

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, Maier Lorizate, Francesc-Xabier Contreras, Jon
Ander Nieto-Garai* eta Oihana Terrones*

* Lanaren zuzendaritzan ekarpen berdina

UPV/EHU, Leioa, Espainia

LABURPENA: Mintzen arteko Kontaktu Guneak (MKG) bi organuluen 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, minbizia eta neuroendekapenezko gaixotasunekin. Azken urteotan, MKGen azterketarako bereizmen handiko fluoreszentzia mikroskopia (BHFM) beste teknika batzuen artean gailendu da. Lan honetan, MKGen ezaugarri eta funtzio biologikoak deskribatu eta laburbildu dira eta horien azterketarako eraginkorrak izan daitezkeen BHFM tekniken analisi sakona burutu 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.

HITZ GAKOAK: 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*

1

***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/0000-0002-8665-099X>, 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 eta Terrones, Oihana. (2025). Bereizmen-handiko fluoreszentzia-mikroskopiaren aurrerapenak organuluen mintzen arteko kontaktu-guneen azterketarako, Ekaia, 49, xx-xx. (<https://doi.org/10.1387/ekaia.27537>)

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

ISSN 0214-9001-eISSN 2444-3225 / © 2025 UPV/EHU



Obra Creative Commons Atribución 4.0 Internacional-en lizentzian dago

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.

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 du.

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, orduan fosfolipido ezberdinen sintesia eta garraioa erretikulu endoplasmaticoaren (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 hauek, elkarrekintzan diharduten organuluen arteko lotura fisikoak sortzeaz arduratzen dira [5]. Egiturazko funtzioa duten proteinez gain, MKGek proteina konposizio bereizgarria dute, eta proteina horiek hainbat prozesu fisiologikorako 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 biogenesisia arautzen dituztenak barne [6].

Orain arte, ondoen karakterizatutako MKGak EEa inplikatzten dutenak dira. Halaber, badakigu, mitokondriez gain, mintz plasmaticoarekin (MP), Golgiren aparatuekin, peroxisomekin, lisosomekin, lipido tantekin eta endosomekin ere elkarrenergiten duela [7].

MKGek zelula-funtzio garrantzitsuak betetzen dituztenez, horien erregulazioa funtsezkoa da, eta, beraz, disfuntzioek zelula-narriadura dakartzate. MKGen disfuntzioa hainbat patologien 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 eztaba daezina 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 aztertzeke 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 fluoreszentziako mikroskopia konfokala da, azkarra, maneiatzen erraza eta zelula bizietako neurketetan aplika baitaiteke. Hala ere, mikroskopia konfokal bidezko seinaleen detekzioak berezko arazoa du: MKG gehienek tamainak difrakzio optikoak ezarritako bereizmen-mugatik behera daude. Azkenaldiko aurrerapen batzuek hobekuntza apalak ahalbidetu dituzte konfigurazio konfokalen albo-bereizmenean, eta espezifikoari aplikatu dira MKGak aztertzeke. Cook et al.-ek egindako ikerketan zitomegalobirusak eragindako infekzioaren ondorioz gertatutako hainbat MKGen berregituraketa 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, zeinak birus-partikula berrien ekoizpenean laguntzen duten. Zitomegalobirusak eragina du EE-peroxisoma elkarrekintzetan ere, peroxisomaren hazkuntza eragin eta birioien mihiztadura eraginkorragoa ahalbidetzeko [11]. Hala ere, egungo mikroskopia konfigurazio konfokal gehienek mugak dituzte MKGak aztertzeke, eta beste irudi-teknika batzuk erabili behar dira. Erronka horri aurre egiteko, bereizmen handiko mikroskopia-teknikak garatu ziren, difrakzioak ezarritako 200 nm-ko bereizmen-muga gainditzeko helburuarekin. Teknika horiek, difrakzio-mugatik beherako bereizmen espaziala ematen dute (20 eta 100 nm artekoa), MKGen egituren antolamenduari eta dinamikari buruzko informazioa eskuratzea ahalbidetuz [12,13].

2. BEREIZMEN HANDIKO FLUORESZENTZIA MIKROSKOPIA MINTZEN ARTEKO KONTAKTU GUNEAZ AZTERTZEKO

Bereizmen handiko fluoreszentzia mikroskopiaren (BHFM, SRFM ingelesez) barruan bereizmen espazial handiko irudiak lortzea ahalbidetzen duten hainbat teknika sailkatzen dira. Mikroskopia baten bereizmen optikoa bi objektu bereizi ahal izateko behar den gutxieneko distantzia

da, eta ohiko mikroskopia optikoan argiaren difrakzioaz 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 patroia 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, fluoreszentzia-zko-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 behatuko ditugu. Difrakzio mugaren formularen arabera, mikroskopia optiko arrunt batean albo-bereizmena (x-y norabidean) 200-300 nm inguruan dago, eta bereizmen-axiala (z norabidean), ordea, 500-600 nm inguruan [14]. Jakinda MKGen arteko distantzia 10-80 nm artekoa dela [4], hau da, argiaren difrakzioak ezarritako bereizmena baino txikiagoa, mikroskopia optikoak mugatuta daude haien azterketarako.

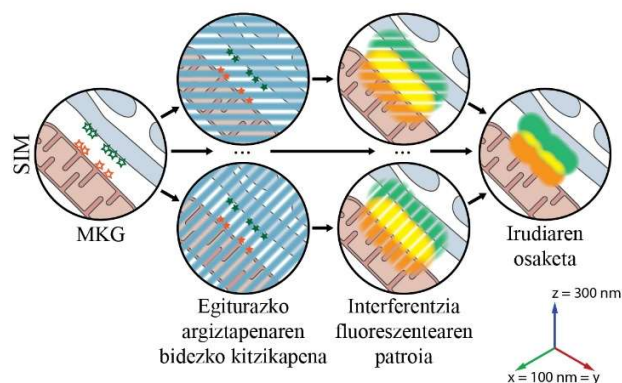
Honi aurre egiteko, BHFMB bezalako teknika berrien garapena beharrezkoa izan da. Hainbat BHFMB teknika daude, bakoitza bere funtzionamendu, abantaila eta mugekin, baina guztiek dute ezaugarri komun bat: argiaren difrakzio-muga baino bereizmen espazial txikiagoa duen lagin biologiko baten irudiak lortzeko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

2.1. Egituratutako Argiztapen Mikroskopia (SIM)

Egituratutako Argiztapen 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 (bolumetrikokoak, laminarrak etab.), eta ohiko zunda eta markaketa

fluoreszenteekin bateragarria denez, SR-SIMa zelula biziak ikertzeko bereizmen handiko mikroskopia teknika erabilienera bihurtu da [15].

SIM teknikak lagineko egiturei buruzko bereizmen handiko informazioa eskaintzen du, bereizmen txikiko interferentzia-patroietatik abiatuta. Fluoreszentziako-mikroskopian, puntu batean dagoen fluoreszentiaren intentsitatea bi parametroen arabera da: kitzikapen-argiaren intentsitatearen arabera eta zundak puntu horretan duen dentsitatearen arabera. SIMen, lagina bandaka paratutako maiztasun desberdineko argiztapenari 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 patroia ugari lor daitezke eta, haien konbinazioetatik abiatuta bereizmen handiko irudiak eraiki daitezke, 100 nm inguruko albo-bereizmenarekin [16] (1. irudia).



1. Irudia. Egiturazko Argiztapen Mikroskopia (SIM). Lagina intentsitate ezberdineko bandaz osatutako argi-patroiekin kitzikatzen da. Patroia eragindako kitzikapena fluoroforoen dentsitatearen arabera izango da, eta horien interferentzia-patroiak erabili ahal dira zundak duen dentsitatea jakiteko. Kitzikapen argia biratu egiten da hainbat interferentzia-patroi desberdin lortzeko, eta horien konbinazioari esker bereizmen handiko irudia sortzen da. Albo-bereizmena ≈ 100 nm; bereizmen axiala ≈ 300 nm.

SIMek ez du fluoroforo ezta markaketa teknika espezializatuen beharrik, sentikortasun eta kontraste maila altuak ditu eta, gainera, hainbat teknika osagarriekin konbina daitezke informazio gehigarria ateratzeko. Adibidez, teknika hau 3D irudiak berreraikitze erabil daitezke (SIM 3D/3D EAM), eta horrek bereizmen axiala 300 nm-tara handitzen du eta egitura biologikoei buruzko informazio gehiago ematen du.

MKGen ikerketan, SIMaren 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 mikroskopia sinple bat baino ez du behar, laser bakar batekin erabil daiteke, ez du fluoroforo berezirik behar eta, baldintza egokietan, denbora-bereizmen egokia eskaini dezake. Bada, 3D SIM eta Angelu Txikiko Intzidentzia (ingelesez *Grazing incidence*) teknika delakoa konbinatuz (GI-SIM), hasiera batean lautzat hartu ziren EEren eremuak, oso dinamikoak diren egitura tubularrez osatuta daudela ikusi ahal izan zen [17]. Gainera, GI-SIM teknikari esker, EE eta mitokondrien arteko MKGen bitartez EEaren egitura tubular horiek mitokondriaren fisioa eta fusioa eraentzen zutela aurkitu zen [18]. Horrez gain, ikerketa horrek agerian utzi zuen EEak MKGak erabiltzen dituela bere egitura berrantolatzeke. Era berean, mitokondrien eta EEen arteko MKGek mitokondrietako nukleoideen barreiapenean eta erreplikazioan ere parte hartzen dute [19]. Gainera, SIM esperimentu ezberdinek mitokondria 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 EEaren arteko kontaktuen egonkortasuna eta iraupena. Horrek azpimarratzen du EEk berebiziko garrantzia duela proteinen tolestura 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, fluoreszentsiako intentsitatean gainbehera esanguratsu gabe. Gainera, lisosoma eta mitokondrien arteko elkarrekintza nolakoa zen detailez deskribatu zuten [21].

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

2.2. Bizkortutako Igorpeneko Deplezio mikroskopia (STED)

Bizkortutako Igorpeneko Deplezio mikroskopiak (ingelesez STED) difrakzio-muga saihesten du argi egituratua erabiliz. Fluoreszentzia mikroskopio arruntan, laserrak lagina eskaneatzen du, puntu bakoitzean fluoroforoak kitzikatuz. Jarraian, puntu bakoitzaren igorpen fluoresentea 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 pulsu batekin puntu bat kitzikatzen du; gerora, donut forma duen intentsitate altuko izpi batekin, puntu horren kanpoaldeko fluoroforoen kitzikapena ezabatzen du, hauek oinarritzko egoerara itzularaziz fluoresentzia igorri gabe, bizkortutako igorpen izenez ezagutzen den prozesu bati esker (2A. irudia). Horrela, donut formako izpiaren erdiko eskualdea soilik mantenduko da kitzikatuta. Horri esker, PZF-aren 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 iragazkaitzak dira: beraz, organuluak *in vivo* markatzea 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 jaitsi 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, pulsatutako laser baten ordeaz. Etenik gabeko izpi hori kitzikapen-laser pulsatuarekin konbinatzerakoan, fluoroforoen informazio espaziala fotoien emisio-denboran kodetzen da. Denbora-bereizmen handiko detektagailuak erabiliz, kitzikapenaren ondoren berehala igorritako fotoiak bazter daitezke, eta horrek irudiaren bereizmena hobetzen du. Horrela, gSTED teknikak bereizmena handitu dezake laserraren intentsitatea baxua mantenduz, fototoxikotasuna murriztuz [27]. Azkenik, irudia eskuratzeko denbora BHFeko beste teknika batzuetan baino luzeagoa da, prozesu dinamiko azkarren erregistroa mugatuz. Hala ere, muga horiek gorabehera, hainbat ikerketan 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 ez ezik, MKGen

dinamikak *in vivo* jarraitzea lortu dute. Horrez gain, teknika hau erabilita, zelula bizi baten lehendabiziko kolore biko irudia lortu da. Markatze estrategia horri esker, EE 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 dinamikoaren irudikatzea galarazten du. Hala ere, EE-MP MKGetako autofagosometan estresaren aurkako erantzunak aztertzeke erabilgarria da [29], baita hainbat proteinen kokapenaren berri emateko ere.

Azkenaldian, STED teknikaren hainbat aldaera ezagun egin dira, hots, Trantsizio Fluoreszente Optiko Saturagarri Itzulgarria (ingelesez *Reversible Saturable Optical Fluorescent Transition*, RESOLFT) eta batez ere Zatikatze-gaitasuna duen eskala nanometrikoko denbora errealeko irudigintza molekularra (ingelesez *Molecular Nanoscale Live Imaging with Sectioning Ability*, MoNaLISA); hein batean eskuratze-denbora eta fototoxikotasun murriztea lortu dute. MoNaLISA-n, kasurako, SIMaren argiztapen patroia eta STEDen 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-denbora nahiko laburrekin [30].

Gainera, berriki, STED mikroskopia peroxisomen azterketarako oso erabilgarria suertatu da. Bada, STED mikroskopiaren bitartez, peroxisomen mintza eta argia bereiz daitezke, eta hori gutxi balitz, teknikaren bereizmenari esker, peroxisomen mintzen morfologia eta tamaina diskriminatu eta kuantifikatu ahal izan da [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, haiek osatzen dituzten MKGak aztertzeke erabilgarria suerta daiteke.

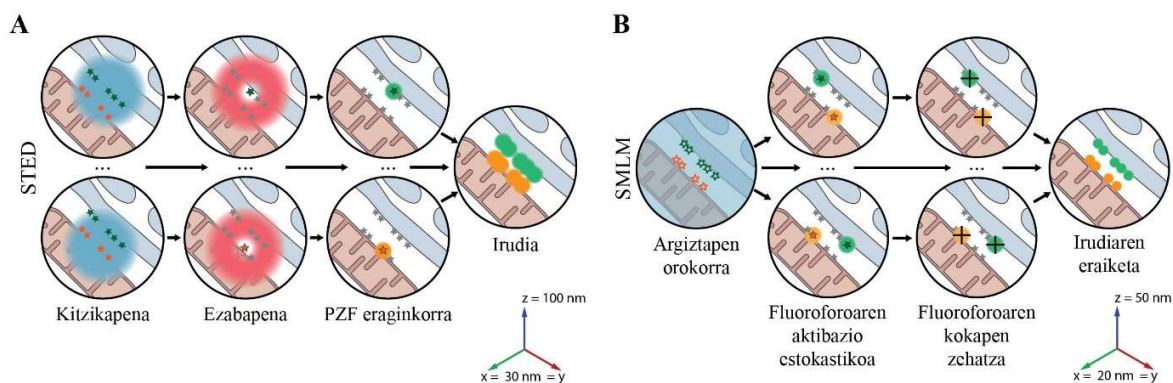
2.3. Molekula Bakarreko Kokapen Mikroskopia (SMLM)

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 hau zunda fluoreszente batzuen propietate bereziei esker gauzatu daiteke. Zunda horiek “piztuta” zein “itzalita” egoeretan egon daitezke. “Piztuta” egoeran, fluoroforoa kitzikatzen da eta fluoreszentsia igorri dezake. “Itzalita” egoeran, ostera, ezin du fluoreszentsiarik 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 ezberdinen gainjartzea ekidinez. Gerora, irudi bakoitzean, bertako fluoroforoen PZFak kalkulatzeko 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 aztertzeke 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 eraikitzeke [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 du. Horrela, soilik erdialdeko puntuak igorriko du fluoreszentzia. Albo-bereizmena $\approx 30\text{ nm}$; bereizmen axiala $\approx 100\text{ nm}$. B) Molekula Bakarreko Kokapen Mikroskopia (SMLM). "Itzalita" eta "piztuta" egoeren artean aldatzen diren zundak erabiltzen dira. Irudi bakoitzean, fluoroforo batzuk bakarrik igorriko dute fluoreszentzia, besteen igorpenak gainjartzea saihestuz. Irudi bakoitzean, fluoroforo

bakoitzaren PZFaren masa-zentroa kalkulatzeko da (gurutze beltza) eta jarraian bereizmen handiko irudia eraikitzen da. Albo-bereizmena ≈ 20 nm; bereizmen axiala ≈ 50 nm.

3. ONDORIOAK ETA ETORKIZUNERAKO IKUSPEGIAK

Azken aldian, mintzen arteko kontaktu guneek interes berezia irabazi dute, lehendik ezezagunak ziren funtzio zelular ugariaren eragile baitira, eta horiek inplikazio esanguratsuak baitituzte hainbat gaixotasunetan. Azterketa horien ondorioz, MKGak estrategia terapeutiko berrien iturri 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 fluoreszentsia 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 ere teknika ezberdinak desberdintzeko eta sailkatzeko erabili 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 balitz *in vivo*.

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

Bestalde, STED eta SMLMk, esaterako, banakako MKGen eta haien loturen inguruko informazioa eskaini dezakete, 20-30 nm inguruko bereizmena bait dute [35]. SMLMari dagokionez, bereizmen tenporal kaskarra izan arren, kolore anitzeko irudikapenak erraztasun gehiagoz lortzen dira, espezializatutako fluoroforo ugari baitaude. Honakoa bereziki interesgarria da, izatez MKGek bi organulu ezberdinen molekulak baitituzte.

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

BHFMa etengabe garatzen hari den teknika da eta berriki hainbat aldaera garatu dira azterketa ezberdinetarako. MINFLUX adibidez (Fluoreszentziatzko fotoi-fluxu minimoen mikroskopia, ingelesez MINimal fluorescence photon FLUXes microscopy), eskala nanoskopikoan bereizmen espaziala handia eskaintzen duen teknika da. MINFLUX teknikak argiarekin itzali 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, organuluaren azterketan ez ezik, maila molekularrean ere. Horrelako erabilerak bereziki garrantzitsuak izan daitezke MKGetan, bertako proteinak eta, batez ere, lipidoak sakonki aztertzeke baitaude. Alabaina, MINFLUX teknikak oraindik eskualde handiak irudikatzeke denbora asko behar duenez, MKG osoak aztertzeke ez da hain baliagarria.

Aipatutako teknika gehienak MKGeetako 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 bigeruza lipidikozko egiturak direla eta mintzekin erlazionatutako proteina asko dituztela haien baitan. 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 gehiegi aztertu, hein handi batean BHFMrekin erabili daitezkeen eta lipidoekin bateragarriak diren zundak ez baitaude eskuragarri. Zailtasun hori gainditzeko, azken aldiak lipidok ikertzeke 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 erabili ditzakete osagai lipidikoak eta proteinak aztertzeke, MKGen irudi osoa lortzeko, funtzioen erregulazioa hobeto ulertzeko eta MKGak itu terapeutiko berri bezala erabiltzeko.

Laburbilduz, BHFMe teknika bakar batek ere ezin du 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 konbinatu daitezke.

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

1. Taula BHFMTeknika ezberdinen 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 $\approx 100\text{ nm}$ ax $\approx 300\text{ nm}$	Fluoroforo edo markaketa bereizgarrien beharrik ez. Kolore biko eta 3D irudiak. Denbora-bereizmen egokia.	Bereizmen espazial mugatua.
STED	al $\approx 30\text{ nm}$ ax $\approx 100\text{ nm}$	Bereizmen espazial handia MKG asko aztertzeke.	Teknikarako zunda egoki gutxi. Denbora-bereizmen mugatua, <i>in vivo</i> egiteko eta dinamikak aztertzeke zaila. Fototoxikotasuna.
SMLM	al $\approx 20\text{ nm}$ ax $\approx 50\text{ nm}$	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 honek, BHFMTeknikak erabiltzerako orduan egon daitezkeen helburu esperimental posibleei erantzuna ematea du xede. Bertan, helburu bakoitzetik abiatuta, betebeharrak esperimentalak zeintzuk izan beharko liratekeen aipatzen da eta horiek aintzat hartuta beharizan bakoitzari hobekien egokitzen zaion teknika izendatzen da.

2. Taula Helburu ezberdinetarako beharrezkoak diren betebeharrak esperimentalak eta horiek betetzeko eraginkorrenak diren BHFMTeknikak.

Helburua	Betebeharrak esperimentalak	Teknika erabilgarria
Bi organuluren arteko elkarrekintza fisikoa aztertzea <u>zelula bizietan</u> 2D edo 3D-tan	- Z ardatzean laginaren sakontasun desberdinetan irudiak eskuratzea. - Denbora-bereizmen handia.	SIM
Bi organuluren arteko <u>garraio molekularra</u> aztertzea	- Denbora-bereizmen handia. - Albo-bereizmen handia.	SIM (<i>Grazing Incident</i> teknikarekin)
MKG batean <u>proteina jakin baten</u> kokapena aztertzea	- Albo-bereizmen altua. - Proteina jakin hori markatzeko zunda berezia.	STED
MKG batean <u>hainbat proteinen</u> kokapena aztertzea	- Albo-bereizmen altua. - Igorpen uhin luzera desberdinetako zundak.	SMLM

ESKER ONAK

Artikulu hau honako diru-laguntzek finantzatu dute: PID2020-117405GB-I00 diru-laguntza, MCIN/AEI/10.13039/501100011033 erakundeak finantzatua; “Europar Batasuna NextGenerationEU/PRTR” programaren bidez; Eusko Jaurlaritzaren diru-laguntzak, ELKARTEK22/86 eta IT1625-22; eta Ramón Areces Fundazioa, CIVP20S11276 diru-laguntza.

4. 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., HAJNÓCKY, 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., HAJNÓCKY, 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-Organellar 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.