

IMAGE-PRO

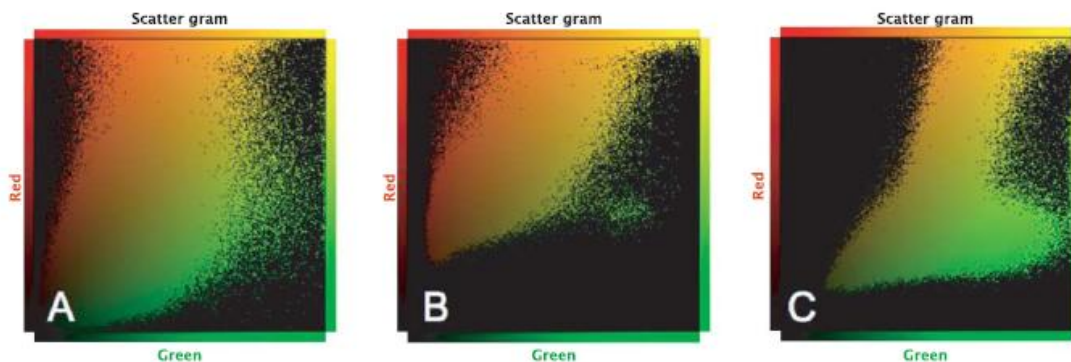
Ποσοτική ανάλυση συνεντοπισμού φθοριοχρωμάτων Quantitative colocalization analysis

Η ανάλυση συνεντοπισμού σε πολυχρωματικές εικόνες μικροσκοπίας φθορισμού βασίζεται στην μελέτη παρουσίας σήματος διαφορετικού φθορισμού στο ίδιο pixel της ψηφιακής εικόνας. Θα πρέπει να λαμβάνεται υπ'οψιν ότι η επιβεβαίωση συνεντόπισης των αντιγόνων που μας ενδιαφέρουν δεν αποτελεί απόδειξη της λειτουργικής τους σχέσης.

Για παράδειγμα η συνεντόπιση πράσινου και κόκκινου φθορισμού που προέρχεται από σήμανση διαφορετικών αντιγόνων ανιχνεύεται με 3 εικόνες. 1) μια με φθορισμό στο κόκκινο, 2) μια με φθορισμό στο πράσινο και 3) μια συνδυασμένη, όπου τα επικαλυπτόμενα pixels φαίνονται κίτρινα.

Το λογισμικό που χρησιμοποιούμε υπολογίζει ποσοτικά το βαθμό συνεντόπισης, εφαρμόζοντας αλγόριθμους στην περιοχή ενδιαφέροντος (ROI=region of interest) και παράγει έναν αριθμό συντελεστών.

Η κατανομή των pixels μπορεί να οπτικοποιηθεί σε 2D σκεδαστικό διάγραμμα (εικόνα 1).



Εικόνα 1. Παραδείγματα των σκεδαστικών διαγραμμάτων που προέρχονται από το λογισμικό ανάλυσης συνεντόπισης και δείχνουν τις διαφορές στην κατανομή των pixels στις εικόνες που μελετήθηκαν (A–C). Το επιλεγμένο ζευγάρι ήταν κόκκινο-πράσινο. Τα επικαλυπτόμενα κίτρινα pixels βρίσκονται στη διαγώνιο. Στο διάγραμμα C παρατηρείται ο μικρότερος βαθμός συνεντόπισης.

Πρακτικές οδηγίες για μελέτες συνεντόπισης

1. Σωστή ετοιμασία του δείγματος στο οποίο επιθυμούμε να μελετήσουμε πιθανή συνεντόπιση δύο αντιγόνων:

- Προσοχή ώστε τα επιλεγμένα φθοριοχρώματα που χρησιμοποιούμε να έχουν καλά διαχωρισμένα φάσματα εκπομπής και απορρόφησης.
- Χρήση αντισωμάτων με υψηλή ειδικότητα για τα συγκεκριμένα αντιγόνα και απουσία cross reactivity.
- Σταθερή χρήση υλικού σταθεροποίησης (mounting) (π.χ. Mowiol, cityfluor etc) στα δείγματά μας, καθώς μπορεί αλλαγή του υλικού να επηρεάσει το επίπεδο του background φθορισμού.
- Καθορισμός του ποσοστού του αυτοφθορισμού, με χρήση μη σημασμένων δειγμάτων ως μάρτυρες.

2. Σωστή λήψη και επεξεργασία εικόνων:

- Θα πρέπει να αποφεύγεται η λήψη εικόνων με έντονο φθορισμό ή υψηλό contrast, καθώς αυτό μπορεί να οδηγήσει σε κορεσμό του σήματος.
- Να αποφεύγεται η ταυτόχρονη λήψη εικόνων, αλλά η χρήση του sequential scanning. Αυτό βοηθά να ελαχιστοποιηθεί το bleed-through effect.
- Κατά την αποθήκευση της εικόνας, να επιλέγουμε το TIFF format (αποθήκευση σαν JPEG, PICT, BMP, οδηγεί σε απώλεια δεδομένων της ψηφιακής εικόνας)
- Να αποφεύγεται πριν τη μελέτη της συνεντόπισης, η επεξεργασία της εικόνας με προγράμματα όπως το Adobe Photoshop.

3. Περιορισμοί στις εικόνες που συλλέγουμε με το μικροσκόπιο και η σημασία της διόρθωσης του Background:

Το πρόβλημα κατά τη λήψη της εικόνας είναι ότι συχνά μπορεί να υπάρχει υψηλός θόρυβος (background), που να φτάνει έως και το 30% της μέγιστης έντασης φθορισμού. Για το λόγο αυτό, πριν γίνουν οι μετρήσεις για τη συνεντόπιση πρέπει να διορθωθεί ο θόρυβος των εικόνων. Αν οι εικόνες έχουν ληφθεί με το Olympus Cell R σύστημα, το λογισμικό Cell R παρέχει τη δυνατότητα αφαίρεσης/διόρθωσης του background. Το βήμα αυτό είναι πολύ σημαντικό και επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό το αποτέλεσμα του υπολογισμού των συντελεστών συνεντόπισης.

4. Σημασία της μείωσης της επικάλυψης (Cross-talk) των φασμάτων των φθοριοχρωμάτων:

Ένα εμπόδιο στον αξιόπιστο υπολογισμό συντελεστών συνεντόπισης είναι η επικάλυψη των φασμάτων των φθοριοχρωμάτων. Αυτό μπορεί να μειωθεί με εφαρμογή sequential laser scanning στο συνεστιακό μικροσκόπιο. Το Sequential scanning βοηθά στη μείωση της επικάλυψης με διέγερση κάθε χρωστικής χωριστά.

Στην περίπτωση που έχουμε συλλέξει εικόνες με μικροσκοπία φθορισμού ευρέως πεδίου, μπορούμε να εφαρμόσουμε το λογισμικό για Φασματοσκοπικό διαχωρισμό φθορίζουσών ουσιών (Spectral unmixing).

5. Συντελεστές που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της συνεντόπισης:

Η συνεντόπιση δύο φθοριοχρωμάτων μπορεί να αξιολογηθεί ποσοτικά χρησιμοποιώντας αλγόριθμους, που υπολογίζουν τους εξής συντελεστές:

- Pearson's correlation,
- Manders' overlap,
- συνεντόπισης $m1$ και $m2$,
- συνεντόπισης $M1$ και $M2$,
- overlap $k1$ και $k2$

Οι συντελεστές αυτοί χρησιμοποιούν διαφορετικές προσεγγίσεις για να υπολογίσουν τη συνεντόπιση και έχουν διαφορετική ευαισθησία και εφαρμογή.

Ο συντελεστής συσχέτισης Pearson (Pearson's correlation) είναι ένας από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους αλγόριθμους για να περιγράψει τη συσχέτιση κατανομής της έντασης φθορισμού σε διαφορετικά κανάλια (channels). Οι τιμές που παίρνουμε για τον συντελεστή αυτό κυμαίνονται μεταξύ -1.0 και 1.0 , όπου το 0 δεν δείχνει σημαντική συσχέτιση, και το -1.0 δείχνει πλήρως αρνητική συσχέτιση. Εντούτοις, οι αρνητικές τιμές στο Pearson's correlation coefficient, θα πρέπει να ερμηνεύονται πολύ προσεκτικά. Εάν η τιμή στο Pearson's correlation coefficient είναι >0 , καλό θα ήταν να χρησιμοποιήσουμε το Manders' overlap coefficient για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων μας.

Ο συντελεστής Manders' overlap δείχνει την επικάλυψη των σημάτων και επομένως αντιπροσωπεύει τον αληθινό βαθμό της συνεντόπισης. Οι τιμές κυμαίνονται από 0 έως 1.0 . Εάν μια εικόνα έχει συντελεστή Manders' overlap 0.5 , αυτό δείχνει ότι το 50% των pixels επικαλύπτονται. Μία τιμή 0 σημαίνει ότι δεν υπάρχουν επικαλυπτόμενα pixels.

Οι συντελεστές συνεντόπισης $m1$ και $m2$ περιγράφουν τη συνεισφορά καθενός από τα δύο επιλεγμένα φθοριοχρώματα (channels) στα pixels που μας ενδιαφέρουν. Για παράδειγμα, εάν το κόκκινο-πράσινο ζεύγος καναλιών είναι επιλεγμένο και τα $m1$ και $m2$ είναι 1.0 και 0.2 , αντίστοιχα, αυτό σημαίνει ότι όλα τα κόκκινα pixels συνεντοπίζονται με τα πράσινα pixels, αλλά μόνο το 20% των πράσινων pixels συνεντοπίζονται με τα κόκκινα. Η τιμή 1.0 και για τα δύο κανάλια υποδεικνύει τέλεια συνεντόπιση.

Οι συντελεστές συνεντόπισης $M1$ και $M2$ είναι πανομοιότυποι με τα $m1$ και $m2$, αλλά εφαρμόζονται για την ανάλυση σκεδαστικών διαγραμμάτων (scatter gram ROI):

Οι συντελεστές overlap $k1$ και $k2$ διαχωρίζουν την τιμή της συνεντόπισης σε ένα ζεύγος ξεχωριστών παραμέτρων. Εξαρτώνται από τη συνολική ένταση του φθορισμού στα δύο κανάλια και είναι ευαίσθητοι σε διαφορές στην ένταση των σημάτων.

ΣΥΝΟΠΤΙΚΑ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΟΥΣ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΕΣ ΣΥΝΕΝΤΟΠΙΣΗΣ

Στον πίνακα φαίνεται η σύγκριση των συντελεστών. Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο συντελεστής Pearson's correlation δίνει καλά αποτελέσματα. Εντούτοις, εάν το ένα αντιγόνο έχει σημάνει καλύτερα από το άλλο, τότε θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ο συντελεστής Manders' overlap.

Π.χ. μπορεί ο συντελεστής Pearson να είναι 0.88, ο συντελεστής Manders να είναι 0.92, οι συντελεστές συνεντόπισης m_1 και m_2 να είναι 0.97 και 0.99, αντίστοιχα, και οι συντελεστές overlap k_1 και k_2 να είναι 1.24 και 0.68, αντίστοιχα. Αυτά τα ποσοστά δείχνουν ότι υπάρχει συνεντόπιση.

Table 1. Brief comparison of coefficients used to estimate colocalization with their meanings, ranges of values, and use

Coefficients	Meaning	Values	Use
Pearson's correlation coefficient [19].	Describes the correlation of the intensity distribution between channels [5, 20].	From -1.0 to 1.0; 0 indicates no significant correlation and -1.0 indicates complete negative correlation.	Can be used in any colocalization experiment.
Overlap coefficient according to Manders [19].	Indicates an actual overlap of the signals, represents the true degree of colocalization [5, 20].	From 0 to 1.0; 0.5 implies that 50% of both selected channels colocalize.	Can be used in any colocalization experiment, especially applicable when fluorescence of one antigen is stronger than of the other.
Colocalization coefficients m_1 and m_2 [34].	Describe contribution of each one from two selected channels to the pixels of interest [5, 20].	From 0 to 1.0; m_1 and m_2 of 1.0 and 0.2 for red-green pair imply that all red pixels colocalize with green, but only 20% of green pixels colocalize with red.	Can be used in any colocalization experiment.
Colocalization coefficients M_1 and M_2 [5, 20].	Identical to m_1 and m_2 , but applied to analyze scatter gram ROI [5, 20].	From 0 to 1.0; m_1 and m_2 of 1.0 and 0.2 for red-green pair imply that all red pixels colocalize with green, but only 20% of green pixels colocalize with red.	Can be used in any colocalization experiment.
Overlap coefficients k_1 and k_2 [33].	Split the value of colocalization into the two separate parameters, allows to determine the contribution of each antigen to the areas with colocalization [5, 20].	Vary.	Can be used in any colocalization experiment.

(Zinchuk V. et al, 2007)

IMAGE-PRO:

1. Υπολογισμός των συντελεστών συνεντόπισης (Colocalization co-efficients)

- Διπλό κλικ στο **image-pro plus** στο desktop
- File → open → ανοίγουμε την εικόνα
- Window → hide/show tool bar
- Επιλέγουμε είτε ολόκληρη την εικόνα είτε κάποιο από τα AOI (area of interest)
π.χ. Irregular AOI
- Measure → co-localisation → ανοίγει το παράθυρο co-localisation analysis. Το παράθυρο περιέχει τις εξής επιλογές:

1. CREATE GRAY CO-LOCALISATION WITH FREQUENCIES

2. CREATE COLOR CO LOCALISATION

3. CREATE 3-D VIEW OF COLOR CO-LOCALISATION

4. CALCULATE CORRELATION BETWEEN IMAGES

Μπορούμε να επιλέξουμε το CREATE COLOR CO LOCALISATION, οπότε εμφανίζονται σκεδαστικά διαγράμματα

Όποια επιλογή και αν διαλέξουμε, υπολογίζονται οι τιμές των συντελεστών:

Pearson's correlation R_r
Overlap coefficient/ Manders' overlap R
Overlap coefficient k_1
Overlap coefficient k_2
Co-localization (ch2>0) m_1
Co-localization (ch1>0) m_2
Co-localization (ch2 within AOI) M_1
Co-localization (ch1 within AOI) M_2

2. Εφαρμογή για υπολογισμό συνεντόπισης σε χρώση διπλού φθορισμού (co-localisation in double fluorescence staining)

- Διπλό κλικ στο **image-pro plus** στο desktop
- **pasteur** → **fluoro colocalisation** → **image per sheet** (δίνει όλα τα colocalisation ratios σε ένα φύλλο στο excel). Επίσης, υπάρχει και η επιλογή **image in a sheet**, στην οποία μπαίνουν τα αποτελέσματα της κάθε εικόνας σε ένα αρχείο Excel.
- **fluoro colocalise** → **activate**
- **load** → διαλέγουμε το αρχείο με την φωτογραφία και το ανοίγουμε
- **active spatial calibration** → π.χ. 63x φακός, 1024 pixel → **ok** → **continue**
- διαλέγουμε π.χ. το **red signal** → **assign** → φτιάχνουμε τα όρια μέχρι να κυκλώσει όλες τις περιοχές που μας ενδιαφέρουν → **continue**
- διαλέγουμε π.χ. το **blue signal** → **assign** → φτιάχνουμε τα όρια μέχρι να κυκλώσει όλες τις περιοχές που μας ενδιαφέρουν → **continue**
- από την εντολή **draw/merge**, επιλέγουμε σε ποιο κανάλι θα γίνει το draw/merge. Με αριστερό κλικ φτιάχνουμε το σχήμα (την περιοχή που μας ενδιαφέρει) και με δεξί κλικ κλείνουμε το σχήμα → **ok**
- **Co-Localise** → **save data**
- Στη συνέχεια, ανοίγει αυτόματα ένα **excel**. Στο excel ανοίγουμε το φύλλο **Ipp Co-localise**.
- Εκεί φαίνονται τα εξής αποτελέσματα με ποσοστά % co-localisation:
 - Green in red
 - Blue in red
 - Red in green
 - Blue in green
 - Red in blue
 - Green in blue