2005; Halberg and Møbjerg, 2012). They lack respiratory and circulatory organs and the gas exchange functions via diffusion across epidermis and the thick cuticle (Nelson et al., 2015). The circulation is carried out via a large body cavity filled with coelomic fluid containing storage cells (SC; Ramazzotti and Maucci, 1983; Jönsson, 2019).

In general, the cell biology of tardigrades is neglected field, even though a few ultrastructural studies have been conducted (Walz, 1973; Węglarska, 1975; Dewel et al., 1993; Avdonina et al., 2007; Persson et al., 2012; Hyra et al., 2016b).

2. HYPOTHESIS AND AIMS OF THE STUDY

The body cavity of tardigrades is filled with body cavity lymph with free SC, which are coelomocyte-type cells, also called the body cavity cells or coelomocytes (Dewel et al., 1993; Reuner, 2010a). In active animals, the cells move passively in the lymph and fill the empty spaces between organs such as gonad, gut and nerve chord, although they appear to temporarily adhere to the basement membrane of other tissues (Węglarska, 1975; Dewel et al., 1993). Tardigrade SC are responsible for important physiological functions (such as synthesis, accumulation and transport of nutrients) and are highly metabolically active (Szymańska, 1994; Poprawa, 2006; Hyra et al., 2016a, b). Although their shape and content might vary, whether they might or might not be classified into specific groups is not resolved yet. Some studies described their role in processes connected to cryptobiosis (Węglarska, 1975; Jönsson and Rebecchi, 2002; Reuner et al., 2010).

The knowledge about SC is gathered from studies performed on individual specimens and therefore there is still a lack of knowledge to characterize and potentially classify these cells. The objective of my thesis was to collect more information to address the specific function of SC in connection to stress tolerance of tardigrades.

Tardigrades have sometimes been characterised as organisms with constant cell numbers in their adult lives (Gabriel et al., 2007; Guidetti et al., 2012), even though, occasionally, some cell divisions were observed (Bertolani, 1970a, b; Gross et al., 2018). Conditions and possible trigger factors for mitosis occurrence are however not known. Also, up to this day, no primary cell culture of tardigrade cells was developed. Therefore, the first aim was to analyse the occurrence of mitosis in SC and phenotypic factors, which are associated with mitosis occurrence (**Paper I**). **Paper II** aims to analyse (1) survival patterns under repeated cycles of desiccations/rehydration, which has rarely been studied, (2) the potential effect of each desiccation cycle on morphometric traits, and (3) SC divisions after each desiccation/rehydration cycle. **In paper III** morphological and ultrastructural changes connected with desiccation were studied by analysing the gross morphology and tissue organisation in so-called tun formation. The ultrastructure of the body wall, ovary, midgut and SC was analysed in desiccated tardigrades. This study includes the first analysis of cuticle organisation in moulting and non-moulting tardigrades in the desiccated state, with the presentation of a 3D reconstruction of the tun state. **In paper IV**, the aim was to (1) compare the ultrastructure of SC in active and desiccated specimens, and (2) evaluate the effect of temperature stress on tardigrade cells.

In total, the three main topics are part of those manuscripts: (1) mitosis in SC and eutely in tardigrades (**Paper I and II**), (2) Anhydrobiosis in tardigrades *R. cf. coronifer* (**Paper II, III, IV**), (3) Ultrastructure of SC (**Paper III, IV**). The storage cells are the main element connecting all the studies.

3. MATERIAL AND METHODS

3.1 Model species: *Richtersius cf. coronifer*

The model species of all studies *R. cf. coronifer* (Richters, 1903; Eutardigrada, Macrobiotidae) is a limno-terrestrial herbivorous tardigrade, with documented high ability to tolerate extensive desiccation (Jönsson and Rebecchi, 2002; Jönsson et al., 2005, 2008). It is one of the most extensively studied tardigrades with respect to anhydrobiosis (Westh and Ramløv, 1991; Jönsson and Guidetti, 2001; Jönsson et al., 2001, 2005; Ramløv and Westh, 2001; Ivarsson and Jönsson, 2004). Besides the intriguing stress tolerance, tardigrades of this species belong to the largest tardigrade species (measuring sometimes up to 1000 µm).

3.2 Study population

Since no culturing method has been developed for *R. cf. coronifer*, specimens used in all presented studies were collected and extracted from a natural moss-living population on Alvar habitat of the Baltic Sea island Öland (South-Eastern Sweden). The specimens live in mosses (mainly *Orthotrichum cupulatum* Hoff. ex Brid.) growing on limestone rock fences, directly exposed to winds and insolation, which leads to rapid temperature and humidity changes (Jönsson et al., 2001).

3.3 Data analyses

For observation of mitosis (**Paper I, II**), the species were fixed and stained *in toto* with acetic-lactic orcein (Tonzetich, 2004). In animals containing mitotic storage cells, the total number of SC was counted and the mitotic index was calculated (**Paper I and II**). Furthermore, the predictive phenotypic traits of mitosis in storage cells were analysed in relation to hydrated specimens (**Paper I**) as well as in connection to repeated anhydrobiotic cycles (**Paper II**). The collected data contained measurements of total body length, buccal tube length, gut content, egg developmental stage, occurrence of moulting, and number, shape and size of oocytes (**Paper I, II**).

Tuns (anhydrobiotic state; **Paper III and IV**) as well as rehydrated and heat stress treated specimens (**Paper IV**) were analysed using the light microscopy, scanning and transmission electron microscopy (based on semi- and ultra-thin sections of animal bodies). Polysaccharide, protein and lipid reserves in storage cells were detected using histochemical staining techniques (PAS and Bonhag's method, Sudan black B staining and BODIPY 494/503; Litwin, 1985). Three-dimensional reconstruction of tuns was based on series of semi-thin sections (500 nm thick) that were stained, photographed and aligned in correct order and position (in detail described in **Paper III**). **Paper IV** consists of a descriptive and an experimental part. The descriptive part is focused on comparison of storage cells in desiccated and hydrated specimens. The experimental part focused on effects of combination of long-term desiccation and

heating (50°C, 24h) on storage cells and specimen survival. In **paper IV**, confocal microscopy was used to visualize proliferating and dying cells using an anti-phosphohistone H3 antibody, and a TUNEL assay, respectively.

4. RESULTS and DISCUSSION

4.1 Mitosis in storage cells

The juveniles had a higher frequency of mitosis in SC compared to adults. Moreover, the numerical growth of SC from juvenile to adult stage was documented. In both studies (**Paper I, II**), only about 20% of studied animals had mitotic storage cells. SC have a low mitotic index, 1.27% in **Paper I** and 1.60% in **Paper II**, respectively. The number of SC varied among the individuals but also between the adults and juveniles. *R. cf. coronifer* specimens had on average 600±209 storage cells in adults, and 425±23 in juveniles (**Paper I**), but the total number of storage cells can vary from 300 to 1100 in adults and from 60 to 800 in juveniles (**Paper I and II**). Since the mitotic index is low, mitotic SC were more frequent in juveniles than in adults, and it is connected to moulting that usually corresponds to the late egg development stage, in adults, SC division seems to be closely related to animal growth

In juveniles, none of the phenotypic characters were significant predictors triggering the occurrence of mitosis, whereas, in adults, mitosis was significantly associated with the late egg developmental stage that is connected to moulting process and empty gut content (**Paper I**). The results presented in **Paper II** did not confirm any significant correlation between mitosis in SC and gut content as well. By compiling data from **Paper I, II, III, IV** together it is possible to conclude, that physiological processes related to moulting might represent the strongest predictor for the occurrence of mitosis in storage cells.

Mitosis in SC does not seem to be triggered by energetic stress of desiccation cycles, since the occurrence of mitotic storage cells, as well as the storage cells number, tended to decline with several repeated desiccation cycles (**Paper II**). Because the SC are the major repository of energy resources (Węglarska, 1957; Rosati, 1968; Węglarska, 1975; Szymańska, 1994), the loss of cells might indicate (A) energetic stress (and reabsorption of the cells), (B) cellular damage (and possible cell death), or (C) both mechanisms.

Although the SC divide, the animals with observed mitotic cells have a very low mitotic index. Thus, most of the storage cells seem to carry out their specialized function and do not divide. The observed low mitotic index implies that the cell division is suppressed until specific mitotic trigger factors occur (O'Farrel, 2001). Such trigger factors for tardigrade storage cells remain to be studied.

4.2 Experimentally-induced repeated anhydrobiosis

Tardigrades of *R. cf. coronifer* can survive the maximum of 6 repeated desiccation cycles (non-cultured conditions) with the clear significant decline of survival rate after repeated desiccations (**Paper II**). The fifth desiccation cycle seemed to be critical because there was a steeper survival decline. The animals had significantly lower number of storage cells after the fifth desiccation, as well. Since it is assumed that SC serve as an energy store (Węglarska,

1975) and the re-absorption of storage cells with starvation and anhydrobiosis in some tardigrade species has been reported (Reuner et al., 2010a), it seemed that animals reached an energetic constraint and did not have energy available to exit the fifth and enter the next cycle. On the other hand, in contrast to a previous study (Jönsson and Rebecchi, 2002), no reduction in SC size after several desiccation cycles, and no depletion of gut content by repeated desiccation was observed (**Paper II**). In addition, the starvation of *R. cf. coronifer* specimens in continuously hydrated conditions did not result in a significant decline in the number of SC (Jönsson et al., 2005; Jönsson et al., 2008). Therefore, it seems that *R. cf. coronifer* have an energy budget different from other tardigrade species and/or the energy budget used for starvation stress and anhydrobiosis can also differ.

In tardigrades of species *I. g. granulifer*, midgut digestive cells have been lately shown to serve as another energy budget in tardigrades (Hyra et al., 2016a). SC of this species contain mainly polysaccharides (Hyra et al., 2016b), whilst the reserve material in SC of *R. cf. coronifer* is composed mainly of lipids and polysaccharides (**Paper III, IV**), similarly to the SC of *H. exemplaris* and *M. polonicus* (Hyra et al., 2016a, b). No decrements of lipid or polysaccharide content in SC were observed in connection to anhydrobiosis (**Paper III, IV**). Instead, the protein spheres were diminished in desiccated tardigrades (**Paper IV**) which indicates protein degradation and/or utilisation during stress conditions.

After the fifth desiccation cycle, significantly more tardigrades were not able to contract properly during tun formation. Thus, contraction started to be uncontrolled and incomplete („semi-tuns“). This result is compatible with the observation of Bauman (1922). In that study, tardigrades undergoing repeated desiccation were unable to produce a cuticular secretion, which resulted in uncontrolled contraction of the body. Based on collected data, it seems that the declining survival after multiple anhydrobiotic cycles in *R. cf. coronifer* is not only caused by depletion of energy in storage cells but rather it is caused by the accumulation of cellular damage. This explanation is also supported by the current study of carbonylation accumulation during the anhydrobiotic state (Kuzmic et al., 2018). Autophagy also seems to be an important mechanism in tardigrade anhydrobiosis and survival, but its precise role during anhydrobiosis remain to be studied.

4.2.1 Tun formation in *R. cf. coronifer*

Tun formation was analysed by 3D reconstruction of the tun with a focus on the inner organ packing (**Paper III**). The inner organ relocation is dependent on the rigid buccal tube and the ovary size is limited by rigid eggshells (**Paper III**). The SC enclose all the inner organs and fill up almost all the inner space between organs (**Paper III and IV**).

Based on the results presented in **Paper III**, although the cells were shrunk as a result of desiccation, morphological damage on the ultrastructural level of cells and tissues was not found. But changes of pigmentation in epidermal cells in desiccated animals were observed. The pigment granules may play a role in desiccation tolerance because they can either be utilized or denatured during entry or exit from anhydrobiosis (**Paper III**). Epidermal cells also contain lipid vacuoles, which were previously observed in other tardigrade species to discharge their content to the cuticular layers, which provide a barrier to water exchange (Baccetti and Rosati, 1971; Walz, 1982; Dewel et al., 1993). Therefore, it is possible, that cuticular lipids play an important role in anhydrobiosis (**Paper III**).

4.2.2 The effect of long-term desiccation in combination with temperature stress

R. cf. coronifer specimens can survive 6 months in desiccated state (**Paper III**). In tardigrades, desiccation leads to overall cellular shrinkage and change in cellular shape. Due to high electron density of cyto- and nucleoplasm in desiccated cells, organelles such as RER and Golgi complexes are barely visible. The average desiccated storage cells size is 11.8µm (**Paper III** and **IV**) and their whole inner space is filled with membrane-coated spheres of different electron density (**Paper IV**). Based on the ultrastructural analyses from **Paper III** and **IV**, no cellular damage on ultrastructural level was observed.

The ultrastructure of normally highly metabolically active cells such as epithelial cells of ovary wall or storage cells does not indicate any secretory activity under desiccated conditions. Coated vesicles resulting from endocytosis in enterocytes were also not observed in a desiccated state (**Paper III**). These observations support the hypothesis of at least low (maybe arrested) metabolic activity in anhydrobiotic state and are in line with other studies (e.g. Pigoń and Węglarska, 1955; Wright, 2001).

While non-heated desiccated tardigrades were fully active after 3 hours of rehydration, the heat stress of tuns caused a decrease in survival rate (40% survival). Since the required recovery time was longer in heated specimens, the damages may be rather at the level of molecular components necessary for cell survival. Moreover, some differences such as heterochromatin increase and change in reserve material were observed. Therefore, heat likely caused damage to molecular components of repair mechanisms and/or caused such damage that was not possible to repair. In general, our observations of the ultrastructure of storage cells support the vitrification hypothesis. Heat stress, however, caused ultrastructural changes in the density of reserve spheres in desiccated storage cells. Spheres in non-heated specimens were homogenous, whereas cellular spheres in heated specimens were filled with granules of lower electron density indicating a change in the distribution of the stored material.

The large amounts of lipids were present in all storage cells (**Paper III, IV**). Lipids have been proposed to play a key role in heat stress management of the eukaryotic, especially mammalian, cells (Balogh et al., 2013). Since lipids are not utilized during the desiccation/rehydration cycles in *R. cf. coronifer*, they may represent immediate energy for starved animals. Alternatively, lipids may be used for metabolic processes connected to preparation for anhydrobiosis and synthesis of protective molecules such as glycerol (**Paper III** and **IV**, Kinchin, 1993). Since lipids are present in dehydrated SC, they may also maintain the spatial distribution of cells in the absence of bulk water (Womersley et al., 1982; Kinchin, 1993). Large amounts of lipid droplets were also found in epidermal cells of *R. cf. coronifer* (**Paper III**). This is in line with observations of epidermal cells in other anhydrobiotic tardigrade species, *M. tardigradum* and *M. hufelandi* (Dewel et al., 1993; Walz, 1982). Because specimens of *R. cf. coronifer* do not have a cuticular wax layer, large lipid reserves might serve as lipid supply to the cuticle and thus helping to reduce evaporative water loss as shown in nematodes (Womersley et al., 1982).

4.3 The storage cells of *R. cf. coronifer*

In desiccated animals, the SC have an amoeboid shape (**Paper I, II, III, IV**). The size of SC in adult animals varies from 6 up to 20 μm . The average size of adult SC in the active state is 13.7 μm (± 2.3 , $n=295$), and 10.53 μm (± 2.4 , $n=32$) in juveniles (**Paper I, III**). In contrast to studies on other species (Szymańska, 1994; Poprawa, 2006; Hyra et al., 2016b), the observations presented in **Paper IV** did not confirm the production of vitellogenins in storage cells of *R. cf. coronifer*.

Two types of SC fill the body cavity fluid in *R. cf. coronifer* (**Paper IV**). The fine structure of the first cell type is similar to other Parachela species (**Paper IV**), but *R. cf. coronifer* SC differ in the stored reserve material. Ultrastructure of type I cells change during oogenesis. They contain nucleolus with nucleolar vacuoles (also called a nucleolar cavity) with low electron density. The presence of irregular vacuoles varies with respect to the oogenetic stage. Nucleolar vacuoles were observed during previtellogenesis, but not during and after vitellogenesis. Type I cells are also characterized by the presence of many mitochondria, cisterns of RER and specific spheres of reserve material. Large amounts of mitochondria present in these cells indicate high metabolic activity.

The SC of type II were found in a smaller amount and only in females. Their ultrastructure is similar during all oogenetic stages. These cells have fewer organelles and no nucleolar vacuoles. They may represent young undifferentiated cells or even stem cells.

4.3.1 Storage cell ultrastructure with regard to survival of stress conditions: desiccation and heat stress

Although we detected few differences in cell structures between hydrated and desiccated animals, our observations are in line with the prediction of vitrification hypothesis not only for storage cells but also for epidermal cells, ovary and midgut cells. However, a comparison of dead and dried animals revealed intact organelles and membranes in both groups. This finding supports the idea that desiccation injury is caused by changes proceeding at the biochemical level, while structures are protected from deformations.

5. CONCLUSIONS

1. Mitotic division of tardigrade storage cells correlates with the growth phase of the animal. Mitotic storage cells occurred with higher frequency in examined juveniles (38%) than in adults (18%). The mitotic index was higher in adults. Mitosis is more frequent in moulting tardigrades.
2. Even though the mitotic index is low, the number of storage cells in single animal varies among individuals and within individuals over time. Tardigrades thus cannot be classified as eutelic at least for storage cells.

3. Tardigrades of *R. cf. coronifer* can survive the maximum of 6 repeated desiccation cycles (non-cultured conditions). Their survival rate, mitosis in storage cells, and ability to form “tun” declined with repeated desiccations.
4. Desiccation stress leads to cellular shrinkage and changes the cellular shape but causes no ultrastructural change of organelles and membranes in cells in *R. cf. coronifer*. After desiccation, the epidermal cells reduced their pigmentation granules and the lipid vacuole content was also diminished.
5. Although the combining effect of desiccation and heat stress affected tardigrade survival, it did not cause cellular damage at the ultrastructural level. The cause of reduced survival may instead depend on damage at molecular level - heterochromatin amounts increased, the nucleolus was partially lost, and the amount and content of reserve material changed after desiccation and heat stress.
6. The content of stored material in storage cells is species-dependent, and *R. cf. coronifer* storage cells differ from those of other tardigrade species. The main reserve materials are lipids and polysaccharides.
7. We identified two storage cells types based on their ultrastructure. The first cellular type includes metabolically active cells, exhibiting their specific function. The second cellular type is represented by young undifferentiated cells.

6. POUŽITÁ LITERATURA/REFERENCES

Altiero T., Guidetti R., Caselli V., Cesari M., Rebecchi L., 2011. Ultraviolet radiation tolerance in hydrated and desiccated eutardigrades. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 49 (1): 104—110.

Avdonina A.M., Biserova N.M., Bertolani R., Rebecchi L., 2007. Ultrastructure of the digestive system of *Ramazzottius tribulosus* and *Macrobiotus richtersi* (Eutardigrada) in relationship with diet. *Journal of Limnology* 66(1): 5—11.

Baccetti B., Rosatti F., 1971. Electron microscopy on tardigrades. 3. Integument. *Journal of Ultrastructure Research* 34: 214—243.

Balogh G., Péter M., Glatz A., Gombos I., Török Z., Horváth I., Harwood J.L., Vigh L., 2013. Key role of lipids in heat stress management. *FEBS Letters* 587 (13): 1970—1980.

Baumann H., 1922. Die anabiose der tardigraden. *Zoologische Jahrbücher*. 45: 501—556.

Bertolani R., 1970a. Mitosi somatiche e costanza cellular numerica nei Tardigradi. *Atti Della Accademia Nazionale dei Lincei Rendiconti Ser 8a* 48: 739—742.

Bertolani R., 1970b. Variabilita numerica cellular in alcuni tessuti di Tardigradi. *Atti Della Accademia Nazionale dei Lincei Rendiconti* 49: 442—445.

Degma P., Bertolani R., Guidetti R., 2019. Actual checklist of Tardigrada species. <https://iris.unimore.it/retrieve/handle/11380/1178608/226739/Actual%20checklist%20of%20Tardigrada%2035th%20Edition.pdf> [Accessed January 12, 2020].

Dewel R.A., Nelson D.R., Dewel C., 1993. Chapter 5. Tardigrada. *Microscopic anatomy of invertebrates 12: Onychophora, Chilopoda and lesser Protostomata*, 143—183.

Gabriel W.N., McNuff R., Patel S.K., Gregory R., Jeck W.R., Jones C.D., Goldstein B. 2007. The tardigrade *Hypsibius dujardini*, a new model for studying evolution of development. *Developmental Biology* 312: 545—559.

Gross V., Bährle R., Mayer G., 2018. Detection of cell proliferation in adults of the water bear *Hypsibius dujardini* (Tardigrada) via incorporation of a thymidine analog. *Tissue and Cell* 51: 77—83.

Guidetti R., Rizzo A.M., Altiero T., Rebecchi L., 2012. What can we learn from the toughest animals of the Earth? Water bears (tardigrades) as multicellular model organisms in order to perform scientific preparations for lunar exploration. *Planetary and space science* 74: 97—102.

Halberg K.A., Møbjerg N., 2012. First evidence of epithelial transport in tardigrades: a comparative investigation of organic anion transport. *The Journal of Experimental Biology* 215: 497—507.

Halberg K.A., Persson D., Møbjerg N., Wanninger A., Kristensen R.M., 2009. Myoanatomy of the marine tardigrade *Halobiotus crispae* (Eutardigrada: Hypsibiidae). *Journal of Morphology* 270: 996—1013.

Hashimoto T., Horikawa D.D., Saito Y., Kuwahara H., Kozuka-Hata H., Shin I.T. et al., 2016. Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein. *Nature Communication* 7:12808.

Heidemann N.W., Smith D.K., Hygum T., Stapane L., Clausen L.K., Jørgensen A., Nielsen C.H., Møbjerg N., 2016. Osmotic stress tolerance in semi-terrestrial tardigrades. *Zoological Journal of the Linnean Society* 178: 912—918.

Hengherr S., Reuner A., Brümmer F., Schill R.O., 2010. Ice crystallisation and freeze tolerance in embryonic stages of the tardigrade *Milnesium tardigradum*. *Comparative biochemistry and Physiology* 156(1): 151—155.

Hengherr S., Worland M.R., Reuner F., Schill R.O., 2009a. High-temperature tolerance in anhydrobiotic tardigrades is limited by glass transition. *Physiological and Biochemical Zoology* 82(6): 749—755.

Horikawa D.D., Cumbers J., Sakakibara I., Rogoff D., Leuko S., Harnoto R., Arakawa K., Katayama T., Kuneida T., Toyoda A., Fujiyama A., Rotschild L.J., 2013. Analysis of DNA repair and protection in the Tardigrade *Ramazzottius varieornatus* and *Hypsibius dujardini* after exposure to UVC radiation. *Plos ONE* 8 (6): 1—11.

Horikawa D.D., Iwata K., Kawai K., Koseki S., Okuda T., Yamamoto K., 2009. High hydrostatic pressure tolerance of four different anhydrobiotic animal species. *Zoological Science* 26: 238—242.

Horikawa D.D., Sakashita T., Katagiri C., Watanabe M., Kikawada T., Nakahara Y. Et al. 2006. Radiation tolerance in the tardigrade *Milnesium tardigradum*. *International Journal of Radiation Biology* 82: 843—848.

Hyra M., Poprawa I., Włodarczyk A., Student S., Sonakowska L., Kszuk-Jendrysyk M., et al., 2016a. Ultrastructural changes in midgut epithelium of *Hypsibius dujardini* (Doyère, 1840) (Tardigrada, Eutardigrada, Hypsibiidae) in relation to oogenesis. *Zoological Journal of Linnean Society* 178 (4): 897—906.

Hyra M., Rost-Roszkowska M.M., Student S., Włodarczyk A., Deperas M., Janelt K., Poprawa I., 2016b. Body cavity cells od Parachela during their active life. *Zoological Journal of Linnean Society* 178(4): 878—887.

Chavez C., Cruz-Becerra G., Fei J., Kassavetis G.A., Kadonaga J.T., 2019. The tardigrade damage suppressor protein binds to nucleosome and protects DNA from hydroxyl radicals. *eLife* 8: e47682 DOI: 10.7554/eLife.47682

Ivarsson H., Jönsson K.I., 2004. Aggregation effects on anhydrobiotic survival in the taridgrade *Richtersius coronifer*. *Journal of Experimental Zoology* 301A: 195—199.

Jönsson K.I., 2019. Radiation Tolerance in Tardigrades: Current Knowledge and Potential Applications in Medicine. *Cancers* 11(9): 1333.

Jönsson K.I., Borsari S., Rebecchi L., 2001. Anhydrobiotic survival in populations of the tardigrades *Richtersius coronifer* and *Ramazzottius oberhaeuseri* from Italy and Sweden. *Zoologischer Anzeiger* 240: 419—423.

Jönsson K.I., Guidetti R., 2001. Effects of Methyl Bromide fumigation on anhydrobiotic metazoans. *Ecotoxicology and environmental safety* 50: 72—75.

Jönsson K.I., Harms-Ringdahl M., Torudd J., 2005. Radiation tolerance in the eutardigrade *Richtersius coronifer*. *International Journal of Radiation Biology* 81(9): 649—656, DOI: 10.1080/09553000500368453

Jönsson K.I., Holm I., Tassidis H., 2019. Cell Biology of the Tardigrades: Current Knowledge and Perspectives, In W. Tworzydło, S. M. Bilinski, *Evo-Devo: Non-model Species in Cell and Developmental Biology, Results and Problems in Cell Differentiation* 68, pp 231—249 https://doi.org/10.1007/978-3-030-23459-1_10

Jönsson K.I., Rabbow E., Schill R.O., Harms-Ringdahl M., Rettberg P., 2008. Tardigrades survive exposure to space in low Earth orbit. *Current Biology* 18: R729—731.

Jönsson K.I., Wojcik A., 2017. Tolerance to X-rays and Heavy Ions (Fe, He) in the Tardigrade *Richtersius coronifer* and the Bdelloid Rotifer *Mniobia russeola*. *Astrobiology* 17(2): 163—167.

Jönsson, K.I., Rebecchi L., 2002. Experimentally induced anhydrobiosis in the tardigrade *Richtersius coronifer*: phenotypic factors affecting survival. *Journal of Experimental Zoology* 293: 578—584.

Jørgensen A., Kristensen R.M., Møbjerg N., 2018. Phylogeny and Integrative Taxonomy of Tardigrada. In: Schill R. (eds) *Water Bears: The Biology of Tardigrades*. Zoological Monographs, vol 2. Springer, Cham

Jørgensen A., Møbjerg N., Kristensen R.M., 2007. A molecular study of the tardigrade *Echiniscus testudo* reveals low DNA sequence diversity over a large geographic area. *Journal of Limnology* 66(1): 77—83.

Kinchin I., 1993. An observation of body cavity cells of *Ramazzottius* (Hypsibiidae, Eutardigrada). *Quekett Journal of Microscopy* 37: 52—55.

Kuzmic M., Richaud M., Frelon S., Galas S., 2018. Carbonylation accumulation of the *Hypsibius exemplaris* anhydrobiote reveals age-associated marks. *PLoS ONE* 13(12): e0208617, DOI: [10.1371/journal.pone.0208617](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208617)

Litwin J.A., 1985. Light microscopic histochemistry on plastic sections. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 16: 1—84.

Møbjerg N., Jørgensen A., Kristensen R.M., 2019. Ongoing revision of Echiniscoidea (Heterotardigrada: Echiniscoidea), with the description of a new interstitial species and genus with unique anal structures. *Zoological Journal of the Linnean Society* XX: 1-18. [10.1093/zoolinnean/zlz122](https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlz122)

Nelson D.R., Guidetti R., Rebecchi L., 2005. Phylum Tardigrada. In: Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates, Ecology and General Biology, Fourth Edition, 2015, Academic Press, 347–380. ISBN: 9780123850263

Nelson, D.R., 2002. Current Status of the Tardigrada: Evolution and Ecology. *Integrative and Comparative Biology*, 42(3), 652-659, DOI:10.1093/icb/42.3.652

Nilsson C., Jönsson K.I., Pallon J., 2013. Element analysis of the eutardigrades *Richtersius coronifer* and *Milnesium cf. asiaticum* using particle induced X-ray emission (PIXE). *J. Limnol.* 72(s1): 92—101.

Nilsson C.E.J., Jönsson K.I., Pallon J., 2010. Tolerance to proton irradiation in the eutardigrade *Richtersius coronifer* – a nuclear microprobe study. *Int. J. Radiat. Biol.* 86(5): 420—427.

O'Farrell P.H., 2001. Triggering the all or nothing switch to mitosis. *Trends in Cellular Biology* 11(12): 519—519.

Ono F., Saigusa M., Uozumi T. Matsushima Y., Ikeda H., Saini N.L., Yamashita M., 2008. Effect of high hydrostatic pressure on to life of tiny animal tardigrade. *Journal of physics and chemistry of solids* 69: 2297—2300.

Persson D., Halberg K.A., Jørgensen A., Ricci C., Møbjerg N., Kristensen R.M., 2011. Extreme stress tolerance in tardigrades: surviving space conditions in low earth orbit. *Journal of Zoological systematics and Evolutionary research* 49(1): 90—97.

Pigoń A., Węglarska B., 1955. Anabiosis in tardigrada. Metabolism and humidity. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences* 2: 31—34.

Poprawa I., 2006. Ultrastructural changes of the storage cells during oogenesis in *Dactylobiotus dispar* (Murray, 1907) (Tardigrada: Eutardigrada). *Zoologica Poloniae* 51(1-4): 13—18.

Ramazzotti G., Maucci W., 1983. II Phylum tardigrada. *Memorie dell' Istituto Italiano di Idrobiologia*, 41, pp 1—1012.

Ramløv H., Westh P., 2001. Cryptobiosis in eutardigrade *Adorybiotus* (*Richtersius*) *coronifer*: Tolerance to alcohols, temperature and de novo protein synthesis. *Zool. Anz.* 240: 517—523.

Reuner A., Hengherr S., Brümmer F., Schill R.O., 2010. Comparative studies on storage cells in tardigrades during starvation and anhydrobiosis. *Current zoology* 56(2): 259—263.

Rosati F., 1968. Riserche di microscopia elettronica sui Tardigradi, 2 I globuli cavitary. *Atti Accad Fisiocritici, Siena* 17: 1439—1452.

Szymańska B., 1994. Interdependence between storage bodies and egg developmental stages in *Macrobiotus richtersi* Murray, 1911 (Tardigrada). *Acta Biologica Cracoviensa, Series Zoologia* 36: 41—50.

Tanaka S., Tanaka J., Miwa Y., Horikawa D.D., Katayama T., Arakawa K., Toyoda A., Kubo T., Kunieda T., 2015. Novel Mitochondria-Targeted Heat-Soluble Proteins Identified in the Anhydrobiotic Tardigrade Improve Osmotic Tolerance of Human Cells. *PLoS ONE* 10(2): e0118272. DOI: 10.1371/journal.pone.0118272

Tonzetich J., 2004. Orcein staining and the identification of polytene chromosomes. *Methods of molecular biology* 247: 249—256.

Tsujimoto M., Imura S., Kanda H., 2016. Recovery and reproduction of an Antarctic tardigrade retrieved from a moss sample frozen for over 30 years. *Cryobiology* 72:78—81

Walz B., 1973. Zur Feinstruktur der Muskelzellen des Pharynx-Bulbus von Tardigraden. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 140: 389—399.

Walz B., 1982. Molting in Tardigrada. A review including new results on cuticle formation in *Macrobiotus hufelandi*. In: Nelson, D.R. (Ed.), *Proceedings of the third international symposium on the Tardigrada*. East Tennessee State University Press, USA, pp. 129—142.

Węglarska B., 1957. On the encystation in Tardigrada. *Zoologica Poloniae* 8(4): 315—325.

Węglarska B., 1975. Studies on the morphology of *Macrobiotus richtersi* Murray, 1911. *Mem. Ist. Ital. Idrol.* 32: 445—464.

Welnicz W., Grohme M.A., Kaczmarek Ł., Schill R.O., Frohme M., 2011. Anhydrobiosis in tardigrades—The last decade. *Journal of Insect Physiology* 57(5): 577—583.

Westh, P. & Ramløv, H. 1991. Trehalose accumulation in the tardigrade *Adorybiotus coronifer* during anhydrobiosis. *Journal of Experimental Zoology* 258, 303—311.

Womersley C., Thompson S.N., Smith L., 1982. Anhydrobiosis in nematodes II: Carbohydrate and lipid analysis in undesiccated and desiccated nematode. *Journal of nematology* 14(2): 145—153.

Wright J.C., Westh P., Ramløv H. 1992. Cryobiosis in tardigrades. *Biol Rev.* 67: 1—29.

Wright, J.C. 2001. Cryptobiosis 300 years on from van Leuwenhoek: what have we learned about tardigrades? *Zoologischer Anzeiger* 240, 563—582.

Seznam publikací/List of publications:

1a) publikace in extenso, které jsou podkladem disertace

- I Czernekova M, Jönsson KI (2016a). Mitosis in storage cells of the eutardigrade *Richtersius coronifer* - Zoological Journal of the Linnean Society 178 (4): 888 – 896.
IF: 2.909
- II Czernekova M, Jönsson KI (2016b). Experimentally induced repeated anhydrobiosis in the eutardigrade *Richtersius coronifer* - PLoS ONE 11 (11): e0164062.
IF: 2.776
- III Czerneková M, Jönsson KI, Chajec L, Student S, Poprawa I (2017). The structure of the desiccated *Richtersius coronifer* (Richters, 1903) - Protoplasma 254 (3): 1367-1377.
IF: 2.633
- IV Czerneková M, Janelt K, Student S, Jönsson KI, Poprawa I (2018). A comparative ultrastructure study of storage cells in the eutardigrade *Richtersius coronifer* in the hydrated state and after desiccation and heating stress. PLoS ONE 13(8): e0201430.
IF: 2.776

1b) publikace in extenso, které jsou podkladem disertace:

poster presentation:

Czerneková M, Tassidis H, Holm I, Jönsson KI, 2016. Primary Culture of Tardigrade Storage Cells from *Richtersius coronifer* Richters, 1903. Presented at the 12th International Congress on Cell Biology, Prague, 21-25 July.

1a publikace in extenso bez vztahu k tématu disertace:

Czernekova M, Jönsson KI, Hajer J, Devetter M, 2018. Comparison of extraction methods for quantitative analyses of tardigrade abundance in soil and leaf litter. Pedobiologia 70: 1-5, DOI: 10.1016/j.pedobi.2018.06.005
IF: 1.833

Mgr. Michaela Czerneková



Moskevská 1509/36, Ústí nad Labem, 40001, ČR



607 606 290



czernekovaM@seznam.cz

V rámci studia se zaměřuji na buněčnou biologii a kryptobiózu skupiny méně probádaných bezobratlých živočichů, kmen Tardigrada (želvušky). Zkušenosti se sběrem a zpracováním biologických vzorků, mikrobiologickou laboratorní prací a pokročilými mikroskopickými technikami (SEM, TEM, flow cytometry, fluorescent microscopy). Schopnost analýzy dat a práce se statistickými programy (SYSTAT, EvaSys). Práce na zahraničních pracovištích, prezentace výsledků v podobě posterů i přednášek na mezinárodních konferencích, publikování výsledků v mezinárodních časopisech s IF. Adeptka pro dokončení PhD studia.



VZDĚLÁNÍ

2013 - dosud

Ph.D.: Biologie a patologie buňky

1. Lékařská Fakulta - Univerzita Karlova

2013 - 2011

Magisterské studium: Biologie a Společenské vědy se zaměřením na vzdělávání

Univerzita J. E. Purkyně - Ústí Nad Labem



VÝZKUMNÉ PROJEKTY A PUBLIKAČNÍ ČINNOST /

Kristianstad University (Švédsko), Silesian University (Polsko)

2012 - 2013 MABH (Man and Biosphere Health)

Projektové výstupy:

- účast na multi-disciplinární platformě zaměřené na interakci mezi lidskými dopady na ekosystém, funkčností ekosystému a lidské zdraví v rámci Ph.D. projektu zaměřeného na kryptobiózu želvušek

- účast na odborných workshopech (scientific writing, statistika, flow cytometry) a seminářích
- spoluúčast na popularizaci vědy: science safari (program SŠ)

Publikace:

- Czernekova M., Jönsson K.I., Hajer J., Devetter M. 2018. Comparison of extraction methods for quantitative analyses of tardigrade abundance in soil and leaf litter. *Pedobiologia* 70: 1-5, DOI: 10.1016/j.pedobi.2018.06.005
- Czernekova M., Janelt K, Student S, Jönsson K.I., Poprawa I., 2018. A comparative ultrastructure of desiccated eutardigrades *Richtersius coronifer* (Richters, 1903) after heating and rehydration. *PLoS ONE* 13(8), DOI: 10.1371/journal.pone.0201430
- Czernekova M., Jönsson K.I., 2016. Experimentally induced repeated anhydrobiosis in the eutardigrade *Richtersius coronifer*. *PLoS ONE* 11(11): e0164062. doi:10.1371/journal.pone.0164062
- Czerneková M., Jönsson K.I., Chajec L., Student S., Poprawa I., 2016. The structure of desiccated *Richtersius coronifer* (Richters, 1903). *Protoplasma*, DOI: 10.1007/s00709-016-1027-2
- Czerneková M., Jönsson K.I., 2016. Mitosis in storage cells of the eutardigrade *Richtersius coronifer*. *Zoological Journal of the Linnean Society* 178(4): 888-896, DOI: 10.1111/zoj.12440



ÚČAST NA KONFERENCÍCH

- 2018: 14th International Symposium on Tardigrada, Kodaň, Dánsko (poster)
- 2017: Actual problems of environmental protection, Katowice, Polsko 19 May (poster)
- 2016: 12th International Congress on Cell Biology, Praha, ČR, 21. - 25. 7. (poster)
- 2016: Arthropod conference, University of Silesia, Katowice, Polsko (poster)
- 2016: The 16th European microscopy congress, Lyon, Francie (poster)

2016: XXXII Embryology conference in Wojslawice,
Polsko (Konferencja embriologiczna) (poster)
2015: 13th International Symposium on Tardigrada,
Modena, Itálie (oral presentation)
2014: Zoologické dny, Ostrava, ČR (poster)
2013: Zoologické dny, Brno, ČR (oral presentation)
2012: 12th International Symposium on Tardigrada, Porto,
Portugalsko (poster)
2012: Kostelecké inspirování, Kostelec nad Černými Lesy,
ČR (poster)



STÁŽE / INTERNSHIPS

duben 2014 – září 2016 Kristianstad University
(Kristinastad, Švédsko), Výzkum
kryptobiózy a buněčné biologie
želvušek
říjen 2015 – prosinec 2015 University of Silesia (Katowice,
Polsko), Výzkum histologie a
kryptobiózy želvušek
červenec 2014 Stockholm University, The Wenner-Gren
Institute (Stockholm, Švédsko),
Výzkum kryptobiózy (iradiace)
želvušek



PROFESNÍ KVALIFIKACE - KURZY

Flow Cytometry: From Theory to application – Karolinska
Institutet, Švédsko (21 – 25/9 2015)
• Akreditováno Karolinska Institutet, zakončeno
certifikací
FE-SEM Workshop for Life Sciences – Umeå University,
Švédsko (17 – 19/11 2014)
• příprava specifických vzorků pro SEM/TEM microscopy
Flow Cytometry course – Kristiansad University, Švédsko
(2014)
• úvod do průtokové cytometrie (Flow Cytometry)
SEM kurz – Univerzita J.E. Purkyně, Ústí nad Labem, ČR (16
– 17/5 2013)
• Akreditováno Mikrobiologickým ústavem AV ČR

Function and structure of cell membrane – Fyziologický ústav AV ČR, Praha, ČR (5 – 9/11 2012)

- Akreditováno AV ČR

SEM kurz – Univerzita J. E. Purkyně, Ústí nad Labem, ČR (2011)

- Akreditováno Mikrobiologickým ústavem AV ČR



DOVEDNOSTI

- schopnost hledat nové postupy a techniky
- designování experimentu a analýza výsledků
- spoluúčast na tvorbě projektů a multi-disciplinární platformy
- kreativita a myšlení „outside the box“

Organizační a komunikační dovednosti:

- schopnost spolupráce a komunikace na mezinárodní úrovni
- plánování zahraniční stáže - finanční rozpočet, čas, navázání spolupráce



PRÁCOVNÍ ZKUŠENOSTI

2019 – dosud

Vědecký pracovník

Univerzita J.E. Purkyně, Katedra Biologi, Ústí nad Labem, ČR

2014 - 2017

Odborná Pracovnice

Fyziologický Ústav Akademie Věd ČR, Praha, ČR

2015 - 2015

Asistentka V Kanceláři Pro Zahraniční Vztahy

Kristianstad University, Kristianstad, Švédsko

2014 - 2014

Lektorka Biologie

TUTOR, Praha, ČR

2010 - 2013

Učitelka Biologie

Obchodní Akademie A Jazyková Škola, Ústí nad Labem, ČR