



---

# Universidad de Valladolid

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y FISIOLÓGIA



TRABAJO FIN DE MÁSTER

**“Regulación de la dinámica mitocondrial en células  $\alpha$ -pancreáticas mediada por *insulin-degrading enzyme* (IDE)”**

AUTOR

**ÓSCAR TOVAR FERRERO**

DIRECTORES

**GERMÁN PERDOMO**

**BEATRIZ MERINO**

## ÍNDICE

<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>RESUMEN GRÁFICO</b> .....	<b>4</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
1.1. Diabetes mellitus: definición, contexto y fisiopatología .....	<b>5</b>
1.2. Célula $\alpha$ y secreción de glucagón .....	<b>6</b>
1.3. Dinámica mitocondrial .....	<b>7</b>
1.4. Insulin-degrading enzyme .....	<b>9</b>
1.5. Hipótesis y objetivos.....	<b>11</b>
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
2.1. Cultivo celular .....	<b>12</b>
2.2. Método de transfección .....	<b>12</b>
2.3. Ensayo de secreción de glucagón para observar morfología mitocondrial .....	<b>13</b>
2.4. Microscopía .....	<b>14</b>
2.5. Cuantificación y análisis de la dinámica mitocondrial.....	<b>14</b>
2.6. Desarrollo experimental .....	<b>14</b>
2.7. Análisis estadístico .....	<b>15</b>
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>16</b>
3.1. Dinámica mitocondrial en células $\alpha$ -pancreáticas WT en condiciones secretoras (1 mM) y represoras (16 mM) de glucagón.....	<b>16</b>
3.2. Dinámica mitocondrial en células $\alpha$ -pancreáticas shRNA-IDE-KD en condiciones secretoras (1 mM glucosa) y represoras (16 mM glucosa) de glucagón. ....	<b>17</b>
3.3. Comparación de la dinámica mitocondrial entre células $\alpha$ -pancreáticas WT y shRNA-IDE-KD.....	<b>19</b>
<b>4. DISCUSIÓN</b> .....	<b>24</b>
4.1. Regulación de la dinámica mitocondrial en células $\alpha$ -pancreáticas WT.....	<b>24</b>
4.2. Regulación de la dinámica mitocondrial mediada por IDE.....	<b>25</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>27</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>28</b>

## ABSTRACT

Pancreatic alpha-cells produce and secrete glucagon, a hormone that regulates blood glucose levels. Hyperglucagonemia is a hallmark of type 2 diabetes, but molecular and cellular mechanisms remain elusive. Recently, we identified a new role of the insulin-degrading enzyme (IDE) on glucagon secretion.

Coordinated cycles of mitochondrial fusion and fission (A.K.A. mitochondrial dynamics) regulate mitochondrial morphology and function in response to changes in the cellular milieu. Interestingly, there are two isoforms of IDE: mitochondrial and cytoplasmic, but its individual contribution to regulation of mitochondrial dynamics is unknown. We hypothesize that IDE regulates mitochondrial dynamics during glucagon secretion in alpha-cells.

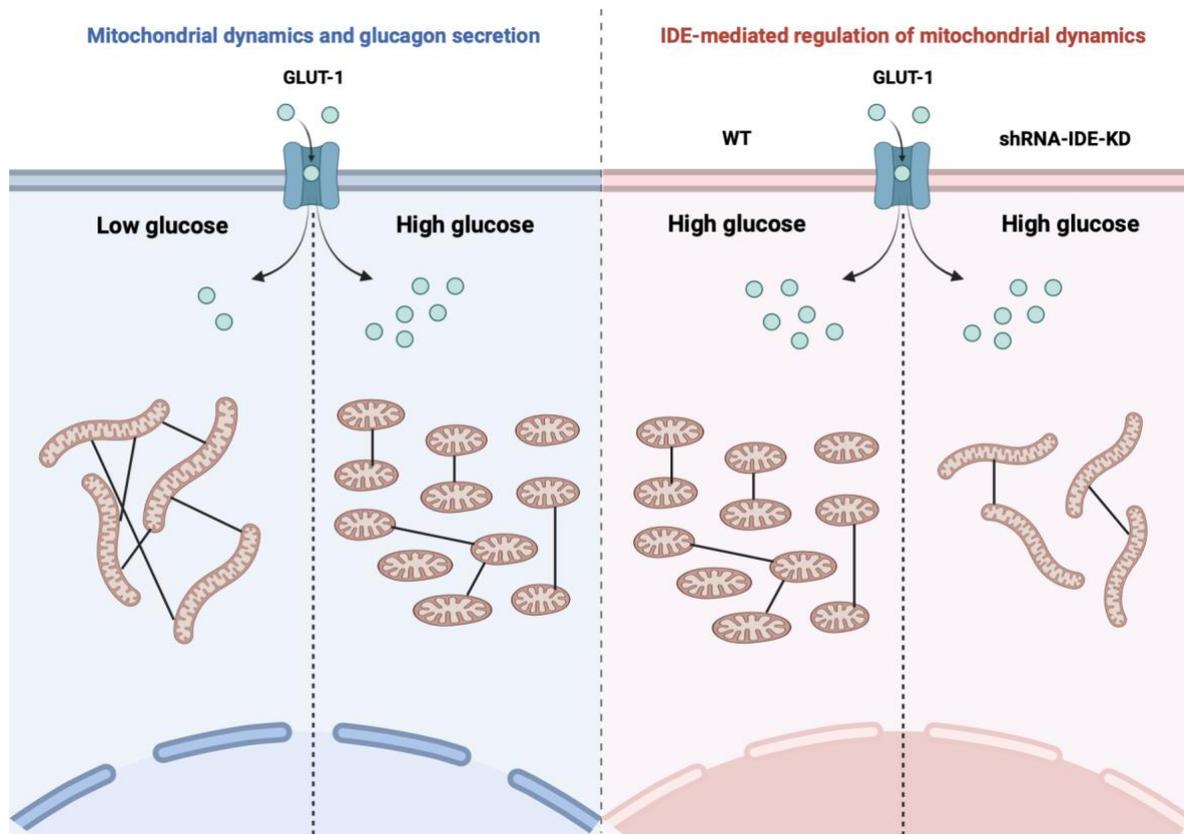
In WT alpha-cells, under conditions of glucagon repression (16 mM glucose; HG) compared to glucagon secretion (1 mM glucose; LG), there was an increase in the number (~40%) and the fragmentation level (~40%) of mitochondria, whereas the mitochondrial connections remained unchanged.

Using shRNA-IDE, we diminished by (~50%) the expression levels of IDE in alpha-cells (shRNA-IDE-KD cells), which resulted in a completely loss of glucagon secretion in response to LG. There was a reduction in the number (~42%) and connections between mitochondria (~50%), whereas the fragmentation level remained unchanged, in conditions of glucagon repression (HG) compared to glucagon secretion (LG).

Finally, shRNA-IDE-KD cells compared to WT cells, exhibited lower number of mitochondria (~55%) and mitochondrial connections (~42%) under conditions of glucagon repression (HG), indicating that IDE is necessary for the regulation of mitochondrial dynamics in alpha cells.

In conclusion, IDE is a novel regulator of mitochondrial plasticity in the adaptive responses of alpha-cells between changes in the secretory and the inhibitory phases of glucagon secretion.

## RESUMEN GRÁFICO



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Diabetes mellitus: definición, contexto y fisiopatología

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la diabetes mellitus (DM) como un desorden metabólico de etiología múltiple caracterizado por una alteración en el metabolismo de los hidratos de carbono, las grasas y las proteínas, como resultado de un defecto en la secreción de insulina, su acción, o ambas (1). A nivel mundial, las últimas estimaciones de la Federación Internacional de Diabetes (IDF) muestran que más de 500 millones de personas padecen diabetes, cuya cifra ascenderá hasta los casi 800 millones en 2045 (2).

La diabetes se ha convertido en una de las enfermedades crónicas más graves y comunes de nuestro tiempo, causando una gran variedad de complicaciones y reduciendo la esperanza de vida (3). Entre estas complicaciones encontramos las macrovasculares (enfermedad cardiovascular) y microvasculares (neuropatía, nefropatía y retinopatía), así como complicaciones agudas (cetoacidosis diabética, estado hiperosmolar hiperglucémico, acidosis láctica e hipoglucemia) y, en última instancia, la muerte (4).

Existen diferentes tipologías de diabetes, pero las más prevalentes y comunes son (5):

- **Diabetes tipo 1 (DM1):** debida a la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas, generalmente con deficiencia absoluta de insulina.
- **Diabetes tipo 2 (DM2):** debida a una pérdida progresiva en la capacidad de secreción de insulina acompañado generalmente de resistencia a la misma.

Independientemente de la fisiopatología particular de la diabetes de cada individuo, una de las características unificadora de todos los tipos de diabetes es la presencia de hiperglucemia crónica (6).

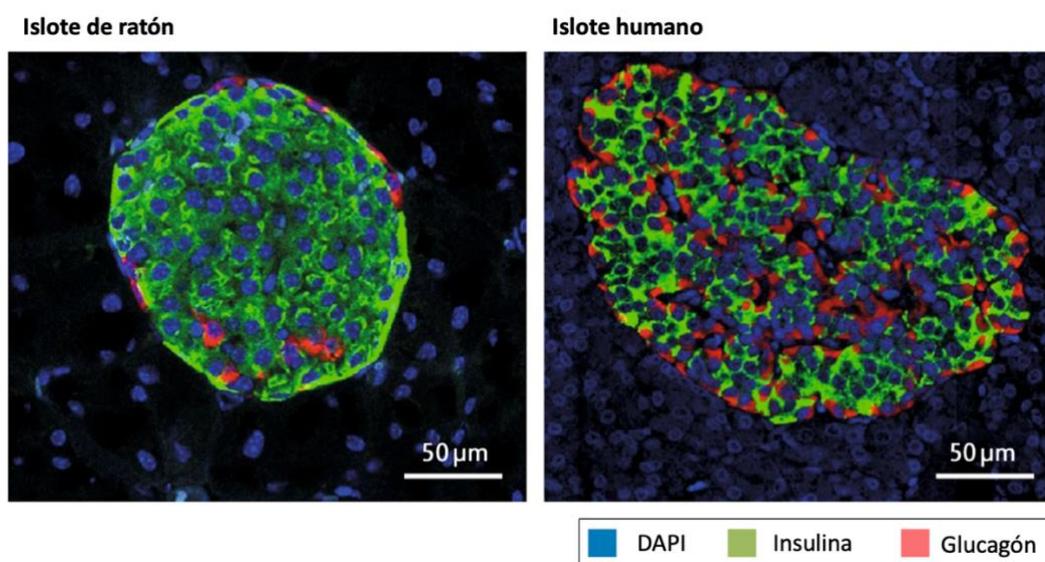
Centrándonos en la fisiopatología de la DM2, tradicionalmente la causa de esta hiperglucemia crónica ha girado en torno a la insulina, una hormona pancreática de 51 aminoácidos sintetizada, almacenada y secretada por la célula  $\beta$  del páncreas endocrino en respuesta a concentraciones elevadas de glucosa en sangre. El paradigma actual sostiene que la hiperglucemia es el resultado, por un lado, de la disminución en la secreción de insulina como consecuencia de una pérdida de la masa y función de la célula  $\beta$  (7); y por otro lado a un aumento de la resistencia a la insulina en tejidos periféricos (músculo esquelético, hígado y tejido adiposo) debido a la aparición de glucotoxicidad e inflamación (8,9).

Sin embargo, en los últimos años se ha puesto el foco en que, además de un defecto en la secreción o acción de la insulina, el exceso de glucagón (hiperglucagonemia) también contribuye al desarrollo de la diabetes (10).

Se ha observado que pacientes con DM2 presentan hiperglucagonemia en ayunas y una disminución en la supresión de glucagón en estado postprandial (11,12). Esta situación de hiperglucagonemia contribuiría a agravar la hiperglucemia característica de la diabetes, por lo que resulta de vital importancia profundizar en la fisiología de la célula  $\alpha$ -pancreática.

## 1.2. Célula $\alpha$ y secreción de glucagón

La célula  $\alpha$  es un tipo celular presente en los islotes de Langerhans encargada principalmente de la secreción de glucagón en respuesta a bajos niveles de glucosa en sangre. Éstas representan el segundo tipo celular más abundante del islote, difiriendo en cuanto a localización y número entre roedores y humanos (Fig. 1). En roedores, las células  $\alpha$  se encuentran en la periferia de los islotes y tienen una menor representación en cuanto a número, siendo en los humanos más numerosas y distribuidas de manera aleatoria (13,14).



**Figura 1. Citoarquitectura del páncreas endocrino de ratón y humano.** Los islotes de ratón tienen una población mayor de células  $\beta$  (insulina marcada en verde) y se encuentran rodeadas por un bajo número de células  $\alpha$  (glucagón marcado en rojo). Los islotes humanos tienen una población mayor de células  $\beta$  respecto a células  $\alpha$ , distribuidas de manera heterogénea. Los núcleos celulares están marcados en azul con DAPI. Adaptado de la referencia (14).

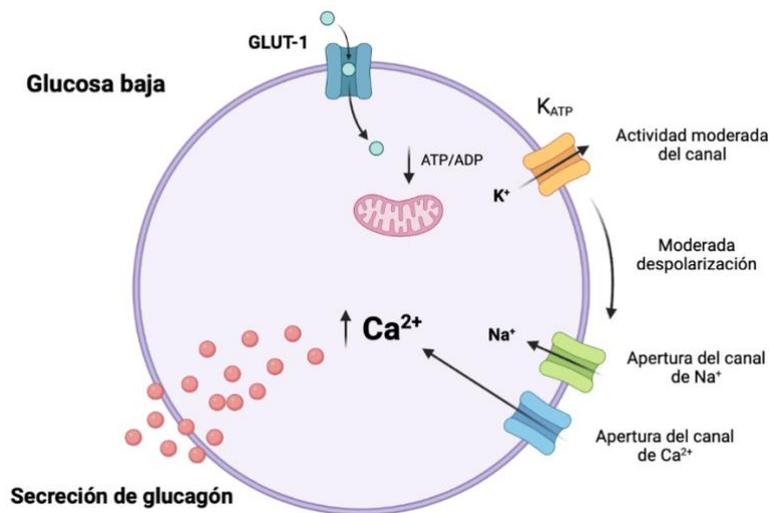
La mayor abundancia relativa de células  $\alpha$  en los islotes pancreáticos humanos en comparación con los islotes de roedores sugiere que el glucagón podría desempeñar un papel aún más destacado en la regulación de la glucemia en los seres humanos (15).

Los mecanismos fisiológicos y moleculares que subyacen a la secreción de glucagón aún no están completamente definidos, aunque el modelo de acoplamiento estímulo-secreción propuesto por Zhang et al. en 2013 (16) y revisado en 2023 (17) es el más aceptado, siendo el canal de potasio dependiente de ATP ( $K_{ATP}$ ) un elemento clave.

En ratón, la glucosa es captada por las células  $\alpha$  a través del transportador de glucosa 1 (GLUT1), el cual tiene una  $K_m$  de 1-2 mM, y es metabolizada por las mitocondrias, modificando los niveles intracelulares de ATP y la ratio ATP/ADP en función de los niveles de glucosa circulantes (18).

En presencia de concentraciones elevadas de glucosa (a partir de 4-5 mM), el incremento del metabolismo celular y el consecuente aumento en la ratio ATP/ADP supone el cierre del canal  $K_{ATP}$ , una elevada despolarización de la membrana plasmática

y, consecuentemente, la inactivación de los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que se traduce en una inhibición de la secreción de glucagón. En cambio, cuando la concentración de glucosa es baja (1-2 mM) el canal  $\text{K}_{\text{ATP}}$  induce una moderada despolarización que conlleva a la apertura de los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , incrementando el flujo de ambos iones al espacio intracelular y desencadenando la exocitosis y secreción de glucagón (Fig. 2) (15,18).



**Figura 2. Mecanismo de secreción de glucagón estimulado por baja concentración de glucosa en ratón.** Elaboración propia, adaptado de la referencia (15).

Debido a la gran relevancia de la célula  $\alpha$  en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, no es de extrañar que aparezcan complicaciones cuando su función está alterada, siendo la disfunción mitocondrial un mecanismo que lleva a dicha situación (19).

En células  $\alpha$ , la disfunción mitocondrial conduce a un cambio patológico en la secreción de glucagón caracterizándose por una secreción excesiva a altas concentraciones de glucosa y una secreción insuficiente en condiciones de hipoglucemia, marcadores característicos de la DM2 (16,19).

### 1.3. Dinámica mitocondrial

Tradicionalmente, las mitocondrias han sido catalogadas como las 'centrales energéticas' de la célula. No obstante, esta terminología no hace justicia a la naturaleza multifuncional y maleable de estos orgánulos (20).

Las mitocondrias son orgánulos dinámicos que, además de jugar un papel imprescindible en el metabolismo energético, son fundamentales en la síntesis de lípidos, metabolismo de aminoácidos, termogénesis, o en la regulación de señales proapoptóticas y antivirales, entre otras muchas (21–25). Todas estas funciones son, en parte, reguladas por ciclos dinámicos de fusión y fisión (Fig. 3), procesos conjuntamente conocidos bajo el término de dinámica mitocondrial (26).

### Fusión mitocondrial

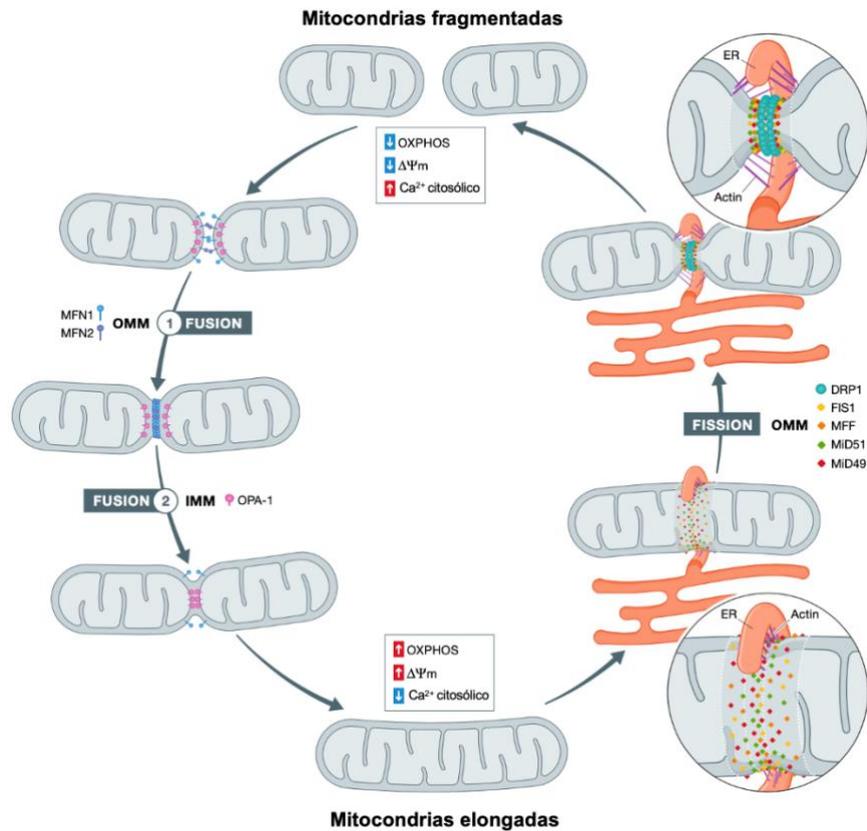
En células de mamífero, la fusión mitocondrial está regulada principalmente por dos mitofusinas (Mfn1 y Mfn2) y por la proteína de atrofia óptica 1 (Opa1), localizadas en la membrana mitocondrial externa (OMM) e interna (IMM), respectivamente (26–28).

El mecanismo por el cual ocurre la fusión mitocondrial no está completamente dilucidado. El proceso comienza con la interacción de dos moléculas Mfn1, provocando la hidrólisis de GTP y fusionando las dos OMMs. Seguidamente, gracias a Opa1 finaliza el proceso de fusión de las IMM (26,29), la cual también está involucrada en el remodelado de las crestas mitocondriales (30) (Fig. 3). Sin embargo, aún no se conoce el papel exacto que ocupa la Mfn2 en la fusión mitocondrial, aunque se ha visto que participa en la interacción entre mitocondrias y con otros orgánulos, particularmente el retículo endoplásmico (RE) (29,31).

### Fisión mitocondrial

Por su parte, la fisión mitocondrial se lleva a cabo principalmente por la proteína relacionada con la dinamina 1 (Drp1), una proteína citoplasmática que precisa de diferentes proteínas adaptadoras para unirse a la membrana mitocondrial, como el factor de fisión mitocondrial (Mff), la proteína de fisión mitocondrial (Fis1) y las proteínas de dinámica mitocondrial 49 y 51 (MID49 y MID51) (32). Curiosamente, el proceso de fisión ocurre en lugares donde el RE 'envuelve' a las mitocondrias, lo que permite que Drp1 oligomerice y provoque la constricción de las membranas mitocondriales, dando como resultado dos mitocondrias hijas (33) (Fig. 3).

Se ha visto que ciertas proteínas implicadas en la dinámica mitocondrial, particularmente la Mfn2, se encuentran disminuidas en músculo esquelético de pacientes con obesidad y DM2 (34,35). De hecho, esta proteína jugaría un papel importante en la regulación de la señalización de insulina y la homeostasis de la glucosa *in vivo* (36), lo que apoyaría la importancia de profundizar en este ámbito de estudio.



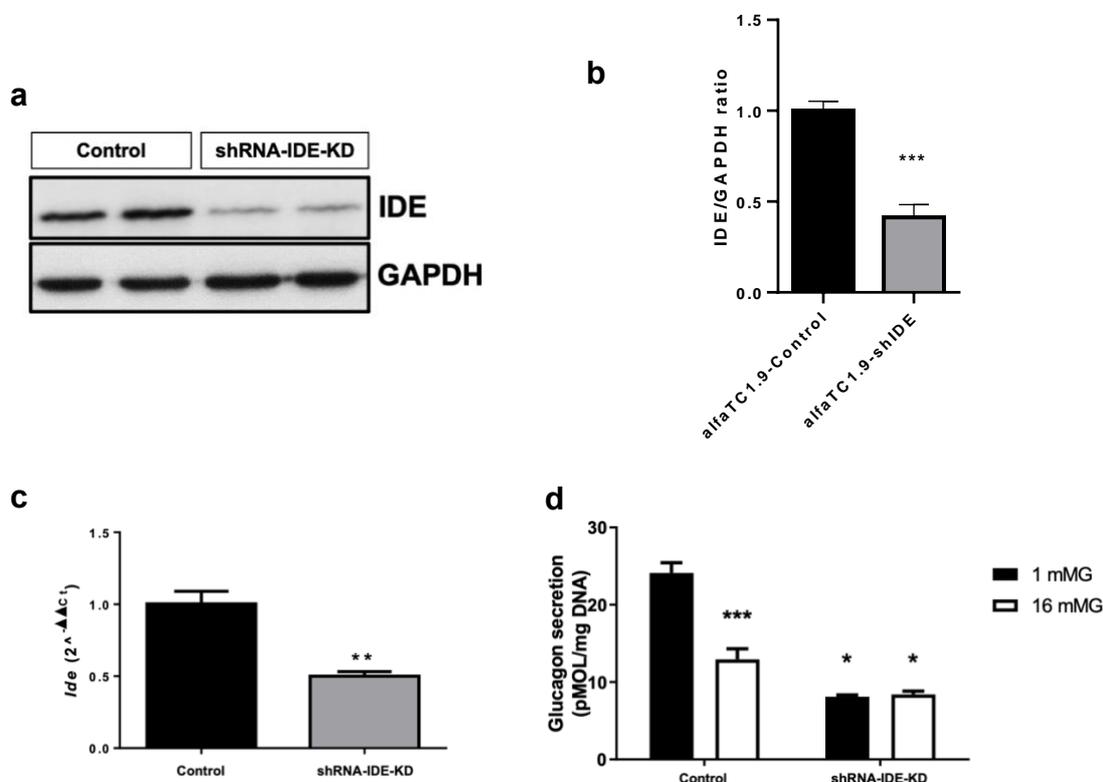
**Figura 3. Dinámica mitocondrial: ciclos coordinados de fusión y fisión.** Adaptado de la referencia (37). OXPHOS, fosforilación oxidativa; MFN1, mitofusina 1; MFN2, mitofusina 2; OPA-1, proteína de atrofia óptica 1; Drp1, proteína relacionada con la dinamina 1; Fis1, proteína de fisión mitocondrial 1; Mff, factor de fisión mitocondrial; MID49, proteína de dinámica mitocondrial 49; MID51, proteína de dinámica mitocondrial 51;  $\Delta\Psi_m$ , potencial de membrana mitocondrial.

#### 1.4. Insulin-degrading enzyme

*Insulin-degrading enzyme* (IDE) es una metaloendopeptidasa de  $Zn^{2+}$  ubicuamente expresada en células respondedoras y no respondedoras a la insulina (38). En humanos, el gen *Ide* se encuentra en un locus asociado a una mayor susceptibilidad a desarrollar DM2 (39). El nombre de esta proteína viene por su capacidad de degradar la insulina *in vitro*, aspecto descrito por primera vez hace más de 70 años por Mirsky A. et al. (40). Además, se ha visto que IDE es capaz de degradar otros péptidos, incluido el glucagón, la somatostatina o el péptido amiloide  $A\beta$  (41).

En los últimos años, ha ido ganando confianza la hipótesis de que IDE podría tener un papel no proteolítico. Por ejemplo, Sharma SK et al. (42) postularon que IDE actuaría como una chaperona con capacidad de unirse a los oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína, conduciendo a la formación de complejos estables e irreversibles de la misma. Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que la deficiencia de IDE conduce a una agregación de  $\alpha$ -sinucleína en células  $\alpha$ -pancreáticas, contribuyendo a la alteración de la secreción de glucagón debido a una disfunción en el citoesqueleto y alteración de la cilíogenesis *in vivo* (43).

Experimentos realizados en nuestro laboratorio por la Dra. Beatriz Merino, han demostrado que una reducción de la expresión de IDE (~50%) en las células  $\alpha$  causa una inhibición en la secreción de glucagón, independientemente de la concentración de glucosa, situando a IDE como un regulador importante de la secreción de glucagón *in vitro* (Fig. 4a-d).



**Figura 4. La pérdida de expresión de IDE suprime la capacidad de secretar glucagón en respuesta a glucosa en las células  $\alpha$ .** (A) *Western blot* representativo de los niveles de IDE en células control ( $\alpha$ Tc1.9) y células genéticamente modificadas (shRNA-IDE-KD). (B) Cuantificación del panel A. Los datos son la media  $\pm$  SEM. N= 3/grupo. \* $p$ <0.5 vs. Control mediante la prueba *t* de Student. (C) Cuantificación de la expresión génica de *Ide*. Los datos son la media  $\pm$  SEM. N= 3/grupo. \* $p$ <0.5 vs. Control por la prueba *t* de Student. (D) Secreción de glucagón. Las células control ( $\alpha$ Tc1.9) y shRNA-IDE-KD fueron preincubadas en presencia de baja (1 mM) y alta (16 mM) glucosa, seguido de la cuantificación de glucagón en el sobrenadante mediante un ELISA específico para la hormona. Los datos son la media  $\pm$  SEM. N= 3/grupo. \* $p$ <0.5 vs. Control mediante la prueba *One Way Anova*. Resultados no publicados.

Respecto a su localización subcelular, IDE se encuentra principalmente en el citoplasma, aunque nuestro grupo también la ha localizado en la superficie de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) humanas (44). En 2005, Leissring M. et al. identificó una isoforma de IDE producida por una iniciación alternativa de la traducción, descubriendo así la isoforma mitocondrial (45).

El papel de la isoforma mitocondrial de IDE y los efectos que ésta pueda tener sobre la función y dinámica mitocondria son completamente desconocidos. Sin embargo, recientemente se ha publicado que IDE interacciona con proteínas relacionadas con la

síntesis y el ensamblaje de los complejos mitocondriales I y IV, y se especula que ésta podría actuar como chaperona y contribuir a la homeostasis de las proteínas y estrés celular (46).

### 1.5. Hipótesis y objetivos

Por todo lo expuesto, nuestras hipótesis de trabajo son:

- **Hipótesis 1:** la dinámica mitocondrial en células  $\alpha$ -pancreáticas cambia en condiciones de secreción de glucagón.
- **Hipótesis 2:** la deficiencia de IDE altera la dinámica mitocondrial en células  $\alpha$ -pancreáticas.

**El objetivo general** del presente trabajo fue determinar si la deficiencia de IDE en células  $\alpha$ -pancreáticas podría alterar la dinámica mitocondrial, siendo los objetivos específicos conocer de qué forma varía la morfología mitocondrial tanto en células  $\alpha$ -pancreáticas WT (control) como en aquellas con niveles de expresión de IDE reducidos (shRNA-IDE-KD).

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

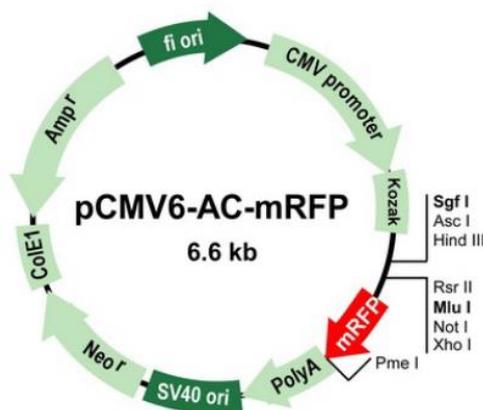
### 2.1. Cultivo celular

La línea celular utilizada fue  $\alpha$ TC1.9 (clon 9), una línea celular inmortalizada procedente de un adenoma pancreático de ratón (*mus musculus*), adherente y de morfología epitelial. También se empleó una línea con niveles de expresión de IDE reducidos ~50% (shRNA-IDE-KD) que ha sido desarrollada en nuestro laboratorio por la Dra. Beatriz Merino (datos sin publicar).

Las células se cultivaron en DMEM suplementado con FBS (10%), glucosa (16 mM), y antibióticos (penicilina/estreptomicina), a una densidad de 100.000 células/ml, en flasks de 75cm<sup>3</sup> con una atmósfera húmeda de 37°C al 5% de CO<sub>2</sub>. Las células fueron subcultivadas a una ratio de 1/4, procurando que la confluencia celular no superase el 70-80%.

### 2.2. Método de transfección

El método de transfección utilizado fue empleando fosfato cálcico, que consiste en la formación de precipitados entre el cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) y el plásmido de interés en una solución salina de fosfatos. En este caso, el plásmido de interés fue un vector de expresión con una secuencia de dirección a la mitocondria que lleva unida una proteína roja fluorescente (mitRFP) (Fig. 5). Los precipitados formados fueron endocitados por las células, expresándose el plásmido en las mitocondrias.



**Figura 5. Vector de expresión utilizado.** Imagen tomada de (47). mRFP, proteína roja fluorescente mitocondrial; SV40, origen de replicación SV40; Neo<sup>r</sup>, gen de resistencia a neomicina; ColE1, gen para la colicina E1; Amp<sup>r</sup>, gen de resistencia a la ampicilina; Fi ori, origen de replicación f1; CMV promoter, promotor de citomegalovirus.

En el día 1, se sembraron células WT y shRNA-IDE-KD (100.00 células por pocillo) en placas de 24 pocillos. En el día 2 se cambió el medio de cultivo, y transcurridas 2 horas se realizó la transfección por fosfato cálcico. Para ello se empleó:

- Vector de expresión mitRFP
- CaCl<sub>2</sub> 1:10 (disuelto en agua destilada)
- 100µl HEBS 2x
- Agua destilada

Se prepararon dos eppendorf, a cada uno de los cuales se les añadió, en el siguiente orden: 0,83µg del vector, 100µl de CaCl<sub>2</sub> y 100µl de HEBS 2x, éste último añadido gota

a gota y burbujeando al final. El volumen final de cada eppendorf fue de 200 $\mu$ l, es decir, un total de 400 $\mu$ l. Se dejaron los eppendorfs a temperatura ambiente durante 10 minutos y posteriormente se les dio un vórtex. Por último, se añadieron 66 $\mu$ l de la solución a cada pocillo y se dejaron 24 horas en el mismo medio, con el fin de que conseguir una transfección óptima.

### 2.3. Ensayo de secreción de glucagón para observar morfología mitocondrial

Se simuló un ensayo de secreción de glucagón *in vitro* con el fin de observar si existían cambios en la morfología mitocondrial en función de si las células eran sometidas a estimulación o represión de la secreción. Para ello, se prepararon 500ml de un buffer de secreción KRB ajustado a pH 7,4 con la siguiente composición:

- 139mM NaCl
- 3,5mM KCl
- 0,49mM MgSO<sub>4</sub>
- 1,99 mM NaHCO<sub>3</sub>
- 4,99mM HEPES
- 2,59mM CaCl<sub>2</sub>
- 0,49mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Se cogieron x2 falcon independientes y se le añadió a cada uno de ellos 50ml del buffer y la concentración de glucosa correspondiente para estimular o reprimir la secreción de glucagón:

- x1 falcon → 1 mM glucosa (condición estimuladora de la secreción)
- x1 falcon → 16 mM glucosa (condición represora de la secreción)

A continuación, se le añadió media cucharada de BSA libre de ácidos grasos a cada falcon, se aplicó un vórtex y se metieron ambos falcon al incubador durante 30 minutos sin tapa para que hubiera intercambio de CO<sub>2</sub>.

Pasados los 30 minutos, se cogió la placa de transfección y se lavaron todos los pocillos 3 veces con 1ml del falcon de 5 mM dejando el último lavado y metiéndolo otros 30 minutos al incubador.

De nuevo, pasados los 30 minutos sacamos la placa del incubador y añadimos cada una las concentraciones a dos pocillos, de la siguiente forma:

- Pocillos de 1mM → quitamos los 5 mM, lavamos una vez con 1 mM, retiramos y añadimos de nuevo 1 mM
- Pocillos de 16mM → quitamos los 5 mM y añadimos 16 mM

Volemos a meter la placa por última vez durante 30 minutos al incubador.

Pasado este tiempo, sacamos la placa del incubador y la ponemos sobre hielo durante 5 minutos para que las células dejen de secretar. A continuación, fijamos los cristales en el portaobjetos:

1. Quitamos los medios de secreción
2. Lavamos los pocillos dos veces con 1ml de PBS
3. Añadimos 1mL de formalina al 10% y dejamos durante 5 minutos
4. Retiramos la formalina y añadimos PBS para que no se sequen las células

5. Añadimos una gota de DAPI en el portaobjetos y montamos los cristales sobre éste, debiendo estar la parte del cristal en la que se encuentran fijadas las células en contacto con el DAPI para marcar los núcleos.

## 2.4. Microscopía

Para la toma de imágenes se empleó el Microscopio Confocal Leica TCS SP5. Las fotografías se tomaron a una resolución de 1024x1024 píxeles, a zoom 8, y se guardaron con formato multicanal, uno para el DAPI (azul, longitud de onda 488) y otro para la proteína roja fluorescente mitRFP (rojo, longitud de onda 594).

Se fotografiaron un total de 5 células de cada condición de cada uno de los portaobjetos, es decir, un total de 30 células por cada condición, obteniendo 10 *Z-stacks* de cada célula.

## 2.5. Cuantificación y análisis de la dinámica mitocondrial

Para la cuantificación se utilizó el software Fiji ImageJ 2.9.0/1.54c para MacOS X y el plugin Mitochondrial Analyzer V2.3, el cual nos aporta múltiples parámetros relacionados con la dinámica mitocondrial.

El análisis parte inicialmente de un preprocesamiento, que consiste en seleccionar el canal marcado con las mitocondrias, convertirlo en blanco y negro, eliminar el fondo y aumentar el brillo. Esto nos permitirá un análisis de las imágenes más óptimo. A continuación, se lleva a cabo el procesamiento final previo al análisis de la dinámica mitocondrial, que consiste en ajustar el enfoque, contraste y límite de las mitocondrias.

Por último, partiendo de las imágenes ya procesadas, se procede al análisis de la dinámica mitocondrial. En primer lugar debe ajustarse el umbral, acercándose la imagen analizada lo máximo a la imagen real y fijándonos en los máximos detalles posibles. Una vez hayamos fijado el umbral óptimo, fijaremos los parámetros '*Block size*' y '*C-value*', siendo éstos los mismos en el análisis mitocondrial de todas las células con el fin de preservar la homogeneidad de resultados. En este caso, el '*Block Size*' y '*C-value*' fueron de 1.45 y 7, respectivamente.

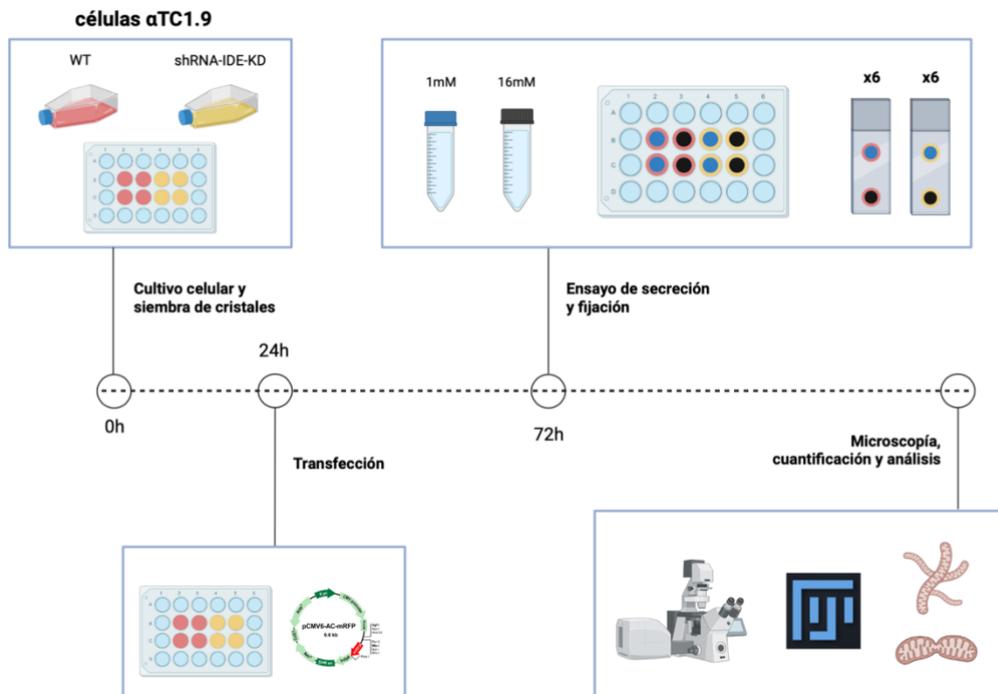
Finalmente, se analizarán todas las imágenes que seleccionemos, obteniendo todos los parámetros que le pidamos al software.

Para facilitar la comprensión y estructuración de los resultados, los diferentes parámetros de la dinámica mitocondrial fueron agrupados en morfología (número de mitocondrias, esfericidad, volumen medio y área de superficie media) y red mitocondrial (ramificaciones, longitud total de ramificaciones, conexión entre ramificaciones y número de terminaciones finales), tal y como recogen guías de análisis mitocondrial (48).

## 2.6. Desarrollo experimental

Como se puede apreciar en la Figura 6, la duración del protocolo experimental fue de 72h sin tener en cuenta la cuantificación y el análisis estadístico. Se comenzó con el cultivo y siembra de células  $\alpha$ TC1.9 WT y shRNA-IDE-KD. Transcurridas 24h desde el momento del sembrado de las células, se procedió a realizar la transfección mediante el vector mitRFP y se dejó durante 48h. A las 72h, se procedió a realizar la última parte

del experimento, que consistió en un ensayo de secreción de glucagón y la posterior fijación de los cristales en el portaobjetos, obteniendo un total de 6 por cada condición.



**Figura 6. Diagrama del desarrollo experimental realizado para la elaboración del TFM.** Elaboración propia con BioRender.

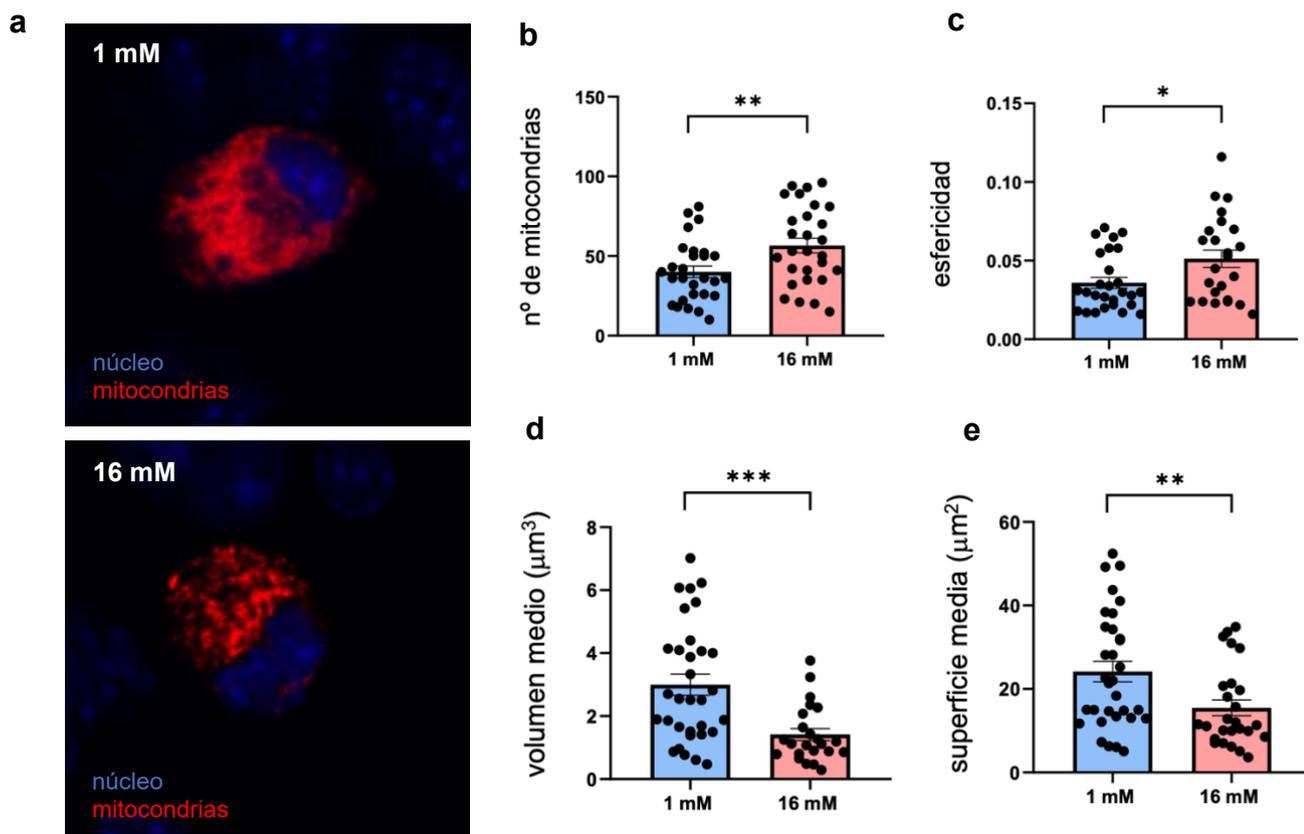
## 2.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico y representación gráfica de los datos se realizó a través del programa estadístico GraphPad Prism 8.02. Debido a la variabilidad de las muestras, en primer lugar, se realizó el análisis de *outliers*. Este análisis se realizó con GraphPad, ajustando a un 10% la exclusión de *outliers*. Para determinar la distribución de la normalidad de los datos se empleó la prueba Kolmogórov-Smirnov. Para las variables que seguían una distribución normal se aplicó la prueba estadística “t-test”, mientras que para las variables que no seguían una distribución normal se aplicó la prueba estadística “U de Mann-Whitney”. Ambas pruebas estadísticas permiten comparar las medias de dos grupos de datos. El nivel de significancia se ajustó a  $p < 0.05$ .

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Dinámica mitocondrial en células $\alpha$ -pancreáticas WT en condiciones secretoras (1 mM) y represoras (16 mM) de glucagón.

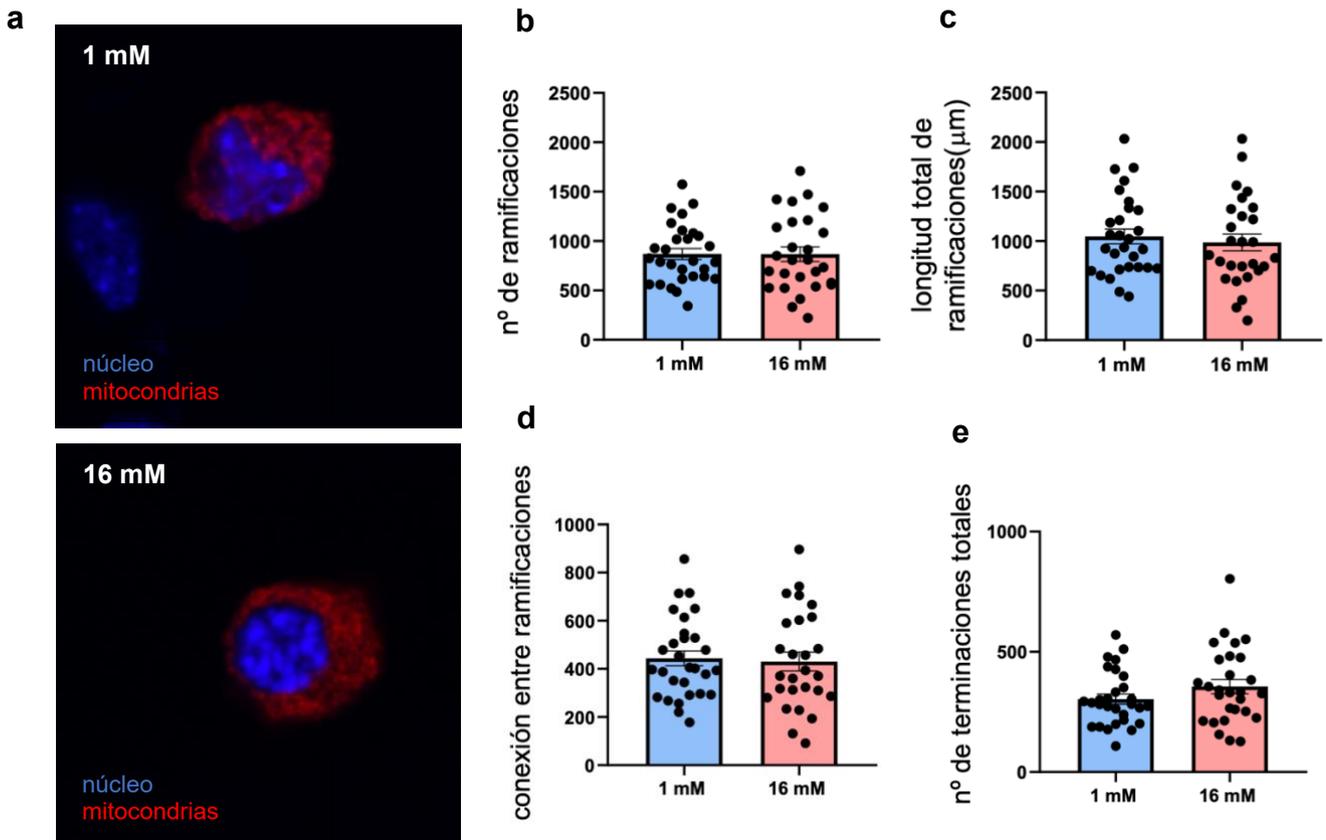
El análisis del número y morfología mitocondrial (Fig. 7a) en células WT mostró que tanto el número de mitocondrias (Fig. 7b) como el grado de esfericidad (Fig. 7c) fue menor en condiciones de secreción de glucagón respecto a condiciones represoras. Además, el tamaño (volumen y área) fue mayor en comparación con las células bajo la condición represora (Fig. 7d-e).



**Figura 7. Análisis y comparación del número y morfología mitocondrial bajo condiciones secretoras y represoras de glucagón en células  $\alpha$  WT.** Imágenes representativas del número y morfología mitocondrial a 1 y 16 mM glucosa (a). Representación gráfica del número de mitocondrias (b), esfericidad (c), volumen medio (d) y superficie media (e). Los datos representados corresponden a la media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Unpaired *t*-test.

Estos datos sugieren la existencia de un fenotipo mitocondrial más elongado en condiciones secretoras (baja concentración de glucosa) en comparación con la condición represora, lo que podría deberse a un incremento de la fusión mitocondrial o a una disminución de la mitofagia.

Respecto al análisis de la red mitocondrial (Fig. 8a) no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros medidos independientemente de la condición de secreción (Fig. 8b-e), lo que sugiere que la red mitocondrial no se modifica en respuesta a los estímulos secretores o represores de glucagón.



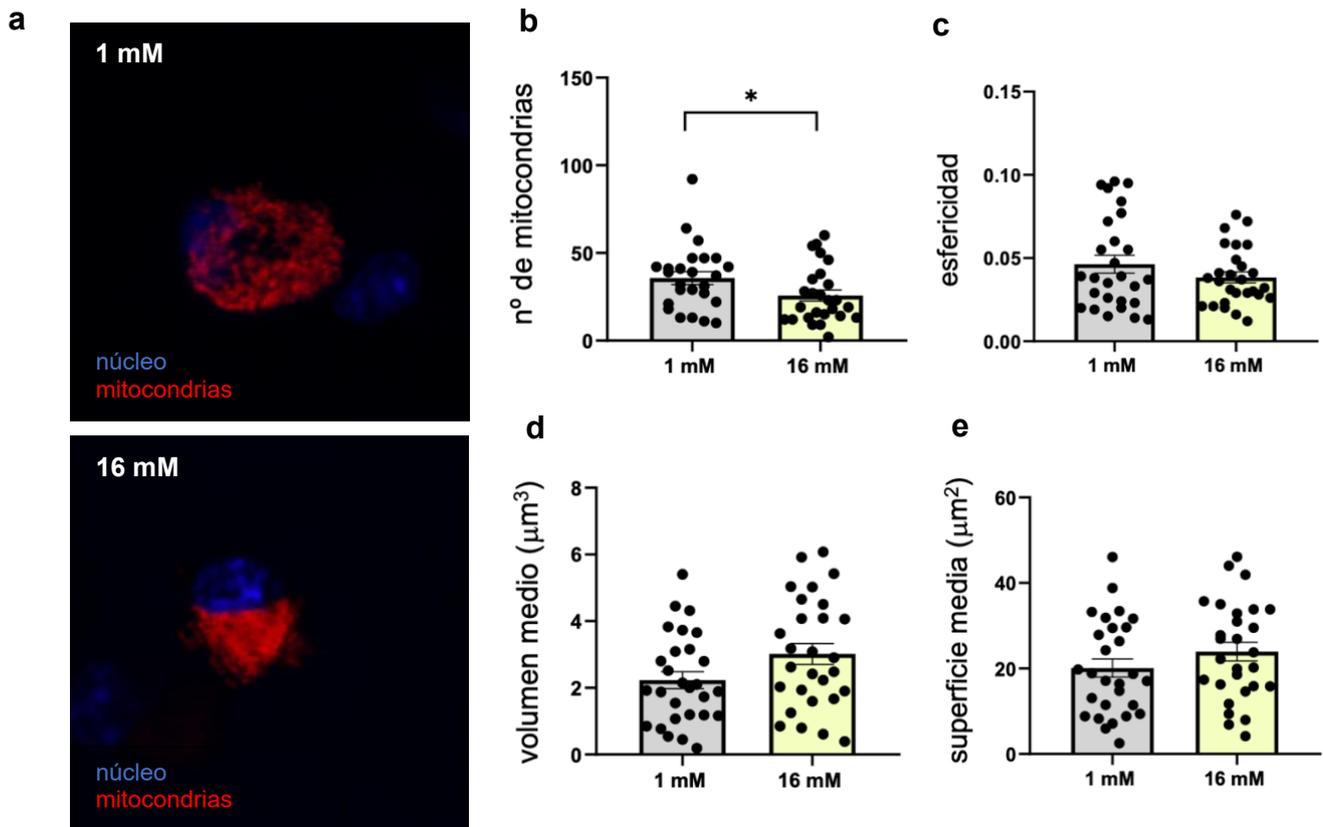
**Figura 8. Análisis y comparación de la red mitocondrial bajo condiciones secretoras y represoras de glucagón en células  $\alpha$  WT.** Imágenes representativas de la red mitocondrial a 1 y 16 mM glucosa (a). Representación gráfica del número de ramifications (b), longitud total de las ramifications (c), conexión entre ramifications (d) y número de terminaciones totales (e). Los datos representados corresponden a la media  $\pm$  SEM. *Unpaired t-test*.

En resumen, el análisis de la dinámica mitocondrial de células  $\alpha$ -pancreáticas WT parece indicar la existencia de una adaptación en el número y morfología individual bajo condiciones secretoras sin presentar cambios en la red mitocondrial.

### 3.2. Dinámica mitocondrial en células $\alpha$ -pancreáticas shRNA-IDE-KD en condiciones secretoras (1 mM glucosa) y represoras (16 mM glucosa) de glucagón.

Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio por la Dra. Beatriz Merino, determinaron que una reducción en los niveles de expresión de IDE (~50%) causa la pérdida en la capacidad de secretar glucagón en respuesta a glucosa en las células  $\alpha$ .

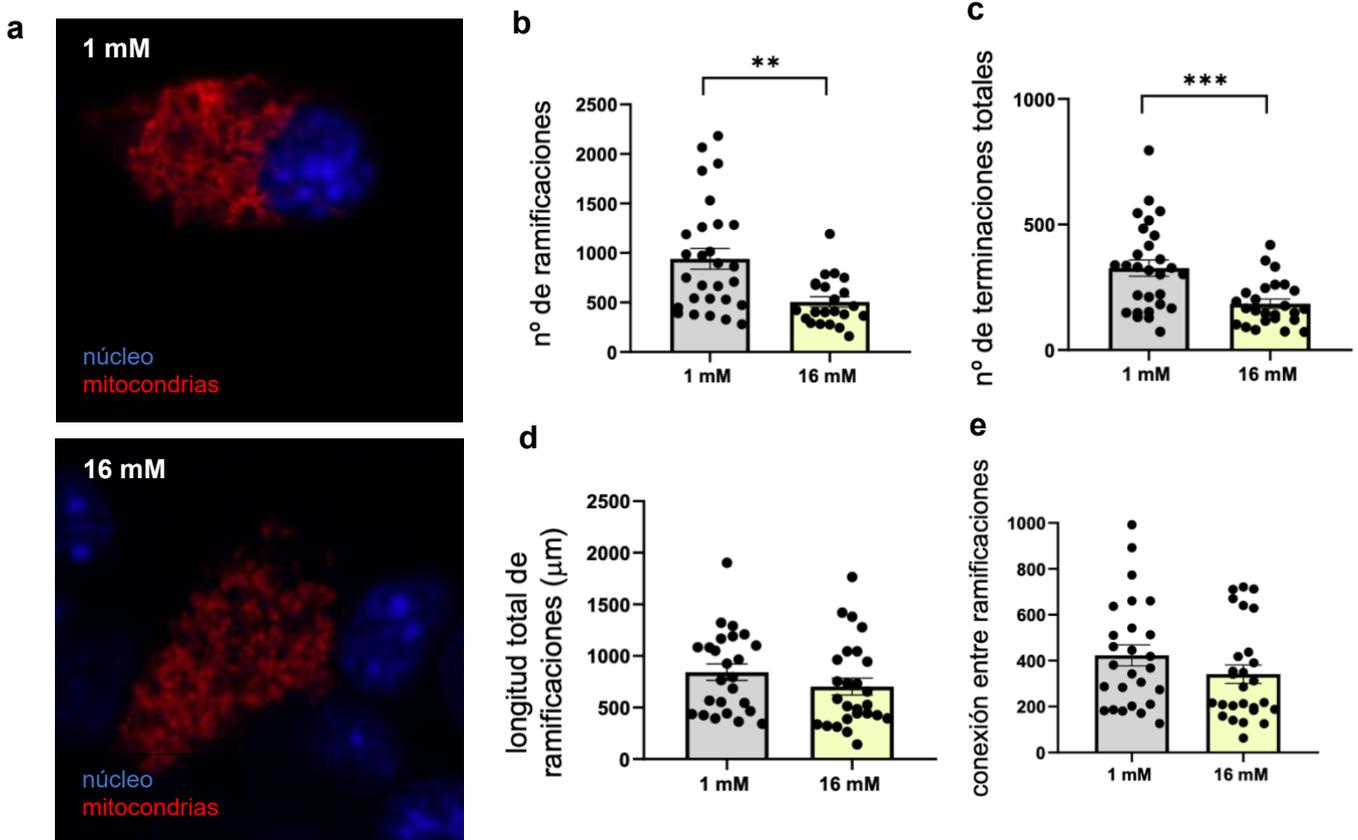
El análisis del número y morfología mitocondrial (Fig. 9a) en células shRNA-IDE-KD únicamente mostró resultados significativos en el número de mitocondrias, siendo menor en aquellas células preincubadas a 16 mM glucosa en comparación con las preincubadas a 1 mM glucosa (Fig. 9b). En cuanto a la esfericidad y el tamaño (área y volumen), no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros (Fig. 9c-e).



**Figura 9. Análisis y comparación del número y morfología mitocondrial bajo condiciones secretoras y represoras de glucagón en células  $\alpha$  shRNA-IDE-KD.** Imágenes representativas del número y morfología mitocondrial a 1 y 16 mM glucosa (a). Representación gráfica del número de mitocondrias (b), esfericidad (c), volumen medio (d) y superficie media (e). Los datos representados corresponden a la media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ . *Unpaired t-test*.

En resumen, estos datos sugieren que, a concentraciones elevadas de glucosa, la ausencia de IDE regula la cantidad de mitocondrias en células  $\alpha$ -pancreáticas. La reducción del número de mitocondrias sin alterar su tamaño sugiere que podría deberse a una disminución de la biogénesis mitocondrial o a un incremento de la mitofagia.

Respecto al análisis de la red mitocondrial (Fig. 10a), se observó una disminución en el número de ramificaciones y terminaciones totales en aquellas células sometidas a elevadas concentraciones de glucosa (Fig. 10b-c), mientras que la longitud total y el número de conexiones no presentaron diferencias (Fig. 10d-e).



**Figura 10. Análisis y comparación de la red mitocondrial bajo condiciones secretoras y represoras de glucagón en células  $\alpha$  shRNA-IDE-KD.** Imágenes representativas de la red mitocondrial a 1 y 16 mM glucosa (a). Representación gráfica del número de ramifications (b), número de terminaciones totales (c), longitud total de las ramifications (d) y conexión entre ramifications (e). Los datos representados corresponden a la media  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . *Unpaired t-test*.

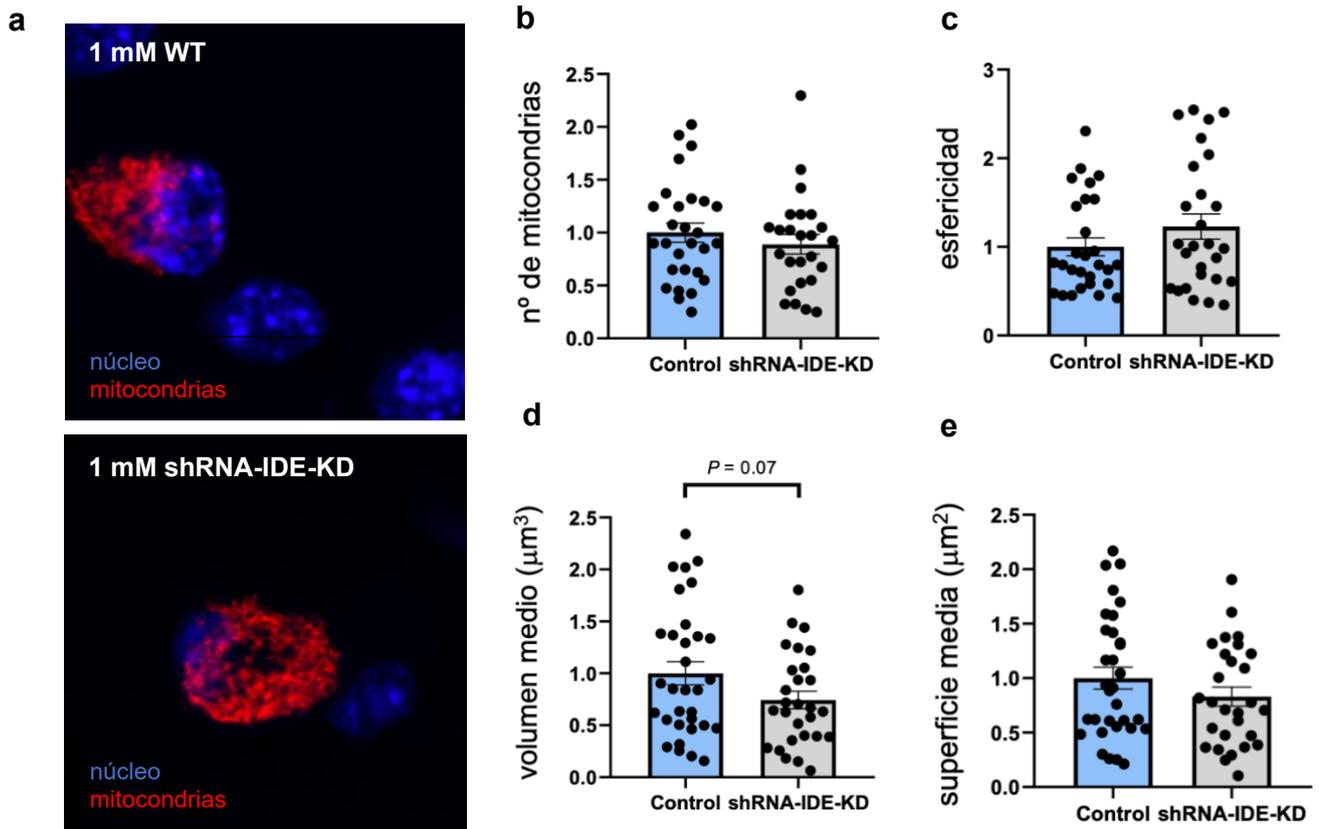
Por lo tanto, el análisis de la dinámica mitocondrial en células  $\alpha$ -pancreáticas shRNA-IDE-KD sometidas a 16mM glucosa sugiere que los niveles de IDE son importantes en el mantenimiento del número de mitocondrias y su capacidad de establecer conexiones entre sí.

### 3.3. Comparación de la dinámica mitocondrial entre células $\alpha$ -pancreáticas WT y shRNA-IDE-KD.

Por último, decidimos comparar la dinámica mitocondrial de los diferentes genotipos celulares a igualdad de concentración de glucosas.

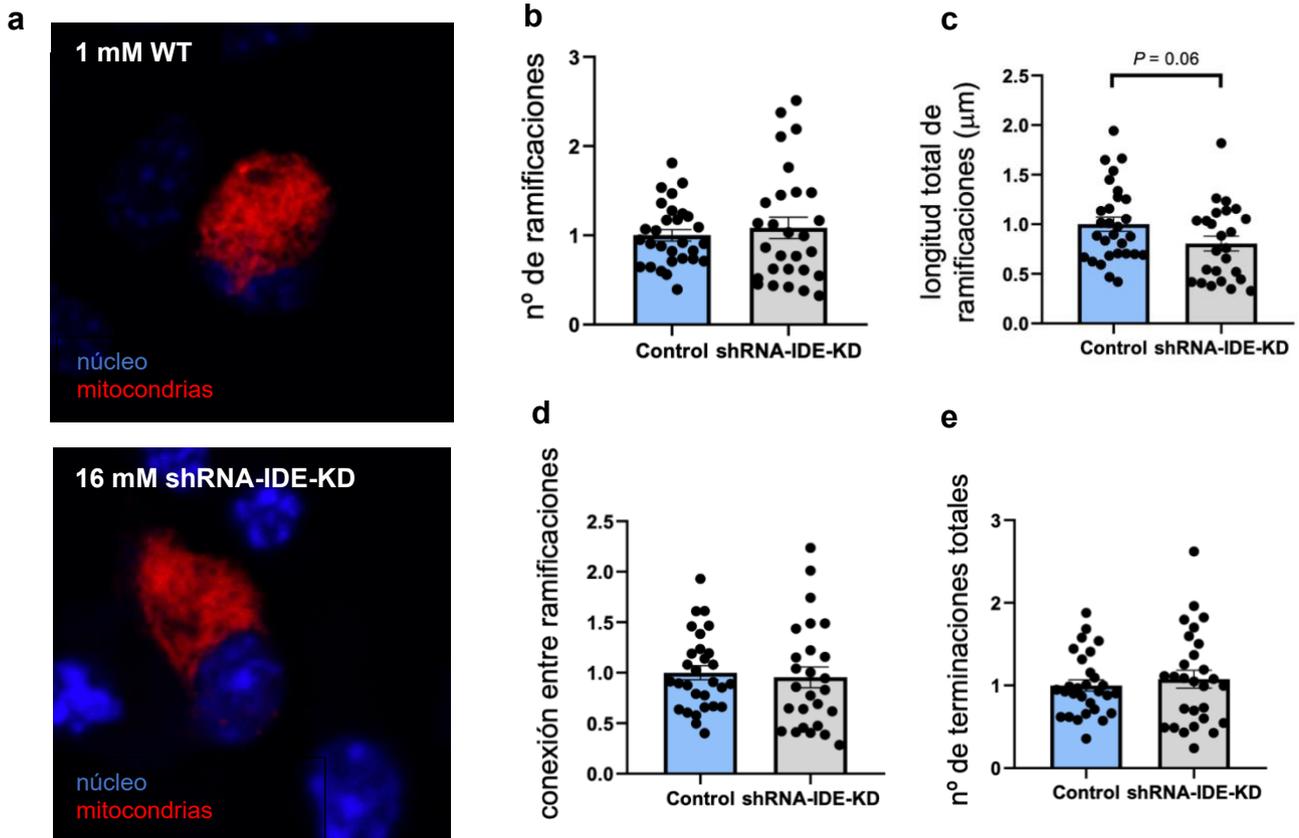
#### 3.3.1. Dinámica mitocondrial en células $\alpha$ -pancreáticas WT y shRNA-IDE-KD bajo condiciones secretoras (1 mM).

El análisis del número y morfología mitocondrial entre células WT y shRNA-IDE-KD (Fig. 11a) no mostró diferencias significativas en el número, tamaño, volumen y área (Fig. 11b-e), sugiriendo que la reducción en los niveles de IDE no es relevante en la regulación de la dinámica mitocondrial bajo condiciones secretoras de glucagón.



**Figura 11. Comparación del número y morfología mitocondrial bajo condiciones secretoras en células WT y shRNA-IDE-KD.** Imágenes representativas del número y morfología mitocondrial a 1 mM glucosa en células WT y shRNA-IDE-KD (a). Representación gráfica del número de mitocondrias (b), esfericidad (c), volumen medio (d) y superficie media (e). Todas las gráficas se normalizaron a 1 para el control. Los datos representados corresponden a la media  $\pm$  SEM. *Unpaired t-test*.

Respecto al análisis de la red mitocondrial (Fig 12a), tampoco se observaron diferencias en ninguna de las variables relacionadas con las ramificaciones (Fig. 12b-e), aunque sí que parece existir cierta tendencia en cuanto a la longitud total de las ramificaciones (Fig. 12b).

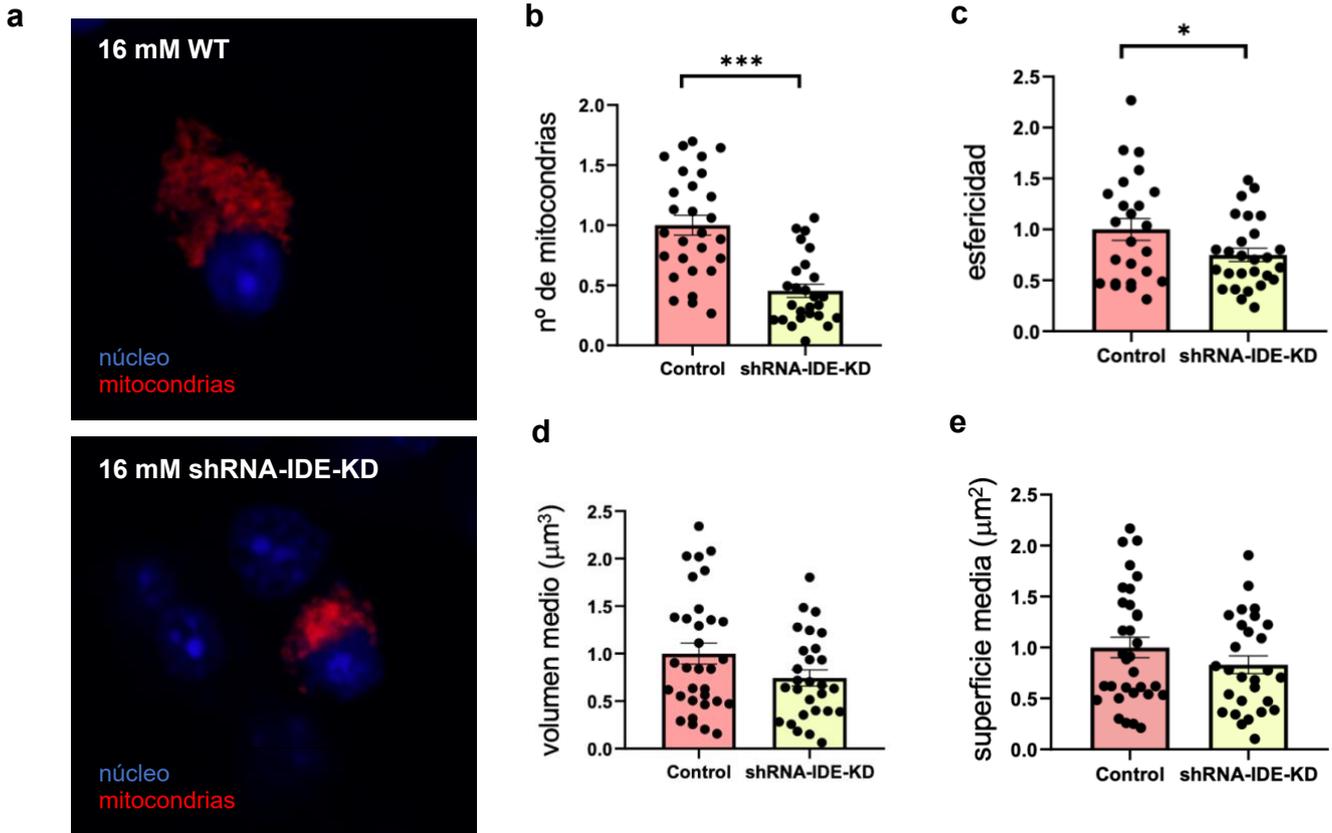


**Figura 12. Comparación de la red mitocondrial bajo condiciones secretoras en células WT y shRNA-IDE-KD** Imágenes representativas de la red mitocondrial a 1 mM glucosa en células WT y shRNA-IDE-KD (a). Representación gráfica del número de ramificaciones (b), longitud total de ramificaciones (c), conexión entre ramificaciones (d) y número de terminaciones totales (e). Todas las gráficas se normalizaron a 1 para el control. Los datos representados corresponden a la media  $\pm$  SEM. *Unpaired t-test*.

Por lo tanto, estos datos sugieren que IDE no es necesaria para la regulación de la dinámica mitocondrial en células  $\alpha$ -pancreáticas a concentraciones de 1 mM glucosa.

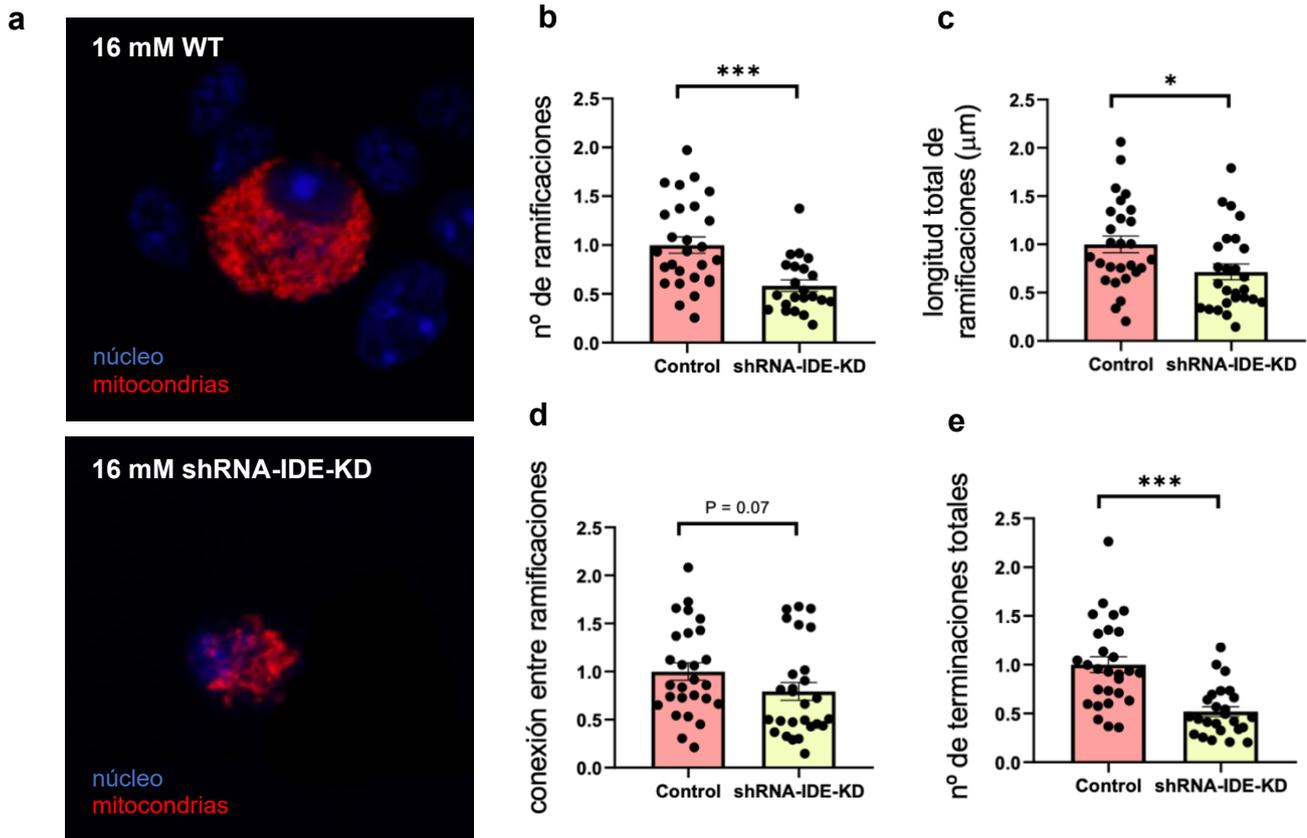
### 3.3.2. Dinámica mitocondrial en células $\alpha$ -pancreáticas WT y shRNA-IDE-KD bajo condiciones represoras (16mM).

El análisis del número y morfología mitocondrial (Fig. 13a) entre células WT y shRNA-IDE-KD mostró diferencias significativas en cuanto al número y esfericidad de las mitocondrias, siendo menor en ambos casos en las células shRNA-IDE-KD (Fig. 13b-c). Por otro lado, no hubo diferencias significativas en cuanto al volumen y área de superficie media (Fig. 13d-e). Estos datos sugieren que IDE es necesaria en la regulación del número de mitocondrias y grado de esfericidad en células  $\alpha$  a 16mM glucosa.



**Figura 13. Comparación del número y morfología mitocondrial bajo condiciones represoras en células WT y shRNA-IDE-KD.** Imágenes representativas del número y morfología mitocondrial a 16 mM glucosa en células WT y shRNA-IDE-KD (a). Representación gráfica del número de mitocondrias (b), esfericidad (c), volumen medio (d) y superficie media (e). Todas las gráficas se normalizaron a 1 para el control. Los datos representados corresponden a la media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ . *Unpaired t-test*.

Respecto al análisis de la red mitocondrial (Fig. 14a), se observó una disminución significativa en el número de ramificaciones, longitud total y el número de terminaciones totales, además de existir cierta tendencia a un menor grado conexión entre ramificaciones (Fig. 14b-e), sugiriendo que IDE es un regulador de la red mitocondrial.



**Figura 14. Comparación de la red mitocondrial bajo condiciones represoras en células WT y shRNA-IDE-KD.** Imágenes representativas de la red mitocondrial a 16 mM glucosa en células WT y shRNA-IDE-KD (a). Representación gráfica del número de ramificaciones (b), longitud total de ramificaciones (c), conexión entre ramificaciones (d) y número de terminaciones totales (e). Todas las gráficas se normalizaron a 1 para el control. Los datos representados corresponden a la media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ . *Unpaired t-test*

Por lo tanto, estos datos sugieren que IDE es necesaria para la regulación de la dinámica mitocondrial en células  $\alpha$ -pancreáticas a concentraciones de 16 mM glucosa.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. Regulación de la dinámica mitocondrial en células $\alpha$ -pancreáticas WT

Actualmente, no existe ningún estudio que evalúe el papel de la dinámica mitocondrial en células  $\alpha$ -pancreáticas, aunque sí hay modelos computacionales en los que se propone que la disfunción mitocondrial de este tipo celular conlleva a alteraciones en la secreción de glucagón, lo que podría tener implicaciones a la hora de desarrollar nuevos tratamientos farmacológicos en enfermedades como la DM2 (19,49). Hasta donde nuestro conocimiento alcanza, los estudios presentados en este trabajo son pioneros y novedosos en un área de conocimiento emergente. Por lo tanto, el conocimiento generado podría ayudar a comprender el papel que juega la dinámica mitocondrial en la regulación de la secreción de glucagón.

En las células  $\beta$ -pancreáticas, aunque la evidencia es limitada, sí se han realizado estudios de dinámica mitocondrial. Las mitocondrias juegan un papel decisivo durante la secreción de insulina, ya que el incremento en las concentraciones intracelulares de ATP provoca, en última instancia, la exocitosis de los gránulos de insulina. En respuesta a cambios de demanda u oferta de energía, las mitocondrias se adaptan ajustando su capacidad y producción de ATP (50). Se ha descrito que la disfunción mitocondrial de las células  $\beta$  resulta en una pérdida de la secreción de insulina estimulada por glucosa, pudiendo ser la dinámica mitocondrial uno de los procesos alterados que influyen durante la secreción de insulina (19,51).

En el caso de las células  $\alpha$ -pancreáticas, el papel que juegan las mitocondrias durante la secreción de glucagón está menos definido, ya que no se conoce exactamente si precisan o no del incremento de las concentraciones intracelulares de ATP para iniciar la secreción (16,18). Existen algunos estudios realizados en glándula salival que revelan un incremento de la fusión mitocondrial durante la exocitosis debido al incremento de la demanda energética (52), por lo que podríamos hipotetizar que el incremento de la fusión mitocondrial que observamos podría deberse a la exocitosis de las vesículas que contienen glucagón.

Se ha descrito que la morfología mitocondrial de las células  $\beta$  y hepatocitos *in vitro* cambia en función del ambiente nutricional expuesto, adquiriendo un fenotipo mitocondrial fragmentado aquellas expuestas a un ambiente rico en nutrientes, y un fenotipo mitocondrial elongado aquellas sometidas a estados de ayuno o baja disponibilidad de nutrientes (50). Nuestras observaciones en las células  $\alpha$  pancreáticas están en concordancia con lo descrito en la literatura, a saber, que en alta glucosa hay una mayor fragmentación y número de mitocondrias. De hecho, existen estudios realizados en línea celular de hígado de rata en los que se ha observado que cuando se somete a 25mM glucosa se induce un incremento de la fragmentación mitocondrial máxima de forma muy rápida (15 minutos) (53). De manera similar a lo descrito en la literatura, los cambios en la dinámica mitocondrial que hemos observado en las células  $\alpha$  se producen en un corto espacio de tiempo (30 minutos).

Por otra parte, los pacientes con DM2 suelen estar expuestos tanto a altas concentraciones de glucosa como de ácidos grasos en circulación, lo que se conoce como la hipótesis de la glucolipototoxicidad. En células  $\beta$ -pancreáticas se ha descrito que la exposición a elevadas concentraciones de nutrientes (20mM glucosa y 0.4mM

palmitato) produce un incremento de la fragmentación mitocondrial y, aunque el grado de fragmentación es menor, a 20mM glucosa únicamente también se produce dicho efecto (54). Explorar el efecto de la glucolipototoxicidad sobre la dinámica mitocondrial en las células  $\alpha$ -pancreáticas, podría ser una prolongación natural de este trabajo de investigación.

Finalmente, nuestro estudio ha puesto de manifiesto que en condiciones secretoras (1 mM glucosa), las mitocondrias de las células  $\alpha$ -pancreáticas adoptan una morfología más elongada. Nuestras observaciones están en concordancia con lo descrito en la literatura, pues se observa un fenotipo mitocondrial elongado en las células sometidas a estados de ayuno o baja disponibilidad de nutrientes (50). Este fenotipo mitocondrial es importante en múltiples procesos celulares, siendo uno de los más conocidos el incremento en la producción de ATP (37). De hecho, parte de nuestros resultados podrían explicarse por este fenómeno, ya que es probable que la exocitosis de los gránulos que contienen glucagón requiera de un incremento de ATP, el cual podría estar apoyado por un aumento en la fusión mitocondrial.

Sin embargo, este proceso podría no ser el único implicado. Una aproximación e hipótesis a nivel molecular que proponemos es que este fenotipo mitocondrial elongado podría deberse a la inhibición de algunas de las proteínas implicadas en la fisión mitocondrial. Sabemos que bajo condiciones de ayuno -o niveles bajos de glucosa- se produce un incremento de los niveles de AMP cíclico (cAMP), el cual es un activador de PKA. Ésta, a su vez, provoca la inhibición de Drp1 al fosforilar en el residuo de serina 637, impidiendo la translocación de esta proteína a la mitocondria y, por tanto, evitando que se dé la fisión mitocondrial (55), lo que daría lugar a una mayor fusión.

En resumen, nuestros datos indican que parece existir una relación entre la disponibilidad de glucosa y la secreción de glucagón con la presencia del fenotipo mitocondrial elongado observado, siendo éstos los primeros hallazgos en torno a este tipo celular.

#### 4.2. Regulación de la dinámica mitocondrial mediada por IDE

A día de hoy, el papel que juega IDE sobre la dinámica mitocondrial es completamente desconocido. Desde el descubrimiento de la isoforma mitocondrial de IDE, en el que se postuló que la función de IDE en la mitocondria era degradar los péptidos señal mitocondriales (45), el conocimiento de la biología de IDE no ha avanzado sustancialmente. En particular, la contribución de la isoforma citoplasmática y la mitocondrial a la regulación de la dinámica mitocondrial es completamente desconocida.

En el modelo celular empleado (shRNA-IDE-KD) hemos visto que disminuyen ambas isoformas de IDE, aunque no conocemos la implicación que tiene cada una de ellas en los resultados observados. Para tratar de dilucidar la función particular de cada una de las isoformas sobre la dinámica mitocondrial, una continuación de dicho trabajo podría ser realizar rescates por separado con cada una de las isoformas, y ver así si el fenotipo mitocondrial observado corresponde a la ausencia de alguna de ellas en particular. Otra posible continuación sería reducir los niveles de cada una de las isoformas mitocondriales de manera independiente, ver qué efectos tiene sobre la secreción y, además, si esto tiene alguna implicación sobre el fenotipo morfológico.

Por último, también sería interesante observar si la ausencia o sobreexpresión de IDE impacta de alguna forma en las proteínas implicadas durante la fusión y fisión mitocondrial, ya que no sería descabellado pensar que, dado que IDE también cuenta con una función proteolítica, podría tener impacto sobre dichas proteínas.

Nuestros resultados manifiestan que a bajas concentraciones de glucosa la presencia de IDE no parece ser relevante en la regulación de la dinámica mitocondrial. Sin embargo, la menor expresión de IDE a 16mM glucosa provoca que haya un menor número de mitocondrias y de conexiones entre ellas, además de presentar un fenotipo más elongado con respecto a las células con niveles de expresión de IDE superiores. Por lo tanto, nuestros datos sugieren que IDE juega un papel evidente en la regulación de la dinámica mitocondrial en respuesta a los cambios en los niveles de glucosa.

Se ha descrito que un exceso de nutrientes provoca un incremento de la fisión mitocondrial debido al aumento en el estrés celular (54). Inicialmente, en células  $\beta$ -pancreáticas se ha visto que ocurre un proceso denominado hiperfusión mitocondrial (54), producido en un primer intento de proteger a la mitocondria contra la mitofagia y optimizando la producción de ATP. Sin embargo, si el estrés celular persiste, esta hiperfusión desembocaría en fisión y eliminación a través de la mitofagia (56). De hecho, se ha visto que padecer diabetes u obesidad induce un incremento de la fragmentación mitocondrial en células  $\beta$ -pancreáticas (57).

La reducción en el número de mitocondrias descritas en este trabajo podría explicarse por un posible incremento en la mitofagia, mientras que el fenotipo elongado observado podría deberse a que IDE regula de algún modo la fusión o fisión mitocondrial, bien aumentándola o disminuyéndola, respectivamente. La mitofagia, a pesar de no ser uno de los ejes clave de la dinámica mitocondrial, es uno de los motivos por el que la fisión mitocondrial se lleva a cabo, ya que uno de los objetivos de este proceso es la separación de las mitocondrias dañadas y su consecuente eliminación a través de la mitofagia (29). Por tanto, es plausible hipotetizar que IDE es un factor que regula la mitofagia en las células  $\alpha$ -pancreáticas. Testar esta hipótesis podría dar continuidad a este trabajo de investigación, así como generar nuevo conocimiento en el contexto de la hiperglucagonemia observada en los pacientes diabéticos.

Por otro lado, tras la finalización de la parte experimental de este trabajo, se publicó un trabajo donde se pone de manifiesto que IDE interacciona con proteínas mitocondriales ribosomales y otras relacionadas con los complejos I y IV de la cadena transportadora de electrones (46). Estos hallazgos proponen nuevas funciones de IDE en su posible papel como chaperona y como reguladora en respuesta al estrés celular (46).

Dado que se ha sugerido que IDE podría regular la respuesta al estrés celular (46) y ésta tiene una estrecha relación con la morfología mitocondrial (58), es tentador hipotetizar que el fenotipo mitocondrial que observamos a concentraciones elevadas de glucosa cuando hay menor expresión de IDE podría ser debido a una pérdida de la homeostasis mitocondrial y, consecuentemente, al incremento de la mitofagia; situando a IDE como un regulador clave en este proceso.

En resumen, nuestros datos indican que parece existir una relación entre niveles elevados de glucosa y la presencia o no de IDE, observándose un fenotipo mitocondrial menos conectado y con menor número de mitocondrias en aquellas células con niveles de IDE reducidos, siendo éstos los primeros hallazgos en torno a este tipo celular.

## **5. CONCLUSIONES**

Por todo lo expuesto, las principales conclusiones del presente trabajo son:

- 1.** Durante los procesos de secreción e inhibición de glucagón en respuesta a la glucosa se producen cambios adaptivos en la plasticidad mitocondrial de las células  $\alpha$  pancreáticas.
- 2.** IDE regula los procesos de dinámica mitocondrial a concentraciones elevadas de glucosa en las células  $\alpha$  pancreáticas.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Alberti KGMM, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998;15(7):539–53.
2. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 2022;183:109119.
3. Heald AH, Stedman M, Davies M, Livingston M, Alshames R, Lunt M, et al. Estimating life years lost to diabetes: outcomes from analysis of National Diabetes Audit and Office of National Statistics data. *Cardiovasc Endocrinol Metab.* 2020;183–5.
4. Harding JL, Pavkov ME, Magliano DJ, Shaw JE, Gregg EW. Global trends in diabetes complications: a review of current evidence. *Diabetologia.* 2019;62(1):3–16.
5. ElSayed NA, Aleppo G, Aroda VR, Bannuru RR, Brown FM, Bruemmer D, et al. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Care in Diabetes—2023. *Diabetes Care.* 2022 Dec 12;46(Supplement\_1):S19–40.
6. Skyler JS, Bakris GL, Bonifacio E, Darsow T, Eckel RH, Groop L, et al. Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis. *Diabetes.* 2016;66(2):241–55.
7. Ikegami H, Babaya N, Noso S. Beta-Cell failure in diabetes: Common susceptibility and mechanisms shared between type 1 and type 2 diabetes. *J Diabetes Investig.* 2021;12(9).
8. DeFronzo RA, Tripathy D. Skeletal Muscle Insulin Resistance Is the Primary Defect in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2009;32(2).
9. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol Rev.* 2018;98(4):2133–223.
10. Unger RH, Cherrington AD. Glucagonocentric restructuring of diabetes: A pathophysiologic and therapeutic makeover. *Journal of Clinical Investigation.* 2012;122(1):4–12.
11. Müller WA, Faloona GR, Aguilar-Parada E, Unger RH. Abnormal Alpha-Cell Function in Diabetes. *New England Journal of Medicine.* 1970 Jul 16;283(3):109–15.
12. Kumpatla S, Parveen R, Murugan P, Juttada U, Devarajan A, Viswanathan V. Hyperglucagonemia and impaired insulin sensitivity are associated with development of prediabetes and type 2 diabetes - A study from South India. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews.* 2021;15(4):102199.
13. Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, Harlan DM, et al. Assessment of Human Pancreatic Islet Architecture and Composition by Laser Scanning Confocal Microscopy. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 2005 Sep;53(9):1087–97.
14. Gromada J, Chabosseau P, Rutter GA. The  $\alpha$ -cell in diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2018;14(12):694–704.
15. Quesada I, Tudurí E, Ripoll C, Nadal Á. Physiology of the pancreatic  $\alpha$ -cell and glucagon secretion: Role in glucose homeostasis and diabetes. *Journal of Endocrinology.* 2008;199(1):5–19.
16. Zhang Q, Ramracheya R, Lahmann C, Tarasov A, Bengtsson M, Braha O, et al. Role of KATP channels in glucose-regulated glucagon secretion and impaired counterregulation in type 2 diabetes. *Cell Metab.* 2013;18(6):871–82.
17. Gao R, Acreman S, Ma J, Abdulkader F, Wendt A, Zhang Q. A-Cell Electrophysiology and the Regulation of Glucagon Secretion. *Journal of Endocrinology.* 2023;258(2).
18. Müller TD, Finan B, Clemmensen C, Di Marchi RD, Tschöp MH. The new biology and pharmacology of glucagon. Vol. 97, *Physiological Reviews.* 2017. 721–766 p.
19. Grubelnik V, Zmazek J, Markovič R, Gosak M, Marhl M. Mitochondrial dysfunction in pancreatic alpha and beta cells associated with type 2 diabetes mellitus. *Life.* 2020;10(12):1–16.
20. Monzel AS, Enríquez JA, Picard M. Multifaceted mitochondria: moving mitochondrial science beyond function and dysfunction. *Nat Metab.* 2023;5(4):546–62.

21. Schlame M, Greenberg ML. Biosynthesis, remodeling and turnover of mitochondrial cardiolipin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2017;1862(1):3–7.
22. Kainulainen H, Hulmi JJ, Kujala UM. Potential role of branched-chain amino acid catabolism in regulating fat oxidation. *Exerc Sport Sci Rev*. 2013;41(4):194–200.
23. Bertholet AM, Natale AM, Bisignano P, Suzuki J, Fedorenko A, Hamilton J, et al. Mitochondrial uncouplers induce proton leak by activating AAC and UCP1. *Nature*. 2022;606(7912):180–7.
24. Riley JS, Quarato G, Cloix C, Lopez J, O'Prey J, Pearson M, et al. Mitochondrial inner membrane permeabilisation enables mtDNA release during apoptosis. *EMBO J*. 2018 Sep 3;37(17):e99238.
25. Koshihara T, Yasukawa K, Yanagi Y, Kawabata S ichiro. Mitochondrial Membrane Potential Is Required for MAVS-Mediated Antiviral Signaling. *Sci Signal*. 2011 Feb 1;4(158).
26. Liesa M, Palacín M, Zorzano A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev*. 2009;89(3):799–845.
27. Santel A, Fuller MT. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci*. 2001 Mar 1;114(5):867–74.
28. Cipolat S, De Brito OM, Dal Zilio B, Scorrano L. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *PNAS*. 2004;101(45):15927–32.
29. Giacomello M, Pyakurel A, Glytsou C, Scorrano L. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(4):204–24.
30. Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko G V., Rudka T, et al. OPA1 Controls Apoptotic Cristae Remodeling Independently from Mitochondrial Fusion. *Cell*. 2006;126(1):177–89.
31. De Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*. 2008;456(7222):605–10.
32. Losón OC, Song Z, Chen H, Chan DC. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell*. 2013 Jan 2;24(5):659–67.
33. Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J, Voeltz GK. ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division. *Science (1979)*. 2011;334(6054):358–62.
34. Bach D, Naon D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Rieusset J, et al. Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 2A Gene, in Human Skeletal Muscle: Effects of Type 2 Diabetes, Obesity, Weight Loss, and the Regulatory Role of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  and Interleukin-6. *Diabetes*. 2005 Sep 1;54(9):2685–93.
35. Zorzano A, Liesa M, Palacín M. Role of mitochondrial dynamics proteins in the pathophysiology of obesity and type 2 diabetes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2009;41(10):1846–54.
36. Sebastián D, Hernández-Alvarez MI, Segalés J, Sorianello E, Muñoz JP, Sala D, et al. Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *PNAS*. 2012;109(14):5523–8.
37. Cervantes-Silva MP, Cox SL, Curtis AM. Alterations in mitochondrial morphology as a key driver of immunity and host defence. *EMBO Rep*. 2021;22(9):1–18.
38. Najjar SM, Perdomo G. Hepatic Insulin Clearance: Mechanism and Physiology. *Physiology*. 2019 Apr 10;34(3):198–215.
39. Fakhrai-Rad H, Nikoshkov A, Kamel A, Fernström M, Zierath JR, Norgren S, et al. Insulin-degrading enzyme identified as a candidate diabetes susceptibility gene in GK rats. *Hum Mol Genet*. 2000 Sep 1;9(14):2149–58.
40. MIRSKY IA, BROH-KAHN RH. The inactivation of insulin by tissue extracts; the distribution and properties of insulin inactivating extracts. *Arch Biochem*. 1949 Jan;20(1):1–9.
41. González-Casimiro CM, Merino B, Casanueva-álvarez E, Postigo-Casado T, Cámara-Torres P, Fernández-Díaz CM, et al. Modulation of insulin sensitivity by insulin-degrading enzyme. *Biomedicines*. 2021;9(1):1–38.

42. Sharma SK, Chorell E, Steneberg P, Vernersson-Lindahl E, Edlund H, Wittung-Stafshede P. Insulin-degrading enzyme prevents  $\alpha$ -synuclein fibril formation in a nonproteolytical manner. *Sci Rep*. 2015;5:1–10.
43. Merino B, Casanueva-Álvarez E, Quesada I, González-Casimiro CM, Fernández-Díaz CM, Postigo-Casado T, et al. Insulin-degrading enzyme ablation in mouse pancreatic alpha cells triggers cell proliferation, hyperplasia and glucagon secretion dysregulation. *Diabetologia*. 2022;65(8):1375–89.
44. González-Casimiro CM, Arribas-Rodríguez E, Fiz-López A, Casas J, Gutiérrez S, Tellería P, et al. Altered Surface Expression of Insulin-Degrading Enzyme on Monocytes and Lymphocytes from COVID-19 Patients Both at Diagnosis and after Hospital Discharge. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. 2022.
45. Leissring MA, Farris W, Wu X, Christodoulou DC, Haigis MC, Guarente L, et al. Alternative translation initiation generates a novel isoform of insulin-degrading enzyme targeted to mitochondria. *Biochemical Journal*. 2004;383(3):439–46.
46. Yilmaz A, Guerrero C, É EW, Lipecka J, Bertocci B, Endert P Van. Insulin-Degrading Enzyme Interacts with Mitochondrial Ribosomes and Respiratory Chain Proteins. *Biomolecules*. 2023;13(6):1–16.
47. pCMV6-AC-mRFP Mammalian Expression Vector – PS100041 | OriGene [Internet]. Available from: <https://www.origene.com/catalog/vectors/mammalian-expression-vectors/ps100041/pcmv6-ac-mrfp-mammalian-expression-vector>
48. Chaudhry A, Shi R, Luciani DS. A pipeline for multidimensional confocal analysis of mitochondrial morphology, function, and dynamics in pancreatic  $\beta$ -cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2020;318(2):E87–101.
49. Grubelnik V, Markovič R, Lipovšek S, Leitinger G, Gosak M, Dolenšek J, et al. Modelling of dysregulated glucagon secretion in type 2 diabetes by considering mitochondrial alterations in pancreatic  $\alpha$ -cells. *R Soc Open Sci*. 2020;7(1).
50. Liesa M, Shirihai OS. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab*. 2013;17(4):491–506.
51. Park KS, Wiederkehr A, Kirkpatrick C, Mattenberger Y, Martinou JC, Marchetti P, et al. Selective actions of mitochondrial fission/fusion genes on metabolism-secretion coupling in insulin-releasing cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(48):33347–56.
52. Porat-Shliom N, Harding OJ, Malec L, Narayan K, Weigert R. Mitochondrial Populations Exhibit Differential Dynamic Responses to Increased Energy Demand during Exocytosis In Vivo. *iScience*. 2019;11:440–9.
53. Yu T, Robotham JL, Yoon Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *PNAS*. 2006;103(8):2653–8.
54. Molina AJA, Wikstrom JD, Stiles L, Las G, Mohamed H, Elorza A, et al. Mitochondrial networking protects  $\beta$ -cells from nutrient-induced apoptosis. *Diabetes*. 2009;58(10):2303–15.
55. Liu Y, Merrill RA, Strack S. A-Kinase Anchoring Protein 1: Emerging Roles in Regulating Mitochondrial Form and Function in Health and Disease. *Cells*. 2020;9(2):1–12.
56. Lebeau J, Saunders JM, Moraes VWR, Madhavan A, Madrazo N, Anthony MC, et al. The PERK Arm of the Unfolded Protein Response Regulates Mitochondrial Morphology during Acute Endoplasmic Reticulum Stress. *Cell Rep*. 2018;22(11):2827–36.
57. Masini M, Martino L, Marselli L, Bugliani M, Boggi U, Filipponi F, et al. Ultrastructural alterations of pancreatic beta cells in human diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*. 2017 Sep 1;33(6):e2894.
58. Eisner V, Picard M, Hajnóczky G. Mitochondrial dynamics in adaptive and maladaptive cellular stress responses. *Nat Cell Biol*. 2018;20(7):755–65.