

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach

**Jakub Biń**

**Rola peptydu MOTS-c w funkcjonowaniu endokrynej części trzustki**

The role of the MOTS-c peptide in the functioning of the endocrine part of the pancreas

Praca doktorska

Doctoral thesis

**Promotor:** dr hab. Maciej Sassek

**Dyscyplina naukowa:** nauki biologiczne

Praca doktorska wykonana  
w Katedrze Fizjologii i Biochemii Zwierząt

Poznań 2026

*Pragnę złożyć najserdeczniejsze podziękowania Promotorowi **dr hab. Maciejowi Sasskowi**, za opiekę merytoryczną, cierpliwość, ogromne pokłady spokoju i humoru oraz otrzymane wsparcie podczas całej ścieżki naukowej*

*Chciałbym również złożyć specjalne podziękowania **prof. dr hab. Pawłowi Kołodziejskiemu**, **dr hab. Ewie Pruszyńskiej-Oszmałek** oraz **dr Natalii Leciejewskiej** za pomoc i wsparcie w laboratorium, przekazane rady i wskazówki*

*Ponadto pragnę podziękować mojej Żonie **Agnieszce** oraz Synkowi **Frankowi**, za wyrozumiałość oraz cierpliwość, bez których ta praca by nie powstała*

**Artykuły naukowe wchodzące w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską:**

1. Bień, J., Pruszyńska-Oszmałek, E., Kołodziejcki, P., Leciejewska, N., Szczepankiewicz, D., & Sassek, M. (2024). MOTS-c regulates pancreatic alpha and beta cell functions *in vitro*. *Histochemistry and Cell Biology*, 161(6), 449-460.

**IF=2,1**

2. Bień, J., Pruszyńska-Oszmałek, E., Kołodziejcki, P., Leciejewska, N., Szczepankiewicz, D., Grzęda, E., & Sassek, M. (2025). MOTS-c modulates pancreatic islet function in rats and pigs *in vitro*. *Histochemistry and Cell Biology*, 163(1), 64.

**IF=2,1**

**Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu Sonata 14 nr 2018/31/D/NZ4/01121, kierownik dr hab. Maciej Sassek.**

## Spis treści

1.	Wykaz skrótów .....	7
2.	Streszczenie .....	9
3.	Abstract .....	10
4.	Wstęp .....	11
4.1.	MOTS-c .....	12
4.2.	Trzustka.....	15
4.2.1.	Hormony produkowane przez trzustkę .....	16
4.3.	Cukrzyca .....	18
5.	Hipotezy i cele badań.....	22
5.1.	Eksperyment I – badania na komórkach linii $\alpha$ TC-1 i INS-1E .....	22
5.2.	Eksperyment II – badania na izolowanych wyspach trzustkowych .....	23
6.	Materiały i metody.....	24
6.1.	Hodowle komórkowe.....	24
6.2.	Wpływ MOTS-c na funkcjonowanie linii komórkowych oraz izolowanych wysp trzustkowych .....	25
6.3.	Barwienie immunofluorescencyjne linii komórkowych.....	25
6.4.	Wydzielanie MOTS-c z linii komórkowych.....	26
6.5.	Badania nad wydzielaniem MOTS-c z wysp trzustkowych .....	27
6.6.	Wydzielanie hormonów z linii komórkowych.....	27
6.7.	Wydzielanie hormonów z wysp trzustkowych .....	27
6.8.	Pożywka oraz KRB z dodatkiem wolnych kwasów tłuszczowych .....	28
6.9.	MTT .....	28
6.10.	BrdU.....	28
6.11.	Śmiertelność komórek .....	28
6.12.	Ekstrakcja RNA, odwrotna transkrypcja i reakcja PCR.....	29

6.13.	Izolacja białka .....	30
6.14.	Western blot .....	30
6.15.	Zwierzęta wykorzystane do badań.....	31
6.16.	Izolacja wysp trzustkowych - szczur .....	32
6.17.	Izolacja wysp trzustkowych – świnią .....	32
6.18.	Barwienie immunofluorescencyjne wysp trzustkowych .....	33
6.19.	Analiza statystyczna .....	34
7.	Wyniki.....	35
7.1.	MOTS-c jest obecny w komórkach INS-1E oraz $\alpha$ TC-1.....	35
7.2.	Insulina i glukagon zwiększają sekrecję i ekspresję MOTS-c w komórkach INS-1E oraz $\alpha$ TC-1 .....	35
7.3.	MOTS-c wpływa na ekspresję i sekrecję insuliny i glukagonu oraz ich receptorów .....	36
7.4.	Sekrecja i ekspresja genu MOTS-c zmienia się w zależności od stężenia glukozy w pożywce .....	36
7.5.	Wolne kwasy tłuszczowe zwiększają wydzielanie MOTS-c z komórek INS-1E, ale obniżają w komórkach $\alpha$ TC-1 .....	37
7.6.	MOTS-c zwiększa żywotność komórek INS-1E oraz obniża żywotność komórek $\alpha$ TC-1.....	37
7.7.	MOTS-c obniża proliferację komórek $\alpha$ TC-1, ale nie wpływa na proliferację komórek INS-1E.....	37
7.8.	MOTS-c wpływa na obniżenie apoptozy komórek INS-1E oraz $\alpha$ TC-1 .....	37
7.9.	Przeciwciało anti-MOTS-c jest specyficzne dla świńskiego MOTS-c.....	38
7.10.	MOTS-c jest obecny w szczurzych i świńskich wyspach trzustkowych....	38
7.11.	Składniki pokarmowe oraz hormony trzustkowe zmieniają ekspresję oraz sekrecję MOTS-c ze szczurzych wysp trzustkowych.....	43

7.12.	MOTS-c obniża wydzielanie insuliny oraz glukagonu, ale zwiększa ich ekspresję na poziomie RNA w wyspach trzustkowych szczura .....	43
7.13.	Składniki pokarmowe oraz hormony trzustkowe wpływają na wydzielanie MOTS-c, ale nie na jego ekspresję w świńskich wyspach trzustkowych.....	43
7.14.	MOTS-c wpływa na ekspresję i sekrecję insuliny i glukagonu oraz ich receptorów w świńskich wyspach trzustkowych .....	44
7.15.	MOTS-c zwiększa przeżywalność komórek wysp trzustkowych szczura i świni, ale nie wpływa na ich apoptozę .....	44
8.	Dyskusja.....	45
9.	Spis literatury .....	56
10.	Spis tabel i rycin .....	60
10.1.	Tabele.....	60
10.2.	Ryciny .....	60

## 1. Wykaz skrótów

- ACC (ang. acetyl-coenzyme A carboxylase) – karboksylaza acetylo-koenzymu A
- ADP (ang. adenosine diphosphate) – adenzynodiosforan
- AICAR (ang. 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide) – rybonukleotyd 5-aminoimidazol-4-karboksyamidu
- AMP (ang. adenosine monophosphate) – adenzynomonofosforan
- AMPK (ang. 5'adenosine monophosphate-activated protein kinase) – kinaza aktywowana adenzyno-5'-monofosforanem)
- ATP (ang. adenosine triphosphate) – adenzynotrójfosforan
- BSA (ang. bovine serum albumin) – albumina surowicy bydłowej
- cDNA (ang. complementary DNA) – komplementarny DNA
- CPT-1 (ang. carnitine palmitoyltransferase 1) – palminotransferaza karnityny 1
- DAPI (ang. 4',6-diamidino-2-phenylindole) – 4',6-diamidyno-2-fenylindol
- DMEM (ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium) – zmodyfikowana pożywka Dulbecco Eagle
- DMSO – dimetylosulfotlenek
- DNA (ang. deoxyribonucleic acid) – kwas deoksyrybonukleinowy
- eNOS (ang. endothelial nitric oxide synthase) – śródbłonkowa syntaza tlenku azotu
- FFA (ang. free fatty acids) – wolne kwasy tłuszczowe
- GAPDH (ang. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) – dehydrogenaza gliceraldehydu-3-fosforanowa
- GSIS (ang. glucose stimulated insulin secretion) – wydzielanie insuliny stymulowane glukozą
- HBSS (ang. Hanks balanced salt solution) – bufor Hanksa
- HEPES (ang. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) – kwas 4-(2-hydroksyetylo)1-piperazynoetanosulfonowy
- HN (ang. humanin) – humanina
- IPEX (ang. immunodysregulation polyendorinopathy enteropathy X-linked syndrome) – zespół dysregulacji immunologicznej, poliendokrynopatii i enteropatii sprzężony z chromosomem X
- IR (ang. insulin resistance) – insulinnooporność

KRB (ang. Krebs-Ringer Buffer) – bufor Krebsa-Ringera

LADA (ang. latent autoimmune diabetes in adults) – utajona autoimmunologiczna cukrzyca dorosłych

MDP (ang. mitochondrial-derived peptide) – peptyd mitochondrialnego pochodzenia

MODY (ang. maturity onset diabetes of the young) – cukrzyca wieku dojrzałego u młodych

MOTS-c (ang. mitochondrial open-reading frame of the 12S rRNA-c) – mitochondrialna otwarta ramka odczytu z 12S rRNA-c

mRNA (ang. messenger ribonucleic acid) – przekaźnikowy kwas rybonukleinowy

PBS (ang. phosphate-buffer saline) – sól fizjologiczna buforowana fosforanami

PCR (ang. polymerase chain reaction) – łańcuchowa reakcja polimerazy

RIPA (ang. radioimmunoprecipitation assay buffer) – bufor do testu radioimmunoprecypitacji

RNA (ang. ribonucleic acid) – kwas rybonukleinowy

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

rRNA (ang. ribosomal ribonucleic acid) – rybosomalny kwas rybonukleinowy

SEM (ang. standard error mean) – błąd standardowy średniej

SHLP (ang. small humanin-like peptide) – małe peptydy humaninopodobne

T1DM (ang. type I diabetes mellitus) – cukrzyca typu I

T2DM (ang. type II diabetes mellitus) – cukrzyca typu II

TBP (ang. TATA-box binding protein) – białko wiążące kasetę TATA

tRNA (ang. transfer ribonucleic acid) – transportujący kwas rybonukleinowy

WADA (ang. World AntiDoping Agency) – Światowa Agencja Antydopingowa

WHO (ang. World Health Organization) – Światowa Organizacja Zdrowia

## 2. Streszczenie

Nauka cały czas poszerza listę znanych peptydów i białek występujących w organizmie człowieka i innych ssaków. Jedną z takich substancji jest odkryty w 2015 roku peptyd mitochondrialnego pochodzenia MOTS-c. W pracy opisującej jego odkrycie na modelu mysim wskazano szereg właściwości tego peptydu obejmujących m.in. regulację metabolizmu, wzrost wrażliwości tkanek na insulinę czy spadek otyłości. Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie wpływu peptydu MOTS-c na funkcjonowanie endokrynej części trzustki. Zbadano również wpływ składników energetycznych oraz hormonów trzustkowych na wydzielanie oraz ekspresję MOTS-c. W tym celu wykorzystano dwa rodzaje modeli laboratoryjnych: linie komórkowe (INS-1E oraz  $\alpha$ TC-1) oraz izolowane wyspy trzustkowe (pochodzące od szczura oraz świni). Przy pomocy barwienia immunofluorescencyjnego wykazano również obecność MOTS-c w badanych liniach komórkowych oraz trzustkach szczurów i świń. Z otrzymanych danych wynika, że MOTS-c jest obecny zarówno w komórkach obu badanych liniach oraz w trzustkach obu gatunków, jednak z różną lokalizacją wewnątrz narządu. Ponadto wykazano wpływ MOTS-c na obniżenie sekrecji insuliny przez komórki INS-1E oraz wyspy trzustkowe szczura i zaobserwowano sprzężenie zwrotne stwierdzając również wzrost wydzielania MOTS-c zależny od insuliny. Badając wpływ MOTS-c na trzustkę można zauważyć również pozytywny wpływ tego peptydu na przeżywalność komórek INS-1E oraz komórek wysp trzustkowych. Wyniki uzyskane na liniach komórkowych nie zawsze były tożsame z analogicznymi otrzymanymi na wyspach trzustkowych, co pokazuje, jak nadal ważne jest stosowanie wielu modeli badawczych, od najprostszych, takich jak ustalone linie komórkowe, aż do bardziej złożonych jak izolowane wyspy trzustkowe. Jednym z ważniejszych odkryć prezentowanych badań był fakt odmiennego działania MOTS-c w modelu świńskim w porównaniu do modelu szczurzego. Wykazano m.in., że MOTS-c występujący u świni ma znacznie większą masę cząsteczkową niż wariant występujący u szczura. Otrzymane wyniki są pierwszymi, które w tak złożony sposób opisują wpływ MOTS-c na funkcjonowanie trzustki. Sugerują one pozytywny, protekcyjny wpływ tego peptydu na komórki trzustki, co może mieć kluczowe znaczenie w czasie rozwoju cukrzycy typu II. Kwestia ta oczywiście wymaga szeregu dalszych badań, najlepiej z użyciem modelu *in vivo*.

### 3. Abstract

Science is still developing the list of known peptides and proteins present in organisms such as humans or other mammals. One example of such a substance is mitochondrial-derived-peptide MOTS-c, discovered in 2015. In study describing its discovery on mouse model, researchers described a few properties of this peptide such as regulation of metabolism, enhancing insulin sensitivity in tissues and decreasing. This doctoral thesis aimed to determine the influence of MOTS-c peptide on functioning of the endocrine part of the pancreas. Moreover, the effect of energetic compounds and pancreatic hormones on secretion and expression of MOTS-c was examined. To achieve this, two laboratory models were used: cell lines (INS-E and  $\alpha$ TC-1) and isolated pancreatic islets (derived from rats and pigs). MOTS-c presence in examined cell lines and pancreatic islets was shown using immunofluorescence staining. Collected data shows that MOTS-c is present in both cell lines used and in pancreas of both species, but with different location inside the organ. Moreover, the influence of MOTS-c on decreasing insulin secretion from INS-1E cells and rats pancreatic islets was determined and the feedback loop was observed noticing enhanced secretion of MOTS-c after exposure to insulin. Examining the influence of MOTS-c on pancreas it can be noticed that this peptide has positive influence on viability of INS-1E cells and pancreatic islets cells. Results obtained from cell lines were not always the same as those obtained from analogous experiments conducted on pancreatic islets, which shows that it is still very important to use many of research models, from the simplest one like laboratory cell lines to more complex like isolated pancreatic islets. One of the more important discoveries of this study was fact that MOTS-c acts differently in pig model than in the rat model. It was shown that MOTS-c present in pig has a significantly higher mass than the one present in rat. Obtained results are first, which describes the influence of MOTS-c on the functioning of pancreas in such complex way. They suggest positive, protective influence of this peptide on pancreatic cells, which may play a major role in developing type II diabetes. This topic of course needs much further research, preferably using *in vivo* model.

#### 4. Wstęp

Nauka rozwija się nieustannie, a szczególnie widać to na przykładzie szeroko pojętych nauk biologicznych, które przeżywają teraz swój rozkwit. Pomaga temu rozwój coraz to nowszych metod badawczych, dzięki którym możemy coraz głębiej wnikać w funkcjonowanie organizmów oraz zachodzące w nich procesy. Ponad siedemdziesiąt lat temu opisano strukturę DNA (Watson i Crick, 1953). Natomiast dekadę później odkryto DNA mitochondrialne (Nass i Nass, 1963). Mitochondria są od lat znane jako organella odpowiedzialne za przeprowadzanie szeregu procesów dostarczających komórce energii niezbędnej do prawidłowego funkcjonowania. Podobnie jak plastyny w komórkach roślinnych, mitochondria pochodzą od mikroorganizmów, które weszły w symbiozę z komórką gospodarza. Stało się to prawdopodobnie ok 1,8 mld lat temu gdy proteobakterie pochłonięte przez komórki eukariotyczne pozostały w cytoplazmie dając początek nowej, wyjątkowej symbiozie (Sagan 1967). Takie pochodzenie sprawia, że organella te są cały czas przedmiotem licznych badań i ciągle odkrywane są nowe ich cechy oraz funkcje. Ponad cztery dekady temu dokonano zsekwencjonowania genomu znajdującego się w ludzkim mitochondrium (Anderson i wsp. 1981). Odkryto, że sekwencja nukleotydów tworząca ten genom odpowiada za kodowanie 22 rodzajów tRNA, 2 rodzajów rRNA oraz 13 rodzajów białek łańcucha oddechowego (Cobb i wsp. 2016). Wraz z rozwojem badań nad genomem pochodzenia mitochondrialnego, po dokładniejszej analizie sekwencji tych 37 genów, odkryto w ich obrębie mniejsze, funkcjonalne fragmenty, które są odpowiedzialne za kodowanie peptydów.

Pierwszym odkrytym genem, kodującym tzw. peptydy mitochondrialnego pochodzenia - MDPs (*mitochondrial derived peptides*) był odkryty ponad dwie dekady temu przez zespół Nishimoto gen humaniny (HN) (Hashimoto i wsp. 2001). Gen ten został wykryty przy pomocy tzw. ekspresji funkcjonalnej gdzie najpierw poszukiwano określonej funkcji (w tym przypadku była to ochrona neuronów przed szkodliwym działaniem amyloidu  $\beta$  w chorobie Alzheimera), a następnie sprawdzano jaki peptyd ten efekt powoduje. Biologiczne działanie humaniny zostało potwierdzone przez badaczy i dotychczas opisano między innymi efekt tego peptydu powodujący wzrost wrażliwości na insulinę (Muzumdar i wsp. 2009) jak również wykazano działanie ochronne na serce w mysim modelu niedokrwienia oraz reperfuzji, prawdopodobnie przez system sygnalizacji AMPK-eNOS (kinaza białkowa aktywowana adenozy-5'-monofosforanem –

śródbłonkowa syntaza tlenu azotu) oraz regulację procesów apoptotycznych. Myszy, które otrzymały po niedokrwieniu i reperfuzji humaninę, charakteryzowały się większą objętością wyrzutową krwi niż myszy z grupy kontrolnej (Muzumdar i wsp. 2010).

Rok 2016 przyniósł kolejne znaczące odkrycie naukowe dotyczące związków, których sekwencje znajdują się wewnątrz genomu mitochondrialnego – odkryto 6 genów odpowiedzialnych za kodowanie białek wewnątrz sekwencji 16S rRNA. Związki te zostały nazwane SHLPs (*small humanin-like peptides*), co można przetłumaczyć jako małe peptydy humaninopodobne. Szczególnie interesującym faktem w kontekście regulacji metabolizmu węglowodanowo-lipidowego jest, iż jeden z tych peptydów, SHLP-2, również wykazuje działanie uwrażliwiające na insulinę (Cobb i wsp. 2016).

Nazwa	Długość łańcucha aminokwasów	Rok odkrycia	Gen, w którym znajduje się ORF
Humanina	24	2001	16S rRNA
SHLP1	24	2016	16S rRNA
SHLP2	26	2016	16S rRNA
SHLP3	38	2016	16S rRNA
SHLP4	26	2016	16S rRNA
SHLP5	24	2016	16S rRNA
SHLP6	20	2016	16S rRNA
MOTS-c	16	2015	12S rRNA

Tabela 1. Opisane dotychczas peptydy mitochondrialnego pochodzenia (na podst. Miler i wsp. 2022 oraz Merry i wsp. 2020).

#### 4.1. MOTS-c

W roku 2015 zespół badaczy pod kierownictwem Lee przy użyciu metod bioinformatycznych odkrył w sekwencji 12S rRNA otwartą ramkę odczytu kodującą nieznaną wcześniej peptyd. Z uwagi na lokalizację nazwano go mitochondrialną otwartą ramką odczytu z 12S rRNA-c, MOTS-c (Mitochondrial Open-reading-frame the Twelve SrRNA-c.) (Lee i wsp. 2015). Ramka zawierała 51 par zasad, które po translacji tworzyły peptyd składający się z 16 aminokwasów. Co ciekawe, translacja ta nie zachodzi przy

użyciu kodu genetycznego i aparatu enzymatycznego mitochondrialnego, ale ma miejsce w cytoplazmie z użyciem standardowego kodu genetycznego, gdyż translacja mitochondrialna generowałaby tandemowe kodony start i stop. Wskazuje to, że poliadenylowany transkrypt MOTS-c jest eksportowany poza mitochondria gdzie ulega dalszej ekspresji. Mechanizmy transportujące mitochondrialne RNA (tRNA jak również rRNA) są jednak dotychczas słabo poznane (Lee i wsp. 2015).

Interesującą cechą peptydu MOTS-c jest jego konserwatywność wśród różnych gatunków ssaków takich jak człowiek, bonobo, orangutan, ale również tych mniej spokrewnionych jak szczur czy mysz, zwłaszcza w przypadku pierwszych 11 aminokwasów.

Człowiek	MRWQEMGYIFYP	PRK---	LR-----
Szympan	MRWQEMGYIFYP	PRK---	LR-----
Bonobo	MRRQEMGYIFYP	PRK---	LR-----
Orangutan	MEWQEMGYIFYP	FRK---	LR-----
Mysz	MKWEEMGYIFL	-----	-----
Szczur	MKRKEMGYIFF	SQR---	TLRNPL-----
Golec	MKWEEMGYIFLY	KN----	INDSYHEI-----
Pies	MRWEEMGYIFYP	-R---	TFHECFYEIKN----
Krowa	MKWEEMGYILY	TKR---	IKHESYYETNNQRRI
Danio	MKWEEMGYTFYP	RIYENV	T-----
Lew	MRWEAMGYIFYN	-----	-----
Niedźwiedź	MGWEEMGYIFY	S-R---	TTYESFYETKN----
Koń	MGWREMGYIFY	PKNKNFNPDES	LHETGD----
Delfin	MDWEEMGYIFY	NKN---	TP-----

Ryc.1 Sekwencje aminokwasów peptydu MOTS-c u różnych gatunków (na podst. Lee i wsp. 2015).

Do tej pory udowodniono wpływ MOTS-c na szereg procesów biologicznych, co potwierdza jego znaczenie w procesach homeostazy ustroju. W związku z tym, że

mitochondria są obecne w prawie każdej komórce eukariotycznej, genom mitochondrialny oraz MOTS-c są prawdopodobnie ważnymi regulatorami metabolizmu. Co istotne, peptyd ten ulega ekspresji w wielu różnych tkankach gryzoni będących zwierzętami modelowymi oraz jest wykrywany w osoczu krwi, zarówno ludzi jak i szczurów (Lee i wsp. 2015, Kim i wsp. 2019).

W pracach Du oraz Luo zauważono, że stężenie MOTS-c w osoczu krwi jest niższe u ludzi otyłych w obu grupach badanych: dzieci oraz młodzieży (Du i wsp. 2018, Luo i wsp. 2023). W badaniach laboratoryjnych na modelu mysim wykazano, że MOTS-c przeciwdziała otyłości wywołanej dietą oraz obniża insulinooporność (Lee i wsp. 2015, Yang i wsp. 2021). Podobne wyniki tj. przeciwdziałanie otyłości oraz obniżanie insulinooporności uzyskano również na modelu mysim w przypadku, gdy otyłość i insulinooporność były wywołane owariektomią (Lu i wsp. 2019). Udowodniono również potencjalny efekt terapeutyczny MOTS-c w pooperacyjnym ostrym uszkodzeniu płuc, gdzie zaobserwowano łagodzenie powstałych uszkodzeń oraz hamowanie ferroptozy spowodowanej przez reperfuzję miokardiocytów po niedokrwieniu (Lu i wsp. 2023).

W literaturze opisano ponadto szereg innych właściwości MOTS-c i jego wpływ na procesy fizjologiczne. Wykazano jego działanie ochronne w kardiomiopatii septycznej wywołanej lipopolisacharydami (Wu i wsp. 2023). Już w publikacji dokumentującej odkrycie MOTS-c Lee wykazał działanie tego peptydu przez wpływ na cykl metioninowo-folianowy i bezpośrednio powiązaną z tym ścieżkę biosyntezy puryn *de novo*. Zmiany w ekspresji genów odpowiedzialnych za kodowanie enzymów biorących udział w tych procesach biochemicznych obserwowane były już po czterogodzinnej ekspozycji na nowoodkryty wówczas peptyd. Wykryto skoordynowany spadek stężenia 5-metylo-tetrahydrofolianu, który jest najczęściej występującą formą aktywnego folianu oraz metioniny przy jednoczesnym wzroście stężenia homocysteiny w komórkach o zwiększonej intensywności ekspresji MOTS-c. Spadek koncentracji 5-metylo-tetrahydrofolianu występował razem z blokadą biosyntezy puryn *de novo* co powodowało akumulację endogennego 5-aminoimidazol-4-karboksyamidu rybonukleotydu (AICAR) do stężeń 20 razy większych w komórkach o nadekspresji MOTS-c w porównaniu z grupą kontrolną. To w konsekwencji prowadziło do spodziewanego znacznego spadku koncentracji puryn. Dobrze znaną rolę AICAR jest aktywacja AMPK (kinazy aktywowanej 5'AMP) i stymulacja utleniania kwasów tłuszczowych przez indukowaną

fosforylacją dezaktywującą acetylo-CoA karboksylazy (ACC), która z kolei prowadzi do łagodzenia inhibicji allosterycznej pierwszej palminotransferazy karnityny (CPT-1) oraz zwiększa pobór glukozy przez mięśnie. Efektem działania MOTS-c na badane w doświadczeniach komórki była fosforylacja AMPK $\alpha$  oraz aktywności, w tendencji zależnej od dawki i czasu przez jaki trwała ekspozycja na peptyd. Po 72 godzinach trwania eksperymentu wykazano również wzrost fosforylacji AMPK $\alpha$ 2 i ACC oraz zwiększone stężenie CPT-1. Na uwagę zasługuje również fakt, że aktywacja AMPK nastąpiła pomimo niskich poziomów AMP i wyższych poziomów ADP oraz ATP (Lee i wsp. 2015). Powyższe doniesienia o wpływie MOTS-c na metabolizm, szczególnie w kwestii wrażliwości na insulinę oraz gospodarki energetycznej zapoczątkowały badania nad tym peptydem i jego wpływem na organy wewnętrzne, zwłaszcza te, które są zaangażowane w szereg kluczowych procesów regulujących metabolizm. Trzustka jest tutaj organem szczególnym i bardzo specyficznym, który pełni dwojaką funkcję – zarówno jako narząd endokryny oraz jako narząd egzokryny. Dotychczasowe badania mające na celu zweryfikowanie wpływu tego peptydu pochodzenia mitochondrialnego na funkcjonowanie trzustki oraz wysp trzustkowych są bardzo nieliczne. Jednym z niewielu znanych efektów działania MOTS-c na trzustkę jest ochronne działanie na wyspy trzustkowe w przypadku cukrzycy typu I (Kong i wsp. 2021) oraz, łagodzenie hiperglikemii oraz insulinooporności w cukrzycy ciążowej (Yin i wsp. 2022).

#### **4.2. Trzustka**

Trzustka jest narządem, który oddziałuje na organizmy w podwójny sposób: jako narząd endokryny w układzie hormonalnym oraz jako narząd egzokryny w układzie pokarmowym. Dualizm tego działania jest widoczny również w jej budowie, ponieważ składa się ona z dwóch populacji komórek tworzące dwie różne struktury – zraziki trzustkowe, które stanowią większą część trzustki i składają się z komórek wydzielających enzymy do układu pokarmowego, oraz wysp trzustkowych (Langerhansa), zbudowanych z komórek produkujących i wydzielających hormony. Komórki endokryne trzustki należą do 4 głównych grup: A ( $\alpha$ ) produkujące i wydzielające glukagon, B ( $\beta$ ) produkujące i wydzielające insulinę, D ( $\delta$ ) produkujące i wydzielające somatostatynę oraz komórki F, które produkują i wydzielają polipeptyd trzustkowy. Udział części endokrynej względem całej trzustki jest zmienny w zależności

od gatunku, u szczurów i świń wynosi ok 2%. Również pod względem budowy anatomicznej występują różnice międzygatunkowe. U szczurów trzustka jest narządem rozszianym w krezce jelitowej, podczas gdy u świni jest narządem zwartym, podobnie jak u człowieka. W części endokrynej tj. w wyspach trzustkowych rozkład komórek  $\alpha$  i  $\beta$  także jest gatunkowo specyficzny. W wyspach szczurzych komórki produkujące glukagon są zlokalizowane skrajnie na peryferiach w przekroju poprzecznym wyspy tworząc obrączkę, natomiast komórki produkujące insulinę znajdują się w jej centrum. W wyspach świni natomiast, komórki  $\alpha$  i  $\beta$  są ułożone dużo bardziej równomiernie w różnych częściach wyspy, bez widocznych tendencji do obwodowego ułożenia komórek  $\alpha$  (Talathi i wsp. 2023, Tsuchitani i wsp. 2016).

#### **4.2.1. Hormony produkowane przez trzustkę**

Do funkcji pełnionych przez hormony produkowane przez endokrynną część trzustki można zaliczyć regulację stężenia glukozy we krwi oraz wpływ na wydzielanie gruczołowe. Wśród głównych hormonów wydzielanych przez trzustkę można wymienić insulinę, glukagon oraz somatostatynę i polipeptyd trzustkowy. Dodatkowo narząd ten produkuje proinsulinę, amylinę oraz peptyd C. Insulina wpływa na obniżenie stężenia glukozy we krwi, natomiast glukagon działa antagonistycznie powodując jego wzrost. Peptyd C bierze udział m.in. w procesach transdukcji sygnałów komórkowych (Chen i wsp. 2023), a dotychczas odkryte funkcje polipeptydu trzustkowego dotyczą głównie hamowania opróżniania żołądka oraz apetytu (Zhu i wsp. 2023). Amylina odpowiada m.in. za uczucie sytości (Lutz 2010), natomiast proinsulina, poza byciem prekursorem insuliny oraz peptydu C, pełni również funkcje neuroprotektoryjne (De Pablo i wsp. 2018).

##### **4.2.1.1. Insulina**

Jej nazwa pochodzi od łacińskiego słowa *insula* oznaczającego wyspę i jest nawiązaniem do miejsca, w którym jest produkowana i z którego jest wydzielana, czyli wyspy trzustkowej. Po raz pierwszy została opisana w 1922 roku przez Fredericka Bantinga, który otrzymał w 1923 roku wraz ze swoim przełożonym Johnem Macleodem za to odkrycie Nagrodę Nobla. Insulina wpływa na regulację zapasów energetycznych organizmu w trakcie sytości. Hormon ten odpowiada za wewnątrzkomórkowy transport glukozy do insulinozależnych komórek/tkanek, takich jak mięśnie czy tkanka tłuszczowa.

Głównym narządem insulinowrażliwym, na który insulina oddziałuje metabolicznie jest wątroba. To właśnie tam zachodzą procesy regulowane przez insulinę, takie jak synteza glikogenu z glukozy czy też przekształcenie nadmiaru glukozy w kwasy tłuszczowe będące prekursorami triglicerydów. Dotychczasowe badania potwierdziły, że insulina zwiększa wykorzystanie glukozy w wątrobie przyspieszając glikolizę i glikogenogenezę, a jednocześnie zmniejszając produkcję glukozy przez obniżanie aktywności procesów glukoneogenezy i glikogenolizy (Hatting i wsp. 2018). Insulina stymuluje również pobór glukozy oraz aminokwasów z krwioobiegu przez mięśnie szkieletowe (Rahman i wsp. 2021). Ponadto insulina, jako hormon odpowiadający za gospodarkę energetyczną wpływa również na magazyn energii w organizmie jakim jest tkanka tłuszczowa. Hormon ten zwiększa intensywność lipogenezy, a obniża intensywność lipolizy, zwiększając tym samym ilość rezerw energetycznych organizmu (Rahman i wsp. 2021). W zdrowym organizmie, ilość wydzielanej insuliny jest odpowiednia do zapotrzebowania energetycznego. Komórki  $\beta$  trzustki są wrażliwe na zmiany w stężeniu glukozy w surowicy i w zależności od poziomu glikemii odpowiadają sekrecją insuliny. W związku z tym glukoza jest ewolucyjnie głównym czynnikiem stymulującym wydzielanie tego hormonu. Większość aminokwasów w fizjologicznych stężeniach nie wpływa znacząco na sekrecję insuliny jednak niektóre pary aminokwasów w stężeniach fizjologicznych lub wyższych mogą zwiększać wydzielanie insuliny stymulowane glukożą - GSIS (*glucose stimulated insulin secretion*). Na przykład sama glutamina nie wpływa na wydzielanie insuliny, jednak w połączeniu z leucyną wzmacnia GSIS. Do związków zmieniających intensywność sekrecji hormonu z komórek  $\beta$  trzustki należą również wolne kwasy tłuszczowe - FFA (*free fatty acids*). Pobudzają między innymi wydzielanie insuliny w przypadku niedoborów tego hormonu przy insulinooporności w przebiegu cukrzycy typu II. FFA regulują też GSIS – wyspy z niedoborami FFA wykazują niewystarczającą intensywność GSIS, którą można podnieść dodając egzogennych wolnych kwasów tłuszczowych (Fu i wsp. 2013, Crespin i wsp. 1969).

#### 4.2.1.2. Glukagon

Wkrótce po odkryciu insuliny Kimball i Murlin wykonali eksperymenty, w których odkryli, że po zaaplikowaniu psom ekstraktu z trzustki zwiększa się stężenie glukozy we krwi. Odpowiedzialną za to substancję nazwali glukagonem, którego nazwa wywodzi się

z wyrażenia „agonista glukozy” (Kimball i Murlin 1923). Podobnie jak insulina glukagon odgrywa istotną rolę w procesach odpowiadających za regulację glikemii zachodzących w wątrobie, jednak działa do insuliny odwrotnie: zwiększa glikogenolizę i glukoneogenezę (Albrechtsen i wsp. 2023). Poza wpływem na zwiększanie glikemii glukagon wpływa również na szereg innych procesów w organizmie. Opisano dotychczas wpływ tego hormonu na stymulację termogenezy w brązowej tkance tłuszczowej (Joel 1966) oraz obniżenie motoryki żołądka i wzmożenie procesów autofagii (Müller i wsp 2017). Ważną rolę w sekrecji glukagonu odgrywają składniki odżywcze. Jednym z ważniejszych, podobnie jak w przypadku insuliny jest glukoza. Działanie glukozy na wydzielanie glukagonu jest jednak odwrotne niż na wydzielanie insuliny: wyższy poziom glikemii zmniejsza sekrecję glukagonu, podczas gdy niższe stężenia glukozy w osoczu powodują jej wzrost. Aminokwasy mają zróżnicowaną skalę wpływu na wydzielanie hormonu z komórek  $\alpha$  trzustki. Arginina, alanina i glutamina są znaczącymi stymulatorami sekrecji glukagonu, podczas gdy leucyna i lizyna oddziałują tak w mniejszym stopniu. Większość badań nad wpływem wolnych kwasów tłuszczowych wykazuje, że krótkotrwała ekspozycja izolowanych wysp trzustkowych, bądź linii komórkowych modelowych dla komórek  $\alpha$  trzustki działa stymulująco na wydzielanie przez nie glukagonu (Marroqui i wsp. 2014).

### 4.3. Cukrzyca

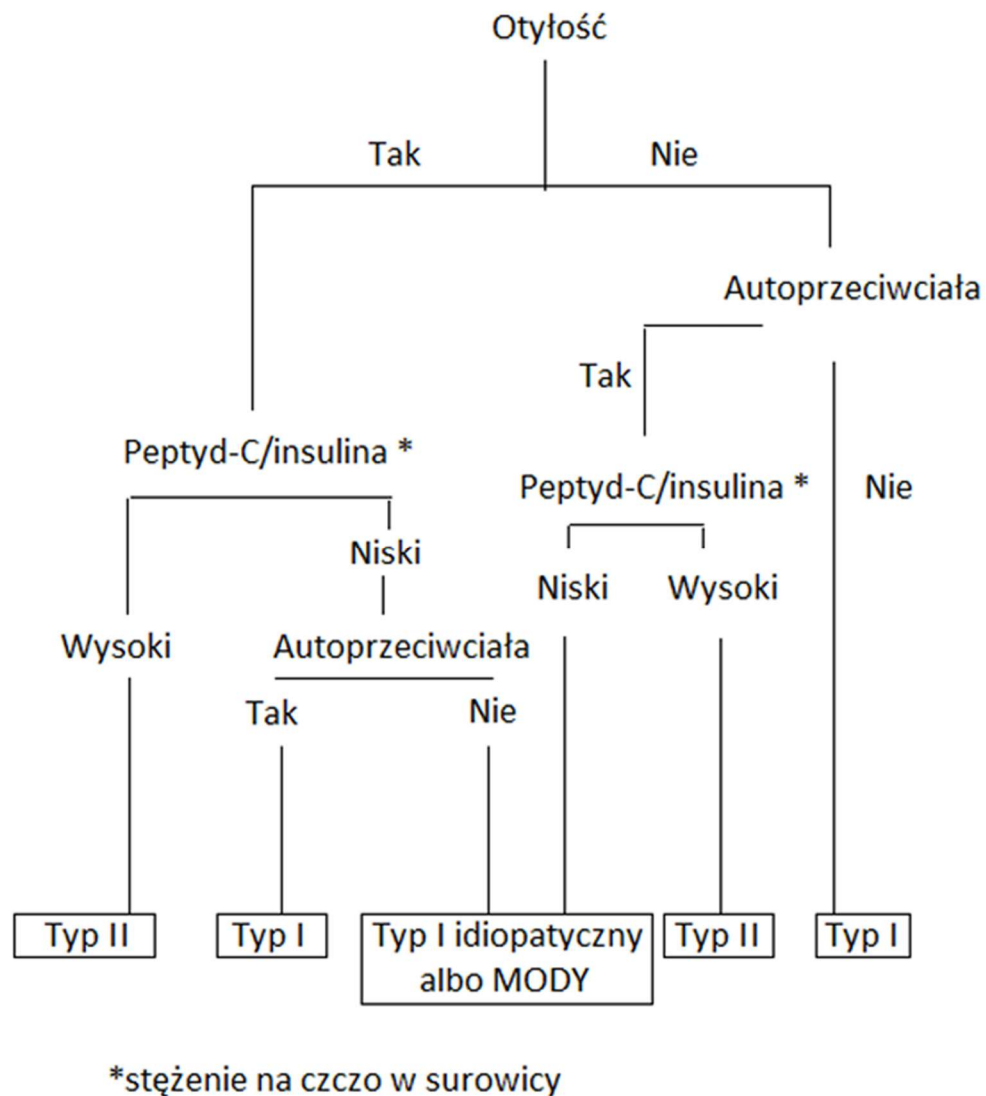
Jednostką chorobową ściśle powiązaną z trzustką jest jedna z chorób cywilizacyjnych, a mianowicie cukrzyca. Szacuje się, że w 2012 roku 346 milionów ludzi na świecie cierpiało na tę chorobę (Scully, 2012). Schorzenie to występuje, gdy mamy do czynienia z zaburzeniem utrzymania i regulacji glikemii, jednakże są różne typy cukrzycy, charakteryzujące się odmienną przyczyną i przebiegiem choroby. Zasadniczo wyróżnia się cukrzycę typu I - T1DM (*type 1 diabetes mellitus*) o podłożu autoimmunologicznym oraz cukrzycę typu II - T2DM (*type 2 diabetes mellitus*) o podłożu wieloczynnikowym (otyłość, dieta, predyspozycje genetyczne), na który składa się ok 90% wszystkich przypadków cukrzycy u dorosłych (Scully, 2012). Cukrzyca typu I dzieli się na kilka rodzajów: autoimmunologiczną, idiopatyczną i podwójną (połączoną z cukrzycą typu II). Typ IA – czyli autoimmunologiczny, o podłożu wielogenowym jest najczęściej występującym typem cukrzycy typu I, który stanowi 80-90% wszystkich przypadków

cukrzyca typu I. Jednym z podtypów tej cukrzycy jest utajona autoimmunologiczna cukrzyca dorosłych LADA (*latent autoimmune diabetes in adults*), która głównie pojawia się w wieku około 35 lat i jest często skojarzona z innymi chorobami o podłożu autoimmunologicznym. Kolejnym wariantem cukrzycy IA jest podtyp „monogenowy”, który powiązany jest z autoimmunologicznym zespołem niedoczynności wieloguczołowej typ IA oraz zespołem IPEX czyli sprzężonym z chromosomem X zespołem dysregulacji immunologicznej, poliendokrynopatii i enteropatii (*immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome*). Typ IB posiada obraz kliniczny taki sam jak typ IA natomiast nie występuje w nim część autoimmunologiczna choroby (Dib i Gomes, 2009).

Kolejnym z typów cukrzycy jest typ MODY (*maturity onset diabetes of the young*). Dziedziczona jest autosomalnie dominująco, najczęściej objawia się w wieku około 25 lat i chorzy często są błędnie diagnozowani jakby mieli cukrzycę typu I lub II. Ten typ cukrzycy jest nieketonowy oraz nie występują tu autoprzeciwciała. Związana jest z dysfunkcją komórek  $\beta$  w trzustce (Hoffman i wsp. 2018).

Cukrzyca typu II wg Światowej Organizacji Zdrowia - WHO (*World Health Organization*) jest przewlekłą chorobą metaboliczną, charakteryzującą się podwyższonym stężeniem glukozy we krwi, która z czasem prowadzi do uszkodzeń serca, naczyń krwionośnych, oczu, nerek oraz nerwów. Typ drugi cukrzycy charakteryzuje się początkowo podwyższoną sekrecją insuliny przez komórki  $\beta$  trzustki wynikającą z obwodowej insulinooporności - IR (*insulin resistance*) oraz niedostateczną kompensacyjną sekrecją insuliny w fazie zaawansowanej (Galicia-Garcia i wsp. 2020). Do przyczyn powstawania choroby można zaliczyć wiele czynników wynikających z niezdrowego trybu życia takich jak: brak wystarczającej ilości aktywności fizycznej, siedzący tryb życia, palenie papierosów czy nadużywanie alkoholu. W 55% przypadków cukrzycy typu II wśród chorych występuje otyłość. Uważa się, że wzrost dziecięcej otyłości na przestrzeni od 1960 do 2000 roku wpłynął na zwiększenie się liczby przypadków cukrzycy typu II u dzieci i osób w wieku dojrzewania. Ponadto istnieją również stany patofizjologiczne, które mogą zwiększyć ryzyko wystąpienia lub zaostrzenia cukrzycy typu II, takie jak: nadciśnienie, podwyższony cholesterol (mieszana hiperlipidemia) oraz zespół metaboliczny (znany również jako zespół X lub zespół Reavena). Ponadto do tej pory opisano szereg genów, które są związane z rozwojem

cukrzyca typu II, a należą do nich między innymi geny: PPARG, SLC30A8, TCF7L2, KCNJ11, FTO, WFS1, CDKAL1, NOTCH2, IGF2BP2, HHEX oraz JAZF1 (Olokoba i wsp. 2012).



Ryc 2. Klasyfikacja cukrzycy (na podst. American Diabetes Association, 2000).

Niniejsza rozprawa doktorska opisuje szereg pionierskich badań podstawowych nad słabo poznanym mitochondrialnym peptydem MOTS-c i jego wpływem na funkcjonowanie trzustki. Eksperymenty przeprowadzono z zastosowaniem modeli linii komórkowych  $\alpha$ TC-1 oraz INS-1E, które reprezentują odpowiednio komórki typu  $\alpha$  oraz  $\beta$  trzustki, natomiast w kolejnym etapie badań wykorzystano izolowane wyspy trzustkowe. Do badań użyto wyspy pozyskane od dwóch modelowych gatunków zwierząt

jakimi są szczur wędrowny - stado niekrewniacze Wistar oraz świnia domowa złotnicka. Badania miały na celu m.in. zbadanie wpływu MOTS-c na sekrecję hormonów takich jak glukagon oraz insulina oraz wpływu na ekspresję genów kodujących te hormony, jak również zweryfikowanie sekrecji i ekspresji MOTS-c pod wpływem wybranych substancji, takich jak: hormony trzustkowe, glukoza i wolne kwasy tłuszczowe. Prezentowane wyniki badań nad MOTS-c są pierwszymi i jedynymi jak do tej pory na świecie gdzie peptyd pochodzenia mitochondrialnego był badany na modelu świni domowej.

## 5. Hipotezy i cele badań

Hipoteza ogólna:

MOTS-c, jako peptyd regulujący homeostazę energetyczną ustroju, wpływa na fizjologię endokrynej części trzustki.

Cel badań:

Podstawowym celem pracy było ustalenie wpływu peptydu MOTS-c na funkcjonowanie komórek  $\alpha$  i  $\beta$  trzustki oraz izolowanych wysp trzustkowych.

W trakcie badań postawiono szczegółowe hipotezy i cele badawcze odnoszące się do poszczególnych eksperymentów celem lepszej weryfikacji postawionych hipotez.

### 5.1. Eksperyment I – badania na komórkach linii $\alpha$ TC-1 i INS-1E

Hipotezy badawcze

- 1) MOTS-c jest obecny w komórkach linii  $\alpha$ TC-1 i INS-1E.
- 2) Hormony trzustki i MOTS-c wpływają wzajemnie na swoją sekrecję oraz ekspresję kodujących je genów w komórkach linii  $\alpha$ TC-1 i INS-1E.
- 3) Wydzielanie MOTS-c oraz jego ekspresja w komórkach linii  $\alpha$ TC-1 i INS-1E zmieniają się pod wpływem substratów energetycznych.
- 4) MOTS-c wpływa na żywotność komórek modelowych linii  $\alpha$ TC-1 i INS-1E.

Cele badań

- 1) Zbadanie obecności MOTS-c w komórkach linii  $\alpha$ TC-1 i INS-1E metodą immunofluorescencji.
- 2) Zbadanie wzajemnego wpływu MOTS-c na sekrecję i ekspresję insuliny oraz glukagonu w komórkach  $\alpha$ TC-1 i INS-1E.
- 3) Określenie wpływu glukozy i wolnych kwasów tłuszczowych na wydzielanie i ekspresję MOTS-c w komórkach  $\alpha$ TC-1 i INS-1E.
- 4) Określenie wpływu MOTS-c na przeżywalność, proliferację i śmiertelność komórek linii  $\alpha$ TC -1 i INS-1E.

## **5.2. Eksperyment II – badania na izolowanych wyspach trzustkowych**

### Hipotezy badawcze

- 1) MOTS-c jest obecny w wyspach trzustkowych szczura i świni.
- 2) Hormony trzustki i MOTS-c wpływają wzajemnie na swoją sekrecję oraz ekspresję kodujących je genów w izolowanych wyspach trzustkowych szczura i świni.
- 3) Wydzielanie MOTS-c oraz jego ekspresja w szczurzych i świńskich wyspach trzustkowych zmieniają się pod wpływem substratów energetycznych.
- 4) MOTS-c wpływa na żywotność komórek izolowanych wysp trzustkowych szczura i świni.

### Cele badań

- 1) Zbadanie obecności MOTS-c w izolowanych wyspach trzustkowych szczura i świni metodą immunofluorescencji.
- 2) Zbadanie wzajemnego wpływu MOTS-c na sekrecję i ekspresję insuliny oraz glukagonu w izolowanych wyspach trzustkowych szczura i świni.
- 3) Określenie wpływu glukozy i wolnych kwasów tłuszczowych na wydzielanie i ekspresję MOTS-c w izolowanych wyspach trzustkowych szczura i świni.
- 4) Określenie wpływu MOTS-c na przeżywalność i śmiertelność komórek izolowanych wysp trzustkowych szczura i świni.

## 6. Materiały i metody

W celu uzyskania możliwie jak najpełniejszego obrazu działania MOTS-c na endokryjne komórki trzustki zastosowano w eksperymentach liczne, uzupełniające się modele badawcze. Były to:

- linia komórkowa  $\alpha$ TC-1 komórek  $\alpha$  syntezująca i uwalniająca glukagon
- linia komórkowa INS-1E komórek  $\beta$  syntezująca i uwalniająca insulinę
- wyspy trzustkowe izolowane od szczurów stada niekrewniaczego Wistar
- wyspy trzustkowe izolowane od prosiąt rasy Żłotnicka biała

### 6.1. Hodowle komórkowe

Hodowle komórek wykorzystanych do przeprowadzenia badań były prowadzone w inkubatorze w temperaturze 37°C oraz 5% zawartości CO<sub>2</sub>. Komórki linii INS-1E zakupiono w Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA), natomiast komórki linii  $\alpha$ TC-1 klon 9 w ATCC (Manassas, VA, USA). Wszystkie składniki pożywek do hodowli oraz eksperymentów zostały zakupione w Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA).

Do hodowli komórek linii INS-1E (Sigma Aldrich, SCC491) używano medium 1640 z Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Corning, NY, USA) z dodatkiem 2 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 2 mM glutaminy, 1% antybiotyku i antymykotyku, 1% pirogronianu sodu, 1% kwasu 4-(2-hydroksyetylo)1-piperazynoetanosulfonowego (HEPES), 10% płodowej surowicy cielęcej bez wolnych kwasów tłuszczowych oraz 0,1%  $\beta$ -merkaptioetanolu. Pożywka w hodowli była wymieniana dwa razy w tygodniu. Pożywka do eksperymentów miała taki sam skład za wyjątkiem zastąpienia 10% płodowej surowicy cielęcej dodatkiem 0,2% albuminy z surowicy bydlęcej pozbawionej wolnych kwasów tłuszczowych. Do eksperymentu badającego wpływ różnych stężeń glukozy użyto pożywki RPMI 1640 bez glukozy i dodano odpowiednie ilości glukozy by uzyskać stężenia 2 mM, 6 mM oraz 16 mM.

Linia komórkowa  $\alpha$ TC1 klon 9 (ATCC, CRL-2350) była hodowana przy użyciu zmodyfikowanej pożywki Dulbecco Eagle (DMEM) z niską zawartością glukozy (Corning, NY, USA). Do pożywki dodano 15 mM HEPES, 0,1 mM roztworu aminokwasów, 10% płodowej surowicy cielęcej, 0,02% albuminy z surowicy bydlęcej wolnej od wolnych kwasów tłuszczowych oraz 1% antybiotyku-antymykotyku. Pożywka w hodowli była wymieniana dwa razy w tygodniu. Pożywka do eksperymentów miała

taki sam skład, jednak bez dodatku 10% płodowej surowicy cielęcej, którą zastąpiono dodatkiem 0,2% albuminy z surowicy bydłowej pozbawionej wolnych kwasów tłuszczowych. Do doświadczeń z różnymi stężeniami glukozy użyto pożywki DMEM bez glukozy, którą następnie dodano by osiągnąć koncentracje 2 mM, 6 mM i 16 mM.

## **6.2. Wpływ MOTS-c na funkcjonowanie linii komórkowych oraz izolowanych wysp trzustkowych**

W każdym z eksperymentów dotyczących wpływu MOTS-c na funkcjonowanie komórek oraz wysp trzustkowych do pożywki eksperymentalnej (komórki) lub bufor Krebsa-Ringera (wyspy) (KRB, 115 mM NaCl, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub> oraz 0,5% BSA) dodano peptyd w stężeniach 1, 10 i 100 nM. Dodatkowo była obecna również grupa kontrolna, w której komórki nie były poddane działaniu MOTS-c. Peptyd MOTS-c użyty do doświadczeń został zakupiony w firmie Novazym (Poznań, Polska). Dla komórek  $\alpha$ TC1 zastosowano MOTS-c myszy o następującej sekwencji aminokwasów: MKWEEMGYIFL, natomiast dla komórek INS-1E zastosowano MOTS-c szczurzy o sekwencji aminokwasów: MKRKEMGYIFFSQRTLRLNPL. Do eksperymentów na wyspach pozyskanych od szczurów użyto peptyd o sekwencji aminokwasowej specyficznej dla tego gatunku, natomiast w eksperymentach na wyspach świńskich wykorzystano sekwencję aminokwasową MOTS-c odpowiednią dla człowieka (MRWQEMGYIFYPRKLR), jako że sekwencja świni pozostaje nieznaną. Decyzja o użyciu w badaniach na świni peptydu ludzkiego, wymuszona brakiem znajomości sekwencji świni, wynikała też z większego podobieństwa genetycznego ludzi i świń niż ludzi i szczurów. Choć człowiek i świnia rozdzieliły się ewolucyjnie wcześniej niż linia prowadząca do gryzoni dzielą obecnie więcej, bo aż 85-90% wspólnych genów.

## **6.3. Barwienie immunofluorescencyjne linii komórkowych**

Komórki przed barwieniem były zanurzone w 4% paraformaldehydzie przez 10 minut, następnie przepłukane 3-krotnie buforem fosforanowym (PBS). Kolejną czynnością była permeabilizacja komórek przy użyciu 1% Triton X-100 w PBS przez 15 minut i następnie kolejne 3x przepłukanie PBS. Następnie blokowano autofluorescencję przy użyciu 0,1% glicyny w PBS przez 15 minut i po której usunięciu komórki były blokowane przy użyciu 2% albuminy z surowicy bydłowej (BSA) w PBS przez 45 minut.

Do procesu barwienia użyto przeciwciał pierwszorzędowych: anty-MOTS-c i anty-MOTS-c wraz z peptydem blokującym i syntetycznym MOTS-c; anty-insulina (w przypadku komórek INS-1E) oraz anty-glukagon (w przypadku komórek  $\alpha$ TC1). Peptyd blokujący (nr kat. MBS543991; MyBioSource, San Diego, CA, USA) rekomendowany do użytego przeciwciała anty-MOTS-c oraz syntetyczny peptyd MOTS-c (Novazym, Poznań, Polska) zostały dodane by zablokować zastosowane przeciwciała i udowodnić jego specyficzność w badanych komórkach. Przeciwciała oraz peptydy blokujące były inkubowane ze sobą przez 48 godzin przed użyciem. Pierwszorzędowe przeciwciała były inkubowane z komórkami przez godzinę w stężeniu 1:400 w PBS z dodatkiem 0,2% żelatyny. Następnie komórki były przepłukane trzykrotnie buforem PBS i dodano przeciwciała drugorzędowe również w stężeniu 1:400 w PBS z dodatkiem 0,2% żelatyny na 15 minut. Następnie wybarwiono jądra komórkowe przy użyciu 4',6-diamidyno-2-fenylindolu (DAPI) przez 1 minutę i wykonano zdjęcia przy użyciu LSM 510 Meta, Axiovert 200 M, AxioCamHR, LD Plan Neofluar 64x/0,75 Korr Ph2 (Zeiss, Oberkochen, Niemcy).

Przeciwciała użyte do barwienia były następujące: anty-insulina, poliklonalne, kawia domowa, nr kat. A0564 (Agilent, Santa Clara, CA, USA); anty-glukagon, poliklonalne, kawia domowa, nr kat. 4031-01F (Merck Millipore, Burlington, MA, USA); anty-MOTS-c, poliklonalne, królik, nr kat. MBS542112 (MyBioSource, San Diego, CA, USA).

Do wykonania barwienia użyto również wymienionych kolejno przeciwciał drugorzędowych: Alexa Fluor 488, kozie, anty-kawia domowa IgG, nr kat. A11073 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) oraz Cy3 kozie, anty-królicze IgG, nr kat A10520 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

#### **6.4. Wydzielanie MOTS-c z linii komórkowych**

Oba rodzaje komórek były inkubowane w płytkach 96 dołkowych z pożywką eksperymentalną z dodatkiem: a) kwasu oleinowego, stearynowego lub palmitynowego w stężeniu 200  $\mu$ M oraz grupa kontrolna bez dodatku żadnego z kwasów, b) 2 mM, 6 mM oraz 16 mM glukozy. Dodatkowo komórki  $\alpha$ TC1 były inkubowane w pożywce eksperymentalnej wzbogaconej o glukagon w stężeniach 1, 10 i 100 nM oraz grupa kontrolna bez dodatku tego hormonu, natomiast komórki INS-1E były poddane inkubacji

w pożywce eksperymentalnej z dodatkiem 1, 10 i 100 mM insuliny oraz grupa kontrolna bez insuliny. Inkubacje trwały po 1,5 godziny.

By określić stężenie MOTS-c w pożywce po eksperymencie użyto testów Rat MOTS-c kit (Sunred, Szanghaj, Chiny) oraz Mouse MOTS-c kit (Sunred, Szanghaj, Chiny) zgodnie z dołączonymi instrukcjami. By znormalizować wyniki wykonano test z bromkiem 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-1-tetrazoliowym (MTT) po każdej inkubacji i otrzymane wyniki zestawiono z wynikami z sekrecji.

### **6.5. Badania nad wydzielaniem MOTS-c z wysp trzustkowych**

Przeprowadzono podobne jak w pkt. 6.4 badania na izolowanych wyspach trzustkowych, które były umieszczone w płytce 48-dołkowej (po 5 wysp na dołek) i były inkubowane przez 1,5 godziny w KRB zamiast w pożywce. Koncentracja MOTS-c w buforze była zmierzona przy pomocy Rat MOTS-c kit oraz Pig MOTS-c kit (SunRed, Szanghaj, Chiny), zgodnie z instrukcjami dołączonymi do zestawu.

### **6.6. Wydzielanie hormonów z linii komórkowych**

Komórki INS-1E były hodowane na płytce 96-dołkowej i inkubowane z MOTS-c przez 1,5 godziny. Po zakończonej inkubacji zmierzono stężenie insuliny w pożywce przy użyciu testu RI-13K (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) zgodnie z dołączoną instrukcją.

Komórki  $\alpha$ TC-1 również były inkubowane z MOTS-c przez 1,5 godziny. Po tym czasie zmierzono koncentrację glukagonu w pożywce przy użyciu testu GL-32K (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) zgodnie z dołączoną instrukcją.

### **6.7. Wydzielanie hormonów z wysp trzustkowych**

Wyizolowane wyspy były inkubowane przez 1,5 godziny w płytce 48-dołkowej z różnymi stężeniami MOTS-c (1 nM, 10 nM i 100 nM lub alternatywnie 10 nM i 100 nM w KRB) oraz grupa kontrolna bez dodatku MOTS-c. Po zakończonej inkubacji stężenia insuliny i glukagonu były mierzone przy pomocy gatunkowo specyficznych testów ELISA. Koncentracje insuliny zostały zmierzone przy użyciu Rat Insulin (INS) ELISA Kit oraz Pig Insulin (INS) ELISA Kit, natomiast stężenia glukagonu przy pomocy Rat Glucagon (GC) ELISA Kit, oraz Pig Glucagon (GC) ELISA Kit (wszystkie testy

zakupiono z firmy SunRed, Szanghaj, Chiny). Testy ELISA zostały wykonane zgodnie z instrukcjami dołączonymi do zestawów.

#### **6.8. Pożywka oraz KRB z dodatkiem wolnych kwasów tłuszczowych**

Przed dodaniem pożywki do hodowli komórkowych, ogrzane wolne kwasy tłuszczowe były dodane do pożywki w stężeniu 200  $\mu$ M. Następnie pożywka była umieszczona w łaźni wodnej w temperaturze 37°C na 3 h by umożliwić sprzęgnięcie wolnych kwasów tłuszczowych z albuminą z surowicy bydlęcej obecną w pożywce. Podobny proces z buforem Krebsa-Ringera poprzedzał analogiczne eksperymenty na wyspach trzustkowych.

#### **6.9. MTT**

Komórki oraz wyspy trzustkowe były inkubowane przez 24 godziny w odpowiednio pożywce i KRB z dodatkiem MOTS-c. Po tym czasie na płytkach 96-dołkowych przeprowadzono test MTT. Roztwór roboczy z 0,05% MTT (Merck, Darmstadt, Niemcy) był dodany do każdego dołka na płytce, która następnie była umieszczona w inkubatorze przez 25 minut. W kolejnym kroku usunięto medium z płytki, a komórki rozpuszczono w 100  $\mu$ l dimetylosulfotlenku (DMSO). Płytkę umieszczono w termomikserze w temperaturze 37°C i mieszano delikatnie przez 5 minut. Następnie zmierzono absorbancję przy długości fali 570 nm oraz dokonano pomiaru tła przy długości 650 nm na Synergy 2 (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

#### **6.10. BrdU**

Komórki były hodowane na płytkach 96-dołkowych i inkubowane z dodatkiem MOTS-c przez 24 godziny. Po zakończonej inkubacji dodano 5-bromo-2'-deoksyurydynę (BrdU) i przeprowadzono test przy użyciu zestawu Cell Proliferation ELISA, BrdU (kolorymetryczny) (Roche, Basel, Switzerland) zgodnie z dołączoną instrukcją.

#### **6.11. Śmiertelność komórek**

Komórki oraz izolowane wyspy trzustkowe były inkubowane z dodatkiem peptydu MOTS-c na płytkach 96-dołkowych. By zbadać śmiertelność komórek użyto testu Cell

Death Detection ELISA Plus (Roche, Basel, Switzerland) zgodnie z instrukcją dołączoną do zestawu.

#### **6.12. Ekstrakcja RNA, odwrotna transkrypcja i reakcja PCR**

Komórki oraz wyspy trzustkowe inkubowano z MOTS-c przez 24 godziny w 12-dolkowych płytkach. Następnie wyizolowano RNA przy użyciu Extrazolu zakupionego w BLIRT (Gdańsk, Polska) w przypadku komórek oraz TRIzolu w przypadku wysp zgodnie z protokołami izolacji dołączonymi do instrukcji.

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono używając High Output cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) zgodnie z instrukcją dołączoną do zestawu.

Odczynnikiem użytym podczas reakcji łańcuchowej polimerazy był HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne OÜ, Tartu, Estonia). Reakcja była przeprowadzona w QuantStudio™ 12 K Flex System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Reakcja PCR dla prób z linii komórkowych była przeprowadzona w objętości 10 µl, zawierającej 5 µl HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus, 2 µl zestawu primerów (w stężeniu 2,5 µM) oraz 3 µl cDNA. Warunki reakcji PCR były następujące: denaturacja wstępna w temperaturze 95°C przez 10 min, kolejno 40 cykli denaturacji w 95°C przez 15 s, przyłączanie starterów w 60°C przez 1 min. oraz wydłużanie w 72°C przez 20 s. Następnie przeprowadzono analizę krzywej topnienia w następujących krokach 95°C przez 15 sekund, 60°C przez 60 s oraz 95°C przez 15 s.

Reakcja PCR dla prób z wysp trzustkowych została przeprowadzona w warunkach takich jak w przypadku badań dotyczących linii komórkowych, jednak ze zmienioną temperaturą przyłączania na 61°C.

Gen	Starter Forward	Starter Reverse
<b>Szczur</b>		
Insulina	CCAGTTGGTAGAGGGAGCAG	AGACCATCAGCAAGCAAGCGGTC
Receptor insuliny	CAGAAAAACCTCTTCAGGCAAT	TTCAAGGGATCTTCGCTTTC
Glukagon	AAGATGGTTGTGAATGGTGAAA	TGAGATGAACACGATTCTCGAT
Receptor glukagonu	TTCTGTTGCAGACCAGCTCA	GTGACCAGTGCCACCACA
GAPDH	CTGCACCACCAACTGCTTAG	TGATGGCATGGACTGTGG
<b>Mysz</b>		
Glukagon	CAGAAAAACCTCTTCAGGCAAT	TTGCACCAGCATTATAAGCAA
Receptor glukagonu	GATCCGAGTACGCTCGAGGA	GTTGTGGTGGCATTGGTCAC
GAPDH	ATGGTG AAGGTCCGGTGTGA	AATCTCCACTTTGCCACTGC
<b>Świnia</b>		
Insulina	GTGGCATCGTGGAGCAGT	CGGCCTAGTTGCAGTAGTTCTC
Receptor insuliny	AACGCCAGGGACATCGTCAA	CTTTGGACACCACCCCCAGG
Glukagon	CATCAGCCACTGCACAAAAT	AGGGCACGTTTACCAGTGAC
Receptor glukagonu	GTCACGAAGGCAAACACCAC	CTGCCCTGGTACCACAAAGT
TBP	TTGAGAACATCTACCCTATCC	CGTCCACAACACCACCATT

Tabela 2. Sekwencje starterów użytych w reakcjach PCR (5'-3')

### 6.13. Izolacja białka

Komórki były inkubowane z MOTS-c w 6-dołkowych płytkach., a wyspy w płytkach 12 dołkowych przez 24 godziny. Następnie zostały zebrane przy użyciu buforu RIPA (*radioimmunoprecipitation assay buffer*) z dodatkiem inhibitorów proteaz. Lizat został wymieszany i zwirowany dwukrotnie w miniwirówce oraz umieszczony w termomikserze w 4°C, gdzie był mieszany przy prędkości 900 rpm przez 10 minut. Po upływie tego czasu próbówki były wirowane przy prędkości 13000 x g przez 10 minut. Otrzymany supernatant zawierający białko został przeniesiony do nowych probówek i została zmierzona koncentracja białka przy użyciu testu Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

### 6.14. Western blot

Równe objętości białka wraz z dodatkiem Laemmli i  $\beta$ -merkaptoetanolu zostały rozdzielone podczas elektroforezy w żelu zawierającym 12% poliakrylamid w obecności

buforu SDS-PAGE, a następnie przeniesione na membranę PVDF (Roche, Bazylea, Szwajcaria). By uniknąć niespecyficznych wiązań membrana została zablokowana przy użyciu 3% roztworu albuminy surowicy bydlęcej. Kolejno inkubowano membranę przez całą noc w 4°C z przeciwciałami pierwszorzędowymi: anty-MOTS-c, anty-receptor insuliny, anty-receptor glukagonu w rozcieńczeniu 1:1000.

Po zakończeniu inkubacji membrana została przepłukana trzykrotnie przy użyciu buforu TBST i umieszczona w roztworze przeciwciała drugorzędowego (anty-królicze) w rozcieńczeniu 1:5000 przez 1,5 godziny. Po kolejnym płukaniu za pomocą TBST, sygnał z membrany został zwizualizowany przy pomocy Super Signal™ West Pico PLUS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Następnie membrana była inkubowana z przeciwciałem anty- $\beta$ -aktyna przez całą noc w 4°C, przepłukana TBST i inkubowana z przeciwciałem drugorzędowym (anty-mysie) przez 1 godzinę. Sygnał był zwizualizowany za pomocą Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Proces wizualizacji był wykonany w urządzeniu ChemiDoc MP Imaging system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Przeciwciała pierwszorzędowe oraz peptyd blokujący użyte w tej metodzie były następujące: anty-MOTS-c, poliklonalne królicze, nr kat MBS542112 (MyBioSource, San Diego, CA, USA), peptyd blokujący nr kat MBS543991 MyBioSource, San Diego, CA, USA anty-receptor insuliny region środkowy, poliklonalne królicze, nr kat MBS3205807 (MyBioSource, San Diego, CA, USA), anty-receptor glukagonu, poliklonalne, królik, nr kat. OAAF04902 (Aviva Systems Biology, San Diego, CA, USA), anty- $\beta$ -aktyna (nr kat. A1978, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Użyto następujących przeciwciał drugorzędowych: anty-królicze IgG, nr kat. 7074P2 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), anty-mysie IgG, nr kat A2304 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA).

#### **6.15. Zwierzęta wykorzystane do badań**

Samce szczurów niekrewniaczego stada Wistar zostały zakupione w Zwierzętarni Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk. Prosięta świni Złotnickiej białej ważące 7-8 kg zostały zakupione z Gospodarstwa Doświadczalnego Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu (Swadzim). Wszystkie czynności na zwierzętach zostały przeprowadzone zgodnie z polskim prawem.

Zwierzęta wykorzystano jedynie do pośmiertnego pozyskania tkanek nie wykonując na nich żadnych procedur.

#### **6.16. Izolacja wysp trzustkowych - szczur**

Samce szczurów Wistar zostały poddane dekapitacji i skrwawieniu, następnie przystąpiono do procedury pozyskania wysp trzustkowych. Otwarto jamę otrzewnej i założono zaciski na dwunastnicy na ujściu przewodu trzustkowego. Przewód trzustkowy został nacięty i wprowadzono kaniulę. Przez przewód dokonano iniekcji do trzustki 13 ml buforu Hanksa (HBSS, 0,137 M NaCl, 5,37 mM KCl, 4,17 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,26 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,84 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, i 0,34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) zawierającego 13 jednostek Wunsch'a Liberazy TL (nr kat. 05401012001, Roche, Bazylea, Szwajcaria). Następnie wycięto trzustkę i przeniesiono do próbówki typu Falcon, którą umieszczono w łaźni wodnej w temp. 37°C na 11 minut. Po zakończonej inkubacji próbkę energicznie wstrząsano przez 30 sekund. Trawienie enzymatyczne zatrzymano przez dodanie HBSS z dodatkiem 10% surowicy płodowej bydlęcej (FBS). Obserwując powstały roztwór przy użyciu binokularu stereoskopowego (Delta Optical, Poznań, Polska) wyspy trzustkowe ręcznie przenoszono do buforu Krebsa-Ringera (KRB, 115 mM NaCl, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub> oraz 0,5% BSA) zawierającego glukozę w stężeniu 6 mM. Przed dalszymi eksperymentami wyspy umieszczono w inkubatorze w 37°C i stężeniu CO<sub>2</sub> wynoszącym 5% na 1,5 godziny celem regeneracji. Na izolację RNA oraz białka w każdym eksperymencie zostało zebrane po około 50 wysp. Do izolacji RNA wyspy zostały zamrożone w 500 µl TRIzol (nr kat. 15596026, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), natomiast do izolacji białka zebrane wyspy zamrożono w 50 µl RIPA (nr kat. 20-188, Merck Millipore, Burlington, MA, USA). Probówki z materiałem były przechowywane w temperaturze -80°C do czasu dalszych czynności.

#### **6.17. Izolacja wysp trzustkowych – świnia**

Wyspy trzustkowe były izolowane ze świń rasy Złotnicka biała przez enzymatyczne trawienie trzustki. Zwierzęta zostały uśmiercone przez przedawkowanie anestetyków i środków znieczulających (metedomidyna 200 µg/kg masy ciała oraz ketamina 40 mg/kg masy ciała), następnie skrwawione przez punkcję serca. Trzustka została wycięta i

umieszczona w buforze HBSS. Do dalszej izolacji pobrano ok 2 g narządu i umieszczono w probówce typu Falcon zawierającej 10 ml HBSS i pocięto nożyczkami na drobne kawałki. Do roztworu dodano kolagenazę P (nr kat. 11213873001, Roche, Bazylea, Szwajcaria) w ilości 1 U/ml, aby rozpocząć trawienie enzymatyczne. Probówkę umieszczono w łaźni wodnej w temp. 37°C na 12 minut, a po upływie tego czasu wyjęto i energicznie potrząsano przez 1 minutę. Działanie enzymu trawiącego zatrzymano przez dodanie do 90 ml HBSS z dodatkiem 10% FBS. Tkanka została przepłukana, i obserwując ją pod binokulem stereoskopowym (Delta Optical, Poznań, Polska), wyspy trzustkowe ręcznie przenoszono do KRB zawierającego 6 mM glukozy. Podobnie jak w przypadku wysp szczurzych, świńskie wyspy umieszczono w inkubatorze na 1,5 godziny celem regeneracji. Zebrano po około 50 wysp do izolacji RNA oraz białka. Do izolacji RNA wyspy zostały zamrożone w 500 µl TRIzol (nr kat. 15596026, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), natomiast do izolacji białka zebrane wyspy zamrożono w 50 µl RIPA (nr kat. 20-188, Merck Millipore, Burlington, MA, USA). Probówki z materiałem były przechowywane w temperaturze -80°C do czasu dalszych czynności.

#### **6.18. Barwienie immunofluorescencyjne wysp trzustkowych**

Wycięte fragmenty trzustki szczura i świni zostały umieszczone w odczynniku Bouina (150 ml kwasu pikrynowego, 50 ml formaldehydu, 10 ml kwasu octowego, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Następnie tkanki zatopiono w parafinie i pokrojono na skrawki grubości 5 µm przy użyciu mikrotonu. Parafina została usunięta przez podgrzewanie szkiełek ze skrawkami do 60°C przez 45 min. Następnie próbki zostały uwodnione w szeregu stężeń alkoholu (100%, 85%, 70%, 60%, 50%, woda). Dodatkowe uwidocznienie antygenów odbyło się przez gotowanie skrawków w buforze cytrynianowym (pH 6, 10 mM cytrynian dwusodowy i 0,05% Tween-20) 3 x 5 minut i chłodzenie przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Kolejno próbki były przepłukiwane wodą przez 5 minut. Fragmenty tkanek na szkiełku obrysowano Dako Pen by utrzymać dalsze reagenty podczas inkubacji.

Celem redukcji autofluorescencji próbki były inkubowane w 15 mM roztworze glicyny przez 5 min, płukane PBS, inkubowane w roztworze 0,2% żelatyny oraz kolejny raz płukane PBS. Podano następnie przeciwciała pierwszorzędowe: anti-MOTS-c, w stężeniu 1:200 (bez oraz z dodatkiem 100 µl peptydu blokującego w stężeniu 2,5 mg/ml);

anty-insulinę w stężeniu 1:400 oraz anty-glukagon w stężeniu 1:400 w PBS z dodatkiem 0,2% żelatyny. Skrawki były inkubowane z przeciwciałami pierwszorzędowymi przez całą noc. Dodatkowo przeciwciało anty-MOTS-c inkubowało się z peptydem blokującym przez 48 godzin przed wykonaniem barwienia. Po zakończonej inkubacji próbki zostały przepłukane i inkubowane w PBS z dodatkiem 0,2% żelatyny przez 1 godzinę. Przeciwciała drugorzędowe zostały podane na próbkę w stężeniu 1:400 w PBS z 0,2% żelatyny na 15 minut. Ostatnim etapem było barwienie jąder komórkowych przy użyciu DAPI przez 1 minutę. Zdjęcia zostały wykonane przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Leica DMI8 (aparat Leica K5-14403549, 16 bitów, 2048 pikeli, oprogramowanie LAS X, obiektyw HC PL FLUOTAR L 20x/0,40 DRY, apertura 0,4). Przeciwciała i peptyd blokujący użyte w procesie barwienia były następujące: anty-MOTS-c, królik, poliklonalne (nr kat. MBS542112, MyBioSource, San Diego, CA, USA); peptyd blokujący nr kat MBS543991 MyBioSource, San Diego, CA, USA; anty-insulina, poliklonalne, kawia domowa (nr kat. A0564, Agilent, Santa Clara, CA, USA) oraz anty-glukagon, poliklonalne, kawia domowa, nr kat 4031-01F, Merck Millipore, Burlington, MA, USA). Wykorzystano również następujące przeciwciała drugorzędowe: Alexa Fluor 488, kozie, anty-kawia domowa, IgG (nr kat. A11073, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) oraz Cy3, kozie, anty-królik IgG (nr kat. A10520, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

### **6.19. Analiza statystyczna**

Wszystkie analizy zostały wykonane przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Wyniki zostały przedstawione jako średnia arytmetyczna  $\pm$  SEM. Istotność różnic została sprawdzona przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) wraz z testem post hoc Dunnetta, porównując wyniki z grupą kontrolną. Dodatkowo gdy porównywano wszystkie grupy ze sobą (w przypadku eksperymentu z różnymi stężeniami glukozy, gdzie nie ma klasycznej kontroli bez glukozy) wykonano test post hoc Tukeya. Istotność statystyczna oznaczono jako \* dla  $p < 0,05$  oraz \*\* dla  $p < 0,01$ .

## 7. Wyniki

Szczegółowe wyniki oraz wykresy dotyczące badań wpływu peptydu MOTS-c na trzustkowe linie komórkowe INS-1E i  $\alpha$ TC-1 oraz izolowane wyspy trzustkowe zawarte są w publikacjach:

- 1) Linie komórkowe: Jakub Bień, Ewa Pruszyńska-Oszmałek, Paweł Kołodziejcki, Dawid Szczepankiewicz, Maciej Sassek. MOTS-c regulates pancreatic alpha and beta cell functions *in vitro*.
- 2) Wyspy trzustkowe: Jakub Bień, Ewa Pruszyńska-Oszmałek, Paweł Kołodziejcki, Natalia Leciejewska, Dawid Szczepankiewicz, Emilia Grzęda, Maciej Sassek. MOTS-c modulates pancreatic islet function in rats and pigs *in vitro*.

### 7.1. MOTS-c jest obecny w komórkach INS-1E oraz $\alpha$ TC-1

Barwienie immunofluorescencyjne wykazało obecność peptydu MOTS-c w komórkach obu badanych linii: INS-1E oraz  $\alpha$ TC-1 (Fig. 1 a, g). Inkubacja wraz z peptydem blokującym spowodowała zanik specyficznego sygnału MOTS-c (Fig. 1 b, h). Dodatkowo wykonano barwienie ukazujące obecność insuliny (w komórkach INS-1E) oraz glukagonu (w komórkach linii  $\alpha$ TC-1) (Fig. 1 e, k). Nałożone obrazy z tego eksperymentu pokazują kolokalizację MOTS-c wraz z wyżej wymienionymi hormonami w liniach komórkowych reprezentujących komórki endokrynne trzustki (Fig. 1 f, l).

### 7.2. Insulina i glukagon zwiększają sekrecję i ekspresję MOTS-c w komórkach INS-1E oraz $\alpha$ TC-1

Inkubacja komórek INS-1E z insuliną w stężeniu 10 nM przez 1,5 godziny spowodowała istotne zwiększenie sekrecji MOTS-c do medium w porównaniu z grupą kontrolną (Fig. 2 a). Ponadto ekspresja MOTS-c na poziomie białka była istotnie wyższa w komórkach inkubowanych przez 24 godziny z insuliną w stężeniu 10 nM oraz 100 nM w porównaniu do grupy bez dodatku tego hormonu (Fig. 2 b).

Podobne wyniki otrzymano w badaniu wpływu glukagonu na sekrecję i ekspresję MOTS-c w komórkach  $\alpha$ TC-1. Po 1,5 godzinie inkubacji z glukagonem w stężeniu 10 nM, zaobserwowano istotny wzrost stężenia MOTS-c w porównaniu z grupą kontrolną (Fig. 2 c). Dodatkowo ekspresja MOTS-c na poziomie białka wzrosła istotnie w komórkach

inkubowanych przez 24 godziny z glukagonem w stężeniach 10 nM i 100 nM w porównaniu z komórkami inkubowanymi w pożywce bez glukagonu (Fig. 2 d).

### **7.3. MOTS-c wpływa na ekspresję i sekrecję insuliny i glukagonu oraz ich receptorów**

Po przeprowadzeniu eksperymentu, w którym komórki INS-1E były inkubowane z MOTS-c przez 1,5 godziny zaobserwowano spadek sekrecji insuliny w grupie ze stężeniem 10 nM MOTS-c (Fig. 3 a). Co więcej, ekspresja genu insuliny była obniżona w komórkach, które były inkubowane z MOTS-c w stężeniach 10 nM oraz 100 nM (Fig. 3 b). Po 24 godzinnej inkubacji komórek INS-1E z MOTS-c w stężeniu 100 nM zaobserwowano wzrost ekspresji genu receptora insuliny (Fig. 3 c), jednakże na poziomie białka ekspresja receptora insuliny była wyższa w komórkach inkubowanych z MOTS-c w stężeniu 10 nM (Fig. 3 d).

Podobne badanie przeprowadzone na komórkach  $\alpha$ TC-1, sprawdzające wpływ MOTS-c na sekrecję i ekspresję glukagonu oraz jego receptora wykazało działanie stymulujące sekrecję tego hormonu po inkubacji komórek z MOTS-c w stężeniu 100 nM przez 1,5 godziny (Fig. 3 e). Ekspresja mRNA glukagonu wzrosła również przy inkubacji komórek w obecności MOTS-c w stężeniu 100 nM przez 24 godziny (Fig. 3 f). Nie wykazano natomiast wpływu MOTS-c na ekspresję receptora glukagonu (Fig. 3 g, h).

### **7.4. Sekrecja i ekspresja genu MOTS-c zmienia się w zależności od stężenia glukozy w pożywce**

Po inkubacji komórek INS-1E przez 1,5 godziny w pożywkach z glukozą w stężeniach 2 mM, 6 mM i 16 mM zaobserwowano wzrost wydzielania MOTS-c przez komórki inkubowane z glukozą w stężeniu 2 mM w porównaniu do komórek z grupy z glukozą w stężeniu 16 mM (Fig. 4 a). Ponadto wykazano różnice w ekspresji MOTS-c na poziomie białka w komórkach inkubowanych przez 24 godziny z glukozą w stężeniu 2 mM w porównaniu do tych inkubowanych z glukozą w stężeniu 6 mM (Fig. 4 b).

W analogicznym eksperymencie z komórkami  $\alpha$ TC-1 zaobserwowano wzrost wydzielania MOTS-c w komórkach inkubowanych z glukozą 2 mM oraz 16 mM w porównaniu do grupy inkubowanej z glukozą 6 mM (Fig. 4 c). Po zbadaniu ekspresji MOTS-c w komórkach  $\alpha$ TC-1 wyniki wskazują na wzrost ekspresji w grupie

inkubowanej z 2 mM glukozą w porównaniu do komórek inkubowanych z glukozą 6 mM (Fig. 4 d).

#### **7.5. Wolne kwasy tłuszczowe zwiększają wydzielanie MOTS-c z komórek INS-1E, ale obniżają w komórkach $\alpha$ TC-1**

Po 1,5 godzinie inkubacji komórek INS-1E z kwasem oleinowym i stearynowym zaobserwowano wzrost sekrecji MOTS-c w porównaniu z grupą kontrolną (Fig. 5 a). W przypadku komórek  $\alpha$ TC-1 obserwowany efekt był odwrotny. Każdy z użytych w doświadczeniu kwasów (oleinowy, palmitynowy oraz stearynowy) spowodował spadek wydzielania MOTS-c przez komórki w porównaniu z grupą kontrolną (Fig. 5 c). Po zbadaniu ekspresji MOTS-c na poziomie białka zaobserwowano jej obniżenie w przypadku inkubacji z kwasem stearynowym w eksperymentach z wykorzystaniem obu linii komórkowych (Fig. 5 b, d).

#### **7.6. MOTS-c zwiększa żywotność komórek INS-1E oraz obniża żywotność komórek $\alpha$ TC-1**

Po 24 godzinnej inkubacji z MOTS-c, zaobserwowano wzrost żywotności komórek INS-1E w grupie ze stężeniem 100 nM peptydu w porównaniu z grupą kontrolną (Fig. 6 a), natomiast w doświadczeniu na komórkach  $\alpha$ TC-1 wykazano spadek żywotności w grupie z 10 nM MOTS-c w porównaniu z grupą kontrolną (Fig. 6 b).

#### **7.7. MOTS-c obniża proliferację komórek $\alpha$ TC-1, ale nie wpływa na proliferację komórek INS-1E**

Po dobie inkubacji komórek  $\alpha$ TC-1 z dodatkiem 100 nM MOTS-c zaobserwowano spadek proliferacji względem grupy kontrolnej (Fig. 6 d). W doświadczeniu na komórkach INS-1E nie zaobserwowano istotnych różnic między grupami (Fig. 6 c).

#### **7.8. MOTS-c wpływa na obniżenie apoptozy komórek INS-1E oraz $\alpha$ TC-1**

Po całodobowej inkubacji komórek obu linii z MOTS-c wykazano spadek apoptozy w porównaniu z grupą kontrolną. W przypadku komórek INS-1E zmiany zaobserwowano w grupach z MOTS-c w stężeniach 10 oraz 100 nM, natomiast w doświadczeniu z

komórkami  $\alpha$ TC-1, spadek obserwowany był tylko w grupie z MOTS-c w stężeniu 10 nM (Fig. 6 e, f).

### **7.9. Przeciwciało anti-MOTS-c jest specyficzne dla świńskiego MOTS-c**

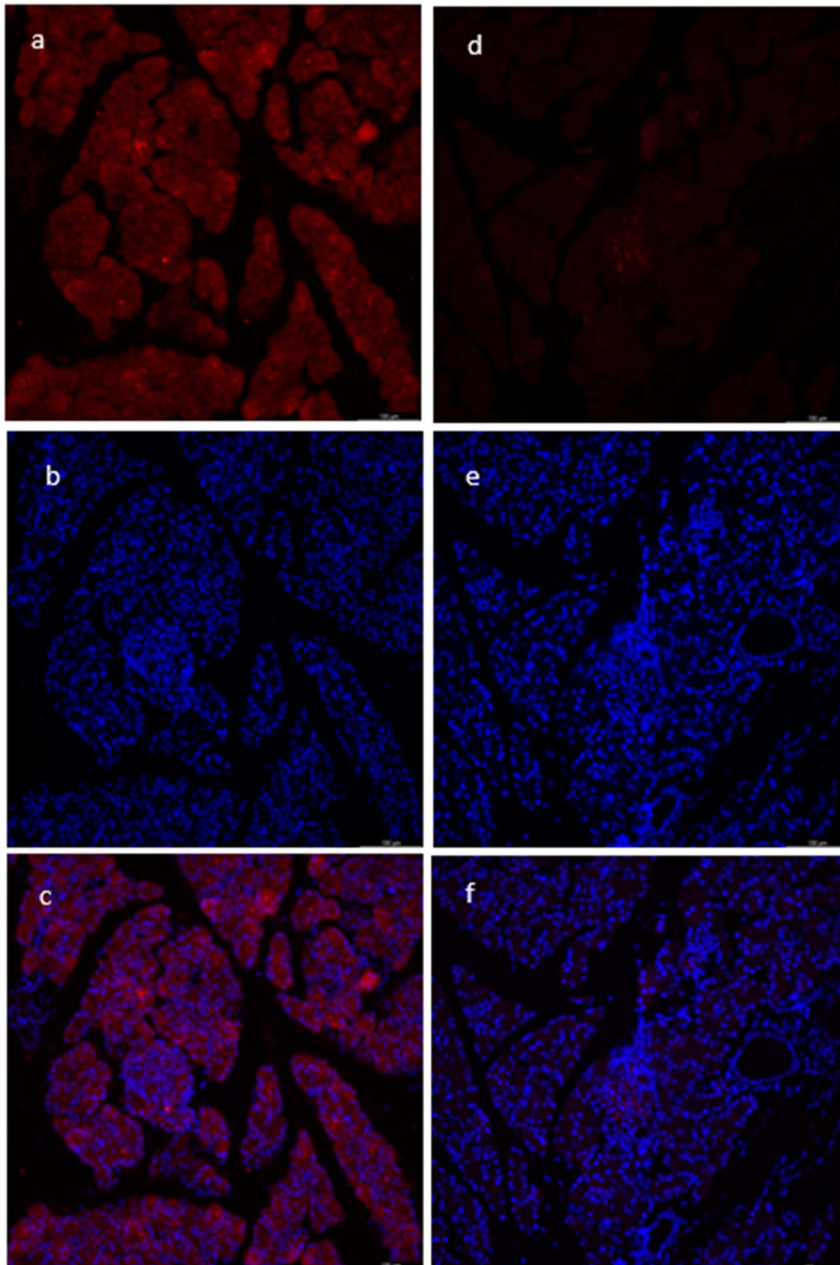
W celu potwierdzenia specyficzności przeciwciała anti-MOTS-c dla peptydu badanego gatunku (świni) przeprowadzono analizę Western Blot używając trzustek pozyskanych od szczura i świni (Fig. 1). Na membranie inkubowanej z przeciwciałem anti-MOTS-c był jeden wyraźny sygnał w próbce pochodzącej od szczura oraz jeden w próbce pochodzącej od świni. Sygnały te zanikły gdy przeciwciało było preinkubowane z peptydem blokującym MOTS-c dedykowanym do tego przeciwciała, co potwierdziło specyficzność tego przeciwciała. Co ciekawe, sygnały MOTS-c na każdej z linii pojawiły się na różnych wysokościach, co świadczy o różnej masie cząsteczkowej tego peptydu między badanymi gatunkami. Taka obserwacja sugeruje inną sekwencję aminokwasową i/lub strukturę przestrzenną tego peptydu. Prawdopodobnie związane jest to z tworzeniem złożonych oligomerów MOTS-c u świni. Z uwagi na podobną masę cząsteczkową świńskiego MOTS-c do  $\beta$ -aktyny, w przypadku eksperymentów na świni jako białka referencyjnego w metodzie Western Blot użyto GAPDH.

### **7.10. MOTS-c jest obecny w szczurzych i świńskich wyspach trzustkowych**

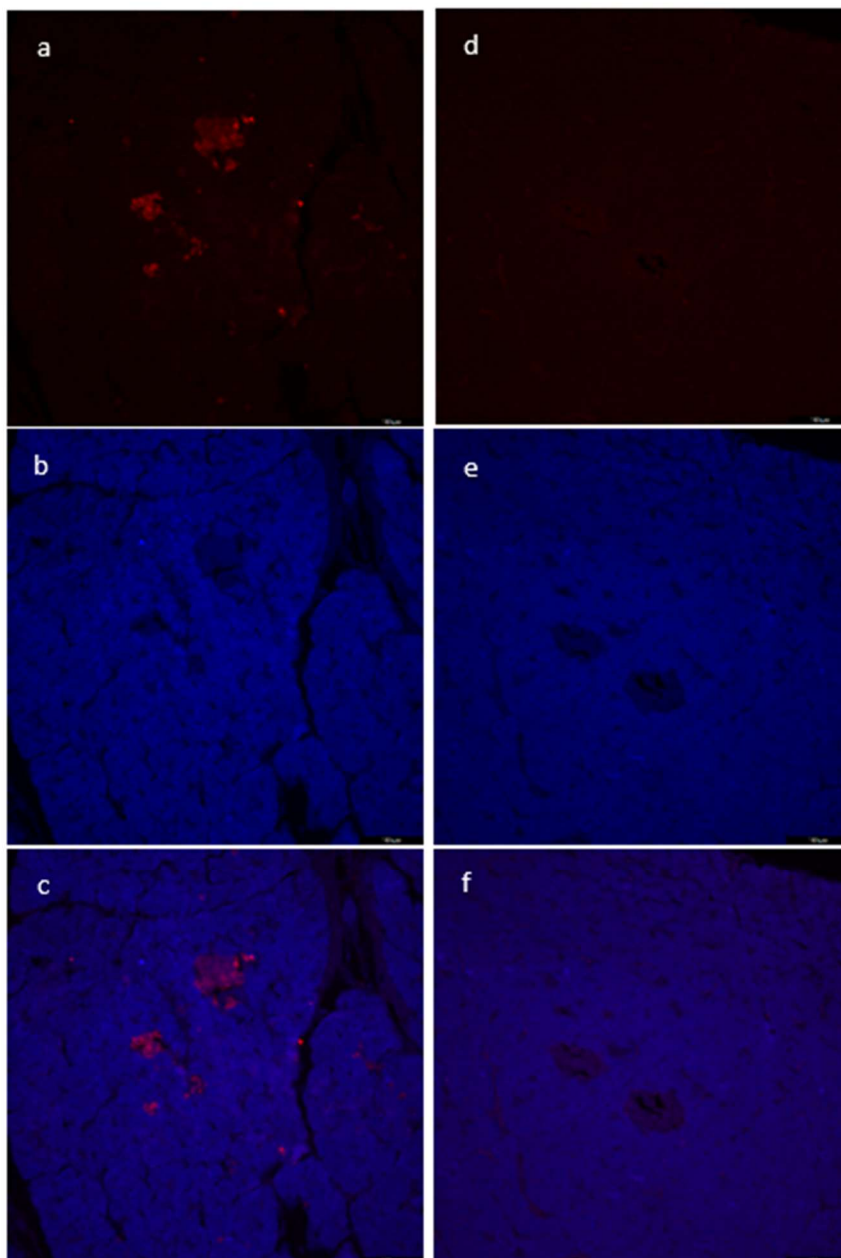
Z uwagi na błąd edytorski, którego mimo stosownej korespondencji z wydawnictwem nie udało się poprawić, wyniki dotyczące barwienia immunofluorescencyjnego zostaną omówione tu wraz z zamieszczeniem fotografii i ich prawidłowych opisów.

Barwienie immunofluorescencyjne izolowanych wysp trzustkowych potwierdziło obecność MOTS-c u obu badanych gatunków (Ryc. 3 a i 4 a). Specyficzność tego sygnału została potwierdzona poprzez wykorzystanie preinkubacji przeciwciała z peptydem blokującym (Ryc. 3d i 4d). Dodatkowo przeprowadzono barwienie insuliny oraz glukagonu obecnego w wyspach, aby sprawdzić kolokalizację MOTS-c z tymi hormonami (Ryc. 5 d, h; 6 d, h). W szczurzej wyspie MOTS-c został wykryty w trzustce zarówno w części egzokrynnej i endokrynnej, natomiast u świni MOTS-c znajdował się jedynie w wyspach trzustkowych, czyli endokrynnej części tego narządu. Kolokalizacja tego peptydu wykazała u szczura, że MOTS-c nie jest produkowany przez specyficzne komórki, natomiast znajduje się w komórkach wydzielających zarówno insulinę jak i

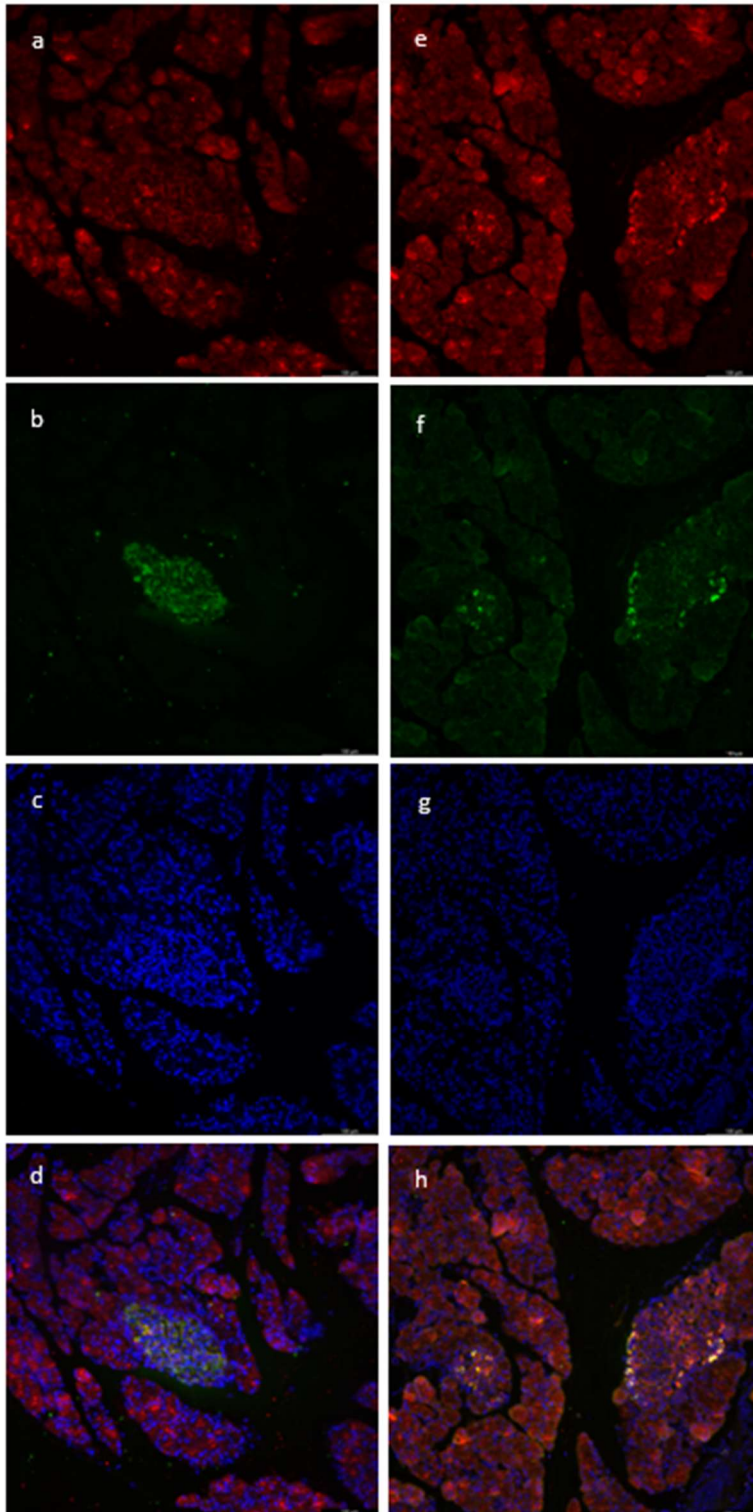
glukagon. U świni również stwierdzono kolokalizację MOTS-c z powyższymi hormonami, jednak u tego gatunku, obecność MOTS-c jest zarejestrowano tylko w komórkach wysp trzustkowych, i to nie we wszystkich, które produkują w tej strukturze insulinę lub glukagon.



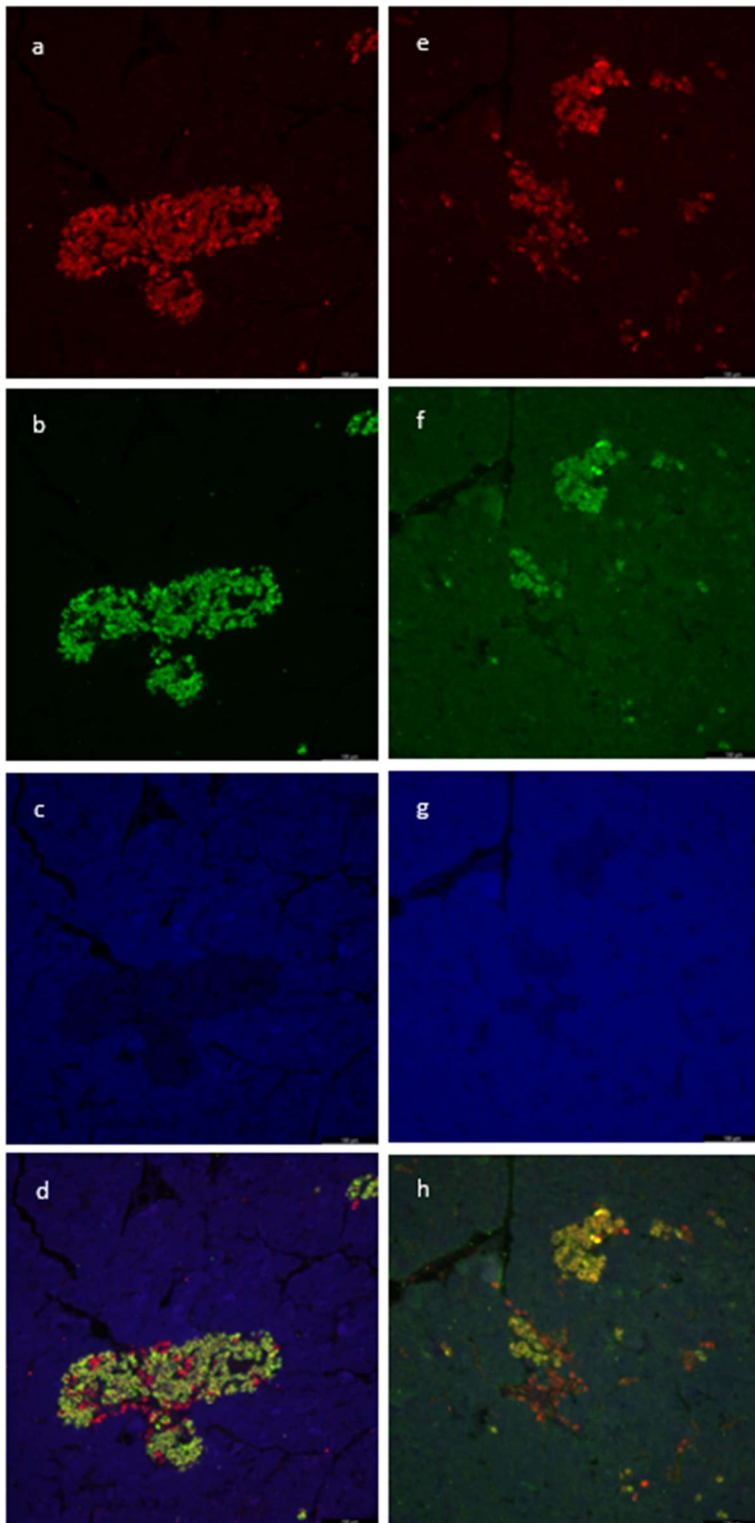
Ryc. 3 Barwienie immunofluorescencyjne trzustki szczura: a) MOTS-c w wyspie trzustkowej szczura, b) barwienie DAPI, c) nałożone obrazy a i b, d) zanikający sygnał MOTS-c po użyciu peptydu blokującego, e) barwienie DAPI, f) nałożone obrazy d i e.



Ryc 4. Barwienie immunofluorescencyjne trzustki świni a) MOTS-c w wyspie trzustkowej świni, b) barwienie DAPI, c) nałożone obrazy a i b, d) zanikający sygnał MOTS-c po użyciu peptydu blokującego, e) barwienie DAPI, f) nałożone obrazy d i e.



Ryc 5. Barwienie immunofluorescencyjne trzustki szczura: a) MOTS-c b) insulina, c) barwienie DAPI, d) kolokalizacja MOTS-c i insuliny, e) MOTS-c, f) glukagon, g) barwienie DAPI, h) kolokalizacja MOTS-c i glukagonu.



Ryc 6. Barwienie immunofluorescencyjne trzustki świni: a) MOTS-c b) insulina, c) barwienie DAPI, d) kolokalizacja MOTS-c i insuliny, e) MOTS-c, f) glukagon, g) barwienie DAPI, h) kolokalizacja MOTS-c i glukagonu.

### **7.11. Składniki pokarmowe oraz hormony trzustkowe zmieniają ekspresję oraz sekrecję MOTS-c ze szczurzych wysp trzustkowych**

Po inkubacji szczurzych wysp trzustkowych z dodatkiem glukozy w stężeniu 2 mM zaobserwowano zwiększenie sekrecji MOTS-c, jednak nie wykazano zmian w intensywności ekspresji na poziomie białka (Fig. 6 a, b). Dodatek wolnych kwasów tłuszczowych do buforu, w którym były inkubowane wyspy trzustkowe szczura nie wpłynął na zmiany w sekrecji oraz ekspresji MOTS-c (Fig. 6 c, d). Istotne zmiany nastąpiły natomiast po inkubacji wysp z dodatkiem insuliny, w każdej z badanych grup wykazano wzrost sekrecji MOTS-c. Ponadto zaobserwowano wzrost ekspresji MOTS-c na poziomie białka w wyspach inkubowanych z insuliną w stężeniu 100 nM (Fig. 6 e, f). Inkubacja z dodatkiem glukagonu wykazała znaczący wzrost sekrecji MOTS-c w grupie z glukagonem w stężeniu 10 nM, natomiast nie wykryto zmian w ekspresji MOTS-c na poziomie białka (Fig. 6 g, h).

### **7.12. MOTS-c obniża wydzielanie insuliny oraz glukagonu, ale zwiększa ich ekspresję na poziomie RNA w wyspach trzustkowych szczura**

Po inkubacji szczurzych wysp trzustkowych z MOTS-c zaobserwowano obniżone wydzielanie insuliny w grupach z peptydem w stężeniach 10 oraz 100 nM (Fig. 7 a) oraz spadek wydzielania glukagonu przy stężeniu 10 nM (Fig. 7 b). W przypadku ekspresji tych hormonów na poziomie RNA, wykazano wzrost ekspresji insuliny po dodaniu 10 nM MOTS-c do medium inkubacyjnego, natomiast dla glukagonu zmiany pojawiły się w grupie z MOTS-c w stężeniu 100 nM. Przeprowadzono również badania ekspresji genów kodujących receptor insuliny oraz glukagonu na poziomie transkryptu mRNA po inkubacji wysp z MOTS-c, które wykazały jedynie wzrost ekspresji receptora insuliny w grupie z MOTS-c w stężeniu 10 nM.

### **7.13. Składniki pokarmowe oraz hormony trzustkowe wpływają na wydzielanie MOTS-c, ale nie na jego ekspresję w świńskich wyspach trzustkowych**

W eksperymencie, gdzie inkubowano wyspy trzustkowe świnii w różnych stężeniach glukozy, zaobserwowano spadek sekrecji MOTS-c w grupach z glukozą w stężeniach 2 i 16 mM w porównaniu z grupą z glukozą 6 mM, nie wykryto natomiast zmian w ekspresji

tego peptydu (Fig. 8 a, b). Inkubacja świńskich wysp trzustkowych z glukagonem w stężeniu 100 nM spowodowała spadek wydzielania MOTS-c, natomiast w eksperymencie, gdzie wyspy były inkubowane z insuliną, w grupie z 100 nM hormonu zaobserwowano wzrost sekrecji MOTS-c (Fig. 8 e, g). Nie wykryto jednakże istotnych zmian w ekspresji MOTS-c na poziomie białka po inkubacji wysp z tymi hormonami. Nie wykazano również zmian w sekrecji i ekspresji MOTS-c po inkubacji z wolnymi kwasami tłuszczowymi (Fig. 8c, d).

#### **7.14. MOTS-c wpływa na ekspresję i sekrecję insuliny i glukagonu oraz ich receptorów w świńskich wyspach trzustkowych**

Po inkubacji wysp trzustkowych pochodzących od świni z MOTS-c w różnych stężeniach, zaobserwowano wzrost sekrecji glukagonu w grupie z dodatkiem MOTS-c w stężeniu 100 nM (Fig. 9 b). Inkubacja wysp świni z MOTS-c spowodowała spadek ekspresji glukagonu i insuliny na poziomie transkrypty mRNA w grupach z peptydem w stężeniu odpowiednio 10 i 100 nM. (Fig. 9 c, d). Nie zaobserwowano natomiast żadnych zmian w ekspresji genów receptora insuliny oraz glukagonu (Fig. 9 e, f).

#### **7.15. MOTS-c zwiększa przeżywalność komórek wysp trzustkowych szczura i świni, ale nie wpływa na ich apoptozę**

Inkubacja wysp trzustkowych z różnymi stężeniami MOTS-c wykazała wzrost przeżywalności komórek wysp szczurzych w grupie z MOTS-c w stężeniu 10 nM oraz świńskich w grupie z MOTS-c w stężeniu 100 nM (Fig. 10 a, b). Nie zaobserwowano natomiast zmian w poziomie apoptozy komórek wysp trzustkowych po inkubacji z MOTS-c u obu gatunków (Fig. 10 c, d).

## 8. Dyskusja

Zachodni sposób życia cechujący się małym natężeniem wysiłku fizycznego, bardzo często siedzącą pracą oraz dietą bogatą w łatwo przyswajalne węglowodany powoduje wzrost przypadków otyłości oraz cukrzycy typu II (Kopp, 2019). Niewątpliwie jednym z najważniejszych kierunków badań dla współczesnej nauki jest znalezienie rozwiązań, które powstrzymałoby rozwój tych schorzeń w społeczeństwie. Szczególne zaniepokojenie budzi fakt, że w krajach wysoko rozwiniętych schorzenia te przyjęły już postać epidemii. Walka z jej skutkami to nie tylko kwestia zdrowia milionów ludzi, ale także olbrzymie koszty obciążające budżety narodowe. Odkrycia w obszarze biologii i medycyny dostarczają informacji o coraz nowszych substancjach, takich jak np. peptydy, które mogą być przedmiotem doświadczeń nad regulacją procesów fizjologicznych zwierząt oraz ludzi. Badania te wpisują się w kategorię badań podstawowych, które choć nie dają natychmiastowych efektów są podstawą wszelkich dalszych analiz o charakterze praktycznym i rozwoju nauki.

MOTS-c jest stosunkowo niedawno odkrytym peptydem, który jest nadal przedmiotem intensywnych dociekań w świecie nauki. Dotychczas poznano już część efektów jakie wywiera na szereg różnych narządów oraz tkanek w organizmie. Jednym z takich przykładów jest tkanka mięśniowa. Badania *in vitro* na liniach komórkowych przeprowadzone przez Garcia-Benlloch z zespołem udowodniły, że MOTS-c ma stymulujący wpływ na różnicowanie mięśni u ludzi - linia LHCN-M2 oraz myszy - linia C2C12 (García-Benlloch i wsp. 2022). Dodatkowo peptyd ten może hamować utratę tkanki mięśniowej wywołaną przez insulinooporność (Kumagai i wsp. 2021). Kolejną tkanką, na którą udowodniono wpływ peptydu MOTS-c jest tkanka tłuszczowa. Opisano dotychczas oddziaływanie MOTS-c promujące termogenezę tłuszczową, której działanie ma przeciwdziałać hipotermii (Lu i wsp 2019). Znane są już także doniesienia naukowe o roli jaką MOTS-c pełni w ochronie wysp trzustkowych w przebiegu cukrzycy typu I u myszy (Kong i wsp. 2021). Kolejną pracą ukazującą protekcyjne działanie MOTS-c jest publikacja autorstwa Yin i zespołu, w której wykazano, że trzustki myszy traktowanych streptozotocyną oraz MOTS-c zawierają więcej komórek  $\beta$  trzustki niż u myszy, którym nie podawano MOTS-c (Yin i wsp. 2022). Warto wspomnieć, że streptozotocyna to cytostatyczny antybiotyk selektywnie niszczący komórki  $\beta$  trzustki i stosowany w terapii nowotworów neuroendokrynych tego narządu. W tym samym okresie pojawiły się

doniesienia naukowe o niższej koncentracji MOTS-c we krwi u ludzi z cukrzycą w porównaniu do osób bez tej jednostki chorobowej (Ramanjaneya i wsp. 2019). Wymienione powyżej wyniki badań bezsprzecznie podkreślają znaczenie MOTS-c jako czynnika regulującego metabolizm.

Biorąc powyższe fakty pod uwagę, celem badań prezentowanych w niniejszej rozprawie było ustalenie wpływu MOTS-c na funkcjonowanie komórek  $\alpha$  i  $\beta$  trzustki oraz izolowanych wysp trzustkowych. Wyniki te mogą mieć niebagatelny wpływ na rozumienie fizjologii endokrynnej części trzustki, a to z kolei może w przyszłości przełożyć się na skuteczniejsze metody zapobiegania zmianom chorobowym lub umożliwić łagodzenie powstających powikłań.

W pierwszej części prezentowanych badań skupiono się na laboratoryjnych liniach komórkowych, jako modelu podstawowym, aby zweryfikować działanie peptydu MOTS-c przed wykorzystaniem modeli bardziej złożonych. W tym celu wybrano linie komórkowe INS-1E oraz  $\alpha$ TC-1, które odpowiadają komórkom  $\alpha$  i  $\beta$  trzustki, odgrywającym fundamentalną rolę w metabolizmie glukozy. Otrzymane wyniki badań wskazują, że w wybranych liniach zachodzi ekspresja tego peptydu i jest on widoczny podczas barwienia fluorescencyjnego. MOTS-c nie wykryto w wyspecjalizowanych komórkach, odpowiedzialnych za jego produkcję, ujawniono natomiast, że znajduje się on zarówno w komórkach wydzielających insulinę jak i glukagon. Z uwagi na mitochondrialne pochodzenie tego peptydu, bardzo prawdopodobnym jest, że jego ekspresja zachodzi w wielu tkankach i komórkach w całym organizmie, co opisano już częściowo w publikacji prezentującej ten peptyd po raz pierwszy (Lee i wsp. 2015). Można także założyć, że MOTS-c, będąc peptydem wydzielanym do krwi, wpływa na fizjologię komórek i tkanek zarówno przez interakcje parakryne jak i endokryne.

W kolejnych eksperymentach z wykorzystaniem linii komórkowych zbadano wpływ głównych hormonów wydzielanych przez trzustkę tj. insuliny oraz glukagonu na sekrecję MOTS-c. Oba z tych hormonów zwiększyły wydzielanie MOTS-c, co może sugerować, że peptyd ten może być wydzielany wspólnie z innymi substancjami (np. hormonami) gdy wzrasta aktywność wydzielnicza komórki. Dotychczas opublikowane wyniki badań pokazują wpływ MOTS-c na metabolizm różnych tkanek, przykładem mogą być np. mięśnie (Lee i wsp. 2015). Należy jednak pamiętać, że zarówno komórki INS-1E, jak i  $\alpha$ TC-1 reprezentują linie komórkowe, które są hodowane w izolowanej monokulturze,

bez obecności komórek innego rodzaju i idących za tym interakcji międzykomórkowych, jak również obecności szeregu hormonów i mediatorów wpływających na ich fizjologię. Wspomniane interakcje wydają się szczególnie ważne w kontekście badań nad trzustką i jej strukturami endokrynnymi – wyspami. Mimo wymienionych ograniczeń przeprowadzone badania pozwoliły uzyskać wyniki świadczące o bezpośrednim wpływie insuliny i glukagonu, który w efekcie zwiększa sekrecję MOTS-c z badanych komórek modelowych. W przypadku zmian ekspresji MOTS-c na poziomie białka badanych metodą Western Blot po działaniu insuliną lub glukagonem, zaobserwowano takie same tendencje jak w przypadku sekrecji w obu badanych liniach komórkowych. Tym samym oczywistą kontynuacją stało się przeprowadzenie dalszych badań na izolowanych wyspach trzustkowych w celu weryfikacji wyników uzyskanych na liniach komórkowych.

Kolejną częścią badań sekrecyjnych przeprowadzonych na komórkach były badania w kierunku określenia wpływu peptydu MOTS-c na wydzielanie oraz ekspresję insuliny i glukagonu – dwóch głównych hormonów trzustkowych. W przypadku peptydu o tak słabo poznanej roli jak MOTS-c badania wzajemnej sekrecji tj. wpływu insuliny i glukagonu na wydzielanie MOTS-c omówione powyżej oraz wpływu MOTS-c na wydzielanie insuliny i glukagonu wydają się szczególnie zasadne. Otrzymane wyniki wskazują, że inkubacja komórek w pożywce z dodatkiem peptydu MOTS-c spowodowała spadek sekrecji oraz ekspresji insuliny w przypadku komórek INS-1E oraz wzrost sekrecji i ekspresji glukagonu w komórkach  $\alpha$ TC-1. Uzyskane rezultaty dość wyraźnie sugerują, że peptyd MOTS-c pełni istotną rolę w regulacji fizjologii komórek trzustki oraz regulacji metabolizmu glukozy w organizmie. Dodatkowo zaobserwowano podwyższony poziom ekspresji receptora insuliny w komórkach linii INS-1E, co odpowiada znanym już wcześniej odkryciom na temat działania MOTS-c zwiększającego wrażliwość komórek na insulinę (Lee i wsp. 2015). Co więcej, przeprowadzone eksperymenty ukazują sprzężenie zwrotne między MOTS-c a insuliną, w komórkach INS-1E. Insulina powoduje wzrost wydzielania MOTS-c, podczas gdy MOTS-c obniża sekrecję insuliny. Podobnej zależności jednakże nie zaobserwowano w przypadku glukagonu i MOTS-c w komórkach  $\alpha$ TC-1.

Kolejne badania przeprowadzono z użyciem najważniejszych składników pokarmowych i energetycznych, aby sprawdzić ich wpływ na wydzielanie MOTS-c. W eksperymentach

użyto w medium inkubacyjnym różnych stężeń glukozy i wolnych kwasów tłuszczowych sprzęgniętych z albuminą, a następnie zmierzono sekrecję MOTS-c. Badanie to wymagało zmiany składu pożywki dla komórek, ponieważ linie komórkowe INS-1E oraz  $\alpha$ TC-1 wymagają podczas hodowli innych stężeń glukozy w medium (odpowiednio 11 mM oraz 5,6 mM). Zabieg ten miał na celu wprowadzenie warunków hiper-, normo- oraz hipoglikemii symulujących stan poposiłkowy/cukrzycy, stan homeostazy oraz stan głodu. Rezultaty otrzymane w tych doświadczeniach ukazały zmiany w sekrecji MOTS-c w zależności od stężenia glukozy, co świadczy o tym, że pojawiające się we krwi składniki pokarmowe oraz status metaboliczny organizmu wpływają na wydzielanie tego peptydu z wysp trzustkowych. Zaobserwowano, że w niskim stężeniu glukozy wzrasta sekrecja MOTS-c. Jak wiadomo sekrecja glukagonu wzrasta w warunkach hipoglikemii, a uzyskane wyniki pokazują jednocześnie, że glukagon działa stymulująco na wydzielanie MOTS-c. Te odkrycia sugerują, że w warunkach głodu, charakteryzujących się niskim poziomem glikemii oraz wysokim stężeniem glukagonu we krwi, MOTS-c może mieć wpływ na pozyskanie energii w wyniku szeregu procesów takich jak lipoliza lub glikogenoliza.

Jako że wcześniejsze doniesienia sugerowały, że MOTS-c wpływa na długość życia komórek, w końcowym etapie wykonano szereg badań mających sprawdzić wpływ MOTS-c na żywotność komórek modelowych odpowiadających komórkom  $\alpha$  i  $\beta$  trzustki. W badaniach określono intensywność procesu apoptozy w komórkach, intensywność metabolizmu mitochondrialnego oraz tempo podziałów komórkowych. Szeroko pojęta przeżywalność komórek to szczególnie istotny parametr, z uwagi na znaczenie komórek  $\beta$  w przebiegu cukrzycy typu II, gdzie uszkodzenie oraz niewłaściwe funkcjonowanie tych komórek jest czynnikiem warunkującym rozwój choroby (Porte 1991). Wyniki przeprowadzonych na tym etapie eksperymentów pokazują, że MOTS-c obniża poziom apoptozy w obu badanych liniach komórkowych, co pokrywa się ze znanym dotychczas protekcyjnym działaniem MOTS-c oraz innych peptydów mitochondrialnego pochodzenia (Merry i wsp. 2020). Odmienne wyniki między poszczególnymi liniami komórkowymi uzyskano natomiast w przypadku efektu wywoływanego przez MOTS-c na żywotność komórek badaną za pomocą testu MTT. Podczas gdy peptyd ten zwiększa żywotność komórek INS-1E, obniża ją jednocześnie w komórkach  $\alpha$ TC-1. Różnica ta może być efektem zupełnie odmiennej roli pełnionej przez peptyd MOTS-c w komórkach

wydzielających insulinę oraz tych wydzielających glukagon i łączyć się z opisanym wcześniej odwrotnym wpływem MOTS-c na sekrecję hormonów z linii INS-1E i  $\alpha$ TC-1. Jednym z prawdopodobnych wyjaśnień jest fakt, że komórki  $\alpha$ TC-1 po wzmożonej sekrecji glukagonu spowodowanej działaniem MOTS-c mogą być osłabione przez intensywność tego procesu, co może skutkować z kolei obniżeniem ich metabolizmu i żywotności.

Po otrzymaniu interesujących wyników z doświadczeń przeprowadzonych na liniach komórkowych INS-1E oraz  $\alpha$ TC-1, kolejnym etapem były badania na bardziej złożonym modelu jakim są izolowane wyspy trzustkowe. Wybrano w tym celu dwa gatunki zwierząt, z których pozyskiwane były wyspy: szczura wędrownego oraz świnię domową. Szczur został wybrany jako klasyczny model laboratoryjny z uwagi na niską cenę chowu oraz szeroką dostępność. Gryzoni są często brane pod uwagę jako pierwsze zwierzęta, z których pozyskiwane są tkanki do badań lub przeprowadzane są na nich testy *in vivo* nowoodkrytych substancji. Z uwagi jednak na istotne różnice anatomiczne oraz fizjologiczne, nie zawsze wyniki uzyskane w doświadczeniach z ich udziałem nadają się do przełożenia otrzymanych rezultatów bezpośrednio na ludzi (Arner 2005). Wybór świni jako modelu badawczego został podyktowany właśnie ze względu na bliższe człowiekowi podobieństwo fizjologiczne (Lunney 2021) oraz anatomiczne. Już w samej budowie morfologicznej trzustki można dostrzec znacznie większe podobieństwo między świnią, a człowiekiem niż między szczurem, a człowiekiem. Zarówno u człowieka jak i świni trzustka tworzy zwarty narząd, natomiast u szczura jest ona rozsiana w krezce jelitowej. Z wyborem modeli badawczych wiązały się jednak pewne ograniczenia. Jak do tej pory nie została poznana sekwencja aminokwasów peptydu MOTS-c świni (Lee i wsp. 2015). Z uwagi na opisane wcześniej podobieństwo tego gatunku do człowieka, w eksperymentach wykorzystano MOTS-c z sekwencją aminokwasów odpowiednią dla peptydu ludzkiego. W badaniach kluczowym krokiem było sprawdzenie specyficzności przeciwciała anti-MOTS-c przeciw nieznanemu peptydowi świńskiemu. Dokonano tego za pomocą dedykowanego peptydu blokującego oraz dodatku peptydu MOTS-c zsyntezowanego na potrzeby badań. Oprócz potwierdzenia specyficzności, odkryto również, że świński peptyd MOTS-c jest prawdopodobnie większy niż jego wariant występujący u szczura. Analiza Western Blot wykazała bowiem obecność w próbce białek świni sygnału dla MOTS-c na dużo większej wysokości niż w przypadku szczura

oraz fakt, że sygnał ten zniknął jeśli wcześniej dokonano preinkubacji przeciwciała ze wspomnianymi peptydami blokującymi. Świadczy to jednoznacznie, że użyte przeciwciała anti-MOTS-c wiąże się specyficznie z peptydem świni mimo, że nie znamy jego sekwencji.

Mając na uwadze znane różnice fizjologiczne i anatomiczne trzustki między obydwoma badanymi gatunkami zwierząt oraz fakt nieznamość sekwencji i struktury peptydu świńskiego, można było się spodziewać różnic w wynikach otrzymanych z tych samych eksperymentów wykonywanych na wyspach trzustkowych w zależności od gatunku, z którego były one pozyskane. Już barwienie immunofluorescencyjne wykazało istotne różnice w lokalizacji MOTS-c w trzustkach u tych zwierząt. U świni peptyd ten jest obecny tylko w endokrynej części trzustki tj. w wyspie i rozsianych komórkach endokrynych, podczas gdy u szczura jest obecny zarówno w części endokrynej jak i egzokrynej narządu. Tak wyraźna różnica może sugerować odmienną funkcję jaką pełni MOTS-c w trzustce u tych gatunków. W przypadku szczurów MOTS-c może regulować oprócz aktywności endokrynej także wydzielanie egzokryjne i wpływać na proces trawienia pokarmu. Kwestie te wychodzą już poza zakres prezentowanych wyników, ale niewątpliwie stanowią interesującą hipotezę do dalszych badań. Z kolei w przypadku świni obecność MOTS-c obserwowano jedynie w komórkach wykazujących aktywność endokryną, tj. wydzielających insulinę lub glukagon, co także jest interesujące i wskazuje, że peptyd mitochondrialny nie musi ulegać ekspresji w całym organizmie i są mechanizmy regulujące aktywność otwartej ramki odczytu w mitochondrialnym genie 12S RNA.

Chcąc nawiązać do wcześniej uzyskanych wyników, podobnie jak w poprzednich doświadczeniach na liniach komórkowych, przeprowadzono szereg eksperymentów badających wpływ hormonów trzustkowych (insuliny i glukagonu) oraz składników energetycznych, takich jak glukoza i wolne kwasy tłuszczowe na sekrecję oraz ekspresję MOTS-c. Ponadto zbadano także sekrecję hormonów trzustkowych pod wpływem inkubacji izolowanych wysp z MOTS-c uzupełniając w ten sposób sieć wzajemnych zależności między insuliną, glukagonem i MOTS-c. Wyniki uzyskane w eksperymentach określających sekrecję i ekspresję mogą nie korespondować ze sobą w pełni z uwagi na odmienne czasy trwania inkubacji. Podczas badań dotyczących sekrecji inkubacja trwała 1,5 godziny ukazując bezpośredni wpływ danego hormonu na bieżącą sekrecję

pęcherzyków egzocytarnych zgromadzonych w cytoplazmie komórki, bez uwzględnienia wpływu na mechanizmy ekspresji badanego białka. Natomiast w przypadku eksperymentów nastawionych na zbadanie intensywności ekspresji danego genu przed zebraniem RNA lub białka wyspy były poddane działaniu hormonu badanego przed 24 godziny, aby mogły zajść procesy prowadzące do ewentualnych zmian na poziomie transkryptu mRNA lub w ilości białka.

Wyniki uzyskane w badaniach na wyspach szczurzych w większości odpowiadają tym z linii komórkowych, co może być skutkiem zgodności pochodzenia linii INS-1E od szczura, a linii  $\alpha$ TC-1 od myszy w ramach rządu gryzoni. W przypadku wyników otrzymanych w doświadczeniach przeprowadzonych na wyspach świńskich nie zaobserwowano podobnego profilu takiego jak ten z badań na komórkach. Brak podobieństw odnotowano m.in. w rezultatach dotyczących wpływu wolnych kwasów tłuszczowych na wydzielanie MOTS-c, gdzie w przypadku izolowanych wysp trzustkowych nie stwierdzono żadnych zmian w porównaniu do badań na komórkach. Podobnie odmienne efekty zaobserwowano w przypadku inkubacji z glukozą gdzie wyspy świni wykazały odwrotną reakcję do komórek i wysp szczura. Wydzielanie MOTS-c z wysp szczurzych było najniższe przy 6 mM stężeniu glukozy, podczas, gdy u świni przy tej samej ilości glukozy w buforze zaobserwowano wydzielanie najwyższe. Może sugerować to zdecydowanie odrębną rolę MOTS-c w regulacji metabolizmu i gospodarki energetycznej u tych gatunków, jednakże na potwierdzenie tej hipotezy należy jeszcze poczekać. Wynika to głównie z braku poznanej sekwencji MOTS-c u świni, która uniemożliwia bliższe badania. Warto tutaj podkreślić także, że jakiegokolwiek efekty MOTS-c są obserwowane czy to u szczurów, myszy, świń czy ludzi cały czas nie jest znany żaden potencjalny receptor MOTS-c, przez który mógłby on działać.

Pokazuje to dobrze, jak ważne są badania zarówno na ustalonych liniach komórkowych i bardziej złożonych strukturach jakimi są wyspy trzustkowe. W pierwszym przypadku otrzymujemy efekt bezpośredniego wpływu badanej substancji na dany typ komórki niezakłócony przez inne oddziaływania. W drugim, działając na strukturach takich jak wyspy trzustkowe mamy już do czynienia z wieloma współlistniejącymi rodzajami komórek, które oddziałują również wzajemnie na siebie w wyniku efektów parakrynych. Należy pamiętać także, że ewentualne rozbieżności w wynikach uzyskiwanych na ustalonych liniach komórkowych i izolowanych strukturach tkankowych mogą wynikać

z możliwości penetracji komórek przez badany związek. Komórki rozrastające się na płaskiej powierzchni są dużo bardziej narażone na potencjalne działanie podanego peptydu czy białka, a struktury takie jak wyspy trzustkowe charakteryzujące się trójwymiarową przestrzenią wykazują ograniczone możliwości penetracji i oddziaływania z badaną substancją. Warto pamiętać także o specyficznym unaczynieniu trzustki, które w warunkach fizjologicznych organizmu wymusza dotarcie substancji najpierw do wnętrza wyspy trzustkowej, które charakteryzuje się, w przypadku szczura, przewagą komórek  $\beta$  a następnie na obwód do rejonów z przewagą komórek  $\alpha$ . Układ taki powoduje, że pierwszą jest interakcja z insuliną, a następnie z glukagonem.

Osobną kwestią przy porównywaniu wyników uzyskanych *in vitro* z linii komórkowych czy izolowanych wysp trzustkowych jest kwestia ich odniesienia do efektów uzyskiwanych *in vivo*. W przypadku doświadczeń *in vivo* uzyskane wyniki mogłyby być zupełnie odmienne. Wpływ podawanego np. dootrzewnowo MOTS-c na opisane w tej pracy interakcje mogłyby być całkiem inny, łącznie z tym, że mogłoby nie dochodzić do obserwowalnych zmian w badanych zależnościach między hormonami.

Kolejnym rezultatem z badań na wyspach trzustkowych szczura, odpowiadającym tym otrzymanym z komórek szczurzej linii INS-1E jest występowanie sprzężenia zwrotnego między MOTS-c, a insuliną. Podobnie jak w przypadku badań na komórkach, na wyspach również zaobserwowano spadek sekrecji insuliny po działaniu MOTS-c, podczas gdy sama insulina zwiększała wydzielanie MOTS-c. W przypadku wysp pochodzących od szczura zaobserwowano również podobną zależność między MOTS-c a glukagonem – glukagon zwiększał wydzielanie MOTS-c, podczas, gdy MOTS-c obniżał sekrecję glukagonu. Po przeprowadzeniu analogicznych doświadczeń przeprowadzonych na izolowanych wyspach trzustkowych świni, nie zaobserwowano zbliżonych powiązań. To kolejne wskazanie by przypuszczać, że działanie MOTS-c u gryzoni i świń wydaje się być zupełnie inne. Następnym aspektem, w którym wyniki otrzymane ze szczurzych wysp oraz linii komórkowych są odmienne od wyników uzyskanych na próbkach uzyskanych od świni jest zwiększona ekspresja receptora insuliny pod wpływem MOTS-c. Wzrost ekspresji tego receptora u szczura potwierdzony na modelu komórkowym oraz na wyspach trzustkowych może sugerować, iż jest to jeden z mechanizmów odpowiedzialnych za dotychczas dobrze udokumentowane działanie MOTS-c skutkujące

zwiększeniem wrażliwości na insulinę i to pomimo obserwowanego jednocześnie spadku wydzielania tego hormonu (Lee i wsp 2015; Kim i wsp 2019).

Jako że znany jest efekt działania MOTS-c poprawiający funkcjonalność mięśni u myszy (Ran i wsp. 2021), podobnie jak w przypadku badań na liniach komórkowych, postanowiono sprawdzić wpływ MOTS-c na żywotność oraz apoptozę komórek w wyspach trzustkowych. Zrezygnowano tutaj z testów na proliferację (BrdU) z uwagi na fakt, że zróżnicowane komórki izolowanych wysp trzustkowych są zdolne do kolejnych podziałów komórkowych w bardzo ograniczonym zakresie obserwowanym raczej w tygodniach i miesiącach niż w ciągu doby. W odróżnieniu od badań na komórkach INS-1E oraz  $\alpha$ TC-1, wyniki otrzymane z wysp trzustkowych nie wykazały żadnego wpływu na apoptozę ani u świni, ani u szczura. Zaobserwowano jednak zwiększoną żywotność komórek w wyspach pochodzących od obu gatunku po inkubacji z peptydem MOTS-c mierzoną testem MTT. Jest to istotne odkrycie, ponieważ jest bardzo prawdopodobne, że peptyd MOTS-c pełni rolę protekcyjną w stosunku do komórek  $\beta$  i/lub  $\alpha$  trzustki. Tym samym jego działanie, może przyczyniać się do wydłużenia życia komórek tego narządu, np. w przebiegu cukrzycy, co zostało już opisane w modelu mysim, dla cukrzycy typu I (Kong i wsp. 2021). Zaobserwowanie tego efektu u ludzi najlepiej w trakcie przebiegu cukrzycy typu II mogłoby mieć doniosłe znaczenie kliniczne. Wydłużenie funkcjonowania komórek  $\beta$  w czasie rozwoju cukrzycy insulinoniezależnej, gdy organizm systematycznie je traci w wyniku wyczerpania nieustanną nadprodukcją insuliny dałoby uzasadnione nadzieje na rozciągnięcie w czasie postępów choroby i odłożenie bądź całkowite uniknięcie poważnych powikłań, np. neurologicznych.

Wyniki zebrane w doświadczeniach na izolowanych wyspach trzustkowych sugerują wiele różnic między MOTS-c u badanych gatunków, które mogą mieć charakter zarówno strukturalny jak i funkcjonalny. MOTS-c występujący u świni ma inną wielkość cząsteczkową, niż ten występujący u szczura, ponadto jest inaczej ulokowany w trzustce świni, niż w przypadku szczura. Dodatkowo wykazano różnice w zmianach w sekrecji MOTS-c po działaniu glukagonu oraz różnych stężeń glukozy między badanymi gatunkami. Zaobserwowano również inny wpływ MOTS-c na regulację hormonów trzustkowych. Widoczne różnice mogą wynikać z wymienionych wcześniej różnic anatomicznych oraz fizjologicznych między świnią, a szczurem, ale przede wszystkim, jak się wydaje, mają charakter genetyczny.

Przeprowadzone badania bez wątpienia ukazały wpływ peptydu MOTS-c na fizjologię endokrynej części trzustki, zarówno na modelach komórkowych oraz na izolowanych wyspach trzustkowych. Wyniki otrzymane z doświadczeń na liniach komórkowych nie zawsze pokrywały się z wynikami z tych samych doświadczeń przeprowadzonych na wyspach trzustkowych. Różnice te mogą wynikać ze odmiennej złożoności wybranego modelu. Linie komórkowe są monokulturą komórek, które dodatkowo zostały zmienione na potrzeby hodowli laboratoryjnych. Nie można zaobserwować wobec tego na tym modelu interakcji międzykomórkowych, jak również część odpowiedzi komórkowej może być inna niż ich fizjologicznych odpowiedników, z uwagi choćby na ich fizjologiczną nieśmiertelność. Mimo tych ograniczeń badania na liniach komórkowych niezmiennie powinny stanowić pierwszy etap doświadczeń, zwłaszcza, gdy przedmiotem dociekań jest niedawno odkryta substancja i zupełnie nie jest znany jej wpływ na dany aspekt fizjologii. Wyspy trzustkowe są natomiast bardziej złożoną strukturą, w której obserwujemy znacznie bardziej skomplikowane procesy, takie jak chociażby obecność w obrębie jednej wyspy komórek produkujących insulinę oraz glukagon, a co za im idzie mamy do czynienia z interakcjami para- i endokrynnymi. Część wyników otrzymanych z wysp szczurzych ukazywała jednak ten sam kierunek zmian, jaki był obserwowany w wynikach uzyskanych w doświadczeniach na liniach komórkowych. Fakt ten często nie dotyczył wyników uzyskanych na wyspach świńskich, które nie były tożsame z tymi uzyskiwanymi na liniach komórkowych. Powodem takich różnic może być fakt, iż użyte w doświadczeniach linie komórkowe INS-1E oraz  $\alpha$ TC-1 pochodzą odpowiednio od szczura oraz myszy. Warto zaznaczyć, że nie ma obecnie na rynku komercyjnym żadnej linii komórkowej, która reprezentowałaby komórki endokryne trzustki i pochodziła z organizmu świni.

Ważnym odkryciem dokonany podczas tych badań, było wykazanie odmiennej wielkości cząsteczki MOTS-c występującej u świni. W pracy opisującej odkrycie MOTS-c w 2015 roku, Lee wraz z zespołem opisali sekwencję tego peptydu u 14 różnych gatunków (m.in. człowieka, ale też lwa, konia czy delfina), natomiast nie opisali wspomnianej sekwencji dla świni (Lee i wsp. 2015). Podczas eksperymentu mającego potwierdzić specyficzność zakupionego przeciwciała anty-MOTS-c w badaniach nad świnią zaobserwowano, że w odróżnieniu od peptydu MOTS-c obecnego u szczura, który ma masę około 5 kDa, wariant występujący u świni jest znacznie cięższy (około 42 kDa).

MOTS-c cały czas pozostaje interesującym obiektem badań. Na szczególne zainteresowanie naukowców zasługuje jego efekt ochronny jaki wywiera na serce (Wang i wsp. 2023; Zhong i wsp. 2022; Li i wsp. 2022). Mając na uwadze dotychczas opublikowane wyniki badań, można założyć, że MOTS-c może okazać się w przyszłości środkiem wykorzystywanym klinicznie. Jego wyjątkowy wpływ na metabolizm, prowadzący do osłabienia utleniania glukozy w procesie glikolizy, sugeruje, że peptyd ten może wykazywać mniej wad w swoim działaniu, niż inne substancje, które aktywują AMPK i powodują więcej skutków ubocznych (Gao i wsp 2023). Niestety, pozytywne działanie tego peptydu na tkanki oraz brak, jak do tej pory, dostatecznych badań klinicznych pozwalających na zalegalizowanie go jako leku ma również ciemne strony. W związku z dotychczas opisanymi pozytywnymi efektami jego działania, m.in. na mięśnie oraz niewystarczającymi regulacjami prawnymi na rynku pojawiły się już oferty MOTS-c jako suplementu diety mającego nawet zastępować wysiłek fizyczny. Nie powinno zatem dziwić, że Światowa Agencja Antydopingowa (World Anti-Doping Agency, WADA) umieściła MOTS-c na liście substancji zakazanych w sporcie (WADA 2025).

## 9. Spis literatury

1. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG et al (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457–465. [https:// doi. org/ 10. 1038/ 29045 7a0](https://doi.org/10.1038/290457a0).
2. Association, A. D. (2000). Type 2 diabetes in children and adolescents. *Pediatrics*, 105(3), 671-680.
3. Chen, J., Huang, Y., Liu, C., Chi, J., Wang, Y., & Xu, L. (2023). The role of C-peptide in diabetes and its complications: an updated review. *Frontiers in endocrinology*, 14, 1256093.
4. Cobb LJ, Lee C, Xiao J et al (2016) Naturally occurring mitochondrial-derived peptides are age-dependent regulators of apoptosis, insulin sensitivity, and inflammatory markers. *Aging* 8:796–809. [https:// doi. org/ 10. 18632/ aging. 100943](https://doi.org/10.18632/aging.100943).
5. De Pablo, F., Hernández-Sánchez, C., & de la Rosa, E. J. (2018). The prohormone proinsulin as a neuroprotective factor: past history and future prospects. *Frontiers in molecular neuroscience*, 11, 426.
6. Dib, S. A., & Gomes, M. B. (2009). Etiopathogenesis of type 1 diabetes mellitus: prognostic factors for the evolution of residual  $\beta$  cell function. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 1(1), 25.
7. Du C, Zhang C, Wu W et al (2018) Circulating MOTS-c levels are decreased in obese male children and adolescents and associated with insulin resistance. *Pediatr Diabetes* 19:1058–1064. [https:// doi. org/ 10. 1111/ pedi. 12685](https://doi.org/10.1111/pedi.12685).
8. Fu, Z., R. Gilbert, E., & Liu, D. (2013). Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Current diabetes reviews*, 9(1), 25-53.
9. Galicia-Garcia, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., ... & Martín, C. (2020). Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *International journal of molecular sciences*, 21(17), 6275.
10. Gao, Y., Wei, X., Wei, P., Lu, H., Zhong, L., Tan, J., ... & Liu, Z. (2023). MOTS-c functionally prevents metabolic disorders. *Metabolites*, 13(1), 125.
11. Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H et al (2001) A rescue factor abolishes neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and

- Aß. Proc Natl Acad Sci U S A 98:6336–6341. <https://doi.org/10.1073/pnas.101133498>.
12. Hatting, M., Tavares, C. D., Sharabi, K., Rines, A. K., & Puigserver, P. (2018). Insulin regulation of gluconeogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1411(1), 21-35.
  13. Hoffman, L. S., Fox, T. J., Anastasopoulou, C., & Jialal, I. (2018). Maturity onset diabetes in the young.
  14. Joel, C. D. (1966). Stimulation of metabolism of rat brown adipose tissue by addition of lipolytic hormones in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 241(4), 814-821.
  15. Kim SJ, Miller B, Mehta HH et al (2019) The mitochondrial-derived peptide MOTS-c is a regulator of plasma metabolites and enhances insulin sensitivity. *Physiol Rep*. <https://doi.org/10.14814/phy2.14171>.
  16. Kimball, C. P., & Murlin, J. R. (1923). Aqueous extracts of pancreas: III. Some precipitation reactions of insulin. *Journal of Biological Chemistry*, 58(1), 337-346.
  17. Kong BS, Min SH, Lee C et al (2021) Mitochondrial-encoded MOTS-c prevents pancreatic islet destruction in autoimmune diabetes. *Cell Rep* 36(4):109447. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109447>.
  18. Lee C, Zeng J, Drew BG et al (2015) The mitochondrial-derived peptide MOTS-c promotes metabolic homeostasis and reduces obesity and insulin resistance. *Cell Metab* 21:443–454. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.02.009>.
  19. Lu H, Wei M, Zhai Y et al (2019) MOTS-c peptide regulates adipose homeostasis to prevent ovariectomy-induced metabolic dysfunction. *J Mol Med* 97:473–485. <https://doi.org/10.1007/s00109-018-01738-w>.
  20. Lu P, Li X, Li B et al (2023) The mitochondrial-derived peptide MOTS-c suppresses ferroptosis and alleviates acute lung injury induced by myocardial ischemia reperfusion via PPAR $\gamma$  signaling pathway. *Eur J Pharmacol* 15(953):175835. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175835>.
  21. Luo YH, Xie L, Li JY et al (2023) Serum MOTS-C levels are decreased in obese children and associated with vascular endothelial function. *Diabetes, Metab Syndrome Obesity* 16:1013–1020. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S403934>.

22. Lutz, T. A. (2010). The role of amylin in the control of energy homeostasis. *American journal of physiology-regulatory, integrative and comparative physiology*, 298(6), R1475-R1484.
23. Marroqui, L., Alonso-Magdalena, P., Merino, B., Fuentes, E., Nadal, A., & Quesada, I. (2014). Nutrient regulation of glucagon secretion: involvement in metabolism and diabetes. *Nutrition research reviews*, 27(1), 48-62.
24. Merry, T. L., Chan, A., Woodhead, J. S. T., Reynolds, J. C., Kumagai, H., Kim, S.-J., & Lee, C. (2020). *Mitochondrial-derived peptides in energy metabolism*. *American Journal of Physiology — Endocrinology and Metabolism*, 319(4), E659–E666. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00249.2020>.
25. Miller, B., Kim, S.-J., Kumagai, H., Yen, K., & Cohen, P. (2022). *Mitochondria-derived peptides in aging and healthspan*. *The Journal of Clinical Investigation*, 132(9), e158449. <https://doi.org/10.1172/JCI158449>.
26. Müller, T. D., Finan, B., Clemmensen, C., DiMarchi, R. D., & Tschöp, M. H. (2017). The new biology and pharmacology of glucagon. *Physiological reviews*, 97(2), 721-766.
27. Muzumdar RH, Huffman DM, Atzmon G et al (2009) Humanin: a novel central regulator of peripheral insulin action. *PLoS ONE* 4:e6334. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006334>.
28. Muzumdar, R. H., Huffman, D. M., Calvert, J. W., Jha, S., Atzmon, G., Einstein, F. H., Ma, X., Yang, X., Park, J., Zhang, Y., & Cohen, P. (2010). *Acute humanin therapy attenuates myocardial ischemia and reperfusion injury in mice*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(10), 1940–1948. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.206219>.
29. Nass MM, Nass S (1963) Intramitochondrial fibers with DNA characteristics: I. Fixation and electron staining reactions. *J Cell Biol* 19(3):593–611. <https://doi.org/10.1083/jcb.19.3.593>.
30. Olokoba, A. B., Obateru, O. A., & Olokoba, L. B. (2012). Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman medical journal*, 27(4), 269.
31. Rahman, M. S., Hossain, K. S., Das, S., Kundu, S., Adegoke, E. O., Rahman, M. A., ... & Pang, M. G. (2021). Role of insulin in health and disease: an update. *International journal of molecular sciences*, 22(12), 6403.

32. Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*, 14(3), 225–274. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(67\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(67)90079-3).
33. Scully, T. (2012). Diabetes in numbers. *Nature*, 485(7398), S2-S3.
34. Talathi, S. S., Zimmerman, R., & Young, M. (2023). Anatomy, abdomen and pelvis, pancreas. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
35. Tsuchitani, M., Sato, J., & Kokoshima, H. (2016). A comparison of the anatomical structure of the pancreas in experimental animals. *Journal of toxicologic pathology*, 29(3), 147-154.
36. Watson JD, Crick FH (1953) The structure of DNA. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 18:123–131. <https://doi.org/10.1101/sqb.1953.018.01.020>.
37. Wewer Albrechtsen, N. J., Holst, J. J., Cherrington, A. D., Finan, B., Gluud, L. L., Dean, E. D., ... & Müller, T. D. (2023). 100 years of glucagon and 100 more. *Diabetologia*, 66(8), 1378-1394.
38. Wu J, Xiao D, Yu K et al (2023) The protective effect of the mitochondrial-derived peptide MOTS-c on LPS-induced septic cardiomyopathy: effect of MOTS-c on septic cardiomyopathy. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 55(2):285–294. <https://doi.org/10.3724/abbs.2023006>.
39. Yang B, Yu Q, Chang B et al (2021) MOTS-c interacts synergistically with exercise intervention to regulate PGC-1 $\alpha$  expression, attenuate insulin resistance and enhance glucose metabolism in mice via AMPK signaling pathway. *Biochem Biophys Acta Mol Basis Dis*. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166126>.
40. Yin Y, Pan Y, He J et al (2022) The mitochondrial-derived peptide MOTS-c relieves hyperglycemia and insulin resistance in gestational diabetes mellitus. *Pharmacol Res* 175:105987. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105987>.
41. Zhu, W., Taday, N., Flatt, P. R., & Irwin, N. (2023). Pancreatic polypeptide revisited: Potential therapeutic effects in obesity-diabetes. *Peptides*, 160, 170923.

## **10. Spis tabel i rycin**

### **10.1. Tabele**

Tabela 1. Opisane dotychczas peptydy mitochondrialnego pochodzenia str. 1

Tabela 2. Sekwencje starterów użytych w reakcjach PCR (5'-3')

### **10.2. Ryciny**

Rycina 1. Sekwencje aminokwasów peptydu MOTS-c u różnych gatunków

Rycina 2. Klasyfikacja cukrzycy

Rycina 3. Barwienie immunofluorescencyjne trzustki szczura

Rycina 4. Barwienie immunofluorescencyjne trzustki świni

Rycina 5. Barwienie immunofluorescencyjne trzustki szczura

Rycina 6. Barwienie immunofluorescencyjne trzustki świni



# MOTS-c regulates pancreatic alpha and beta cell functions in vitro

Jakub Bień<sup>1</sup> · Ewa Pruszyńska-Oszmałek<sup>1</sup> · Paweł Kołodziejki<sup>1</sup> · Natalia Leciejewska<sup>1</sup> · Dawid Szczepankiewicz<sup>1</sup> · Maciej Sassek<sup>1</sup>

Accepted: 11 February 2024 / Published online: 2 March 2024  
© The Author(s) 2024

## Abstract

The aim of this study is to determine the influence of the mitochondrial open-reading-frame of the twelve S rRNA-c (MOTS-c) peptide on pancreatic cell physiology. Moreover, in this study, we examined the changes in MOTS-c secretion and expression under different conditions. Our experiments were conducted using laboratory cell line cultures, specifically the INS-1E and  $\alpha$ TC-1 cell lines, which represent  $\beta$  and  $\alpha$  pancreatic cells, respectively. As the pancreas is an endocrine organ, we also tested its hormone regulation capabilities. Furthermore, we assessed the secretion of MOTS-c after incubating the cells with glucose and free fatty acids. Additionally, we examined key cell culture parameters such as cell viability, proliferation, and apoptosis. The results obtained from this study show that MOTS-c has a significant impact on the physiology of pancreatic cells. Specifically, it lowers insulin secretion and expression in INS-1E cells and enhances glucagon secretion and expression in  $\alpha$ TC-1 cells. Furthermore, MOTS-c affects cell viability and apoptosis. Interestingly, insulin and glucagon affect the MOTS-c secretion as well as glucose and free fatty acids. These experiments clearly show that MOTS-c is an important regulator of pancreatic metabolism, and there are numerous properties of MOTS-c yet to be discovered.

**Keywords** MOTS-c · Pancreas · INS-1E ·  $\alpha$ TC-1

## Introduction

The human mitochondrial genome is an incredibly fascinating subject of research. Despite being sequenced 40 years ago, it continues to yield discoveries. It consists of 16,569 bp (Anderson et al. 1981) and is known to encode 22 tRNAs, 2 rRNAs, and 13 proteins (Cobb et al. 2016). Delving deeper into the sequences of these 37 genes, researchers have identified smaller functional genes that encode peptides. Among the first to be discovered was the humanin gene (HN), which was identified in Nishimoto's lab in 2001 through functional expression screening (Hashimoto et al. 2001). Humanin has been confirmed as a biologically active peptide that, for example, enhances insulin sensitivity (Muzumdar et al. 2009).

In 2016, another significant finding occurred with the discovery of six new peptides in the 16S rRNA. These were

named small humanin-like peptides (SHLPs). Notably, one of these peptides, SHLP-2, also acts as an insulin sensitizer (Cobb et al. 2016). Another mitochondrial-derived peptide (MDP) is mitochondrial open-reading-frame of the twelve S rRNA-c (MOTS-c). This peptide was discovered through bioinformatic methods in silico in 2015 by Lee et al. (2015). Their research revealed a short open reading frame (sORF) in the human 12S rRNA, consisting of 51 bp, which translates into a peptide comprising 16 amino acids. Interestingly, the translation does not occur using the mitochondria-specific genetic code but it is effective in the cytoplasm using the standard genetic code, making MOTS-c viable.

One of the remarkable aspects of MOTS-c is its highly conserved amino acid sequence, especially in the first 11 positions, across different animal species such as humans, bonobos, orangutans, mice, and rats (Lee et al. 2015).

Although the discovery of MOTS-c occurred just a few years ago, it has already been established as a biologically active peptide. Since mitochondria are present in almost all eukaryotic cells, mitochondria genome and MOTS-c is probably a very important regulator of metabolism. It is expressed in various tissues of laboratory rodents and can be

✉ Maciej Sassek  
maciej.sassek@up.poznan.pl

<sup>1</sup> Department of Animal Physiology, Biochemistry and Biostructure, Poznan University of Life Sciences, Poznan, Poland

detected in the blood plasma of both humans and rats (Lee et al. 2015; Kim et al. 2019).

Notably, the concentration of MOTS-c in human plasma is found to be decreased in obese people, as observed in both children and adolescent study groups (Du et al. 2018; Luo et al. 2023). Furthermore, in mice, MOTS-c has been shown to counteract diet-induced obesity and insulin resistance (Lee et al. 2015; Yang et al. 2021). Another interesting finding is that, in a mouse model, MOTS-c prevents obesity and insulin resistance induced by ovariectomy (Lu et al. 2019b). In both cases, the action of MOTS-c is mediated through the activation of 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) (Lee et al. 2015; 2019b).

These reports on the effects of MOTS-c on metabolism, especially insulin resistance and energy homeostasis, sparked our interest in investigating the impact of MOTS-c on a significant organ such as the pancreas. The pancreas is a very specific organ with a dual function, serving as both an endocrine and an exocrine gland. In our work, we specifically focused on the endocrine part, particularly on pancreatic islets, and especially on beta and alpha cells. These cells play a vital role in glucose metabolism as they are responsible for the secretion of insulin and glucagon.

The impact of MOTS-c on the pancreas and its secretory functions has not been investigated so far. To address this gap, we performed experiments on pancreatic cell lines, namely INS-1E and  $\alpha$ TC-1, which serve as reliable models for studying pancreatic  $\beta$  and  $\alpha$  cells, respectively.

## Materials and methods

### Cell culture

The cell lines were cultured in an incubator set at 37 °C with either 5% or 10% CO<sub>2</sub>. INS-1E and  $\alpha$ TC1 clone 9 cells were purchased from Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA) and ATCC (Manassas, VA, USA), respectively. Unless otherwise mentioned, all medium components were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA).

The INS-1E (Sigma Aldrich, SCC491) cells were cultured using Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Corning, New York, USA), supplemented with 2 g/l NaHCO<sub>3</sub>, glutamine, 1% antibiotic–antimycotic, 1% sodium pyruvate, 1% 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), and 0.1%  $\beta$ -mercaptoethanol, along with 10% fetal calf serum. The culture medium was replaced twice a week. For experimental purposes, the medium's composition remained the same as the culture medium, except that 10% fetal calf serum was replaced with 0.2% bovine serum albumin, which was free from free fatty acids. For experiments with variable glucose,

RPMI 1640 medium without glucose was used and glucose was supplemented to 2 mM, 6 mM, and 16 mM values.

$\alpha$ TC1 cells clone 9 (ATCC, CRL-2350) were cultured using Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) low glucose medium (Corning, NY, USA). The medium was supplemented with 15 mM HEPES, 0.1 mM nonessential amino acids, 10% fetal calf serum, 0.02% bovine serum albumin that was free from free fatty acids, and 1% antibiotic–antimycotic. The culture medium was replaced twice a week. For the experimental conditions, the medium's composition remained the same as the culture medium but without the addition of 10% fetal calf serum. For experiments with variable glucose, DMEM medium without glucose was used and glucose was supplemented to 2 mM, 6 mM, and 16 mM values.

### Experimental treatment of cells with MOTS-c

In each experiment, the cells were incubated with varying concentrations of MOTS-c (1, 10, and 100 nM) in the experimental medium. Additionally, there was a control group where cells were not exposed to MOTS-c. The MOTS-c peptide used in the experiments was purchased from Novazym (Poznan, Poland). For the  $\alpha$ TC-1 cells, the amino acid sequence of the mouse MOTS-c was MKWEEMGYIFL. On the other hand, for the INS-1E cells, the amino acid sequence of the rat MOTS-c was MKRKEMGYIFFSQRTLRLNPL.

### Immunofluorescence

The cells underwent a series of treatments to prepare them for staining. Firstly, they were treated with 4% paraformaldehyde for 10 min and then washed three times with phosphate-buffered saline (PBS). Next, the cells were permeabilized with 1% Triton X-100 in PBS for 15 min and then washed three times with PBS. Subsequently, autofluorescence was blocked using 0.1% glycine in PBS for 15 min, and after removal, the cells were blocked with 2% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 45 min.

For staining, the primary antibodies used were anti-MOTS-c, antiMOTS-c with blocking peptide, and synthetic MOTS-c; antiinsulin (in the case of INS-1E cells); and anti-glucagon (in the case of  $\alpha$ TC1 cells). The blocking peptide (cat. no. MBS543991; MyBioSource, San Diego, CA, USA) recommended for this antiMOTS-c antibody was used, and additionally the MOTS-c peptide obtained from Novazym was added to block the MOTS-c positive signals. Antibody and blocking peptides were incubated 48 h before the use. The primary antibodies were allowed to incubate for 1 h at a concentration of 1:400 in PBS buffer with 0.2% gelatin. Following this, the cells were washed three times with PBS, and then the secondary antibody was added for 15 min also in a concentration of 1:400 in PBS buffer with 0.2% gelatin.

Then, the nuclei of cells were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 1 min, and photographs were taken using LSM 510 Meta, Axiovert 200 M, AxioCamHR, LD Plan Neofluar 63x/0.75 Korr Ph2 (Zeiss, Oberkochen, Germany).

The antibodies used for staining were as follows: anti-insulin, polyclonal guinea pig, cat. no. A0564 (Agilent, Santa Clara, CA, USA); antiglucagon, polyclonal guinea pig, cat. no. 4031-01F (Merck Millipore, Burlington, MA, USA); antiMOTS-c, rabbit polyclonal, cat. no. MBS542112 (MyBioSource, San Diego, CA, USA).

The following secondary antibodies were used: Alexa Fluor 488 Goat antiguinea pig IgG, cat. no. A11073 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and Cy3 Goat antirabbit IgG, cat. no. A10520 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

### MOTS-c secretion

Both types of cells were incubated in a 96-well plate and exposed to an experimental medium with the addition of (a) oleic, stearic, and palmitic acid at a concentration of 200  $\mu$ M and without any fatty acid (control group), (b) 2, 6, and 16 mM of glucose. Additionally,  $\alpha$ TC-1 cells were incubated with an experimental medium with 1, 10, and 100 nM of glucagon and the control without glucagon, and INS-1E cells were incubated with an experimental medium with 1, 10, and 100 nM of insulin, and the control group without insulin. Incubations lasted 1.5 h.

To determine the MOTS-c levels in the medium, the Rat MOTS-c kit (Sunred, Shanghai, China) and Mouse MOTS-c kit (Sunred, Shanghai, China) were measured following the instructions provided in the attached manual. To normalize the results, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assays were conducted after each incubation, and the secretion results were normalized by comparing them with the MTT results.

### Secretion of hormones

The INS-1E cells were cultured in a 96-well plate and incubated with MOTS-c for 1.5 h. Following the incubation period, the insulin levels in the medium were measured using the RI-13 K (kit from Merck Millipore, Burlington, MA, USA), according to the instructions provided in the attached manual.

Similarly, the  $\alpha$ TC-1 cells were also cultured in a 96-well plate and incubated with MOTS-c for 1.5 h. After the incubation, the glucagon levels in the medium were measured using the GL-32 K (kit from Merck Millipore, Burlington, MA, USA), according to the instructions provided in the attached manual.

### Cell culture medium with free fatty acids

Before administering the medium to the cells, free warm fatty acids were added to the medium to achieve a concentration of 200  $\mu$ M. Subsequently, the cells were incubated at 37 °C for 1.5 h to facilitate the coupling of the fatty acids to bovine serum albumin in the medium.

### MTT

The cells were incubated for a 24-h incubation period with MOTS-c. Afterward, a 96-well plate containing the cells was used for the MTT assay. A 0.05% working solution of MTT from Merck (Darmstadt, Germany) was added to the medium in each well, and the plate was placed in an incubator for 25 min. Following the incubation, the medium was carefully removed, and the cells were dissolved in 100  $\mu$ l of dimethylsulfoxide. The plate was then placed on a thermomixer at 37 °C and gently shaken for 5 min. Subsequently, the absorbance of the cells was measured at 570 nm wavelength, and background measurements were taken at 650 nm wavelength on Synergy 2 (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

### BrdU

The cells were cultured in a 96-well plate and incubated with MOTS-c for a duration of 24 h. After this incubation period, a 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) assay was performed using the Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) kit, according to the instructions provided in the attached manual.

### Cell death

The cells were incubated with MOTS-c for 24 h in a 96-well plate. To measure the level of cell death, a Cell Death Detection ELISA Plus test was conducted according to the instructions provided in the attached manual.

### RNA extraction

The cells were incubated with MOTS-c for 24 h in a 12-well plate. Following the incubation, RNA was extracted from the cells using Extrazol reagent purchased from BLIRT (Gdansk, Poland), and the RNA extraction protocol provided in the attached manual was followed.

### Reverse transcription

Reverse transcription was performed using the High Output cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), as per the instructions provided in the manual.

## PCR

The reagent used for the reaction was HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne OÜ, Tartu, Estonia). The reaction was carried out using the QuantStudio™ 12 K Flex System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

The primer sequences utilized (5′–3′) were: Rat insulin F: CCAGTTGGTAGAGGGAGCAG, R: AGACCATCA GCAAGCAAGCGGTC. Rat insulin receptor F: CAG AAAAACCTCTTCAGGCAAT, R: TTCAAGGGATCT TCGCTTTC. Mouse glucagon F: TACACCTGTTTCGAG CTCAG, R: TTGCACCAGCATTATAAGCAA. Mouse glucagon receptor F: GATCCGAGTACGCTCGAGGA, R: GTTGTGGTGGCATTGGTCAC. GAPDH rat F: CTG CACCACCAACTGCTTAG, R: TGATGGCATGGACTG TGG. GAPDH mouse F: ATGGTGAAGGTCGGTGTG A, R: AATCTCCACTTTGCCACTGC. The PCR reaction was conducted in a 10 µl volume, containing 5 µl of HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus, 2 µl of the primer set (at a dilution of 2.5 µM), and 3 µl of cDNA. The PCR conditions were as follows: an initial denaturation step at 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, annealing at 60 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 20 s. Subsequently, a melt curve analysis was carried out with the following steps: 95 °C for 15 s, 60 °C for 60 s, and 95 °C for 15 s.

## Protein isolation

Cells were incubated with MOTS-s for 24 h on a six-well plate. Following this, they were collected using radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer supplemented with protease inhibitors. The cell lysate was then vortexed and centrifuged twice and put in a thermomixer at 4 °C and shaken at 900 rpm for 10 min. After that, the lysate was centrifuged at 13,000×g for 10 min. The resulting supernatant containing protein was transferred to new tubes, and protein concentration was measured with Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

## Western blot

An equal amount of protein with the addition of Laemmli and β-mercaptoethanol was separated through sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 12% gel electrophoresis and then transferred onto a polyvinylidene fluoride (PVDF) Western Blotting Membrane (Roche, Basel, Switzerland). To prevent nonspecific binding, the membrane was blocked using 3% bovine serum albumin. Subsequently, the membrane was incubated overnight

at 4 °C with primary antibodies (antiMOTS-c, anti-insulin receptor, and anti-glucagon receptor) at a dilution of 1:1000.

Following the primary antibody incubation, the membrane was washed with TBST buffer and then exposed to a secondary antibody (antirabbit) at a dilution of 1:5000 for 1.5 h. After another round of washing with TBST, the signal was visualized using Super Signal™ West Pico PLUS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Next, the membrane was incubated with an anti-β-actin antibody overnight at 4 °C, followed by washing with TBST and incubation with a secondary antibody (antimouse) for 1 h. The signal was visualized using Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The visualization process was performed using the ChemiDoc MP Imaging system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

The antibodies used in WB were as follows: antiMOTS-c, rabbit polyclonal, cat. no. MBS542112 (MyBioSource, San Diego, CA, USA); antiinsulin receptor middle region, rabbit polyclonal, cat. no. MBS3205807 (MyBioSource, San Diego, CA, USA); antiglucagon receptor antibody, rabbit polyclonal, cat. no. OAAF04902 (Aviva Systems Biology, San Diego, CA, USA).

The secondary antibodies used were as follows: antirabbit IgG, cat. no. 7074P2 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA); antimouse IgG, cat. no. A2304 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA).

## Results

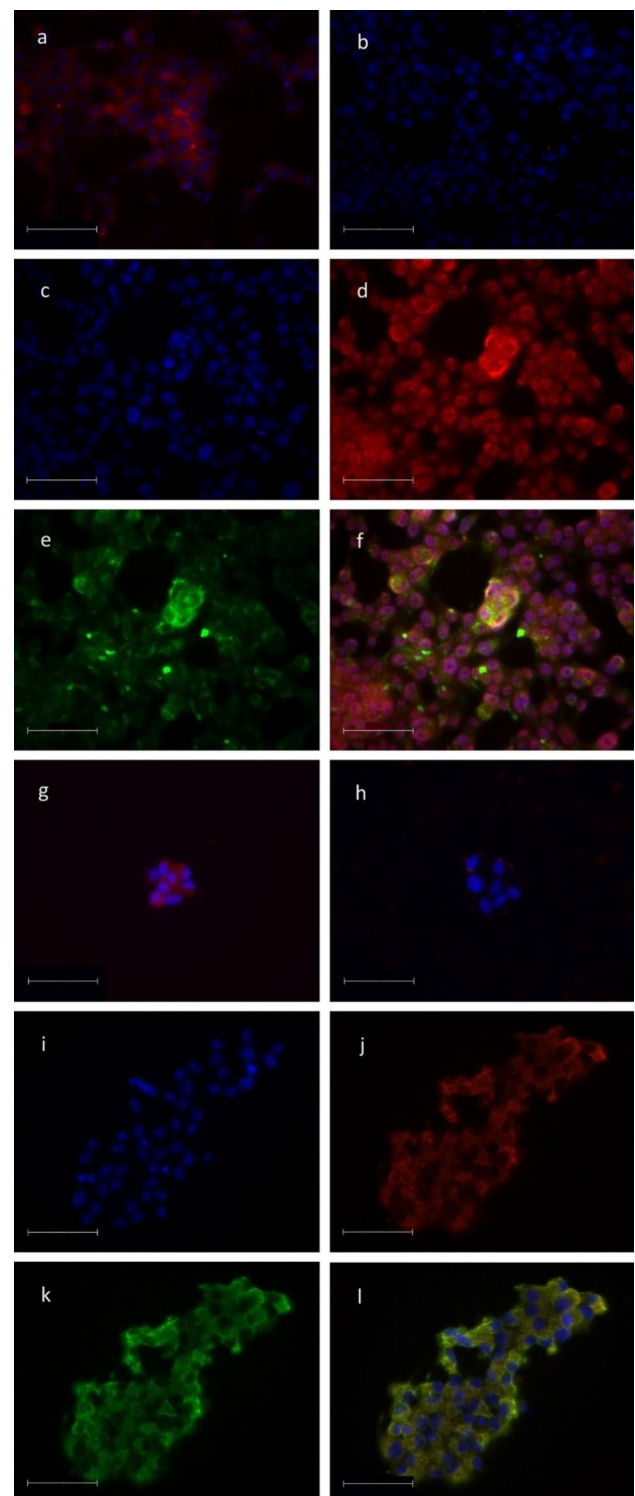
### MOTS-c is present in INS-1E and αTC-1 cells

Immunofluorescence staining showed the presence of MOTS-c in both INS-1E and αTC-1 cells (Fig. 1a, g). The use of a blocking peptide abolished the specific signal from MOTS-c (Fig. 1b, h). In addition, staining was performed to indicate the presence of insulin and glucagon in INS-1 and TC-1 cells, respectively (Fig. 1e, k). The merged images from the experiment indicate the copresence of MOTS-c along with these hormones in the endocrine pancreatic cell lines (Fig. 1f, l).

### Insulin and glucagon increase MOTS-c secretion and gene expression in INS-1E and αTC-1 cells

Secretion of MOTS-c was significantly increased in INS-1E cells that were incubated for 1.5 h with 10 nM insulin compared with the control group (Fig. 2a). Furthermore, the expression of MOTS-c at the protein level was significantly higher in cells that were incubated overnight with both 10 mM and 100 nM insulin, in comparison with the control group (Fig. 2b).

**Fig. 1** The use of antiMOTS-c antibodies demonstrates the presence of MOTS-c peptide inside the INS-1 cells (a), the lack of signal when blocking peptide was added (b), DAPI staining for INS-1E cells (c), the MOTS-c localization (d), the insulin localization (e), and MOTS-c colocalization with insulin (f). Images of MOTS-c localization (d) and insulin localization (e) were merged using ImageJ software. Analogous presence of MOTS-c was observed in  $\alpha$ TC-1 cells (g), the lack of signal when blocking peptide was added (h), DAPI staining for  $\alpha$ TC-1 cells (i), the MOTS-c localization (j), the glucagon localization (k), and MOTS-c colocalization with glucagon (l). Images of MOTS-c localization (j) and glucagon localization (k) were merged using ImageJ software. The length of the scale bar is 50  $\mu$ m



Similarly, in  $\alpha$ TC-1 cells, the secretion of MOTS-c was significantly elevated after a 1.5-h incubation in a medium containing 10 nM glucagon, as compared with the control group (Fig. 2c). Moreover, the expression of MOTS-c at protein level was significantly higher in cells that were incubated overnight with both 10 mM and 100 nM glucagon, in contrast to the control group (Fig. 2d).

### **MOTS-c lowers insulin gene secretion and expression and simultaneously increases insulin receptor gene expression in INS-1E cells, while MOTS-c increases glucagon gene secretion and expression in $\alpha$ TC-1 cells and simultaneously has no effect on glucagon receptor gene expression in $\alpha$ TC-1**

Upon treating INS-1E cells with MOTS-c for 1.5 h, a reduction in insulin secretion was observed, particularly at a concentration of 10 nM MOTS-c (Fig. 3a). Additionally, the expression of insulin mRNA was lowered in both groups treated with 10 nM and 100 nM MOTS-c (Fig. 3b). Interestingly, after overnight incubation with MOTS-c, the expression of the insulin receptor gene was enhanced, especially in the group exposed to the highest concentration of MOTS-c (Fig. 3c). However, at the protein level, the expression of the insulin receptor was higher in the group treated with 10 nM MOTS-c (Fig. 3d).

In  $\alpha$ TC-1 cells, when treated with 100 nM MOTS-c for 1.5 h, an increase in glucagon secretion was higher than in the control group (Fig. 3e). Moreover, the expression of glucagon mRNA was increased in the group incubated with 100 nM MOTS-c after overnight incubation (Fig. 3f). Simultaneously, no effect of MOTS-c on glucagon receptor expression was observed (Fig. 3g, h).

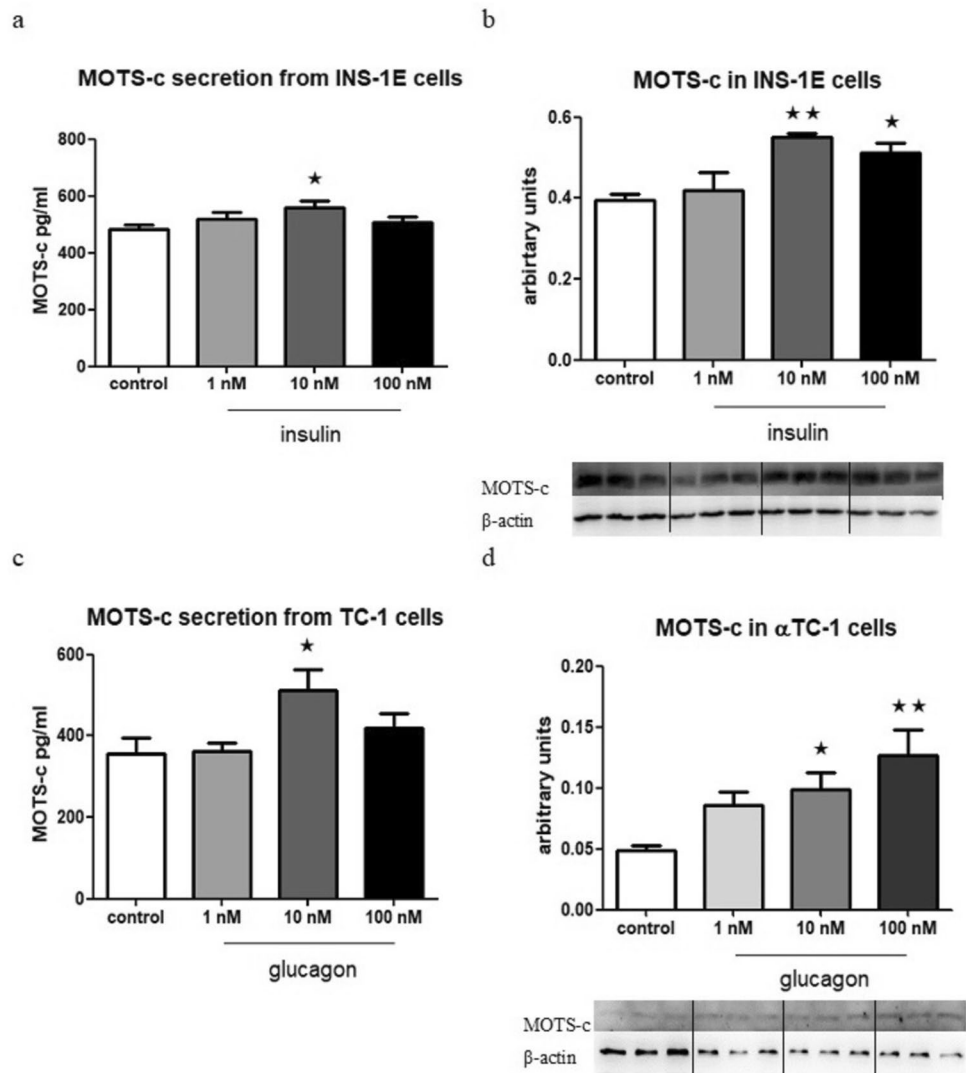
### **MOTS-c secretion and gene expression change in different glucose levels in the medium**

MOTS-c secretion was observed in higher amounts from INS-1E cells that were incubated for 1.5 h with 2 mM glucose when compared with the group incubated with 16 mM glucose (Fig. 4 a). Additionally, at the protein level, the

expression of MOTS-c was enhanced in cells incubated with 2 mM glucose compared with the cells incubated overnight with 6 mM glucose (Fig. 4 b).

In  $\alpha$ TC1 cells, the secretion of MOTS-c was higher when incubated with either 2 mM or 16 mM glucose than in the group incubated with 6 mM glucose (Fig. 4 c). On

**Fig. 2** Influence of insulin on MOTS-c secretion from INS-1E cells after 1.5 h incubation,  $p=0.0477$  (a) and on expression at protein level in INS-1E cells after 24 h of incubation,  $p=0.0093$  (b). Influence of glucagon on MOTS-c secretion from  $\alpha$ TC-1 cells after 1.5 h incubation,  $p=0.0199$  (c) and on the expression at protein level in  $\alpha$ TC-1 cells after 24 h of incubation,  $p=0.0054$  (d). The Western blot effect presented as the ratio of the MOTS-c to the  $\beta$ -actin. Data show mean  $\pm$  SEM, \* and \*\* indicate  $p$  value  $<0.05$  and  $<0.01$ , respectively



the protein level, the results indicate significant differences between the groups incubated with 2 mM glucose and 6 mM glucose (Fig. 4 d).

### Free fatty acids enhance MOTS-c secretion from INS-1E cells but lower it in $\alpha$ TC-1 cells

After a 1.5 h incubation with oleic and stearic acid, the secretion of MOTS-c from INS-1E cells was significantly higher (Fig. 5a). However, in the case of  $\alpha$ TC-1 cells, the effect was the opposite, as all three examined fatty acids—oleic, palmitic, and stearic acid—result in lower MOTS-c secretion (Fig. 5c). On the other hand, after overnight incubation, in both cell lines, stearic acid appears to lower MOTS-c expression (Fig. 5b, d).

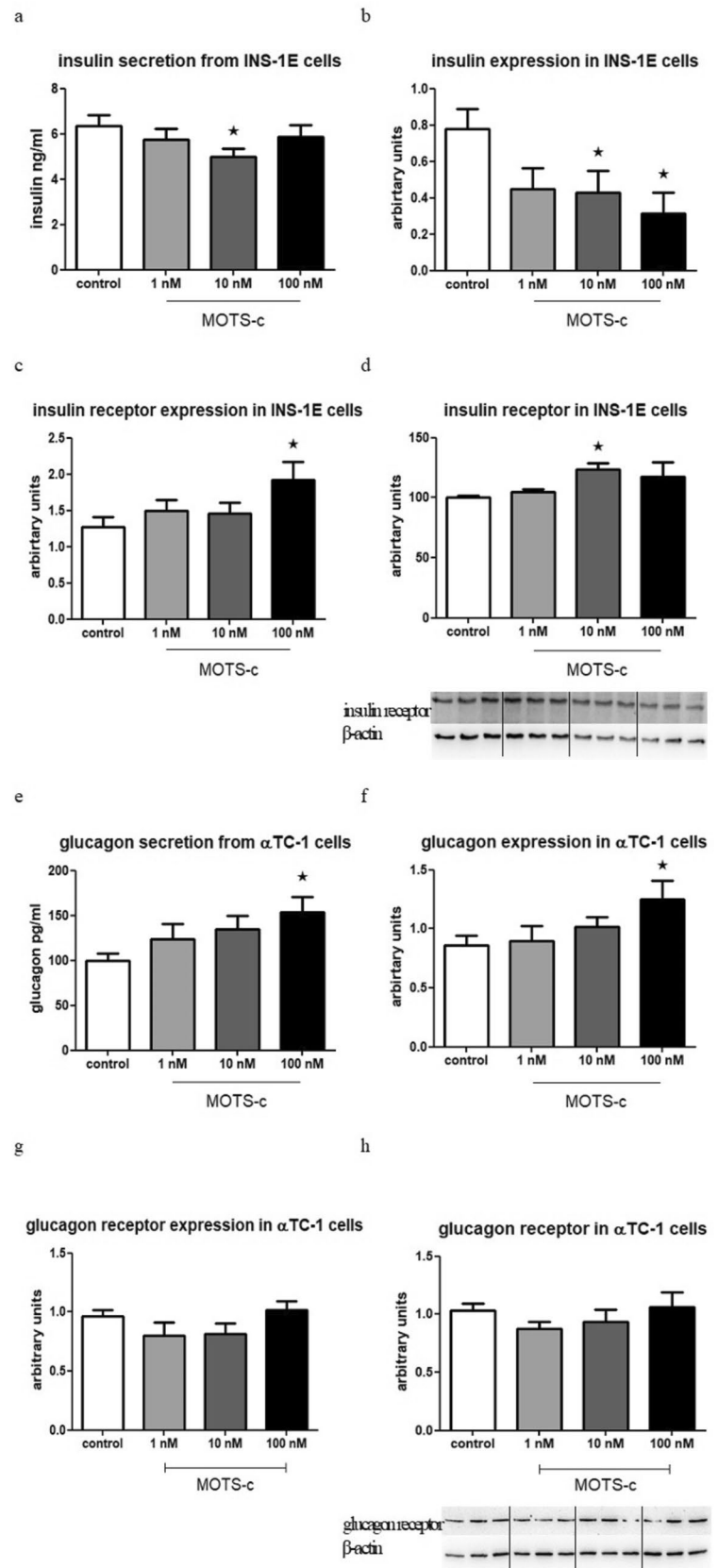
### MOTS-c enhances the viability of INS-1E cells and decreases the viability of $\alpha$ TC-1 cells

INS-1E cells treated with 100 nM MOTS-c overnight exhibited increased viability compared with the control group (Fig. 6a). However,  $\alpha$ TC-1 cells showed contrasting results, with reduced viability observed in groups treated with 10 nM MOTS-c after 24 h of incubation (Fig. 6b).

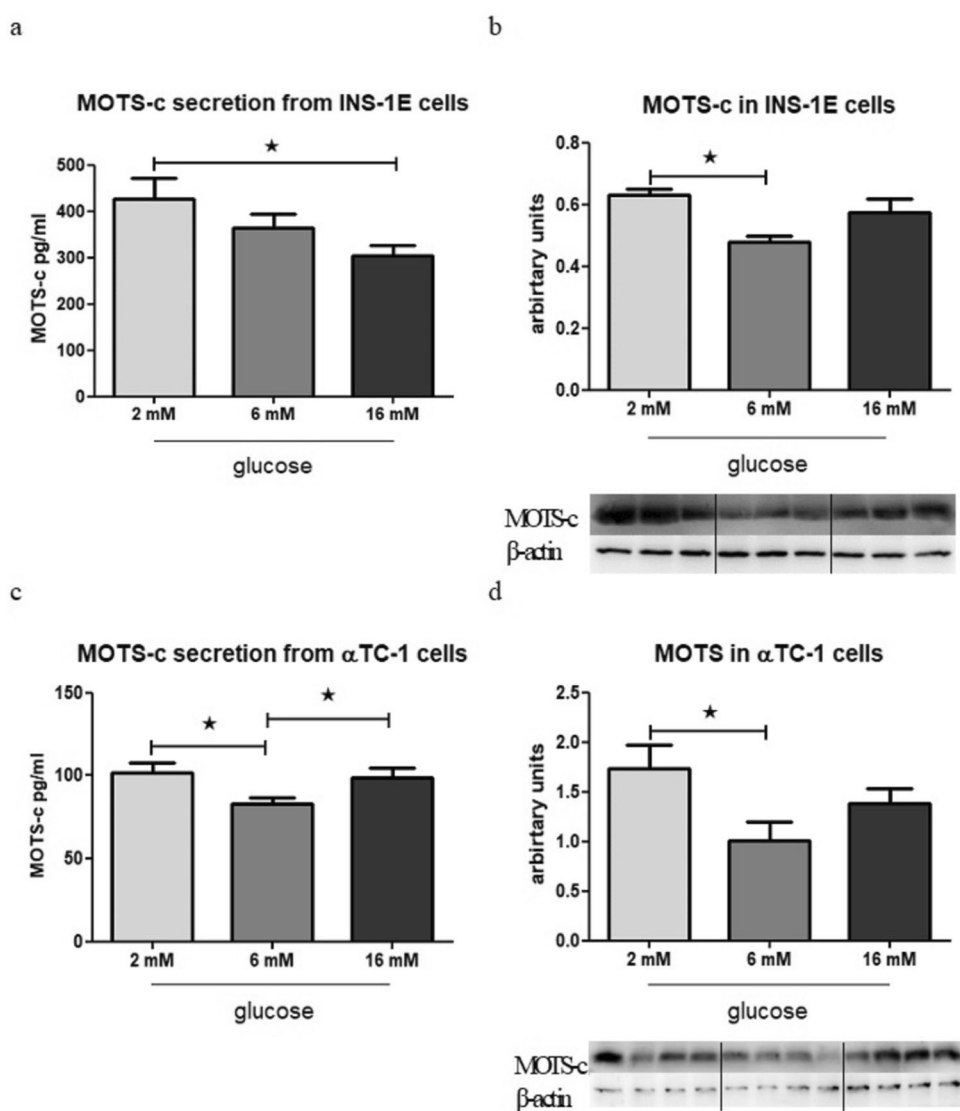
### MOTS-c lowers cell proliferation in $\alpha$ TC-1 cells but not in INS-1E

After 24 h of incubation of  $\alpha$ TC-1 cells with MOTS-c, a decrease of cell proliferation was observed in the group treated with 100 nM peptide (Fig. 6 d). Conversely, in

**Fig. 3** Insulin secretion from INS-1E cells after 1.5 h incubation with MOTS-c,  $p=0.0377$  (a), insulin gene expression in INS-1E cells after 24 h of incubation,  $p=0.0424$  (b), insulin receptor gene expression in INS-1E cells after 24 h of incubation with MOTS-c, mRNA level,  $p=0.0421$  (c), insulin receptor gene expression in INS-1E cells after 24 h of incubation with MOTS-c, protein level,  $p=0.0491$  (d). Glucagon secretion from  $\alpha$ TC-1 cells after 1.5 h incubation with MOTS-c,  $p=0.0436$  (e), glucagon gene expression in  $\alpha$ TC-1 cells after 24 h of incubation,  $p=0.0417$  (f). Glucagon receptor gene expression in  $\alpha$ TC-1 cells after 24 h of incubation with MOTS-c, mRNA level (g), glucagon receptor gene expression in  $\alpha$ TC-1 cells after 24 h of incubation with MOTS-c, protein level (h). The Western Blot effect presented as the ratio of the insulin or glucagon receptor to the  $\beta$ -actin. Data show mean  $\pm$  SEM, \* means  $p < 0.05$



**Fig. 4** Glucose influence on MOTS-c secretion after 1.5 h from INS-1E cells,  $p=0.0493$  (a) and MOTS-c expression at protein level in INS-1E cells after 24 h,  $p=0.0311$  (b). Glucose influence on MOTS-c secretion after 1.5 h from  $\alpha$ TC-1 cells,  $p=0.0261$  (c) and MOTS-c expression at protein level in  $\alpha$ TC-1 cells after 24 h,  $p=0.0459$  (d). The Western Blot effect presented as the ratio of the MOTS-c to the  $\beta$ -actin. Data show mean  $\pm$  SEM, \* means  $p < 0.05$



INS-1E cells, no significant differences in proliferation were observed (Fig. 6 c).

### MOTS-c decreases apoptosis in INS-1E and $\alpha$ TC-1 cells

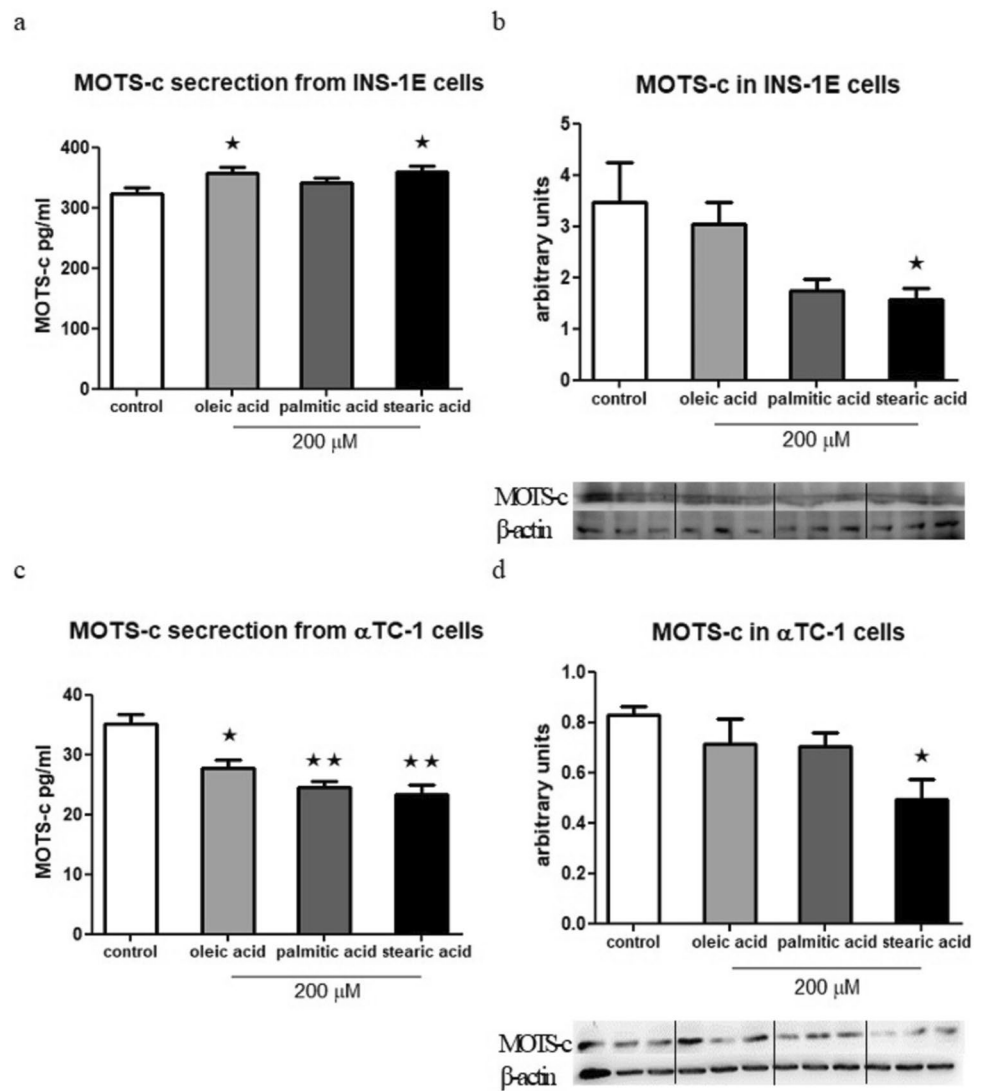
After 24 h of incubation with MOTS-c, the results indicated that this peptide lowers apoptosis in both types of examined cells. In INS-1E cells, significant changes were observed in both the 10 and 100 nM MOTS-c groups, while in  $\alpha$ TC-1 cells, changes were only observed in the 10 nM MOTS-c group (Fig. 6e, f).

### Supplementary data

MOTS-c alters the expression of some components of intracellular signaling pathways and transcription factors. We examined the expression of glucose transporter 2

(GluT2), cAMP response element-binding protein (CREB), and 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in INS-1E cells (Supplementary Fig. 1a, c, e) and glucose transporter 1 (GluT1), Pax6 transcription factor, and MafB transcription factor in  $\alpha$ TC-1 cells (Supplementary Fig. 1b, d, f). As our work does not describe these pathways in detail, we present them as supplementary data. Below are the primer sequences used in supplementary experiments on INS-1E cells: GluT2 F: TAGTCAGATTGCTGGCCTCAGCTT, R: TTGCCCTGACTTCCTTCCAACCT. CREB F: GCACAGACCACTGATGGACA, R: ACGCCATAACAACCTCCAGGG. AMPK F: GGTGAAGATCGGCCACTACAT, R: ATTTTCCCGACCACGTCCAG. Below are the primer sequences used in supplementary experiments on  $\alpha$ TC-1 cells: GluT1 F: ACCCTGGGACTGCAGGTT, R: AGGGACGGAGGGCTACTG. Pax6 F: CACCAGACTCACCTGACACC, R: TCTCACACATCTGCTCACCG. Mafb F: CAGGGCTGGTTTGGATCCT, R: TTGGCTCAATGGGAGCTCAG.

**Fig. 5** Free fatty acids influence MOTS-c secretion after 1.5 h from INS-1E cells,  $p=0.0424$  (a) and MOTS-c expression at protein level in INS-1E cells after 24 h,  $p=0.0317$  (b). Free fatty acids influence on MOTS-c secretion after 1.5 h from  $\alpha$ TC-1 cells,  $p=0.0015$  (c) and MOTS-c expression at protein level in  $\alpha$ TC-1 cells after 24 h,  $p=0.0401$  (d). The Western Blot effect presented as the ratio of the MOTS-c to the  $\beta$ -actin. Data show mean  $\pm$  SEM, \* and \*\* mean  $p < 0.05$  and  $< 0.01$ , respectively



## Statistical analysis

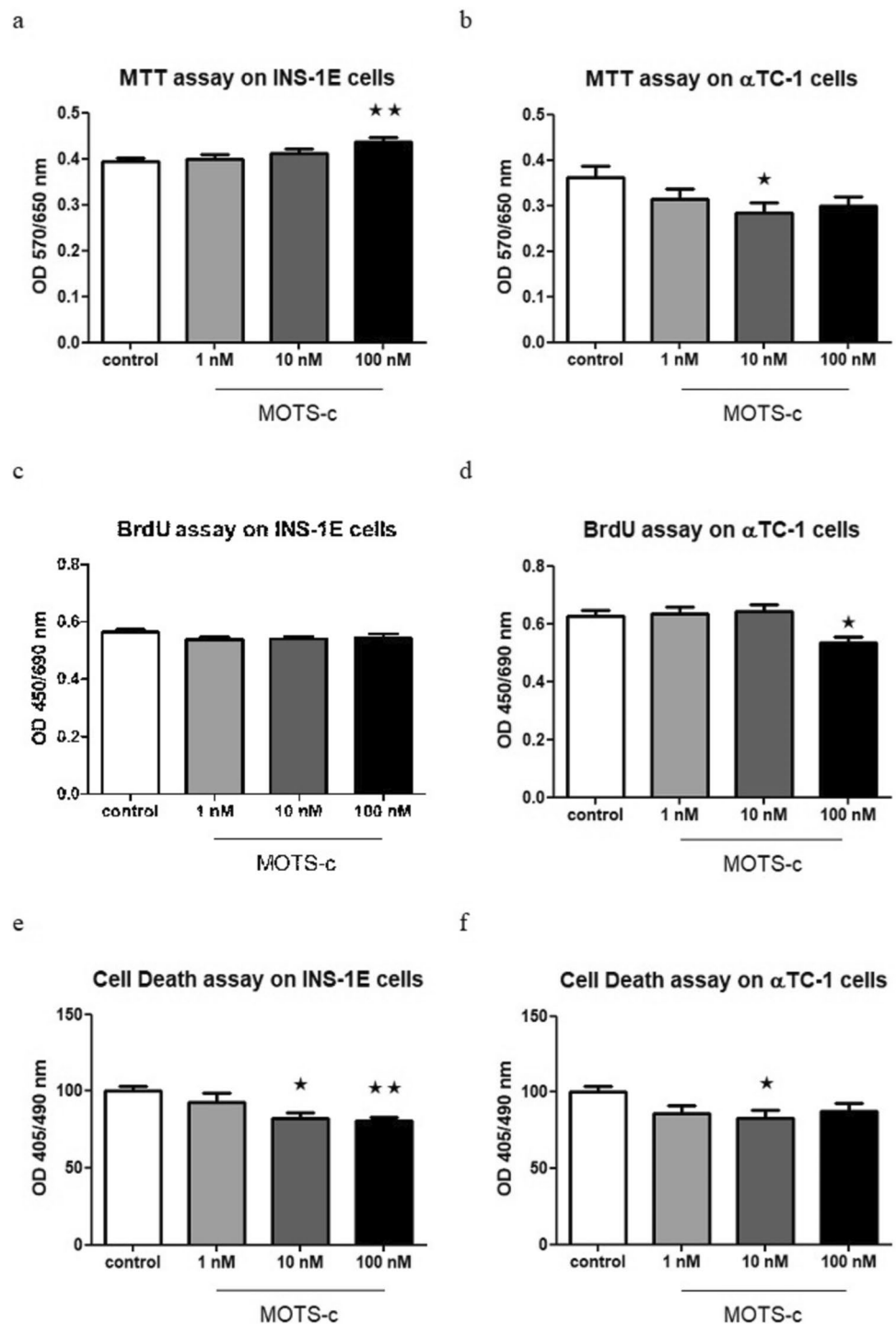
All analyses were carried out using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The results are presented as the arithmetic mean  $\pm$  SEM. The significance of differences was determined using one-way analysis of variance (ANOVA) with a Dunnett post hoc test, comparing the results with the control group. Additionally, a Tukey post hoc test was employed when comparing groups with each other. Statistical significance is denoted by \* for  $p < 0.05$  and \*\* for  $p < 0.01$ .

## Discussion

MOTS-c is a novel peptide that has captured the interest of researchers since its discovery. It has been found to exert a significant impact, particularly on muscle tissue. In vitro

research has demonstrated that MOTS-c enhances muscle differentiation in human (LHCN-M2) and mice (C2C12) cell lines (García-Benlloch et al. 2022). Additionally, it may act against skeletal muscle wasting induced by insulin resistance (Kumagai et al. 2021). Besides its effect on muscle tissue, MOTS-c also influences adipose tissue by promoting adipose thermogenesis to counteract hypothermia (Lu et al. 2019a). Furthermore, there are studies indicating its protective effect on pancreatic islets in type I diabetes in mice (Kong et al. 2021). Similar observations regarding the protective effect of MOTS-c on pancreatic islets and increasing insulin sensitivity in C2C12 cells were also demonstrated in the work of Yin et al. (Yin et al. 2022). At the same time, a decrease in the amount of MOTS-c peptide in the blood of people with diabetes has been observed (Ramanjaneya et al. 2019). All of these findings highlight the importance of MOTS-c as a crucial metabolic factor.

**Fig. 6** Effect of 24 h incubation with MOTS-c at doses of 1, 10, and 100 nM. MTT assay performed on INS-1E cells,  $p=0.0096$  (a) and  $\alpha$ TC-1 cells,  $p=0.0428$  (b), BrdU assay on INS-1E cells (c) and  $\alpha$ TC-1 cells,  $p=0.015$  (d), and cell death assay on INS-1E cells,  $p=0.008$  (e) and  $\alpha$ TC-1 cells,  $p=0.0419$  (f). Data show mean  $\pm$  SEM, \* and \*\* mean  $p < 0.05$  and  $< 0.01$ , respectively



The aim of this study is to determine the influence of MOTS-c on pancreatic cell lines INS-1E and  $\alpha$ TC-1, representing  $\beta$  and  $\alpha$  cells involved in glucose metabolism. The study showed that MOTS-c is present in both INS-1E and  $\alpha$ TC-1 cells under normal conditions (Fig. 1). This is not surprising, as MOTS-c, being a mitochondrial peptide, is also found in pancreatic endocrine cells. Although there were no specific MOTS-c-producing cells in the pancreas,

it was expressed in cells producing insulin and glucagon. Considering its mitochondrial origin, it is likely that MOTS-c is distributed widely in various tissues and cells throughout the entire organism. Consequently, endogenous, as well as exogenous, peptides may impact many aspects of cellular physiology through paracrine and endocrine interactions.

This study also investigated the influence of the main pancreatic hormones on MOTS-c secretion from pancreatic

cells. Both insulin and glucagon were found to enhance the secretion of MOTS-c. This suggests that MOTS-c may be cosecreted with other hormones when the secretory activity of the cell is elevated. Existing studies indicate that MOTS-c can regulate metabolism in different tissues, such as skeletal muscle (Lee et al. 2015). However, it is important to remember that INS-1E and  $\alpha$ TC-1 cells are model cells, functioning in isolated monoculture, rather than in a more complicated environment with various types of cells, as seen in pancreatic islets, where many other hormones circulate and intercellular reactions occur. Nevertheless, the results obtained in this study demonstrate an undisturbed, direct increasing effect of pancreatic hormones on MOTS-c secretion.

The subsequent part of this research aimed to examine the effect of MOTS-c on the secretion of the two main pancreatic hormones: insulin and glucagon. The results revealed that, after incubation with MOTS-c, there was a decrease in insulin secretion and expression in INS-1E cells, while glucagon secretion and expression increased in  $\alpha$ TC-1 cells. These findings strongly suggest that MOTS-c plays a major role in regulating pancreatic cells and glucose metabolism. Additionally, the expression of the insulin receptor was enhanced, indicating higher insulin sensitivity in  $\beta$  cells, which aligns with previous discoveries demonstrating that MOTS-c increases cellular insulin sensitivity (Lee et al. 2015). Additionally, the experiment showed a feedback loop between MOTS-c and insulin. Insulin increases MOTS-c secretion, while MOTS-c, in turn, lowers insulin secretion. However, no similar relationship was observed with glucagon. It is known that there are many different regulators of glucagon secretion, such as glucose, which, when released via glucagon activity, inhibits glucagon secretion (Fig. 3).

Furthermore, additional tests were conducted in this study to examine MOTS-c secretion after incubation with glucose. It is worth noting that these experiments required a change in the basal cell medium since INS-1E and  $\alpha$ TC-1 cells are standard cultured in different glucose concentrations (11 mM and 5.6 mM, respectively). This change was necessary to examine MOTS-c secretion under hypo-, normo-, and hyperglycemic conditions, which simulate hunger, homeostasis, postprandial status, or diabetes. The results obtained from these tests on model cells demonstrated that energetic compounds can directly modulate the secretion of MOTS-c, further confirming its role in regulating metabolism.

Additionally, the study revealed that glucagon secretion increases in low glucose concentrations, and interestingly, glucagon itself acts as an enhancer of MOTS-c secretion. This finding suggests that, under conditions of hunger, characterized by low blood glucose levels and high glucagon levels, MOTS-c may serve as a stimulant for various ways of gaining energy, such as through lipolysis and fatty acids or glycogenolysis and glucose (Figs. 4 and 5).

Finally, we examined the influence of MOTS-c on the viability of pancreatic endocrine cells, which is of significant importance in type II diabetes, where beta cell damage and reduced functioning play a crucial role in disease development (Porte 1991). The results showed that MOTS-c reduces apoptosis in both types of examined cell lines, aligning with the known protective effects of MOTS-c and other MDPs (Merry et al. 2020). An interesting observation was that MOTS-c acts differently on alpha and beta cell lines concerning cell viability, as measured by the MTT assay. While it enhances viability in INS-1E cells, there is the opposite effect in  $\alpha$ TC-1 cells. This difference could be related to the fact that MOTS-c also modulates hormone secretion in these cells, and the altered viability may be influenced by the varying levels of hormone secretion. It is plausible that cells that secrete more (glucagon from  $\alpha$ TC-1) might exhibit lower vitality (Fig. 6).

MOTS-c has emerged as an exceptionally attractive peptide for examination. Especially its protective effect on the heart seems worth further attention (Wang et al. 2023; Zhong et al. 2022; Li et al. 2022). It ranks high on the list of potential candidates for medical use as a drug. Its unique way of affecting metabolism, leading to the nonoxidation of glucose through glycolysis, suggests that MOTS-c may have fewer disadvantages as a medicine compared with other AMPK-activating substances that could cause more side effects (Gao et al. 2023).

## Conclusions

The direct impact of MOTS-c on pancreatic cell functioning has not been examined previously, but MOTS-c is a very significant regulator of pancreatic function. The results obtained from this study provide good fundamentals for further experiments. While cell lines serve as common models for initial experiments, the next step should involve experiments with isolated pancreatic islets to observe how MOTS-c influences pancreatic physiology in a more complex and physiological environment beyond cell culture conditions.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00418-024-02274-0>.

**Author contributions** J.B.: conceptualization, methodology, investigation, writing original draft. E.P.O., P.K., N.L., D.S.: methodology and investigation. M.S.: writing, review and editing, project administration, funding acquisition, supervision.

**Funding** The project was financed by the National Science Centre, grant no. 2018/31/D/NZ4/01121.

**Data availability** The data that support the findings of this study are not openly available and are available from the corresponding author upon reasonable request.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG et al (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457–465. <https://doi.org/10.1038/290457a0>
- Cobb LJ, Lee C, Xiao J et al (2016) Naturally occurring mitochondrial-derived peptides are age-dependent regulators of apoptosis, insulin sensitivity, and inflammatory markers. *Aging* 8:796–809. <https://doi.org/10.18632/aging.100943>
- Du C, Zhang C, Wu W et al (2018) Circulating MOTS-c levels are decreased in obese male children and adolescents and associated with insulin resistance. *Pediatr Diabetes* 19:1058–1064. <https://doi.org/10.1111/pedi.12685>
- Gao Y, Wei X, Wei P et al (2023) MOTS-c functionally prevents metabolic disorders. *Metabolites* 13:125. <https://doi.org/10.3390/metab13010125>
- García-Benlloch S, Revert-Ros F, Blesa JR, Alis R (2022) MOTS-c promotes muscle differentiation in vitro. *Peptides (NY)* 155:170840. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2022.170840>
- Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H et al (2001) A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and A $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6336–6341. <https://doi.org/10.1073/pnas.101133498>
- Kim SJ, Miller B, Mehta HH et al (2019) The mitochondrial-derived peptide MOTS-c is a regulator of plasma metabolites and enhances insulin sensitivity. *Physiol Rep*. <https://doi.org/10.14814/phy2.14171>
- Kong BS, Min SH, Lee C, Cho YM (2021) Mitochondrial-encoded MOTS-c prevents pancreatic islet destruction in autoimmune diabetes. *Cell Rep* 36:109447. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109447>
- Kumagai H, Coelho AR, Wan J et al (2021) MOTS-c reduces myostatin and muscle atrophy signaling. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* 320:E680–E690. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00275.2020>
- Lee C, Zeng J, Drew BG et al (2015) The mitochondrial-derived peptide MOTS-c promotes metabolic homeostasis and reduces obesity and insulin resistance. *Cell Metab* 21:443–454. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.02.009>
- Li S, Wang M, Ma J et al (2022) MOTS-c and exercise restore cardiac function by activating of NRG1-ErbB signaling in diabetic rats. *Front Endocrinol (Lausanne)*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.812032>
- Lu H, Tang S, Xue C et al (2019) Mitochondrial-derived peptide MOTS-c increases adipose thermogenic activation to promote cold adaptation. *Int J Mol Sci*. <https://doi.org/10.3390/ijms20102456>
- Lu H, Wei M, Zhai Y et al (2019) MOTS-c peptide regulates adipose homeostasis to prevent ovariectomy-induced metabolic dysfunction. *J Mol Med* 97:473–485. <https://doi.org/10.1007/s00109-018-01738-w>
- Luo YH, Xie L, Li JY et al (2023) Serum MOTS-C levels are decreased in obese children and associated with vascular endothelial function. *Diabetes, Metab Syndrome Obesity* 16:1013–1020. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S403934>
- Merry TL, Chan A, Woodhead JST et al (2020) Mitochondrial-derived peptides in energy metabolism. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* 319:E659–E666. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00249.2020>
- Muzumdar RH, Huffman DM, Atzmon G et al (2009) Humanin: a novel central regulator of peripheral insulin action. *PLoS ONE* 4:e6334. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006334>
- Porte D (1991)  $\beta$ -cells in type II diabetes mellitus. *Diabetes* 40:166–180. <https://doi.org/10.2337/diab.40.2.166>
- Ramanjaneya M, Bettahi I, Jerobin J et al (2019) Mitochondrial-derived peptides are down regulated in diabetes subjects. *Front Endocrinol (Lausanne)*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00331>
- Wang M, Wang G, Pang X et al (2023) MOTS-c repairs myocardial damage by inhibiting the CCN1/ERK1/2/EGR1 pathway in diabetic rats. *Front Nutr*. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1060684>
- Yang B, Yu Q, Chang B et al (2021) MOTS-c interacts synergistically with exercise intervention to regulate PGC-1 $\alpha$  expression, attenuate insulin resistance and enhance glucose metabolism in mice via AMPK signaling pathway. *Biochem Biophys Acta Mol Basis Dis*. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166126>
- Yin Y, Pan Y, He J et al (2022) The mitochondrial-derived peptide MOTS-c relieves hyperglycemia and insulin resistance in gestational diabetes mellitus. *Pharmacol Res*. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105987>
- Zhong P, Peng J, Hu Y et al (2022) Mitochondrial derived peptide MOTS-c prevents the development of heart failure under pressure overload conditions in mice. *J Cell Mol Med* 26:5369–5378. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17551>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



# MOTS-c modulates pancreatic islet function in rats and pigs in vitro

Jakub Bień<sup>1</sup> · Ewa Pruszyńska-Oszmalek<sup>1</sup> · Paweł Kolodziejcki<sup>1</sup> · Natalia Leciejewska<sup>1</sup> · Dawid Szczepankiewicz<sup>1</sup> · Emilia Grzęda<sup>1</sup> · Maciej Sassek<sup>1</sup>

Accepted: 14 May 2025  
© The Author(s) 2025

## Abstract

MOTS-c is a promising regulator of metabolism and energy homeostasis. While its effects have been studied in cell lines, our team aimed to investigate its influence on more complex structures—specifically, isolated pancreatic islets. We used two animal models: the rat, which is commonly studied, and the pig, which shares greater physiological similarities with humans. This study assessed the expression and secretion of insulin and glucagon, the expression of their receptors, cell viability, and cell death following MOTS-c treatment of the islets. Additionally, we examined how MOTS-c secretion is affected by different incubation media, such as the presence of free fatty acids, pancreatic hormones, and different glucose concentrations. The results indicate that MOTS-c impacts pancreatic islet physiology by, for example, reducing insulin and glucagon secretion and enhancing cell viability. Notably, the effects differed between the two species, which may be attributed to anatomical differences in their pancreatic islets or structural variations in rat and pig MOTS-c. These facts may lead to the conclusion that if MOTS-c may be helpful in human medicine, the pig model should be considered another valuable choice.

**Keywords** MOTS-c · Pancreas · Pancreatic islets

## Introduction

The continuous development of biological sciences continues to uncover new peptides that regulate key physiological functions. With the development of innovative research methods, new discoveries and insights are constantly emerging. Seventy years ago, the structure of DNA was described (Watson and Crick 1953). Ten years later, mitochondrial DNA was identified (Nass and Nass 1963). In the early twenty-first century, the first mitochondrial-derived peptide, humanin, was discovered in Hashimoto's laboratory (Hashimoto et al. 2001).

Nearly a decade ago, MOTS-c peptide (mitochondrial open reading frame of the 12S rRNA-c) was identified. It was first discovered in silico as a short open reading frame within the 12S rRNA gene of the mitochondrial genome. MOTS-c is highly conserved across multiple species and is expressed in various tissues and organs, including the heart,

kidneys, and muscles (Lee et al. 2015). Initial studies demonstrated that MOTS-c plays a significant role in metabolism and insulin resistance (Lee et al. 2015). Since then, many additional studies have explored its functions (Mohtashami et al. 2022). For example, it has been shown to provide protection in lipopolysaccharide-induced septic cardiomyopathy (Wu et al. 2023) and to exert a potential therapeutic effect in postoperative acute lung injury by mitigating damage and suppressing ferroptosis caused by myocardial ischemia–reperfusion (Lu et al. 2023). Moreover, MOTS-c plasma levels appear to be associated with obesity, as reduced levels have been observed in men, adolescents, and children with obesity (Du et al. 2018; Luo et al. 2023).

However, the functions of this peptide are still undiscovered and undescribed. In particular, limited research has investigated the peptide's role in the pancreas and pancreatic islets. It is known that MOTS-c exerts a protective effect on pancreatic islets in type 1 diabetes mellitus (Kong et al. 2021) and that it alleviates hyperglycemia and insulin resistance in gestational diabetes mellitus (Yin et al. 2022).

In our previous study (Bień et al. 2024), we examined the effects of MOTS-c on pancreatic cell metabolism using laboratory cell line models (INS-1E and  $\alpha$ TC-1). Since the results were promising for further research, we decided to

✉ Maciej Sassek  
maciej.sassek@up.poznan.pl

<sup>1</sup> Department of Animal Physiology, Biochemistry and Biostructure, Poznan University of Life Sciences, Poznan, Poland

examine how MOTS-c changes pancreas metabolism using a more complex structure as a test object—isolated pancreatic islets obtained from rats and pigs. Both animals are widely used as model organisms in biomedical research (Ericsson et al. 2013), and they offer contrasting pancreatic islets. In rats, the pancreas is dispersed throughout the intestinal mesentery, and the islets exhibit a distinct organization, with  $\beta$ -cells located centrally and  $\alpha$ -cells at the periphery. In contrast, pigs have a more compact pancreas, and their islets lack such clear segregation, resembling the islet structure of the human pancreas more closely (Hoang et al. 2014).

## Materials and methods

### Animal information

Male Wistar rats, each weighing approximately 300 g, were obtained from the Animal House of the Mossakowski Medical Research Institute, Polish Academy of Sciences. Piglets of the Złotnicka White pig, weighing approximately 7–8 kg, were acquired from the Swadzim Agricultural Experimental Farm at the Poznań University of Life Sciences. All experimental procedures were conducted in accordance with Polish law and the guidelines of the Local Ethical Commission for Animal Research.

The MOTS-c peptide used in the experiments was purchased from Novazym (Poznań, Poland). For experiments involving rat islets, the rat-specific MOTS-c amino acid sequence—MKRKEMGYIFFSQRTLRLNPL—was used. For experiments involving pig islets, the human MOTS-c sequence—MRWQEMGYIFYPRKLR—was used, as the porcine MOTS-c sequence has not yet been identified. Given that pigs are physiologically closer to humans than rats, especially in pancreatic structure, we chose to use the human MOTS-c peptide in our pig-based experiments.

### Isolation of rat pancreatic islets

Male Wistar rats were decapitated and exsanguinated, after which the dissection procedures were carried out immediately. The abdominal cavity was opened, and clamps were placed on the duodenum near the pancreatic duct estuary. The pancreatic duct was then severed, and a cannula was inserted. A total of 13 ml of Hanks' balanced salt solution (HBSS, 0.137 M NaCl, 5.37 mM KCl, 4.17 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.26 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.84 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 0.34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) containing 13 Wunsch units of Liberase TL (cat. no. 05401020001, Roche, Basel, Switzerland) was injected into the pancreas. The pancreas was excised, transferred to a Falcon tube, and incubated in a water bath at 37 °C for 11 min. Following incubation, the tube was shaken vigorously for 30 s. The enzymatic digestion

was stopped by adding HBSS supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). The islets were washed and manually isolated under a binocular microscope (Delta Optical, Poznań, Poland), then transferred into Krebs Ringer buffer (KRB, 115 mM NaCl, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, and 0.5% bovine serum albumin, BSA) containing 6 mM glucose. They were incubated at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> for 1.5 h to allow regeneration. Approximately 50 islets were collected for RNA or protein extraction. For RNA isolation, islets were frozen in 500  $\mu$ l of TRIzol (cat. no. 15596026, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); for protein extraction, they were frozen in 200  $\mu$ l of radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA, cat. no. 20-188, Merck Millipore, Burlington, MA, USA). All samples were stored at –80 °C until further processing.

### Isolation of pig pancreatic islets

Pancreatic islets were isolated from the Złotnicka White piglets via enzymatic digestion of the pancreas. The animals were killed by an overdose of anesthetics and sedatives administration (medetomidine 200  $\mu$ g/kg of body weight and ketamine 40 mg/kg of body weight) and then exsanguinated by intracardiac puncture. The pancreas was excised and placed in HBSS. Approximately 2 g of pancreatic tissue was transferred into a Falcon tube containing 10 ml of HBSS and finely chopped with scissors. Collagenase P (cat. no. 11213873001, Roche, Basel, Switzerland) was then added to the solution. The tube was incubated in a water bath at 37 °C for 12 min, followed by vigorous shaking outside the bath for 1 min. Enzymatic digestion was stopped by adding 90 ml of HBSS supplemented with 10% FBS. The islets were washed and manually isolated under a binocular microscope (Delta Optical, Poznań, Poland), then transferred to KRB containing 6 mM glucose. They were incubated at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> for 1.5 h to allow for regeneration. Approximately 50 islets were collected for RNA or protein isolation. For RNA extraction, islets were frozen in 500  $\mu$ l of TRIzol (cat. no. 15596026, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); for protein extraction, they were frozen in 200  $\mu$ l of RIPA (cat. no. 20-188, Merck Millipore, Burlington, MA, USA). Samples were stored at –80 °C until further analysis.

### Protein isolation

Pancreatic islets were incubated for 24 h in a 12-well plate. Following incubation, the islets were collected using RIPA buffer supplemented with cComplete protease inhibitor tablets (cat. no. 04693116001, Roche, Basel, Switzerland) for protein isolation. The lysate was mixed using a vortex and centrifuged (two times). The tubes were then placed on a thermomixer and shaken at 900 rpm at 4 °C for 10 min. The

samples were then centrifuged for 10 min at  $13,000\times g$ . The resulting supernatant was carefully transferred to new tubes. Protein concentrations were measured using the Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), following the manufacturer's protocol.

### Western blot

The Western blot procedure followed the protocol described in Bieñ et al. (2024). Briefly, equal amounts of protein (15  $\mu\text{g}$ ) were separated by 12% gel electrophoresis (SDS PAGE) and transferred onto a 0.2- $\mu\text{m}$  PVDF membrane. The membrane was blocked using 3% BSA and incubated overnight with the primary antibody 1:1000. After the membrane was washed with tris-buffered saline with Tween-20 (TBST), it was incubated with a secondary antibody 1:5000 for 1.5 h. Secondary antibodies were conjugated with horseradish peroxidase and the signal detection method was chemiluminescence. The signal corresponding to the target protein was measured. Subsequently, the membrane was incubated overnight with anti- $\beta$ -actin or antiGAPDH antibody 1:5000, washed with TBST, and incubated again with a secondary antibody 1:5000. The signal for the reference protein was visualized using Super Signal™ West Pico PLUS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and detected using the ChemiDoc MP Imaging system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

The antibodies and blocking peptide used for Western blotting were as follows: antiMOTS-c, rabbit polyclonal (cat. no. MBS542112, MyBioSource, San Diego, CA, USA); blocking peptide (cat. no. MBS543991, MyBioSource, San Diego, CA, USA); anti- $\beta$ -actin (cat. no. A1978, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); antiGAPDH (cat. no. G8795, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The secondary antibodies used were as follows: antirabbit IgG (cat. no. 7074P2, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) and antimouse IgG (cat. no. A2304, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

### Immunofluorescence

Rat and pig pancreases were dissected out and placed in Bouin's reagent (150 ml picric acid, 50 ml formaldehyde, 10 ml acetic acid; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) immediately. Subsequently, fixed pancreases were embedded in paraffin, and sliced in 5- $\mu\text{m}$  sections using a microtome. Paraffin was removed by heating the slides at 60 °C for 45 min. The sections were then rehydrated through graded alcohol solutions with decreasing concentrations (100%, 85%, 70%, 60%, 50%, water). Antigen retrieval was performed by boiling the slides in citrate buffer (pH 6, 10 mM disodium citrate and 0.05% Tween-20) three times for 5 min each, then cooling at room temperature for 20 min. Afterward, the samples were rinsed with water for 5 min.

The tissue sections on the slides were encircled using a Dako Pen to contain the reagents during incubation.

To reduce autofluorescence, the samples were incubated in 15 mM glycine solution for 5 min, washed in phosphate-buffered saline (PBS), incubated in 0.2% gelatin solution, and washed again with PBS. Primary antibodies were then applied to stain for MOTS-c 1:200 (with and without 100  $\mu\text{l}$  of blocking peptide in a concentration 2.5 mg/ml), insulin 1:400, and glucagon 1:400 in PBS buffer with 0.2% gelatin. Sections were incubated with primary antibodies overnight. For MOTS-c staining with blocking peptide, the antibodies were preincubated with the peptide for 48 h before application. Following primary antibody incubation, all samples were washed and incubated for 1 h in PBS containing 0.2% BSA. The secondary antibody was added for 15 min also in a concentration of 1:400 in PBS buffer with 0.2% gelatin. Finally, cell nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 1 min. Images were captured using a Leica DMI8 fluorescence microscope (camera Leica K5-14403549, 16 bits, 2048 pixels, software system LAS X, objective HC PL FLUOTAR L 20 $\times$ /0.40 DRY, aperture 0.4).

The antibodies and blocking peptide used for immunofluorescence were as follows: antiMOTS-c, rabbit polyclonal (cat. no. MBS542112, MyBioSource, San Diego, CA, USA); blocking peptide (cat. no. MBS543991, MyBioSource, San Diego, CA, USA); anti-insulin, polyclonal guinea pig (cat. no. A0564, Agilent, Santa Clara, CA, USA); and antiglucagon, polyclonal guinea pig (cat. no. 4031-01F, Merck Millipore, Burlington, MA, USA). The secondary antibodies used were Alexa Fluor 488 goat antiguinea pig IgG (cat. no. A11073, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and Cy3 Goat antirabbit IgG (cat. no. A10520, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

### MOTS-c secretion and cell culture medium with free fatty acids

Pancreatic islets were placed in a 48-well plate, with five islets per well, and incubated for 1.5 h in Krebs buffer. The control group received buffer without any additives, while experimental groups received Krebs buffer supplemented with: (a) 200  $\mu\text{M}$  of oleic, stearic, or palmitic acid; (b) insulin at concentrations of 1, 10, or 100 nM; (c) glucagon at concentrations of 1, 10, or 100 nM. Additionally, rat and pig pancreatic islets were incubated for 1.5 h in experimental media containing glucose at concentrations of 2, 6, or 16 mM. MOTS-c levels in the incubation medium were measured using rat and pig MOTS-c ELISA kits (SunRed, Shanghai, China), following the manufacturer's instructions.

Before islets were incubated in the medium, warm, free fatty acids were added to the medium, resulting in a final concentration of 200  $\mu\text{M}$  of each free fatty acid. Then, the

experimental medium was incubated for 1.5 h at 37 °C to couple free fatty acids to BSA in the medium.

### Secretion of hormones

Rat and pig pancreatic islets were incubated for 1.5 h in a 48-well plate with varying concentrations of MOTS-c (1 nM, 10 nM, and 100 nM or alternatively 10 nM and 100 nM in Krebs Ringer buffer), along with a control group that received no MOTS-c. After incubation, hormone concentrations were measured using ELISA kits specific to each species. Insulin levels were assessed using the Rat Insulin (INS) ELISA Kit and the Pig Insulin (INS) ELISA Kit (SunRed, Shanghai, China), while glucagon levels were determined using the Rat Glucagon (GC) ELISA Kit and the Pig Glucagon (GC) ELISA Kit (all from SunRed, Shanghai, China). All measurements were conducted according to the protocols provided by the manufacturer.

### RNA extraction, reverse transcription, and PCR

Pancreatic islets were incubated for 24 h in 12-well plates. Following incubation, total RNA was extracted using TRIzol according to the manufacturer's instructions and was measured by Implen NP80 NanoPhotometer (Implen, Munich, Germany). Reverse transcription was then performed using the High Output cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), following the protocol provided in the kit manual.

Quantitative PCR was carried out using the HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne OÜ, Tartu, Estonia) on the QuantStudio™ 12K Flex System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The primer sequences (5'–3') were as follows. Rat insulin F: CCAGTTGGTAGAGGGAGCAG, R: AGACCATCAGCAAGCAAGCGGTC; insulin receptor F: CAGAAAACCTCTTCAGGCAAT, R: TTCAAGGGATCTTCGCTTTC; glucagon F: AAGATGGTTGTGAATGGTGAAA, R: TGA GATGAACACGATTCTCGAT; glucagon receptor F: TTC TGTTGCAGACCAGCTCA, R: GTGACCAGTGCCACCACA; GAPDH F: CTGACCACCAACTGCTTAG, R: TGA TGGCATGGACTGTGG; pig insulin F: GTGGCATCGTGGAGCAGT, R: CGGCCTAGTTGCAGTAGTTCTC; insulin receptor F: AACGCCAGGGACATCGTCAA, R: CTT TGGACACCACCCAGG; glucagon F: CATCAGCCA CTGCACAAAAT, R: AGGGCACGTTTACCAGTGAC; glucagon receptor F: GTCACGAAGGCAAACACCAC, R: CTGCCCTGGTACCACAAAGT; TATA-box binding protein (TBP) F: TTGAGAACATCTACCCTATCC, R: CGT CCACAACACCACCATT.

The PCR reaction was carried out in a total volume of 10 µl, consisting of 5 µl of reagent mix, 3 µl of cDNA, and 2 µl of primer mix (final primer concentration of 2.5 µM).

Cycling conditions included an initial denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C (denaturation), 1 min at 61 °C (annealing), and 20 s at 72 °C (extension). Melt curve analysis was performed with the following settings: 95 °C for 15 s, 60 °C for 60 s, and 95 °C for 15 s.

### MTT

Pancreatic islets were incubated with different concentrations of MOTS-c for 24 h. Following incubation, a 0.05% MTT solution (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) was added to the islets. The plate was then incubated for 20 min at 37 °C. Afterward, the medium was removed, and the islets were dissolved in 100 µl of dimethylsulfoxide. Absorbance was measured at a wavelength of 570 nm, with background correction performed at 650 nm, using the Synergy 2 microplate reader (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

### Apoptosis

Pancreatic islets were incubated with MOTS-c for 24 h in 96-well plates. The level of apoptosis was assessed using the Cell Death Detection ELISA Plus kit (Roche, Basel, Switzerland), following the manufacturer's protocol. Absorbance was measured at a wavelength of 405 nm, with background correction performed at 490 nm, using the Synergy 2 microplate reader (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

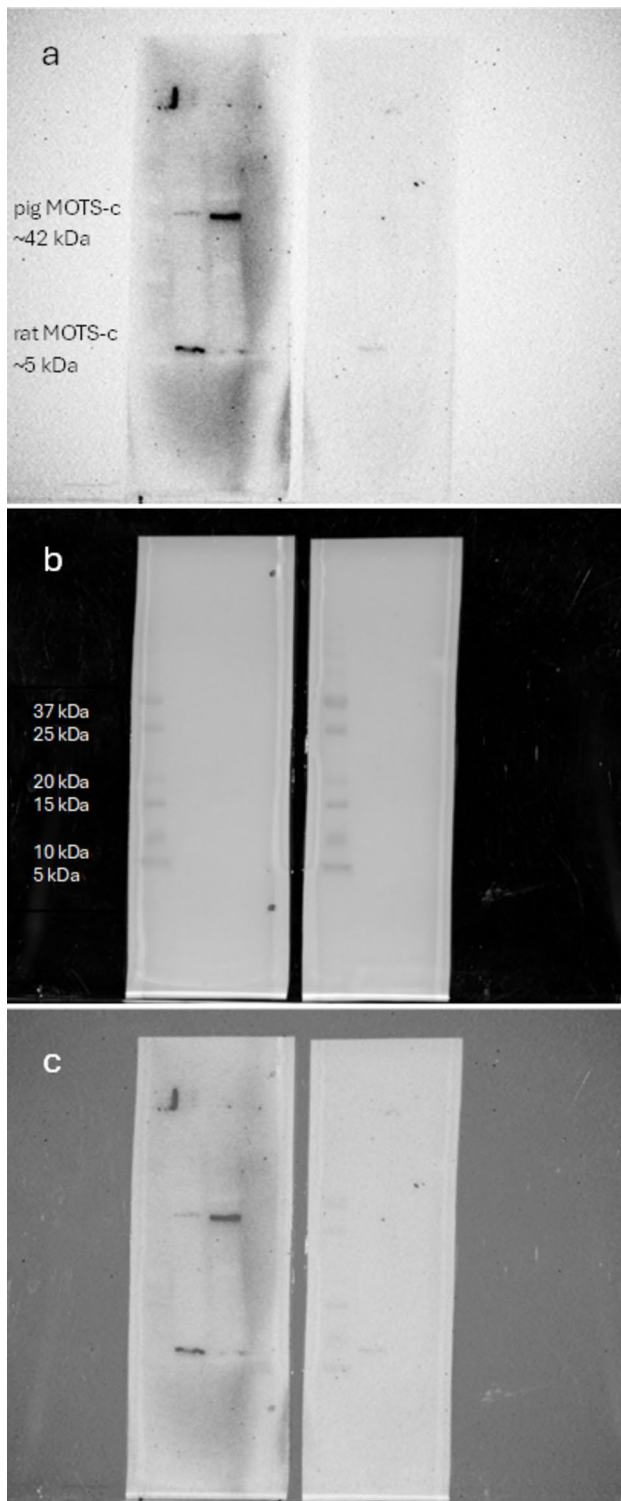
### Statistical analysis

All analyses were carried out using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The results are presented as the arithmetic mean ± SEM. The significance of differences was determined using one-way analysis of variance (ANOVA) with a Dunnett post hoc test, comparing the results with the control group. Additionally, a Tukey post hoc test was employed when comparing groups with each other (experiments with glucose). Statistical significance is denoted by \* for  $p < 0.05$  and \*\* for  $p < 0.01$ .

## Results

### antiMOTS-c antibody is specific to pig MOTS-c

To confirm the specificity of the antiMOTS-c antibody, Western blot analysis was performed using pancreatic tissue from rats and pigs (Fig. 1). Unfortunately, we do not have access to other validation methods related to genetics methods or mass spectrometry. On the membrane incubated with antiMOTS-c antibody, there was one clear signal in a



**Fig. 1** Confirmation that antiMOTS-c antibody is specific to pig MOTS-c. **a** Chemiluminescence, **b** visible light, **c** combination of **a** and **b**. Left membrane: left track, rat pancreas; right track, pig pancreas. There is a visible difference between the sizes of the MOTS-c protein in each species: right membrane, left track, rat pancreas; right track, pig pancreas. The molecular weight of rat MOTS-c is approximately 5 kDa, porcine MOTS-c is approximately 42 kDa. On the right membrane, an antibody blocked with MOTS-c peptide was used. The extinguishing of the signals from rats and pigs can be observed

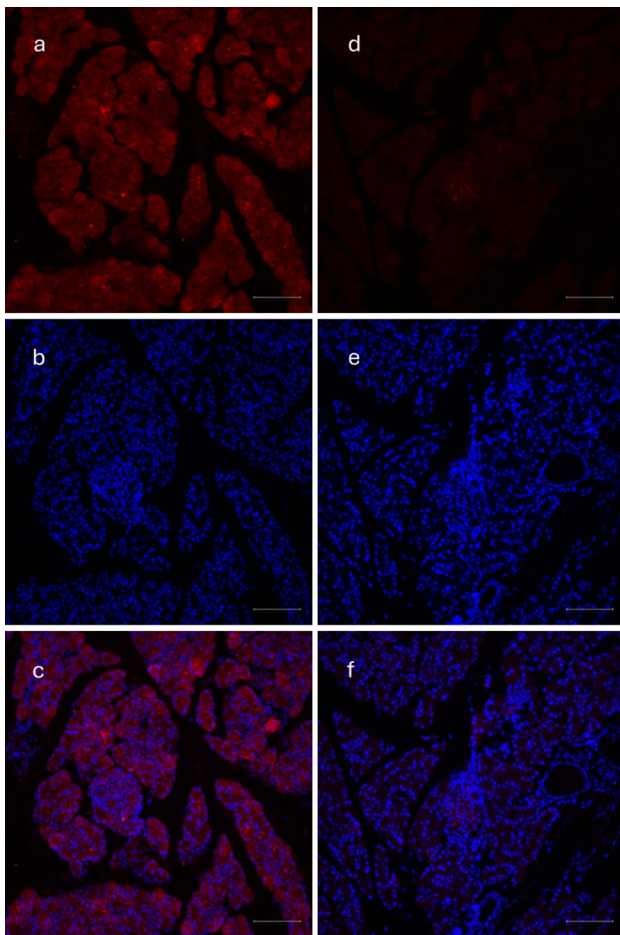
sample from the rat pancreas and one clear signal in the sample from the pig pancreas. These signals disappeared when the antibody was preincubated with the MOTS-c blocking peptide dedicated to this antibody, confirming antibody specificity. Interestingly, MOTS-c signals were detected at different molecular weights, with pig MOTS-c appearing at a higher position than rat MOTS-c. This suggests differences in the amino acid sequence and/or tertiary structure between species, possibly due to the formation of distinct oligomeric complexes in pigs. Because the molecular weight of pig MOTS-c overlaps with that of  $\beta$ -actin (used as a reference protein), GAPDH was used instead as the control in Western blots involving pig tissue.

### MOTS-c is present in rat and pig pancreatic islets

Immunofluorescence staining of isolated pancreatic islets confirmed the presence of MOTS-c in both rat and pig islets (Figs. 2a and 4a). The specificity of this signal was eliminated using a blocking peptide (Figs. 2d and 4d). Additional staining for insulin and glucagon was conducted to assess the colocalization of MOTS-c with these hormones (Figs. 3d, h and 5d, h). In rats, MOTS-c was detected throughout the pancreas, including both endocrine and exocrine regions. In contrast, in pigs, MOTS-c expression was restricted to the islets, the endocrine portion of the organ. The detection of MOTS-c and insulin and glucagon in rats showed that MOTS-c is not produced by separate cells but colocalizes in cells, producing both insulin and glucagon. Colocalization is also observed in the pig, but in this species MOTS-c is produced by cells within the islets but not in all cells that also synthesize insulin or glucagon.

### Energetic compounds and pancreatic hormones change MOTS-c expression and secretion from rat pancreatic islets

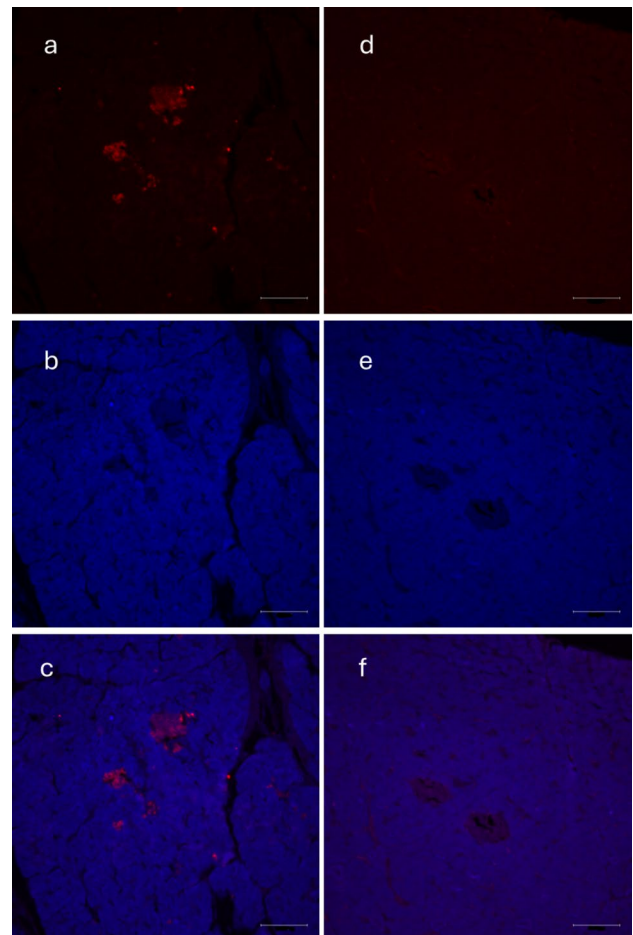
A lower glucose concentration (2 mM) in the incubation buffer led to increased MOTS-c secretion, although no change was observed in protein expression levels in rat pancreatic islets (Fig. 6a, b). Incubation with free fatty acids in the medium did not produce significant changes in either MOTS-c secretion or expression (Fig. 6c, d). Significant changes were noticed after incubation of pancreatic islets with insulin: in each of the examined groups, there was significant enhancement of secretion of MOTS-c. Also, there was an increased expression of MOTS-c on protein level in islets treated with 100 nM insulin (Fig. 6e, f). Glucagon treatment induced a significant increase in MOTS-c secretion at the 10 nM concentration, but no change in protein expression was detected (Fig. 6g, h).



**Fig. 2** Immunofluorescence staining in rat pancreatic islet. **a** MOTS-c presence in rat pancreatic islet, **b** DAPI staining in rat pancreatic islet, **c** combination of **a** and **b**, **d** disappearing signal of MOTS-c, when using blocking peptide, **e** DAPI staining in rat pancreatic islet, **f** combination of **d** and **e**. Scale bar 100  $\mu$ m

### MOTS-c lowers insulin and glucagon secretion but enhances its expression at the RNA level in rat pancreatic islets

Treatment of rat pancreatic islets with MOTS-c resulted in reduced insulin secretion at concentrations of 10 and 100 nM (Fig. 7a), and decreased glucagon secretion at 10 nM (Fig. 7b). The addition of MOTS-c to incubation medium enhanced insulin and glucagon expression (Fig. 7c, d). Tests were also performed measuring expression changes of insulin receptor and glucagon receptor after incubating rat pancreatic islets with different concentrations of MOTS-c; these showed increased expression on RNA level only in insulin expression in the group treated with 10 nM MOTS-c (Fig. 7e, f).



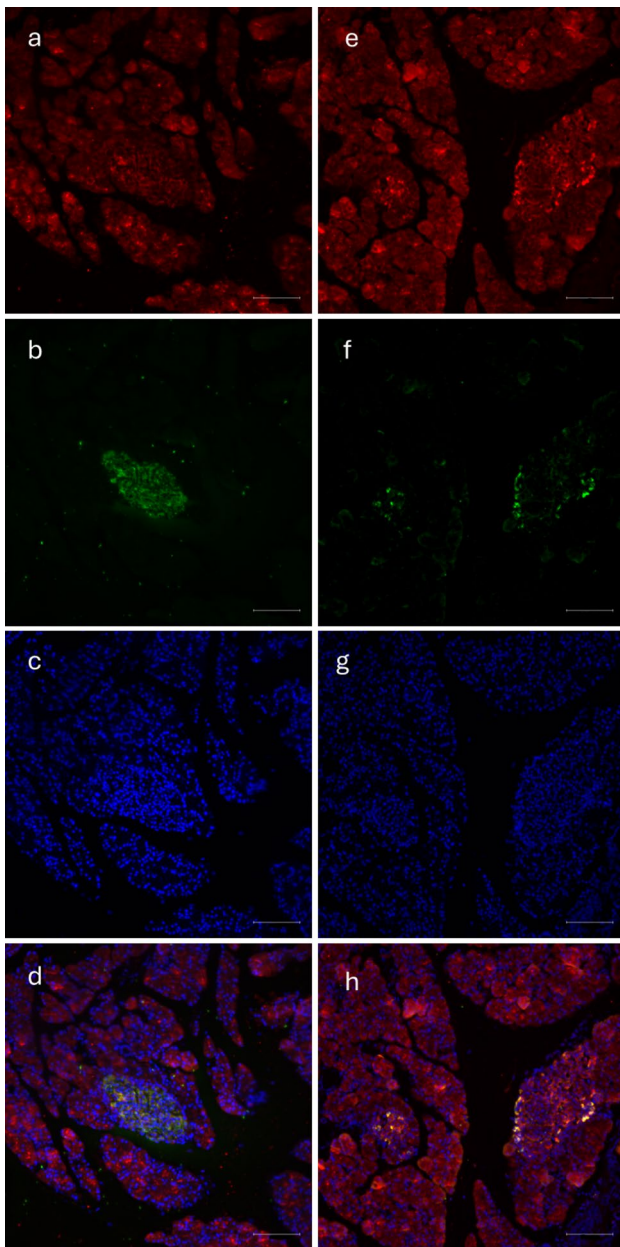
**Fig. 3** Immunofluorescence staining in rat pancreas: **a** MOTS-c, **b** insulin, **c** DAPI staining, **d** colocalization of MOTS-c and insulin in rat pancreas **e** MOTS-c, **f** glucagon, **g** DAPI staining, **h** colocalization of MOTS-c and glucagon in rat pancreas. Scale bar 100  $\mu$ m

### Energetic compounds and pancreatic hormones change MOTS-c secretion but not MOTS-s expression on protein level in pig pancreatic islets

Incubation of pig pancreatic islets in 2 and 16 mM glucose resulted in lower secretion of MOTS-c, but it did not change the expression of this peptide (Fig. 8a, b). Treating pancreatic islets with insulin and glucagon enhanced and diminished MOTS-c secretion in groups with 100 nM of each hormone, respectively (Fig. 8e, g). No significant changes in expression were observed after incubating pig pancreatic islets with those hormones (Fig. 8f, h).

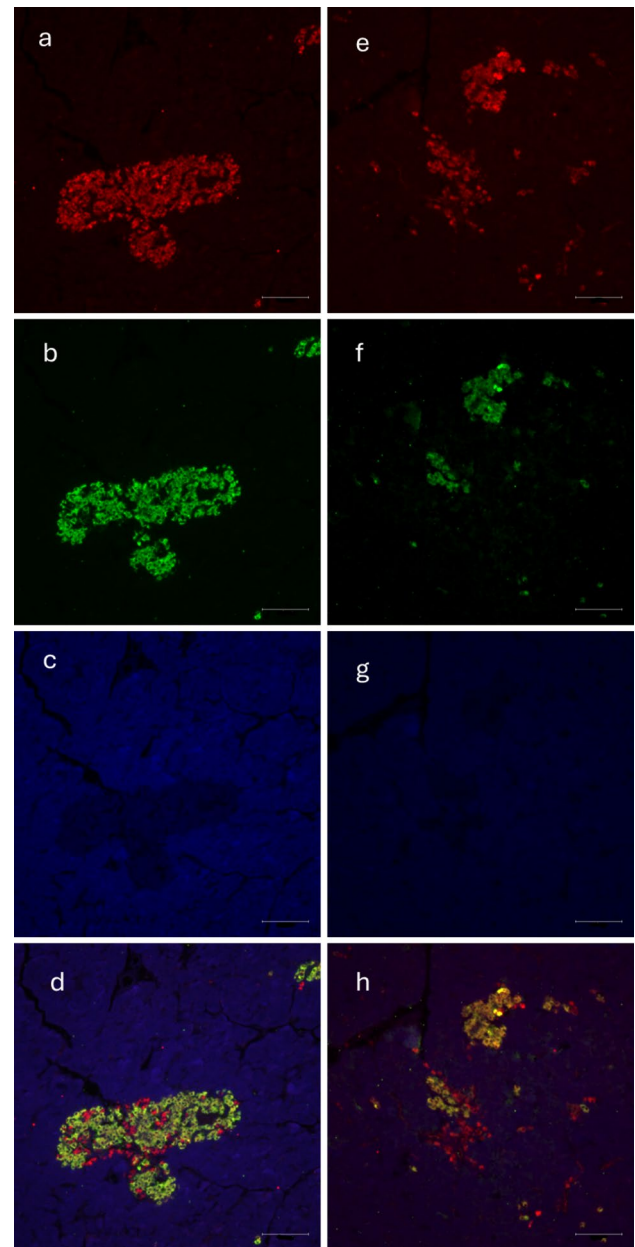
### Insulin and glucagon lowers MOTS-c expression and enhances MOTS-c secretion in pig pancreatic islets

A significant increase in the secretion of MOTS-c was observed in pig islets treated with 100 nM glucagon,



**Fig. 4** Immunofluorescence staining in pig pancreas: **a** presence of MOTS-c in pig pancreas, **b** DAPI staining, **c** combined pictures of **a** and **b**, **d** disappearing signal of MOTS-c after use of blocking peptide, **e** DAPI staining, **f** combination of **d** and **e**. Scale bar 100  $\mu$ m

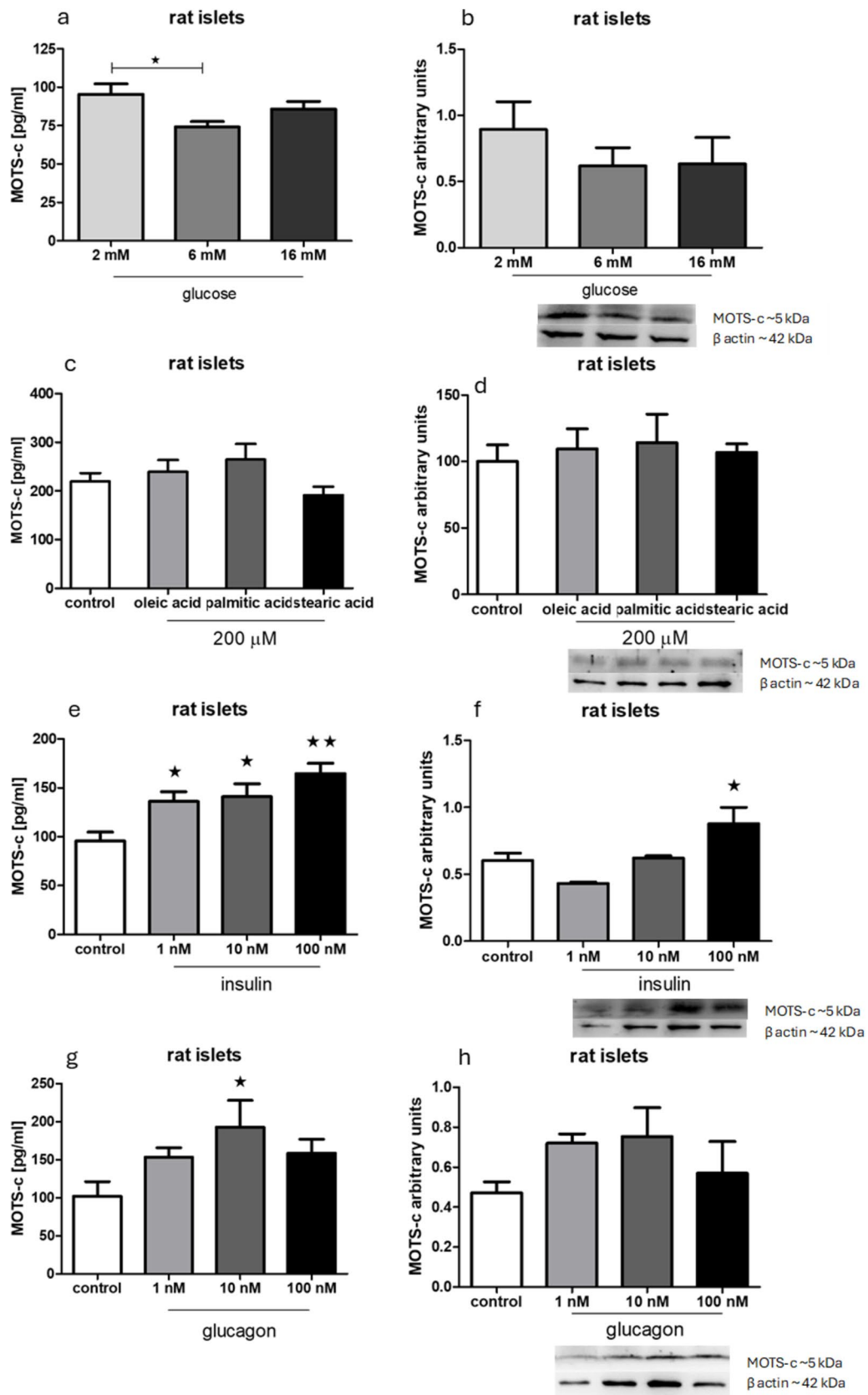
whereas insulin treatment did not affect secretion (Fig. 9a, b). At the RNA level, MOTS-c expression was significantly reduced after treatment with 100 nM insulin and 10 nM glucagon (Fig. 9c, d). No changes were detected in the RNA expression of insulin or glucagon receptors (Fig. 9e, f).



**Fig. 5** Immunofluorescence staining in pig pancreas: **a** MOTS-c, **b** insulin, **c** DAPI staining, **d** colocalization of MOTS-c and insulin in pig pancreas, **e** MOTS-c, **f** glucagon, **g** DAPI staining, **h** colocalization of MOTS-c and glucagon in pig pancreas. Scale bar 100  $\mu$ m

### MOTS-c enhances the viability of pig and rat pancreatic islets but does not affect their apoptosis

Treating pancreatic islets obtained from pigs and rats with MOTS-c increased their viability (in groups with 10 and 100 nM, respectively; Fig. 10a, b). However, MOTS-c had no significant impact on apoptosis levels in either species (Fig. 10c, d).



**Fig. 6** Influence of chosen energetic compounds and hormones on secretion and expression of MOTS-c examined with Western blotting in rat pancreatic islets. **a** MOTS-c secretion after incubation with different concentrations of glucose, **b** MOTS-c expression after incubation with different concentrations of glucose, **c** MOTS-c secretion after incubation with free fatty acids, **d** MOTS-c expression after incubation with free fatty acids, **e** MOTS-c secretion after incubation with insulin, **f** MOTS-c expression after incubation with insulin, **g** MOTS-c secretion after incubation with glucagon, **h** MOTS-c expression after incubation with glucagon. Data show mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

## Discussion

In the context of metabolic disorders, it is well established that a Western diet and lifestyle contribute to the rising incidence of obesity and type 2 diabetes mellitus (Kopp 2019). One challenge for researchers is finding a way to prevent the spread of such diseases. New naturally occurring compounds continue to be discovered and evaluated for their physiological impact on both animals and humans. Our research team previously investigated MOTS-c, a peptide derived from the mitochondrial genome and discovered in 2015, which has been shown to enhance insulin sensitivity (Lee et al. 2015). Following promising results from experiments using cultured pancreatic cell lines (Bień et al. 2024), we extended our studies to more complex biological models. In selecting model species, our primary aim was to compare two morphologically distinct pancreatic types and assess whether MOTS-c modulates pancreatic islet function.

First, we confirmed the specificity of the antiMOTS-c antibody for the pig peptide. During this test, it was discovered that pig MOTS-c is larger than the corresponding peptide present in the rat pancreas. This is particularly important because the amino acid sequence of this peptide is still unknown (Lee et al. 2015). Moreover, since pig MOTS-c is a larger protein, it will be a fascinating subject for further experiments. As a result of the unavailability of a synthetic pig MOTS-c peptide and the physiological similarities between pigs and humans (Lunney 2021), we chose to use the human analogue in all pig-related experiments. Of course, we are aware of the limitations of this solution, but it was the only way to test the mentioned models. Since these two model animals have different pancreas anatomy, there were differences in the results of experiments as well. In rats, MOTS-c is present in the whole pancreas—in the endocrine and exocrine parts. In pigs, MOTS-c occurs only in the endocrine part of the pancreas (Figs. 1, 2, 3, and 4). Together with the different sizes of the porcine peptide, this may indicate significant differences in the physiological role of MOTS-c between these species. As mentioned before, the pig is an excellent model for humans, and its pancreas is anatomically closer to humans than the rat one; we can assume that the results obtained on the swine model could be

more related to what is expected in humans. Rodents are also good laboratory animals because they are relatively cheap and easy to care for. They are good sources of information on how newly discovered peptides work, but sometimes the functions of analogous compounds in humans may differ significantly (Arner 2005).

MOTS-c is derived from mitochondria (Zhong et al. 2022). Therefore, we performed experiments testing the influence of energetic compounds such as glucose and free fatty acids on MOTS-c secretion and expression. In addition, we examined the effects of pancreatic hormones on MOTS-c secretion in both rat and pig islets. It is important to note that results related to MOTS-c, insulin, or glucagon—whether regarding secretion or expression—may not directly correlate. This discrepancy is largely due to differences in the duration of experimental procedures: secretion experiments lasted 1.5 h, whereas expression analyses via PCR or Western blot required 24 h. The results from rat islet experiments were consistent with those obtained in previous studies using cell lines (Bień et al. 2024), while the findings from pig islets did not show similar patterns. This may be attributed to the rodent origin of the INS-1E and  $\alpha$ TC-1 cell lines used in earlier studies. However, not all outcomes aligned across models. For instance, the effects of free fatty acids on MOTS-c secretion observed in cell lines were not replicated in the more complex islet models (Figs. 6c, d and 8c, d). Therefore, experiments should be performed on laboratory cultured cell lines since they have limitations and on larger structures like islets or in vivo tests.

Another observation supporting the hypothesis that MOTS-c functions differently in rats and pigs is the contrasting regulation of its secretion by glucose (Figs. 6a and 8a). In rats, MOTS-c secretion is lowest at physiological glucose concentrations, whereas in pigs, it is highest. This suggests distinct regulatory roles for MOTS-c in these species. However, this is only speculation because of the lack of the porcine MOTS-c sequence and the lack of known receptors for this peptide.

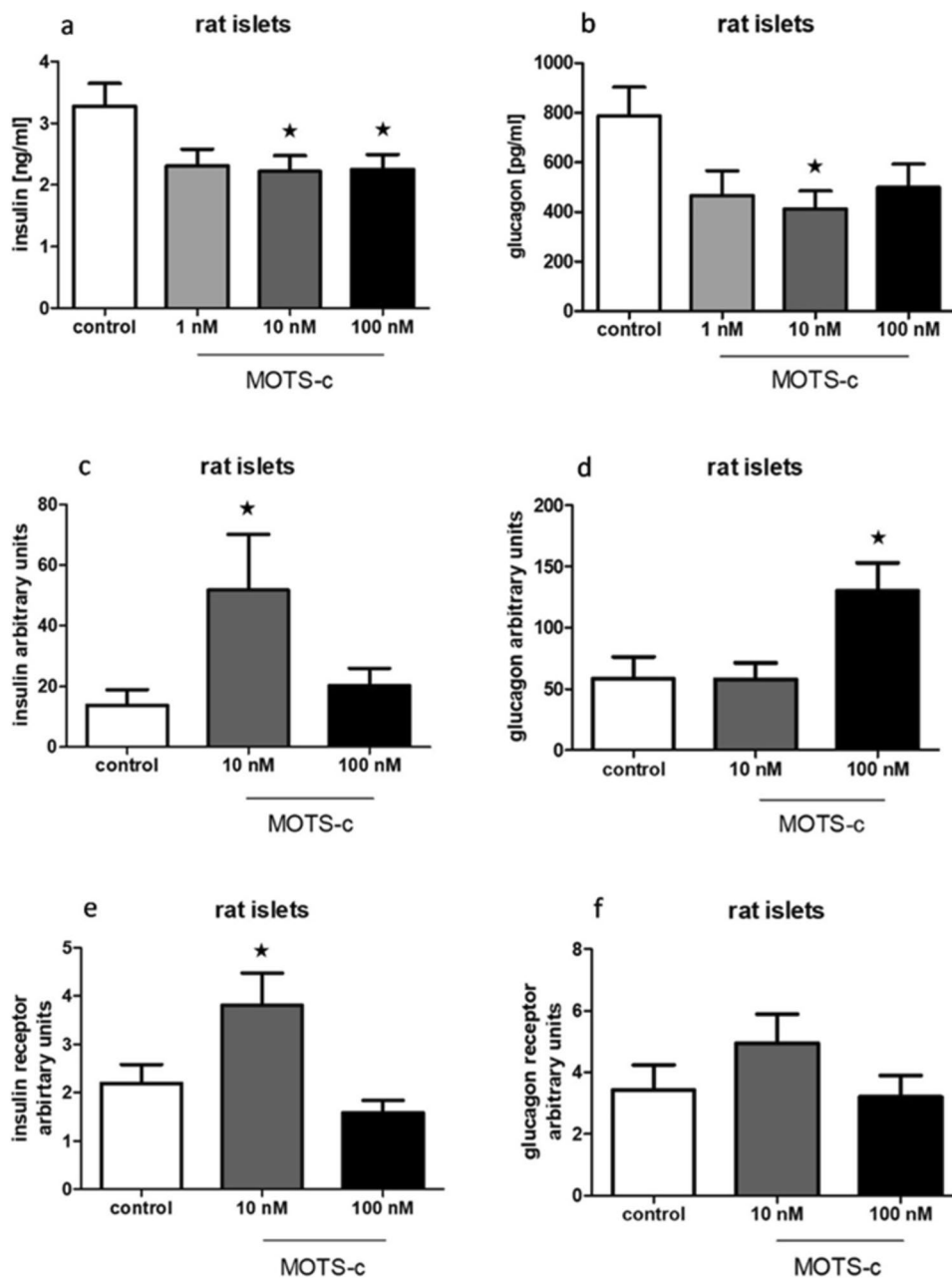
In rat pancreatic islets, we observed a feedback loop consistent with our earlier findings in INS-1E cells. Specifically, MOTS-c reduces insulin secretion, while insulin enhances MOTS-c secretion (Figs. 6e and 7a). A similar feedback pattern was noted with glucagon secretion (Figs. 6g and 7b).

Regarding pig islets, we see no similar feedback loops with insulin and glucagon, as no correlations were observed (Figs. 8e, g and 9a, b). Other results obtained on rat pancreatic islets and cell lines showed increased insulin receptor expression in rat pancreatic islets and cell lines, but this effect was not observed in pig islets. This discrepancy may help explain the mechanism by which MOTS-c enhances insulin sensitivity in rats—a well-documented property of the peptide (Lee et al. 2015; Kim et al. 2019).

The final stage of this study examined whether MOTS-c influences cell viability and apoptosis. Previous studies have shown that this peptide improves muscle function in mice (Ran et al. 2021) and has demonstrated protective effects in pancreatic cell lines (Bień et al. 2024). Although MOTS-c did not affect apoptosis levels in pancreatic islets from either species, it significantly enhanced cell viability in both pig and rat models. This finding may be especially relevant for extending the functional lifespan of pancreatic islet cells during the progression of diabetes, a protective role that has already been confirmed in rodent models of type 1 diabetes (Kong et al. 2021).

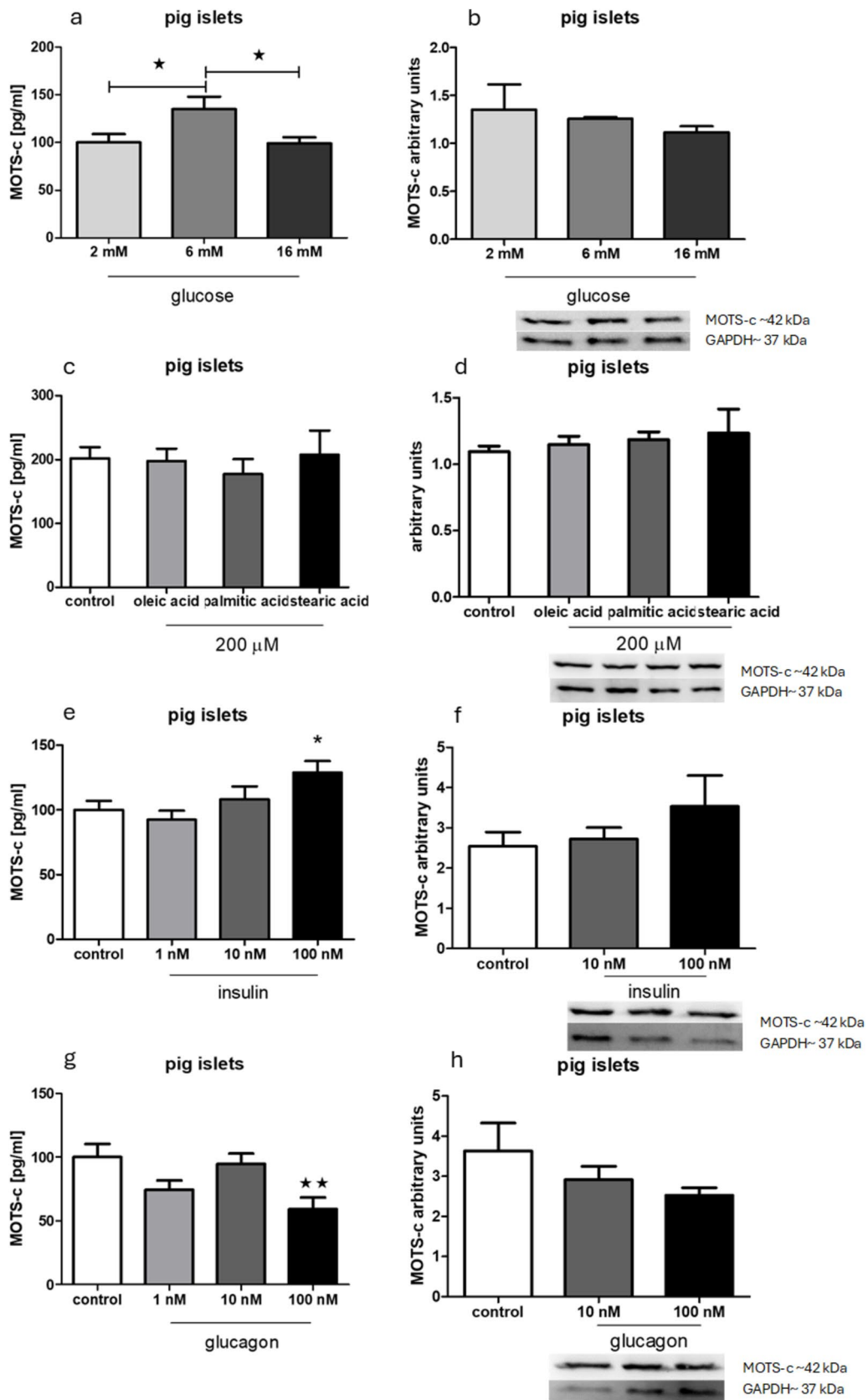
In summary, MOTS-c is a mitochondria-derived peptide intimately linked to metabolic regulation. Although

**Fig. 7** Influence of MOTS-c on secretion and expression of insulin and glucagon tested with PCR in rat pancreatic islets: **a** insulin secretion after incubation with MOTS-c, **b** glucagon secretion after incubation with MOTS-c, **c** insulin expression after incubation with MOTS-c, **d** glucagon expression after incubation with MOTS-c, **e** insulin receptor expression after incubation with MOTS-c, **f** glucagon receptor expression after incubation with MOTS-c. Data show mean  $\pm$  SEM, \* $p < 0.05$

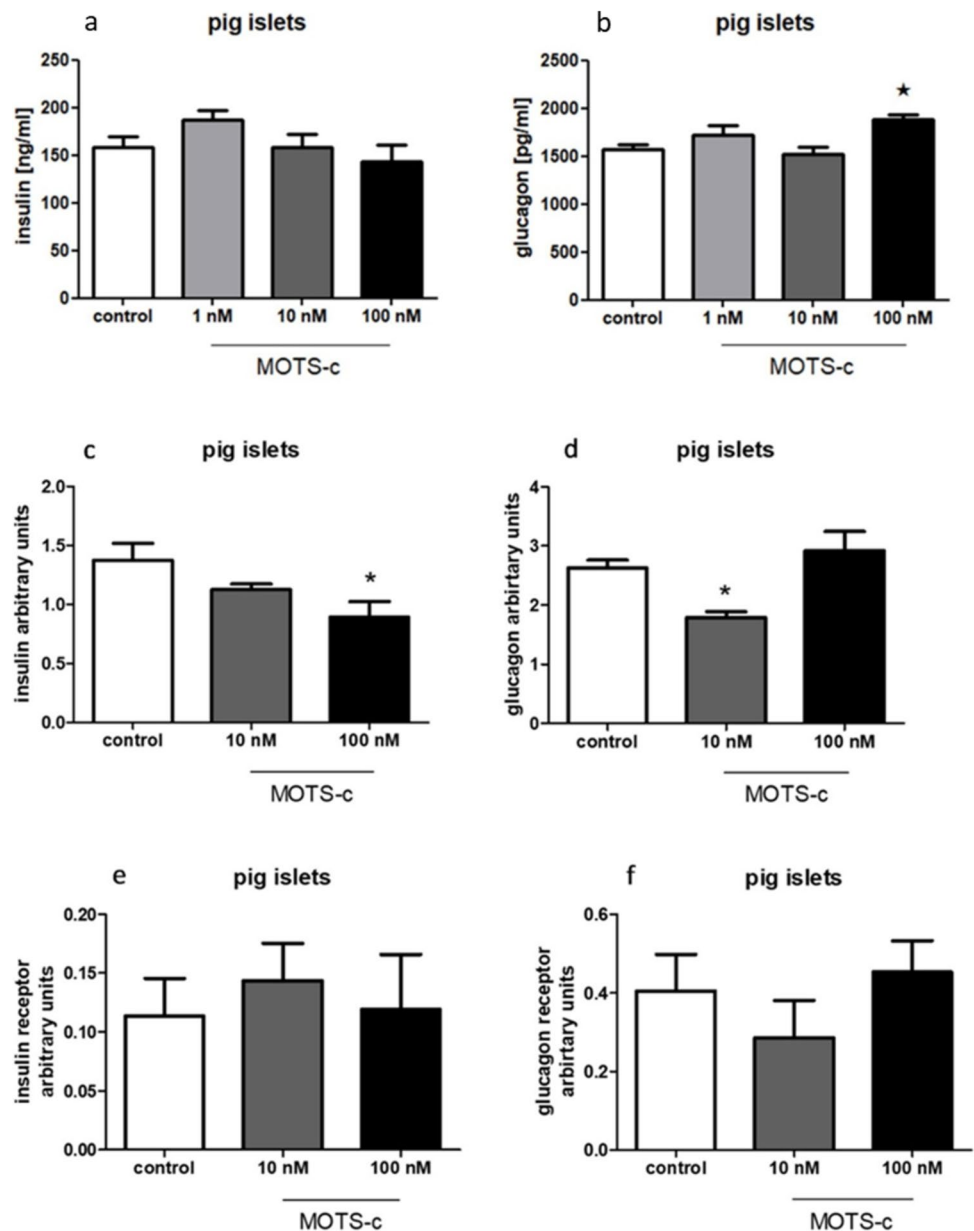


**Fig. 8** Influence of chosen energetic compounds and hormones on secretion and expression of MOTS-c examined with Western blotting in pig pancreatic islets. **a** MOTS-c secretion after incubation with different concentrations of glucose, **b** MOTS-c expression after incubation with different concentrations of glucose, **c** MOTS-c secretion after incubation with free fatty acids, **d** MOTS-c expression after incubation with free fatty acids, **e** MOTS-c secretion after incubation with insulin, **f** MOTS-c expression after incubation with insulin, **g** MOTS-c secretion after incubation with glucagon, **h** MOTS-c expression after incubation with glucagon. Data show mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

research into its mechanisms and effects is ongoing, many of its physiological roles remain unknown—most notably, the receptor to which it may bind has yet to be identified. Our



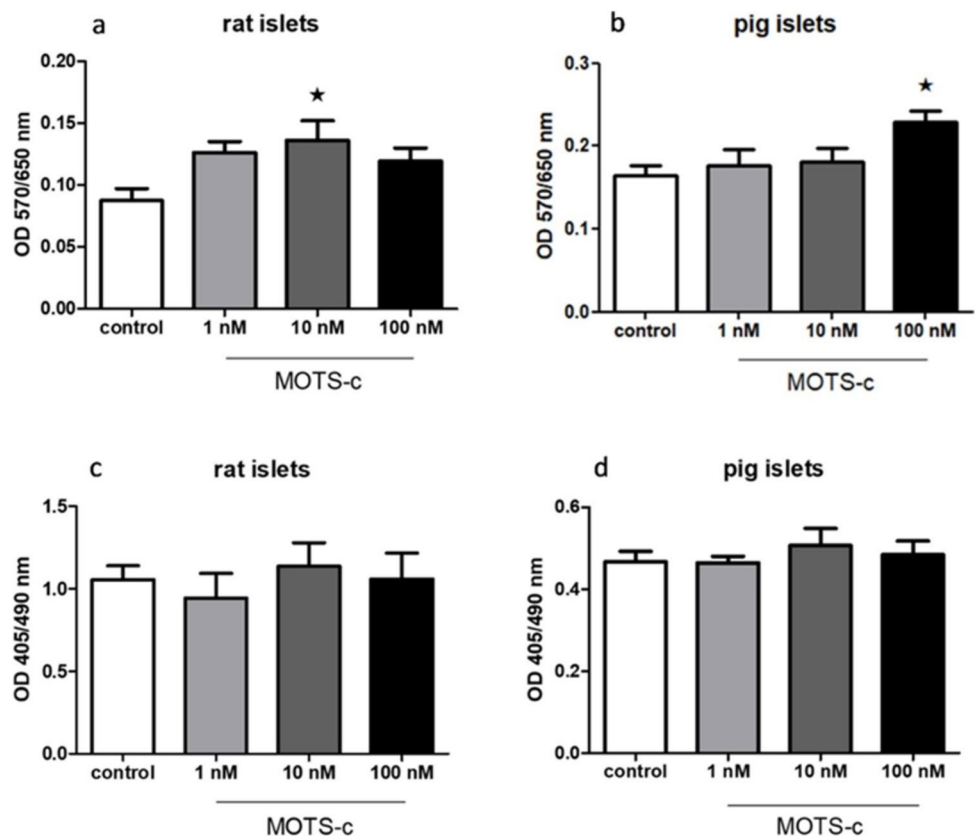
**Fig. 9** Influence of MOTS-c on secretion and expression of insulin and glucagon tested with PCR in rat pancreatic islets: **a** insulin secretion after incubation with MOTS-c, **b** glucagon secretion after incubation with MOTS-c, **c** insulin expression after incubation with MOTS-c, **d** glucagon expression after incubation with MOTS-c, **e** insulin receptor expression after incubation with MOTS-c, **f** glucagon receptor expression after incubation with MOTS-c. Data show mean  $\pm$  SEM, \* $p < 0.05$



results suggest that MOTS-c differs fundamentally between rats and pigs, both structurally and functionally: (i) the sizes of MOTS-c of rats and pigs are different; (ii) the locations in the rat and pig pancreas are different; (iii) its secretion patterns in response to glucose and glucagon differ; and (iv) the regulatory effects of insulin and glucagon on MOTS-c secretion in rats and pigs are different. Such a discrepancy

in animal data may be more worrying than the widespread availability of MOTS-c as a supplement for people, which is treated almost as a substitute for physical exercise. It is therefore not surprising that the World Anti-Doping Agency (WADA) has included MOTS-c on its list of banned substances in sports (WADA 2025).

**Fig. 10** Influence of MOTS-c on pancreatic islet cells: **a** rat pancreatic islet cell viability measured with MTT test, **b** pig pancreatic islet cell viability measured with MTT test, **c** rat islet cell death measured with cell death test, **d** pig pancreatic islet cell death measured with cell death test. Data show mean  $\pm$  SEM, \* $p < 0.05$



**Author contributions** J.B.: conceptualization, methodology, investigation, writing original draft. E.P.O., P.K., N.L., D.S., E.G.,: methodology & investigation. M.S.: writing, review & editing, project administration, funding acquisition, supervision.

**Funding** This work was supported by Narodowe Centrum Nauki, 2018/31/D/NZ4/01121.

**Data availability** No datasets were generated or analysed during the current study.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors declare no competing interests.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

- Arner P (2005) Resistin: yet another adipokine tells us that men are not mice. *Diabetologia* 48(11):2203–2205. <https://doi.org/10.1007/s00125-005-1956-3>
- Bieñ J, Pruszyńska E, Kolodziejcki P et al (2024) MOTS-c regulates pancreatic alpha and beta cell functions in vitro. *Histochem Cell Biol* 161(6):449–460. <https://doi.org/10.1007/s00418-024-02274-0>
- Du C, Zhang C, Wu W et al (2018) Circulating MOTS-c levels are decreased in obese male children and adolescents and associated with insulin resistance. *Pediatr Diabetes* 19(6):1058–1064. <https://doi.org/10.1111/pedi.12685>
- Ericsson AC, Marcus J, Crim MJ et al (2013) A brief history of animal modeling. *Mo Med* 110(3):201–205
- Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H et al (2001) A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and A $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(11):6336–6341. <https://doi.org/10.1073/pnas.101133498>
- Hoang DT, Matsunari H, Nagaya M et al (2014) A conserved rule for pancreatic islet organization. *PLoS ONE* 9(10):e110384. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110384>
- Kim SJ, Miller B, Mehta HH et al (2019) The mitochondrial-derived peptide MOTS-c is a regulator of plasma metabolites and enhances insulin sensitivity. *Physiol Rep* 7(13):e14171. <https://doi.org/10.14814/phy2.14171>
- Kong BS, Min SH, Lee C et al (2021) Mitochondrial-encoded MOTS-c prevents pancreatic islet destruction in autoimmune diabetes. *Cell Rep* 36(4):109447. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109447>
- Kopp W (2019) How western diet and lifestyle drive the pandemic of obesity and civilization diseases. *Diabetes Metab Syndr Obes*

- Targets Ther 24(12):2221–2236. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S216791>
- Lee C, Zheng J, Drew BG et al (2015) The mitochondrial-derived peptide MOTS-c promotes metabolic homeostasis and reduces obesity and insulin resistance. *Cell Metab* 21(3):443–454. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.02.009>
- Lu P, Li X, Li B et al (2023) The mitochondrial-derived peptide MOTS-c suppresses ferroptosis and alleviates acute lung injury induced by myocardial ischemia reperfusion via PPAR $\gamma$  signaling pathway. *Eur J Pharmacol* 15(953):175835. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175835>
- Lunney JK, Van Goor A, Walker KE et al (2021) Importance of the pig as a human biomedical model. *Sci Transl Med* 13(621):eabd5758. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd5758>
- Luo YH, Xie L, Li JY et al (2023) Serum MOTS-C levels are decreased in obese children and associated with vascular endothelial function. *Diabetes Metab Syndr Obes* 12(16):1013–1020. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S403934>
- Mohtashami Z, Singh M, Salimiaghdam N et al (2022) MOTS-c, the most recent mitochondrial derived peptide in human aging and age-related diseases. *Int J Mol Sci* 23(19):11991. <https://doi.org/10.3390/ijms231911991>
- Nass MM, Nass S (1963) Intramitochondrial fibers with DNA characteristics: I. Fixation and electron staining reactions. *J Cell Biol* 19(3):593–611. <https://doi.org/10.1083/jcb.19.3.593>
- Ran N, Lin C, Leng L et al (2021) MOTS-c promotes phosphorodiamidate morpholino oligomer uptake and efficacy in dystrophic mice. *EMBO Mol Med* 13(2):e12993. <https://doi.org/10.15252/emmm.202012993>
- Watson JD, Crick FH (1953) The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 18:123–131. <https://doi.org/10.1101/sqb.1953.018.01.020>
- World Anti-Doping Agency. World anti-doping code international standard prohibited list 2025 [2024 Nov 24]. [www.wada-ama.org/sites/default/files/2024-09/2025list\\_en\\_final\\_clean\\_12\\_september\\_2024.pdf](http://www.wada-ama.org/sites/default/files/2024-09/2025list_en_final_clean_12_september_2024.pdf)
- Wu J, Xiao D, Yu K et al (2023) The protective effect of the mitochondrial-derived peptide MOTS-c on LPS-induced septic cardiomyopathy: effect of MOTS-c on septic cardiomyopathy. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 55(2):285–294. <https://doi.org/10.3724/abbs.2023006>
- Yin Y, Pan Y, He J et al (2022) The mitochondrial-derived peptide MOTS-c relieves hyperglycemia and insulin resistance in gestational diabetes mellitus. *Pharmacol Res* 175:105987. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105987>
- Zhong P, Peng J, Hu Y et al (2022) Mitochondrial derived peptide MOTS-c prevents the development of heart failure under pressure overload conditions in mice. *J Cell Mol Med* 26:5369–5378. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17551>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Poznań, 10.02.2026

Mgr Jakub Bień

Katedra Fizjologii i Biochemii Zwierząt

Wydział Medycyny Weterynaryjnej i

Nauk o Zwierzętach

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

## OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA PUBLIKACJI

W związku z ubieganiem się przeze mnie o nadanie stopnia doktora oświadczam, że jestem współautorem publikacji pt:

1. Bień, J., Pruszyńska-Oszmałek, E., Kołodziejski, P., Leciejewska, N., Szczepankiewicz, D., & Sassek, M. (2024). MOTS-c regulates pancreatic alpha and beta cell functions *in vitro*. *Histochemistry and Cell Biology*, 161(6), 449-460.

Mój udział w powstaniu pracy to przygotowywanie koncepcji badań, przeprowadzenie i metodyczne opracowanie części eksperymentów, analiza wyników i napisanie pierwszej wersji manuskryptu.

2. Bień, J., Pruszyńska-Oszmałek, E., Kołodziejski, P., Leciejewska, N., Szczepankiewicz, D., Grzęda, E., & Sassek, M. (2025). MOTS-c modulates pancreatic islet function in rats and pigs *in vitro*. *Histochemistry and Cell Biology*, 163(1), 64.

Mój udział w powstaniu pracy to przygotowywanie koncepcji badań, przeprowadzenie i metodyczne opracowanie części eksperymentów, analiza wyników i napisanie pierwszej wersji manuskryptu.

  
.....  
podpis

Poznań, 10.02.2026

Dr hab. Maciej Sassek  
Katedra Fizjologii i Biochemii Zwierząt  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i  
Nauk o Zwierzętach  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA PUBLIKACJI

W związku z ubieganiem się przez mgr Jakuba Bienia o nadanie stopnia doktora oświadczam, że jestem współautorem publikacji pt:

1. Bień, J., Pruszyńska-Oszmałek, E., Kołodziejski, P., Leciejewska, N., Szczepankiewicz, D., & Sassek, M. (2024). MOTS-c regulates pancreatic alpha and beta cell functions *in vitro*. *Histochemistry and Cell Biology*, 161(6), 449-460.

Mój udział w przygotowaniu pracy to nadzór nad całością prac, edytowanie i korekta manuskryptu, pozyskanie środków finansowych na badania.

2. Bień, J., Pruszyńska-Oszmałek, E., Kołodziejski, P., Leciejewska, N., Szczepankiewicz, D., Grzęda, E., & Sassek, M. (2025). MOTS-c modulates pancreatic islet function in rats and pigs *in vitro*. *Histochemistry and Cell Biology*, 163(1), 64.

Mój udział w przygotowaniu pracy to nadzór nad całością prac, edytowanie i korekta manuskryptu, pozyskanie środków finansowych na badania.



.....  
podpis

Poznań, 10.02.2026

Prof. UPP dr hab. Paweł Kołodziejski  
Katedra Fizjologii i Biochemii Zwierząt  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i  
Nauk o Zwierzętach  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA PUBLIKACJI

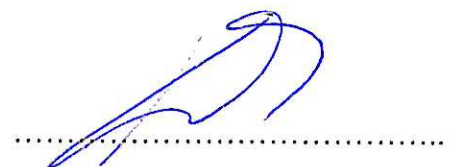
W związku z ubieganiem się przez mgr Jakuba Bienia o nadanie stopnia doktora oświadczam, że jestem współautorem publikacji pt:

1. Bień, J., Pruszyńska-Oszmałek, E., Kołodziejski, P., Leciejewska, N., Szczepankiewicz, D., & Sassek, M. (2024). MOTS-c regulates pancreatic alpha and beta cell functions *in vitro*. *Histochemistry and Cell Biology*, 161(6), 449-460.

Mój udział w przygotowaniu pracy to pomoc metodyczna i przeprowadzenie części analiz laboratoryjnych.

2. Bień, J., Pruszyńska-Oszmałek, E., Kołodziejski, P., Leciejewska, N., Szczepankiewicz, D., Grzęda, E., & Sassek, M. (2025). MOTS-c modulates pancreatic islet function in rats and pigs *in vitro*. *Histochemistry and Cell Biology*, 163(1), 64.

Mój udział w przygotowaniu pracy to pomoc metodyczna i przeprowadzenie części analiz laboratoryjnych.



podpis

Poznań, 10.02.2026

Dr hab. Ewa Pruszyńska-Oszmałek  
Katedra Fizjologii i Biochemii Zwierząt  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i  
Nauk o Zwierzętach  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA PUBLIKACJI

W związku z ubieganiem się przez mgr Jakuba Bienia o nadanie stopnia doktora oświadczam, że jestem współautorem publikacji pt:

1. Bień, J., Pruszyńska-Oszmałek, E., Kołodziejski, P., Leciejewska, N., Szczepankiewicz, D., & Sassek, M. (2024). MOTS-c regulates pancreatic alpha and beta cell functions *in vitro*. *Histochemistry and Cell Biology*, 161(6), 449-460.

Mój udział w przygotowaniu pracy to pomoc metodyczna i przeprowadzenie części analiz laboratoryjnych.

2. Bień, J., Pruszyńska-Oszmałek, E., Kołodziejski, P., Leciejewska, N., Szczepankiewicz, D., Grzęda, E., & Sassek, M. (2025). MOTS-c modulates pancreatic islet function in rats and pigs *in vitro*. *Histochemistry and Cell Biology*, 163(1), 64.

Mój udział w przygotowaniu pracy to pomoc metodyczna i przeprowadzenie części analiz laboratoryjnych.

.....  
  
.....  
podpis

Poznań, 10.02.2026

Dr Natalia Leciejewska  
Katedra Fizjologii i Biochemii Zwierząt  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i  
Nauk o Zwierzętach  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

### OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA PUBLIKACJI

W związku z ubieganiem się przez mgr Jakuba Bienia o nadanie stopnia doktora oświadczam, że jestem współautorem publikacji pt:

1. Bień, J., Pruszyńska-Oszmałek, E., Kołodziejcki, P., Leciejewska, N., Szczepankiewicz, D., & Sassek, M. (2024). MOTS-c regulates pancreatic alpha and beta cell functions *in vitro*. *Histochemistry and Cell Biology*, 161(6), 449-460.

Mój udział w przygotowaniu pracy to pomoc metodyczna i przeprowadzenie części analiz laboratoryjnych.

2. Bień, J., Pruszyńska-Oszmałek, E., Kołodziejcki, P., Leciejewska, N., Szczepankiewicz, D., Grzęda, E., & Sassek, M. (2025). MOTS-c modulates pancreatic islet function in rats and pigs *in vitro*. *Histochemistry and Cell Biology*, 163(1), 64.

Mój udział w przygotowaniu pracy to pomoc metodyczna i przeprowadzenie części analiz laboratoryjnych.



podpis