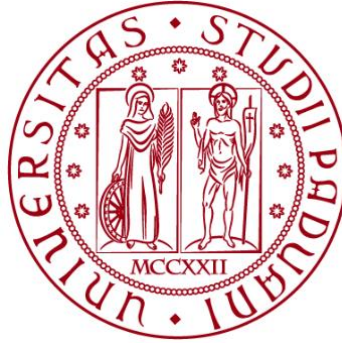


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**CONTATTI TRA MELANOSOMI E MITOCONDRI:
IL RUOLO DI Mfn2 e OA1**

**Tutor: Dott.ssa Marta Giacomello
Dipartimento di Biologia**

Co-tutor: Dott.ssa Paula Rebelo

Laureanda: Ajla Sehovic

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

1. ABSTRACT

2. INTRODUZIONE

2.1 I MITOCONDRI

2.2 I MELANOSOMI

2.3 MITOFUSINA 2 (Mfn2)

2.4 OCULAR ALBINISM TYPE 2 (OA1)

3. METODI E RISULTATI

4. DISCUSSIONE

5. CONCLUSIONE

6. STAGE

7. BIBLIOGRAFIA

1. ABSTRACT

I contatti tra mitocondri ed altri organelli svolgono molteplici funzioni, modulate da varie proteine o complessi proteici. Tra queste la GTPasi mitofusina2 (Mfn2), che si trova localizzata nella membrana mitocondriale esterna, nella membrana del Reticolo endoplasmatico e dei melanosomi.

I melanosomi sono il sito di sintesi, immagazzinamento e trasporto della melanina in cellule specializzate note come melanociti. L'origine e la maturazione di questi organelli sono gradualmente: avvengono tramite la formazione di vescicole a diversi stadi di maturazione (dallo stadio I al IV), caratterizzate da un contenuto crescente di melanina e diversa localizzazione subcellulare.

Obiettivo di questo articolo era studiare l'interazione tra mitocondri e melanosomi in vari stadi di maturazione. A tale scopo, sono stati impiegati melanociti *wildtype* e mutanti del gene *OA1*: gli esperimenti effettuati hanno evidenziato come questi ultimi siano caratterizzati da pochi melanosomi, di grandi dimensioni e con ridotta motilità.

Inoltre, i risultati supportano l'ipotesi che tra mitocondri e melanosomi esista una connessione fisica e funzionale, regolate sia da Mfn2 che da OA1.

2. INTRODUZIONE

L'articolo sui cui si basa la tesi è stato scritto da Daniele et al., 2014, intitolato "*Mitochondria and Melanosomes Establish Physical Contacts Modulated by Mfn2 and Involved in Organelle Biogenesis*".

L'obiettivo principale della tesi era quello di verificare se i complessi proteici, contenenti Mfn2 e OA1, modulino la frequenza dei contatti tra melanosomi e mitocondri.

La coltura cellulare impiegata, nel corso dei diversi esperimenti, era quella dei melanociti murini *wildtype* e quelli per cui il del gene OA1 era stato deletato (Oa1-KO) e successivamente, mediante vettore plasmidico contenente OA1 umano, reintrodotta (Oa1-KO+hOA1); il *knockout* di un gene è l'approccio usato nel momento in cui si vuole studiare la funzione di un gene e il suo ruolo nell'organizzazione della disposizione dei compartimenti cellulari, come analizzato nella tesi.

In primo luogo si era riscontrato che i contatti tra i due organelli considerati erano meditati da ponti fibrillari (elettron-densi in tomografia elettronica), in cui i melanosmi OA1 positivi, rispetto a quelli negativi, sembravano avere una maggiore probabilità di interazione con i mitocondri. Le evidenze sperimentali discusse di seguito indicavano che OA1 era in grado di ripristinare il fenotipo *wildtype*, quando overespresso nelle cellule Oa1-KO.

Inoltre, effettuando una "*down-regolazione*" della proteina Mfn2 (localizzata sulle membrane di questi organelli) tramite due siRNA indipendenti, mediante immunogold si era verificato che sia il segnale che le frequenze delle giustapposizioni diminuivano abbondantemente.

In secondo luogo gli autori avevano quantificato la distribuzione dei melanosomi nel citoplasma; i risultati della CLEM suggerivano che i melanosomi precoci si concentravano maggiormente nella regione del peri-Golgi, luogo in cui aumenta la probabilità di interazione con i mitocondri, suggerendo così che il processo di melanogenesi iniziava nella regione perinucleare della cellula.

Infine i ricercatori avevano osservato che la biogenesi del melanosoma, da parte di OA1, richiedeva sia la proteina Mfn2 che ATP mitocondriale.

Per cui, per vedere se effettivamente Mfn2 fosse necessaria, essa era stata silenziata tramite *RNA interference* in melanociti Oa1-KO. Il risultato era che il numero di cellule che mostravano il tipico accumulo di melanosomi indotto da OA1, diminuiva abbondantemente; ciò suggeriva che la proteina era fondamentale per la corretta maturazione.

Successivamente, per constatare se il bisogno di ATP fosse rilevante per il processo di melanogenesi, i melanociti venivano trattati con oligomicina; si era riscontrato che il segnale di immunofluorescenza di OA1 aumentava abbondantemente nelle

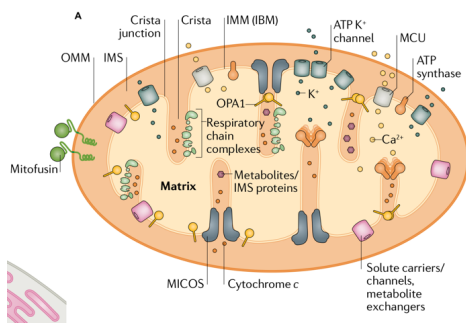
cellule trattate rispetto a quelle non e che gli organelli a grappolo, formatisi in seguito ad una maggiore interazione dei melanosomi immaturi, incrementavano di numero. Pertanto la presenza di ATP era fondamentale per la corretta melanogenesi.

La tesi è suddivisa in quattro capitoli in cui, dapprima vengono argomentate brevemente alcune caratteristiche fondamentali dei due organelli in esame, seguiti dalle proteine Mfn2 e Oa1; successivamente vengono trattate le metodologie impiegate nel corso dei vari esperimenti per dimostrare l'ipotesi iniziale, proseguendo poi con la discussione dei dati e la relativa conclusione. Infine la tesi contiene un capitolo dedicato all'illustrazione di immagini dei quattro stadi di maturazione del melanosoma, acquisiti tramite microscopia elettronica durante il periodo di stage. In appendice l'articolo analizzato per la stesura della tesi.

2.1 **MITOCONDRI**

I mitocondri (Fig. 1) sono organelli fondamentali per le cellule dei mammiferi, in quanto svolgono importanti funzioni metaboliche e omeostatiche: tra queste, la fosforilazione ossidativa (OXPHOS), che porta alla produzione di ATP, l'ossidazione del piruvato e il ciclo dell'acido citrico (Giacomello et al., 2020). Essi sono delimitati da una doppia membrana, una interna (IMM, Inner Mitochondrial Membrane) dove avvengono molteplici reazioni biochimiche (ciclo di Krebs¹, replicazione del DNA mitocondriale e biosintesi di proteine) e l'altra esterna (OMM, Outer Mitochondrial Membrane), ricca di proteine che stabiliscono interazioni con altri organelli in zone note come "siti di contatto" (Giacomello et al., 2020): quelli tra mitocondri e RE (MERCs, mitochondria-ER contacts) sono il tipo di interazione fisica tra organelli più studiato, infatti sono stati i primi ad essere identificati (Rusinol et al., 1994). Da un punto di vista funzionale i MERCs partecipando alla sintesi dei fosfolipidi (Vance, 2014) e mediano il trasferimento di Ca²⁺ dal RE ai mitocondri (Csordas et al., 2010; Giacomello et al., 2010), processo fondamentale per la cellula in quanto sostiene la produzione di ATP e, in generale, la bioenergetica cellulare (Cardenas et al., 2010). Inoltre i MERCs contribuiscono anche alla fissione mitocondriale (Friedman et al., 2011) e all'autofagia (Hamasaki et al., 2013) oltre che essere fondamentali per la sopravvivenza cellulare, dato che controllano la risposta allo stress del reticolo endoplasmatico e l'apoptosi (Giacomello et al., 2020).

¹ Una serie di reazioni chimiche catalizzate da enzimi che, per ossidazione della porzione acetilica dell'acetilcoenzima A, generano equivalenti riducenti: NADH e FADH₂ (Giacomello et al., 2020).



□ **Figura 1:** Giacomello et al., 2020. Struttura di un mitocondrio. L'IMM comprende due sottocompartimenti: 1. l'IBM (Inner Boundary Membrane) contenente trasportatori per il passaggio di ioni, ATP/ADP e piccoli metaboliti; 2. le creste mitocondriali (invaginazioni della membrana) in cui sono localizzati i complessi della catena respiratoria e l'ATP sintasi necessari per compiere la fosforilazione ossidativa. Le creste mitocondriali sono collegate all'IBM tramite giunzioni strette che impediscono il rilascio del contenuto delle creste nell'IMS (tra questi MICOS, Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System). La membrana mitocondriale esterna, contrariamente a quella interna, contiene dei canali che permettono a molecole di dimensione inferiore a 5000 Da di diffondere da un lato all'altro della membrana.

A partire dalle prime ricerche effettuate sui mitocondri, gli scienziati hanno riscontrato che questi organelli possono assumere forme diverse, variando sia morfologia (lunghezza e larghezza) che l'organizzazione delle membrane mitocondriali, durante i vari step del ciclo cellulare oppure in seguito a particolari segnali cellulari e metabolici. In effetti si trovano come organelli isolati o uniti per creare una rete più estesa oppure disposti in maniera non uniforme nel citoplasma per soddisfare particolari richieste energetiche delle cellule. Questa natura mutevole e adattabile dei mitocondri è nota con il termine "dinamiche mitocondriale" (Giacomello et al., 2020).

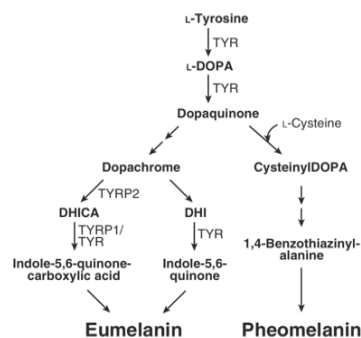
I mitocondri sono organelli peculiari perché contengono un genoma proprio, probabilmente un residuo del loro progenitore endosimbiotico eubatterico: il DNA mitocondriale (mtDNA) (Martin, 2017). Il mtDNA multicopia è ereditato maternamente negli esseri umani e nella maggior parte delle specie animali. A causa della sua replicazione continua, indipendente dal ciclo cellulare e dall'assenza di meccanismi di riparazione specifici per mtDNA, quest'ultimo è soggetto ad alti tassi di mutazione, probabilmente anche perché esposto ad elevate concentrazioni di specie ossidative reattive (ROS) generate come sottoprodotti di OXPHOS² (fosforilazione ossidativa, Oxidative phosphorylation) (DiMauro e Schon, 2008; Schon et al., 2012; Druzhyna et al., 2008).

2.2 I MELANOCITI

I melanociti si trovano localizzati nello strato basale dell'epidermide. Sono unici in quanto producono pigmenti eu-/eumelaninici (complessivamente noti come melanina) in organelli specializzati chiamati melanosomi, fondamentali *"nella protezione dagli effetti nocivi di fattori esterni (come UV-R, prodotti chimici,*

² Un processo che accoppia la respirazione mitocondriale con la produzione di ATP (Giacomello et al., 2020).

farmaci) e interni (infiammazione, iperpigmentazione postinfiammatoria, influenze ormonali)” (Costantin et al., 2007). I melanosomi maturano all’ interno del melanocita attraverso quattro stadi sequenziali, che danno origine ad organelli morfologicamente distinti (concetti illustrati in Figura 7 e approfonditi nel Capitolo 6). Nei melanociti dei mammiferi vengono sintetizzate: l’eumelanina (di colorazione nera e marrone) e feomelanina (di colorazione rossa e gialla) derivanti da un precursore comune chiamato dopachinone (Fig. 2) (Slominski et al., 2022). La biosintesi delle melanine è regolata dall’esposizione al sole e da molti fattori ormonali a livello tissutale, cellulare e subcellulare quali α -MSH (ormone melanotropo, Melanocyte Stimulating Hormone) e ACTH (ormone adrenocorticotropo, Adreno Cortico Tropic Hormone), a causa ad overespressione di tirosinasi in melanociti umani, attraverso la via di segnalazione del cAMP (Tadokoro et al., 2008).



□ **Figura 2:** Wiriyasermkul., 2020.
 Il pathway biochimico che porta alla formazione dell’eumelanina e della feomelanina. Abbreviazioni: TYR, Tirosinasi; L-DOPA, dopamina; DHI, diidrossiindolo; DHICA, diidrossiindolo carbossilico; TYRP2 e TYRP1, rispettivamente Proteina 2 e1 correlate alla tirosinasi. Il dopachinone è formato dalla trasformazione catalizzata della tirosinasi della tirosinasi in DOPA e dopachinone. Mentre la biosintesi della feomelanina richiede solo la cisteina per produrre benztiazina e unità di benztiazolo, quella della eumelanina richiede due ulteriori proteine correlate alla tirosinasi (TRP) che convertono il dopocromo in DHICA (TRP-1) e mediano l’ossidazione di DHI e DHICA (TRP-2) (Slominski et al., 2022).

2.3 MITOFUSINA 2 (Mfn2)

Mfn2 è un complesso proteico localizzato sulla membrana mitocondriale, sui melanosomi e sul reticolo endoplasmatico; uno dei suoi ruoli principali è quello di consentire la fusione mitocondriale (Fig 3). Nei mammiferi, la fusione mitocondriale è attivata dallo stress cellulare dove il glutatione disolfuro ossidato (GSSG) promuove l’assemblaggio di complessi Mfn mediante la formazione di ponti disolfuro reversibili (Shutt et al., 2012).

Il dominio N-terminale di Mfn2 è molto simile alla GTPasi dinamina, quello C-terminale è localizzato nell’IMS, non è essenziale a guidare la fusione mitocondriale, ma funge da sensore dello stato redox. Le due regioni coiled-coil denominate HR1 e HR2, che si trovano rispettivamente al centro della proteina e prossima alla regione C-terminale, formano interazioni di tipo coiled-coil intra e intermolecolari, una volta che Mfn2 oligomerizza (Koshiba et al., 2004; Huang et al., 2011; Franco et al., 2016; Qi et al., 2016; Cao et al., 2017); anche le dinamiche di HR2 dipendono dallo stato redox cellulare (Riemer et al., 2015). I residui di

cisteine conservate in posizione C684 e C700 sono responsabili della dinamica degli oligomeri proteici, in particolare sono coinvolti sia nella formazione dei legami disolfuro tra le proteine (Shutt et al., 2012) sia nella modulazione della risposta respiratoria allo stress ossidativo (Thaher et al., 2017).

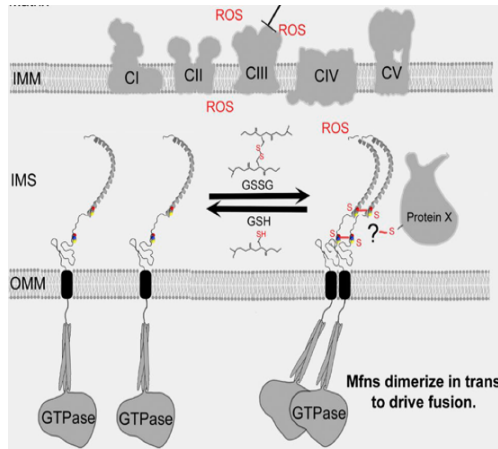


Figura 3: Mattie et al., 2018. Modello di fusione mitocondriale. I ROS prodotti all'interno o esterno del mitocondrio attivano la fusione in presenza di GSH.

In presenza di GSSG, Mfn2 forma oligomeri legati da ponti disolfuro: Mfn2 può legare un'altra Mfn2 oppure una proteina X (ancora da individuare) in IMS. I legami disolfuro possono portare a cambiamenti strutturali che promuovono altre connessioni o variazioni nell'attività GTPasica. Mfn2 può ritornare nello stato iniziale dopo un'esposizione con GSH e successivamente, dopo l'ossidazione di questo, il mitocondrio può andare incontro ad un altro processo di fusione.

2.4 OCULAR ALBINISM TYPE 1 (OA1)

Il gene OA1 codifica per una proteina che ha molte similitudini con la superfamiglia dei recettori accoppiati a proteine G ed è alla base della patologia (X-linked) nota come Albinismo Oculare di Tipo 1³ (Schiaffino et al., 1999)

La proteina presenta sette alpha eliche transmembrana ed è altamente conservata tra le specie di mammiferi, uccelli, anfibi e pesci: questa conservazione si riscontra all'interno dei domini transmembrana (TM), a livello delle cisteine nel primo e secondo loop extracellulare (e1 ed e2); alla fine del dominio TM3 si trova un motivo simile a DRY; gli aminoacidi acido aspartico, triptofano e prolina sono localizzati rispettivamente nel mezzo della sequenza di TM2, TM4 e TM5 e triptofano e cisteina nel mezzo di TM6 (Schiaffino et al. 1999). Tra queste specie anche il dominio N-terminale mostra un'elevata similitudine, mentre quello C-terminale e i primi loop citosolici ed extracellulari (i1 ed e1) mostrano invece una maggiore divergenza (Schiaffino e Tacchetti, 2005).

Le vie di segnalazione legate ad OA1 non sono ancora chiare, sebbene alcune ipotesi siano state avanzate in base al fenotipo osservato in modelli murini knockout per OA1 e in pazienti recanti mutazioni di OA1 (Schiaffino e Tacchetti, 2005). Il ligando di OA1 dovrebbe provenire dal lume del melanosoma: potrebbe essere la melanina stessa, un suo precursore o dei suoi prodotti intermedi

³ caratterizzata dalla riduzione dell'acuità visiva, ipopigmentazione retinale, ipoplasia foveale e presenza di melanosomi giganti (macromelanosomi) nei melanociti della pelle e nell'epitelio del pigmento retinale (RPE) (Schiaffino e Tacchetti, 2005).

(Schiaffino e Tacchetti., 2005); in alternativa, OA1 potrebbe essere attivato da meccanismi meno convenzionali, come ad esempio la l'aumento della dimensione degli organelli che in assenza del signaling di OA1 può condurre alla formazione dei macromelanosomi. Questa ipotesi è corroborata dal fatto che mutazioni di OA1 possono essere associate alla presenza di macromelanosomi (Giordano et al., 2009).

Si è inoltre osservato che le cellule che contengono melanosomi "giganti" mostrano una diminuzione del numero di melanosomi normali (Garner and Jay, 1980; Wong et al., 1983). Essi potrebbero derivare dalla fusione di singoli organelli. In alternativa, si può ipotizzare che i meccanismi di regolazione intracellulare che guidano la formazione, maturazione e dimensione di questi organelli siano controllati da OA1, ed alterati in caso di assenza o mutazione della proteina: in tal caso melanosomi maturi, apparentemente normali, continuerebbero a crescere in maniera eccessiva, in seguito ad una sintesi continua di melanina ed espansione della membrana degli organelli (Incerti et al., 2000). Infatti, i macromelanosomi potrebbero rappresentare solo un epifenomeno della malattia: il difetto potrebbe essere dovuto ad alterazioni in altre fasi del processo melanogenico (ad esempio, nella biogenesi stessa dei melanosomi, o nell'accumulo di melanina all'interno degli stessi) (O'Donnell et al., 1976).

3. METODOTI e RISULTATI

3.1 COLTURA CELLULARE E TRASFEZIONE

La linea cellulare dei melanociti murini è stata dapprima allestita su vetrini portaoggetti; il giorno seguente, il vettore plasmidico pR/OA1 contenente il gene wildtype umano OA1, è stato trasfettato all'interno di tali cellule mediante Fugene 6 (Roche). Erano necessarie 48 ore per far avvenire correttamente il fissaggio, in modo da consentire il completo ripristino del fenotipo Oa1-KO (nella dimensione e distribuzione degli organelli).

Le cellule erano poi state trattate con 200 ng/ml di oligomicina per 24 ore, per inibire l'attività dell'ATP sintasi (Daniele et al., 2014).

3.2 KNOCKDOWN DEL GENE OA1

Per studiare il ruolo dei contatti melanosoma-mitocondrio nella melanogenesi in condizioni fisiologiche e patologiche, gli autori avevano utilizzato melanociti *wildtype* e *knock-out* per OA1 (Oa1-KO). In particolare, sono stati analizzati i

melanociti Oa1-KO transfettati in modo transiente con un vettore di espressione per OA1 umano, 48 ore dopo la transfezione (Oa1-KO hOA1) (Daniele et al., 2014).

3.3 TRATTAMENTO CON OLIGOMICINA

Dopo che il plasmide per il gene umano OA1 è stato transfettato nei melanociti Oa1-KO, alcuni di essi venivano trattati con oligomicina; il fissaggio delle cellule avveniva dopo altre 24 ore. Seguiva la marcatura con anticorpi contro OA1 umano e con GM130, un marker dell'apparato di Golgi, usato per identificare l'area del periGolgi (raggio di 10 μm), mostrato in Figura 4 (vedi anche Fig. 11) (Daniele et al., 2014).

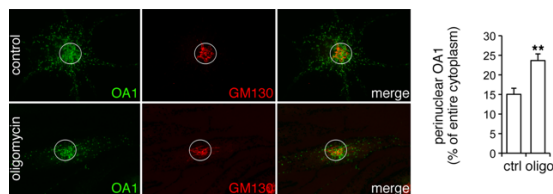


Figura 4: Daniele et al., 2014. Il grafico è stato ottenuto considerando 12 cellule in due esperimenti diversi (trattati con oligomicina e di controllo rispettivamente). I dati sono espressi come il rapporto tra il segnale OA1 nell'area del peri-Golgi e nell'intera cellula. Scalebar: 15 μm .

3.4 IMMUNOFLUORESCENZA (IF)

L'IF è una tecnica usata per rilevare antigeni mediante emissione di fluorescenza. È stata effettuata un'analisi di immunofluorescenza per verificare la relazione spaziale tra melanosomi e mitocondri in melanociti di topo wildtype (Fig. 5); la distribuzione dei mitocondri veniva comparata con quella dei seguenti marcatori dei melanosomi: Pmel17 per i melanosomi immaturi; l'enzima tirosinasi per quelli maturi; OA1 per i melanosomi ed endosomi tardivi/ lisosomi (Schiaffino et al., 1996; Piccirillo et al., 2006; Giordano., 2009). Non si era riscontrata alcuna sovrapposizione tra i due compartimenti, ma i mitocondri si localizzavano adiacenti ai melanosomi e talvolta sembravano circondare questi ultimi, suggerendo quindi la presenza di connessioni strutturali e/o funzionali. Per cui, gli autori dell'articolo avevano sottoposto i melanociti *wildtype* ad un'analisi ultrastrutturale mediante CLEM (Correlative Light-Electron Microscopy) (Polishchuck et al., 2000). Le cellule cresciute sui vetrini coprioggetto venivano fissate chimicamente con 4% di formaldeide e le membrane rese permeabili in seguito al trattamento con la *blocking solution*, composta da PBS a cui è stato aggiunto 0.1% di saponina, 0.5% di BSA e 50mM NH₄Cl. Successivamente i melanociti venivano incubati con l'anticorpo primario, poi con quello secondario coniugato con un fluoroforo (Daniele et al., 2014).

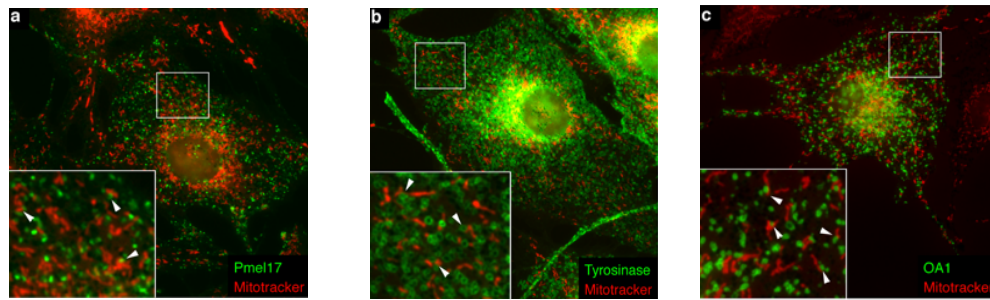


Figura 5: Daniele et al., 2014. I melanociti erano stati marcati con il Mitotracker (in rosso) per visualizzare i mitocondri, fissati e messi a contatto con anticorpi-Pmel17 (a) o tirosinasi (b) per poi essere visualizzati in IF. In alternativa le cellule erano state trasfettate con un vettore plasmidico umano contenente OA1, poi fissate e trattate con l'anticorpo umano OA1 (c).

Sebbene i marcatori dei due organelli non si sovrapponevano, i pannelli in basso a sinistra di ciascuna foto mostravano che i melanosomi erano adiacenti e talvolta apparivano abbracciati dai mitocondri (freccie). Scalebar: 15 µm; pannelli: 5 µm.

3.5 CLEM E ANALISI ULTRAISTRUTTURALE

Mediante CLEM (Correlative Light-Electronic Microscopy), i compartimenti ultrastrutturali di una cellula potevano, dapprima essere identificati mediante microscopia ottica (LM, light microscope), e di seguito analizzati con alta risoluzione in microscopia elettronica (EM, electron microscope). Dopo aver preparato i campioni, alcune sezioni di 100 nm sono state raccolte su delle griglie ricoperte da una pellicola di supporto di formvar-carbone ed esaminati a 80 kV mediante microscopia elettronica a filtraggio di energia (LEO 912), dotato di una fotocamera Proscan 2048 HSC 14BIT e un software di analisi delle immagini (Fig.6) (Daniele et al., 2014).

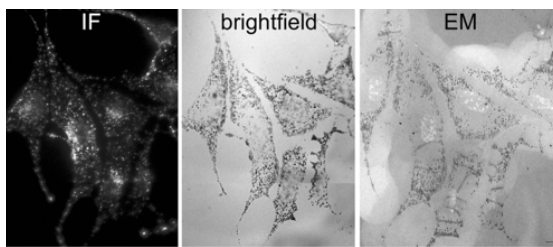
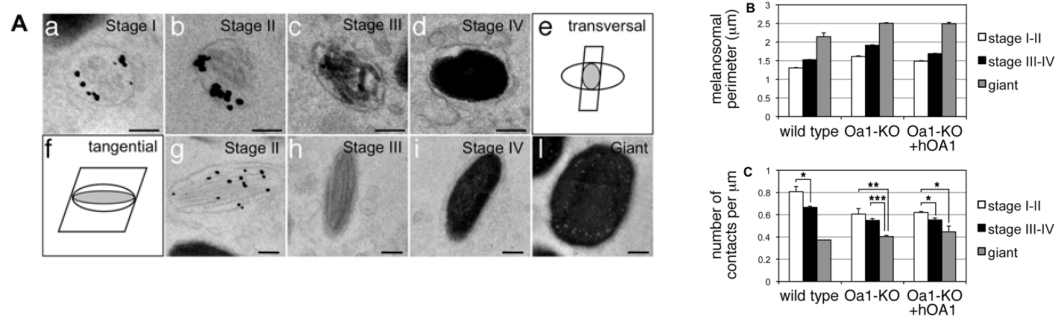


Figura 6: Daniele et al., 2014.

Dopo il fissaggio, i melanosomi sono stati sottoposti a IF e EM.

L'immagine di brightfield, ottenuta grazie LM, è stata allineata con diverse sezioni di immagini in EM per identificare le stesse cellule. Scale bar: 10 µm.

Al fine di visualizzare i quattro stadi progressivi di maturazione dei melanosomi, i ricercatori avevano marcato le cellule con Pmel17 e OA1 (coniugati a particelle d'oro) e acquisito le immagini con microscopia elettronica (Daniele et al., 2014 (Fig. 7).



□ **Figura 7:** Daniele et al., 2014.

A. Rappresentazione di tutte le fasi di maturazione dei melanosomi (marcatura con Pmel17 coniugato a particelle dorate). Gli organelli dallo stadio II a IV sono mostrati sezionati trasversalmente (con il piano di sezione ortogonale all'asse più lungo dell'organello, **b-d**) e tangenzialmente (con il piano di sezione parallelo all'asse più lungo, **g-i**); gli schemi **e** ed **f** illustrano rispettivamente l'orientamento delle sezioni. Lo stadio I (**a**) non possiede l'asse maggiore, mentre i macromelanosomi (**l**) hanno una forma irregolare. Scalebar: 100 nm.

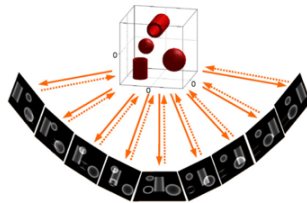
B-C. I grafici suggerivano l'esistenza di una correlazione inversa tra dimensione dei melanosomi e le frequenze dei contatti, cioè che il numero di contatti diminuisce progressivamente con la maturazione e allargamento degli organelli. **B.** Viene rappresentato il perimetro melanosomico medio (ottenuto tramite EM) dei melanosomi di stadio I-II, III-IV e "gigante" nelle cellule *wildtype*, Oa1-KO e Oa1-KO+hOA1. **C.** Viene rappresentato il numero medio di contatti per unità di perimetro, calcolato sui melanosomi a contatto con i mitocondri ordinati per categoria di stadio in ciascun tipo di cellula.

Venivano quindi classificati come melanosomi di stadio I, quei compartimenti che presentavano un lume traslucido e un numero variabile di vescicole interne, positive per Pmel17 (per *wildtype* e Oa1-KO) o per OA1 (per Oa1-KO+hOA1) (almeno tre particelle d'oro); Pmel17 e OA1 si colocalizzavano soprattutto negli stadi immaturi, ciò osservabile sia in analisi di immunofluorescenza che immunogold (Piccirillo et al., 2006; Giordano et al., 2009). Questi melanosmi si differenziavano dagli endosomi e lisosomi più maturi (in cui OA1 è presente), in base alla loro dimensione e morfologia. Allo stadio II venivano associati i melanosmi immaturi che mostravano al loro interno fibrille allungate, mentre organelli simili, in cui le striature longitudinali erano più spesse a causa della deposizione iniziale di melanina, sono stati attribuiti allo stadio III. Gli organelli maturi con un denso contenuto di melanina sono stati classificati allo stadio IV. I melanosomi completamente pigmentati, aventi lunghezza e larghezza superiori a 400 nm o con una dimensione maggiore di 1 μm sono stati assegnati alla categoria macromelanosomi (Daniele et al., 2014).

3.6 TOMOGRAFIA ELETTRONICA E RICOSTRUZIONE 3D

A differenza del TEM, che produce immagini bidimensionali, con la tomografia elettronica la terza dimensione veniva recuperata. L'idea centrale era quella di

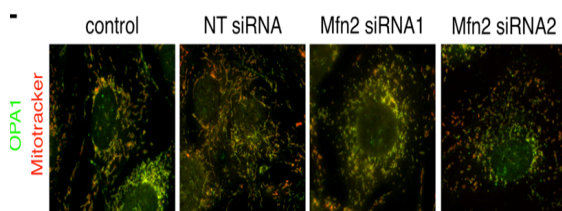
raccogliere una serie di immagini 2D da diverse angolazioni, inclinando gradualmente il portacampione attorno ad un asse perpendicolare al fascio di elettroni, e successivamente combinarle per produrre un' immagine tridimensionale del campione (Barcena and Koster., 2009), come mostrato nella Figura 8 (vedi anche Fig 11).



□ **Figura 8:** Bárcena and Koster., 2009.
Rappresentazione della ricostruzione tridimensionale di un campione sottoposto a tomografia elettronica.

3.7 RNA INTERFERENCE

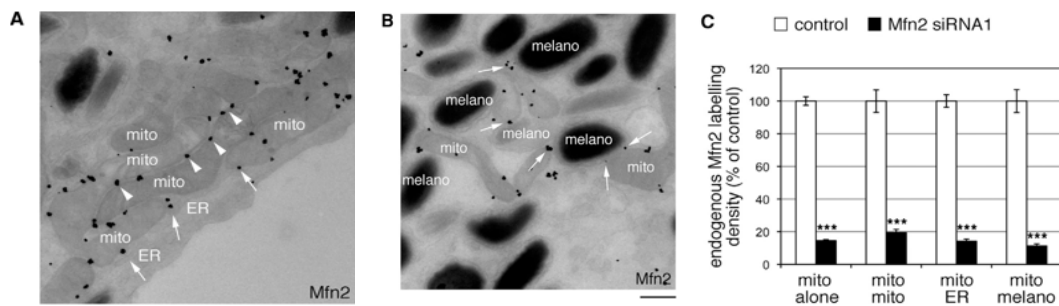
I siRNA (small interfering RNA) erano stati disegnati usando due tool indipendenti (1000 nM di siRNA sono stati trasfettati nelle cellule usando Lipofectamine 2000, Invitrogen); Mfn2 siRNA1 (5'-AGGUAUGUGAACUAGGGUA-3') era complementare per la regione UTR di Mfn2 di topo, mentre Mfn2 siRNA2 (5'-ACACAUGGCUGAAGUGAAU-3') per la regione codificante (Daniele et al., 2014) (Fig. 9).



□ **Figura 9:** Daniele et al., 2014. Immagine di IF in cui i melanociti sono stati trasfettati con siRNA, trattati con Mitotracker (in rosso per mitocondri polarizzati), fissati e colorati per IF con un anticorpo contro OPA1 (in verde per visualizzare la rete mitocondriale complessiva).

3.8 IMMUNOGOLD

Il TEM, in combinazione con l'impiego di oro colloidale coniugato alla proteina A o ad anticorpi secondari e analisi statistiche, consentiva di localizzare molecole d'interesse (per esempio antigeni proteici) all'interno di diversi compartimenti cellulari o tissutali (Mayhew, 2011); come si può osservare dalle immagini, questa metodica viene spesso utilizzata con tecnologie più avanzate come TEM (Fig. 10).



□ **Figura 10:** Daniele et al., 2014.

A-B. Melanociti wildtype sono stati fissati e marcati per EM con un anticorpo specifico per Mfn2 (particelle d'oro). **A.** Mfn2 risulta localizzata in modo specifico nei mitocondri (mito) e nell'ER, in particolare tra i siti di contatto mitocondrio-mitocondrio (punte delle frecce) ed ER-mitocondrio (frecce). **B.** Particelle d'oro sono presenti anche nelle aree in cui i melanosomi (melano) si trovano vicino/a contatto con i mitocondri (frecce). Scalebar: 350 nm.

C. I melanociti sono stati marcati con un anticorpo anti-Mfn2 ed analizzati tramite CLEM. Il grafico mette a confronto melanociti di controllo con melanociti avente il gene che codifica per Mfn2 silenziato; si può osservare la quantificazione della densità di marcatura di Mfn2 sui mitocondri (mito alone), sui siti di contatto tra mitocondrio e mitocondrio (mito-mito), tra mitocondrio e ER (mito-ER) e mitocondrio e melanosomi (mito-melano).

3.9 WESTERN IMMUNOBLOTTING

La tecnica del Western Blotting viene impiegata nel momento in cui si vogliono rilevare specifiche proteine (Mfn2 in questo caso) a partire da un lisato cellulare (Fig 13A). Le cellule prima sono state trattate con tripsina e successivamente lavate una volta con PBS e lisate con il RIPA buffer. Dopo aver incubato le provette contenente le cellule per mezz'ora in ghiaccio, il surnatante è stato centrifugato a 13'000 rpm per 20 minuti a 4°C per rimuovere i nuclei e le membrane. Il contenuto proteico è stato determinato con il metodo BCA (acido bicinconinico). Prima di procedere con l'Immunoblotting, i campioni sono stati caricati su gel di poliaccrilammide in presenza di sodio dodecil solfato (detergente denaturante) per effettuare una SDS-PAGE (SDS polyacrylamide gel electrophoresis), la quale permette di separare le proteine estratte per differenza tra pesi molecolari (le proteine a bassi pesi molecolari si troveranno in fondo al gel); esse poi venivano trasferite dal gel ad una membrana di nitrocellulosa (mantenendo la disposizione del gel) sfruttando la corrente elettrica. La membrana, contenente le proteine, doveva subire un processo di "Blocking" in modo tale da prevenire i legami aspecifici dopo trattamento con anticorpi; per cui veniva poi incubata prima con un tampone di bloccaggio formato da latte 5% (p/V) in TBS contenente 0.1% (V/V) di Tween 20 (detergente) a pH 7.5 per un'ora a temperatura ambiente e in seguito con anticorpi primari per due ore a temperatura ambiente (oppure a 4°C

overnight). Il passaggio seguente prevedeva di lavare la membrana tre volte per 10 min con TBS contenente 0.1% (V/V) di Tween 20 (T-TBS) per rimuovere l'eccesso di anticorpi primari. All'anticorpo primario si sarebbe legato a quello secondario coniugato con la perossidasi di rafano (HRP); seguono poi tre lavaggi con T-TBS e uno con TBS per rimuovere l'eccesso. Il Western Blot è stato determinato mediante chemiluminescenza e le bande sono state quantificate mediante analisi densitometrica; l'intensità del segnale ottenuto viene normalizzato rispetto al segnale di controllo mediante tubulina (Daniele et al., 2014).

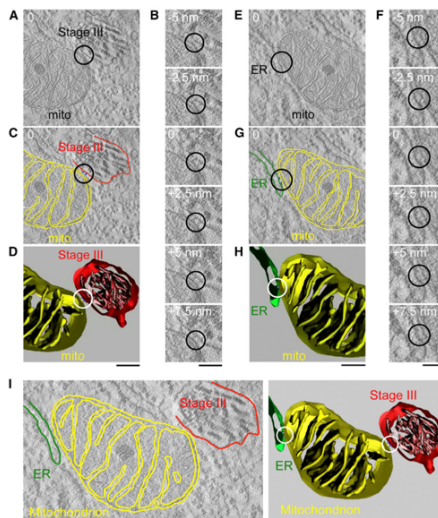
4. DISCUSSIONE

Obiettivo principale di questo lavoro era studiare l'interazione tra mitocondri e melanosomi in vari stadi di maturazione.

In primo luogo, gli studiosi avevano usato della tecnica CLEM per identificare i cinque stadi di maturazione dei melanosomi: dall'analisi si poteva constatare che l'11.40% dei melanosomi localizzati sull'intera area cellulare si trovava entro 100 nm (*vicinity*) dai mitocondri e che il 6.77% contattava i mitocondri tramite giustapposizione delle membrane che coinvolgono il $14\% \pm 0.8\%$ del perimetro del melanosoma (*contacts*). Quindi, si stimava che l'1% del perimetro dei melanosomi totali nelle cellule era coinvolto nell'interazione con i mitocondri, una percentuale alquanto rilevante considerando che il 2.25% delle membrane mitocondriali contattava quelle del RE (Cosson et al., 2012).

Inoltre, dall'analisi CLEM si evinceva che il numero dei contatti tra mitocondri e melanosomi era maggiore nella zona perinucleare in cui il processo di melanogenesi avveniva molto frequentemente, questo soprattutto quando il legame si instaurava con particolari categorie di melanosomi: veniva coinvolto il 17% delle membrane dei melanosomi precoci e fino al 28% dei melanosomi a "grappolo". Per caratterizzare la struttura dei contatti tra mitocondri e melanosomi è stata prima utilizzata una tecnica nota come tomografia elettronica e successivamente una ricostruzione tridimensionale (Daniele et al., 2014) (Fig. 11). Contrariamente a quanto ipotizzato, gli autori avevano visto che i contatti tra i due organelli avvenivano attraverso ponti fibrillari elettronici densi che connettevano le membrane dei due organelli, visibili in poche sezioni ottiche. Infatti, questi ponti proteici apparivano in gruppi di due o tre, distanziati di circa 20 nm; erano caratterizzati da uno spessore di 10-15 nm ed una lunghezza di 20-30 nm. Considerando lo spessore delle singole sezioni di microscopia elettronica

(50-100 nm) è probabile che la frequenza dei contatti misurata sia sottostimata (Csordàs et al., 2006; Boncompagni et al., 2009) (Figura 11).



□ **Figura 11:** Daniele et al., 2014

A-I) Melanociti wt sono analizzati in tomografia per mostrare il contatto tra mitocondrio melanosoma al terzo stadio e tra il RE.

In **A** ed **E** sono mostrate le sezioni ottenute, in **B** e **F** sono mostrati, a distanza sempre meno ravvicinata, i contatti tra gli organelli sul piano considerato.

In **C** e **G** vengono cerchiati i contatti di una sezione e di blu i ponti fibrillari

In **D**, **H** ed **I** viene illustrata la ricostruzione 3D della tecnica CLEM; in giallo i mitocondri, in rosso il melanosoma e in verde il RE.

Scale bar in **A**, **C**, **E** ed **G**: 150 nm, in **B** e **F**: 75 nm.

Questi esperimenti avevano evidenziato che sia nelle cellule *wildtype* che in quelle Oa1-KO i melanociti del primo e secondo stadio erano poco rappresentati (circa 10% del totale); la maggior parte degli organelli apparteneva al terzo/quarto stadio e, in Oa1-KO, a macromelanosomi. Questi ultimi rappresentavano circa il 30% del totale dei melanosomi nelle cellule Oa1-KO (con una conseguente diminuzione degli organelli regolarti del III e IV stadio), mentre nelle cellule *wildtype* erano quasi assenti. Il ripristino dell'espressione di OA1 (in melanociti Oa1-KO hOA1) aveva indotto un fenotipo simile al *wildtype*, indicando che l'assenza di OA1 causava alterazioni sia nella distribuzione degli organelli subcellulari che nella maturazione e dimensioni dei melanosomi (Daniele et al., 2014).

Per quanto riguarda la contiguità tra melanosomi e mitocondri nelle cellule Oa1-KO rispetto alle *wildtype*, essa era significativamente ridotta, rispettivamente del 28% per *vicinity* e 37% per *contact*; al contrario i macromelanosomi erano caratterizzati da una maggiore frequenza di contatto con i mitocondri (Daniele et al., 2014).

Per verificare se Oa1 fosse necessario per stabilire connessioni inter-organelli, è stata utilizzata la tecnica immunogold. Nei melanociti Oa1-KO hOA1, Oa1 risulta presente in tutte le fasi di maturazione melanosomiale, con particolare arricchimento nei melanosomi immaturi (Piccirillo et al., 2014; Giordano et al., 2009) (Fig. 12). Successivamente è stata analizzata la frequenza dei contatti in ciascuna sottopopolazione di melanociti: i melanosomi OA1 positivi sembrano avere una maggiore probabilità di interazione con i mitocondri. L'interazione tra mitocondri e melanosomi è stata caratterizzata anche dal punto di vista strutturale: la maggior parte dei contatti misurava 100-300 nm (corrispondente

circa al 10-20% del perimetro del melanosoma); una frazione di essi mostrava un'estensione più lunga, fino oltre a 400 nm, particolarmente frequenti (20% del totale) in melanociti Oa1-KO hOA1 a differenza di cellule wildtype e OA1-KO, dove erano particolarmente rari (Fig. 12B).

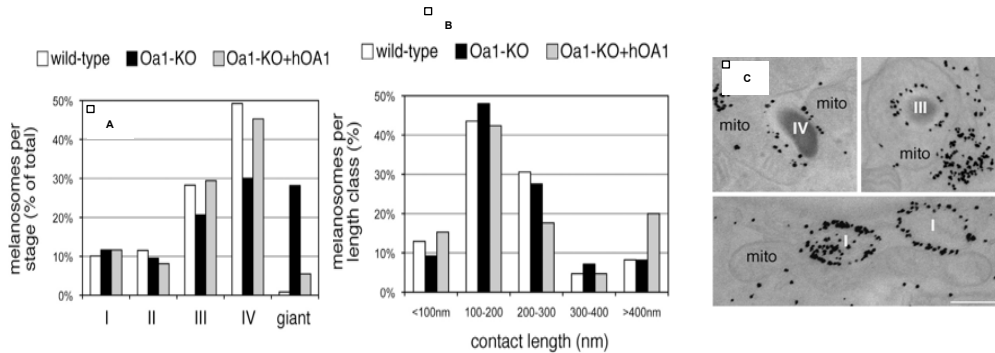


Figura 12: Daniele et al., 2014.

A. Quantificazione dei melanosomi nei vari stadi di maturazione (immagini EM). I dati sono espressi come percentuale dei melanosomi totali in ciascuna linea cellulare. I–IV, stadi dei melanosomi; *giant*, melanosomi giganti.

B. Quantificazione della lunghezza dei contatti melanosoma-mitocondrio in ciascuna linea cellulare. I dati sono raggruppati in cinque classi di lunghezza (nm) ed espressi come percentuale del totale dei contatti analizzati in ciascuna linea cellulare.

C. L'immagine rappresenta i contatti tra mitocondri (mito) e melanosomi (da stadio I a IV) in melanociti Oa1-KO+hOA1. Scalebar: 0.5 μ m. Le particelle d'oro rappresentano la marcatura con OA1.

Complessivamente i risultati ottenuti indicavano che OA1 era in grado di ripristinare il fenotipo *wildtype*, se overespresso, in cellule Oa1-KO, nonché di aumentare la frequenza e la lunghezza delle giustapposizioni tra melanosomi e mitocondri. Questi risultati suggerivano un contributo sia di OA1 che dei contatti tra organelli nella la biogenesi del melanosoma (Daniele et al., 2014).

Inoltre, per via del suo coinvolgimento nella fusione mitocondriale, Mfn2 agiva come un ponte tra i vari organelli (di seguito nominati). Esperimenti di immunofluorescenza effettuati in melanociti avevano evidenziato che la forma endogena di Mfn2 è principalmente localizzata alla rete mitocondriale. Tuttavia, esperimenti di immunogold (Fig. 10) avevano chiarito che Mfn2 era presente anche nei siti di contatto, in particolare:

- membrane esterne dei mitocondri e ER (1.591 ± 0.044 particelle d'oro/ μ m),
- contatti tra i diversi mitocondri (0.157 ± 0.008 particelle d'oro/ μ m)
- contatti tra mitocondri e ER (0.084 ± 0.005 particelle d'oro/ μ m)
- contatti tra mitocondri e melanosomi (0.069 ± 0.004 particelle d'oro/ μ m).

Per convalidare questi risultati, nei melanociti in cui Mfn2 è stata downregolata tramite i due siRNA, il segnale risultava ridotto fino all'80 % in ciascuno dei

compartimenti citati e la frequenza dei “*contacts*” e “*vicinities*” era diminuita del 40% (Daniele et al., 2014) (Fig. 9 e Fig. 10).

In secondo luogo gli autori hanno riscontrato che la biogenesi del melanosoma nell'area perinucleare era correlata con l'aumento delle interazioni melanosoma-mitocondrio. La maturazione del melanosoma si verificava in concomitanza con il trasporto progressivo degli organelli dal centro del citoplasma verso la periferia cellulare; melanosomi precoci erano distribuiti in maniera non omogenea all'interno della cellula (Daniele et al., 2014).

Gli autori dello studio avevano quantificato la distribuzione dei melanosomi nel citoplasma, ottenendo i seguenti risultati (Palmisano et al., 2008):

- Le cellule *wildtype* mostravano una disposizione regolare dei melanociti sull'intera area citoplasmatica.
- Le cellule Oa1-KO presentavano una regione centrale apparentemente vuota di melanosomi.
- I melanociti Oa1-KO hOA1, invece, erano caratterizzati dall'accumulo di minuscoli organelli e leggermente pigmentati (probabilmente di nuova formazione) nell'area perinucleare/Golgi, in cui era anche arricchita la colorazione Oa1.

Queste evidenze sperimentali suggerivano che la biogenesi dei melanosomi ha luogo nella regione perinucleare. Per verificare questa ipotesi, è stata eseguita un'analisi quantitativa mediante CLEM su aree citoplasmatiche, in regioni predefinite distanti al massimo 10 µm dal nucleo e contenenti l'apparato di Golgi (area del peri-Golgi). Sono stati ottenuti i seguenti risultati (Daniele et al., 2014):

- le cellule *wildtype* contenevano melanosomi in tutti gli stadi con progressivo aumento del numero di organelli con la maturazione; tuttavia rispetto alla cellula intera, gli organelli immaturi erano notevolmente arricchiti nella regione considerata mentre quelli allo stadio IV erano relativamente meno abbondanti.
- Nei melanociti Oa1-KO, la regione risultava essere priva di melanosomi e il numero di organelli non aumentava nelle fasi successive di maturazione.
- In seguito alla reintroduzione di OA1 nelle cellule Oa1-KO, viene ripristinata la densità dei melanosomi immaturi nell'area del peri-Golgi.

Le analisi avevano rivelato che nei melanociti Oa1-KO la frequenza dei contatti tra melanosomi e mitocondrio rimaneva bassa in entrambe le regioni cellulari, invece in quelle *wildtype* e Oa1-KO hOA1 era più frequente nel peri-Golgi. Ciò era particolarmente evidente nel caso di melanosomi di stadio I e II rispetto agli stadi III e IV, seppure i primi rappresentavano meno del 40 % del totale dei melanosomi (Daniele et al., 2014). Complessivamente questi risultati indicavano che i melanosomi non maturi si concentrano nella regione del peri-Golgi, dove

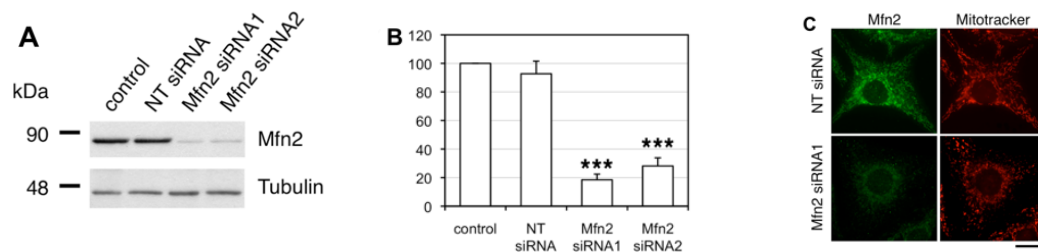
aumentava la possibilità di interazione con i mitocondri, suggerendo che quest'ultima poteva svolgere un ruolo critico, in particolare nelle prime fasi della biogenesi degli organelli (Daniele et al., 2014).

In terzo luogo, i ricercatori avevano osservato che la biogenesi del melanosoma da parte di OA1 richiede sia Mfn2 che ATP mitocondriale.

Il ripristino del fenotipo Oa1-KO in cellule Oa1-KO hOA1 è correlato con una maggiore frequenza e lunghezza dei contatti (Daniele et al., 2014) (Fig. 12)

Inizialmente gli autori avevano verificato se il knockdown di Mfn2 in cellule Oa1-KO potesse interferire con il ripristino della biogenesi del melanosoma. Si era scoperto che questo non influenzava il potenziale mitocondriale (Fig. 9) ma sembrava ridurre significativamente la frazione di cellule trasfettate che mostravano il tipico accumulo di melanosomi indotto da OA1 (Daniele et al., 2014) (Fig. 12).

Inoltre, per convalidare queste considerazioni, è stato eseguito un Western Blot (Fig 13A e B) seguito da un processamento mediante CLEM (Daniele et al., 2014) (Fig. 13C).



□ **Figura 13:** Daniele et al., 2014.

A.Rappresentazione di un Western Blot; la tubulina è il loading-control. I melanociti sono stati transfettati con 100 nm di due siRNA indipendenti (citati nella sezione “materiali e metodi) contro Mfn2 murino (terzo e quarto pozzetto) e con un “non- targetin” siRNA (secondo pozzetto); nel primo pozzetto è stato caricato il campione di controllo di melanociti.

B.Grafico che mostra la quantificazione del silenziamento genico indotto dai siRNA diretti contro Mfn2, ottenuto effettuando sei esperimenti indipendenti ed analisi statistiche.

C.Immagine di IF di cellule trattate con NT siRNA e Mfn2 siRNA. I melanociti rispettivamente sono stati transfettati con i siRNA citati, fissati, marcati con anticorpi anti-Mfn2 e analizzati con CLEM; i mitocondri sono marcati in rosso con il Mitotracker.

Queste osservazioni suggeriscono che Mfn2 era fondamentale per la melanogenesi, per il suo ruolo nella formazione delle connessioni interorganellari. Poiché la biogenesi dei melanosomi richiede energia, ed i mitocondri rappresentano il principale sito intracellulare per la produzione di ATP, gli autori avevano verificato se l'ATP risultava essere rilevante per il processo di

melanogenesi, trattando le cellule con oligomicina. Essa non aveva interferito con l'espressione di OA1 né con la formazione di nuovi melanosomi, ma aveva cambiato la localizzazione di Oa1 (Fig. 5). Per quantificare tale fenotipo i ricercatori avevano calcolato il rapporto tra il segnale di immunofluorescenza di OA1 nell'area del peri-Golgi e nell'intera area, osservando che era aumentato in modo significativo in cellule trattate con oligomicina rispetto a quelle non trattate (circa 150%) (Daniele et al., 2014) (Fig 5).

Inoltre l'analisi ultrastrutturale dei melanociti aveva rivelato anche la presenza di melanosomi che condividevano parzialmente la loro membrana con altri melanosomi circostanti, i cosiddetti "melanosomi a grappolo" (Fig 14A), menzionati all'inizio della discussione. Questi sono stati osservati molto raramente nei melanociti wildtype e OA1-KO, sebbene più frequenti nella regione del peri-Golgi (rispettivamente 2.9% contro 6.6% di tutti gli organelli nell'intera cellula rispetto all'area del peri-Golgi); abbondantemente nella regione del peri-Golgi delle cellule Oa1-KO hOA1, dove rappresentavano più del 20% (Fig .14A, 14B) di tutti gli organelli, nonostante la differenza contenuta in termini di numerosità dei melanosomi rispetto a quella nei wildtype (Daniele et al., 2014).

Questi risultati suggerivano che gli organelli a grappolo rappresentano una fase intermedia fisiologica della biogenesi dei melanosomi, che si accumula nei melanociti Oa1-KO hOA1 a causa della stimolazione di quest'ultima. Tale categoria di melanosomi mostrava un'elevata propensione a formare contatti tra melanosomi e mitocondri (Fig. 14C); al contrario, i melanosomi isolati (che rappresentano circa l'80% del totale) erano caratterizzati da una frequenza inferiore di contatti con mitocondri (Daniele et al., 2014) (Fig. 14E).

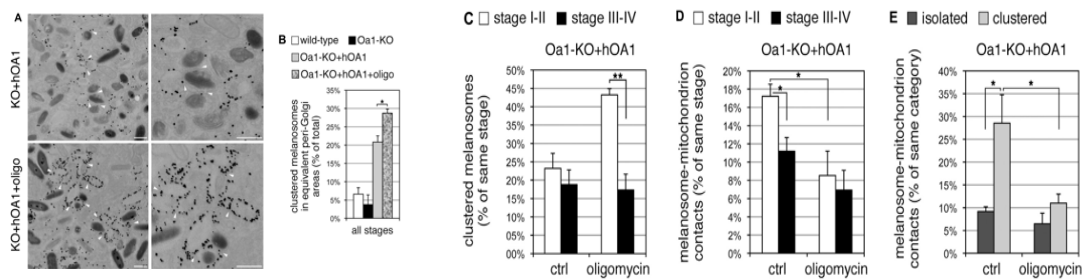


Figura 14: Daniele et al., 2014.

(A-E) I melanociti Oa1-KO sono stati trasfettati con il plasmide OA1, trattati o meno con l'oligomicina 24 ore dopo la trasfezione ed infine analizzati tramite CLEM con marcatura in oro per OA1 48 ore dopo la trasfezione.

A. Immagine rappresentativa di EM dell'area peri-Golgi: la stimolazione della biogenesi del melanosoma e i melanosomi raggruppati sono più numerosi in cellule trattate con oligomicina (+ oligo). Le frecce indicano membrane condivise tra melanosomi raggruppati. Scalebar: 0,5 μm.

B. Quantificazione dei melanosomi raggruppati nell'area peri-Golgi dei melanociti Oa1-KO+hOA1, non trattati o trattati con oligomicina, rispetto alle cellule wild-type e Oa1-KO.

C. Quantificazione dei melanosomi a grappolo nei melanociti Oa1-KO+hOA1 trattati o non trattati come in (B), espressi separatamente come percentuale dei melanosomi di stadio I-II o III-IV.

D. Quantificazione dei contatti melanosoma-mitocondrio nell'area peri-Golgi dei melanociti Oa1-KO+hOA1 trattati o non trattati, espressi come percentuale di melanosomi di stadio I-II o III-IV.

E. Quantificazione dei contatti melanosoma-mitocondrio nell'area peri-Golgi dei melanociti Oa1-KO+hOA1 trattati o non trattati, espressi come percentuale di melanosomi isolati o raggruppati.

Per cui, trattando le cellule con oligomicina la percentuale di melanosomi a grappolo aumentava fino a quasi il 30%, in assenza di variazioni del numero degli organelli (Fig. 14A e 14B); l'aumento era dovuto ad una maggiore interazione tra melanosomi di stadio I e II, circa il 45% di questi organelli era associato (Fig. 14C) Queste considerazioni dimostravano che le connessioni interorganellari tra melanosoma e mitocondrio sono più importanti nei melanosomi precoci e a grappolo; anche se entrambi rappresentavano una minoranza della popolazione complessiva di melanosomi, essi subivano maggiori cambiamenti strutturali. Infatti l'inibizione della sintesi di ATP mitocondriale con oligomicina porta a variazioni principalmente in queste categorie di melanosomi, riducendo così il loro coinvolgimento nei contatti di membrana con i mitocondri e inducendo un notevole aumento degli organelli a grappolo. Pertanto, sia il silenziamento di Mfn2 che l'inibizione dell'ATP sintasi interferivano con la corretta attivazione ed esecuzione della biogenesi del melanosoma (Daniele et al., 2014).

5. CONCLUSIONE

L'obiettivo dell'articolo intitolato: *"Mitochondria and Melanosomes Establish Physical Contacts Modulated by Mfn2 and Involved in Organelle Biogenesis"* era quello di caratterizzare gli stadi di maturazione dei melanosmi e di verificare se tra i mitocondri e melanosomi esista una connessione fisica e funzionale regolate da Mfn2 e OA1 in melanociti *wildtype* e KO-OA1.

Le strategie sperimentale utilizzate avevano permesso di dimostrare che le interazioni effettuate dai mitocondri, che si trovavano a diretto contatto con i melanosomi, erano mediate da proteine o complessi proteici contenenti la proteina Mfn2, in modo molto simile alle giustapposizioni tra ER e mitocondri. I risultati suggerivano che i contatti tra melanosomi e mitocondri partecipavano alla melanogenesi perché più abbondanti nell'area perinucleare, zona in cui si generano nuovi melanosomi. La frequenza dei contatti aumentava in seguito alla stimolazione melanogenesi indotta d'espressione del gene OA1 in cellule Oa1-KO; al contrario i contatti interorganellari erano ridotti in condizioni di alterata melanogenesi, causata da delezione di OA1 o disfunzione mitocondriale, legata a silenziamento di Mfn2 o l'inibizione dell'ATP sintasi.

Gli autori avevano ipotizzato che la funzione fisiologica dei contatti melanosoma-mitocondrio fosse rilevante per la biogenesi degli organelli e una loro modulazione

poteva essere associata ad alcuni fenotipo patologici della pigmentazione come albinismo e vitiligine.

Infatti i contatti mitocondri-melanosomi consentivano lo scambio locale di piccole molecole tra i due organelli, come gli ioni Ca^{2+} (Rizzuto et al., 1993) e di mediare il rilascio di ATP in zone adiacenti a melanosomi di stadio I/II che richiedevano livelli energetici più alti. Inoltre, l'ATP risulta indispensabile per regolare il trasporto di organelli, la sintesi di melanina o il pH intramelanosomiale (Daniele et al., 2014).

Gli autori avevano osservato che la riduzione delle giustapposizioni, tra melanosomi e mitocondri in cellule in cui Mfn2 era stata silenziato e in melanociti trattati con oligomicina, era accompagnata da una alterazione della morfologia mitocondriale, rispettivamente da una riduzione della loro dimensione e dalla formazione di organelli a grappolo (oppure da una loro frammentazione) (Giedt et al., 2012; de Brito and Scorrano., 2008).

La rete mitocondriale risultava più frammentata in Oa1-KO rispetto ai melanociti *wildtype*, nonostante l'assenza di differenze significative nel potenziale della membrana mitocondriale, suggerendo così che la rottura poteva essere correlata allo stato metabolico delle cellule (Hyde et al., 2010). Tuttavia, sebbene non si poteva escludere che l'alterazione della morfologia mitocondriale influenzasse i contatti tra melanosoma e mitocondrio, diversi risultati riscontrati dentro le stesse cellule, invece, erano indipendenti da questa variabile (ad esempio quelli relativi ai diversi stadi melanosomiali e alla marcatura con OA1) (de Brito et al., 2008; Maltecca et al., 2012).

Infine, considerando l'elevata motilità lungo i microtubuli, non è ancora chiaro come i melanosomi e mitocondri riescano a controllare le loro interazioni; era possibile che i contatti siano dinamici e avvengano durante periodi meno mobili oppure secondo la modalità "*kiss and run*⁴". Gli studi di microscopia confocale *in vivo* avevano rilevato che le connessioni ER-mitocondri rimanevano intatte, anche se i due organelli si muovevano lungo i microtubuli acetilati (Rowland and Voeltz., 2012; Friedman et al., 2010); non è ancora chiaro se meccanismi simili avvengano anche tra mitocondri e melanosomi (Daniele et al., 2014).

⁴ Una rapida endocitosi in cui le vescicole contattano brevemente la membrana plasmatica attraverso la formazione di un poro di fusione (Wen et al., 2017).

6. STAGE

ALLESTIMENTO DI UNA COLTURA CELLULARE di melanociti immortali di topo: melan-a/melan c2

Durante il periodo di stage (svoltosi nei mesi di marzo, aprile e maggio) avevo assistito all'allestimento di numerosi esperimenti e in uno di questi sono stata particolarmente coinvolta. Uno degli obiettivi principali era quello di osservare e riconoscere i quattro stadi di maturazione dei melanosomi (Fig 2)

Seguendo il protocollo sottostante avevo preparato il mezzo di coltura cellulare della linea Melan-a. Successivamente le cellule sono state fissate chimicamente e le immagini acquisite tramite TEM.

PREPARAZIONE DEL MEZZO di COLTURA CELLULARE:

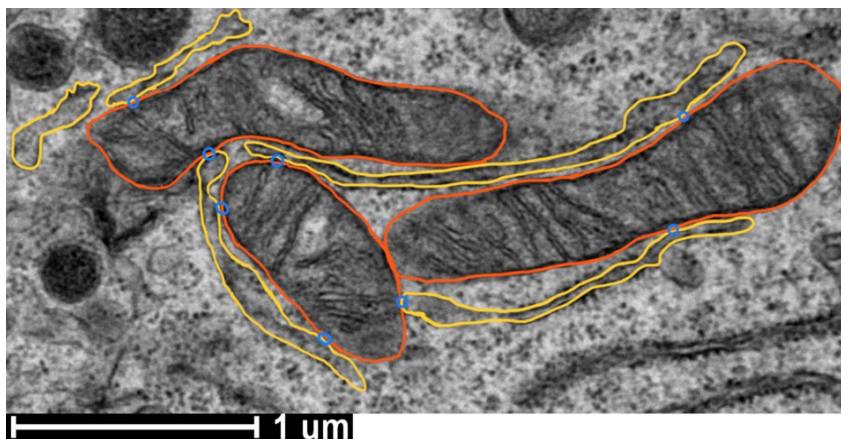
- RPMI 1640, pH 7,0-7,1. Il pH basso è essenziale solo per i melanociti pigmentati non albinici; la produzione di feomelanina a partire da DOPA o dalla tirosina in presenza di cisteina da parte della tirosinasi è massima a valori di pH di 5,8-6,3, mentre la produzione di eumelanina è inferiore a pH 5,8. Ciò suggerisce che il processo di melanogenesi è spostato verso la produzione di feomelanina a un pH debolmente acido (Wakamatsu et al., 2017).
- È necessario l'uso di un incubatore con CO₂ al 10% per la crescita di melanociti wildtype (Svidersakaya et al., 1997); tale percentuale è necessaria affinché il pH cellulare non diventi acido o alcalino, condizioni che inibirebbero la crescita delle cellule. Infatti l'acqua presente nel buffer, in combinazione con l'anidride carbonica, forma carbonato e bicarbonato acido, molecole fondamentali a mantenere i livelli di pH funzionali all'interno della coltura cellulare.
- SUPPLEMENTI al terreno:
 - penicillina, 100.000 U/L streptomicina solfato (Bennett et al., 1987).
 - 100 mg/L di glutammina 2 mM; Siero fetale di vitello, 10% (Bennett et al., 1987).
 - TPA (tetradecanoyl phorbol acetate), 200 nM. (Bennett et al., 1997).
 - Per cellule albine aggiungere tossina del colera, 200 pM (Bennett et al., 1985).

PROCEDURA

Per staccare le cellule, si effettua un lavaggio con PBS 1x e successivamente si aggiunge una soluzione contenente tripsina-EDTA allo 0,5%. Le cellule si staccheranno e sarà possibile procedere con la conta cellulare (Bennett et al., 1987; Bennett et al., 1997).

ANALISI IMMAGINI TEM

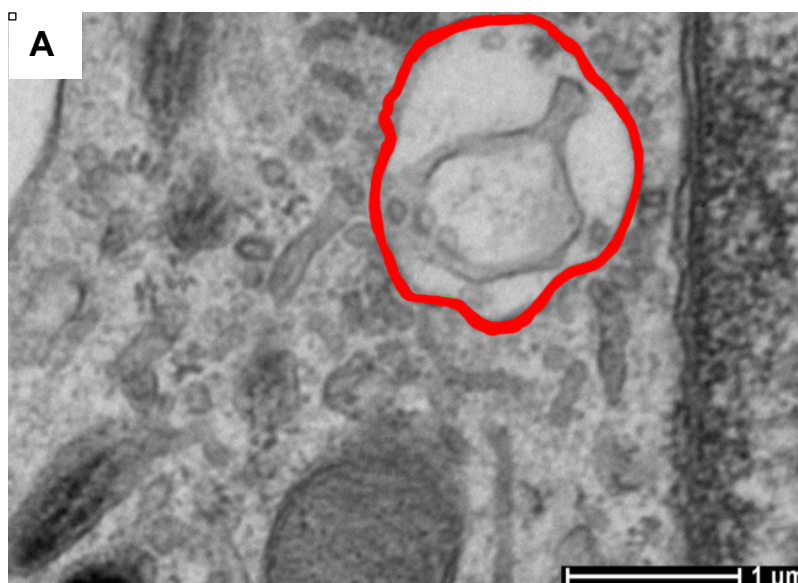
In figura 1 vengono mostrati i contatti mediati da ponti proteici che avvengono tra mitocondri e ER.

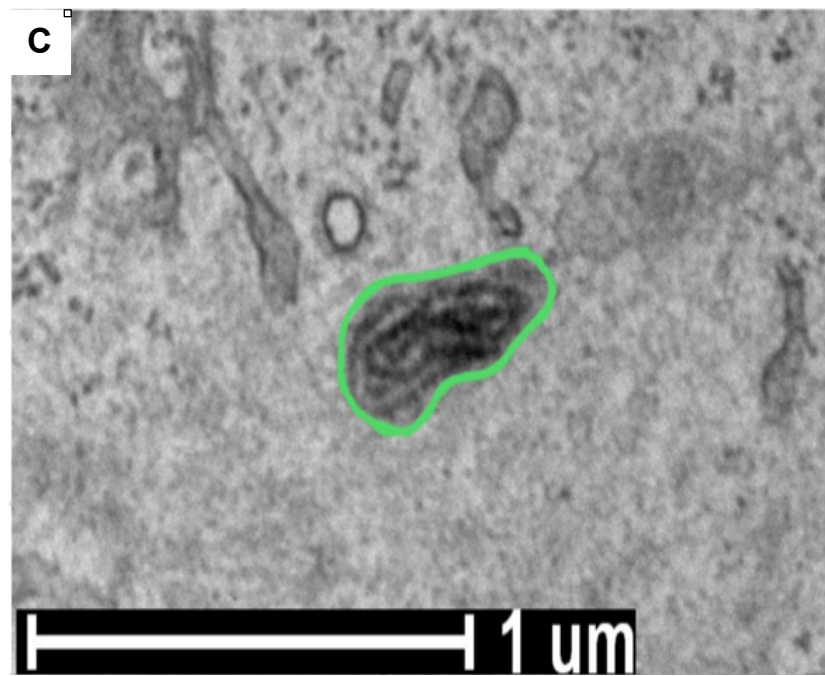
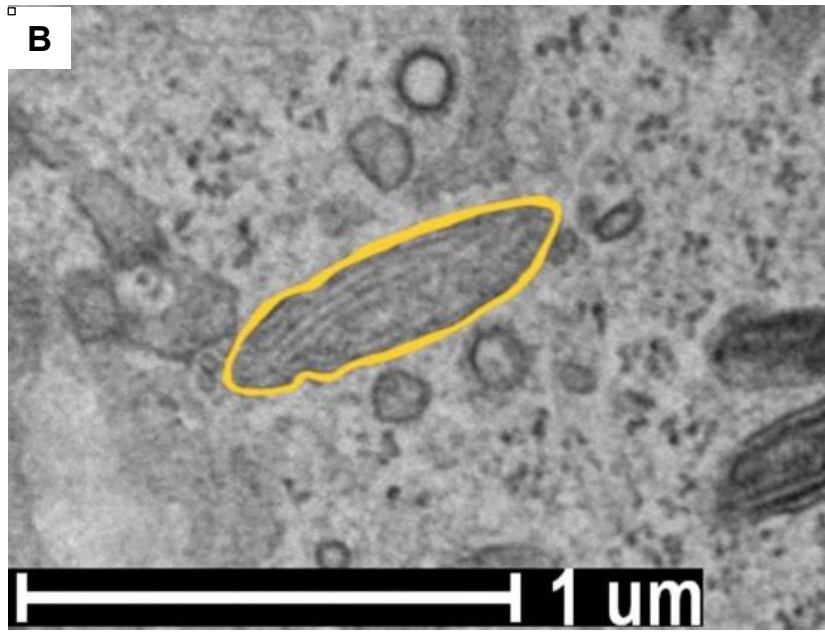


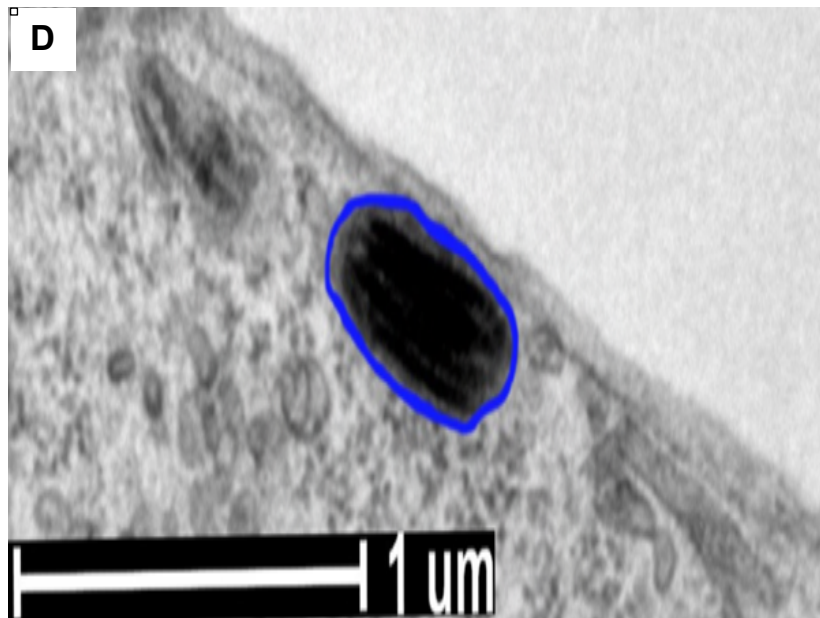
- **Figura 1**
In arancione è evidenziato il perimetro dei mitocondri.
In giallo viene delineato il perimetro dei RE che prende contatto con i mitocondri.
In blu sono cerchiati i contatti tra mitocondri e ER.

Nella figura 2 è possibile osservare i quattro stadi sequenziali di maturazione dei melanosomi. Per la descrizione dei quattro pannelli viene analizzato l'articolo di Raposo and Marks., 2019 intitolato: "*Melanosomes – dark organelles enlighten endosomal membrane transport*".

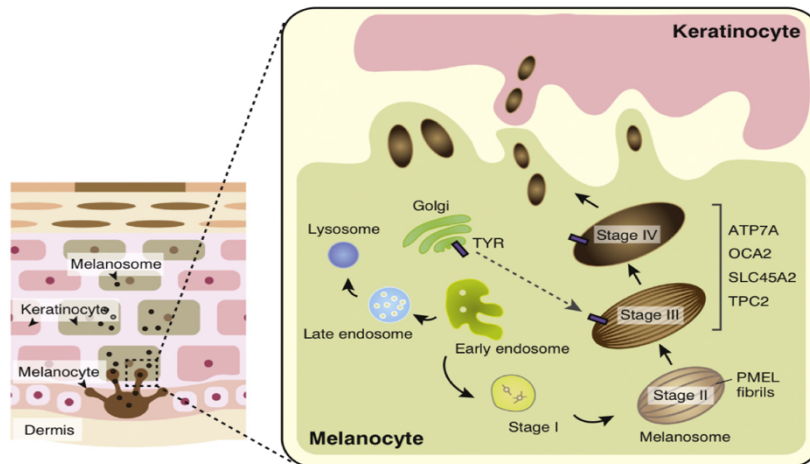
Per fornire una migliore comprensione della disposizione degli organelli nel melanocita, viene illustrata la figura 3.







- **Figura 2:**
- A.** In rosso è evidenziato un melanosoma di stadio I (detto anche premelanosoma), organello ancora immaturo perché, a causa dell'assenza di enzimi melanogenici, non sono pigmentati. Essi sono compartimenti endosomiali circolari che contengono poche vescicole intraluminali e granuli citosolici; in questo stadio iniziano a formarsi le fibrille proteiche intraluminali, la cui componente principale è la proteina PMEL 17.
- B.** In giallo viene rappresentato un melanosoma al secondo stadio (ancora immaturo), in cui il processo di deposizione delle fibrille proteiche intraluminali sta giungendo a termine; a questo stadio si organizzano come fogli paralleli di forma ellissoidale.
- C.** In verde è evidenziato un melanosoma al terzo stadio in cui è possibile osservare una debole pigmentazione ed una forma più allungata; essi contengono enzimi melanogenici come la tirosinasi (Tyr), la proteina 1 e 2 correlata alla tirosinasi (Tymp1 e 2) e la dopacromo tautomerasi (Dct) necessarie alla produzione delle melanine. Quest' ultime si depositeranno sulle fibrille proteiche provocando un loro ispessimento.
- D.** In rosso è evidenziato un melanosoma completamente maturo di stadio IV, in cui l'organello è pieno di melanina ed è pronto per essere rilasciato dai melanociti.



□ **Figura 3:** Wiriyasermkul et al., 2020.

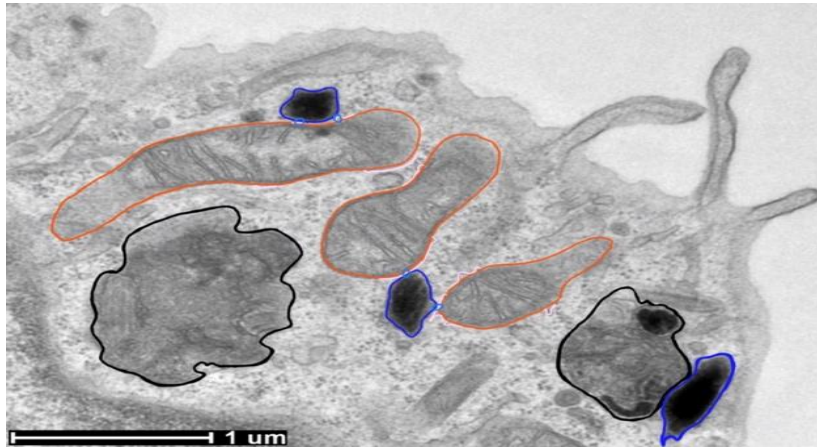
Schema degli strati dell'epidermide e della biogenesi del melanosoma nei melanociti. L'epidermide è composta da diversi strati di cheratinociti; i corpi dei melanociti si trovano nello strato basale dell'epidermide (pannello a sinistra), mentre le loro estroflessioni si inseriscono tra i cheratinociti degli strati superiori. Il melanosoma si sviluppa a partire dall'endosoma iniziale. La formazione e la maturazione del melanosoma avviene in quattro fasi; gli stadi I-II sono gli stadi non pigmentati dei melanosomi.

Il percorso della melanogenesi inizia allo stadio III, lo stadio in cui l'enzima TYR insieme a TYRP, ATP7A (proteina di Menkes), OCA2 (proteina P), SLC45A2 (proteine di trasporto associati alla membrana) e TPC2 (Canale 2 del segmento a due pori) vengono traslocati dalla rete trans-Golgi ai melanosomi.

I premelanosomi hanno un pH acido, ma i melanosomi di stadio III-IV hanno un pH neutro. A pH neutro, TYR è funzionale per la melanogenesi e la melanina viene sintetizzata.

Le melanine sintetizzate occupano interamente le fibrille PMEL allo stadio IV, conseguentemente dando origine al melanosoma maturo. I melanosomi maturi vengono successivamente trasportati ai cheratinociti e sono distribuiti su tutta la pelle.

In figura 4 vengono mostrati i contatti che avvengono tra mitocondri e melanosomi.



□

Figura 4

In questa immagine TEM sono visibili melanosomi maturi (blu) e mitocondri (arancione) in una zona periferica di un melanocita (Melan-a); i contatti tra i due organelli (cerchiati in azzurro) possono essere singoli oppure multipli. In nero sono evidenziati gli autofagosomi.

7. BIBLIOGRAFIA

- Bárcena Montserrat and Koster Abraham J. **“Electron Tomography in Life Science.”** Elsevier, August 5, 2009. 920-930.
- Bennett Dorothy C., Cooper Philip J., Dexter Tim J., Devlin Linda M., Heasman Janet, and Nester Barry. **“Cloned Mouse Melanocyte Lines Carrying the Germline Mutations Albino and Brown: Complementation in Culture.”** Development , 1989. 379-385.
- Costin Gertude-E. e Hearing Vincent J. Articolo **“Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress.”** Faseb Journal, April 21, 2007. 21(4):976-94.
- Daniele Tiziana, Ilse Hurbain, Vago Riccardo, Casari Giorgio, Raposo Graça, Tacchetti Carlo, and Schiaffino Maria Vittoria. **“Mitochondria and Melanosomes Establish Physical Contacts Modulated by Mfn2 and Involved in Organelle Biogenesis.”** Current Biology; February 17, 2014. 24, 393–403.
- Giacomello Marta, Pyakurel Aswin, Glytsou Christina, and Scorrano Luca. **“The Cell Biology of Mitochondrial Membrane Dynamics.”** Nature, April 2020.
- Mattie Sevan, Riemer Jan, Wideman Jeremy G., and McBride Heidi M.. **“A New Mitofusin Topology Places the Redox-Regulated C Terminus in the Mitochondrial Intermembrane Space.”** Journal Of Cell Biology, 2018. Vol. 217 No. 2, 507–515.
- Mayhew Terry M. **“Quantifying immunogold localization on electron microscopy thin section: a compendium of new approaches for plant cell biologists.”** Journal of Experimental Botany; June 1, 2011. Volume 62, Issue 12/ p. 4101-4113.
- Raposo Graça and Marks Michael S. **“Melanosomes – Dark Organelles Enlighten Endosomal Membrane Transport.”** Nature reviews. Molecular cell biology., October 2007. 8(10): 786–797.
- Schiaffino M. Vittoria and Tacchetti Carlo. **“The Ocular Albinism Type 1 (OA1) Protein and the Evidence for an Intracellular Signal Transduction System Involved in Melanosome Biogenesis.”** Pigment Cell Res., August, 2005. 18; 227–233.
- Slominski Radomir M., Sarna Tadeusz, Płonka Przemysław M., Raman Chander, Brożyna Anna A., and Slominski Andrzej T. **“Melanoma, Melanin, and Melanogenesis: The Yin and Yang Relationship.”** Frontiers in Oncology, March 14, 2022. 12:842496.

Sviderskaya Elena V., Bennett Dorothy C., Ho Lingling, Bailin Tu, Lee Seung-Taek, and Spritz Richard A. **“Complementation of Hypopigmentation in P-Mutant (Pink-Eyed Dilution) Mouse Melanocytes by Normal Human P CDNA, and Defective Complementation by DCA2 Mutant Sequences.”** Journal of Investigative Dermatology, 1997.

Tadoko T., Ozawa K., Bonnet-Duquennoy M., Bonté F., **“Hormone influence on melanogenesis and spots formation.”** International Journal of Cosmetic Science, June 28, 2008. Volume 27, Issue 1/ p. 56-59.

Vianello Caterina, Cocetta Veronica, Caicci Federico, Boldrin Francesco, Montopoli Monica, Martinuzzi Andrea, Carelli Valerio, and Giacomello Marta. **“Interaction Between Mitochondrial DNA Variants and Mitochondria/Endoplasmic Reticulum Contact Sites: A Perspective Review.”** DNA Cell Biology, August 2020; 39(8): 1431-1443.

Wakamatsu K., Nagao A., Watanabe M., Nakao K., Ito S. **“Pheomelanogenesis is promoted at a weakly acidic pH.”** Pigment Cell Melanoma Res. 2017 May; 30(3):372-377.

Yamaguchi Yuji and Hearing Vincent J. **“Melanocytes and Their Diseases.”** Cold Spring Harbor Perspect Med. May, 2014; 4(5):a017046.

Mitochondria and Melanosomes Establish Physical Contacts Modulated by Mfn2 and Involved in Organelle Biogenesis

Tiziana Daniele,^{1,2} Ilse Hurbain,^{3,4,5} Riccardo Vago,^{6,7} Giorgio Casari,^{6,7} Graça Raposo,^{3,4,5} Carlo Tacchetti,^{2,8} and Maria Vittoria Schiaffino^{1,*}

¹Organelle Biogenesis and Motility Unit, Center for Translational Genomics and Bioinformatics, San Raffaele Scientific Institute, 20132 Milan, Italy

²Experimental Imaging Center, San Raffaele Scientific Institute, 20132 Milan, Italy

³Institut Curie, Centre de Recherche, Paris 75248, France

⁴Structure and Membrane Compartments CNRS UMR144, Paris 75248, France

⁵Cell and Tissue Imaging Facility (PICT-IBISA) CNRS UMR144, Paris 75248, France

⁶Vita-Salute San Raffaele University, 20132 Milan, Italy

⁷Neurogenomics Unit, Center for Translational Genomics and Bioinformatics, San Raffaele Scientific Institute, 20132 Milan, Italy

⁸Department of Experimental Medicine, University of Genoa, 16132 Genoa, Italy

Summary

Background: To efficiently supply ATP to sites of high-energy demand and finely regulate calcium signaling, mitochondria adapt their metabolism, shape, and distribution within the cells, including relative positioning with respect to other organelles. However, physical contacts between mitochondria and the secretory/endocytic pathway have been demonstrated so far only with the ER, through structural and functional interorganellar connections.

Results: Here we show by electron tomography that mitochondria physically contact melanosomes, specialized lysosome-related organelles of pigment cells, through fibrillar bridges resembling the protein tethers linking mitochondria and the ER. Mitofusin (Mfn) 2, which bridges ER to mitochondria, specifically localizes also to melanosome-mitochondrion contacts, and its knockdown significantly reduces the interorganellar connections. Contacts are associated to the melanogenesis process, as indicated by the fact that they are reduced in a model of aberrant melanogenesis whereas they are enhanced both where melanosome biogenesis takes place in the perinuclear area and when it is actively stimulated by OA1, a G protein-coupled receptor implicated in ocular albinism and organellogenesis. Consistently, Mfn2 knockdown prevents melanogenesis activation by OA1, and the pharmacological inhibition of mitochondrial ATP synthesis severely reduces contact formation and impairs melanosome biogenesis, by affecting in particular the developing organelles showing the highest frequency of contacts.

Conclusions: Altogether, our findings reveal the presence of an unprecedented physical and functional connection between mitochondria and the secretory/endocytic pathway that goes beyond the ER-mitochondria linkage and is spatially and timely associated to secretory organelle biogenesis.

Introduction

Mitochondria play a plethora of essential functions in eukaryotic cells, including a crucial control over energy availability by ATP synthesis and intracellular signaling by calcium uptake. To accomplish these tasks, mitochondria are able to finely regulate their biochemical activity, shape, and distribution within the cells [1], including relative positioning with respect to other organelles, in a precise space- and time-controlled fashion [2–5]. However, physical contacts between mitochondria and other organelles have been demonstrated so far only with the ER [6, 7]. These interorganellar connections accomplish multiple functions, including calcium signaling, control of lipid biosynthesis, mitochondrial division, and coordinated organelle dynamics [8, 9], and are modulated by the dynamin-like GTPase mitofusin (Mfn) 2, located both on mitochondrial and ER membranes [10].

Among specialized organelles of the secretory/endocytic lineage, melanosomes are lysosome-related organelles of pigment cells (melanocytes and retinal pigment epithelium) devoted to the synthesis, storage, and transport of melanins and representing well-recognized biological models of organelle biogenesis and motility. They originate from endosomal precursors and subsequently undergo a series of maturation stages (I to IV), characterized by progressive melanin deposition and organelle transport toward the cell periphery [11, 12]. In the past few years, a link between melanogenesis and mitochondria has begun to emerge. Indeed, it was found that the cutaneous response to UVB, mediated by the melanocortin 1 receptor (MC1R), involves mitochondria-associated genes [13] and that the MC1R-antagonist Agouti downregulates genes responsible for the mitochondrial redox ability in melanocytes [14]. Furthermore, mitochondrial proteins (prohibitin and ATP synthase) have been identified as cellular targets of compounds that upregulate pigmentation in wild-type and albino melanocytes [15, 16]. Finally, mitochondrial dysfunction has been associated with acquired or inherited pigmentary diseases, such as vitiligo [17] and albinism [18].

To investigate whether an interorganellar crosstalk exists between mitochondria and melanosomes, we exploited both wild-type melanocytes and melanocytes mutant at the ocular albinism type 1 gene (*OA1*, also known as *GPR143*) [19], which are characterized by abnormal biogenesis and transport of melanosomes. In fact, they show the presence of giant pigmented melanosomes [20, 21], reduction of melanosome number [22], and alteration of melanosome motility [23], thus representing a suitable system to study the role of mitochondria in physiological and pathological melanogenesis. We found that mitochondria establish physical contacts with melanosomes, that these interorganellar connections are modulated by Mfn2, that they are spatially and timely enhanced during active melanogenesis, and they are reduced upon either melanosomal or mitochondrial dysfunction.

Results

Melanosomes Contact Mitochondria

To test the spatial relationship between melanosomes and mitochondria, we first performed immunofluorescence (IF)

*Correspondence: schiaffino.mariavittoria@hsr.it



analysis in wild-type mouse melanocytes and compared the distribution of mitochondria with that of melanosomal markers: Pmel17, for immature melanosomes; tyrosinase, for mature melanosomes; and OA1, for melanosomes and late endosomes/lysosomes [24–26]. We found no major overlap between the two compartments, but mitochondria were observed adjacent to, and sometimes appeared to surround, melanosomes (Figure S1A available online), suggesting the presence of structural and/or functional connections. Therefore, we performed a quantitative ultrastructural study in wild-type melanocytes by correlative light-electron microscopy (CLEM) [27] (Figures S1B and S1C).

Melanosomes were classified according to the canonical I to IV maturation stages [11], plus a fifth category corresponding to oversized organelles (giant), which may become frequent in conditions of pathological melanogenesis (Figure S1D; see Experimental Procedures). All melanosomes were screened for the presence of mitochondria within a distance of 100 nm (defined as “vicinity;” Figures 1A and 1B), and, if so, for the occurrence of organelle juxtaposition or overlap (defined as “contacts;” Figures 1C–1H; see Experimental Procedures). The rationale was that, if physical links exist between the two organelles, they might be transient and/or localized to limited membrane areas, so that vicinities might in part represent contacts undetected by CLEM. We found that 11.40% of melanosomes over the entire cell area had a mitochondrion within 100 nm and that 6.77% contacted a mitochondrion, by means of close membrane juxtapositions involving in average $14\% \pm 0.8\%$ of the melanosomal perimeter (mean \pm SEM; $n = 85$ contacts).

Thus, the overall extent of melanosomal membranes engaged into these interorganelle connections approaches 1%, suggesting that they may be functionally relevant, considering that ER-mitochondria contacts were previously estimated to involve 2.25% of the mitochondrial membrane [28] and presumably less of the ER. In addition, the amount of melanosome-mitochondrion connections was significantly higher in areas and conditions of active melanogenesis and with particular melanosomal categories (involving up to 17% of early melanosomes and up to 28% of clustered organelles in the perinuclear region) (see below).

Melanosome-Mitochondrion Contacts Are Mediated by Fibrillar Bridges

To structurally characterize these contacts, we performed electron tomography and three-dimensional reconstruction on chemically fixed epon-embedded melanocytes. We found that the melanosome-mitochondrion interorganelle connections do not involve the continuity between the melanosomal lumen and the mitochondrial inner compartments, but rather occur through electron-dense fibrillar bridges connecting the limiting membranes of the two organelles. These structures were visible in few optical slices and then faded. They appeared in clusters of two or three, were outdistanced by about 20 nm, and had a thickness of 10–15 nm and a length of 20–30 nm (Figures 2A–2D and S2A–S2D; Movie S1). Because bridges occupy less than 15 nm in depth and thus can be difficult to catch in single 50–100 nm EM sections, it is likely that the frequency of contacts, as measured by CLEM analysis, is underestimated. Interestingly, the melanosome-mitochondrion bridges were morphologically similar to the protein tethers connecting the ER and mitochondria [6, 29], which were identified also in our tomogram (Figures 2E–2I; Movie S1).

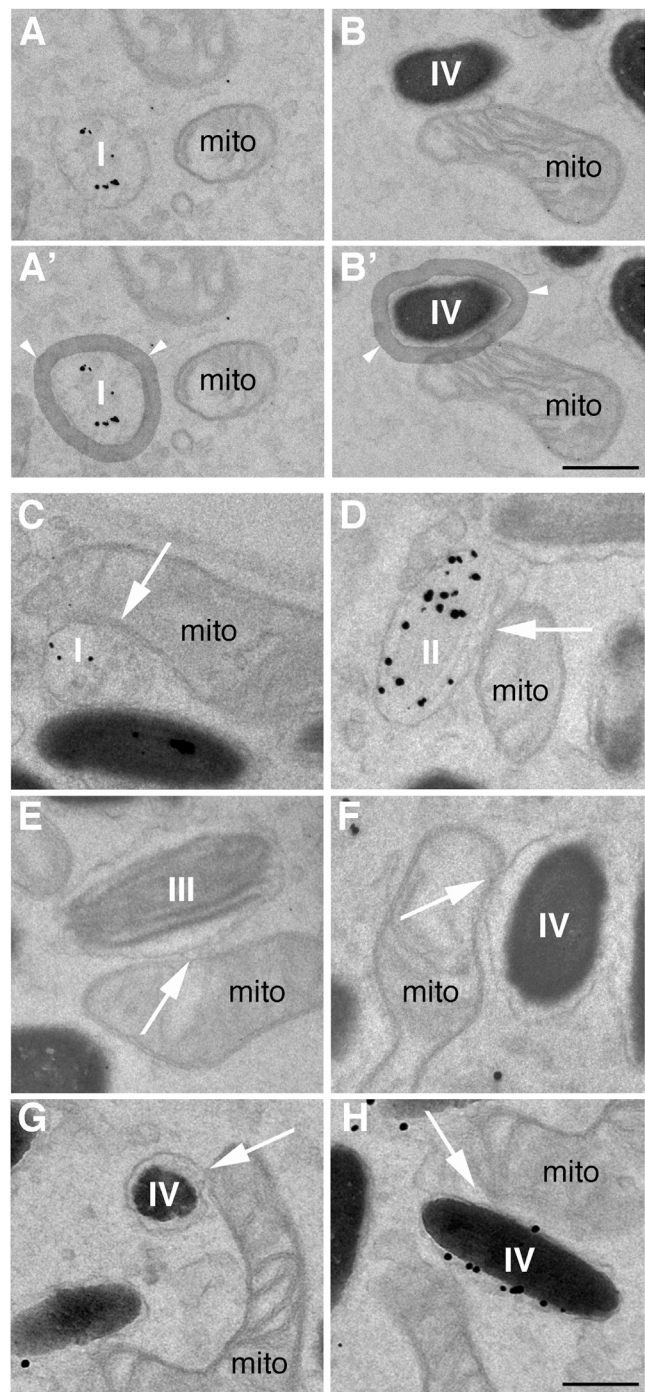


Figure 1. Analysis of Melanosome-Mitochondrion Vicinities and Contacts by EM

Wild-type melanocytes were fixed and stained for EM with the early melanosomal marker Pmel17 (gold particles). Representative images of (A, A') melanosomes distant from mitochondria; (B, B') vicinity, when the mitochondrion lies within 100 nm; (C–G) contact, when the membranes of either one or both the organelles are not visible or touch each other (mitochondria-contacting melanosomes at different maturation stages [I–IV] are shown); (H) contact, when melanosomes and mitochondria overlap. Gray brushstroke delimiting the melanosomes (arrowheads) in A' and B' is 100 nm thick. Mito, mitochondria; I–IV, melanosomes stage I to IV. Scale bars represent 0.5 μ m (A–B) or 0.3 μ m (C–H). See also Figure S1.

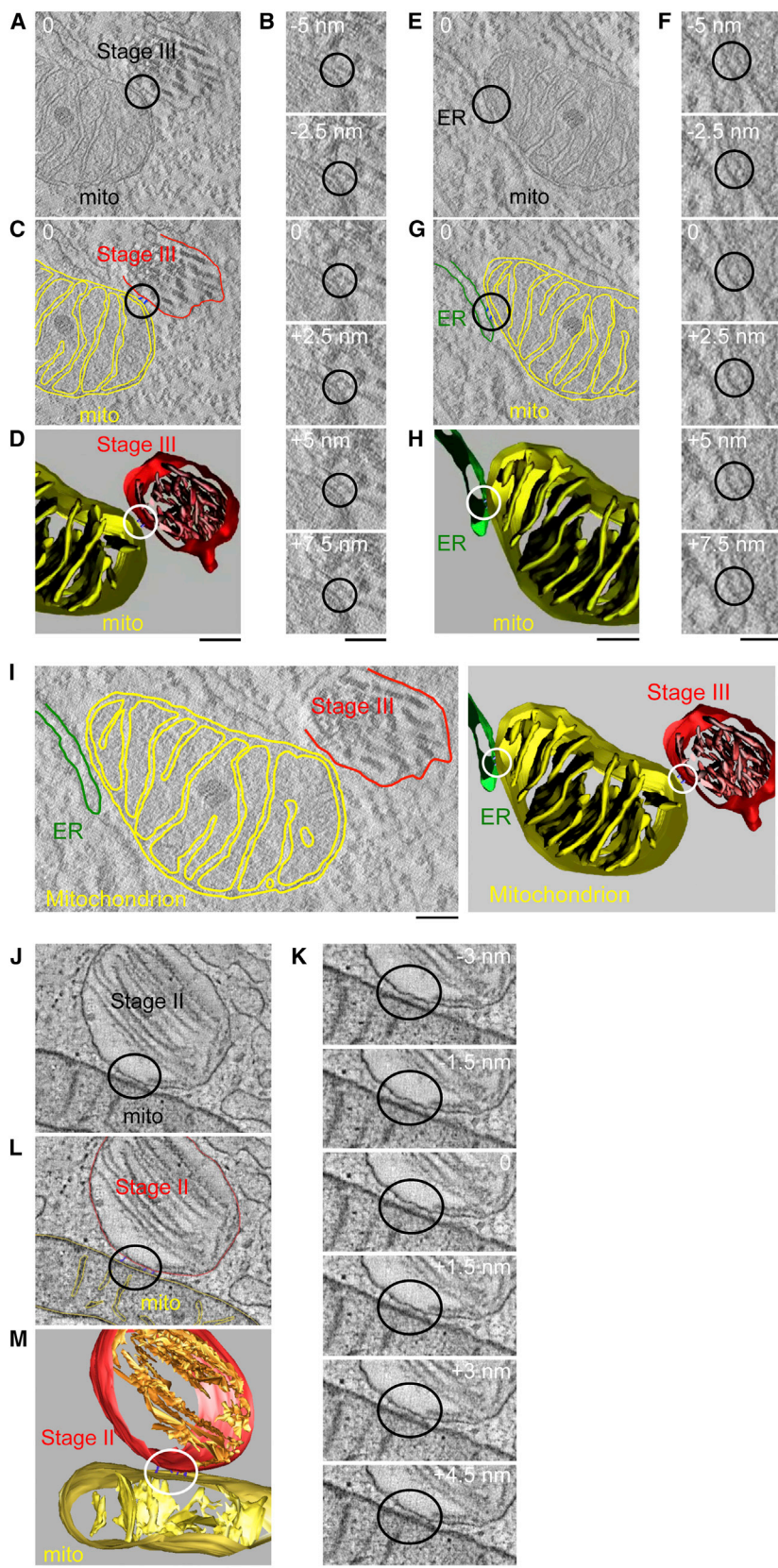


Figure 2. Contacts between Melanosomes and Mitochondria Are Mediated by Bridges

(A–I) Wild-type melanocytes were fixed, embedded in resin, and processed for tomography to show a mitochondrion (mito) contacting both a stage III melanosome and the ER.

(J–M) MNT1 melanoma cells were high-pressure-frozen, freeze-substituted, embedded in resin, and processed for tomography to show a mitochondrion contacting a stage II melanosome.

A tomogram slice (A, E, J) and sequential z-axis enlargements (B, F, K) through the tomographic volume of the organelles are shown. Relative z position in the tomogram is indicated. Circles surround the bridges. Membranes in consecutive slices from the tomographic model were manually contoured and one slice is shown (C, G, I, L). The 3D model displaying rendered surfaces to visualize the bridges (blue-violet) and the membranes (mitochondrion, yellow; melanosome, red; ER, green) is shown in (D), (H), (I), and (M). Scale bars represent 150 nm (A, C, E, G); 75 nm (B and F); 140 nm (J and L); or 65 nm (K). See also [Figure S2](#) and [Movies S1](#) and [S2](#).

on high-pressure-frozen, freeze-substituted MNT1 human melanoma cells [30]. In thin sections of these optimally preserved cells, several tight contacts, appearing as tiny filaments linking mitochondria and melanosomes, were observed ([Figures 2J–2M](#) and [S2E–S2H](#); [Movie S2](#)).

Mfn2 Is Involved in the Formation of Melanosome-Mitochondrion Contacts

In addition to its role in mitochondrial fusion [31], Mfn2 has been implicated in the juxtaposition between mitochondria and the ER, by acting as a structural bridge [10]. The ultrastructural similarity between melanosome-mitochondria and ER-mitochondria contacts prompted us to investigate the role of this protein in the newly identified interorganellar connections. IF analysis in melanocytes showed that endogenous Mfn2 labeling is mostly associated to the mitochondrial network ([Figure S3A](#)). However, immunogold analysis clearly identified Mfn2 both on mitochondria and at interorganellar contact sites ([Figures 3A](#) and [3B](#)). In particular, quantification of the labeling density (see [Experimental Procedures](#)) showed that endogenous Mfn2 is present (1) on mitochondrial outer membranes (1.591 ± 0.044 gold particles/ μm), (2) on contacts between mitochondria (0.157 ± 0.008 gold particles/ μm), (3) on contacts between mitochondria and ER (0.084 ± 0.005 gold particles/ μm), and (4) on contacts between mitochondria and melanosomes (0.069 ± 0.004 gold particles/ μm). The labeling was highly specific, because in melanocytes where Mfn2 was knocked down by

siRNAs, Mfn2 staining was significantly reduced by more than 80% in each compartment described above ([Figures 3C](#) and [S3B–S3E](#)).

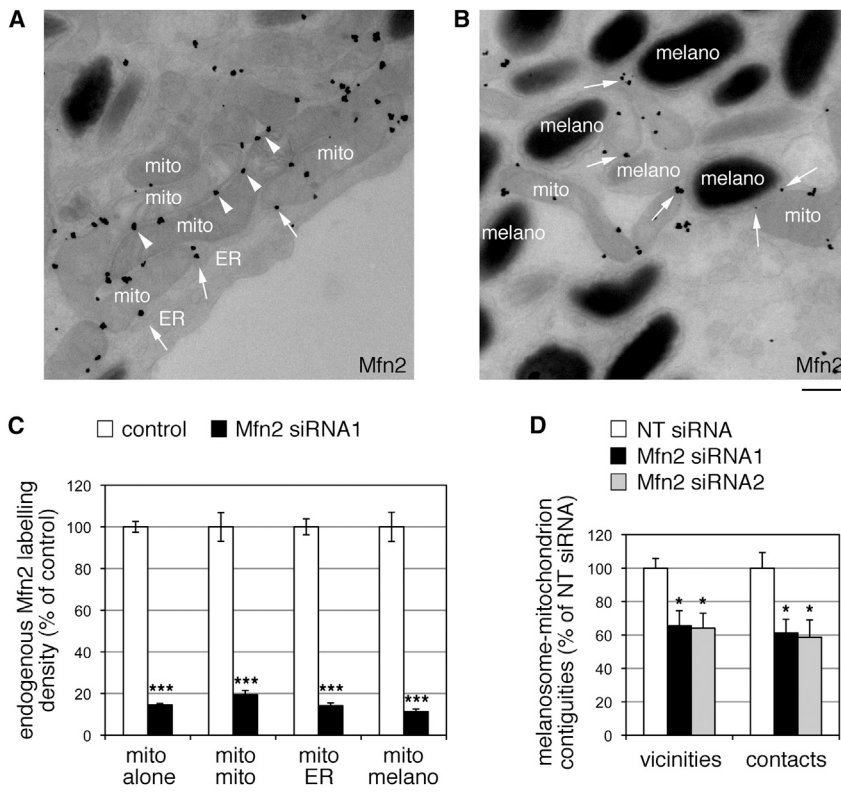


Figure 3. Mfn2 Localizes to and Is Required for Melanosome-Mitochondrion Contacts

(A and B) Wild-type melanocytes were fixed and stained for EM with an antibody to endogenous Mfn2 (gold particles). The antibody specifically stains mitochondria (mito) and the ER, and in particular the mitochondrion-mitochondrion (arrowheads) and the ER-mitochondrion (arrows) contact sites (A). Gold particles are present also in the areas where melanosomes (melano) are found close to/in contact with mitochondria (arrows, B). Scale bar represents 350 nm.

(C) Melanocytes were silenced for Mfn2, labeled with an anti-Mfn2 antibody, and processed for CLEM. The graph shows the quantification of Mfn2 labeling density on mitochondria (mito alone) and mitochondrial contact sites with other mitochondria (mito-mito), the ER (mito-ER), and melanosomes (mito-melano) in Mfn2 knocked down versus control cells. Data are expressed as percent of control and represent the mean \pm SD of four independent cells. *** $p < 0.001$ (versus respective control).

(D) Melanocytes were silenced for Mfn2, labeled with an anti-Pmel17 antibody, and processed for CLEM. The graph shows the quantification of vicinities and contacts between melanosomes and mitochondria (out of total melanosomes) in Mfn2 versus nontargeting (NT) siRNA-treated cells. Data are expressed as percent of NT-siRNA-treated cells and represent the mean \pm SEM of 3–6 independent cells. * $p < 0.05$ (versus NT siRNA). See also Figure S3.

To investigate the role of Mfn2 in the formation of the melanosome-mitochondrion connections, we knocked down Mfn2 by two independent siRNAs and performed ultrastructural analysis by CLEM. We found that the frequencies of both vicinities and contacts were significantly reduced by almost 40% when the protein levels of Mfn2 were knocked down to 20%–30% (Figures 3D, S3B, and S3C). These results are comparable to the decrease of ER-mitochondria juxtaposition reported in *Mfn2*^{-/-} fibroblasts, as evaluated by 3D confocal reconstructions [10]. Thus, contacts between melanosomes and mitochondria are morphologically similar to the ER-mitochondria tethers and appear to share with them at least one of the crucial molecular players, Mfn2.

Melanosome-Mitochondrion Contacts Are Enhanced by OA1

To investigate the role of melanosome-mitochondrion contacts in physiological and pathological melanogenesis, we compared wild-type with *Oa1*-knockout (KO) mouse melanocytes, which represent an excellent model of aberrant melanosome biogenesis and transport [23]. To validate the results, we also analyzed *Oa1*-KO melanocytes transiently transfected with an expression vector for human OA1 and analyzed 48 hr posttransfection (*Oa1*-KO+hOA1). Ultrastructural analysis over the entire cell cytoplasm revealed that in both wild-type and *Oa1*-KO melanocytes stage I and II organelles are less represented (10% each), whereas most melanosomes belong to the pigmented categories (stage III–IV and giant; Figure 4A). However, whereas in *Oa1*-KO cells giant melanosomes represent about 30% of all organelles, with a corresponding decrease of regular stage III and IV organelles, the giant category is nearly absent in wild-type melanocytes. A distribution pattern of melanosomal stages indistinguishable from wild-type was also observed in *Oa1*-KO+hOA1 melanocytes,

indicating that these cells completely correct both the subcellular organelle distribution, as described previously [23], and the melanosome maturation and size abnormalities (Figure 4A).

The analysis of melanosome-mitochondrion contiguities indicated that their frequency is significantly reduced in *Oa1*-KO cells, in particular with respect to all normal melanosomal stages (I–IV), with an overall reduction of 28% and 37% for vicinities and contacts, respectively (Figure 4B). In contrast, giant melanosomes showed a higher probability to contact mitochondria, possibly indicating a peculiar functional condition for these organelles, which might maintain features of maturing melanosomes. These results did not depend on stochastic events due to the organelle size, because we observed an inverse correlation between the frequency of contacts and organelle dimension in all cell types (Figure S1E). Remarkably, as re-expression of OA1 rescued the *Oa1*-KO melanosomal phenotype, it also returned the frequency of vicinities and contacts between melanosomes and mitochondria back to normal (Figure 4B; *Oa1*-KO+hOA1).

To verify whether the presence of OA1 was actually required on the involved melanosomes to establish the interorganellar connections, we correlated the occurrence of vicinities and contacts with the labeling for OA1 by immunogold analysis. First, we found that in *Oa1*-KO+hOA1 melanocytes, OA1 was present at all melanosomal maturation stages, with relative enrichment on immature melanosomes, consistent with previous reports on the endogenous protein [25, 26] (Figure 4C). Next, we compared the frequency of vicinities and contacts in each subpopulation and found that OA1-positive melanosomes display two times the probability of OA1-negative organelles to connect with mitochondria (Figure 4D).

Finally, we evaluated the length of melanosome-mitochondrion contacts, as an estimate of the membrane surface

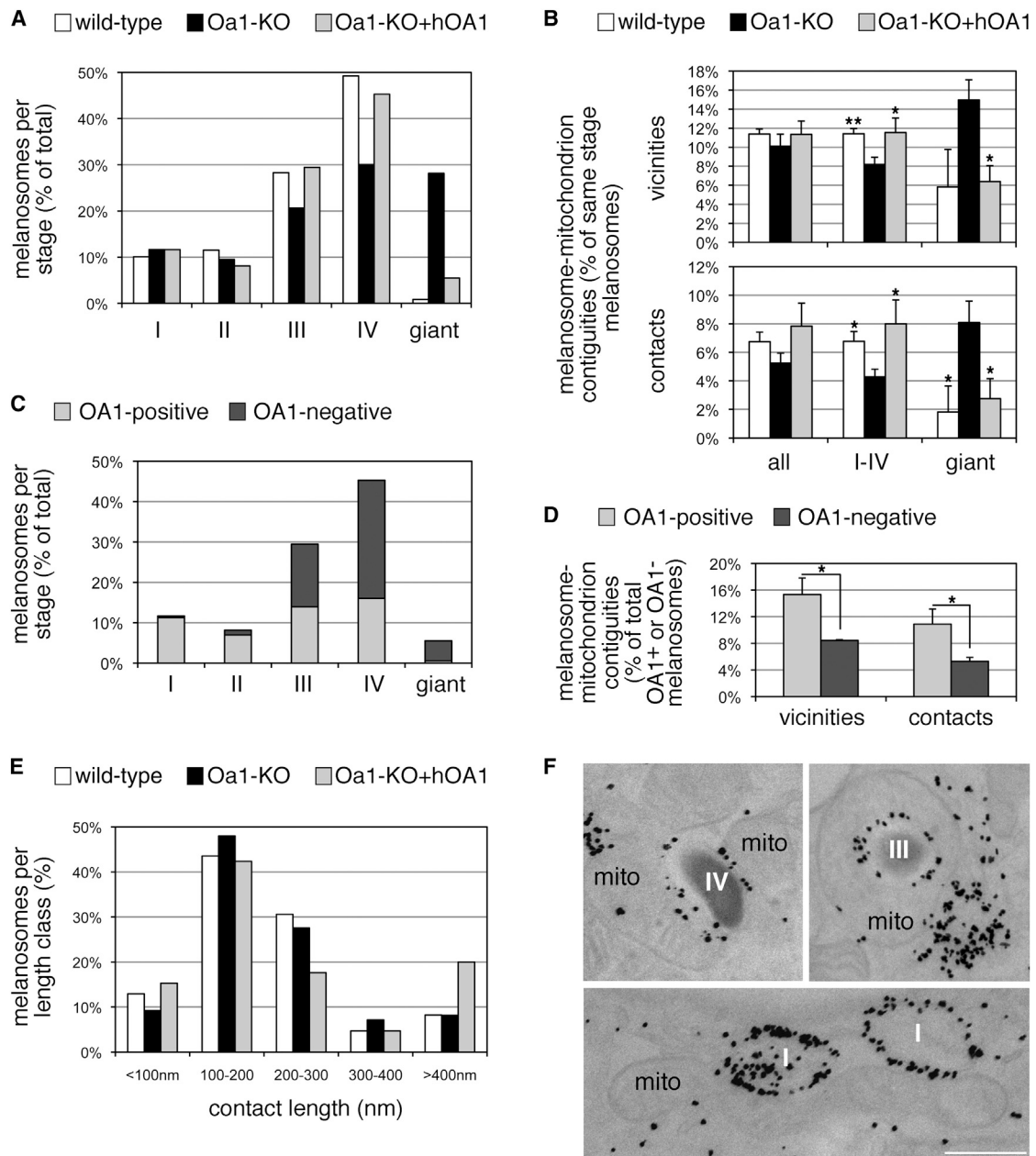


Figure 4. OA1 Increases the Frequency and Length of Interorganellar Contacts

Ultrastructural analysis of wild-type, *Oa1*-KO, and *Oa1*-KO+hOA1 melanocytes over the entire cell area.

(A) Quantification of melanosomes per maturation stage, as defined by EM analysis. Data are expressed as percent of total melanosomes in each cell line. I-IV, canonical melanosomal stages; giant, giant melanosomes. The total number of melanosomes counted was 3,027, 3,171, and 2,745, from 5 wild-type, 5 *Oa1*-KO, and 3 *Oa1*-KO+hOA1 melanocytes, respectively.

(B) Quantification of vicinities and contacts between melanosomes and mitochondria. Data are expressed as percent of total (all) melanosomes or of normal (I-IV) and giant melanosomes in each cell line and represent the mean \pm SEM of 3-5 independent cells. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (versus *Oa1*-KO cells).

(C) Quantification of OA1-positive and OA1-negative melanosomes sorted per maturation stage in *Oa1*-KO+hOA1 melanocytes. Data are expressed as percent of total organelles. The total numbers of OA1-positive and OA1-negative organelles were 1,347 and 1,398, respectively.

(D) Quantification of vicinities and contacts established by either OA1-positive or OA1-negative melanosomes with mitochondria in *Oa1*-KO+hOA1 melanocytes. Data are expressed as percent of total OA1-positive or OA1-negative organelles and represent the mean \pm SEM of three independent cells. * $p < 0.05$ (unpaired one-tailed Student's *t* test).

(E) Quantification of the length of melanosome-mitochondrion contacts in each cell line. Data are binned into five length classes and are expressed as percent of total analyzed contacts in each cell line ($n = 85-98$ contacts).

(F) Representative images of long contacts between mitochondria and melanosomes in *Oa1*-KO+hOA1 melanocytes. Gold particles indicate OA1 staining. Mito, mitochondria; I-IV, melanosomes stage I to IV. Scale bar represents 0.5 μ m.

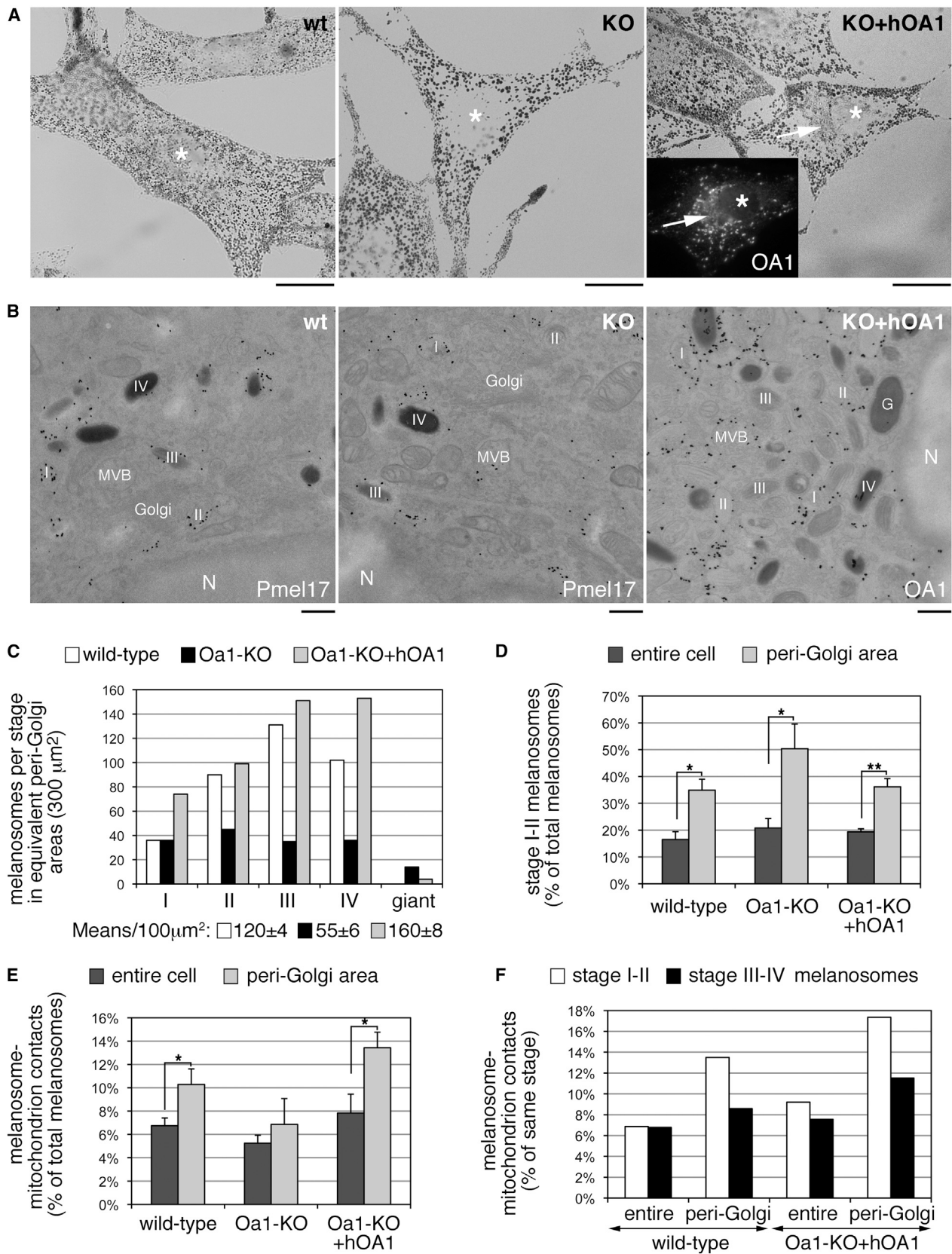


Figure 5. The Perinuclear Area Is Enriched in Immature Melanosomes and Melanosome-Mitochondrion Contacts

Melanocytes were fixed and stained with antibodies to endogenous Pmel17 (wild-type and Oa1-KO) or OA1 (Oa1-KO+hOA1) and processed for IF (A) and CLEM (B-F).

(legend continued on next page)

involved in the interorganellar connection. We observed that, although most contacts measured 100–300 nm (corresponding to about 10%–20% of the melanosomal perimeter), a fraction of them showed a longer extension up to more than 400 nm (Figure 4E). These very long contacts were particularly frequent (20% of total) in *Oa1*-KO+hOA1 melanocytes, where they were characterized by striking images of melanosomes strictly adherent or “embraced” by mitochondria, which were rarely observed in either wild-type or *Oa1*-KO cells (Figure 4F).

Altogether, these findings indicate that OA1 not only rescues the *Oa1*-KO phenotype but also appears to actively enhance the frequency and length of melanosome-mitochondrion juxtapositions. Although it is unlikely that it functions as a true tether, OA1 could act through its ability to stimulate melanogenesis, suggesting that the interorganellar connections might be required and/or generated during melanosome biogenesis.

Melanosome Biogenesis in the Perinuclear Area Correlates with Increased Melanosome-Mitochondrion Interactions

Melanosome maturation occurs concomitantly with progressive transport of the organelles from the central cytoplasm toward the cell periphery, implying a different enrichment of early versus late melanosomes in the two subcellular locations; however, precise quantifications of melanosomal stages in the perinuclear area are lacking. Wild-type melanocytes typically show an even distribution of melanosomes over the entire cell area, whereas *Oa1*-KO cells display an apparently “empty” central region (Figure 5A) [23]. By contrast, *Oa1*-KO+hOA1 melanocytes are characterized by the accumulation of tiny and lightly pigmented organelles, most likely newly formed, in the perinuclear/Golgi area, where OA1 staining is also enriched (Figure 5A; KO+hOA1, arrow) [23]. To demonstrate that new melanosome biogenesis, either at steady state or upon melanogenesis rescue by OA1 re-expression, proceeds from the perinuclear/Golgi region, we performed a quantitative ultrastructural analysis by CLEM on cytoplasmic areas within 10 μm from the nucleus and containing the Golgi apparatus (hereafter defined as peri-Golgi area).

In wild-type melanocytes, the peri-Golgi region contained melanosomes at all stages, with progressive increase of organelle number with maturation. However, compared with the pattern observed in the entire cell, immature organelles were considerably enriched, whereas fully pigmented stage IV melanosomes were relatively less abundant (Figures 5B and 5C). By contrast, in *Oa1*-KO cells, the peri-Golgi region appeared deprived of melanosomes and the number of organelles failed to increase at later maturation stages (Figures 5B and 5C). Importantly, reintroduction of OA1 in *Oa1*-KO cells

rescued melanosome density in the peri-Golgi area by generating an abundant perinuclear cohort of mainly immature melanosomes, tightly packed near the nucleus and labeled by exogenous OA1 (Figures 5B and 5C). Consistently, quantification of nonpigmented versus pigmented melanosomes revealed that the peri-Golgi area contains almost twice the number of stage I and II organelles as compared to the entire cell in all cell types (Figure 5D). Thus, the enrichment of early stages both at steady state and upon melanogenesis stimulation in *Oa1*-KO+hOA1 cells indicate that the perinuclear area surrounding the Golgi apparatus represents a critical site for new melanosome formation.

To evaluate whether the initial phase of melanosome biogenesis also corresponded to a higher probability of organelles to interact with mitochondria, we compared the frequency of melanosome-mitochondrion contacts in the peri-Golgi cytoplasm versus the entire cell. As shown in Figure 5E, whereas in *Oa1*-KO melanocytes the contact frequency remained similarly low in both cell regions, consistent with their defective organellogenesis, both in wild-type and *Oa1*-KO+hOA1 cells the interorganellar contacts were significantly more frequent in the peri-Golgi area. In this region, the higher propensity to form interorganellar interactions was particularly evident for early, nonpigmented stages I and II melanosomes as compared to late, pigmented stages III and IV (about 1.5 times; Figure 5F), despite the fact that the former represent less than 40% of all organelles (Figure 5D). Altogether, these results indicate that the newly generated melanosomes concentrated in the peri-Golgi region are more prone to interact with mitochondria, suggesting that the latter might play a critical role in particular at the early steps of organelle biogenesis.

Proper Stimulation of Melanosome Biogenesis by OA1 Requires *Mfn2* and Mitochondrial ATP

Rescue of the *Oa1*-KO phenotype in *Oa1*-KO+hOA1 cells implies the acute stimulation of new melanosome biogenesis and correlates with an increased frequency and length of contacts (Figures 4 and 5). Therefore, we exploited this inducible organellogenesis model to assess the role of melanosome-mitochondrion interactions in active melanogenesis. First, we tested whether knockdown of *Mfn2* in *Oa1*-KO cells, prior to OA1 expression, could interfere with the rescue of melanosome biogenesis. We found that silencing of *Mfn2* did not affect mitochondrial polarization (Figure S3F), yet significantly reduced the fraction of transfected cells showing the typical perinuclear accumulation of melanosomes induced by OA1 (Figure 6A). These findings suggest that *Mfn2* is critical for melanogenesis, possibly through its role in the formation of the interorganellar connections.

- (A) Representative bright-field images of melanocytes displaying the distribution of pigmented melanosomes. Asterisks indicate the position of the nucleus. Inset in *Oa1*-KO+hOA1 shows the exogenous OA1 staining, mostly concentrated in the perinuclear area. Arrows, melanosome and OA1 accumulation in the peri-Golgi area. Scale bars represent 15 μm .
- (B) Representative EM images of the peri-Golgi area from the same cell types as in (A). N, nucleus; MVB, multivesicular body; I–IV, melanosomal stages; G, giant melanosome. Scale bars represent 0.5 μm .
- (C) Quantification of melanosomes per maturation stage, as defined by EM analysis, in equivalent peri-Golgi areas, obtained from 15 fields and 3 different cells in each cell line. Data are expressed as raw melanosome numbers in 300 μm^2 . Mean \pm SEM of total melanosomes in 100 μm^2 are given below. $n = 3$ independent cells. $p < 0.01$ wild-type versus KO; $p < 0.05$ wild-type versus KO+hOA1.
- (D) Relative abundance of immature stages I–II in the entire cell versus the peri-Golgi area. Data are expressed as percent of total melanosomes in each cell line and considered area and represent the mean \pm SEM of 3–5 independent cells. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.
- (E) Quantification of contacts between melanosomes and mitochondria in the entire cell versus the peri-Golgi area. Data are expressed as percent of total melanosomes in each cell line and considered area and represent the mean \pm SEM of 3–5 independent cells. * $p < 0.05$.
- (F) Same experimental data as in (E) for wild-type and *Oa1*-KO+hOA1 melanocytes, pulled and expressed separately as percent of stage I–II or III–IV melanosomes in the entire cell or the peri-Golgi area.

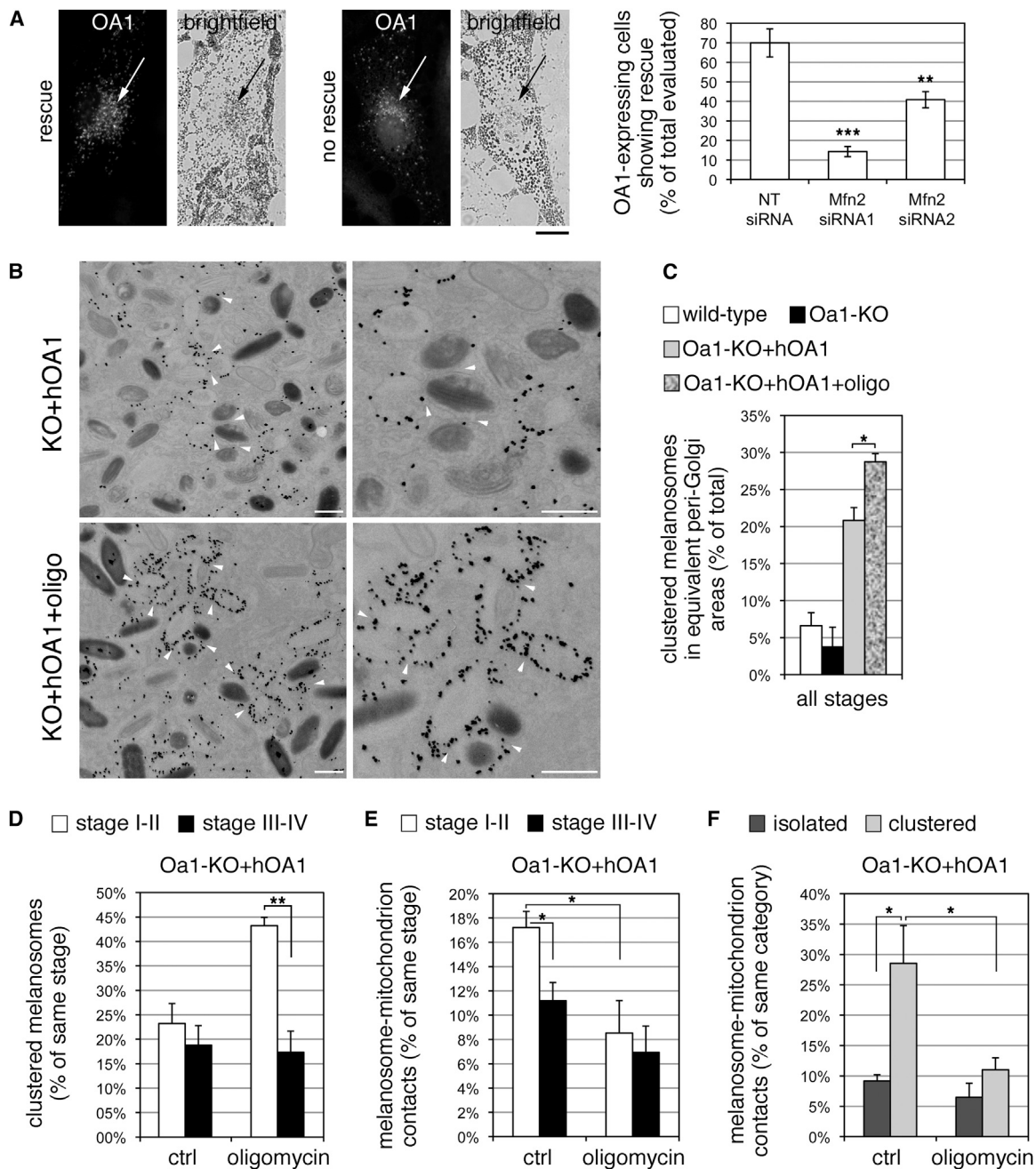


Figure 6. Mfn2 and Mitochondrial ATP Are Required for Melanosome Biogenesis

(A) *Oa1*-KO melanocytes were treated with siRNAs against Mfn2 or nontargeting (NT) siRNA 24 hr prior to transfection with the OA1 plasmid, and phenotype rescue (appearance of a perinuclear concentration of organelles colocalizing with the OA1 staining; arrows) was evaluated 48 hr posttransfection. Representative pictures and quantifications are shown. Data are expressed as percent of total evaluated melanocytes and represent the mean \pm SD of 4 independent experiments. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (versus NT siRNA). Scale bar represents 10 μ m.

(B–F) *Oa1*-KO melanocytes were transfected with the OA1 plasmid, treated or not with the ATP synthase inhibitor oligomycin 24 hr posttransfection, and processed for CLEM with gold-labeling for OA1 48 hr posttransfection.

(B) Representative EM images of the peri-Golgi area, showing stimulation of melanosome biogenesis and the presence of clustered melanosomes, more numerous in oligomycin-treated cells (+ oligo). Arrowheads point at shared membranes between clustered melanosomes. Scale bars represent 0.5 μ m.

(C) Quantification of clustered melanosomes in the peri-Golgi area of *Oa1*-KO+hOA1 melanocytes, either untreated or treated with oligomycin, as compared with wild-type and *Oa1*-KO cells.

(D) Quantification of clustered melanosomes in treated or untreated *Oa1*-KO+hOA1 melanocytes as in (C), expressed separately as percent of stage I–II or III–IV melanosomes.

(E) Quantification of melanosome-mitochondrion contacts in the peri-Golgi area of treated or untreated *Oa1*-KO+hOA1 melanocytes, expressed as percent of stage I–II or III–IV melanosomes.

(F) Quantification of melanosome-mitochondrion contacts in the peri-Golgi area of treated or untreated *Oa1*-KO+hOA1 melanocytes, expressed as percent of isolated or clustered melanosomes.

Data in (C)–(F) represent the mean \pm SEM of 3 independent cells, each analyzed over 100 μ m² of peri-Golgi area. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. See also Figure S4.

Because melanosome biogenesis comprises a number of potentially energy-consuming events and mitochondria represent the main intracellular site for ATP production, we next tested whether proximity to mitochondria may be relevant for the supply of ATP required for melanogenesis. Twenty-four hours after transfection, *Oa1*-KO+hOA1 melanocytes were incubated with or without oligomycin, a mitochondrial ATP synthase inhibitor. In these conditions, oligomycin did not interfere with the expression of OA1 nor with its stimulation of new melanosome formation; however, it induced concentration of the OA1-positive compartment, as visualized by IF analysis, in the peri-Golgi area (Figure S4). To quantify this phenotype, we calculated the ratio between the OA1 immunofluorescent signal in the peri-Golgi area and in the entire cell and observed a significant increase in oligomycin-treated versus untreated cells (to about 150%; Figure S4). A similar behavior was displayed by Pmel17-positive organelles, mostly corresponding to immature melanosomes (not shown).

In addition to canonical melanosomes, which are usually well separated from one another, ultrastructural analysis of melanocytes revealed the presence of single membrane-delimited melanosomes partially sharing their membrane with other surrounding melanosomes, hereafter defined as “clustered” melanosomes (Figure 6B). These figures were rarely observed in wild-type (and *Oa1*-KO) melanocytes, although they appeared more frequent in the peri-Golgi region (2.9% versus 6.6% of all organelles in the entire cell versus peri-Golgi area, respectively). By contrast, clustered melanosomes were abundant in the peri-Golgi region of *Oa1*-KO+hOA1 cells, where they represented more than 20% of all organelles (Figures 6B and 6C), despite the limited difference in organelle density compared to wild-type cells (Figure 5C). These observations suggest that clustered organelles represent a physiological intermediate step of organellogenesis, which accumulate in *Oa1*-KO+hOA1 melanocytes, due to the acute stimulation of melanosome biogenesis. Interestingly, although both early and late melanosomes could similarly participate to clusters, the category of clustered organelles per se showed a particularly high propensity to form melanosome-mitochondrion contacts (Figures 6D and 6F; ctrl). By contrast, isolated melanosomes (representing 80% of total) displayed a considerably lower ability to connect to mitochondria (Figure 6F; ctrl).

Upon oligomycin treatment, the percent of clustered melanosomes was significantly further enhanced to almost 30%, in the absence of organelle density changes ($167 \pm 8/100 \mu\text{m}^2$ organelles in treated cells versus $160 \pm 8/100 \mu\text{m}^2$ in controls; $n = 3$ cells) (Figures 6B and 6C). In particular, this increase was uniquely due to a dramatic increase (almost doubling) of early clustered melanosomes, because almost 45% of stage I and II melanosomes were associated whereas no significant effects were observed on stage III and IV organelles (Figure 6D; oligomycin). Moreover, whereas in untreated *Oa1*-KO+hOA1 cells melanosome-mitochondrion contacts significantly prevail in immature melanosomal stages I-II and in clustered organelles, upon oligomycin treatment the frequency of contacts was overall reduced by 40%, with a greater effect on early and clustered melanosomes (Figures 6E and 6F; ctrl versus oligomycin).

These findings suggest that the melanosome-mitochondrion interorganellar connections are more critical at the early and clustered melanosomes, both representing a minority of the overall melanosome population, yet undergoing the greater structural changes. Inhibition of mitochondrial ATP synthesis during active melanogenesis affects in particular

these categories, reducing their engagement into membrane contacts with mitochondria and inducing a remarkable increase of early clustered organelles. Thus, both *Mfn2* silencing and inhibition of mitochondrial ATP synthase, possibly via their negative impact on contact formation, interfere with the proper activation and execution of melanosome biogenesis.

Discussion

The subcellular distribution of organelles and their spatial organization relative to each other is often necessary for their proper function and reciprocal crosstalk. Here we show that a fraction of mitochondria is located in direct contact with melanosomes, that these interorganellar connections are mediated by fibrillar bridges, and that they are labeled by and require *Mfn2*, similarly to the ER-mitochondria juxtaposition. Moreover, we show that melanosome-mitochondrion contacts are associated to the melanogenesis process, because they are more abundant in the perinuclear area, where new melanosomes are generated, and they are enhanced by the acute stimulation of melanosome biogenesis, as by OA1 re-expression in *Oa1*-KO cells. Conversely, the interorganellar connections are reduced in conditions of abnormal melanosome biogenesis, either due to a primary melanosomal defect (*Oa1*-KO melanocytes) or due to a primary mitochondrial dysfunction (*Mfn2* silencing or inhibition of ATP synthase). We propose that the physiological function of melanosome-mitochondrion contacts is relevant for organelle biogenesis and that changes involving these connections might play a role in UV-induced pigmentation as well as in the pathogenesis of albinism or other pigmentary disorders.

Similarly to the physical juxtaposition joining ER and mitochondria, which generates cytosolic microdomains for calcium signaling [32, 33], melanosome-mitochondrion contacts might allow the localized (“private”) exchange of small molecules between the two organelles. Melanosomes are considered acidic calcium stores [34–36] and mitochondria are both sensors and regulators of calcium signaling [8], and therefore it is possible that contacts serve as exchange sites of calcium. Furthermore, melanosome-mitochondrion contacts might contribute to the control of the redox status in melanocytes, by tethering the antioxidant and free radical scavenging capacity of melanin [37] to the production of reactive oxygen species by mitochondria. Finally, melanosome-mitochondrion connections could ensure a local and timely supply of ATP to melanosomal categories with higher energy requirements, necessary to regulate membrane traffic, organelle transport, melanin synthesis, or intramelanosomal pH.

The reduction of melanosome-mitochondrion contacts in *Mfn2* knockdown and oligomycin-treated cells is associated to specific alterations of the mitochondrial morphology (mitochondrial fragmentation and reduction of mitochondrial size with formation of ring-like organelles, respectively), in agreement with previous reports [10, 38]. Moreover, the mitochondrial network appears more fragmented in *Oa1*-KO compared to wild-type melanocytes, despite the absence of significant differences in the mitochondrial potential (T.D. and R.V., unpublished results), suggesting that fragmentation might be related to the metabolic status of these cells [39]. Although we cannot exclude that alterations of mitochondrial morphology could affect melanosome-mitochondrion contacts, several results (for instance, relative to different melanosomal stages and categories, and OA1 labeling) are independent of this variable, because they were obtained within the

same cells. Of relevance, mitochondria fragmentation per se is not sufficient to reduce the ER-mitochondria juxtaposition [10, 40].

It also remains unclear how melanosomes and mitochondria manage their interactions considering their high motility along microtubules. It is possible that contacts are dynamic and take place during less motile intervals or in a “kiss and run” fashion. However, live confocal microscopy studies have revealed that the ER-mitochondria connections remain intact even as the two organelles move along acetylated microtubules [9, 41]. Whether similar mechanisms also work for the melanosome-mitochondrion connections is an intriguing hypothesis deserving future investigation.

Experimental Procedures

Correlative Light-Immuno Electron Microscopy

Correlative light-electron microscopy (CLEM) was performed as described [27] (Figures S1B and S1C). We identified stage I melanosomes as specialized early endosomes having a translucent lumen and a variable number of internal vesicles positive for Pmel17 (or OA1 in *Oa1-KO+hOA1* cells); all other maturation stages were evaluated based on morphological criteria, as described [11, 12] (Figure S1D). Fully pigmented melanosomes having both length and width longer than 400 nm or one dimension bigger than 1 μm were assigned to the giant category. Melanosome-mitochondrion contacts were defined as situations in which either the membranes of one or both the organelles were not visible or touched each other (Figures 1C–1G) or the two organelles overlapped [42] (Figure 1H).

Morphometric Analysis

Quantification of the Mfn2 immunogold labeling density was performed according to [43]. Compartment size was estimated by superimposing a lattice of test lines (outdistanced by 200 nm) to each microscopic field and counting the intersections with mitochondrial profiles; quantifications were independently confirmed by manual contouring and measurement with ImageJ. Gold particles were assigned to each “compartment” if they were within a distance of 25 nm from its membranes.

Statistical Analysis

Calculations and statistical analyses were carried out with Microsoft Excel. Statistical significance was evaluated by applying the unpaired two-tail Student's *t* test, unless otherwise indicated (Figures 4D and S3C), using the following star code: **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

Supplemental Information

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, four figures, and two movies and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.01.007>.

Author Contributions

T.D. designed and performed most experiments and analyzed quantitative data. I.H. and G.R. performed tomography on high-pressure-frozen and freeze-substituted MNT1 cells. R.V. and G.C. provided reagents, technical support, and information for experiments on mitochondria. C.T. provided technical advice and instrumentation and contributed to EM data experimental design and evaluation. M.V.S. supervised the project, designed experiments, and analyzed quantitative data. T.D. and M.V.S. wrote the manuscript in collaboration with G.C., G.R., and C.T.

Acknowledgments

We are grateful to Paolo Antonelli for help with the statistical analysis and to Andrea Raimondi for help with the tomographic reconstruction. Part of this work was carried out in Alembic, an advanced microscopy facility of the Ospedale San Raffaele, Milan, Italy. Financial support from Telethon-Italy (GGP08156 to M.V.S. and GGP08138 to G.C.); the Vision of Children Foundation, San Diego, CA, USA (to M.V.S.); the National Ataxia Foundation, Minneapolis, MN, USA (to G.C.); the Institut Curie, the Centre National de la Recherche Scientifique, and the Fondation ARC pour la Recherche sur le

Cancer (to G.R.); and the Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC) and the Fondazione San Paolo (to C.T.) is gratefully acknowledged.

Received: August 2, 2012

Revised: November 15, 2013

Accepted: January 3, 2014

Published: January 30, 2014

References

1. Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 872–884.
2. MacAskill, A.F., Atkin, T.A., and Kittler, J.T. (2010). Mitochondrial trafficking and the provision of energy and calcium buffering at excitatory synapses. *Eur. J. Neurosci.* **32**, 231–240.
3. Quintana, A., Schwindling, C., Wenning, A.S., Becherer, U., Rettig, J., Schwarz, E.C., and Hoth, M. (2007). T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 14418–14423.
4. Abarca-Rojano, E., Muñiz-Hernández, S., Moreno-Altamirano, M.M., Mondragón-Flores, R., Enriquez-Rincón, F., and Sánchez-García, F.J. (2009). Re-organization of mitochondria at the NK cell immune synapse. *Immunol. Lett.* **122**, 18–25.
5. Li, Z., Okamoto, K., Hayashi, Y., and Sheng, M. (2004). The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* **119**, 873–887.
6. Csordás, G., Renken, C., Várnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K.F., Balla, T., Mannella, C.A., and Hajnóczky, G. (2006). Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J. Cell Biol.* **174**, 915–921.
7. de Brito, O.M., and Scorrano, L. (2010). An intimate liaison: spatial organization of the endoplasmic reticulum-mitochondria relationship. *EMBO J.* **29**, 2715–2723.
8. Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., and Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 566–578.
9. Rowland, A.A., and Voeltz, G.K. (2012). Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 607–625.
10. de Brito, O.M., and Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* **456**, 605–610.
11. Seiji, M., Fitzpatrick, T.B., Simpson, R.T., and Birbeck, M.S. (1963). Chemical composition and terminology of specialized organelles (melanosomes and melanin granules) in mammalian melanocytes. *Nature* **197**, 1082–1084.
12. Raposo, G., Tenza, D., Murphy, D.M., Berson, J.F., and Marks, M.S. (2001). Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. *J. Cell Biol.* **152**, 809–824.
13. April, C.S., and Barsh, G.S. (2007). Distinct pigmentary and melanocortin 1 receptor-dependent components of cutaneous defense against ultraviolet radiation. *PLoS Genet.* **3**, e9.
14. Le Pape, E., Passeron, T., Giubellino, A., Valencia, J.C., Wolber, R., and Hearing, V.J. (2009). Microarray analysis sheds light on the dedifferentiating role of agouti signal protein in murine melanocytes via the *Mc1r*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 1802–1807.
15. Snyder, J.R., Hall, A., Ni-Komatsu, L., Khersonsky, S.M., Chang, Y.T., and Orlow, S.J. (2005). Dissection of melanogenesis with small molecules identifies prohibitin as a regulator. *Chem. Biol.* **12**, 477–484.
16. Williams, D., Jung, D.W., Khersonsky, S.M., Heidary, N., Chang, Y.T., and Orlow, S.J. (2004). Identification of compounds that bind mitochondrial F1F0 ATPase by screening a triazine library for correction of albinism. *Chem. Biol.* **11**, 1251–1259.
17. Dell'anna, M.L., and Picardo, M. (2006). A review and a new hypothesis for non-immunological pathogenetic mechanisms in vitiligo. *Pigment Cell Res.* **19**, 406–411.
18. Hirobe, T., Ishizuka, K., Ogawa, S., and Abe, H. (2008). Mitochondria are more numerous and smaller in pink-eyed dilution melanoblasts and melanocytes than in wild-type melanocytes in the neonatal mouse epidermis. *Zoolog. Sci.* **25**, 1057–1065.
19. Bassi, M.T., Schiaffino, M.V., Renieri, A., De Nigris, F., Galli, L., Bruttini, M., Gebbia, M., Bergen, A.A.B., Lewis, R.A., and Ballabio, A. (1995). Cloning of the gene for ocular albinism type 1 from the distal short arm of the X chromosome. *Nat. Genet.* **10**, 13–19.

20. O'Donnell, F.E., Jr., Hambrick, G.W., Jr., Green, W.R., Iliff, W.J., and Stone, D.L. (1976). X-linked ocular albinism. An oculocutaneous macro-melanosomal disorder. *Arch. Ophthalmol.* **94**, 1883–1892.
21. Incerti, B., Cortese, K., Pizzigoni, A., Surace, E.M., Varani, S., Coppola, M., Jeffery, G., Seeliger, M., Jaissle, G., Bennett, D.C., et al. (2000). Oa1 knock-out: new insights on the pathogenesis of ocular albinism type 1. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2781–2788.
22. Cortese, K., Giordano, F., Surace, E.M., Venturi, C., Ballabio, A., Tacchetti, C., and Marigo, V. (2005). The ocular albinism type 1 (OA1) gene controls melanosome maturation and size. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**, 4358–4364.
23. Palmisano, I., Bagnato, P., Palmigiano, A., Innamorati, G., Rotondo, G., Altmare, D., Venturi, C., Sviderskaya, E.V., Piccirillo, R., Coppola, M., et al. (2008). The ocular albinism type 1 protein, an intracellular G protein-coupled receptor, regulates melanosome transport in pigment cells. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 3487–3501.
24. Schiaffino, M.V., Baschiroto, C., Pellegrini, G., Montalti, S., Tacchetti, C., De Luca, M., and Ballabio, A. (1996). The ocular albinism type 1 gene product is a membrane glycoprotein localized to melanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9055–9060.
25. Piccirillo, R., Palmisano, I., Innamorati, G., Bagnato, P., Altmare, D., and Schiaffino, M.V. (2006). An unconventional dileucine-based motif and a novel cytosolic motif are required for the lysosomal and melanosomal targeting of OA1. *J. Cell Sci.* **119**, 2003–2014.
26. Giordano, F., Bonetti, C., Surace, E.M., Marigo, V., and Raposo, G. (2009). The ocular albinism type 1 (OA1) G-protein-coupled receptor functions with MART-1 at early stages of melanogenesis to control melanosome identity and composition. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 4530–4545.
27. Polishchuk, R.S., Polishchuk, E.V., Marra, P., Alberti, S., Buccione, R., Luini, A., and Mironov, A.A. (2000). Correlative light-electron microscopy reveals the tubular-saccular ultrastructure of carriers operating between Golgi apparatus and plasma membrane. *J. Cell Biol.* **148**, 45–58.
28. Cosson, P., Marchetti, A., Ravazzola, M., and Orci, L. (2012). Mitofusin-2 independent juxtaposition of endoplasmic reticulum and mitochondria: an ultrastructural study. *PLoS ONE* **7**, e46293.
29. Boncompagni, S., Rossi, A.E., Micaroni, M., Beznoussenko, G.V., Polishchuk, R.S., Dirksen, R.T., and Protasi, F. (2009). Mitochondria are linked to calcium stores in striated muscle by developmentally regulated tethering structures. *Mol. Biol. Cell* **20**, 1058–1067.
30. Hurbain, I., Geerts, W.J., Boudier, T., Marco, S., Verkleij, A.J., Marks, M.S., and Raposo, G. (2008). Electron tomography of early melanosomes: implications for melanogenesis and the generation of fibrillar amyloid sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 19726–19731.
31. Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., and Chan, D.C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* **160**, 189–200.
32. Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M., and Pozzan, T. (1993). Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* **262**, 744–747.
33. Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A., and Pozzan, T. (1998). Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science* **280**, 1763–1766.
34. Bush, W.D., and Simon, J.D. (2007). Quantification of Ca(2+) binding to melanin supports the hypothesis that melanosomes serve a functional role in regulating calcium homeostasis. *Pigment Cell Res.* **20**, 134–139.
35. Hoogduijn, M.J., Smit, N.P., van der Laarse, A., van Nieuwpoort, A.F., Wood, J.M., and Thody, A.J. (2003). Melanin has a role in Ca²⁺ homeostasis in human melanocytes. *Pigment Cell Res.* **16**, 127–132.
36. Patel, S., and Docampo, R. (2010). Acidic calcium stores open for business: expanding the potential for intracellular Ca²⁺ signaling. *Trends Cell Biol.* **20**, 277–286.
37. Meredith, P., and Sarna, T. (2006). The physical and chemical properties of eumelanin. *Pigment Cell Res.* **19**, 572–594.
38. Giedt, R.J., Pfeiffer, D.R., Matzavinos, A., Kao, C.Y., and Alevriadou, B.R. (2012). Mitochondrial dynamics and motility inside living vascular endothelial cells: role of bioenergetics. *Ann. Biomed. Eng.* **40**, 1903–1916.
39. Hyde, B.B., Twig, G., and Shirihai, O.S. (2010). Organellar vs cellular control of mitochondrial dynamics. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21**, 575–581.
40. Maltecca, F., De Stefani, D., Cassina, L., Consolato, F., Wasilewski, M., Scorrano, L., Rizzuto, R., and Casari, G. (2012). Respiratory dysfunction by AFG3L2 deficiency causes decreased mitochondrial calcium uptake via organellar network fragmentation. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 3858–3870.
41. Friedman, J.R., Webster, B.M., Mastrorade, D.N., Verhey, K.J., and Voeltz, G.K. (2010). ER sliding dynamics and ER-mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *J. Cell Biol.* **190**, 363–375.
42. Hailey, D.W., Rambold, A.S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P.K., and Lippincott-Schwartz, J. (2010). Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* **141**, 656–667.
43. Mayhew, T., Griffiths, G., Habermann, A., Lucocq, J., Emre, N., and Webster, P. (2003). A simpler way of comparing the labelling densities of cellular compartments illustrated using data from VPARP and LAMP-1 immunogold labelling experiments. *Histochem. Cell Biol.* **119**, 333–341.