Ekaia, 2026, 49, 155-170
https://doi.org/10.1387/ekaia.27537

ekaia
ZIENTZIA eta TEKNOLOGIA ALDIZKARIA

ISSN 0214-9001 – eISSN 2444-3255

Bereizmen handiko fluoreszentzia-mikroskopiaren aurrerapenak organuluen mintzen arteko kontaktu-guneen azterketarako

(Advances in Super-Resolution Fluorescence Microscopy for Investigating Interorganelle Membrane Contact Sites)

Iker Diez-Arteagoitia, June Olazar-Intxausti[1], *Maier Lorizate*[1], *Francesc-Xabier Contreras*[1,2,3], *Jon Ander Nieto Garai*[1]*, *Oihana Terrones*[4]*

[1] Biokimika eta Biologia Molekularra Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (EHU)
[2] Biofisika Institutua (EHU, CSIC)
[3] Ikerbasque, Basque Foundation of Science
[4] Kimika Aplikatua Saila, Kimika Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (EHU)

* Lanaren zuzendaritzan ekarpen berdina

LABURPENA: Mintzen arteko Kontaktu Guneak (MKG) bi organuluren mintzak elkarrengandik hurbil dauden eskualde dinamikoak dira. Aingura-proteinen bidez mantentzen dira, eta, bertan, proteina eta lipido espezifikoak aurki daitezke. Berriki, MKGen inguruko azterketak gero eta ohikoagoak bihurtu dira betetzen dituzten funtzio zelular garrantzitsuengatik (hala nola ioien eta fosfolipidoen homeostasi prozesuak, eta organulu ezberdinen fisio-eta fusio-prozesuak erregulatzea). Gainera, giza osasunean ere rol garrantzitsua dutela ikusi da; izan ere, hainbat gaixotasunen garapenarekin erlazionatuta daude; esaterako, minbiziarekin eta neuroendekapenezko gaixotasunekin. Azken urteotan, MKGen azterketarako bereizmen handiko fluoreszentzia-mikroskopia (BHFM) gailendu da beste teknika batzuen artetik. Lan honetan, MKGen ezaugarri eta funtzio biologikoak deskribatu eta laburbildu dira, eta horien azterketarako eraginkorrak izan daitezkeen BHFM tekniken analisi sakona egin da. Gainera, teknika bakoitzaren abantailak eta mugak jorratu dira. Amaitzeko, ikerketa-helburua eta teknika bakoitzaren ezaugarriak kontuan harturik, BHFM teknika egokiena aukeratzeko gida bat garatu dugu.

GAKO-HITZAK: Bereizmen handiko fluoreszentzia mikroskopia, organuluen arteko kontaktu-guneak, organuluak.

ABSTRACT: *Membrane Contact Sites (MCS) are regions where the membranes of two adjacent organelles are positioned in close proximity. They are held together by tether proteins, and are defined by the presence of characteristic proteins and lipids. Recently, studies on MCS have become increasingly common due to the important cellular functions they perform, such as regulation of ion and phospholipid homeostasis and organelle fission and fusion processes. Additionally, an important role in human health has also been observed; in fact, they are linked to the development of various diseases, such as cancer and neurodegenerative disorders. In recent years, super-resolution fluorescence microscopy (SRFM) has emerged as a leading technique, proving to be very useful for the study of MCS. This work describes and summarizes the characteristics and biological functions of MCS and provides an in-depth analysis of the SRFM techniques that may be effective for their study. Information regarding each technique along with their advantages and limitations, has been synthesized. Finally, we have generated a guide to facilitate the selection of the most suitable SRFM method, depending on the experimental objectives and the characteristics of the technique.*

KEYWORDS: Super-resolution fluorescence microscopy, interorganelle contact sites, organelles.

* ***Harremanetan jartzeko/Corresponding author:*** Jon Ander Nieto Garai, Biokimika eta Biologia Molekularra Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Sarriena Auzoa, z.g. (48940 Leioa). https://orcid.org/0000-0002-9808-6943, jonander.nieto@ehu.eus

Oihana Terrones, Kimika Aplikatua Saila, Kimika Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Manuel Lardizabal Pasealekua, 3, 20018 Donostia. https://orcid.org/0000-0001-7421-6486, oihana.terrones@ehu.eus

Nola aipatu/How to cite: Diez-Arteagoitia, Iker; Olazar-Intxausti, June; Lorizate, Maier; Contreras, Francesc-Xabier; Nieto Garai, Jon Ander; Terrones, Oihana (2026). «Bereizmen handiko fluoreszentzia-mikroskopiaren aurrerapenak organuluen mintzen arteko kontaktu-guneen azterketarako», *Ekaia*, 49, 2026, DOI: https://doi.org/10.1387/ekaia.27537

Jasoa: maiatzak 13, 2025; Onartua: uztailak 30, 2025

ISSN 0214-9001-eISSN 2444-3225 / © UPV/EHU Press

Lan hau *Creative Commons Aitortu-EzKomertziala-PartekatuBerdin 4.0 Nazioartekoa* lizentzia baten mende dago

1. **SARRERA**

Gaur egun testuliburu askok oraindik erakusten dituzten organulu isolatu eta ondo definituen irudiak zaharkituta geratu dira. Bereizmen handiko irudi-tekniken garapenak zelula-barneko egiturak zuzenean ikustea ahalbidetu du, eta elkarrekintza estuan dauden organuluez eratutako sare oso dinamiko eta konplexua azaleratu dute teknika horiek.

Organuluen arteko hurbiltasuna 1950eko hamarkadaren amaieran deskribatu zen lehenengo aldiz [1], baina organuluen arteko kontaktu-guneei ez zitzaien funtziorik esleitu ia 40 urte geroago arte, zeren orduan fosfolipido ezberdinen sintesia eta garraioa erretikulu endoplasmatikoaren (EE) eta mitokondrien arteko kontaktu-guneetan gertatzen zela aurkitu baitzen [2]. Aurkikuntza horrek ikerketarako interesa konpartimentu bakoitzaren ezaugarri bereizgarria identifikatzetik organuluen arteko mintzen kontaktu-guneen (MKG) azterketa molekular eta funtzionalera aldatu zuen. Azken urteotan bereziki, eskualde horien azterketak interes handia piztu du, eta egile batzuek ikerketa-eremu berri bat ere proposatu dute, *Kontaktologia* izenekoa [3]. MKGak bi organuluen mintzen arteko hurbiltasun estuko guneak dira (10 eta 80 nm bitartekoak) [4]. MKGen egitura mantentzeko zubi molekularrak behar dira. Aingura-proteinek (ingelesez *tether proteins*) betetzen dituzte funtzio horiek, elkarrekintzan diharduten organuluen arteko lotura fisikoak sortzeaz arduratzen baitira [5]. Egiturazko funtzioa duten proteinez gain, MKGek proteina-konposizio bereizgarria dute, eta proteina horiek hainbat prozesu fisiologikotarako aproposa den gunea sortzen dute. MKGan aurki daitezkeen proteinek dituzten funtzioak bi taldetan sailka daitezke: i) molekulen noranzko biko garraioa, hala nola Ca^{2+} edo fosfolipidoak, eta (ii) ingurune-seinaleen transmisioa, organuluen morfologia eta biogenesia arautzen dituztenak barne [6].

Orain arte, ondoen karakterizatutako MKGak EEa inplikatzen dutenak dira. Halaber, badakigu, mitokondriez gain, mintz plasmatikoarekin (MP), Golgiren aparatuarekin, peroxisomekin, lisosomekin, lipido-tantekin eta endosomekin ere elkarreragiten duela [7].

MKGek zelula-funtzio garrantzitsuak betetzen dituztenez, horien erregulazioa funtsezkoa da, eta, beraz, disfuntzioek zelula-narriadura dakarte. MKGen disfuntzioa hainbat patologiaren sorrera eta garapenarekin erlazionatu da, hala nola diabetesarekin [8], minbiziarekin [9] eta neuroendekapenezko gaixotasunekin [10]. Horregatik guztiagatik, MKGen funtzioa, eraketa eta egonkortasuna gobernatzen duten mekanismo molekularren ezagutza fidagarriaren beharra eztabaidaezina da. Ildo horretatik, teknika berriak sortzeko edo daudenak egokitzeko ahalegin handia egiten ari da.

Bi organuluren (EE eta mitokondriaren) arteko elkarrekintza adierazten zuen lehen ebidentzia mikroskopia elektronikoari (ME) esker lortu

zen [1]. Nahiz eta aurkikuntzarako funtsezkoa izan eta MKGak aztertzeko erabili ohi den, MEak finkapen kimikoa behar du, eta horrek, alde batetik, azterketa dinamikoak ekiditen ditu, eta, bestetik, organuluen arteko aposizioan eragina izan dezake, MKGen kopurua murriztuz. Mikroskopia elektronikoaren muga horiek gainditzeko oso erabilgarria den beste teknika bat fluoreszentziazko mikroskopia konfokala da, zeren azkarra, maneiatzen erraza eta zelula bizietako neurketetan aplika baitaiteke. Hala ere, mikroskopia konfokal bidezko seinaleen detekzioak berezko arazoa du: MKG gehienen tamainak difrakzio optikoak ezarritako bereizmen-mugatik behera daude. Azkenaldiko aurrerapen batzuek hobekuntza apalak ahalbidetu dituzte konfigurazio konfokalen albo-bereizmenean, eta espezifikoki aplikatu dira MKGak aztertzeko. Cook eta lankideek egindako ikerketan, zitomegalobirusak eragindako infekzioaren ondorioz gertatutako hainbat MKGren berregituraketak ezaugarritu zituzten. Birusak mitokondria-EE arteko MKGak erabiltzen ditu egitura espezifikoak sortzeko, mitokondria-EE kapsulatze-egitura (MECS, ingelesez *Mitochondria-ER encapsulation Structures*) izenez ezagutzen direnak, zeinek birus-partikula berrien ekoizpenean laguntzen duten. Zitomegalobirusak eragina du EE-peroxisoma elkarrekintzetan ere, eta peroxisomaren hazkuntza eragin eta birioien mihiztadura eraginkorragoa ahalbidetzen du [11]. Hala ere, egungo mikroskopia-konfigurazio konfokal gehienek mugak dituzte MKGak aztertzeko, eta beste irudi-teknika batzuk erabili behar dira. Erronka horri aurre egiteko, bereizmen handiko mikroskopia-teknikak garatu dira, difrakzioak ezarritako 200 nm-ko bereizmen-muga gainditzeko helburuarekin. Teknika horiek difrakzio-mugatik beherako bereizmen espaziala ematen dute (20 eta 100 nm artekoa), eta, hala, MKGen egituren antolamenduari eta dinamikari buruzko informazioa eskuratzea ahalbidetu [12, 13].

2. BEREIZMEN HANDIKO FLUORESZENTZIA-MIKROSKOPIA MINTZEN ARTEKO KONTAKTU-GUNEAK AZTERTZEKO

Bereizmen handiko fluoreszentzia-mikroskopiaren (BHFM, SRFM ingelesez) barruan bereizmen espazial handiko irudiak lortzea ahalbidetzen duten hainbat teknika sailkatzen dira. Mikroskopio baten bereizmen optikoa bi objektu bereizi ahal izateko behar den gutxieneko distantzia da, eta ohiko mikroskopia optikoan argiaren difrakzioak mugatuta dago. Difrakzioak bereizmen optikoan ezarritako muga horri difrakzio-muga esaten zaio. Difrakzio-prozesuan, argia mikroskopioan barrena igarotzen da, eta leiarrarekin kontaktuan jarritakoan difraktatu egiten da. Difrakzio horrek patroi jakin bat du, *Airy* diskoak izenekoak. *Airy* diskoak erdigunean argi-intentsitate handiko eremu batez eta zentrotik urrundu ahala intentsitate txikiagoa duten eraztunez osatuta daude. Bestalde, fluoreszentziazko mikroskopian, argiaren difrakzioak eragina du bai kitzikapen-prozesuan, bai igorpen-prozesuan

ere. Kitzikapenean, laser-izpi bat objektiboan zehar bideratzen da lagineko puntu fokal batera. Prozesuan zehar, ordea, objektiboak laser-izpia difraktatzen du eta zabalagoa egitea eragiten du (460-850 nm-ko diametroa duena). Bestetik, argia bueltan igortzen denean, *Airy* diskoen eraginez, fluoroforo batek igorritako argia lausotu egiten da igorlearen inguruan distantzia jakin batean. Lausotze-eremu horri PSF/PZF (*Point Spread Function*/Puntu Zabalduaren Funtzioa) esaten zaio. Bi fluoroforo difrakzio-mugatik baino distantzia txikiagoan badaude, haien PZFak gainjarriko dira, eta objektu bakar bat gisa ikusiko ditugu. Difrakzio-mugaren formularen arabera, mikroskopio optiko arrunt batean albo-bereizmena (x-y norabidean) 200-300 nm inguruan dago, eta bereizmen axiala (z norabidean), aldiz, 500-600 nm inguruan [14]. Jakinda MKGen arteko distantzia 10-80 nm artekoa dela [4], hau da, argiaren difrakzioak ezarritako bereizmena baino txikiagoa, mikroskopio optikoak mugatuta daude haien azterketarako.

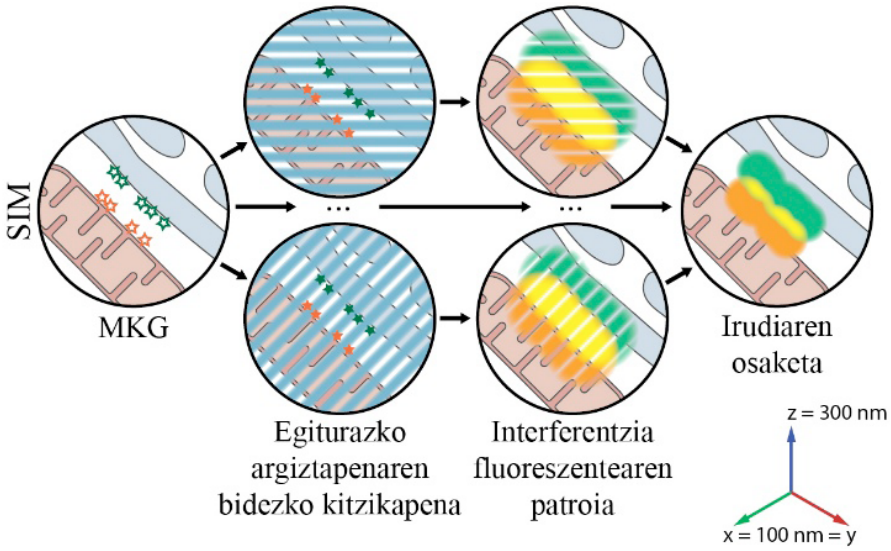
Horri aurre egiteko, BHFM bezalako teknika berrien garapena beharrezkoa izan da. Hainbat BHFM teknika daude, bakoitzak bere funtzionamendu, abantaila eta mugak dituela, baina guztiek dute ezaugarri komun bat: argiaren difrakzio-muga baino bereizmen espazial txikiagoa duen lagin biologiko baten irudiak lortzeko gai dira, eta, beraz, MKGak aztertzeko erabil daitezke. BHFM tekniken artean MKGak aztertzeko hedatuen daudenak lau hauek dira: Structured Illumination Microscopy / Argiztapen Egituratuko Mikroskopia (SIM/AEM), STimulated Emission Depletion microscopy / Bizkortutako Igorpeneko Deplezio Mikroskopia (STED/BIDM) eta Single Molecule Localization Microscopy / Molekula Bakarreko Lokalizazio Mikroskopia (SMLM/MBLM).

2.1. **Argiztapen Egituratuko Mikroskopia (SIM)**

Egiturazko Argiztapen Egituratuko Mikroskopia (ingelesez, SIM) jatorrian, sakontasunaren diskriminazio-metodo gisa garatu zen, irudi-plano bertikal ezberdinetan zeuden fokutik kanpoko ekarpenak ezabatzeko. Ondoren, bereizmen handiko SIM (ingelesez *Super-Resolution SIM*, SR-SIM) garatu zen, interferentzia-patroi periodiko bat erabiltzen duena, difrakzio-mugatik hurbil [15]. Irudi-eredu ugari sortzeko gaitasuna duenez (bolumetrikoak, laminarrak etab.), eta ohiko zunda eta markaketa fluoreszenteekin bateragarria denez, SR-SIMa zelula biziak ikertzeko bereizmen handiko mikroskopia-teknika erabiliena bihurtu da [15].

SIM teknikak lagineko egiturei buruzko bereizmen handiko informazioa eskaintzen du, bereizmen txikiko interferentzia-patroietatik abiatuta. Fluoreszentziazko mikroskopian, puntu batean dagoen fluoreszentziaren intentsitatea bi parametroren araberakoa da: kitzikapen-argiaren intentsitatearen araberakoa eta zundak puntu horretan duen dentsitatearen araberakoa. SIMen, lagina bandaka paratutako maiztasun desberdineko argiz-

tapenari esker kitzikatzen da, non intentsitate altuko eta baxuko bandak txandakatzen diren. Aurreko horiek lagineko egiturek eragindako fluoreszentzia-aldaketekin uztartzen badira interferentzia-patroien agerpena eragiten dute. Interferentzia-patroiek, era berean, zundako dentsitatearen berri eman dezakete. Hori horrela, kitzikapenezko argi-patroiak norabidez aldatuz gero, interferentzia-patroi ugari lor daitezke, eta, haien konbinazioetatik abiatuta, bereizmen handiko irudiak eraiki daitezke, 100 nm inguruko albo-bereizmenekoak [16] (1. irudia).



1. irudia. Argiztapen Egituratuko Mikroskopia (SIM). Lagina intentsitate ezberdinetako bandaz osatutako argi-patroiekin kitzikatzen da. Patroiak eragindako kitzikapena fluoroforoen dentsitatearen araberakoa izango da, eta horien interferentzia-patroiak zunden dentsitatea jakiteko erabil daitezke. Kitzikapen-argia biratu egiten da hainbat interferentzia-patroi lortzeko, eta horien konbinazioari esker bereizmen handiko irudia sortzen da. Albo-bereizmena ≈ 100 nm; bereizmen axiala ≈ 300 nm.

SIMek ez du fluoroforoaren ezta markaketa-teknika espezializatuen beharrik, sentikortasun- eta kontraste-maila altuak ditu, eta, gainera, hainbat teknika osagarrirekin konbina daiteke informazio gehigarria ateratzeko. Adibidez, teknika hau 3D irudiak berreraikitzeko erabil daiteke (SIM 3D/3D AEM), eta horrek bereizmen axiala 300 nm-ra handitzen du, eta egitura biologikoei buruzko informazio gehiago ematen du.

MKGen ikerketan, SIMen muga nagusia albo-bereizmena da, zeina 100 nm ingurura soilik heltzen den. Horrek muga horretatik behera dauden

MKGen ikerketa zailtzen du. Arestian aipatutako mugak gorabehera, teknika honek eremu zabaleko mikroskopio sinple bat baino ez du behar, laser bakar batekin erabil daiteke, ez du fluoroforo berezirik behar, eta, baldintza egokietan, denbora-bereizmen egokia eskain dezake. Bada, 3D SIM eta Angelu Txikiko Intzidentzia (ingelesez *Grazing incidence*) teknika konbinatuz (GI-SIM), hasiera batean lautzat hartu ziren EEren eremuak, oso dinamikoak diren egitura tubularrez osatuta daudela ikusi zen [17]. Gainera, GI-SIM teknikari esker, EEen eta mitokondrien arteko MKGen bitartez EEaren egitura tubular horiek mitokondriaren fisioa eta fusioa eraentzen zituztela aurkitu zen [18]. Horrez gain, ikerketa horrek agerian utzi zuen EEak MKGak erabiltzen dituela bere egitura berrantolatzeko. Era berean, mitokondrien eta EEen arteko MKGek mitokondrietako nukleoideen barreiaketan eta erreplikazioan ere parte hartzen dute [19]. Gainera, SIM esperimentu ezberdinek mitokondrien eta EEen arteko MKGak bestelako funtzio biologiko askotan parte hartzen dutela erakutsi dute.

Kolore bikoitzeko SIM erabiliz egindako esperimentuek glikoproteinen metaketak EEaren estresa eragiten dutela erakutsi dute, eta estres horrek areagotu egiten dituela mitokondrien eta EEen arteko kontaktuen egonkortasuna eta iraupena. Horrek azpimarratzen du EEak berebiziko garrantzia duela proteinen tolesturaren eta jariaketaren erregulazioan, eta prozesu hori ATPren hornidura egokiaren menpe dagoela [20]. EEaren eta mitokondriaren arteko harreman estua, haien arteko lotura proteinei esker gertatzen da (MFN2, adibidez). Loturazko proteina horrek mitokondrietan Ca^{2+}-maila, metabolismoa eta ATP-ekoizpena emendatzea eragiten du. Bestalde, kolore bikoitzeko SIMen egileek mitokondriei edo lisosomei espezifikoki zuzendutako fluoroforoak diseinatu zituzten, eta lisosoma-mitokondriako MKGen irudiak eskuratzea lortu zuten denbora luzean zehar, fluoreszentzia-intentsitatean gainbehera esanguratsurik eragin gabe. Gainera, lisosomen eta mitokondrien arteko elkarrekintza nolakoa zen xeheki deskribatu zuten [21].

Zenbait aurkikuntzak adierazi dutenez, aipatutako elkarrekintza horiek organuluen arteko garraio molekularra eta lisosomen dinamika eta morfologia eraentzen dituzte. Izan ere, HSO_3-arekin lotzean uhin-luzera desberdinetan fluoreszentzia igortzen duen zunda dikromatiko bat erabiliz, sufre erreaktiboko espezieak mitokondrietatik lisosometara nola garraiatzen diren behatu da [22]. Gainera, SIM erabiliz egiaztatu da mitokondrien eta lisosomen arteko MKGek hainbat proteinari esker lisosoma-sarearen dinamika erregulatzen dutela [23].

2.2. **Bizkortutako Igorpeneko Deplezio mikroskopia (STED)**

Bizkortutako Igorpeneko Deplezio (ingelesez STED) mikroskopiak difrakzio-muga saihesten du argi egituratua erabiliz. Fluoreszentzia-mikros-

kopio arruntean, laserrak lagina eskaneatzen du, puntu bakoitzean fluoroforoak kitzikatuz. Jarraian, puntu bakoitzaren igorpen fluoreszentea neurtzen da, eta laginaren irudia lortzen da. Beraz, argiaren difrakzioak mugatzen duen kitzikapen-puntuaren gutxieneko tamainak definituko du mikroskopioaren bereizmen espaziala.

STED mikroskopiaren kasuan bereizmen espaziala handiagoa da, igorpen-puntuaren tamaina murriztea lortzen baitu. Laser-pultsu batekin puntu bat kitzikatzen du; gerora, donut-forma duen intentsitate altuko izpi batekin, puntu horren kanpoaldeko fluoroforoen kitzikapena ezabatzen du, horiek oinarrizko egoerara itzularaziz fluoreszentzia igorri gabe, bizkortutako igorpen izenez ezagutzen den prozesu bati esker (2A irudia). Horrela, donut-formako izpiaren erdiko eskualdea soilik mantenduko da kitzikatuta. Horri esker, PZFaren tamaina txikituko da [24].

Teknika horri esker albo-bereizmena 30 nm inguruko balioetaraino handitzen da [25]. Hala ere, STED mikroskopiaren erabilera mugatua da MKGen azterketarako. Hasteko, teknika honetarako egokiak diren zunda gutxi daude, behintzat kolore anitzeko markaketak egiteko. Izan ere, STED teknikarako egokiak diren zunda gehienak zelula-mintzarekiko iragazgaitzak dira: beraz, organuluak *in vivo* markatzeak zailtasun handiak aurkezten ditu [25]. Bigarrenik, STED teknikan erabilitako donut-formako izpiaren potentzia handia dela eta, fototoxikotasuna eragin dezake [26], eta hainbat organulu fototoxikotasun horrekiko oso sentikorrak dira, hala nola mitokondriak eta EE. Fototoxikotasuna murrizteko STED laseraren intentsitatea jaits daiteke, baina horrek bereizmenaren galera dakar. Galera hori konpentsatzeko, gated-STED (gSTED) bezalako teknikak garatu dira. gSTED-ek etenik gabeko laserrak erabiltzen ditu ezabapen-laser gisa, laser pultsatu baten ordez. Etenik gabeko izpi hori kitzikapen-laser pultsatuarekin konbinatzerakoan, fluoroforoen informazio espaziala fotoien emisio-denboran kodetzen da. Denbora-bereizmen handiko detektagailuak erabiliz, kitzikapenaren ondoren berehala igorritako fotoiak baztertu daitezke, eta horrek irudiaren bereizmena hobetzen du. Horrela, gSTED teknikak bereizmena handitu dezake laserraren intentsitatea baxu mantenduz, fototoxikotasuna murriztuz [27]. Azkenik, irudia eskuratzeko denbora BHFMko beste teknika batzuetan baino luzeagoa da, prozesu dinamiko azkarren erregistroa mugatuz. Hala ere, muga horiek gorabehera, hainbat ikerketa-lanetan organulu ezberdinen arteko MKGak ikustea lortu da, 50 nm baino gutxiagoko bereizmen espazialarekin, gainera [28].

Dena den, mikroskopia honetarako egokiak diren zundak garatzen hasiak dira, dagoeneko aipatutako zenbait muga gainditzen dituztenak. Hasteko, zelula barneko organuluak behatzea ez ezik, MKGen dinamikei *in vivo* jarraitzea ere lortu dute. Horrez gain, teknika hau erabilita, zelula bizi baten lehendabiziko kolore biko irudia lortu da. Markatze-estrategia horri esker, EEen eta mitokondrioen arteko elkarrekintzak ikustea lortu

da [25]. Hala ere, denbora-mugaren ondorioz MKGen dinamikak irudikatzea zaila da. STED bitartez irudiak lortu ahal izateko zelulak fixatzea erabilgarria izan daiteke, eta horrek prozesu dinamikoen irudikatzea galarazten du. Hala ere, EE-MP MKGetako autofagosometan estresaren aurkako erantzunak aztertzeko erabilgarria da [29], baita hainbat proteinaren kokapenaren berri emateko ere.

Azkenaldian, STED teknikaren hainbat aldaera ezagun egin dira, hots, trantsizio fluoreszente optiko asegarri itzulgarria (ingelesez *Reversible Saturable Optical Fluorescent Transition*, RESOLFT) eta batez ere zatikatzegaitasuna duen eskala nanometrikoko denbora errealeko irudigintza molekularra (ingelesez *Molecular Nanoscale Live Imaging with Sectioning Ability,* MoNaLISA); hein batean eskuratze-denbora eta fototoxikotasuna murriztea lortu dute. MoNaLISA-n, kasurako, SIMen argiztapen-patroia eta STEDren fluoroforoen ezabapena uztartzen dira, 30 eta 65 nm bitarteko albo-bereizmena eskainiz eta denbora-bereizmen handia mantenduz. Horri esker, zelula osoko egiturak hiru dimentsiotan ikus daitezke, eskuratze-denborak nahiko laburrak izanik [30].

Gainera, berriki, STED mikroskopia peroxisomen azterketarako oso erabilgarria suertatu da. Bada, STED mikroskopiaren bitartez, peroxisomen mintza eta argia bereiz daitezke, eta, hori gutxi ez eta teknikaren bereizmenari esker, peroxisomen mintzen morfologia eta tamaina diskriminatu eta kuantifikatu ahal izan dira [31]. Esaterako, peroxisomen mintzetan dauden eskualde hutsak kuantifikatu ahal izan dira. Eskualde horiek peroxisometako mintz hutsak dira, eta horien kopuru eta morfologiak gizakion osasunean hainbat ondorio izan ditzakeela aurkitu da [31]. Peroxisomek beste organuluekin osatzen dituzten MKGek funtzio fisiologiko oso garrantzitsua dute. Etorkizunean STED teknikak peroxisomen mintzen inguruan eskainitako informazioa erabilgarria suerta daiteke haiek osatzen dituzten MKGak aztertzeko.

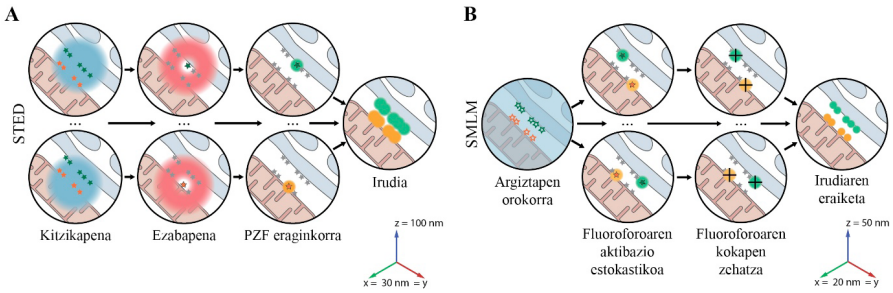
2.3. **Molekula Bakarreko Kokapen Mikroskopia (SMLM)**

Molekula Bakarreko Kokapen Mikroskopia (ingelesez SMLM) teknika ezberdinen multzoa da, eta bertan banakako fluoroforoak konputazionalki lokalizatzen dira. Gerora, haien kokapen zehatza bereizmen handiko irudi bat sortzeko erabiltzen da. Prozesu hori zunda fluoreszente batzuen propietate bereziei esker gauzatu daiteke. Zunda horiek «piztuta» zein «itzalita» egoeretan egon daitezke. «Piztuta» egoeran, fluoroforoa kitzikatzen da, eta fluoreszentzia igor dezake. «Itzalita» egoeran, ostera, ezin du fluoreszentziarik igorri. Fluoroforoak egoera batetik bestera ausaz aldatzen direnez, une jakin batean fluoroforo batzuk bakarrik daude «piztuta». Horrela, irudi bakoitzean fluoroforo jakin batzuk soilik kitzikatuko dira, eta horiek bakarrik igorriko dute fluoreszentzia (2B irudia), seinale fluoreszente ezber-

dinen gainjartzea ekidinez. Gerora, irudi bakoitzean, bertako fluoroforoen PZFak kalkulatzen dira eta haien kokapena zehazten da. Bukatzeko, irudi guztiek eskainitako informaziotik abiatuta, bereizmen handiko irudia sortzen da [32].

Erabiltzen den fluoroforo motaren arabera, SMLM tekniken artean honako hurbilketa hauek aurki ditzakegu: Fotoaktibatutako Lokalizazio Mikroskopia (ingelesez PALM), Berreraikuntza Optiko Estokastikoko Mikroskopia (ingelesez STORM) eta Puntu Metaketa Nanoeskalako Topografiaren Irudikapenerako (ingelesez PAINT). Teknika horiek guztiek, 20 nm eta 50 nm inguruko albo-bereizmena eta bereizmen axiala eskaintzen dituzte, hurrenez hurren. Gainera, kolore anitzeko markaketa lor daiteke, ez baita ezabapeneko izpirik erabiltzen, STEDen ez bezala.

Teknika hauek MKGak aztertzeko bi muga nagusi dituzte. Lehenengoa proteinen markaketarako fluoroforo espezializatuak behar dituztela da. Bigarrena irudiak sortzeko duten modua, zeina irudi askoren gainjarpenarekin osatzen den. Horregatik, teknika horiek denbora-bereizmen txikia dute, eta ez dira zelula bizien irudikapenerako egokiak, milaka fotograma behar baitira bereizmen handiko irudi bakarra eraikitzeko [33]. Beraz, teknika horiek erabiltzen dituzten ikerketa gehienek bereizmen espazial handia lehenesten dute, MKGen dinamikei buruzko informazioa alde batera utzita.



2. irudia. A) Bizkortutako Igorpeneko Deplezio (STED) mikroskopia. Lehenik eta behin, laser baten laguntzaz puntu jakin bat kitzikatzen da. Horren ostean, donut-itxura hartzen duten ezabapen-izpiek intereseko puntuaren inguruko fluoroforoen igorpena ekiditen dute. Horrela, soilik erdialdeko puntuak igorriko du fluoreszentzia. Albo-bereizmena ≈ 30nm; bereizmen axiala ≈ 100 nm. B) Molekula Bakarreko Kokapen Mikroskopia (SMLM). «Itzalita» eta «piztuta» egoeren artean aldatzen diren zundak erabiltzen dira. Irudi bakoitzean, fluoroforo batzuek bakarrik igorriko dute fluoreszentzia, besteen igorpenak gainjartzea saihestuz. Irudi bakoitzean, fluoroforo bakoitzaren PZFaren masa-zentroa kalkulatzen da (gurutze beltza), eta jarraian bereizmen handiko irudia eraikitzen da. Albo-bereizmena ≈ 20 nm; bereizmen axiala ≈ 50 nm.

3. ONDORIOAK ETA ETORKIZUNERAKO IKUSPEGIAK

Azkenaldian, mintzen arteko kontaktu-guneek interes berezia irabazi dute, lehendik ezezagunak ziren funtzio zelular ugariren eragile baitira, eta horiek inplikazio esanguratsuak baitituzte hainbat gaixotasunetan. Azterketa horien ondorioz, MKGak estrategia terapeutiko berrien itu bihurtu dira, eta. beraz, haietara zuzendutako farmakoak sortu aurretik, eskualde horiek hobeto ezagutzea ezinbestekoa da. MKGen ikerketari dagokionez, haien aniztasuna, tamaina nanometrikoa eta izaera dinamikoak ezartzen dituzten muga teknikoak gainditu beharreko trabak dira. Hori horrela, bereizmen handiko fluoreszentzia-mikroskopiek dagoeneko aipatutako hainbat muga gainditzen lagundu dute.

Lan honetan berrikusitako BHFMen hurbilketek hainbat abantaila eskaini dituzte, baina teknika jakin bakoitzak muga espezifikoak ere erakutsi ditu. Horregatik, egin nahi den azterketaren arabera, teknika batzuk beste batzuk baino abantailatsuagoak suertatuko dira.

Horrez gain, denbora-bereizmena teknikak desberdintzeko eta sailkatzeko ere erabil daiteke, haien gaitasunen arabera azterketa desberdinak egin ahal izango baitira. Adibidez, denbora-bereizmen handia duten teknikek MKGen dinamikei buruz informazio baliagarria eman dezakete, eta hori gutxi ez eta baita *in vivo* ere.

Bereizmen espazialari erreparatzen badiogu, hainbat teknika aipa ditzakegu. SIMek, esaterako, 100 nm inguruko albo-bereizmena eskaintzen du [34], eta beste teknika batzuekin konbina daiteke bereizmen handiagoa lortzeko. Lagin osoa argiztatzen denez, zelularen eskualde handiak azter daitezke. Horregatik, hurbilketa horiek MKG berrien identifikazioa errazten dute, eta informazio nahikoa ematen dute haien morfologiari eta funtzioari buruz; beraz, aurkikuntza garrantzitsuak bultza ditzakete.

Bestalde, STEDek eta SMLMek, esaterako, banakako MKGen eta haien loturen inguruko informazioa eskain dezakete, 20-30 nm inguruko bereizmena baitute [35]. SMLMri dagokionez, bereizmen tenporal kaskarra izan arren, kolore anitzeko irudikapenak erraztasun gehiagoz lortzen dira, espezializatutako fluoroforo ugari baitaude. Hori bereziki interesgarria da, izatez MKGek bi organulu ezberdinen molekulak baitituzte.

Aitzitik, STEDekin lor daitekeen kolore anitzeko irudikapena konplexuagoa da; izan ere, uhin-luzera berean kitzikatzen diren fluoroforoen beharra edo hainbat ezabatze-laserren beharra dute. Hala ere, STEDek duen kolore biko irudikapena arrakastatsuagoa izan da. Gainera, SMLM ez bezala, STED mikroskopiaz baliatutako 3D irudikapenak eraginkorrak izan ohi dira, eta MKGen egitura bolumetrikoak aztertzeko baliagarriak dira [26].

BHFM etengabe garatzen ari den teknika da, eta berriki hainbat aldaera garatu dira azterketa ezberdinetarako. MINFLUX adibidez (Fluoreszentziazko fotoi-fluxu minimoen mikroskopia, ingelesez MINimal fluorescence photon FLUXes microscopy), eskala nanoskopikoan bereizmen espazial handia eskaintzen duen teknika da. MINFLUX teknikak argiarekin itzal eta piztu daitezkeen fluoroforoak eta donut-formako kitzikapen-argia konbinatzen ditu; horrela, molekula zehatzen kokapena zehaztu dezake 2 nm-rainoko bereizmen espazialarekin eta milisegundo gutxiren buruan [36]. Beraz, MINFLUXek hainbat aplikazio izan ditzake, organuluen azterketan ez ezik, maila molekularrean ere bai. Horrelako erabilerak bereziki garrantzitsuak izan daitezke MKGetan, bertako proteinak eta, batez ere, lipidoak sakonki aztertzeke baitaude. Alabaina, MINFLUX teknikak oraindik eskualde handiak irudikatzeko denbora asko behar duenez, MKG osoak aztertzeko ez da hain baliagarria.

Aipatutako teknika gehienak MKGetako proteinetan zentratu dira. Aldiz, MKGetako lipidoei buruz ez dago informazio nahikoa, ez konposizioari, ez dinamikei ezta funtzioei dagokienez ere. Hala ere, kontuan hartzekoa da MKGak bi geruza lipidikozko egiturak direla eta mintzekin erlazionatutako proteina asko dituztela barruan. Horri gehituta, seinaleztapen-prozesuetan eta lipidoen sintesi eta garraioan ere parte hartzen dute. Are gehiago, MKGetako lipidoek mintz biologikoetako funtzio asko betetzen dituzte. Gaur egun, MKGen lipidoen inguruko informazioa egon badago [37], baina horien antolaketa espaziala eta tenporala ez dira askorik aztertu, hein handi batean BHFMrekin erabil daitezkeen eta lipidoekin bateragarriak diren zundak ez baitaude eskuragarri. Zailtasun hori gainditzeko, azkenaldian lipidoak ikertzeko eraginkorrak diren BHFMrako egokiak diren zundak sortzeko ahaleginak egin dira [38, 39], eta horrek ikerketa arlo berri baten sorrera eragin du. Etorkizuneko azterketek tresna berri horiek erabil ditzakete osagai lipidikoak eta proteinak aztertzeko, MKGen irudi osoa lortzeko, funtzioen erregulazioa hobeto ulertzeko eta MKGak itu terapeutiko berri gisa erabiltzeko.

Laburbilduz, BHFM teknika bakar batek ere ezin die MKGeei lotutako galdera guztiei erantzun, baina hurbilketa bakoitzak informazio garrantzitsua eman dezake, MKGen dinamika eta morfologia orokorretik hasita eta molekulen barruko banaketa espazialeraino. Gainera, kasu batzuetan, teknika horietako batzuk konbina daitezke.

Beraz, kontuan izanda teknika desberdin guzti horiek aplikazio, abantaila eta muga espezifikoak dituztela, aipatutako teknikak helburuen arabera hobekien erabiltzeko eta haien funtzioak optimizatzeko hurrengo taula hau aurkezten da (1. taula). Bertan, jorratutako teknika ororen informazioa laburbilduta dago.

1. taula. BHFM tekniken ezaugarri nagusiak. Bertan, teknika bakoitzaren bereizmen espaziala (al = albo-bereizmena; ax = bereizmen axiala), abantailak eta mugak azaltzen dira.

Teknika	Gehienezko bereizmena	Abantailak	Mugak
SIM	al ≈ 100 *nm* ax ≈ 300 *nm*	Fluoroforo edo markaketa bereizgarrien beharrik ez. Kolore biko 3D irudiak. Denbora-bereizmen egokia.	Bereizmen espazial mugatua.
STED	al ≈ 30 *nm* ax ≈ 100 *nm*	Bereizmen espazial handia MKG asko aztertzeko.	Teknikarako zunda egoki gutxi. Denbora-bereizmen mugatua, *in vivo* egiteko eta dinamikak aztertzeko zaila. Fototoxikotasuna.
SMLM	al ≈ 20 *nm* ax ≈ 50 *nm*	Bereizmen espazial oso handia. Kolore anitzeko irudiak lor daitezke. Teknika ezberdinak: PALM, PAINT, STORM.	Fluoroforo espezializatuen beharra. Denbora-bereizmen oso txikia.

Azkenik, aurretik aipatutako teknika ororen erabilgarritasunean oinarrituta gida bat osatu da (2. taula). Gida horrek BHFM teknikak erabiltzeko orduan egon daitezkeen helburu esperimental posibleei erantzuna ematea du xede. Bertan, helburu bakoitzetik abiatuta, betebehar esperimentalek zeintzuk izan beharko luketen aipatzen da, eta horiek aintzat hartuta beharrizan bakoitzari hobekien egokitzen zaion teknika izendatzen da.

2. taula. Helburu ezberdinetarako beharrezkoak diren betebehar esperimentalak eta horiek betetzeko eraginkorrenak diren BHFM teknikak.

Helburua	Betebehar esperimentala	Teknika erabilgarria
Bi organuluren arteko elkarrekintza fisikoa aztertzea *zelula bizietan* 2D edo 3Dan	— Z ardatzean laginaren sakontasun desberdinetan irudiak eskuratzea. — Denbora-bereizmen handia.	SIM
Bi organuluren arteko *garraio molekularra* aztertzea	— Denbora-bereizmen handia. — Albo-bereizmen handia.	SIM (*Grazing Incident* teknikarekin)
MKG batean *proteina jakin baten* kokapena aztertzea	— Albo-bereizmen altua. — Proteina jakin hori markatzeko zunda berezia.	STED
MKG batean *hainbat proteinaren* kokapena aztertzea	— Albo-bereizmen altua. — Igorpenezko uhin-luzera desberdinetako zundak.	SMLM

ESKER ONAK

Artikulu hau honako dirulaguntza hauek finantzatu dute: PID2020-117405GBI00 dirulaguntza, MCIN/AEI/10.13039/501100011033 erakundeak finantzatua; «Europar Batasuna NextGenerationEU/PRTR» programaren bidez; Eusko Jaurlaritzaren dirulaguntzak, ELKARTEK22/86 eta IT1625-22; eta Ramón Areces Fundazioa, CIVP20S11276 dirulaguntza.

BIBLIOGRAFIA

[1] BERNHARD, W., ROUILLER, C. 1956. «Close topographical relationship between mitochondria and ergastoplasm of liver cells in a definite phase of cellular activity». *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, **2**, 73-78.

[2] VANCE, J. E. 1990. «Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria». *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 7248-7256.

[3] CSORDÁS, G., WEAVER, D., HAJNÓCZKY, G. 2018. «Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Contactology: Structure and Signaling Functions.». *Trends in cell biology*, **28**, 523-540.

[4] SCORRANO, L., DE MATTEIS, M. A., EMR, S., GIORDANO, F., HAJNÓCZKY, G., KORNMANN, B., LACKNER, L. L., LEVINE, T. P., PELLEGRINI, L., REINISCH, K., RIZZUTO, R., SIMMEN, T., STENMARK, H., UNGERMANN, C., SCHULDINER, M. 2019. «Coming together to define membrane contact sites». *Nature Communications 2019 10:1*, **10**, 1-11.

[5] EISENBERG-BORD, M., SHAI, N., SCHULDINER, M., BOHNERT, M. 2016. «A Tether Is a Tether Is a Tether: Tethering at Membrane Contact Sites». *Developmental cell*, **39**, 395-409.

[6] PRINZ, W. A., TOULMAY, A., BALLA, T. 2020. «The functional universe of membrane contact sites». *Nature reviews. Molecular cell biology*, **21**, 7-24.

[7] WU, H., CARVALHO, P., VOELTZ, G. K. 2018. «Here, there, and everywhere: The importance of ER membrane contact sites.». *Science (New York, N.Y.)*, **361**, DOI: 10.1126/science.aan5835

[8] MADEC, A. M., PERRIER, J., PANTHU, B., DINGREVILLE, F. 2021. «Role of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAMs) interactions and calcium exchange in the development of type 2 diabetes». *International Review of Cell and Molecular Biology*, **363**, 169-202.

[9] RIMESSI, A., PEDRIALI, G., VEZZANI, B., TAROCCO, A., MARCHI, S., WIECKOWSKI, M. R., GIORGI, C., PINTON, P. 2020. «Interorganellar calcium signaling in the regulation of cell metabolism: A cancer perspective». *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **98**, 167-180.

[10] PETKOVIC, M., O'BRIEN, C. E., JAN, Y. N. 2021. «Interorganelle communication, aging, and neurodegeneration». *Genes & development*, **35**, 449-469.

[11] COOK, K. C., TSOPURASHVILI, E., NEEDHAM, J. M., THOMPSON, S. R., CRISTEA, I. M. 2022. «Restructured membrane contacts rewire organelles for

human cytomegalovirus infection». *Nature communications*, **13**, DOI: 10.1038/S41467-022-32488-6

[12] ZANELLATI, M. C., HSU, C.-H., COHEN, S. 2024. «Imaging interorganelle contacts at a glance.». *Journal of cell science*, **137**, DOI: 10.1242/jcs.262020

[13] CALÌ, T., BAYER, E. M., EDEN, E. R., HAJNÓCZKY, G., KORNMANN, B., LACKNER, L., LIOU, J., REINISCH, K., RHEE, H.-W., RIZZUTO, R., SCORRANO, L., BRINI, M. 2025. «Key challenges and recommendations for defining organelle membrane contact sites.». *Nature reviews. Molecular cell biology*, DOI: 10.1038/s41580-025-00864-x

[14] GONG, J., JIN, Z., CHEN, H., HE, J., ZHANG, Y., YANG, X. 2023. «Super-resolution fluorescence microscopic imaging in pathogenesis and drug treatment of neurological disease». *Advanced Drug Delivery Reviews*, **196**, 114791.

[15] CHEN, X., ZHONG, S., HOU, Y., CAO, R., WANG, W., LI, D., DAI, Q., KIM, D., XI, P. 2023. «Superresolution structured illumination microscopy reconstruction algorithms: a review». *Official journal of the CIOMP* 2047-7538.

[16] GUSTAFSSON, M. G. L. 2000. «Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy». *Journal of microscopy*, **198**, 82-87.

[17] NIXON-ABELL, J., OBARA, C. J., WEIGEL, A. V., LI, D., LEGANT, W. R., XU, C. S., PASOLLI, H. A., HARVEY, K., HESS, H. F., BETZIG, E., BLACKSTONE, C., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. 2016. «Increased spatiotemporal resolution reveals highly dynamic dense tubular matrices in the peripheral ER». *Science*, **354**, DOI: 10.1126/SCIENCE.AAF3928

[18] GUO, Y., LI, D., ZHANG, S., YANG, Y., LIU, J. J., WANG, X., LIU, C., MILKIE, D. E., MOORE, R. P., TULU, U. S., KIEHART, D. P., HU, J., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J., BETZIG, E., LI, D. 2018. «Visualizing Intracellular Organelle and Cytoskeletal Interactions at Nanoscale Resolution on Millisecond Timescales». *Cell*, **175**, 1430-1442.e17.

[19] QIN, J., GUO, Y., XUE, B., SHI, P., CHEN, Y., SU, Q. P., HAO, H., ZHAO, S., WU, C., YU, L., LI, D., SUN, Y. 2020. «ER-mitochondria contacts promote mtDNA nucleoids active transportation via mitochondrial dynamic tubulation.». *Nature communications*, **11**, 4471.

[20] GOTTSCHALK, B., KOSHENOV, Z., BACHKOENIG, O. A., ROST, R., MALLI, R., GRAIER, W. F. 2022. «MFN2 mediates ER-mitochondrial coupling during ER stress through specialized stable contact sites». *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **10**, DOI: 10.3389/FCELL.2022.918691/FULL

[21] HAN, Y., LI, M., QIU, F., ZHANG, M., ZHANG, Y.-H. 2017. «Cell-permeable organic fluorescent probes for live-cell long-term super-resolution imaging reveal lysosome-mitochondrion interactions.». *Nature communications*, **8**, 1307.

[22] FANG, G., CHEN, H., SHAO, X., WANG, H., ZHAN, D., WANG, R., MENG, P., FANG, H., LIU, F., LING, P., WU, Z., DIAO, J., YAO, Q., CHEN, Q. 2022. «Single Image Capture of Bioactive Ion Crosstalk within Inter-Organelle Membrane Contacts at Nanometer Resolution». *Small Methods*, **6**, 2200321.

[23] WONG, Y. C., KIM, S., CISNEROS, J., MOLAKAL, C. G., SONG, P., LUBBE, S. J., KRAINC, D. 2022. «Mid51/Fis1 mitochondrial oligomerization complex drives lysosomal untethering and network dynamics». *The Journal of cell biology*, **221**, DOI: 10.1083/JCB.202206140

[24] VICIDOMINI, G., BIANCHINI, P., DIASPRO, A. 2018. «STED super-resolved microscopy.». *Nature methods*, **15**, 173-182.

[25] BOTTANELLI, F., KROMANN, E. B., ALLGEYER, E. S., ERDMANN, R. S., WOOD BAGULEY, S., SIRINAKIS, G., SCHEPARTZ, A., BADDELEY, D., TOOMRE, D. K., ROTHMAN, J. E., BEWERSDORF, J. 2016. «Two-colour live-cell nanoscale imaging of intracellular targets». *Nature communications*, **7**, 10778.

[26] DAMENTI, M., COCEANO, G., PENNACCHIETTI, F., BODÉN, A., TESTA, I. 2021. «STED and parallelized RESOLFT optical nanoscopy of the tubular endoplasmic reticulum and its mitochondrial contacts in neuronal cells.». *Neurobiology of disease*, **155**, 105361.

[27] VICIDOMINI, G., MONERON, G., HAN, K. Y., WESTPHAL, V., TA, H., REUSS, M., ENGELHARDT, J., EGGELING, C., HELL, S. W. 2011. «Sharper low-power STED nanoscopy by time gating.». *Nature methods*, **8**, 571-3.

[28] GEMMINK, A., DAEMEN, S., KUIJPERS, H. J. H., SCHAART, G., DUIMEL, H., LÓPEZ-IGLESIAS, C., VAN ZANDVOORT, M. A. M. J., KNOOPS, K., HESSELINK, M. K. C. 2018. «Super-resolution microscopy localizes perilipin 5 at lipid droplet-mitochondria interaction sites and at lipid droplets juxtaposing to perilipin 2». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1863**, 1423-1432.

[29] NASCIMBENI, A. C., GIORDANO, F., DUPONT, N., GRASSO, D., VACCARO, M. I., CODOGNO, P., MOREL, E. 2017. «ER –plasma membrane contact sites contribute to autophagosome biogenesis by regulation of local PI 3P synthesis». *The EMBO Journal*, **36**, 2018-2033.

[30] MASULLO, L. A., BODÉN, A., PENNACCHIETTI, F., COCEANO, G., RATZ, M., TESTA, I. 2018. «Enhanced photon collection enables four dimensional fluorescence nanoscopy of living systems.». *Nature communications*, **9**, 3281.

[31] KUMAR, R., ISLINGER, M., WORTHY, · HARLEY, CARMICHAEL, R., SCHRADER, · MICHAEL. 2024. «The peroxisome: an update on mysteries 3.0». *Histochemistry and Cell Biology*,**161**, 99-132.

[32] RUST, M. J., BATES, M., ZHUANG, X. 2006. «Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)». *Nature methods*, **3**, 793-795.

[33] HELL, S. W., SAHL, S. J., BATES, M. 2017. «Super-resolution optical microscopy for studying membrane structure and dynamics». *J. Phys.: Condens. Matter*, **29**, 273001.

[34] BESPROZVANNAYA, M., DICKSON, E., LI, H., GINBURG, K. S., BERS, D. M., AUWERX, J., NUNNARI, J. 2018. «GRAM domain proteins specialize functionally distinct ER-PM contact sites in human cells». *eLife*, **7**, DOI: 10.7554/ELIFE.31019

[35] Liu, T., Stephan, T., Chen, P., Chen, J., Riedel, D., Yang, Z., Jakobs, S., Chen, Z. 2022. «Multi-color live-cell STED nanoscopy of mitochondria with a gentle inner membrane stain». *bioRxiv* 2022.05.09.491019.

[36] Eilers, Y., Ta, H., Gwosch, K. C., Balzarotti, F., Hell, S. W. 2018. «MINFLUX monitors rapid molecular jumps with superior spatiotemporal resolution». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **115**, 6117-6122.

[37] Yan, R., Chen, K., Xu, K. 2020. «Probing Nanoscale Diffusional Heterogeneities in Cellular Membranes through Multidimensional Single-Molecule and Super-Resolution Microscopy». *Journal of the American Chemical Society*, **142**, 18866-18873.

[38] Nieto-Garai, J. A., Lorizate, M., Contreras, F. X. 2022. «Shedding light on membrane rafts structure and dynamics in living cells». *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*, **1864**, DOI: 10.1016/J.BBAMEM.2021.183813

[39] Lorizate, M., Terrones, O., Nieto-Garai, J. A., Rojo-Bartolomé, I., Ciceri, D., Morana, O., Olazar-Intxausti, J., Arboleya, A., Martin, A., Szynkiewicz, M., Calleja-Felipe, M., Bernardino de la Serna, J., Contreras, F. X. 2021. «Super-Resolution Microscopy Using a Bioorthogonal-Based Cholesterol Probe Provides Unprecedented Capabilities for Imaging Nanoscale Lipid Heterogeneity in Living Cells». *Small methods*, **5**, DOI: 10.1002/SMTD.202100430