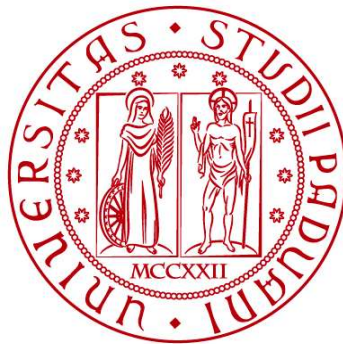


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia



ELABORATO DI LAUREA

**La riduzione dei contatti RE-mitocondrio associata alla
senescenza cellulare compromette il metabolismo lipidico
mitocondriale e l'autofagia nei cardiomiociti**

Tutor: Prof. Luigi Leanza

Dipartimento di Biologia

Co-tutor: Dott.ssa Elisabetta Zaltron

Dipartimento di Biologia

Laureanda: Francesca Zocca

Matricola: 2116361

ANNO ACCADEMICO 2025/2026

ABSTRACT

La riduzione delle connessioni tra reticolo endoplasmatico (RE) e mitocondrio costituisce un fattore determinante nella compromissione della qualità cellulare cardiaca durante l'invecchiamento. Tale deficit è strettamente legato al mancato trasporto di calcio e lipidi verso il mitocondrio, condizione che ne determina un progressivo deterioramento strutturale e funzionale. Esperimenti condotti su modelli murini di senescenza cellulare hanno mostrato un accumulo significativo di mitocondri giganti disfunzionali. L'aumento della presenza di questi organelli danneggiati è riconducibile all'insorgenza di problematiche a livello del metabolismo lipidico e del processo autofagico, che impedisce un loro corretto smaltimento. In associazione a ciò si riscontrano anche una deregolazione della respirazione a livello mitocondriale ed un'eccessiva produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Al fine di ripristinare e salvaguardare l'omeostasi cellulare in fase di senescenza si è tuttavia dimostrata praticabile la modulazione dell'attività di alcuni enzimi coinvolti nel metabolismo lipidico, in particolare PISD (Fosfatidilserina decarbossilasi) e LACTB (lattamasi β). Essi regolano la produzione di Fosfatidiletanolamina (PE), fosfolipide chiave per un corretto reclutamento dell'autofagosoma.

INDICE

Capitolo 1: Introduzione	7
1.1 Organelli intracellulari e siti di contatto	7
1.2 Il contatto RE-Mitocondrio	7
1.3 MERCs/MAMs nella regolazione dei processi cellulari	8
1.3 (A): Sintesi di ATP e trasferimento di Calcio	8
1.3 (B): Regolazione del metabolismo lipidico	9
1.3 (C): Risposta allo stress del RE	9
1.3(D): Meccanismi di autofagia	10
1.4 Il tessuto cardiaco: impatto dei siti di contatto e del metabolismo lipidico	11
Capitolo 2: Articolo: Age-associated reduction in RE-Mitochondrial contacts impairs mitochondrial lipid metabolism and autophagosome formation in the heart	13
2.1 Analisi e risultati	13
2.2 Metodi	25
2.3 Criticità	27
Capitolo 3: Discussione e prospettive future	29
Capitolo 4: Bibliografia	31

Capitolo 1: Introduzione

1.1 Organelli intracellulari e siti di contatto

Gli esseri viventi, ad eccezione dei batteri, sono costituiti da cellule eucariotiche. Queste non rappresentano dei semplici contenitori vuoti, ma sono organizzate in compartimenti specializzati chiamati organelli che collaborano tra loro per il mantenimento dell'omeostasi cellulare.

Ogni organello possiede caratteristiche morfologiche specifiche e svolge funzioni proprie; inoltre, attraverso contatti e interazioni con gli altri compartimenti cellulari, contribuisce alla formazione di siti funzionali coinvolti in numerosi processi, come il signaling ed il trasporto di sostanze. Ciascun organello presenta, dunque, una propria singolarità ed è separato dagli altri da un sistema di membrane interne che comprende il reticolo endoplasmatico, l'apparato di Golgi, le vescicole di trasporto ed i lisosomi. Questo sistema è fondamentale non solo per il traffico intracellulare, ma anche per la comunicazione cellulare e lo smaltimento dei materiali di rifiuto.

Storicamente il primo sito di contatto individuato è stato quello tra il reticolo endoplasmatico (RE) e i mitocondri, che ancora oggi risulta uno tra i più studiati e descritti in letteratura. Tale connessione venne osservata per la prima volta alla fine degli anni '50 in sezioni di fegato di ratto, dove vennero individuate delle regioni in cui le membrane risultavano essere più vicine, ad una distanza compresa tra i 10 e i 25 nm (López-Crisosto et al., 2015).

1.2 Il contatto RE-Mitocondrio

Il contatto tra reticolo endoplasmatico e mitocondrio avviene a livello di regioni note come MERCs (Mitochondria–Endoplasmic Reticulum Contacts), che rappresentano siti strutturali di interazione tra le membrane dei due organelli. Più nel dettaglio, il vero e proprio contatto avviene in zone denominate MAMs (Mitochondria-Associated ER Membranes), le quali costituiscono porzioni membranose dei due organelli in associazione. In queste aree sono densamente localizzate una serie di proteine specializzate nello scambio di molecole segnale e metaboliti, i quali sono determinanti per l'omeostasi e per la corretta fisiologia della cellula. Tra queste proteine troviamo ad esempio GRP75 (Glucose Regulated Protein-75) che collega il recettore dell'inositolo

1,4,5-trifosfato (IP3R) sul RE al canale anionico voltaggio-dipendente sulla membrana mitocondriale esterna (VDAC), facilitando il passaggio del calcio, oppure le Mitofusine (MFN), presenti sia sulla superficie di RE che su quella mitocondriale, le quali si occupano di mediare il trasporto lipidico tra i due organelli (Morgado-Cáceres et al., 2022).

1.3 MERCs/MAMs nella regolazione dei processi cellulari

I MERCs sono fondamentali per il mantenimento dell'omeostasi cellulare, in quanto partecipano alla regolazione di svariati processi, come illustrato in *Figura 1*. Tra questi, alcuni sono di particolare importanza e ne verrà descritta brevemente la dinamica:

- A. il trasporto di calcio e la produzione di ATP;
- B. il metabolismo lipidico;
- C. la risposta allo stress del ER;
- D. i processi autofagici.

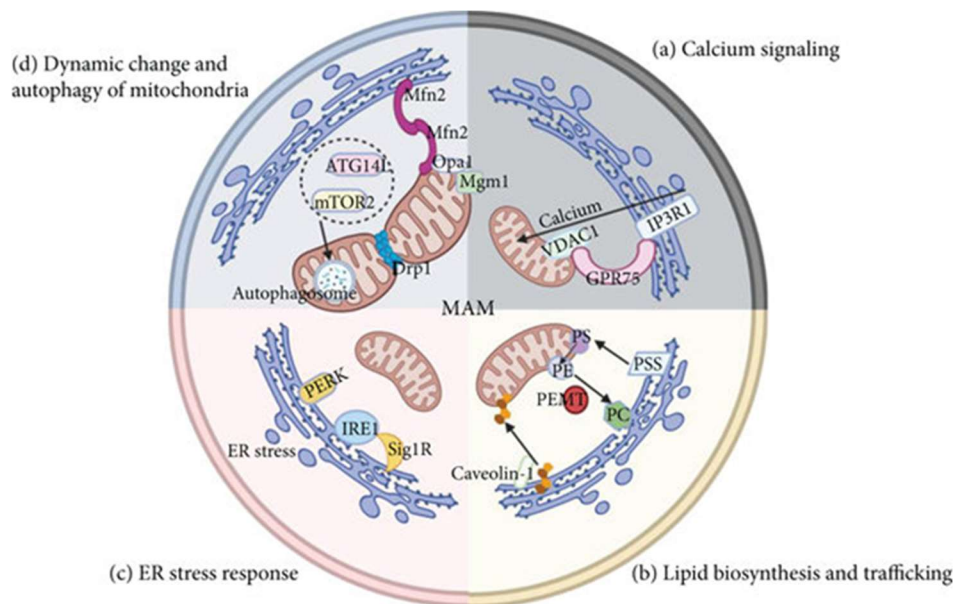


Figura 1.
Funzioni della membrana del reticolo endoplasmatico associata ai mitocondri (Ni L. et al., 2021).

1.3 (A): Sintesi di ATP e trasferimento di Calcio

La sintesi dell'ATP rappresenta uno dei principali processi cellulari, funzionale al mantenimento dell'equilibrio energetico. Le reazioni che ne portano alla produzione avvengono, come ben noto, a livello della membrana interna dei mitocondri, attraverso la

fosforilazione ossidativa. L'ADP viene convertito in ATP grazie ad un gradiente protonico generato dal trasferimento di elettroni da NADH e FADH₂ fino all'accettore finale, l'ossigeno. In questo contesto, i MERCs consentono il trasferimento di ioni Ca²⁺ dal reticolo endoplasmatico alla matrice mitocondriale. Il Ca²⁺ in ingresso attiva enzimi chiave del ciclo di Krebs che promuovono la produzione di NADH e FADH₂, necessari per alimentare la catena di trasporto degli elettroni.

Nei mammiferi questo fondamentale passaggio di calcio è facilitato da proteine delle MAMs che tengono vicini i due organelli fungendo da veri e propri “ponti molecolari” (López-Crisosto et al., 2015).

1.3 (B): Regolazione del metabolismo lipidico

La produzione di ATP può avvenire principalmente attraverso due modalità: la prima consiste nella degradazione dei carboidrati mediante glicolisi, mentre la seconda prevede l'utilizzo degli acidi grassi. In quest'ultimo caso, i substrati vengono trasformati, tramite beta-ossidazione, in acetil-CoA, molecola che entra direttamente nel ciclo di Krebs. I MERCs, come anticipato, sono coinvolti nella regolazione del metabolismo lipidico mitocondriale, rappresentando quindi un punto focale della produzione di ATP tramite beta-ossidazione di acidi grassi. Questo è di particolare rilievo nei cardiomiociti, dove questo processo costituisce la via favorita per la produzione energetica.

1.3 (C): Risposta allo stress del RE

In condizioni di omeostasi cellulare compromessa, si può verificare un sovraccarico funzionale a livello del RE. Per rispondere a questa alterazione, le cellule attivano una risposta di emergenza chiamata UPR (Unfolded Protein Response). Questa via di segnalazione si avvale di tre sensori principali per monitoraggio dello stress, di cui due localizzati nelle MAM:

- PERK (Protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase): garantisce l'integrità strutturale delle membrane e favorisce l'apoptosi cellulare in caso di stress troppo elevato;
- IRE1 (Inositol-Requiring Enzyme 1): regolata e stabilizzata a livello delle MAM dal chaperone Sig1R (Sigma 1 receptor), questa proteina è incaricata di controllare

l'efficacia del recettore IP3R, necessario per la modellazione del trasporto di calcio ai mitocondri.

A completamento dell'azione sinergica dei due enzimi, viene attivato un terzo sensore di stress, ovvero ATF6 (Activating Transcription Factor 6). Esso, traslocando all'apparato del Golgi, viene attivato e può promuovere la trascrizione genica di importanti proteine chaperone, fondamentali per il corretto ripiegamento delle proteine (Ni L. et al., 2021).

1.3(D): Meccanismi di autofagia

A livello delle MAMs si localizzano siti proteici deputati sia alla sintesi che al trasferimento di fosfolipidi. Tra questi, in particolare, la fosfatidilserina (PS) viene sintetizzata nel reticolo endoplasmatico e, a seguito del legame con la Mitofusina 2, viene trasferita ai mitocondri, dove viene convertita in fosfatidiletanolamina (PE) dall'enzima fosfatidilserina decarbossilasi (PSID), che si trova nelle membrane mitocondriali (López-Crisosto et al., 2015).

Una particolarità della PSID è la presenza a livello mitocondriale anche di un suo regolatore negativo, ovvero la proteina beta-lattamasi (LACTB). Questa gestione dei livelli di PSID è fondamentale per la produzione di PE, che è determinante per il mantenimento della fluidità delle membrane. Con una scorretta composizione di fosfolipidi si possono generare squilibri a livello di varie vie di segnale. Ad esempio, proteine come LC3B-II (catena leggera 3 beta-II della proteina 1 associata ai microtubuli) non riescono a inserirsi correttamente causando un impedimento nel processo di autofagocitosi, con conseguente inefficienza a sequestrare componenti intracellulari danneggiati destinati ad essere degradati nei lisosomi. I MERCs reclutano quindi le proteine chiave necessarie alla creazione delle vescicole autofagiche ed una riduzione di tali contatti compromette dunque la formazione degli autofagosomi, determinando un accumulo di organuli malfunzionanti e radicali liberi dovuti allo stress ossidativo, facilitando la degenerazione dei tessuti.



Figura 2. Rappresentazione schematica del processo di formazione degli autofagosomi

Interruzioni nel processo autofagico possono comportare l'insorgenza di malattie come il morbo di Parkinson, problematiche metaboliche, cardiache e disturbi epatici. Il meccanismo che determina la comparsa di queste malattie è sempre lo stesso: la mancata creazione di strutture autofagiche che porta all'accumulo di organuli compromessi (Mizushima N et al., 2011).

1.4 Il tessuto cardiaco: impatto dei siti di contatto e del metabolismo lipidico

Il cuore è rivestito da tessuto muscolare cardiaco, uno strato muscolare striato involontario che prende il nome di miocardio. Il miocardio è composto da cardiomiociti, cellule contrattili di forma cilindrica connesse tra loro mediante dischi intercalari, strutture specializzate che garantiscono sia l'adesione meccanica che la trasmissione dell'impulso elettrico grazie alla presenza di gap junctions, fondamentali per la contrazione cardiaca. Negli spazi interposti tra i cardiomiociti si trova il tessuto connettivo, ricco di capillari sanguigni che consentono rapidi scambi metabolici e assicurano il costante apporto di ossigeno e nutrienti necessari all'elevata attività del miocardio. La costante richiesta di ATP per la funzione contrattile porta il tessuto cardiaco ad essere particolarmente sensibile ad alterazioni dei MERCs. I cardiomiociti si contraddistinguono inoltre per una limitata capacità rigenerativa, poiché dopo la nascita smettono quasi completamente di dividersi. In questa situazione risulta quindi fondamentale il mantenimento di sistemi di controllo della qualità cellulare, come l'autofagia. (Ali MA et al., 2023).

L'invecchiamento dei cardiomiociti, con una correlata riduzione intracellulare dei contatti RE-Mitocondrio e la diminuzione del metabolismo lipidico, porta alla formazione di

mitocondri giganti e disfunzionali. Questi organelli alterati sono considerati la causa primaria dell'aumento dello stress ossidativo, determinando l'accumulo di molecole instabili. Tra queste le più importanti sono state denominate Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS). Esse sono rilasciate fisiologicamente in piccole quantità durante la fosforilazione ossidativa e prontamente neutralizzate da antiossidanti. In un giovane cardiomiocita infatti, le ROS, pur essendo prodotte continuamente, vengono gestite dal glutathione; i mitocondri che ne dovessero produrre in quantità superiori alla norma vengono invece eliminati mediante autofagia. Con l'invecchiamento cellulare ed il conseguente deterioramento dei metodi di smaltimento e riciclaggio di organelli malfunzionanti, assistiamo ad un accumulo di questi mitocondri giganti che determinano dunque un aumento massivo delle ROS.

L'accumulo di queste molecole e la parallela riduzione dell'efficienza metabolica dei mitocondri giganti si traducono in alterazioni funzionali del tessuto cardiaco. Nel dettaglio, lo stress ossidativo promuove l'attivazione di vie apoptotiche e la conseguente perdita di cardiomiociti (Valko M et al.2006). Considerata la limitata capacità rigenerativa di queste cellule, una loro perdita massiva contribuisce a un rimodellamento cardiaco progressivo, con una riduzione dell'efficienza contrattile, già compromessa da una diminuzione della produzione di ATP.

Nel complesso, dunque, tali alterazioni generano una predisposizione alle patologie cardiovascolari, tra cui insufficienza cardiaca e aritmie (Healthy Ageing and Longevity, Suresh I. S. Rattan).

È per queste ragioni che ad oggi lo studio del ruolo delle MAMs emerge come cruciale nella comprensione e nella potenzialità di gestione dei meccanismi di invecchiamento cardiaco, come evidenziato dalle recenti ricerche di Hong et al. (2025).

Capitolo 2: Articolo: Age-associated reduction in RE-Mitochondrial contacts impairs mitochondrial lipid metabolism and autophagosome formation in the heart

2.1 Analisi e risultati

L'articolo "Age-associated reduction in RE-Mitochondrial contacts impairs mitochondrial lipid metabolism and autophagosome formation in the heart" è volto a comprendere i meccanismi molecolari alla base dell'accumulo di mitocondri giganti disfunzionali nei cardiomiociti, un fenomeno che ne determina il progressivo deterioramento durante l'invecchiamento. Tali disfunzioni sono state studiate attraverso l'analisi delle possibili conseguenze che modificazioni dei contatti tra reticolo endoplasmatico e mitocondri possono comportare.

Il tessuto cardiaco è di particolare interesse vista la sua costante necessità di energia per svolgere l'attività contrattile e un controllo minuzioso della qualità cellulare, poiché i cardiomiociti si contraddistinguono per il possesso di bassa capacità di rinnovamento.

Per studiare l'invecchiamento cardiaco i ricercatori hanno utilizzato due modelli murini: topi C57/BL6 giovani (8 settimane) e anziani (76 settimane) per gli esperimenti *in vivo*; linee cellulari cardiache HL-1, in cui l'invecchiamento è stato indotto tramite il farmaco etoposide, che agisce inibendo la topoisomerasi II implicata nella riparazione del DNA, per gli esperimenti *in vitro*.

L'utilizzo di un duplice approccio permette di indagare aspetti diversi dello stesso fenomeno: gli esperimenti *in vivo* consentono di seguire dei meccanismi fisiologici dell'invecchiamento cardiaco reale, attestando l'esistenza stessa del fenomeno e le sue conseguenze; al contrario, il modello *in vitro* viene usato per manipolare geneticamente i meccanismi e dimostrarne i rapporti di causa-effetto.

Conseguentemente, per confermare la validità del modello anziano *in vitro*, gli studiosi hanno analizzato le caratteristiche del tessuto cardiaco dei topi di 76 settimane, attraverso l'osservazione dei marcatori dell'invecchiamento. Questi topi mostrano degli alti livelli di P16, P21 e P53, proteine marcatrici associate all'arresto della crescita cellulare. Hanno inoltre valutato le concentrazioni dell'enzima SA- β -gal, la cui azione aumenta con l'invecchiamento. Inoltre, a livello morfologico, il cuore presenta difetti fisici come l'accumulo di lipofusina, indicativo dell'incapacità tissutale nello smaltimento di rifiuti.

È presente anche un'alterazione della disposizione e della struttura dei mitocondri che risultano di dimensioni quasi doppie rispetto a quelli presenti nelle cellule di topi giovani. Nei soggetti invecchiati il perimetro medio dei mitocondri è infatti di 7,24 μm rispetto a quello dei giovani di circa 3,73 μm . Queste stesse alterazioni, sia a livello dei marcatori molecolari che della struttura cellulare, sono state riscontrate anche nel modello *in vitro*, confermandone così la solidità e l'affidabilità.

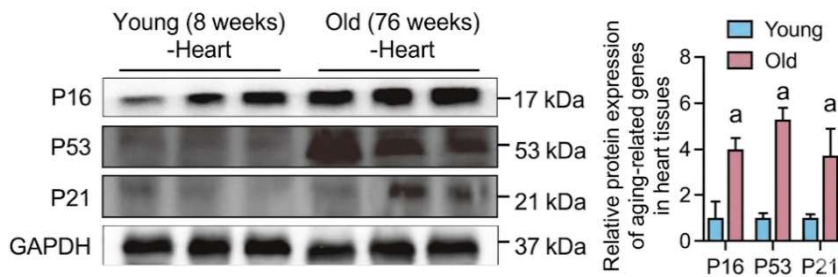


Figura 3. A sinistra Western Blot per verificare i livelli di espressione di P16, P53 e P21 nei tessuti cardiaci di topi giovani e anziani; a destra il grafico a barre relativo alla sua

quantificazione.

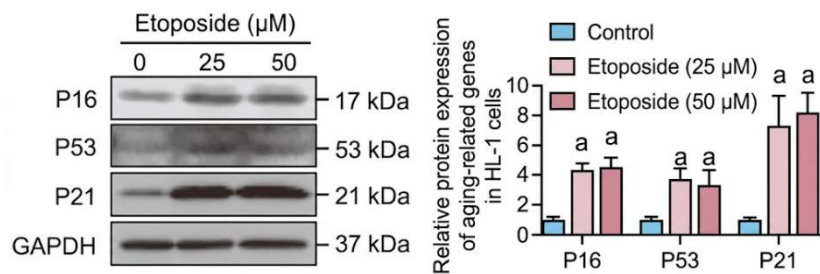


Figura 3.1 A sinistra Western Blot per verificare i livelli di P16, P53 e P21 nei cardiomiociti della linea HL-1 dopo trattamento

con etoposide; a destra la rispettiva quantificazione.

Successivamente, tramite la microscopia elettronica (FIB-SEM), sono state visualizzate le regioni d'interesse. Si è misurata una drastica riduzione dei contatti RE-Mito, evidenziando una correlazione con la formazione di mitocondri giganti nei topi anziani, con un difetto evidente nel processo di fissione. Il deficit strutturale, osservato nel modello anziano *in vivo*, è stato riscontrato anche nella linea cellulare HL-1 trattata con etoposide: le immagini al microscopio confocale, infatti, hanno permesso di confermare l'attesa diminuzione dei contatti anche in quest'ultimo modello.

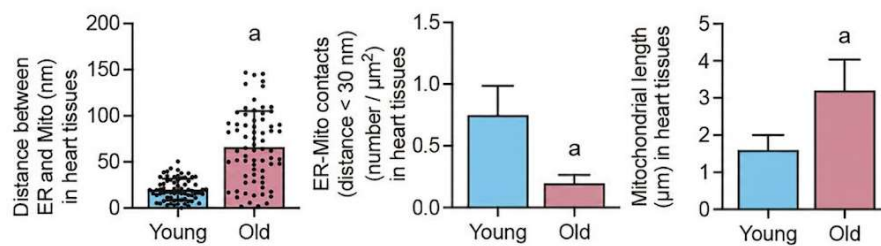


Figura 4. Analisi statistica della distanza tra RE e mitocondri, del numero di contatti ER-mitocondrio e

della lunghezza mitocondriale nel modello in vivo.

Figura 4.1 A sinistra: analisi statistica del numero di contatti ER-mitocondrio in cellule HL-1 di controllo e trattate con etoposide.

A destra: cellule HL-1 marcate con PK Mito (marcatore mitocondriale, rosso) e Calnexin-mCherry (marcatore del reticolo endoplasmatico, verde).

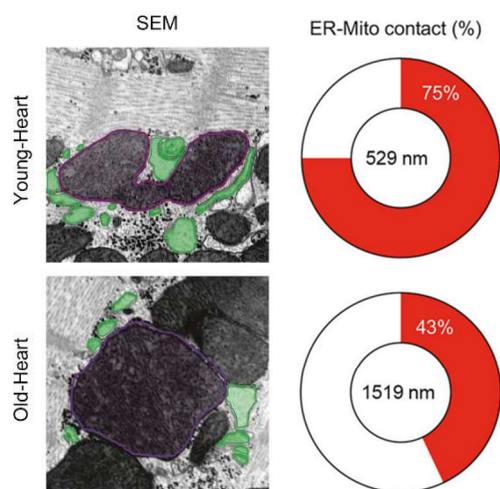
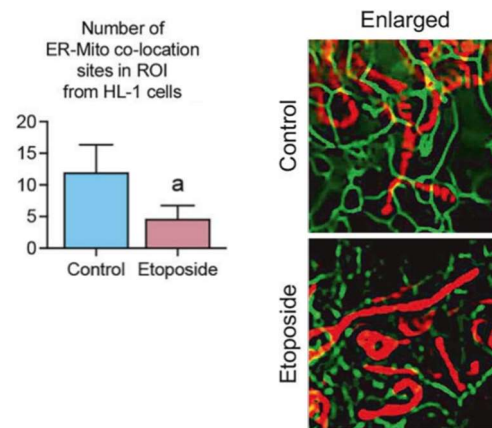


Figura 5. A sinistra: ricostruzione tridimensionale dell'ER (verde) e dei mitocondri (viola) nei siti di contatto nei tessuti cardiaci visualizzati tramite FIB-SEM.

A destra: percentuale della circonferenza mitocondriale a contatto con la membrana dell'ER (il rosso indica contatto, il bianco indica assenza di contatto).

A conferma del fatto che il declino dell'efficienza nella divisione mitocondriale ha un'origine strutturale, è stato osservato che, nei topi giovani, il reticolo endoplasmatico circonda il 75% della circonferenza del mitocondrio, costituendo “una morsa” capace di indurre la costrizione necessaria alla scissione. Al contrario, nei topi anziani, il collegamento tra i due organelli si riduce al 43% rendendo difficile la fissione, poiché viene a mancare lo stimolo meccanico necessario al reclutamento delle proteine responsabili della divisione. Tra queste assume un ruolo chiave la GTPasi DRP1

(Dynamin-Related Protein 1), che facilita la curvatura e la contrazione della membrana idrolizzando il GTP. A supporto della presente tesi, è stata osservata una sovraregolazione delle proteine di fusione (come MFN1, MFN2 e OPA1) dimostrando che, mentre la fissione è bloccata, il processo opposto, ovvero la fusione, continua o subisce un incremento. Questo squilibrio dinamico spiega la formazione dei mitocondri giganti.

Oltre alle alterazioni strutturali del mitocondrio, lo studio ha evidenziato come la riduzione dei MERCs comprometta anche la sua funzione energetica di produzione dell'ATP.

L'analisi dei flussi metabolici ha rilevato, infatti, una significativa riduzione della respirazione mitocondriale (OCR) nei cardiomiociti invecchiati. In particolare, è stata osservata una diminuzione dell'attività del Complesso I della catena di trasporto degli elettroni, la struttura iniziale e fondamentale della fosforilazione ossidativa. Questa disfunzione spiega la ridotta capacità del cuore anziano di produrre ATP e chiarisce l'origine dell'aumento dello stress ossidativo, poiché un Complesso I malfunzionante è una delle principali fonti di radicali liberi (ROS).

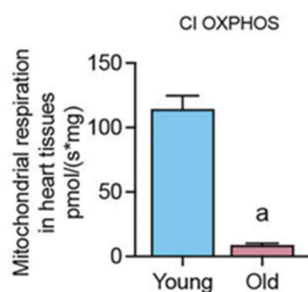


Figura 6. Capacità respiratoria determinata mediante respirometria ad alta risoluzione del complesso I in topi giovani e anziani.

Le analisi di Seahorse hanno mostrato una significativa riduzione della capacità respiratoria anche nella linea cellulare HL-1 trattata con etoposide. In laboratorio, è stata silenziata la proteina INF2 (Inverted Formin 2) che normalmente si trova ancorata al RE ed è implicata nella regolazione della fissione attraverso la polimerizzazione dei filamenti di actina. Questi filamenti circondano il mitocondrio generando una forza costringitiva propedeutica alla successiva attività di DRP1. Tale modulazione ha permesso di osservare un conseguente calo della respirazione mitocondriale analogo a quello osservato nella senescenza, dimostrando la fondamentale importanza della cooperazione RE-mitocondrio per il corretto funzionamento energetico della cellula.

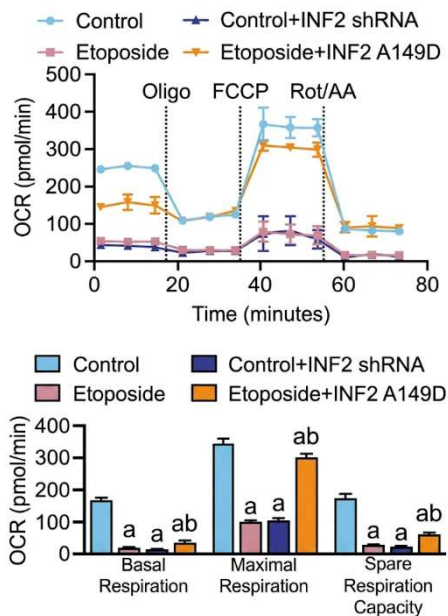


Figura 7. Tassi di consumo di ossigeno mitocondriale (OCR) in cellule HL-1 trattate con etoposide e sottoposte a modulazione dei contatti ER-mitocondrio mediata da silenziamento di INF2. Sono stati quantificati il livello basale, il livello massimo e la capacità respiratoria di riserva dell'OCR.

La compromissione della catena respiratoria ha come diretta conseguenza l'accumulo di radicali liberi dannosi, monitorato sperimentalmente mediante la sonda fluorescente MitoSOX, che incontrando una specie ROS si ossida emettendo una forte fluorescenza rossa.

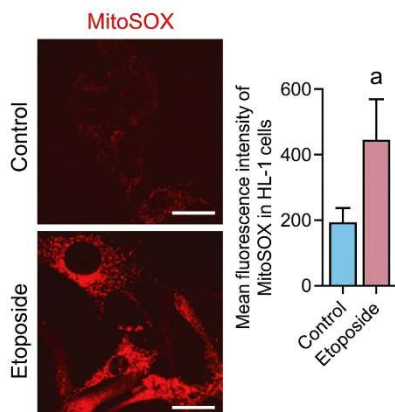


Figura 8. Immagini al microscopio confocale e relativo grafico raffiguranti i segnali del MitoSOX in cellule HL-1 di controllo e trattate con etoposide.

Al fine di tracciare l'impatto della riduzione dei contatti tra RE-Mito sul metabolismo dei lipidi di membrana, i mitocondri sono stati isolati dai tessuti cardiaci *in vivo* e sono stati analizzati in base al profilo lipidomico, concentrandosi in particolare sui livelli del fosfolipide fosfatidiletanolamina (PE). Si è scelto di focalizzare l'attenzione su questo lipide poiché la sua sintesi richiede necessariamente il trasferimento degli intermedi tra i due organelli d'interesse. Pertanto, una riduzione dei contatti dovrebbe comportare il crollo della sintesi di PE.

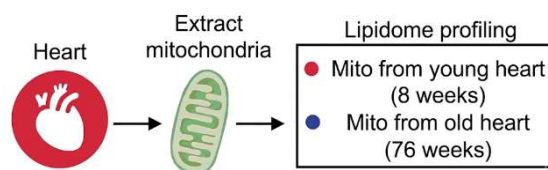


Figura 9. Analisi lipidomica dei mitocondri ottenuti da cuori di topi giovani (8 settimane, rosso) e anziani (76 settimane, blu).

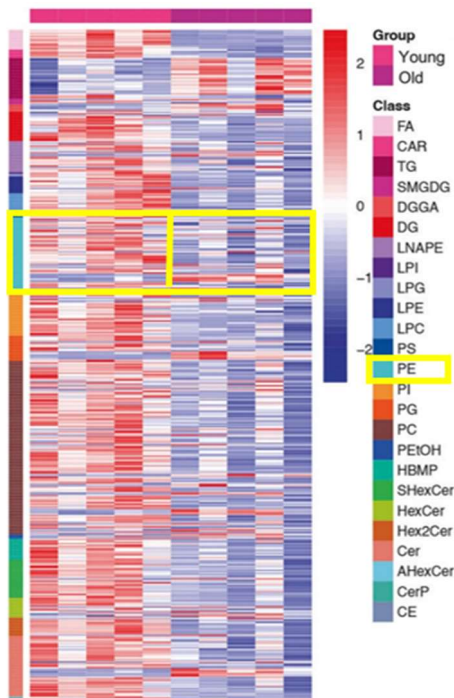
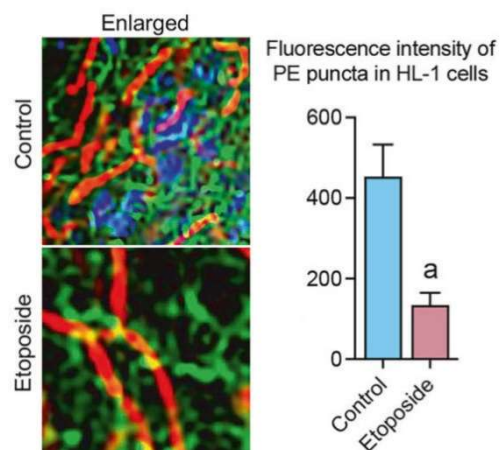


Figura 10. Analisi del lipidoma visualizzate mediante heatmap.

Le informazioni ottenute dalla lipidomica, visualizzata tramite heatmap, hanno mostrato una netta separazione tra i profili dei soggetti giovani e anziani. Nei topi giovani (a sinistra) predomina il colore rosso simbolo dell'abbondanza di molti lipidi strutturali. Negli anziani (a destra) predomina invece il blu, indicando una drastica perdita di lipidi e fosfolipidi, tra cui PE. Con l'invecchiamento aumentano invece i trigliceridi (indici della progressiva insorgenza di depositi di grassi disfunzionali).

Figura 11. A sinistra: cellule HL-1 di controllo e trattate con etoposide, marcate con PK Mito (marcatore mitocondriale, rosso), Calnexin-mCherry (marcatore del reticolo endoplasmatico, verde) e NBD-PE (marcatore della fosfatidiletanolamina, blu); a destra: analisi statistica associata.



Tale diminuzione di PE è stata validata ed evidenziata anche tramite microscopia confocale nel modello cellulare HL-1 dopo il trattamento con etoposide.

UP		DOWN
ATOX1	TK2	OPTN
MMP2	CLM	ETFDH
NDUFAF5	SCP2	CASP6
FIBP	NNT	PISD
UQCRC1	CBR4	RHOT2
TUFM	NUDT12	MAOB
PRKACA	PDP1	TRUB2
NDUFV3	ACOT2	ACAT1
PGS1	MTRF1	ACADM
ATPAF2	GPAM	FMO5
Acot11	SQSTM1	TRAK2
TFRC	ACSL6	
CASP1	BDH1	
GOT2	ACAD11	

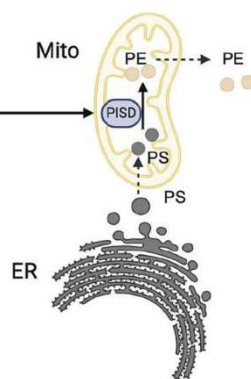


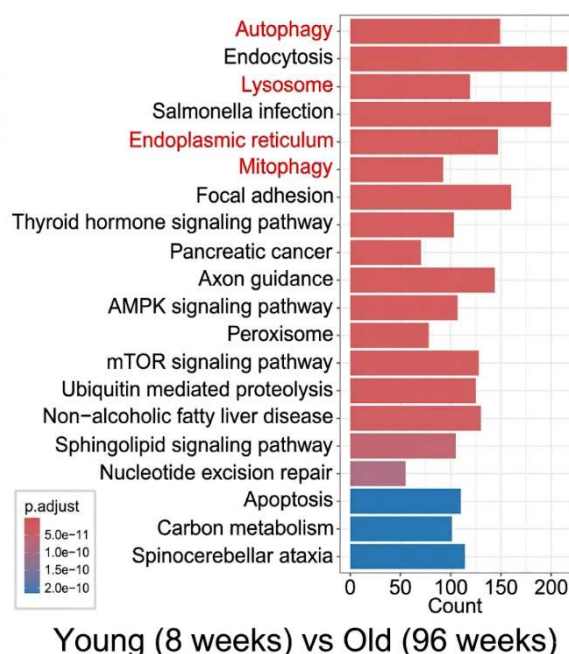
Figura 12. Analisi dell'espressione genica differenziale nei topi anziani.

Al fine di comprendere se vi siano ulteriori anomalie nella sintesi di PE, concomitanti alla perdita di contatto fisico tra RE e mitocondrio, i ricercatori hanno analizzato

l'espressione genica differenziale focalizzata sul metabolismo lipidico mitocondriale in topi giovani e anziani. Il sequenziamento ha permesso di rilevare 39 geni diversamente espressi nei due set di topi: 14 risultavano iper-espressi e 25 down-regolati nei tessuti cardiaci dei topi invecchiati. Andando a studiare il funzionamento di questi è stato identificato ed approfondito il gene PISD, enzima che possiede come unico compito la conversione di PS in PE. Dunque, la sottoregolazione della proteina PISD nei cardiomiociti invecchiati agisce sinergicamente con la riduzione nel trasporto dei lipidi tra ER e mitocondri, bloccando la sintesi di PE e ponendosi come una delle cause principali del malfunzionamento del cuore associata all'avanzare dell'età.

Figura 13. Analisi di arricchimento KEGG dei geni differenzialmente espressi tra topi giovani (8 settimane) e anziani (96 settimane).

L'analisi KEGG ha poi evidenziato che il processo autofagico è profondamente compromesso nei topi anziani a causa del blocco del metabolismo lipidico. La carenza di PE impedisce infatti la corretta lipidazione della proteina LC3B (ovvero la conversione da LC3B-I a LC3B-II), causando la riduzione del rapporto LC3B-PE/LC3B nei tessuti cardiaci senescenti rispetto ai tessuti giovani.



Il dato è stato poi confermato dalle analisi con Western Blot sia nel modello *in vivo* che in quello *in vitro*.

Figura 14. Analisi mediante Western blot dei livelli di LC3B-PE/LC3B (LC3B II/I) nei tessuti cardiaci di topi giovani e anziani.

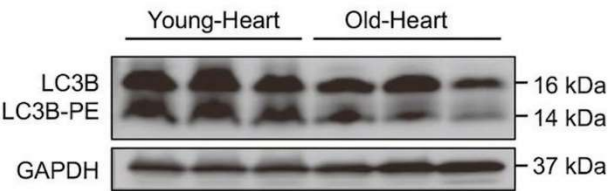
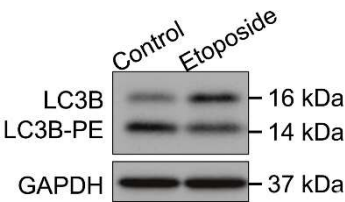


Figura 14.1. Analisi mediante Western blot dei livelli di LC3B-PE/LC3B nelle cellule HL-1 dopo trattamento con etoposide.



Nella linea cellulare HL-1 è stato inoltre messo in atto un ulteriore controllo: sovraregolando PISD (OE-PISD) è stata ripristinata la corretta formazione di autofagosomi, suggerendo l'enzima come possibile “chiave” per la manipolazione del meccanismo in essere.

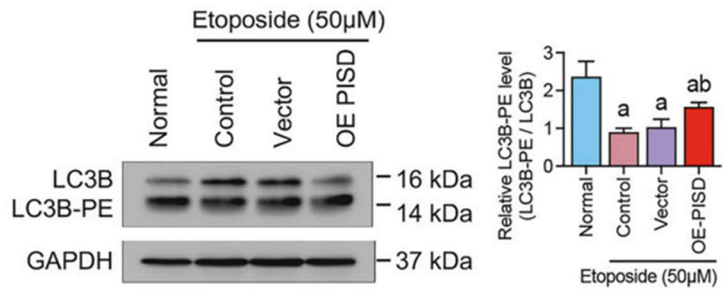


Figura 15. A sinistra: analisi mediante Western blot dei livelli di LC3B-PE/LC3B in cellule HL-1 trattate con etoposide (o con vettore controllo) o con over-espressione di PISD(OE-PISD)).

A destra: rispettiva quantificazione ed analisi statistica.

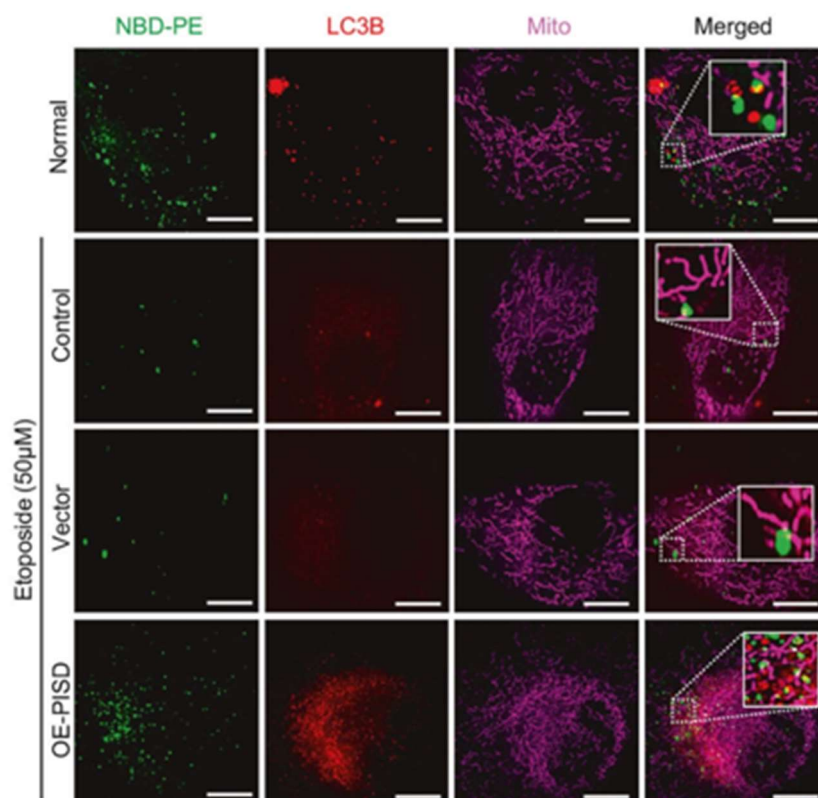


Figura 16. Immagini confocali di cellule HL-1 (trasfettate con vettore controllo oppure OE-PISD), marcate con NBD-PE (marcatore della fosfatidiletanolamina, verde), LC3B-mCherry-GFP (marcatore LC3B, rosso) e PK Mito (marcatore mitocondriale, magenta). Le immagini sono state acquisite a 48h dal trattamento mediante Multi-SIM per analizzare la co-localizzazione tra LC3B e PE.

Il ruolo determinante di PISD è stato poi confermato dalla microscopia Multi-SIM: nelle cellule HL-1 trattate con etoposide, la sovraespressione dell'enzima non solo ha ripristinato i livelli fisiologici di PE (segnale verde) e la conseguente attivazione di LCB3 (segnale rosso), ma ha anche promosso la loro corretta co-localizzazione a ridosso dei mitocondri (segnale magenta), dimostrando l'efficace ripristino del processo autofagico e della morfologia naturale dell'organello.

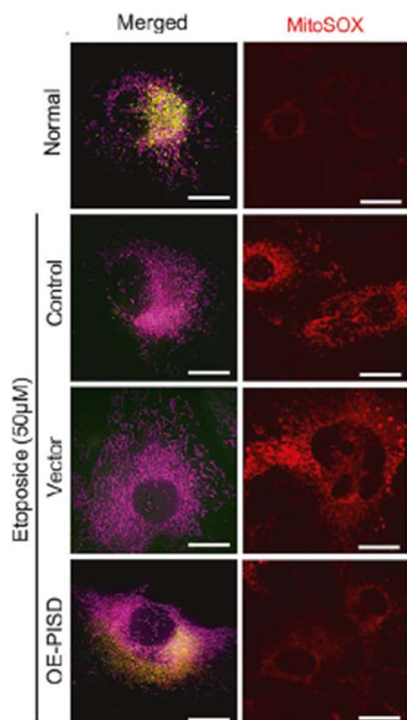


Figura 17. A sinistra: Immagini confocali in cui viene illustrato come l'innalzamento di PISD (OE-PISD) garantisca la ricomparsa dei lipidi strutturali (in giallo) che vengono nuovamente sintetizzati e sono in grado di interagire con i mitocondri (magenta); a destra: MitoSOX che va a marcare il numero di radicali liberi presenti.

A dimostrazione dell'efficacia di tale recupero, l'analisi molecolare con sonda mitoSOX ha rivelato che la sovraespressione di PISD contrasta lo stress ossidativo che era aumentato con il trattamento con etoposide.

Infine, lo studio si è concentrato sull'analisi della proteina LACTB, recentemente identificata come un importante modulatore negativo dei livelli di PISD e, di conseguenza, cruciale nel mantenimento dell'omeostasi mitocondriale.

Attraverso l'analisi con Western Blot è stato registrato un forte e anomalo accumulo di LACTB in entrambi i modelli di senescenza. Questo incremento offre una spiegazione molecolare diretta della riduzione di PISD, precedentemente osservata nei modelli di invecchiamento.

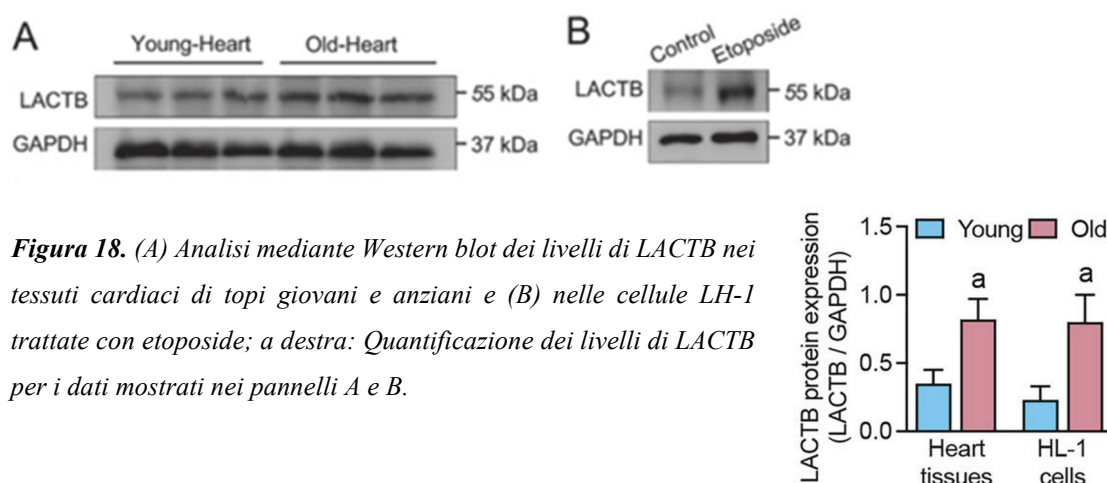


Figura 18. (A) Analisi mediante Western blot dei livelli di LACTB nei tessuti cardiaci di topi giovani e anziani e (B) nelle cellule LH-1 trattate con etoposide; a destra: Quantificazione dei livelli di LACTB per i dati mostrati nei pannelli A e B.

Il ruolo di LACTB è stato confermato dalla sua sovraespressione nelle cellule HL-1 trattate con etoposide dove l'innalzamento dei livelli di LACTB ha determinato una significativa riduzione dell'espressione di PISD.

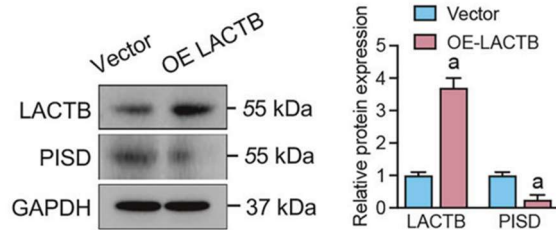


Figura 19. Analisi mediante Western blot dei livelli di PISD in linee cellulari HL-1 (vettore oppure OE-LACTB)

Inducendo invece il silenziamento del repressore LACTB attraverso un RNA interferente (sh-LACTB), come atteso, si verifica un aumento del livello di PISD che, a sua volta, comporta un incremento del rapporto LC3B-PE/LC3B, promuovendo efficacemente la formazione di autofagosomi mitocondriali.

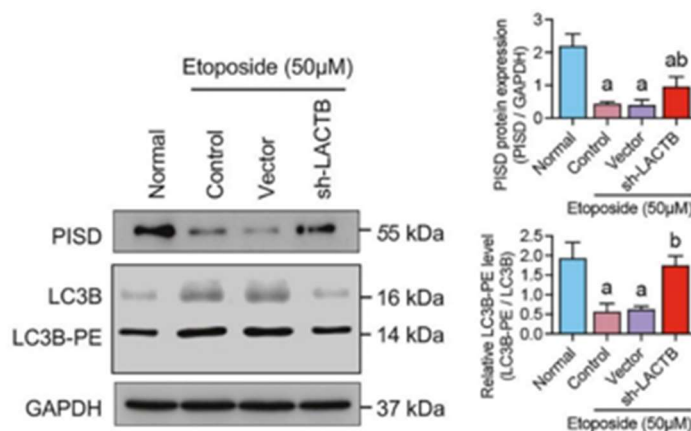


Figura 20. Analisi mediante Western blot e quantificazione dei livelli di PISD e LC3B-PE/LC3B in linee cellulari HL-1 stabili trattate con etoposide (vettore oppure shLACTB).

La regolazione negativa di LACTB nei confronti di PISD è stata poi visualizzata grazie ad immagini rilevate con Multi-SIM, in cui il silenziamento della proteina (sh-LACTB) ha mostrato la chiara ricomparsa dei lipidi strutturali (PE) associati ai mitocondri.

Come ulteriore conferma, è stato realizzato un test basato su MitoSOX che descrive un alto stress ossidativo nella linea trattata con etoposide e segnali più flebili laddove è avvenuto il silenziamento di LACTB.

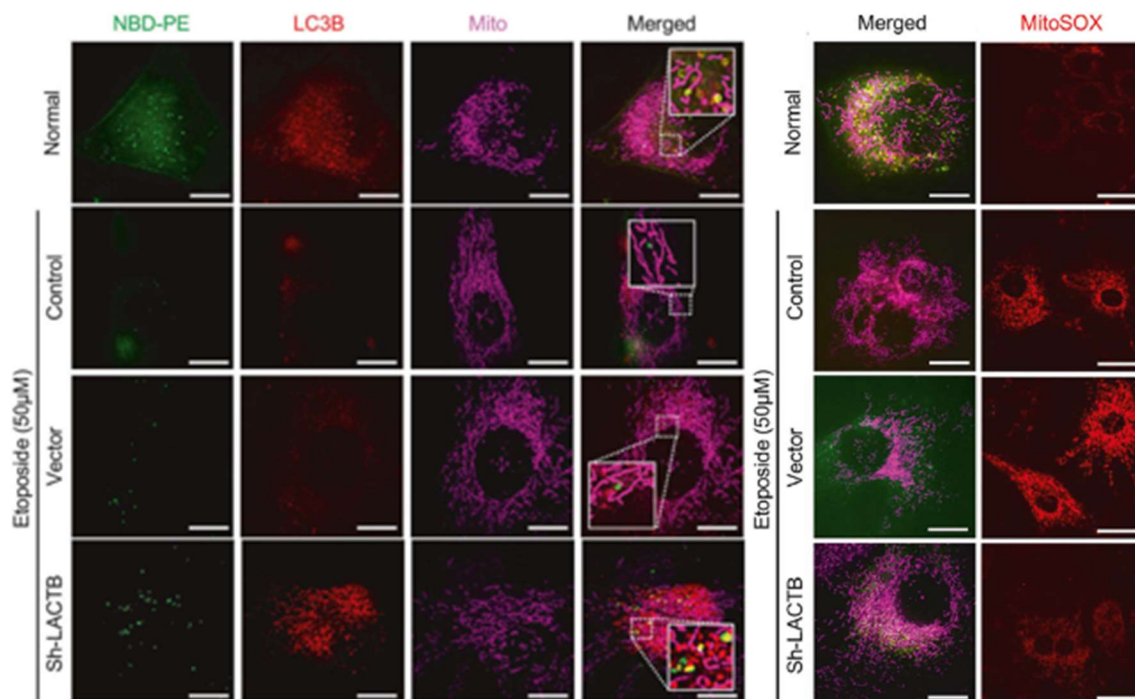


Figura 21. A sinistra: Immagini confocali in cui viene illustrato come il knockdown di LACTB (sh-LACTB) porti alla ricomparsa dei lipidi strutturali (giallo) in grado di interagire con i mitocondri (magenta); a destra: colonna MitoSOX chiarifica il numero di radicali liberi presente nei diversi modelli.

Figura 22. A destra: Immagini confocali di linee cellulari HL-1 stabili (vettore oppure Sh-LACTB) marcate con NBD-PE (marcatore della fosfatidiletanolamina, verde), LC3B-mCherry-GFP (marcatore LC3B, rosso) oppure PK Mito (marcatore mitocondriale, magenta). Dopo 48 ore di trattamento con etoposide. Le immagini sono state acquisite mediante Multi-SIM per analizzare la co-localizzazione tra LC3B e PE.

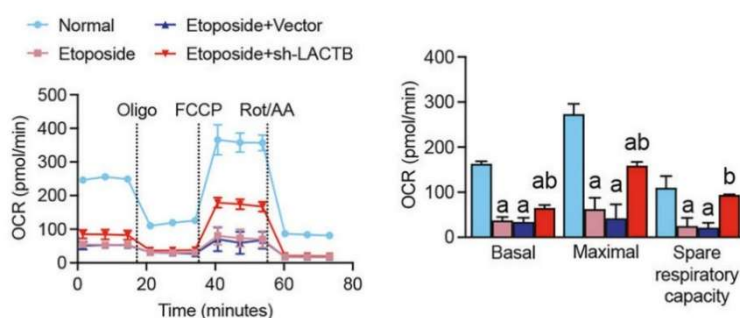


Figura 23. Tassi di consumo di ossigeno mitocondriale (OCR) in cellule HL-1 trattate con etoposide (vettore oppure sh-LACTB). Sono stati quantificati il livello basale, il livello massimo e la capacità respiratoria di riserva dell'OCR.

A riconferma del beneficio derivante dalla modulazione mirata di questi enzimi coinvolti nel metabolismo lipidico, l'analisi metabolica mediante Seahorse ha comprovato che l'intervento su LACTB è in grado di ripristinare pienamente il metabolismo energetico dei cardiomiociti senescenti migliorando significativamente la respirazione basale, la respirazione massima e la capacità respiratoria di riserva.

2.2 Metodi

(1) Western Bolt

Il Western Blot è una tecnica che permette di identificare e quantificare una proteina specifica all'interno di una miscela. Nell'articolo di Hong e colleghi, questa metodologia è stata più volte utilizzata per avvalorare le ipotesi iniziali.

Nel processo, le proteine vengono dapprima estratte dal tessuto o dalle linee cellulari, denaturate e successivamente caricate in un gel di poliacrilammide per essere sottoposte a un campo elettrico (elettroforesi SDS-PAGE). In questa fase, le macromolecole migrano nel gel in base al loro peso molecolare, separandosi in bande distinte.

Successivamente, le proteine vengono trasferite su di una membrana di nitrocellulosa. Questa viene poi incubata con un anticorpo primario specifico per la proteina d'interesse e, in seguito, con un anticorpo secondario in grado di legarsi al primario. Quest'ultimo è coniugato a un enzima o a una molecola che mediante chemiluminescenza garantisce l'emissione di un segnale luminoso, permettendo di visualizzare e quantificare la banda proteica d'interesse.

(2) Microscopia Elettronica a Trasmissione e a Scansione a doppio fascio

Le analisi di Microscopia Elettronica a Trasmissione (TEM) e a Scansione a doppio fascio (FIB-SEM) sono state eseguite su campioni di tessuto fresco, fissati in glutaraldeide e successivamente colorati con tetrossido di osmio, fondamentale per la fissazione delle membrane. I campioni sono stati infine infiltrati con resina Epon che ha permesso la solidificazione del tessuto biologico e, una volta induriti, sono stati tagliati in sezioni sottilissime così da poter essere visualizzate con il microscopio.

Il microscopio TEM è stato adoperato per osservare la stretta vicinanza spaziale (distanza <30 nm) tra le membrane, mentre il FIB-SEM ha permesso di superare i limiti delle immagini 2D ottenute tramite TEM; quest'ultime, infatti, possono creare delle ambiguità riguardo alle dimensioni delle strutture cellulari che possono variare a seconda del taglio della sezione. L'approccio FIB-SEM ha così consentito di calcolare con precisione tridimensionale l'estensione dei contatti tra reticolo endoplasmatico e mitocondrio ed il volume reale di quest'ultimo (Obara CJ et al., 2024).

(3) Seahorse XF Mito Test

In vitro, è stata utilizzata la tecnologia Seahorse XF Mito Test per misurare OCR ed ECAR (Extracellular Acidification Rate), consentendo di misurare il consumo di ossigeno e di rilevare quando le cellule attivano la glicolisi. La duplice misurazione permette di vedere quale via favorisca la cellula per produrre energia (Walsh MA et al., 2023).

Il Seahorse si compone di una piastra con dei pozzetti nei quali vengono seminate le cellule di interesse. All'interno di questi vengono iniettati tre farmaci in sequenza, che mettono i mitocondri in una condizione di sforzo, poiché non basta misurare quanto respirano a riposo per comprendere se sono sani. La prima sostanza infusa è l'Oligomicina che, bloccando l'ATP sintasi, definisce, nella condizione basale, quanta respirazione era legata alla produzione di ATP; il secondo farmaco è FCCP, un disaccoppiante che, rompendo il meccanismo di scambio di protoni, costringe la catena respiratoria a lavorare alla massima velocità possibile per ripristinare il gradiente: l'OCR sale al massimo. Questo picco rappresenta la Respirazione Massimale. La differenza tra il picco massimo e il livello basale è la Capacità di Riserva, ovvero l'energia d'emergenza della cellula. Infine, vengono iniettati il Rotenone e l'Antimicina A che bloccano completamente i Complessi I e III azzerando la respirazione mitocondriale. Quel minimo di consumo di ossigeno che rimane è dovuto ad enzimi non mitocondriali.

(4) Analisi dei Geni Deregolati (DEG)

L'analisi dei geni differenzialmente espressi permette di identificare quali modificano significativamente la loro attività in risposta a specifiche condizioni biologiche o stimoli ambientali, come l'invecchiamento cellulare o un trattamento farmacologico.

Questo approccio si articola idealmente in tre fasi: l'estrazione di set di geni correlati ad una specifica funzione da database biologici (nello studio sono stati selezionati 1513 geni correlati ai mitocondri e 9781 geni associati ai lipidi, estratti dalle banche dati Molecular Signatures Database, UniProt e Human Protein Atlas); l'identificazione delle variazioni attraverso il confronto statistico, isolando i geni che mostrano un aumento o una diminuzione della loro espressione rispetto a campioni di controllo; infine i dati raccolti vengono inseriti in rappresentazioni grafiche (come le heatmap) per comprendere l'impatto reale di queste variazioni sul sistema cellula.

(5) Lipidomica

I lipidi sono stati analizzati mediante cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC/MS) su un sistema UHPLC dotato di una colonna Phenomenex Kinetex C18 accoppiata ad uno spettrometro di massa Orbitrap. UHPLC separa le componenti mentre lo spettrometro di massa Orbitrap le identifica. Nel dettaglio UHPLC è una pompa che spinge il campione liquido attraverso la colonna Kinetex C18 che contiene delle lunghe catene di carbonio idrofobiche. I lipidi interagiscono con queste catene con intensità differenti in base alla loro polarità. Questo determina che la loro uscita dalla colonna avvenga in tempi diversi. Una volta separati, i lipidi entrano nello spettrometro di massa dove vengono pesati e quindi identificati. Nella spettrometria di massa convenzionale le masse molecolari non vengono misurate direttamente, ma vengono dedotte dai rapporti massa/carica (m/z) degli ioni rilevati; per grandi complessi, però, può risultare difficile l'attribuzione dei giusti valori di carica a causa dell'eterogeneità e dell'influenza delle singole parti. Orbitrap permette di superare la problematica individuando i singoli ioni (Deslignière E et al., 2023).

(6) Microscopia a fluorescenza

La microscopia a fluorescenza è una tecnica sperimentale che permette di visualizzare strutture specifiche all'interno delle cellule sfruttando i fluorocromi, molecole che assorbono la luce e la emettono ad una lunghezza d'onda maggiore.

Nello studio sono state utilizzate due metodiche distinte che sfruttano diverse emissioni di fluorescenza: la Multi-SIM, volta a visualizzare la struttura morfologica di vari organelli ed il MitoSOX, utile a marcare le specie reattive dell'ossigeno.

2.3 Criticità

Sebbene lo studio abbia riportato dei risultati significativi e solidi per quanto riguarda la caratterizzazione del processo che porta all'accumulo di mitocondri disfunzionali ed al loro ripristino grazie a manipolazioni geniche su PISD e LACTB, esso presenta comunque alcune limitazioni. In primo luogo, è utile ricordare che tali disfunzioni sono causate dalla diminuzione delle interazioni ER-Mito, eppure lo studio non ha indagato le cause alla base di tale deterioramento accontentandosi di attribuirlo all'invecchiamento

e, dunque, agendo in risoluzione del problema, non attraverso il ripristino di tali contatti, ma utilizzando solo vie secondarie che possano portare ad un aumento di PE. Eppure, i MERCs non servono solo al trasporto lipidico ma anche a processi metabolici come il passaggio del calcio (punto 1.3), fondamentale per l'attivazione di enzimi del ciclo di Krebs. Dunque, potenziare solo la produzione di PE lascia irrisolti i problemi legati al signaling del calcio, suggerendo che l'utilizzo di sh-LACTB come rimedio contro l'invecchiamento cardiaco e il conseguente accumulo di cardiomiociti invecchiati sia una soluzione ipotetica soltanto parziale per la riattivazione dello smaltimento efficace dei mitocondri giganti.

Inoltre, soffermandosi sulle linee cellulari utilizzate *in vitro*, si potrebbe pensare di affiancare la linea murina HL-1 con una linea di muscolo cardiaco di origine umana.

Capitolo 3: Discussione e prospettive future

Alla luce degli studi esposti finora, appare chiaro che il deterioramento del tessuto cardiaco, che si manifesta nella vecchiaia, sia il risultato dell'interruzione della comunicazione tra reticolo endoplasmatico e mitocondrio. Questa interruzione porta alla formazione di mitocondri disfunzionali e a problemi legati al processo autofagico. La progressiva riduzione dei MERCs compromette per prima istanza i livelli di PE mitocondriale. Poiché la PE è un fosfolipide chiave per l'integrità strutturale delle membrane interne, la sua carenza innesca una severa disfunzione mitocondriale, caratterizzata da deficit nella produzione di ATP, alterazioni della catena respiratoria e picchi di stress ossidativo.

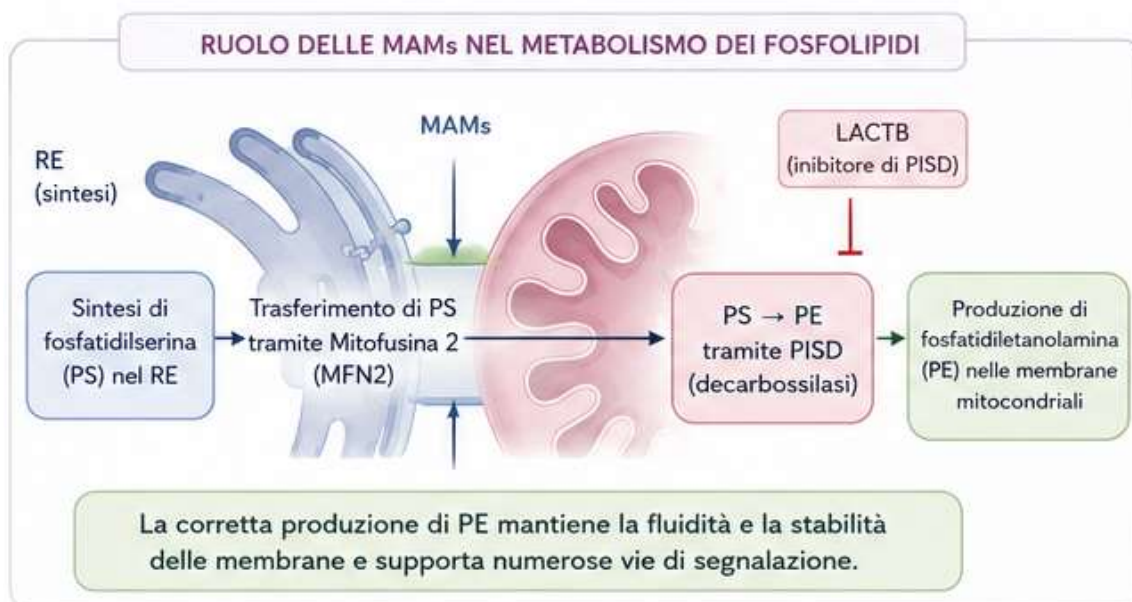


Figura 24. Rappresentazione riassuntiva dei contenuti discussi dall'articolo: meccanismi legati al ripristino dei contatti ER-mitocondrio (MAMs) e della sintesi di PE per il contrasto del deterioramento del processo autofagico nell'invecchiamento cardiaco.

Parallelamente, questo scenario bioenergetico si ripercuote inevitabilmente sui meccanismi fisiologici, bloccando il processo di autofagia.

L'accumulo di mitocondri senescenti e danneggiati, che non possono essere efficacemente smaltiti a causa del blocco del flusso autofagico, accelera degenerazione cellulare e l'apoptosi dei cardiomiociti, manifestandosi infine in un rimodellamento patologico del miocardio e nell'insufficienza cardiaca tipica della vecchiaia.

Nella ricerca di una possibile terapia, riconoscendo i MERCs e i livelli di PE come elementi rilevanti nel malfunzionamento mitocondriale e nel conseguente deterioramento dei cardiomiociti, la loro manipolazione potrebbe costituire una strategia efficace per la risoluzione del problema.

Nello specifico, per rallentare l'invecchiamento cardiaco, è emersa l'efficacia di un intervento che vada a modificare l'asse enzimatico PISD/LACTB che modula i livelli di PE mitocondriale: la strategia è quella di promuovere l'attività dell'enzima PISD inibendo la proteasi LACTB.

Seguendo una prospettiva complementare, va sottolineata la possibilità di agire a livello metabolico e nutrizionale, adottando vie alternative volte al controllo della qualità mitocondriale.

In particolare, è stato dimostrato che la restrizione calorica (CR, Caloric Restriction) può assumere in questo contesto un ruolo interessante. Agisce, infatti, sulla via di segnalazione del fattore di crescita insulino-simile 1 (IGF-1, Insulin-like Growth Factor-1). Questo spegnimento previene l'inibizione dei fattori Forkhead box O (FOXO) e contrasta l'iperattivazione del bersaglio della rapamicina nei mammiferi complesso 1 (mTORC1, mechanistic Target of Rapamycin complex 1), due processi che impattano negativamente sulla qualità del cardiomiocita.

In condizioni di deficit energetico, entra in gioco l'antagonista di mTORC1: la chinasi attivata da AMP (AMPK, AMP-activated Protein Kinase). Studi recenti hanno rivelato che AMPK possiede una funzione cruciale nel mantenimento dell'omeostasi mitocondriale, dal momento che i suoi bersagli sono coinvolti nell'autofagia. Durante la restrizione calorica, AMPK si attiva ed agisce in diverse direzioni: inibisce la via di mTORC1 per limitare il consumo di ATP, attiva i processi autofagici e regola la biogenesi mitocondriale (Herzig S. et al., 2017). Nella ricerca di possibili terapie contro l'invecchiamento cardiaco, l'attivazione della via AMPK assume quindi una posizione di primario interesse.

Un altro approccio è quello di utilizzare strategie di integrazione nutrizionale. La via di AMPK si attiva infatti anche in seguito all'assunzione di prodotti vegetali come la berberina, la curcumina o il resveratrolo, molecole dalle note proprietà antinfiammatorie ed antiossidanti (Cao Z et al., 2026).

Capítulo 4: Bibliografía

1. López-Crisosto C, Bravo-Sagua R, Rodríguez-Peña M, Mera C, Castro PF, Quest AF, Rothermel BA, Cifuentes M, Lavandero S. ER-to-mitochondria miscommunication and metabolic diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Oct;1852(10 Pt A):2096-105. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.07.011. Epub 2015 Jul 11. PMID: 26171812.
2. Ni L, Yuan C. The Mitochondrial-Associated Endoplasmic Reticulum Membrane and Its Role in Diabetic Nephropathy. *Oxid Med Cell Longev*. 2021 Nov 5;2021:8054817. doi: 10.1155/2021/8054817. PMID: 34777695; PMCID: PMC8589504.
3. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011 Nov 11;147(4):728-41. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.026. PMID: 22078875.
4. Ali MA, Gioscia-Ryan R, Yang D, Sutton NR, Tyrrell DJ. Cardiovascular aging: spotlight on mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2024 Feb 1;326(2):H317-H333. doi: 10.1152/ajpheart.00632.2023. Epub 2023 Dec 1. PMID: 38038719; PMCID: PMC11219063.
5. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001. Epub 2006 Aug 4. PMID: 16978905.
6. Rattan SIS, Kaur G, editors. *Nutrition, Food and Diet in Ageing and Longevity*. Cham: Springer; 2021. doi:10.1007/978-3-030-83017-5.
7. Obara CJ, Nixon-Abell J, Moore AS, Riccio F, Hoffman DP, Shtengel G, Xu CS, Schaefer K, Pasolli HA, Masson JB, Hess HF, Calderon CP, Blackstone C, Lippincott-Schwartz J. Motion of VAPB molecules reveals ER-mitochondria contact site subdomains. *Nature*. 2024 Feb;626(7997):169-176. doi: 10.1038/s41586-023-06956-y. Epub 2024 Jan 24. PMID: 38267577; PMCID: PMC10830423.

8. Walsh MA, Musci RV, Jacobs RA, Hamilton KL. A practical perspective on how to develop, implement, execute, and reproduce high-resolution respirometry experiments: The physiologist's guide to an Oroboros O2k. *FASEB J.* 2023 Dec;37(12):e23280. doi: 10.1096/fj.202301644RR. PMID: 37899680.
9. Deslignière E, Rolland A, Ebberink EHTM, Yin V, Heck AJR. Orbitrap-Based Mass and Charge Analysis of Single Molecules. *Acc Chem Res.* 2023 Jun 20;56(12):1458-1468. doi: 10.1021/acs.accounts.3c00079. Epub 2023 Jun 6. PMID: 37279016; PMCID: PMC10286307.
10. Greer EL, Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene.* 2005 Nov 14;24(50):7410-25. doi: 10.1038/sj.onc.1209086. PMID: 16288288.
11. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 2012 Apr 13;149(2):274-93. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.017. PMID: 22500797; PMCID: PMC3331679.
12. Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018 Feb;19(2):121-135. doi: 10.1038/nrm.2017.95. Epub 2017 Oct 4. PMID: 28974774; PMCID: PMC5780224.
13. Cao Z, Duan J, Meng S, Zhou Z, Huang Y, Chen X, Zhao J, Huang T, Zhang G, Su T, Yu L, Yin Z, Wang H. Berberine Reduces Atrial Lipotoxicity and Endoplasmic Reticulum Stress to Alleviate Heart Failure With Preserved Ejection Fraction (HFpEF)-Associated Atrial Fibrillation via AMPK Signaling. *Phytother Res.* 2026 Mar;40(3):1195-1216. doi: 10.1002/ptr.70193. Epub 2026 Jan 20. PMID: 41556855.
14. Ren ZQ, Zheng SY, Sun Z, Luo Y, Wang YT, Yi P, Li YS, Huang C, Xiao WF. Resveratrol: Molecular Mechanisms, Health Benefits, and Potential Adverse Effects. *MedComm (2020).* 2025 Jun 11;6(6):e70252. doi: 10.1002/mco2.70252. PMID: 40502812; PMCID: PMC12152427.

ARTICLE



Age-associated reduction in ER-Mitochondrial contacts impairs mitochondrial lipid metabolism and autophagosome formation in the heart

Weilong Hong^{1,11}, Xue Zeng^{1,2,11}, Ruiyan Ma^{3,11}, Yu Tian^{1,11}, Huimin Miu¹, Xiaoping Ran¹, Rui Song¹, Zhenchun Luo⁴, Dapeng Ju¹, Daqing Ma^{5,6}, Milad Ashrafizadeh⁷, Sujit Kumar Bhutia⁸, João Conde⁹, Gautam Sethi¹⁰, He Huang¹⁰ and Chenyang Duan¹⁰

© The Author(s), under exclusive licence to ADMC Associazione Differenziamento e Morte Cellulare 2025, corrected publication 2025

The accumulation of dysfunctional giant mitochondria is a hallmark of aged cardiomyocytes. This study investigated the core mechanism underlying this phenomenon, focusing on the disruption of mitochondrial lipid metabolism and its effects on mitochondrial dynamics and autophagy, using both naturally aging mouse models and etoposide-induced cellular senescence models. In aged cardiomyocytes, a reduction in endoplasmic reticulum-mitochondrial (ER-Mito) contacts impairs lipid transport and leads to insufficient synthesis of mitochondrial phosphatidylethanolamine (PE). A deficiency in phosphatidylserine decarboxylase (PISD) further hinders the conversion of phosphatidylserine to PE within mitochondria, exacerbating the deficit of PE production. This PE shortage disrupts autophagosomal membrane formation, leading to impaired autophagic flux and the accumulation of damaged mitochondria. Modulating LACTB expression to enhance PISD activity and PE production helps maintain mitochondrial homeostasis and the integrity of aging cardiomyocytes. These findings highlight the disruption of mitochondrial lipid metabolism as a central mechanism driving the accumulation of dysfunctional giant mitochondria in aged cardiomyocytes and suggest that inhibiting LACTB expression could serve as a potential therapeutic strategy for mitigating cardiac aging and preserving mitochondrial function.

Cell Death & Differentiation (2025) 32:1900–1914; <https://doi.org/10.1038/s41418-025-01511-w>

INTRODUCTION

One of the complicated biological mechanisms is aging that can be characterized by various molecular mechanisms and pathological changes. One of the hallmarks of aging is the disruption of lipid metabolism [1, 2], affecting energy balance and participating in inflammation, oxidative stress, and alterations in the cell membrane integrity. These alterations, especially in membrane and phospholipids, have significant consequence for the function of several organs, including the heart [3]. In particular, aging is associated with significant alterations in the cardiac lipid metabolism, including a reduction in the fatty acid oxidation capacity, enhanced lipid deposition, and disruptions in lipid pathways [2]. The accumulation of triglycerides and cholesterol in the cardiomyocytes leads to cellular dysfunction and cardiac remodeling [4]. Furthermore, lipid metabolism abnormalities trigger cardiomyocyte apoptosis and other complications,

declining the cardiac function [5]. Understanding the mechanisms underlying the lipid metabolism during aging can provide crucial insights into delaying the progression of cardiac aging and provide valuable evidence for the prevention and treatment of age-related diseases.

Lipid metabolism is controlled through the communication between various organelles within the cell. The interactions and contacts between these organelles are essential for maintaining the cellular lipid homeostasis and overall cellular function [6]. Among these organelles, the endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria play essential functions: ER is the primary site for the lipid biosynthesis, while mitochondria are considered to be ROS sources [7]. The recent studies have highlighted the importance of endoplasmic reticulum-mitochondrial contact (ER-Mito contact) sites, which are specialized regions of contact between the ER membrane and mitochondrial outer membrane for the regulation

¹Department of Anesthesiology, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, P.R. China. ²Institute for Brain Science and Disease, Chongqing Medical University, Chongqing, P.R. China. ³Department of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Army Medical University, Chongqing, P.R. China. ⁴Intensive Care Unit, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing, P.R. China. ⁵Perioperative and Systems Medicine Laboratory, Department of Anesthesiology, Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, National Clinical Research Center for Child Health, Hangzhou, P.R. China. ⁶Division of Anaesthetics, Pain Medicine and Intensive Care, Department of Surgery and Cancer, Faculty of Medicine, Imperial College London, Chelsea & Westminster Hospital, London, UK. ⁷Department of Radiation Oncology and Shandong Provincial Key Laboratory of Radiation Oncology, Shandong Cancer Hospital and Institute, Shandong First Medical University and Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan, Shandong 250117, China. ⁸Cancer and Cell Death Laboratory, Department of Life Science, National Institute of Technology Rourkela, Sundergarh 769008 Odisha, India. ⁹Comprehensive Health Research Centre (CHRC), NOVA Medical School, Faculdade de Ciências Médicas, NMS | FCM, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal. ¹⁰Department of Pharmacology and NUS Centre for Cancer Research, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore, Singapore. ¹¹These authors contributed equally: Weilong Hong, Xue Zeng, Ruiyan Ma, Yu Tian. ✉email: phcgs@nus.edu.sg; huanghe@cqmu.edu.cn; duanchenyang1991@cqmu.edu.cn

Received: 8 December 2024 Revised: 14 March 2025 Accepted: 1 April 2025

Published online: 20 April 2025

of lipid metabolism. These contact sites accelerate the direct exchange of lipids between the ER and mitochondria [8], exerting a vital function in cellular lipid balance, and disease development [7]. However, the precise relationship between ER-Mito contacts, aging and mitochondrial lipid metabolism remains poorly understood.

Autophagy, a key cellular process for maintaining homeostasis, demonstrates a reduction with aging and is considered a hallmark of the aging process [1]. Dysfunctional autophagy leads to the accumulation of damaged organelles and proteins, enhancing oxidative stress and inflammation, facilitating cellular aging and tissue degeneration. Notably, autophagy contributes to the regulation of innate and adaptive immunity [9]. In contrast, enhancing autophagic clearance of damaged organelles, particularly mitochondria, has been shown to extend lifespan, improve tissue health, and alleviate age-related diseases. The disruption of autophagy has been demonstrated in a number of diseases including cancer, diabetes and neurodegenerative diseases [10]. Moreover, autophagy has the potential to regulate lipid metabolism [10]. On the other hand, lipid metabolism can affect the formation of autophagosome and other structures during autophagy [11]. However, the effects of disrupted organelle communication and lipid metabolism on autophagosome formation and cardiac function during aging are not fully understood.

In this study, we used naturally aging mouse models and etoposide-induced cellular senescence models to investigate the mechanisms driving the accumulation of dysfunctional giant mitochondria in aged cardiomyocytes. We identified the disruption of mitochondrial lipid metabolism as a core mechanism underlying this phenomenon. LACTB, a mitochondrial protein with both enzymatic and regulatory functions, plays a critical role in mitochondrial lipid metabolism and dynamics. LACTB affects mitochondrial lipid remodeling by inhibiting phosphatidylserine decarboxylase (PISD) expression, which is essential for the synthesis of PE. Dysregulation of LACTB expression impairs mitochondrial lipid metabolism, contributing to the mitochondrial dysfunction and autophagy disruption in aging cells. Specifically, a reduction in ER-Mito contacts impairs lipid transport to the mitochondria, leading to insufficient mitochondrial PE synthesis. Additionally, a deficiency in PISD further inhibits the conversion of phosphatidylserine (PS) to PE within mitochondria, increasing PE production deficit. This PE shortage prevents the effective formation of autophagosomal membranes, disrupting autophagic flux and leading to the accumulation of damaged mitochondria. Modulating LACTB expression to enhance PISD activity and PE synthesis helps to maintain mitochondrial homeostasis and quality control in aging cells. This approach may provide a promising therapeutic strategy for delaying cardiac aging and preserving mitochondrial function in the heart and other vital organs.

RESULTS

Reduction in ER-Mito contacts in aged mouse cardiac tissue leads to dysfunctional giant mitochondrial accumulation

We compared cardiac tissues from C57/BL6 mice at 8 weeks of age (young group) and 76 weeks of age (old group). The aging markers P16, P21 and P53 were significantly elevated in the cardiac tissues of aged mice compared to young mice ($P < 0.05$) (Fig. 1A). Additionally, SASP gene expression differences and increased SA- β -gal activity in the aged cardiac tissues confirmed the appropriate establishment of the aging model (Fig. S1A, B). Transmission electron microscopy (TEM) of the cardiac tissue revealed close proximity and adequate contact between the ER and mitochondria in young cardiac tissues (Fig. 1B - white arrows 1 and 2). The mitochondria displayed regular morphology, appearing elongated and cylindrical with smooth outer membranes. The quantitative analysis of TEM images demonstrated the

average mitochondrial length was approximately 1.60 μm , and the perimeter was 3.73 μm (Fig. 1C). Furthermore, mitochondria were arranged in parallel to the longitudinal axis of the myofibrils, which is typical of healthy cardiac tissue and facilitates efficient energy distribution. Compared to the young cardiac tissues, aged cardiac tissue demonstrated significant lipofuscin accumulation (Fig. 1B, orange arrows), a marked reduction in ER-Mito contacts ($P < 0.05$) (Fig. 1B - white arrows 3 and 4), and a substantial increase in the number of giant mitochondria with an average perimeter of 7.24 μm . In contrast to the ordered arrangement characteristic of young myocardial tissues, these giant mitochondria displayed not only aberrant morphology but also precipitated the disruption of tissue architecture (Fig. 1B, C). These results suggest that the reduction in ER-Mito contacts in aged cardiac tissue is associated with the accumulation of dysfunctional giant mitochondria.

To minimize variation from random TEM sectioning, we employed dual-beam scanning electron microscopy to generate three-dimensional reconstructions of representative tissue regions. These reconstructions revealed that approximately 75% of the mitochondrial circumference in young cardiac tissues was in close contact with the ER. This extensive ER-Mito contact facilitated mitochondrial diameter contraction to an average of 529 nm, supporting moderate mitochondrial fission and maintaining mitochondrial homeostasis. In aged cardiac tissues, however, only 43% of the mitochondrial circumference was in contact with the ER, insufficient for proper mitochondrial contraction. This reduction in ER-Mito contact hindered mitochondrial fission, contributing to the accumulation of giant mitochondria (Fig. 1D). Interestingly, while the mRNA levels of mitochondrial fission-related proteins (DRP1, MFF, FIS1, MID49, and MID51) and the mitochondrial biogenesis-related protein PGC1 α did not significantly differ between young and aged cardiac tissues ($P > 0.05$), the mRNA levels of mitochondrial fusion-related proteins (OPA1, MFN1, and MFN2) were significantly upregulated in aged tissues ($P < 0.05$) (Fig. S1C). This upregulation may reflect a compensatory response to the reduction in ER-Mito contacts, potentially contributing to the formation of dysfunctional giant mitochondria.

To investigate the effects of reduced ER-Mito contacts on mitochondrial metabolism in aged cardiac tissue, we utilized the Oroboros O2k system for high-resolution respirometry. Our results showed significant reductions in oxidative phosphorylation (OXPHOS) capacity and Complex I (CI) electron transport chain (ETC) activity in aged mouse cardiac tissues compared to young tissues. Specifically, CI leak, CI OXPHOS, CI + CII OXPHOS, CI + CII ET, and CIV OXPHOS were significantly lower in the aged group ($P < 0.05$), while CII ET showed no significant difference between groups ($P > 0.05$) (Fig. 1E). These findings suggest that the reduction in ER-Mito contacts not only alters mitochondrial morphology but also disrupts mitochondrial metabolism, contributing to cardiac dysfunction.

Reduction in ER-Mito contacts in etoposide-treated HL-1 cells lead to mitochondrial metabolic dysregulation and autophagic flux blockade

To simulate cardiomyocyte aging, HL-1 cells were treated with etoposide. Western blotting analysis revealed that the expression levels of aging markers (P16, P21 and P53) increased with increasing etoposide concentrations ($P < 0.05$) (Fig. 2A). A heatmap of SASP gene expression showed significant differences ($P < 0.05$) (Fig. S2A) and SA- β -gal staining demonstrated elevated SA- β -gal activity ($P < 0.05$) (Fig. 2B) in etoposide-treated HL-1 cells compared to untreated cells, confirming the successful establishment of a cardiomyocyte aging model. TEM images of etoposide-treated HL-1 cells revealed a significantly increased distance between the ER and mitochondria compared to control cells ($P < 0.05$), with a marked reduction in the number of ER-Mito contacts ($P < 0.05$) (Fig. 2C). In addition, numerous immature autophagosomes were

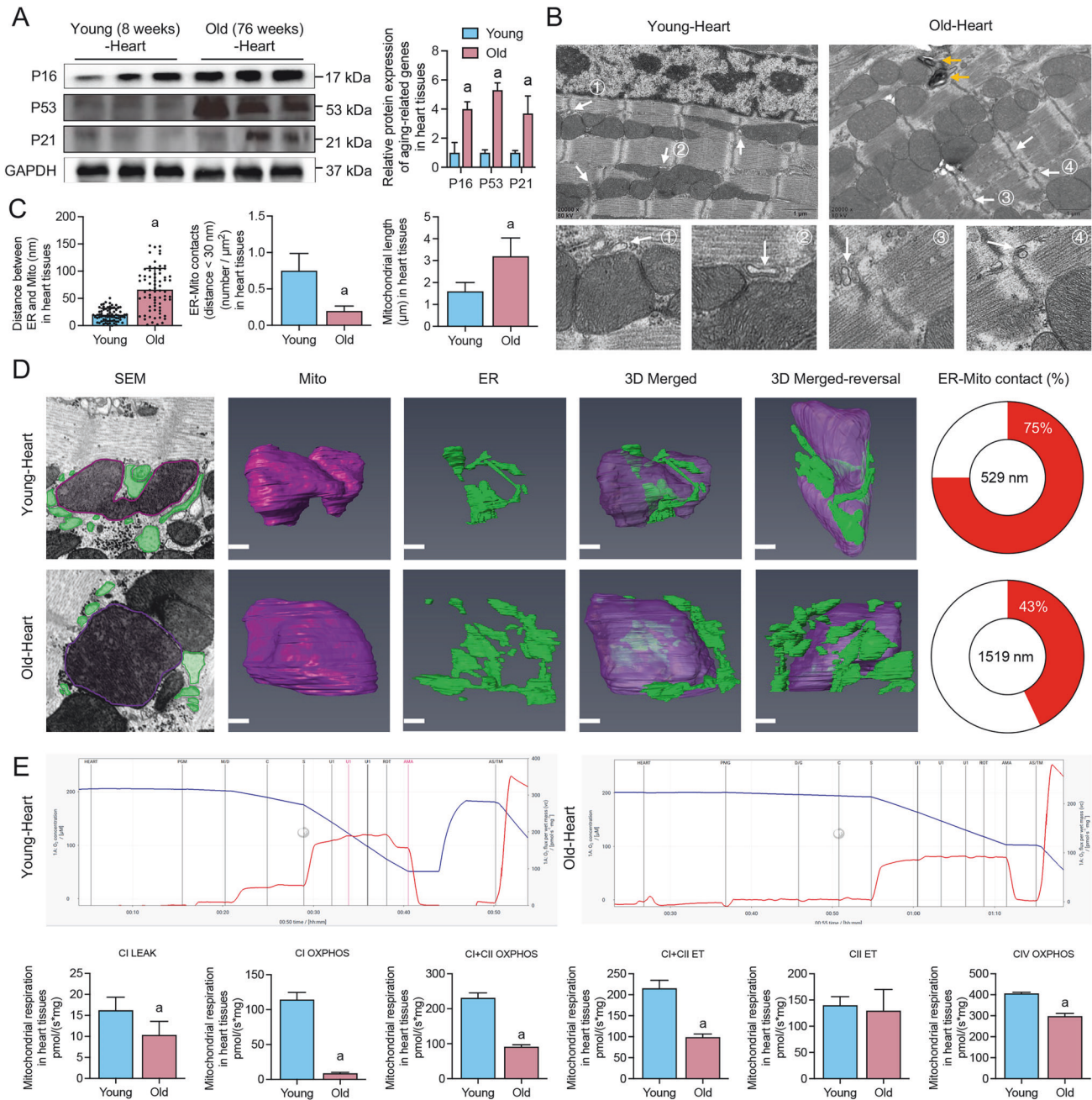
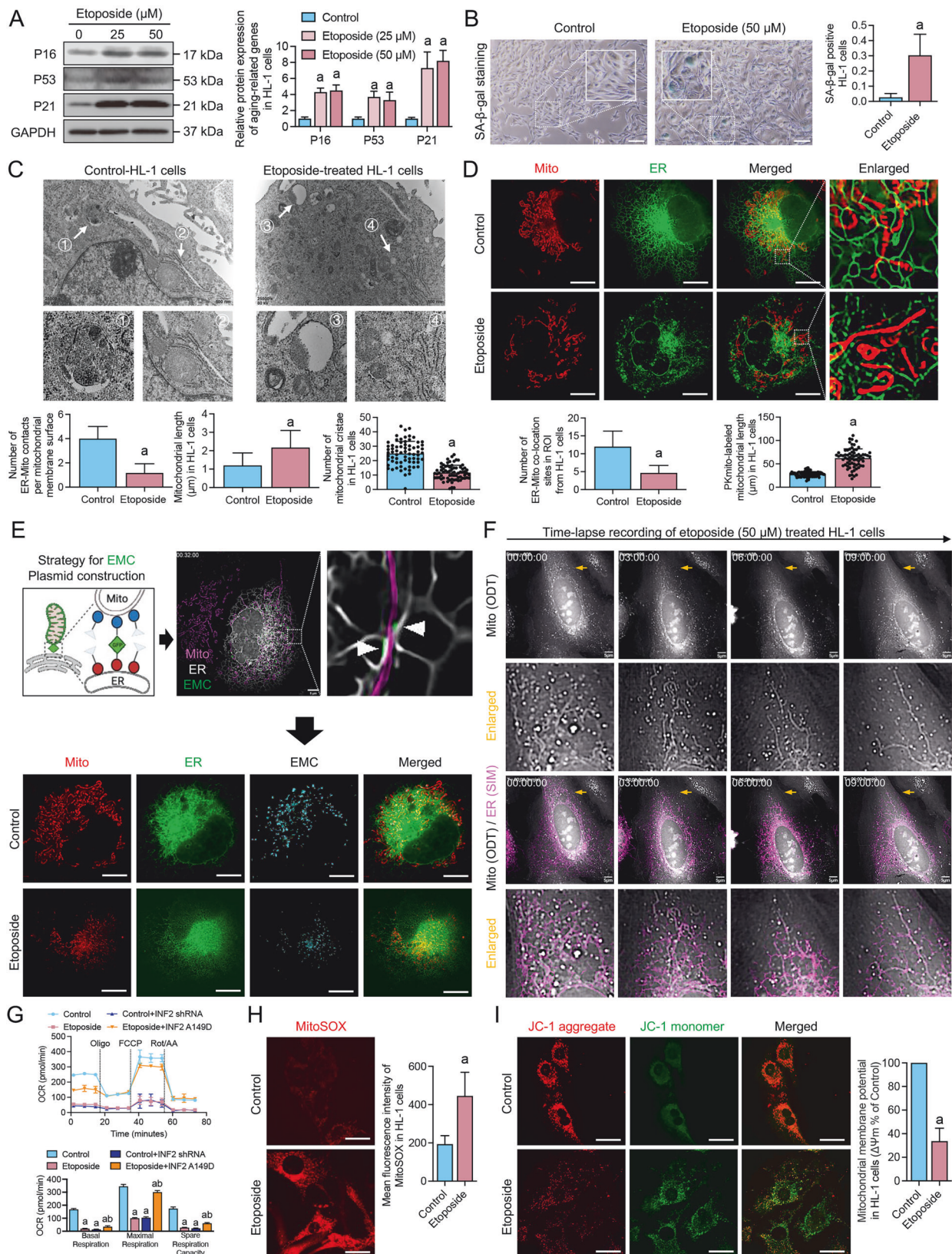


Fig. 1 Reduction of ER-Mito contacts in cardiomyocytes from aging mice leads to accumulation of dysfunctional giant mitochondria. **A** Expression levels of P16, P53 and P21 in the heart tissues of young and old mice ($n = 3$). **B** Representative TEM images showing ER-Mito contacts in young and old mouse heart tissues (20,000× magnification). **C** The statistical results of the distance between ER and mitochondria, the number of ER and mitochondrial contacts, and mitochondrial length. **D** 3D reconstruction of the ER (green) and mitochondria (magenta) at contact sites in heart tissues imaged by FIB-SEM (scale bar, 300 nm). Left: ER wrapping defined as regions where the ER membrane is within 30 nm of the mitochondrial membrane. Right: Percentage of mitochondrial circumference in contact with the ER membrane (red indicates contact, white indicates no contact). Center: Diameter (nm) of each mitochondrion at ER contact points. **E** Representative images of O₂ concentration changes and O₂ flux per mass in each group (top). Oxygen consumption capacity measured by high-resolution respirometry in complex I and II, including CI leak, CI OXPHOS, CI + CII OXPHOS, CI + CII ET (electron transfer system), CII ET, and CIV OXPHOS ($n = 4$). a: $p < 0.05$ compared with the young group.

observed, characterized by membrane-bound structures that had not yet fused with lysosomes and lacked typical degradation products (Fig. 2C). Under normal conditions, autophagosomes exhibited an intact membrane structure that engulfs organelles, such as mitochondria (Fig. 2C - white arrows 1 and 2). However, in etoposide-treated HL-1 cells, the autophagosomal membrane structure was damaged and failed to properly enclose organelles (Fig. 2C - white arrows 3 and 4).

To further investigate the direct role of ER-Mito contacts in mitochondrial morphology and autophagic flux, we manipulated ER-Mito contacts in HL-1 cells. Knockdown of ER-Mito contacts using INF2 shRNA [12] (Fig. S2B - white arrow 1 and Fig. S2C) led to a significant increase in the number of giant mitochondria in control HL-1 cells (Fig. S2B - white arrow 2), indicating that insufficient ER-Mito contacts disrupt mitochondrial morphology. Conversely, transfection INF2-A149D to enhance ER-Mito contacts [13] in



etoposide-treated HL-1 cells restored mitochondrial morphology, reducing the accumulation of giant mitochondria (Fig. S2B - white arrow 3). In addition, autophagic flux was significantly improved, as evidenced by the restoration of autophagosome formation and

effective autophagosome-to-autolysosome conversion (Fig. S2B - white arrow 4). Confocal microscopy examination also revealed reduced ER-Mito contacts and excessive mitochondrial elongation in etoposide-treated HL-1 cells ($P < 0.05$) (Fig. 2D), consistent with

Fig. 2 Reduction in ER-Mito contacts leads to mitochondrial metabolic dysregulation and autophagic flux blockade in etoposide-treated HL-1 cells. **A** Protein levels of P16, P53 and P21 in HL-1 cells after etoposide treatment. **B** SA- β -gal staining of HL-1 cells after 48 h of etoposide treatment (Scale bar, 100 μ m). The white boxes indicate enlarged views of the corresponding areas in the original images, intended to enhance the visualization of positive signals. **C** Representative TEM images of HL-1 cells after 48 h of etoposide treatment (25000 $\times$ magnification). The number of ER and mitochondrial contacts per mitochondrial membrane surface, mitochondrial length, and number of cristae were further analyzed using ImageJ. **D** Confocal images of HL-1 cells labeled with PK Mito (mitochondrial marker, red) and Calnexin-mCherry (ER marker, green) after 48 h of etoposide treatment (scale bar, 20 μ m). **E** Top: Diagram of the EMC plasmid construction strategy and validation of the labeling effect. ER (white) and mitochondria (magenta) contact was detected by GFP fluorescence (green). Bottom: HL-1 cells labeled by PK mito (red), ER (green), and EMC (cyan) (scale bar, 10 μ m). **F** Time-lapse recording of etoposide continuous processing HL-1 cells by SIM&ODT. ODT recorded mitochondria and HIS-SIM recorded ER (magenta). **G** Mitochondrial oxygen consumption rates (OCR) in etoposide-treated HL-1 cells with INF2-mediated ER-Mito contact manipulation. The basal level, maximal level, and spare respiratory capacity of OCR were quantified. (H&I) Confocal images and statistical data showing mitochondrial function indicators, including (H) MitoSox and (I) JC-1 signals, in etoposide-treated HL-1 cells (scale bar, 40 μ m). a: $p < 0.05$ compared with the control group.

TEM observations. Western blotting results further confirmed these findings, showing decreased expression of the ER-Mito contact protein IP3R in etoposide-treated HL-1 cells ($P < 0.05$) (Fig. S2D). Manipulating ER-Mito contact via INF2 intervention confirmed the observed trends: reduced contacts led to increased mitochondrial elongation, while enhanced contacts restored normal mitochondrial morphology (Fig. S2E). These results suggest a close relationship between reduced ER-Mito contacts, disrupted mitochondrial morphology, and autophagic flux in aging cardiomyocytes.

To specifically visualize ER-Mito contact sites, we designed an ER and mitochondrial contact (EMC) plasmid using a split fluorescent protein system. This system generates fluorescence only when the ER and mitochondria are in contact (Fig. 2E and Movies 1–3). Time-lapse recordings validated the specificity and accuracy of the EMC plasmid in reflecting ER-Mito contacts (Movies 1–3). Confocal microscopy data revealed a significant reduction in EMCs in the etoposide-treated HL-1 cells compared to controls ($P < 0.05$) (Fig. 2E and Fig. S2F), further confirming the reduction in ER-Mito contacts in aging cardiomyocytes. SIM-ODT time-lapse recordings showed a gradual reduction in ER-Mito contacts and excessive mitochondrial elongation with the progression of cardiomyocyte aging (Fig. 2F and Movies 4–5). In control HL-1 cells without etoposide, ER-Mito contacts and mitochondrial morphology remained stable during long-term observation (Fig. S2G and Movie 6), ruling out the possibility that the observed changes were due to normal cell growth during prolonged imaging. Additionally, in etoposide-treated HL-1 cells, enhancing ER-Mito contacts with INF2-A149D intervention significantly reduced mitochondrial elongation and restored mitochondrial morphology (Fig. S2H and Movie 7). These results further clarify that in aging cardiomyocytes, reduced ER-Mito contacts impede normal mitochondrial fission, leading to excessive mitochondrial elongation.

We next assessed the impact of reduced ER-Mito contacts on mitochondrial metabolism and function in aging cardiomyocytes. Seahorse analysis showed significantly weakened mitochondrial respiratory capacity in etoposide-treated HL-1 cells, as evidenced by reductions in basal respiration, maximal respiration, and spare respiratory capacity ($P < 0.05$) (Fig. 2G). Mitochondrial function tests showed a significant increase in mitochondrial ROS production ($P < 0.05$) (Fig. 2H) and a significant decrease in mitochondrial membrane potential (MMP, $P < 0.05$) (Fig. 2I) in etoposide-treated HL-1 cells. Moreover, manipulating ER-Mito contacts through INF2 intervention further supported these findings, demonstrating that reduced ER-Mito contacts exacerbated mitochondrial dysfunction, while enhancing these contacts ameliorates the abnormalities (Fig. S2I–J). These findings highlight that reduced ER-Mito contacts in aging cardiomyocytes is a critical factor leading to mitochondrial metabolic and functional dysregulation.

Reduced ER-Mito contacts in aging lead to impaired mitochondrial lipid transport and insufficient mitochondrial PE synthesis

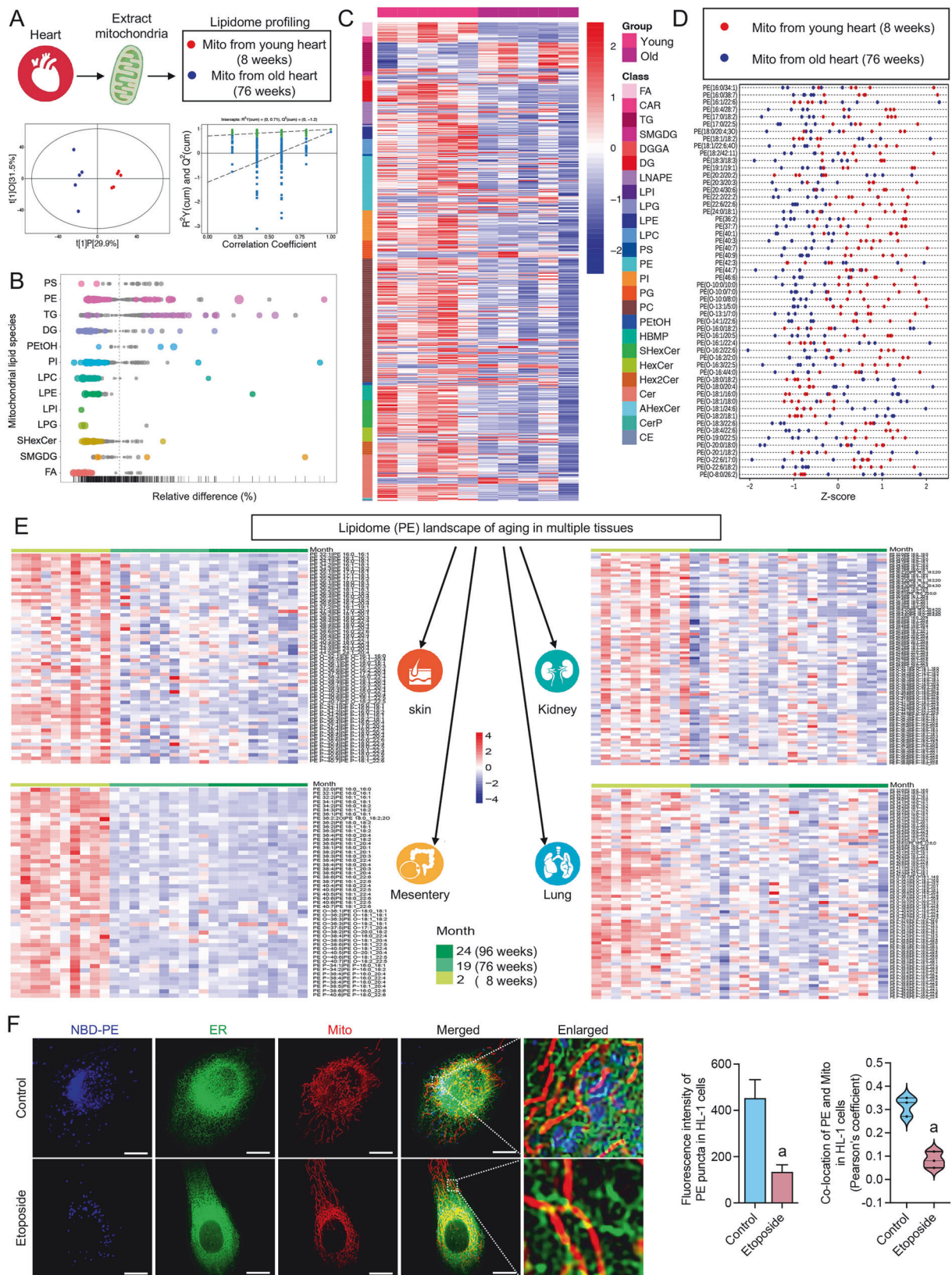
To investigate the effect of reduced ER-Mito contacts on mitochondrial lipid metabolism during aging, we isolated mitochondria from

the heart tissues of young (8 weeks) and aged (76 weeks) mice for comprehensively quantitative lipidomic analysis (Fig. 3A). No significant differences in food and water consumption were observed between the experimental groups (Figure S3A), despite an increase in body weight in the aged mice (Fig. S3B). The lipidomic analysis revealed significant alterations in lipid profiles in the cardiac mitochondria of aged mice. Compared to the young group, aged mice showed elevated levels of triacylglycerols (TG) and decreased levels of several lipid classes, including fatty acids (FA), glycerophospholipids (e.g., PS, PE, and phosphatidylinositol [PI]), lysophospholipids (e.g., lysophosphatidylcholine [LPC], lysophosphatidylethanolamine [LPE], lysophosphatidylinositol [LPI], lysophosphatidylglycerol [LPG]), diacylglycerols (DG), and sphingolipids (e.g., sulfated hexosylceramide [SHexCer] and sulfoquinovosyl diacylglycerol [SMGDG]) ($P < 0.05$) (Fig. 3B and Supplementary Table S1). Heatmap and Z-score analyses further illustrated these findings, highlighting the dysregulation of mitochondrial lipid metabolism in aged cardiac tissues (Fig. 3C and Fig. S3C). These results suggest that the impaired lipid transport associated with reduced ER-Mito contacts in aging may contribute to these metabolic disturbances. Notably, a key observation was the significant reduction in mitochondrial PE synthesis in aged hearts, with 40 specific PE species showing significantly decreased levels (Fig. 3D and Fig. S3D, E). To explore whether this was a systemic phenomenon, we conducted a bioinformatic analysis of PE metabolic profiles across multiple tissues using public databases. The analysis demonstrated that PE levels declined significantly with age in various organs, including the lungs, kidneys, mesentery, and skin (Fig. 3E), suggesting that the reduction in mitochondrial PE content is a widespread phenomenon across multiple tissues and organs.

At the cellular level, we further examined PE dynamics in etoposide-treated HL-1 cells, where reduced ER-Mito contacts were associated with a significant decrease in the co-localization of mitochondria and PE ($P < 0.05$) and an overall reduction in cellular PE expression ($P < 0.05$). In these cells, mitochondria predominantly exhibited giant or excessively elongated morphologies, indicative of inhibited fission (Fig. 3F). These findings suggest that impaired lipid transport, resulting from reduced ER-Mito contacts during aging, may be a critical factor contributing to decreased mitochondrial PE synthesis observed in the heart and other tissues.

PI3D deficiency in mitochondria of aged cardiomyocytes inhibits the conversion of PS to PE, further impeding mitochondrial PE synthesis

To explore additional abnormalities in the mitochondrial PE synthesis pathway that may contribute to insufficient lipid precursors in aging mitochondria, we performed a differential gene expression analysis on cardiac tissues from mice of different ages (GSE179286). The analysis revealed that 39 genes involved in mitochondrial lipid metabolism were significantly altered during aging, with 14 upregulated and 25 downregulated (Fig. 4A). Among these, *PI3D*, a key enzyme responsible for converting PS to PE in mitochondria, was identified as one of the downregulated genes.



Immunohistochemical analysis confirmed that PISD expression was significantly lower in aged cardiac tissues compared to young tissues (Fig. 4B). Western blotting further validated that the reduction in total PISD protein expression in aged cardiac tissues was primarily

localized to the mitochondria ($P < 0.05$) (Fig. 4C). A similar reduction in PISD expression was observed in etoposide-treated HL-1 cells, confirming the mitochondrial deficiency of PISD in aged cardiomyocytes at both the animal and cellular levels (Fig. 4D).

Fig. 3 Reduction in mitochondrion-associated membranes leading to mitochondrial metabolic dysfunction in aging is associated with decreased mt-PE production. **A–C** Lipidomics analysis of cardiac mitochondrial fractions from hearts of young (8 weeks, red) and old (76 weeks, blue) mice ($n = 5$). Results of an orthogonal projections to latent structures discriminant analysis (OPLS-DA) are shown (**A**). Lipid group bubble plot based on the degree of metabolite changes. The size of the points reflects the P -value from the Student's t -test. The horizontal coordinate represents the relative percentage change in the content of each substance in the group (**B**). Lipidome analyses were visualized using a heatmap (**C**). **D** Z-Score plot of the lipidome (PE) data from (**C**). **E** Lipidome (PE) landscape heatmap of aging in multiple tissues, including the skin, kidney, mesentery, and lung. **F** HL-1 cells labeled with PK Mito (mitochondrial marker, red), Calnexin-mCherry (ER marker, green), and NBD-PE (PE marker, blue) (scale bar, 20 μm). a: $p < 0.05$ compared with the control group.

To further investigate the impact of PISD deficiency on mitochondrial PE synthesis, we created stable HL-1 cell lines with either PISD knockdown or overexpression. The effectiveness of the PISD manipulation was validated through various assays (Figs. S4A–D). Confocal microscopy analysis showed that PISD knockdown in HL-1 cardiomyocytes resulted in a significant reduction in PE content ($P < 0.05$) and a marked decrease in PE co-localization with mitochondria ($P < 0.05$), without affecting the number of ER-Mito contacts (Fig. 4E). Conversely, in etoposide-treated HL-1 cells, PISD overexpression promoted PE synthesis and partially ameliorated the excessive elongation of mitochondria (Fig. 4F and Fig. S4E). These results indicate that PISD deficiency in mitochondria of aged cardiomyocytes is the primary cause of impaired PS-to-PE conversion and reduced mitochondrial PE content. Furthermore, the effect of PISD-mediated PE synthesis on mitochondrial morphology appears to be linked to autophagy regulation, which facilitates the clearance of damaged mitochondria and helps maintain normal mitochondrial morphology. This effect is likely independent of ER-Mito contacts and their role in mitochondrial fission.

Insufficient PE in aged cardiomyocytes impairs autophagosome membrane formation, leading to mitochondrial autophagic flux disruption

During the formation of autophagosome membrane structures, PE anchors to the lipid bilayer and conjugates with LC3B to form LC3B-PE (LC3B-I and LC3B-II) [14]. To investigate the effects of aging on autophagic flux, we performed a KEGG pathway enrichment analysis of DEGs from aging tissues and organs from the DNA Data Bank of Japan (DDBJ, ID: PRJDB14285). This analysis highlighted significant enrichment in pathways related to mitochondrial autophagy and lysosomal activity (Fig. 5A).

We next assessed how PISD-mediated disruption of PE conversion affects autophagosome formation within the complete autophagic flux in aged cardiomyocytes. TEM images revealed that under normal conditions, autophagosomes had intact membranes, and autolysosomes contained properly enclosed autophagosome membranes with degraded mitochondrial fragments. In contrast, etoposide-treated HL-1 cells exhibited damaged autophagosome membranes that failed to properly enclose organelles. There were significantly fewer autophagosomes compared to the control group, and autolysosomes displayed severely vacuolated and damaged membranes (Fig. 5B and Fig. S5A, B). Western blotting analysis showed a significant reduction in the LC3B-PE/LC3B ratio in aged mouse cardiac tissues compared to young tissues ($P < 0.05$) (Fig. 5C). Similarly, in etoposide-treated HL-1 cells, the LC3B-PE/LC3B ratio was significantly lower ($P < 0.05$) (Fig. 5D, E), and this effect was reversed by PISD overexpression (Fig. 5F). These results indicate that insufficient PE in aged cardiomyocytes impairs autophagosome membrane formation, a process closely linked to a mitochondrial PISD deficiency. Confocal microscopy revealed that in etoposide-treated HL-1 cells, autophagosome formation was significantly inhibited and the number of mitochondrial autophagosomes was markedly reduced ($P < 0.05$). However, PISD overexpression increased mitochondrial autophagosome generation ($P < 0.05$) (Fig. 5G and Fig. S5C). Additional analysis showed that PISD deficiency-induced disruption of PE conversion directly reduced LC3B autophagosome formation in aged cells. Conversely, PISD overexpression promoted PE synthesis, enhanced LC3B

autophagosome membrane formation (as evidenced by increased PE and LC3B colocalization), and significantly increased the number of mitochondrial autophagosomes ($P < 0.05$) (Fig. 5H and Fig. S5D). These findings highlight the crucial role of PISD-mediated PE conversion in maintaining mitochondrial morphology and function, likely by regulating autophagy to clear damaged mitochondria, rather than by promoting moderate mitochondrial fission via ER-Mito contacts.

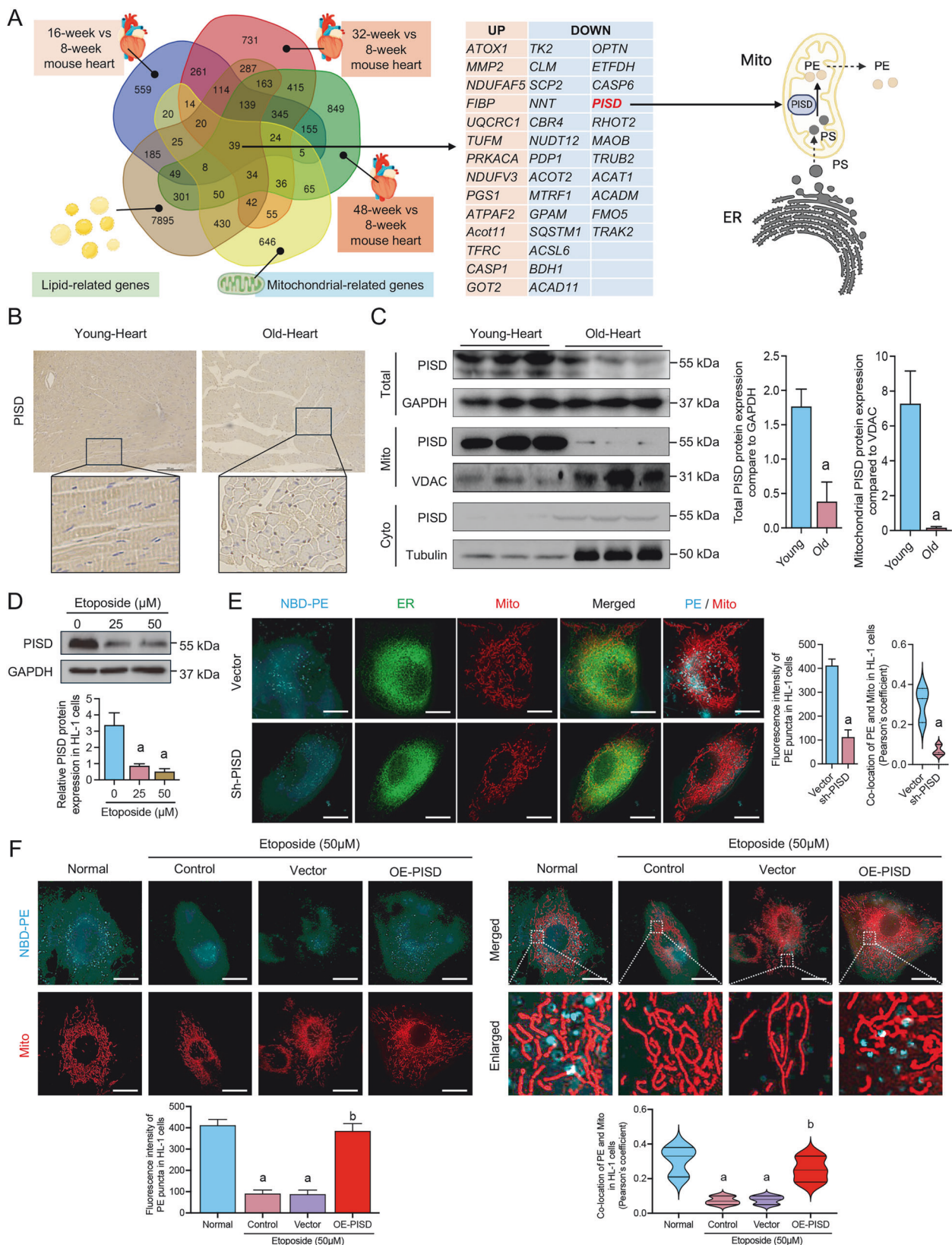
We further explored the effect of PISD-mediated PE conversion disruption on the conversion of autophagosomes to autolysosomes within the complete autophagic flux in aged cardiomyocytes. Under normal conditions, mCherry-GFP-LC3B labeled autophagosomes co-localized well with Lamp1-labeled lysosomes, indicating a smooth autophagic flux. In etoposide-treated HL-1 cells, the colocalization of LC3B and Lamp1 was significantly reduced ($P < 0.05$), and PISD overexpression significantly increased LC3B and Lamp1 colocalization compared to the control group (Fig. S5E, F), suggesting that enhancing PISD-mediated PE conversion benefits autophagic flux.

To assess dynamic changes in LC3B autophagosome formation and mitochondrial morphology during etoposide treatment, we used SIM confocal microscopy for continuous time-lapse recordings. These findings showed that LC3B autophagosome formation decreased gradually and mitochondria became progressively elongated in aged cells (Fig. 5I and Movie 8). PISD overexpression increased LC3B autophagosome formation and facilitated their rapid fusion with lysosomes to form autolysosomes (Fig. 5J and Movies 9–12). These results provide further evidence that PISD deficiency-induced disruption of PE conversion in aged cardiomyocytes blocks complete autophagic flux, impairing the clearance of damaged mitochondria and leading to excessive mitochondrial elongation.

Additionally, we investigated the effect of disrupted PE conversion on mitochondrial metabolism and function. A Seahorse XF energy metabolism assay revealed that PISD overexpression weakened the mitochondrial respiratory capacity in etoposide-treated HL-1 cells. Compared to the etoposide-only group, the Etoposide+OE-PISD group exhibited a 73% increase in basal respiration ($P < 0.05$), a 155% increase in maximal respiration ($P < 0.05$), and a 272% increase in spare respiratory capacity ($P < 0.05$) (Fig. 5K). Mitochondrial function assays also indicated that PISD overexpression reduced mitochondrial ROS production ($P < 0.05$) (Fig. 5L and Fig. S5G) and attenuated the decreased MMP in aged cardiomyocytes ($P < 0.05$) (Fig. 5M and Fig. S5H). These findings suggest that aging significantly disrupts mitochondrial autophagic flux, characterized by a persistent suppression of autophagosome formation and impaired conversion to autolysosomes. However, PISD overexpression effectively enhanced the formation of autophagosomes and autolysosomes, promoted normal autophagic flux, accelerated the clearance of damaged mitochondria, and prevented excessive mitochondrial elongation and metabolic dysfunction.

Promoting PISD expression and PE synthesis through LACTB intervention maintains mitochondrial homeostasis and quality in aged cardiomyocytes

A recent study has indicated that LACTB negatively regulates PISD expression [15]. Western blotting analysis revealed that LACTB



expression was significantly elevated in aged cardiomyocytes ($P < 0.05$) (Fig. 6A) and in etoposide-treated HL-1 cells ($P < 0.05$) (Fig. 6B–C). In HL-1 cells with LACTB overexpression, we observed a significant reduction in PISD expression ($P < 0.05$) (Fig. 6D).

Conversely, LACTB knockdown in etoposide-treated HL-1 cells significantly increased PISD expression ($P < 0.05$), accompanied by an increased LC3B-PE/LC3B ratio ($P < 0.05$) (Fig. 6E). Confocal microscopy showed that LACTB knockdown significantly increased

Fig. 4 **PISD deficiency in mitochondria of aged cardiomyocytes inhibits the conversion of PS to PE, impeding mitochondrial PE synthesis.** **A** Venn diagram showing overlapping significantly differentially expressed genes (DEGs) in different aged mice (GSE179286), mitochondrial-related genes, and lipid-related genes. PISD is the only one that can regulate the conversion of PS to PE in mitochondria directly. **B** Immunohistochemical analysis of PISD in aged mouse heart tissues (scale bar, 200 μ m). **C** Western blotting analysis of mitochondrial PISD levels in young and old mouse heart tissues ($n = 3$). **D** Protein levels of PISD in HL-1 cells after etoposide treatment. **E** Confocal images of HL-1 stable cell lines (vector or shPISD) labeled with PK Mito (mitochondrial marker, red), Calnexin-mCherry (ER marker, green), and NBD-PE (PE marker, cyan) (scale bar, 20 μ m). **F** Confocal images of HL-1 stable cell lines (vector or OE-PISD) labeled with PK Mito (mitochondrial marker, red) and NBD-PE (PE marker, cyan) (scale bar, 20 μ m). Data were quantified using ImageJ. a: $p < 0.05$ compared with the normal group. b: $p < 0.05$ compared with the vector group.

the fluorescence of LC3B-labeled autophagosomes in etoposide-treated HL-1 cells and promoted the co-localization of LC3B with mitochondria ($P < 0.05$) (Fig. 6F and Fig. S6A, B). Additionally, LACTB knockdown enhanced PE synthesis, increased the colocalization of LC3B with PE ($P < 0.05$) (Fig. S6C), and significantly promoted mitochondrial autophagosome formation ($P < 0.05$) (Fig. 6G). These results suggest that LACTB intervention promotes PISD expression and PE synthesis in aged cardiomyocytes.

We further investigated the effects of LACTB intervention on mitochondrial metabolism and function. Seahorse analysis revealed that LACTB intervention significantly improved mitochondrial metabolism in aged cardiomyocytes, restoring basal respiration, maximal respiration, and spare respiratory capacity ($P < 0.05$) (Fig. 6H). Mitochondrial function assays showed that LACTB intervention reduced mitochondrial ROS production ($P < 0.05$) (Fig. 6I) and improved MMP ($P < 0.05$) (Fig. 6J). These findings suggest that promoting PISD expression and PE synthesis via LACTB intervention helps maintain mitochondrial homeostasis and quality in aged cardiomyocytes.

DISCUSSION

Our study revealed significant alterations in ER-Mito contacts between young and aged cardiomyocytes. In young cardiomyocytes, well-maintained ER-Mito contacts facilitated efficient lipid transport, mitochondrial function, and the conversion of PS to PE, which supported autophagosome formation and ensured complete autophagic flux. In contrast, aged cardiomyocytes showed a marked reduction in ER-Mito contacts, impairing lipid transport, PE synthesis, and mitochondrial autophagosome formation. This disruption led to the accumulation of dysfunctional giant mitochondria with metabolic abnormalities. By modulating LACTB expression, we restored PISD activity, increased PE synthesis, and improved mitochondrial quality and function in aged cardiomyocytes (Fig. 7).

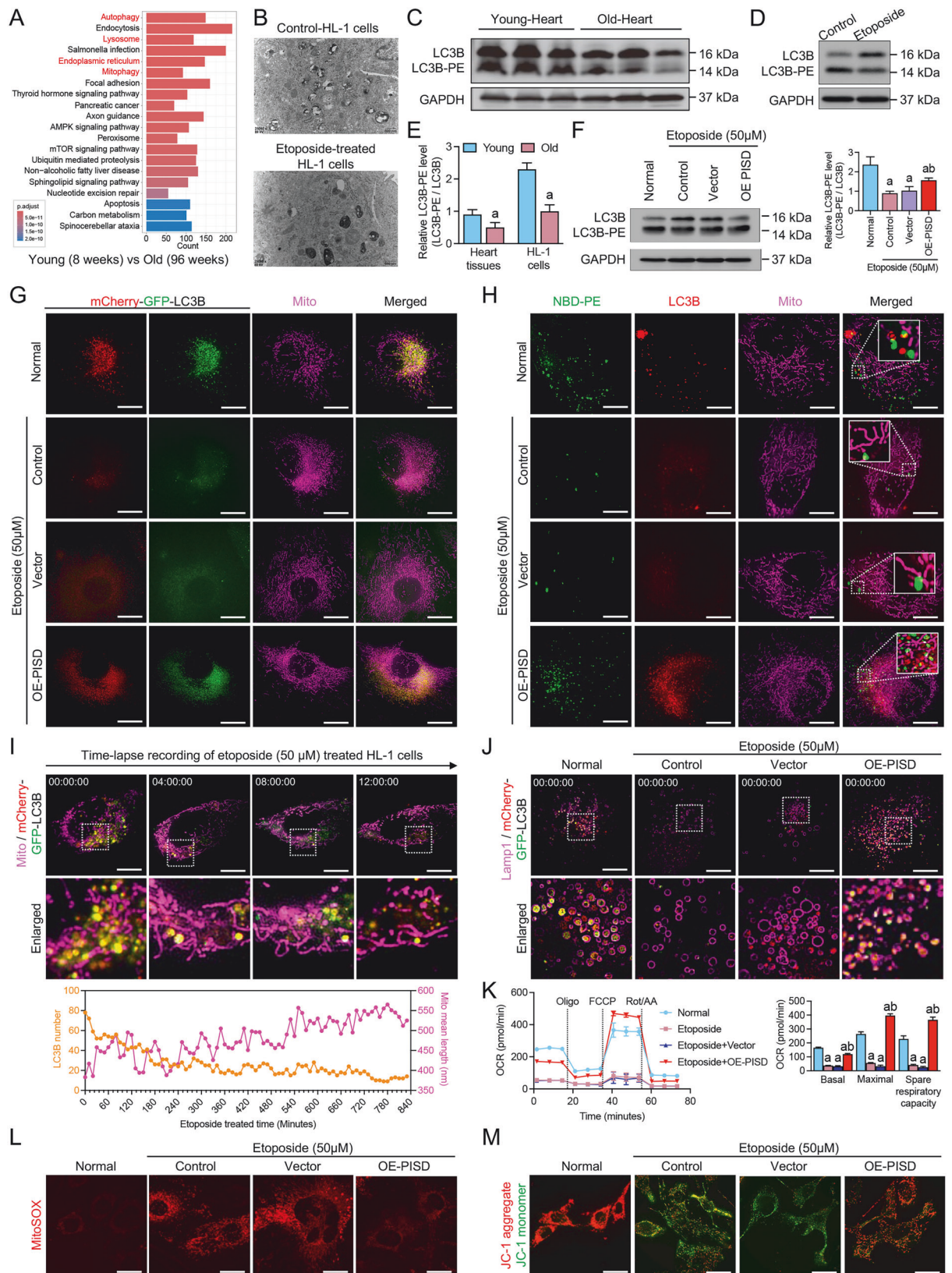
Dynamic changes in ER-Mito contacts play a double-edged role in cellular physiology and pathology. On one hand, appropriate ER-Mito contacts help maintain mitochondrial function and cellular homeostasis. On the other hand, excessive or insufficient ER-Mito contacts can lead to the mitochondrial quality imbalances and diseases [7]. In acute ischemia-hypoxia injury, excessive Drp1 activation increases ER-Mito contacts [12], contributing to the multiorgan dysfunction through disrupted calcium homeostasis and enhanced oxidative stress [16]. In addition, iron can increase the lipid metabolism to trigger oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction [17]. The interaction of mitochondria and ER can affect physiological and pathological events impairing mitochondrial lipid and calcium exchange [8, 18], leading to mitochondrial damage and energy metabolism disorders. Our study uniquely identifies a significant reduction in ER-Mito contacts in aged cardiomyocytes, aligning with findings in aged skeletal muscle [19], brain tissues and nerve degeneration [20, 21]. This contrasts with some studies that report unchanged or even increased ER-Mito contacts [22, 23], which may result from the use of genetically modified models [24], or differences in ER-Mito contact detection methods. Our research highlights a novel aspect

of ER-Mito interaction disruption in aged cardiac tissue, emphasizing its impact on mitochondrial quality.

ER-Mito contacts play multifaceted functions in regulating cellular functions, including ER stress responses, calcium signaling, and mitochondrial dynamics [25]. These contacts interact with mitochondrial fission proteins, such as Drp1, to regulate mitochondrial morphology and fission [12] and facilitate material transport, particularly lipids and calcium ions, between the ER and mitochondria [26]. Our study demonstrates that reduced ER-Mito contacts in aged cardiomyocytes impair lipid transport, disrupting mitochondrial PE synthesis. This highlights the crucial role of lipid transport in maintaining mitochondrial health. Previous studies have linked reduced ER-Mito contacts to impaired lipid transport in diseases such as nonalcoholic fatty liver disease [27]. However, our findings provide a novel perspective by directly linking disrupted lipid transport to mitochondrial PE synthesis in aging cardiomyocytes. This unveils a previously unrecognized mechanism underlying ER-Mito interaction dysfunction during aging and underscores the essential role of lipid transport in preserving mitochondrial and cellular homeostasis.

PE is the second most abundant phospholipid in mammalian cells, playing essential roles in maintaining membrane structure, cellular metabolism, and signaling [28]. PE synthesis occurs via the Kennedy and mitochondrial pathways, the latter of which is highly dependent on ER-Mito contacts. In mammalian cells, the CDP-ethanolamine pathway in the ER and the PISD pathway in mitochondria are key to PE biosynthesis [29]. PE supports critical processes such as protein topology, membrane fusion, mitochondrial function (oxidative phosphorylation and fusion), and autophagy [29]. Abnormal PE levels have been associated with numerous diseases, including neurodegenerative diseases (Alzheimer's and Parkinson's disease), metabolic disorders (e.g., non-alcoholic fatty liver disease), and cardiovascular diseases, primarily due to disrupted membrane function and signaling. The significant reductions in PE levels have been observed in the brains of patients with Huntington's disease and in the hippocampi of aged mice [30]. In our study, we identified a significant decrease in PE content in aged heart mitochondria, underscoring a direct link between reduced ER-Mito contacts, impaired lipid transport, and disrupted PE synthesis. These findings highlight the importance of PE metabolism in aging and its broader implications for mitochondrial health and disease mechanisms.

PISD, first discovered in yeast and located in the inner mitochondrial membrane, plays an essential function in converting PS into PE [28]. In mammalian cells, PISD mutations or deficiencies have been linked to skeletal dysplasia, cataracts [31], uric acid-related liver injury [32], and nonalcoholic steatohepatitis [33], while high PISD expression is associated with cancer progression [34, 35]. However, its role in aging remains largely unexplored. Our study revealed that mitochondrial PISD expression decreases in aged hearts, inhibiting PE biosynthesis, and that PISD overexpression reverses the PE reduction caused by cellular aging. Zhao et al. previously reported that disrupted lipid exchange between the mitochondria and ER impairs PISD function in *Drosophila* [36]. Rockenfeller et al. demonstrated that PISD promotes autophagosome formation by enhancing PE synthesis, thus extending the



lifespan of yeast and *Drosophila* [37]. Building on these findings, our study uncovers a novel mechanism linking impaired PE synthesis to aging and highlights the crucial role of PISD in maintaining mitochondrial function and cellular homeostasis.

Autophagosome formation is considered as a critical step in autophagic flux and it requires the covalent binding of LC3B to PE to generate the membrane structure. Autophagosomes fuse with lysosomes to degrade damaged mitochondria and ER, and

Fig. 5 **Insufficient PE in aged cardiomyocytes impairs autophagosome membrane formation, leading to mitochondrial autophagic flux disruption.** **A** KEGG enrichment analyses of differentially expressed genes between young (8 weeks) and old (96 weeks) mice. **B** TEM images of HL-1 cells after 48 h of etoposide treatment for autophagosome observation (25000× magnification). **C** Western blotting analysis of LC3B-PE/LC3B (LC3B II/I) levels in young and old mouse heart tissues ($n = 3$). **D** Western blotting analysis and quantification of LC3B-PE/LC3B levels in HL-1 cells after 50 μ M etoposide treatment. **E** LC3B-PE/LC3B levels quantified using ImageJ for data in (C) and (D). **F** Western blotting analysis of LC3B-PE/LC3B levels in etoposide-treated HL-1 cells (vector or OE-PISD). (G&H) Confocal images of HL-1 stable cell lines (vector or OE-PISD) labeled with PK Mito (mitochondrial marker, magenta), and LC3B-mCherry-GFP (LC3B marker, red and green) or NBD-PE (PE marker, green). After 48 h of etoposide treatment, images were obtained by Multi-SIM to analyze the puncta of autophagosomes and mitophagosomes (**G**) or fluorescence intensity of PE and co-localization of LC3B (red) and PE (**H**) (scale bar, 20 μ m). **I** Time-lapse recording of etoposide-treated HL-1 cells labeled with PK Mito (mitochondrial marker, magenta), and LC3B-mCherry-GFP (LC3B marker, red and green). LC3B number and mean length of mitochondria quantified using ImageJ (bar, 20 μ m). **J** Time-lapse recording of HL-1 stable cell lines (vector or OE-PISD) labeled with LAMP1 (lysosome marker, magenta), and LC3B-mCherry-GFP (LC3B marker, red and green). Images were obtained by Multi-SIM to analyze the co-localization of LC3B and lysosomes (scale bar, 20 μ m). **K** Mitochondrial OCR in etoposide-treated HL-1 cells (vector or OE-PISD). The basal level, maximal level, and spare respiratory capacity of OCR were quantified. (L&M) Confocal images and statistical data showing mitochondrial function indicators, including (H) MitoSox and (I) JC-1 signals, in etoposide-treated HL-1 cells (vector or OE-PISD) (scale bar, 40 μ m). a: $p < 0.05$ compared with the normal group. b: $p < 0.05$ compared with the vector group.

disruptions in this process are implicated in diseases such as Parkinson's disease, metabolic syndrome, and liver disorders [38]. In our study, autophagy-related pathways were highly enriched in aging across multiple organs. Specifically, aged cardiomyocytes demonstrated a significant reduction in the number of autophagosomes and the LC3B-PE/LC3B ratio, which is consistent with reports of impaired autophagy during aging [39, 40]. Our findings further reveal a novel upstream mechanism underlying these abnormalities: mitochondrial PISD deficiency during aging inhibits the conversion of PS to PE, disrupts mitochondrial PE synthesis, and impairs autophagosome membrane formation and conversion of autophagosomes to autolysosomes. This mechanism highlights how dysfunctional organelle interactions in aging lead to the accumulation of dysfunctional giant mitochondria, impaired clearance of damaged mitochondria, and metabolic abnormalities.

LACTB is a mitochondrial membrane protein that is highly expressed in various organs, such as the heart, liver, and lungs, and directly regulates mitochondrial lipid metabolism and cell proliferation [41]. However, its role in aging remains unclear. Our study revealed that LACTB intervention promotes PISD expression and PE synthesis, thereby maintaining mitochondrial homeostasis and quality in aged cells. Similarly, Keckesova et al. demonstrated that LACTB regulates PISD expression in tumor cells, mediating the conversion of mitochondrial PS to PE [15]. These findings suggest that targeting LACTB in cardiomyocytes to modulate autophagy and improve mitochondrial function may represent a novel strategy for delaying aging in critical organs like the heart.

Despite these significant results, our study had a number of limitations. We used an etoposide-induced cardiomyocyte aging model, and further studies are required to confirm whether other aging models, such as those induced by α -gal or X-ray, yield similar results. Due to current limitations in the fluorescent dyes for PS detection, we were unable to directly observe the transport of PS from the ER to mitochondria or its conversion to PE. Instead, we relied on PE endpoint evidence, and the development of more specific PS dyes will be a focus of future studies. LACTB was the only intervention used to promote PISD expression and PE synthesis in this study. Future research will explore high-throughput screening for the small-molecule drugs targeting PISD. This study lacked in vivo validation of PE-related autophagosome formation, which will be addressed in the future experiments.

CONCLUSION

Our study highlights mitochondrial lipid metabolism dysfunction as a pivotal mechanism driving to the accumulation of dysfunctional giant mitochondria in aged cardiomyocytes. We demonstrate that a reduction in ER-Mito contacts impairs mitochondrial

lipid transport, leading to insufficient mitochondrial PE synthesis. This deficiency is further exacerbated by PISD insufficiency, which impairs the conversion of PS to PE, leading to a substantial reduction in mitochondrial PE levels. The lack of PE disrupts the formation of autophagosome membranes, compromising mitochondrial autophagic flux and hindering the clearance of damaged mitochondria, ultimately resulting in the accumulation of giant dysfunctional mitochondria. Intervention with LACTB can restore PISD expression and enhance PE synthesis, thereby preserving mitochondrial homeostasis in aged cells. This approach may offer a promising strategy for developing interventions aimed at delaying the aging of the heart and other vital organs.

METHODS

Bioinformatic analysis

A total of 1513 mitochondria-related genes [42] (Supplementary Table S2) and 9781 lipid-related genes (Supplementary Table S3) were obtained from the Molecular Signatures Database, UniProt, and Human Protein Atlas (HPA) databases. Differentially expressed genes (DEGs) in these datasets were identified using transcriptomic data from mice of different ages (GSE179286) via GEO2R, with a significance threshold of $P < 0.05$. To analyze lipid changes during aging, orthogonal projections to latent structures discriminant analysis (OPLS-DA) was applied. The $t[1]P$ and $t[1]O$ scores represent the first principal component and the orthogonal component, respectively, indicating between-group and within-group differences. Z-score and heatmap analyses were conducted on mitochondrial data from heart tissues of aged mice. For comprehensive analysis of PE metabolic profiles across tissues, heatmaps of lipid metabolism in aging mice were generated using R software 4.2.3 [43].

Animal experiments and cell culture

Animal care and experimental protocols were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University (Approval No. 2022 (222)). C57/BL6 male mice (8 weeks old and 76 weeks old) were purchased from Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd. Mice were housed under pathogen-free conditions and maintained at 22 °C and 50% relative humidity with a 12 h alternating light/dark cycle. They were sacrificed under anesthesia, and heart tissue samples were collected for further analyses.

HL-1 cells were obtained from HyCytes and cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Gibco, C11995500CP) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco 10091155) and 50 U/mL penicillin/streptomycin (Gibco; 15140122) at 37 °C in an incubator with 5% CO₂. HL-1 cells were treated with various concentrations of etoposide for 48 h to induce cellular senescence in vitro [44].

Stable PISD and LACTB transfectants were generated using a lentiviral system as previously described [45]. Briefly, plasmids were co-transfected with packaging plasmids (pMD2.G and psPAX2) into HEK293T cells. After 48 h, the culture medium was mixed with HitransG P viral infection reagent (Genechem, REVG005) to infect HL-1 cells. Lentiviral vectors harboring mouse *PISD* and *LACTB* genes were obtained from GeneCopeia. Stable cell

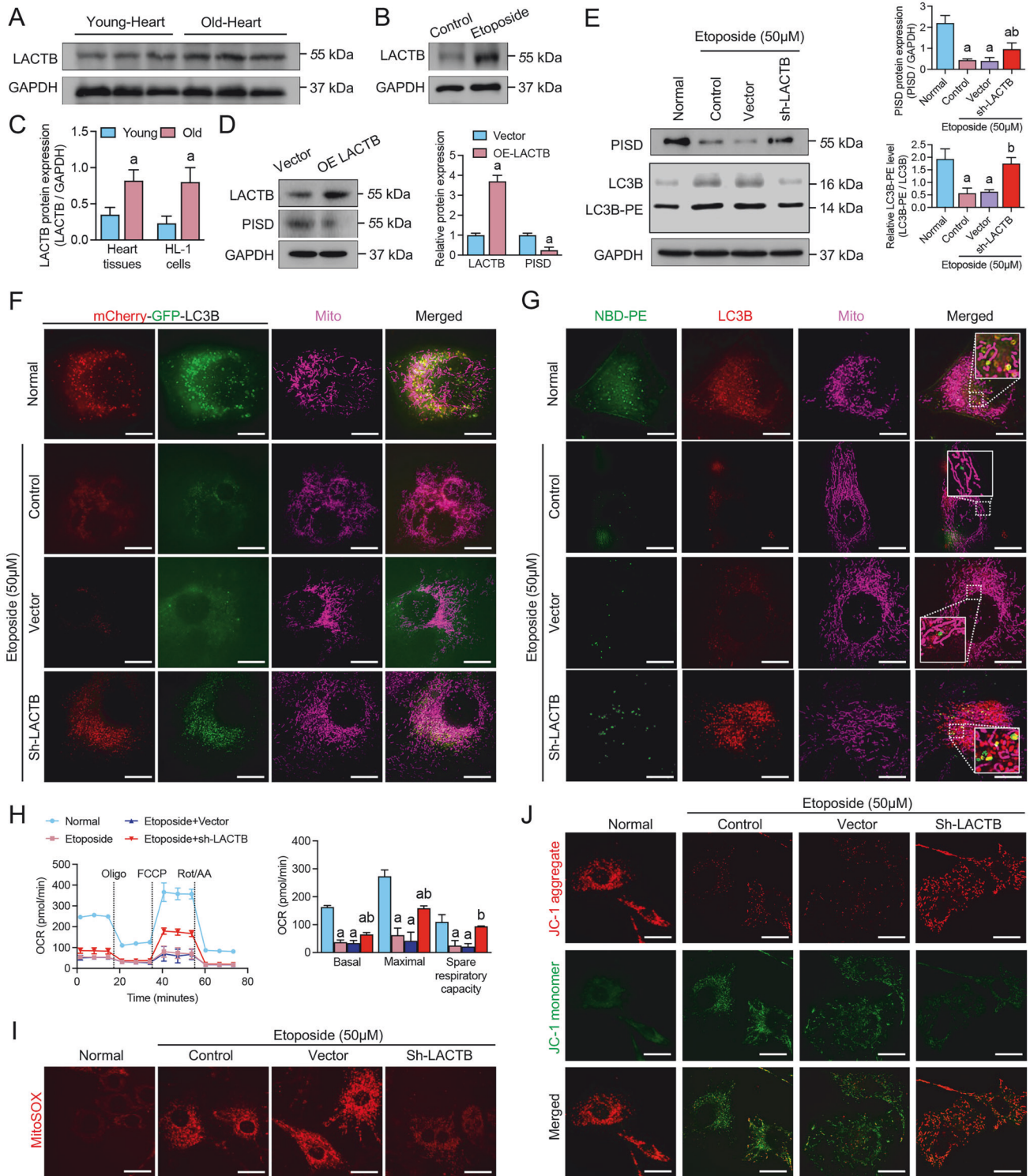


Fig. 6 Targeting LACTB may reverse the PISD-mtPE axis to improve mitochondrial function and metabolism in aged cardiomyocytes. **A** Western blotting analysis of LACTB levels in young and old mouse heart tissues ($n = 3$). **B** Western blotting analysis of LACTB levels in HL-1 cells after 50 μM etoposide treatment. **C** LACTB levels quantified using ImageJ for data in (A) and (B). **D** Western blotting analysis of PISD level in HL-1 stable cell lines (vector or OE-LACTB). **E** Western blotting analysis and quantifications of PISD and LC3B-PE/LC3B in etoposide-treated HL-1 stable cell lines (vector or shLACTB). **F** Confocal images of etoposide-treated HL-1 stable cell lines (vector or shLACTB) labeled with PK Mito (mitochondrial marker, magenta) and LC3B-mCherry-GFP (LC3B marker, red and green). Images were obtained by Multi-SIM to analyze the puncta of autophagosomes and mitophagosomes (scale bar, 20 μm). **G** Confocal images of etoposide-treated HL-1 stable cell lines (vector or sh-LACTB) labeled with PK Mito (mitochondrial marker, magenta) and NBD-PE (PE marker, green). Images were obtained by Multi-SIM to analyze the fluorescence intensity of PE and co-localization of LC3B (red) and PE (scale bar, 20 μm). **H** Mitochondrial OCR in etoposide-treated HL-1 cells (vector or sh-LACTB). The basal level, maximal level, and spare respiratory capacity of OCR were quantified. Confocal images and statistical data showing mitochondrial function indicators, including (I) MitoSox and (J) JC-1 signals, in etoposide-treated HL-1 cells (vector or sh-LACTB) (scale bar, 40 μm). a: $p < 0.05$ compared with the normal group. b: $p < 0.05$ compared with the vector group.

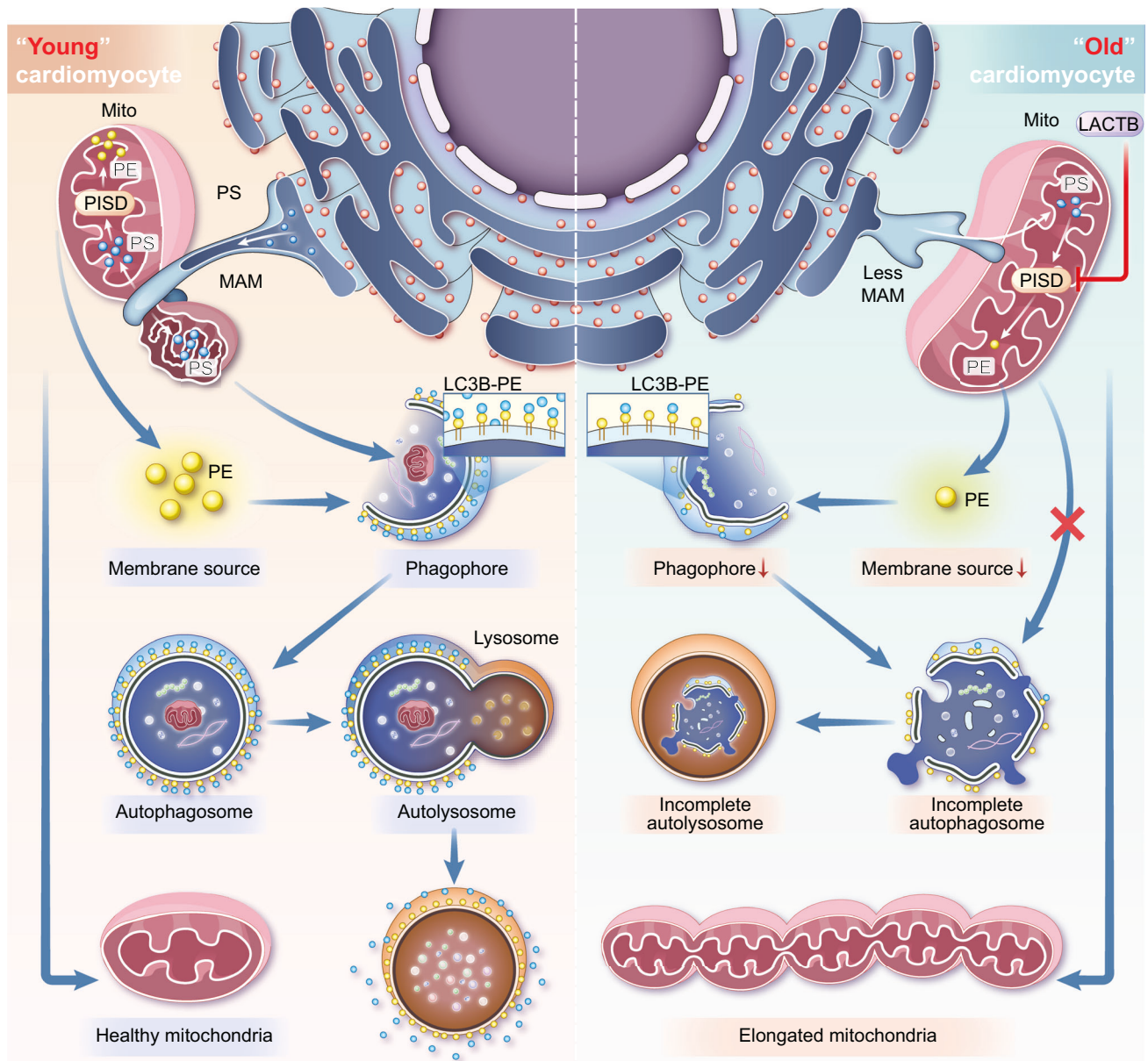


Fig. 7 Overview of the mechanism by which the aging-associated reduction in ER-mitochondrial contacts impairs mitochondrial lipid metabolism and autophagosome formation in the heart. In young cardiomyocytes, well-maintained ER-Mito contacts facilitated efficient lipid transport and mitochondrial function. These contacts supported the conversion of PS to PE, enabling the formation of autophagosome membrane structures and maintaining mitochondrial homeostasis through complete autophagic flux. In contrast, aged cardiomyocytes exhibited a significant reduction in ER-Mito contacts, impairing lipid transport and PE synthesis. This disruption inhibited autophagosome formation and conversion to autolysosomes, leading to inefficient clearance of damaged mitochondria. Consequently, dysfunctional giant mitochondria accumulated, characterized by metabolic abnormalities and impaired cellular homeostasis. Intervention with LACTB restored PISD expression and PE synthesis, thus improving mitochondrial quality and function in aged cardiomyocytes.

lines were selected by treating HL-1 cells with puromycin (10 µg/mL). The shRNA sequences used were as follows: shNC: 5'-TTCTCCGAACGTGT CACGT-3'; shPISD: 5'-CGCCTCAACCAAGTAGAAGT-3'; shLACTB: 5'-CUGUCA CAACAAGAUUACUAA-3'.

Western blotting and RT-qPCR

Cells and mouse heart samples were lysed in RIPA buffer. After centrifugation at 13,000 g for 15 min at 4 °C, the supernatant containing the extracted proteins was collected. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked with 1× TBST containing milk for 1 h, followed by overnight incubation with primary antibodies at 4 °C. GAPDH, Tubulin, and VDAC were used as internal controls. After washing the membranes three times

with 1× TBST for 7 min each, protein bands were detected using the ECL system.

Total RNA was isolated from cells using the Eastep Super Extraction Kit (LS1040, Promega) according to the manufacturer's instructions [42]. The isolated RNA was then reverse-transcribed into cDNA using the PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real-Time). Quantitative PCR was performed using SYBR Green 2× PCR Master Mix (06924204001, Roche) on a Bio-Rad CFX system. Primer sequences for qRT-PCR are listed in Supplementary Table S4.

Mitochondrial extraction

Mouse heart tissues were homogenized on ice using a mitochondrial isolation kit (MP-007, Invent) following the manufacturer's instructions. This

method facilitated the rapid isolation of intact mitochondria, which were then used for subsequent analyses, including SDS-PAGE and liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS).

Mitochondrial membrane potential (MMP) and superoxide measurement

JC-1 (C2006, Beyotime) was used to assess MMP, and MitoSox Red (M36008, Invitrogen) was used to detect mitochondrial superoxide, following the manufacturers' protocol. Briefly, HL-1 cells were treated with etoposide, washed twice with PBS, and then stained with 2 μ M JC-1 or 1 μ M MitoSox at 37 °C in the dark for 20 min. The cells were imaged using an OLYMPUS confocal immunofluorescence microscope.

SIM and SIM&ODT live-cell imaging

HL-1 cells were seeded in confocal dishes (D35-28-0-N, CellVis) and incubated overnight. After transfection with the corresponding fluorescent plasmid for 24 h, the culture medium was replaced with fresh medium containing 50 μ M etoposide to induce cellular senescence. Live-cell imaging was performed using an SIM-ODT (structured illumination microscopy-optical diffraction tomography) microscope, equipped with a 3D holographic imaging system. Cells were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere within a temperature-controlled incubation chamber throughout the imaging process.

Mitochondrial oxygen consumption rate (OCR)

Mitochondrial OCR was measured using the Agilent Seahorse XF Cell Mito Test Kit (Agilent Technologies) following the manufacturer's guidelines. Briefly, after equipment calibration, a mixture of 1.0 μ M oligomycin, 1.0 μ M FCCP, and 0.5 μ M rotenone/0.5 μ M antimycin A was added to the cartridge. The cell culture medium was replaced with Seahorse XF Base Medium containing 1 mM pyruvate, 2 mM glutamine, and 10 mM glucose, and cells were incubated for 45–60 min before the assay. Measurements were performed using the Agilent Seahorse XF HS Mini Analyzer, and results were analyzed with GraphPad Prism 9 after exporting data using Wave Desktop (Agilent Technologies).

For cardiac mitochondrial respiratory function analysis in mice, heart tissues (10 mg) were homogenized in 400 μ L of mitochondrial respiration solution (MiRO5) on ice. A 40 μ L aliquot of the homogenate was used for mitochondrial function analysis with the Oroboros Oxygraph-2 k (O2K) system. The titration scheme was as follows: Complex I LEAK respiration (CI LEAK) was measured by adding 5 mM pyruvate, 10 mM glutamate, and 2 mM malate. The OXPHOS capacity of Complex I (CI OXPHOS) was determined by adding 1 mM ADP. Outer mitochondrial membrane integrity was assessed by injecting 10 μ M cytochrome c. The OXPHOS capacity of both Complex I and II (CI + CII OXPHOS) was measured by adding 10 mM succinate. Electron transfer system (ETS) capacity for Complexes I and II (CI + CII ET) was measured with 0.5 μ M FCCP, while Complex II ETS capacity (CII ET) was determined by adding 0.5 μ M rotenone. Complex III was inhibited with 2.5 μ M antimycin A, and Complex IV OXPHOS (CIV OXPHOS) was assessed by adding 2 mM ascorbate and 0.5 mM TMPD. Oxygen flux was normalized to tissue mass.

Detection of phosphatidylethanolamine (PE) levels

To detect PE, HL-1 cells were stained with 0.22 mM NBD-PE (N360, Invitrogen) at 37 °C in the dark for 30 min, washed twice with PBS, and then imaged using a SIM microscope. The data were analyzed using ImageJ.

Transmission electron microscopy imaging (TEM) and 3D reconstruction using FIB-SEM

Fresh tissues were fixed in 2.5% glutaraldehyde in arsenate buffer (pH 7.4) at 4 °C for 24 h. After three 10-min washes with 0.13 M PBS, tissues were post-fixed in 1% osmium tetroxide for 2 h at 25 °C. Dehydration was performed in a graded ethanol series (65%, 70%, 75%, 80%, 95%) for 10 min each, followed by incubation in tert-butoxide for 10 min and CO₂ drying. Images were captured using a TEM.

For heart tissue analysis, approximately 1 mm blocks were fixed in 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde, then immersed in 0.2 M PBS (pH 7.4) at 25 °C for 2 h. After washing, samples were stained with reduced osmium tetroxide-thiocarbohydrazide (ROTO) and infiltrated with Epon resin. Serial 8 nm sections were obtained using focused ion beam scanning electron microscopy (FIB-SEM, Helios NanoLab G3 UC, Thermo Fisher

Scientific). FIB-SEM tomograms of mitochondria and endoplasmic reticulum were processed using AMIRA 6.2.0 software (Thermo Fisher Scientific) for stacking, alignment, and 3D modeling.

LC/MS analysis

Lipids were analyzed using LC/MS on a UHPLC system equipped with a Phenomenex Kinetex C18 column coupled to an Orbitrap Exploris 120 mass spectrometer. Fresh heart tissue samples (40 mg) were used for mitochondrial extraction and mitochondrial proteins were quantified using the BCA assay (Beyotime, P0012). Mitochondria from each sample were mixed with 190 μ L of water and 480 μ L of extraction solution. After vortexing and sonication, 250 μ L of the supernatant was mixed with a resuspension buffer. For the LC/MS analysis, 30 μ L of this supernatant was used, with an additional 5 μ L serving as a quality control sample. UHPLC separation was performed using the SCIEX ExionLC series UHPLC system, and a mass spectral analysis was conducted using the AB Sciex QTrap 6500+ mass spectrometer. Lipid species were quantified using Skyline 20.1 software.

Statistical analysis

Data are expressed as means $\pm$ SD unless otherwise specified and presented as bar charts. $N=3$ for all experiments and measurements within each biological replicate unless otherwise specified. A statistical significance between two groups was determined using either the Student's *t*-test or Mann–Whitney U test as appropriate. Differences among multiple groups were assessed using one-way ANOVA followed by *post hoc* Newman–Keuls' test. A statistical significance was set at $P < 0.05$. All data were analyzed using GraphPad Prism software, version 9.0.

Reagents and sources

Detailed information on the reagents and sources used in this study is provided in Supplementary Table S5. A summary table listing all acronyms and their full names is provided in Supplementary Table S6.

DATA AVAILABILITY

The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

REFERENCES

- Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*. 2023;186:243–78.
- Mutlu AS, Duffy J, Wang MC. Lipid metabolism and lipid signals in aging and longevity. *Dev Cell*. 2021;56:1394–407.
- Papsdorf K, Brunet A. Linking Lipid Metabolism to Chromatin Regulation in Aging. *Trends Cell Biol*. 2019;29:97–116.
- Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, Jaswal JS, Stanley WC. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev*. 2010;90:207–58.
- Goldberg IJ, Trent CM, Schulze PC. Lipid metabolism and toxicity in the heart. *Cell Metab*. 2012;15:805–12.
- Domingues N, Pires J, Milosevic I, Raimundo N. Role of lipids in interorganelle communication. *Trends Cell Biol*. 2025;35:46–58.
- Csordas G, Weaver D, Hajnoczky G. Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Contactology: Structure and Signaling Functions. *Trends Cell Biol*. 2018;28:523–40.
- Barazzuol L, Giamogante F, Cali T. Mitochondria Associated Membranes (MAMs): Architecture and physiopathological role. *Cell Calcium*. 2021;94:102343.
- Cuervo AM, Macian F. Autophagy and the immune function in aging. *Curr Opin Immunol*. 2014;29:97–104.
- Hansen M, Rubinstein DC, Walker DW. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19:579–93.
- Xie Y, Li J, Kang R, Tang D. Interplay between lipid metabolism and autophagy. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:431.
- Duan C, Liu R, Kuang L, Zhang Z, Hou D, Zheng D, et al. Activated Drp1 Initiates the Formation of Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Contacts via Shrm4-Mediated Actin Bundling. *Adv Sci (Weinh)*. 2023;10:e2304885.
- Korobova F, Ramabhadran V, Higgs HN. An actin-dependent step in mitochondrial fission mediated by the ER-associated formin INF2. *Science*. 2013;339:464–7.
- Ye Y, Tyndall ER, Bui V, Bewley MC, Wang G, Hong X, et al. Multifaceted membrane interactions of human Atg3 promote LC3-phosphatidylethanolamine conjugation during autophagy. *Nat Commun*. 2023;14:5503.

15. Keckesova Z, Donaher JL, De Cock J, Freinkman E, Lingrell S, Bachovchin DA, et al. LACTB is a tumour suppressor that modulates lipid metabolism and cell state. *Nature*. 2017;543:681–6.
16. Acharya TK, Kumar A, Kumar S, Goswami C. TRPV4 interacts with MFN2 and facilitates endoplasmic reticulum-mitochondrial contact points for Ca(2+)-buffering. *Life Sci*. 2022;310:121112.
17. Song CC, Pantopoulos K, Chen GH, Zhong CC, Zhao T, Zhang DG, et al. Iron increases lipid deposition via oxidative stress-mediated mitochondrial dysfunction and the HIF1alpha-PPARgamma pathway. *Cell Mol Life Sci*. 2022;79:394.
18. Janikiewicz J, Szymanski J, Malinska D, Patalas-Krawczyk P, Michalska B, Duszynski J, et al. Mitochondria-associated membranes in aging and senescence: structure, function, and dynamics. *Cell Death Dis*. 2018;9:332.
19. Lu X, Gong Y, Hu W, Mao Y, Wang T, Sun Z, Su X, Fu G, Wang Y, Lai D. Ultrastructural and proteomic profiling of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes reveal aging signatures in striated muscle. *Cell Death & Disease*. 2022;13:296.
20. Chen YF, Kao CH, Chen YT, Wang CH, Wu CY, Tsai CY, et al. Cisd2 deficiency drives premature aging and causes mitochondria-mediated defects in mice. *Genes Dev*. 2009;23:1183–94.
21. Martino Adami PV, Nichtova Z, Weaver DB, Bartok A, Wisniewski T, Jones DR, et al. Perturbed mitochondria-ER contacts in live neurons that model the amyloid pathology of Alzheimer's disease. *J Cell Sci*. 2019;132:jcs229906.
22. Wiel C, Lallet-Daher H, Gitenay D, Gras B, Le Calve B, Augert A, et al. Endoplasmic reticulum calcium release through ITPR2 channels leads to mitochondrial calcium accumulation and senescence. *Nat Commun*. 2014;5:3792.
23. Madreiter-Sokolowski CT, Waldeck-Weiermair M, Bourguignon MP, Villeneuve N, Gottschalk B, Klec C, et al. Enhanced inter-compartmental Ca(2+) flux modulates mitochondrial metabolism and apoptotic threshold during aging. *Redox Biol*. 2019;20:458–66.
24. Ziegler DV, Vindrieux D, Goehrig D, Jaber S, Collin G, Griveau A, et al. Calcium channel ITPR2 and mitochondrial-ER contacts promote cellular senescence and aging. *Nat Commun*. 2021;12:720.
25. Dong J, Chen L, Ye F, Tang J, Liu B, Lin J, et al. Mic19 depletion impairs endoplasmic reticulum-mitochondrial contacts and mitochondrial lipid metabolism and triggers liver disease. *Nat Commun*. 2024;15:168.
26. Salvador-Gallego R, Hoyer MJ, Voeltz GK. SnapShot: Functions of Endoplasmic Reticulum Membrane Contact Sites. *Cell*. 2017;171:1224–e1.
27. Hernandez-Alvarez MI, Sebastian D, Vives S, Ivanova S, Bartoccioni P, Kakimoto P, et al. Deficient Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Phosphatidylserine Transfer Causes Liver Disease. *Cell*. 2019;177:881–95.e17.
28. van der Veen JN, Kennelly JP, Wan S, Vance JE, Vance DE, Jacobs RL. The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2017;1859:1558–72.
29. Calzada E, Onguka O, Claypool SM. Phosphatidylethanolamine Metabolism in Health and Disease. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2016;321:29–88.
30. Qiu B, Zandkarimi F, Bezjian CT, Reznik E, Soni RK, Gu W, et al. Phospholipids with two polyunsaturated fatty acyl tails promote ferroptosis. *Cell*. 2024;187:1177–90.e18.
31. Zhao T, Goedhart CM, Sam PN, Sabouny R, Lingrell S, Cornish AJ, et al. PISD is a mitochondrial disease gene causing skeletal dysplasia, cataracts, and white matter changes. *Life Sci Alliance*. 2019;2:e201900353.
32. Liu N, Huang L, Xu H, He X, Cao J, et al. Phosphatidylserine decarboxylase downregulation in uric acid-induced hepatic mitochondrial dysfunction and apoptosis. *MedComm* (2020). 2023;4:e336.
33. Xu J, Chen S, Wang W, Man Lam S, Xu Y, Zhang S, et al. Hepatic CDP-diacylglycerol synthase 2 deficiency causes mitochondrial dysfunction and promotes rapid progression of NASH and fibrosis. *Sci Bull (Beijing)*. 2022;67:299–314.
34. Luo Y, Zhang Y, Pang S, Min J, Wang T, Wu D, et al. PCBP1 protects bladder cancer cells from mitochondria injury and ferroptosis by inducing LACTB mRNA degradation. *Mol Carcinog*. 2023;62:907–19.
35. Chen YC, Humphries B, Brien R, Gibbons AE, Chen YT, Qyli T, et al. Functional Isolation of Tumor-Initiating Cells using Microfluidic-Based Migration Identifies Phosphatidylserine Decarboxylase as a Key Regulator. *Sci Rep*. 2018;8:244.
36. Zhao H, Wang T. PE homeostasis rebalanced through mitochondria-ER lipid exchange prevents retinal degeneration in Drosophila. *PLoS Genet*. 2020;16:e1009070.
37. Rockenfeller P, Koska M, Pietrocola F, Minois N, Knittelfelder O, Sica V, et al. Phosphatidylethanolamine positively regulates autophagy and longevity. *Cell Death Differ*. 2015;22:499–508.
38. Nanayakkara R, Gurung R, Rodgers SJ, Eramo MJ, Ramm G, Mitchell CA, et al. Autophagic lysosome reformation in health and disease. *Autophagy*. 2023;19:1378–95.
39. Xie S, Xu SC, Deng W, Tang Q. Metabolic landscape in cardiac aging: insights into molecular biology and therapeutic implications. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;8:114.
40. Miyamoto S. Autophagy and cardiac aging. *Cell Death Differ*. 2019;26:653–64.
41. Li X, Ren Z, Huang X, Yu T. LACTB, a Metabolic Therapeutic Target in Clinical Cancer Application. *Cells*. 2022;11:2749.
42. Hong W, Zeng X, Wang H, Tan X, Tian Y, Hu H, et al. PGC-1alpha loss promotes mitochondrial protein lactylation in acetaminophen-induced liver injury via the LDHB-lactate axis. *Pharmacol Res*. 2024;205:107228.
43. Tsugawa H, Ishihara T, Ogasa K, Iwanami S, Hori A, Takahashi M, et al. A lipidome landscape of aging in mice. *Nat Aging*. 2024;4:709–26.
44. Victorelli S, Salmonowicz H, Chapman J, Martini H, Vizioli MG, Riley JS, et al. Apoptotic stress causes mtDNA release during senescence and drives the SASP. *Nature*. 2023;622:627–36.
45. Hong W, Peng X, Zhou X, Li P, Ye Z, Liang W. FXR/ASS1 axis attenuates the TAA-induced liver injury through arginine metabolism. *Biochem Biophys Res Commun*. 2022;611:31–7.

ACKNOWLEDGEMENTS

The Multi-SIM work was supported by Nano Insights (<https://www.naxi-tech.com>). SIM&ODT analyses were supported by CSR-Biotech (<https://www.csr-biotech.com>). J.C. acknowledges IP national support, through UID/04923 - Comprehensive Health Research Centre.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

D.C.Y. and H.W.L. wrote the manuscript. H.W.L. was responsible for most of the cellular experiments. Z.X. and T.Y. were responsible for searching, sorting, and summarizing the references. M.H.M. and J.D.P. were responsible for plasmid construction, R.X.P. assisted with the animal experiments. S.R. assisted with the cellular experiments. D.C.Y., M.R.Y. and L.Z.C. were responsible for the funding of this study. H.H., G.S. and M.D.Q. were responsible for the manuscript editing. M.A, S.K.B and J.C wrote the manuscript and provided the English editing. All authors (regardless of their names) have read, edited, collaborated and approved the final version of the manuscript.

FUNDING

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 82272252, 82270378, and 82372192), Chongqing Talents Program under grant number (cstc2022ycjh-bgzxm0007) and Chongqing Natural Science Foundation General Project (No.CSTB2023NSCQ-MSX0192).

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

ETHICS APPROVAL

All methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations. All animal experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Second Affiliated Hospital of the Chongqing Medical University.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41418-025-01511-w>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Gautam Sethi, He Huang or Chenyang Duan.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

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

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.