



UNIVERSITAT DE VIC
UNIVERSITAT CENTRAL
DE CATALUNYA

LLIÇÓ INAUGURAL **2018-2019**

VISCA LA RESOLUCIÓ!
VISUALITZANT ESTRUCTURES
CEL·LULARS A ESCALA
NANOMÈTRICA

Dr. Carlo Manzo
Facultat de Ciències i Tecnologia



SCIENTIAE PATRIAEQUE
IMPENDERE VITAM

Universitat de Vic - Universitat Central de Catalunya

Lliçó inaugural

2018-2019

**VISCA LA RESOLUCIÓ!
VISUALITZANT ESTRUCTURES
CEL·LULARS A ESCALA
NANOMÈTRICA**

Dr. Carlo Manzo

*Pluris est oculus testis unus,
quam auriti decem.
Qui audiunt, audita dicunt:
qui vident, plane sciunt.*

Titus Maccius Plautus
Truculentus, Act II, sc. 6, line 8.

Si busquem al diccionari la paraula *ciència* trobem que la definició és “conjunt de coneixements obtinguts mitjançant l’observació i el raonament, sistemàticament estructurats i dels quals es dedueixen principis i lleis generals amb capacitat predictiva i comprovables experimentalment” (Real Academia Española, 2001).

És interessant destacar el paper i la posició que té en aquesta definició el terme *observació*, que fins i tot trobem abans de *raonament*. De fet, observant la realitat amb els nostres ulls podem descobrir molts fenòmens diferents. Així ho van fer els antics pensadors i d’aquesta manera ja van poder descobrir una gran part dels fenòmens naturals que coneixem ara. Només cal fixar-se que la mateixa paraula *teoria*, que deriva del verb grec *theorein* que significa mirar (Harper, 2001), ja antigament va arribar a referir-se a la comprensió a través de la contemplació de les coses naturals.

En aquest sentit, l’observació mitjançant la vista va ajudar a satisfer el desig primari de coneixement de l’ésser humà, almenys a l’escala humana. Encara que molt aviat aquest desig es va dirigir cap a l’observació del que era infinitament gran i infinitament petit –òbviament en relació a la nostra mida. No entraré en l’anàlisi de les motivacions i connotacions filosòfiques d’aquestes recerques, com ara si som els elements d’un sistema més gran, entendre com i de què estem fets, fins a l’angoixa d’estar suspesos entre el tot i el no-res (Pascal, 2006). Sigui per la raó que sigui, aquestes dimensions ja no poden ser explorades amb els ulls i necessitem ajuda per veure-hi més enllà, per veure les coses petites, per veure-hi millor. Aquesta necessitat d’obser-

var, investigar i estudiar l'infinitament gran i l'infinitament petit ha originat, abans de tot, el desenvolupament dels instruments òptics, com el microscopi i el telescopi.

En aquesta lliçó inaugural que tinc l'honor de pronunciar, il·lustraré els progressos tècnics i científics en el camp de la microscòpia que ens han fet arribar al desenvolupament de les tècniques de superresolució. Em centraré en uns descobriments obtinguts gràcies a aquestes tècniques en l'àmbit de la biologia cel·lular i de la biofísica, als quals he contribuït amb la meua recerca, duta a terme durant la meua estada al grup de la professora Maria F. Garcia-Parajo, primer a l'Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC) i després a l'Institut de Ciències Fotòniques (ICFO), i que ara continuo realitzant en el Grup de Recerca en Quantitative Biolmaging (QuBI) que coordino a la UVic-UCC.

Una mica d'història

Encara que l'existència d'objectes semblants a les lents es remunta a uns 4000 anys aC i hi ha escrits grecs sobre les propietats òptiques d'esferes plenes d'aigua al segle V aC, l'ús més antic dels microscopis simples (lupes) es remunta a l'ús generalitzat de lents en forma d'ulleres al segle XIII, quan es van inventar ulleres amb lents convexes a Itàlia per ajudar les persones grans amb presbícia. Durant els segles XV i XVI, la qualitat del vidre i les tècniques de polir per a les lents van millorar notablement. És en aquesta època quan es construeixen els primers microscopis i telescopis. Resulta complicat determinar definitivament els detalls precisos de la invenció d'aquests instruments. Encara que es pensi que l'astrònom italià Galileo Galilei inventés el telescopi, això no és estrictament cert. Sembla que va haver-hi precursors del telescopi a Itàlia en la dècada de 1590, abans que els primers telescopis reals apareguessin a Holanda la primera dècada del 1600. Almenys tres fabricants de lents holandesos –Zacharias Janssen, Hans Lippershey i Jacob Metius– reclamen la invenció del telescopi (King, 1955). El que sembla més cert és que Galileo va ser la primera persona a utilitzar un telescopi per a propòsits astronòmics. Basant-se en l'obra de Lippershey, va millorar el disseny del telescopi i va descobrir les quatre grans llunes de Júpiter –Io, Ganímedes, Callisto i Europa– i les característiques físiques de la Lluna (Galilei, 2016).

Pel que fa al microscopi, la història va ser bastant semblant. El primer instrument registrat va ser construït per Zacharias Janssen, probablement amb l'ajuda del seu pare Hans, a la dècada de 1590. Aquest període, però, va viure les aportacions de molts dissenyadors d'instruments científics, principalment holandesos, britànics i italians que van ser particularment actius en la fabricació de diferents tipus de microscopis. Hi va haver, doncs, una evolució constant des de les lents de mà simples a l'aparició de nombrosos prototips de microscopis més complexos, com ara el microscopi compost dissenyat per Robert Hooke (1635-1703) (Bardell, 2004; Croft, 2006).

El telescopi i el microscopi ens van permetre l'observació de dos mons nous. Aquestes dues invencions han revolucionat la nostra manera de concebre la realitat, expandint l'univers que coneixem cap a l'infinitament gran i l'infinitament petit.

Observant el micromón

L'ús del microscopi va obrir una època de descobriments molt excitants, sobretot en el camp de la biologia i de la medicina. Per primer cop es podia intentar veure què passava a una escala més petita. Anton van Leeuwenhoek (1632-1723), un comerciant holandès gairebé sense estudis, va construir molts microscopis al llarg de la seva vida. A més a més de construir-los, van Leeuwenhoek els va fer servir per a tota mena d'usos, des d'observar les teles que venia, fins a descobrir uns quants microorganismes. De fet, la qualitat de les lents que ell mateix construïa li va permetre observar bacils, estreptococs i moltes altres formes característiques de bacteris, protozous i paràsits, i els llevats de la cervesa. En aquella mateixa època, Marcello Malpighi (1628-1694) es va proposar revelar l'estructura oculta del cos humà mitjançant un microscopi. Va observar els alvèols dels pulmons, els receptors papil·lars de la llengua, la connexió entre els vasos arterials i venosos, va identificar els glòbuls vermells i va descriure amb precisió les primeres etapes del desenvolupament embrionari dels pollets. Paral·lelament a l'evolució del microscopi, va començar a gestar-se la teoria del germen: Francesco Redi (1626-1697), Luis Joblot (1645-1723) i Lazzaro Spallanzani (1729-1799) amb les seves aportacions van rebutjar quasi completament la teoria de la generació espontània (De Kruif, 1926; Wainwright & Lederberg, 1992).

Després d'haver descobert que el vi "dolent" contenia microorganismes que es podien veure a través d'un microscopi, Luis Pasteur (1822-1895) va desenvolupar la "pasteurització" un procés per matar els gèrmens bullint el vi. Pasteur va utilitzar els seus descobriments per ajudar a tractar malalties i per explicar com funcionava la vacunació. Examinant amb el microscopi la sang de la gent sana i comparant-la amb la sang de persones amb diverses malalties, va observar que la sang de la gent infectada contenia molts gèrmens. L'obra de Pasteur va ser revolucionària i va donar pas a Robert Koch (1843-1910) per descobrir, més tard, com cada tipus de germen causa una malaltia específica i poder establir una teoria germinal completa de les malalties infeccioses (De Kruif, 1926).

L'evolució de la microscòpia

Un altre gran pas per millorar l'observació mitjançant el microscopi va ser la introducció de procediments que permetien la visualització més fina dels microorganismes, com els mètodes de tinció. Cap al 1882, Koch va aconseguir la tinció del *Mycobacterium tuberculosis* amb blau de metilè, emprant calor per aconseguir que el colorant penetrés la paret cel·lular. Dos anys després, el patòleg danès Hans Christian Gram va introduir la famosa tinció que porta el seu nom i que permetia caracteritzar els bacteris. Aquesta classificació va ser posteriorment relacionada amb diferències en les característiques bioquímiques i morfològiques dels bacteris, i va permetre la divisió en les dues agrupacions que encara s'utilitzen avui dia.

Durant els segles XIX i XX, el microscopi òptic es va desenvolupar fins als seus límits teòrics, gràcies a les aportacions de Fraunhofer, Zeiss, Abbe, Schott, Zernike i Köhler. Els avanços més recents del microscopi òptic en biologia se centren en gran mesura en la invenció de la microscòpia de fluorescència (Rusk, 2009). Gràcies a la tecnologia làser es va poder construir un gran microscopi modern, el microscopi confocal (Davidovits & Egger, 1969). A més a més, es van desenvolupar moltes tècniques per a la tinció fluorescent d'estructures cel·lulars per a l'anàlisi a nivell molecular tant en mostres vives com fixades, com l'ús d'anticossos conjugats a molècules fluorescents (immunofluorescència) i les proteïnes fluorescents, el descobriment de les quals va ser guardonat amb el premi Nobel de la Química el 2008 (Nobel Media AB, 2018a).

La microscòpia de fluorescència ha tingut un paper central en la nostra comprensió de l'organització molecular i les interaccions dels sistemes biològics. La seva alta especificitat molecular i la seva capacitat d'imatge multicolor han permès visualitzar de forma directa les interaccions entre espècies moleculars específiques, i en ser poc invasiva, ha permès estudiar sistemes vius en condicions fisiològiques (Sigal, Zhou, & Zhuang, 2018).

La superresolució destrueix la barrera de difracció

La principal limitació de la microscòpia de fluorescència va ser la resolució espacial imposada per la difracció de la llum. Aquest límit de resolució, primer descrit per Ernst Abbe el 1873, fa que les estructures més petites no es puguin resoldre mitjançant microscopis òptics convencionals. De fet, objectes separats per una distància menor que aproximadament la meitat de la longitud d'ona de la llum visible, és a dir, de 200 a 300 nanòmetres, no es poden distingir. Aquesta és la causa que moltes estructures moleculars de les cèl·lules no es puguin resoldre amb un microscopi convencional. Recentment, l'arribada dels mètodes d'imatges de superresolució ha trencat aquest límit. El 8 d'octubre de 2014, el Premi Nobel de Química va ser atorgat a Eric Betzig, W.E. Moerner i Stefan Hell "pel desenvolupament de la microscòpia de fluorescència superresolta", que porta "la microscòpia òptica a la nanodimensió" (Nobel Media AB, 2018b).

Encara que hi ha diversos mètodes que aconsegueixen la resolució per sota del límit de la difracció, les tècniques funcionals per a la microscòpia de superresolució es poden dividir en dos grups: les tècniques deterministes i les tècniques estocàstiques.

Les tècniques del primer grup, basades en les transicions de fluorescència lineal òptica saturables i reversibles (RESOLFT, de l'anglès *REversible Saturable Optical Linear Fluorescence Transitions*) (Hofmann, Eggeling, Jakobs, & Hell, 2005) i que inclouen la tècnica d'esgotament d'emissió estimulada (STED, de l'anglès *STimulated Emission Depletion*) (Hell & Wichmann, 1994; Klar & Hell, 1999), superen el límit de difracció acompanyant un feix làser d'excitació amb un feix d'esgotament espacialment perfilat. Aquest feix d'esgotament, normalment en forma de rosquilla, serveix per contrarestar l'excitació a través de l'emissió estimulada o altres formes de transicions.

D'aquesta manera s'aconsegueix detectar només la fluorescència de les molècules situades al mig de la rosquilla i per tant es redueix la regió efectiva d'emissió.

La segona categoria aconsegueix millorar la resolució mitjançant l'activació estocàstica de molècules individuals a temps diferents; aquest grup inclou la microscòpia òptica estocàstica de reconstrucció (STORM, de l'anglès *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*) (Rust, Bates, & Zhuang, 2006) i la microscòpia de localització fotoactivada (PALM i FPALM, de l'anglès *Photo-Activated Light Microscopy*) (Betzig *et al.*, 2006; Hess, Girirajan, & Mason, 2006). Activant a l'atzar només un petit subconjunt de molècules fluorescents dins d'un camp de visió en un moment donat, s'aconsegueix que les imatges no se sobreposin i se'n puguin localitzar les posicions amb gran precisió. La iteració d'aquest procés genera altres subconjunts estocàsticament diferent de molècules i permet reconstruir una imatge a partir de nombroses localitzacions moleculars acumulades al llarg del temps.

Resolent estructures cel·lulars

La resolució a escala nanomètrica proporcionada per imatges de superresolució ha fet avançar substancialment la nostra capacitat per desxifrar l'organització espacial de diferents estructures moleculars de les cèl·lules (Huang, Babcock, & Zhuang, 2010; Sahl, Hell, & Jakobs, 2017) i fins i tot ha conduït a descobriments d'estructures cel·lulars prèviament desconegudes.

A la superfície cel·lular, les proteïnes de membrana com els receptors, els canals, les proteïnes d'escissió de vesícules i les proteïnes de fusió vírica han estat investigades per diversos mètodes de superresolució i sovint s'ha trobat que assumeixen organitzacions espacials de rellevància funcional (Sigal *et al.*, 2018).

En aquesta línia, la meua investigació ha contribuït a l'estudi de l'organització d'un important receptor de patògens, DC-SIGN. DC-SIGN és present a la membrana de cèl·lules del sistema immunitari humà i és responsable de lligar i internalitzar una multitud de patògens. Encara que es coneix que DC-SIGN s'organitza en petits grups de molècules de dimensió nanomètrica (nanoclústers) a la superfície cel·lular, els mecanismes moleculars responsables d'aquestes estructures i el seu paper en l'enllaç dels virus no esta-

ven clars. Mitjançant la quantificació d'imatges de microscòpia STED, vam poder demostrar que els nanoclústers de DC-SIGN depenen estrictament de la seva estructura molecular i correlacionen amb la capacitat d'unió viral. Vam demostrar que les interaccions controlades per la regió extracel·lular de DC-SIGN són essencials per coordinar la seva organització en la membrana cel·lular, ampliant eficaçment les seves capacitats d'enganxar patògens d'escala nanomètrica (Manzo *et al.*, 2012).

Utilitzant les mateixes tècniques, vam estudiar altres sistemes biològics relacionats amb la resposta immunitària. Per exemple, vam estudiar el paper de l'organització de les molècules CD1d a la membrana de les cèl·lules que presenten antigens en l'activació de les cèl·lules T assassines naturals, una qüestió important en casos d'infeccions, càncer i trastorns autoimmunes (Torreno-Pina, Manzo, Salio, *et al.*, 2016). Recentment, vam estudiar el receptor de quimiocina CXCR4 i el seu lligand CXCL12, que formen un sistema clau en molts processos, com ara la producció de cèl·lules de la sang o la resposta immunitària, identificant com la seva organització influeix en la funció cel·lular (Martínez-Muñoz *et al.*, 2018).

Dins el citoplasma, les imatges de superresolució també han proporcionat noves idees sobre l'organització de les estructures del citoesquelet i dels orgànuls cel·lulars, com les del reticle endoplasmàtic i els mitocondris, i també han produït nous punts de vista sobre les interaccions que tenen lloc a l'interior de les cèl·lules (Sigal *et al.*, 2018). Dins el nucli cel·lular, mitjançant la superresolució s'han revelat organitzacions interessants del DNA i de les proteïnes que interactuen amb el DNA, així com diferents nivells de compactació de cromatina relacionats amb diferents estats epigenètics (Sigal *et al.*, 2018).

Amb la tècnica STORM, vam contribuir a proporcionar una millor comprensió de l'arquitectura interna del nucli, investigant l'organització dels nucleosomes en diferents tipus cel·lulars (Ricci, Manzo, Lakadamyali, & Cosma, 2015). En concret, vam poder quantificar que els nucleosomes formen grups de mides diferents, intercalats amb regions de DNA empobrides de nucleosomes i vam determinar que el nombre de nucleosomes per grup era específic del tipus cel·lular. A més a més, vam poder relacionar la mida mitjana dels grups de nucleosomes amb el potencial de pluripotència de les cèl·lules, vinculant l'arquitectura de la cromatina a l'estat de la cèl·lula mare

(Ricci *et al.*, 2015). Aquest descobriment potencialment podria ser utilitzat per a la identificació de cèl·lules canceroses i les conseqüents teràpies de seguiment o per identificar les subpoblacions rares de cèl·lules mare en un teixit específic.

Si per un costat la microscòpia de superresolució s'ha convertit en una eina important per a la recerca, encara mostra algunes restriccions, com ara la impossibilitat de quantificar exactament el nombre de proteïnes. Per superar aquestes limitacions, hem desenvolupat uns estàndard de calibratge basat en *origami* de DNA i proteïnes fluorescents, que permet determinar el nombre de còpies de diverses proteïnes en diverses condicions experimentals (Zanacchi *et al.*, 2017).

Dinàmiques moleculars

Com hem vist, els estudis de microscòpia de fluorescència ens han ajudat a revelar com es distribueixen molts dels components cel·lulars, des dels lípids i les proteïnes de la superfície cel·lular fins als orgànuls intracel·lulars, i el DNA dins del nucli cel·lular. L'organització d'aquest elements dins la cèl·lula és molt dinàmica ja que ha de respondre a diferents estímuls bioquímics i mecànics, i és essencial per a molts processos biològics, com per exemple la senyalització, la diferenciació, l'adhesió cel·lular i la migració. Poder visualitzar la dinàmica dels components subjacent a aquests mecanismes cel·lulars ens ajudaria a comprendre millor els sistemes vius. A més a més, poder resoldre el moviment de molècules individuals en el context natural de les cèl·lules vives proporcionaria una descripció més quantitativa i afinada dels processos dinàmics espaciotemporals que controlen la funció cel·lular. En les últimes dècades s'han desenvolupat una gran quantitat de tècniques experimentals per mesurar processos dinàmics en sistemes vius. Entre elles, el rastreig de partícules individuals (SPT, de l'anglès *Single Particle Tracking*) fa servir una tecnologia similar a la dels mètodes estocàstics de superresolució per localitzar molècules concretes amb precisió nanomètrica en funció del temps. Adjuntant aquestes localitzacions s'aconsegueix reconstruir les trajectòries de molècules individuals i permet mesurar les seves característiques dinàmiques (Manzo & Garcia-Parajo, 2015; Torreno-Pina, Manzo, & Garcia-Parajo, 2016). Mitjançant aquesta tècnica vam estudiar molts sistemes biològics de la membrana cel·lular. Per exemple, vam visualitzar com les

interaccions controlades per glicans ajuden en la formació de patrons d'escala micromètrica en la membrana plasmàtica i d'aquesta forma influeixen la internalització i el reciclatge de receptors (Torreno-Pina *et al.*, 2014).

També vam estudiar amb detall la dinàmica del receptor DC-SIGN, que va mostrar difusió anòmala i no ergòdica causada per canvis de la constant de difusió, d'acord amb la visió actual de la membrana cel·lular com un entorn altament dinàmic i desordenat. A més a més, vam poder correlacionar aquest moviment exòtic amb l'estructura molecular del receptor i la seva funció biològica (Manzo *et al.*, 2015). La interpretació teòrica d'aquest fenomen va proporcionar una sèrie de models que per la seva generalitat poden ser aplicat a altres àmbits, com la física de la matèria, la geologia o l'ecologia (Charalambous *et al.*, 2017; Massignan *et al.*, 2014; Molina-García, Pham, Paradisi, Manzo, & Pagnini, 2016; Muñoz-Gil *et al.*, 2017).

Finalment, vam estudiar com el moviment de la integrina $\alpha 4\beta 1$, una molècula fonamental per a l'adhesió cel·lular durant la resposta immunitària, és influenciat per diferents estímuls d'activació, com quimiocines i/o lligands (Sosa-Costa *et al.*, 2016).

Mirant endavant

Així com els primers microscopis van obrir-nos els ulls sobre un món nou, les tècniques òptiques de superresolució i de molècula individual estan començant a transformar la nostra comprensió dels sistemes biològics. Les aplicacions biològiques s'estan expandint ràpidament, proporcionant contínuament molta informació nova que encara necessita ser analitzada i processada adequadament. Els beneficis que es poden pensar a assolir amb aquestes tècniques són molts i esperançadors, com ara noves tècniques de diagnòstic i de biomedicina personalitzada. La clau per aconseguir aquests resultats serà apropar-nos a una interpretació quantitativa dels fenòmens biològics *in health and disease*. Aquests objectius requereixen paral·lelament el desenvolupament de tècniques òptiques i fotòniques i nous mètodes per al marcatge molecular. Tanmateix, l'extracció d'informació a partir de les imatges i la interpretació de les dades requereixen la creació de mètodes d'anàlisi més eficients, i tan sols acabem de començar a aplicar les noves tecnologies basades en *deep learning* (Strack, 2018). Un repte multidisciplinari per al futur pròxim, al qual volem contribuir amb el nostre esforç.

Bibliografia

- Bardell, D. (2004). The invention of the microscope. *Bios*, 75(2), 78-84.
- Betzig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacino, J. S., ... Hess, H. F. (2006). Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313(5793), 1642-1645.
- Charalambous, C., Muñoz-Gil, G., Celi, A., Garcia-Parajo, M. F., Lewenstein, M., Manzo, C., & García-March, M. A. (2017). Nonergodic subdiffusion from transient interactions with heterogeneous partners. *Physical Review E*, 95, 032403.
- Croft, W. J. (2006). *Under the microscope: a brief history of microscopy* (Vol. 5). World Scientific.
- Davidovits, P., & Egger, D. (1969). Scanning Laser Microscope. *Nature*, 223, 831.
- De Kruif, P. (1926). *Microbe hunters*. Harcourt, Brace.
- Galilei, G. (2016). *Sidereus Nuncius, or The Sidereal Messenger*. University of Chicago Press.
- Harper, D. (2001). Theory. Online Etymology Dictionary. Recuperat el 24 de setembre de 2018, a <https://www.etymonline.com>
- Hell, S. W., & Wichmann, J. (1994). Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics letters*, 19(11), 780-782.
- Hess, S. T., Girirajan, T. P. K., & Mason, M. D. (2006). Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophysical Journal*, 91(11), 4258-4272.
- Hofmann, M., Eggeling, C., Jakobs, S., & Hell, S. W. (2005). Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(49), 17565-17569.
- Huang, B., Babcock, H., & Zhuang, X. (2010). Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells. *Cell*, 143(7), 1047-1058.

- King, H. C. (1955). *History of the Telescope*. C. Griffin Ed., London.
- Klar, T. A., & Hell, S. W. (1999). Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy. *Optics letters*, 24(14), 954-956.
- Manzo, C., & Garcia-Parajo, M. F. (2015). A review of progress in single particle tracking: from methods to biophysical insights. *Reports on Progress in Physics*, 78(12), 124601.
- Manzo, C., Torreno-Pina, J. A., Massignan, P., Lapeyre, G. J., Lewenstein, M., & Garcia Parajo, M. F. (2015). Weak ergodicity breaking of receptor motion in living cells stemming from random diffusivity. *Physical Review X*, 5(1), 011021.
- Manzo, C., Torreno-Pina, J. A., Joosten, B., Reinieren-Beeren, I., Gualda, E. J., Loza-Alvarez, P., ... Cambi, A. (2012). The neck region of the C-type lectin DC-SIGN regulates its surface spatiotemporal organization and virus-binding capacity on antigen-presenting cells. *The Journal of biological chemistry*, 287(46), 38946-38955.
- Martínez-Muñoz, L., Rodríguez-Frade, J. M., Barroso, R., Sorzano, C. Ó. S., Torreño-Pina, J. A., Santiago, C. A., ... Mellado, M. (2018). Separating actin-dependent chemokine receptor nanoclustering from dimerization indicates a role for clustering in CXCR4 signaling and function. *Molecular Cell*, 70(1), 106-119.
- Massignan, P., Manzo, C., Torreno-Pina, J. A., García-Parajo, M. F., Lewenstein, M., & Lapeyre, G. J. (2014). Nonergodic subdiffusion from brownian motion in an inhomogeneous medium. *Physical Review Letters*, 112(15), 150603.
- Molina-García, D., Pham, T. M., Paradisi, P., Manzo, C., & Pagnini, G. (2016). Fractional kinetics emerging from ergodicity breaking in random media. *Physical Review E*, 94, 052147.
- Muñoz-Gil, G., Charalambous, C., García-March, M. A., Garcia-Parajo, M. F., Manzo, C., Lewenstein, M., & Celi, A. (2017). Transient subdiffusion from an Ising environment. *Physical Review E*, 96(5), 052140.
- Nobel Media AB. (2018a). The Nobel Prize in Chemistry 2008. NobelPrize.org. Recuperat el 28 de setembre de 2018, a <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2008/summary/>

- Nobel Media AB. (2018b). The Nobel Prize in Chemistry 2014. NobelPrize.org. Recuperat el 28 de setembre de 2018, a <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2014/summary/>
- Pascal, B. (2006). *Pensées*. Urbana, Illinois: Project Gutenberg. Recuperat el 22 de setembre de 2018, a <http://www.gutenberg.org/ebooks/18269>
- Real Academia Española. (2001). Ciencia. Diccionario de la lengua española (22.^a ed.). Recuperat el 24 de setembre de 2018, a <http://dle.rae.es/>
- Ricci, M. A., Manzo, C., Lakadamyali, M., & Cosma, M. P. (2015). Chromatin fibers are formed by heterogeneous groups of nucleosomes *in vivo*. *Cell*, 160(6), 1145–1158.
- Rusk, N. (2009). Milestone 4 (1911, 1929, 1967). First fluorescence microscope, first epifluorescence microscope, the dichroic mirror. In: Evanko D, Heinrichs A, Karlsson Rosenthal C (eds) *Nature milestones in light microscopy*. Macmillan.
- Rust, M. J., Bates, M., & Zhuang, X. (2006). Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature methods*, 3(10), 793-795.
- Sahl, S. J., Hell, S. W., & Jakobs, S. (2017). Fluorescence nanoscopy in cell biology. *Nature reviews Molecular cell biology*, 18(11), 685.
- Sigal, Y. M., Zhou, R., & Zhuang, X. (2018). Visualizing and discovering cellular structures with super-resolution microscopy, 361, 880-887.
- Sosa-Costa, A., Isern de Val, S., Sevilla-Movilla, S., Borgman, K. J. E., Manzo, C., Teixidó, J., & Garcia-Parajo, M. F. (2016). Lateral mobility and nanoscale spatial arrangement of chemokine-activated $\alpha 4\beta 1$ integrins on T cells. *The Journal of biological chemistry*, 291(40), 21053–21062.
- Strack, R. (2018). Deep learning advances super-resolution imaging. *Nature Methods*, 15(6), 403.
- Torreno-Pina, J. A., Castro, B. M., Manzo, C., Buschow, S. I., Cambi, A., & Garcia-Parajo, M. F. (2014). Enhanced receptor-clathrin interactions induced by N-glycan-mediated membrane micropatterning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(30), 11037–11042.

- Torreno-Pina, J. A., Manzo, C., & Garcia-Parajo, M. F. (2016). Uncovering homo-and hetero-interactions on the cell membrane using single particle tracking approaches. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 49(10), 104002.
- Torreno-Pina, J. A., Manzo, C., Salio, M., Aichinger, M. C., Oddone, A., Lakadamyali, M., ... Garcia-Parajo, M. F. (2016). The actin cytoskeleton modulates the activation of iNKT cells by segregating CD1d nanoclusters on antigen-presenting cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States Of America*, 113(6), E772-E781.
- Wainwright, M., & Lederberg, J. (1992). History of microbiology. *Encyclopedia of microbiology*, 2, 419-437.
- Zanacchi, F. C., Manzo, C., Alvarez, A. S., Derr, N. D., Garcia-Parajo, M. F., & Lakadamyali, M. (2017). A DNA origami platform for quantifying protein copy number in super-resolution. *Nature Methods*, 14(8), 789-792.



Universitat de Vic
Universitat Central de Catalunya

Carrer de la Sagrada Família, 7

08500 Vic. Barcelona

Tel. 938 861 222

www.uvic.cat