

Introducción a Colocalización Cuantitativa



ImageJ / Fiji

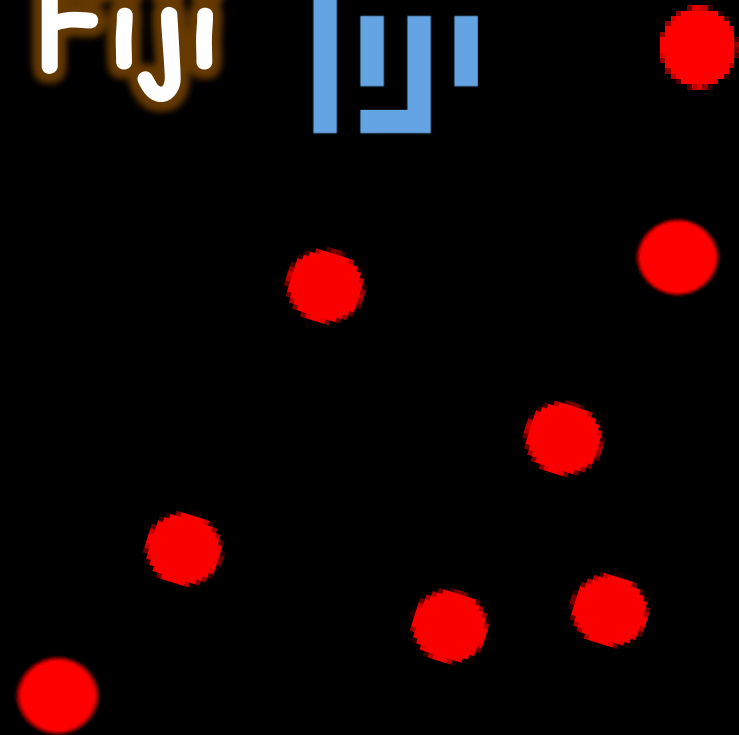


Verónica Labrador Cantarero

Servicio de Microscopía Óptica y Confocal (SMOC)

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM)

Ed: Noviembre 2014



¿Cómo Analizar la Colocalización?

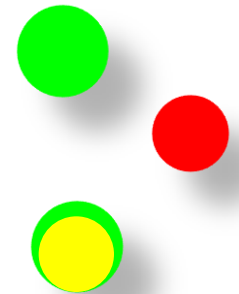
Colocalización **Cualitativa**

Sólo Inspección Visual

+ Extendido. Sencillo

+ Subjetiva

No estadística



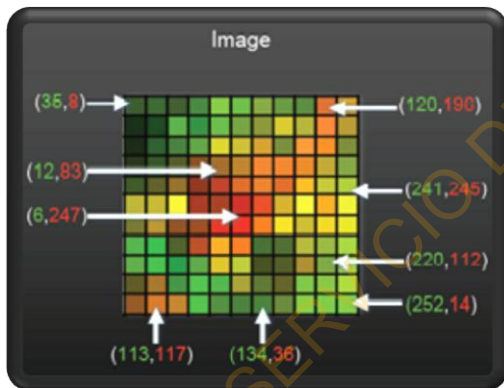
Colocalización **Cuantitativa**

Utiliza datos de la imagen

+ Compleja

+ Objetiva

Estadística



¿Qué información Obtengo?

Colocalización **Cualitativa**:

“Veo Amarillo luego hay Colocalización”

Colocalización **Cuantitativa**:

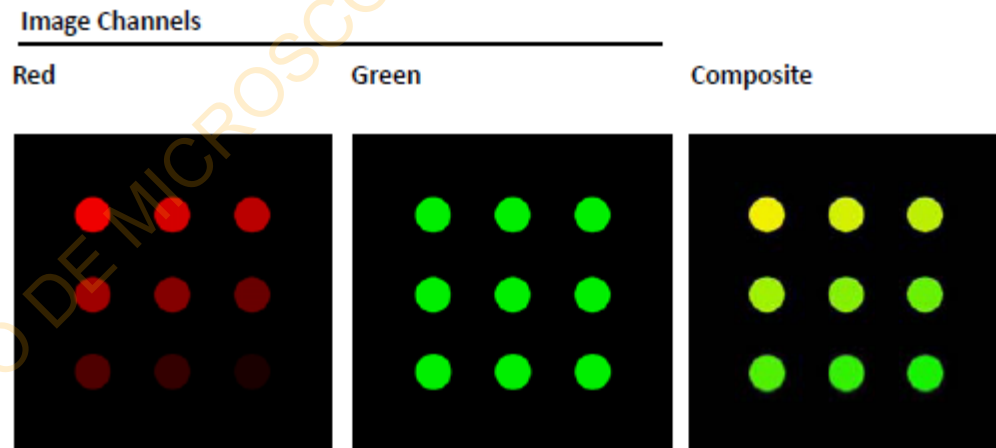
Correlación = ¿Existe Asociación entre Intensidad de Imagen A y B?

Solapamiento = Coincidencia Espacial de Elementos entre Imagen A y B

Colocalización Cualitativa:

“Veo Amarillo luego hay Colocalización”

Cuidado, no siempre que hay verde y rojo vemos amarillo, depende de las intensidades:



Colocalización Cuantitativa

paso a paso...

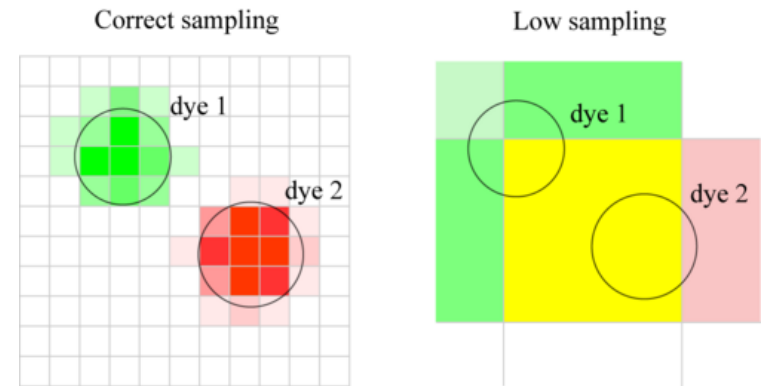
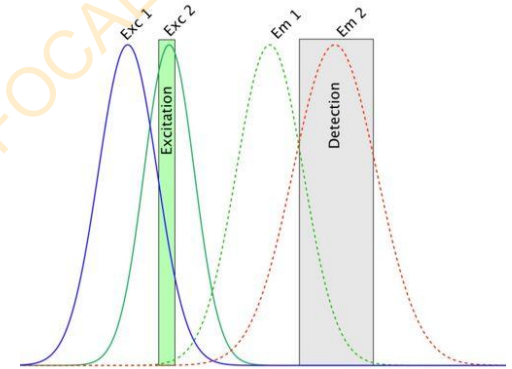
1 Adquisición de la Imagen
Deconvolución. Corrección **Bleedthrough**, **Shift**, **Background**

2 Definir estructura de interés
ROI
Threshold

3 Método Colocalización
Intensidad
Objetos
¿Colocalización Verdadera o Azar?

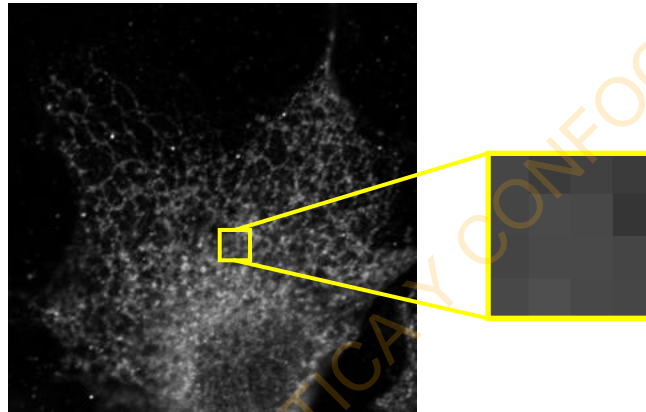
Adquisición de la Imagen

- Evitar **Bleedthrough**, **Autofluorescencia**
- 12 **BITs** = más datos que 8BITs
- Buena **Relación Señal/Ruido**
- Precaución con **Desenfoque**, **Fondo**
- **No Saturación**
- Correcto "**Sampling**" (tamaño pixel, resolución)



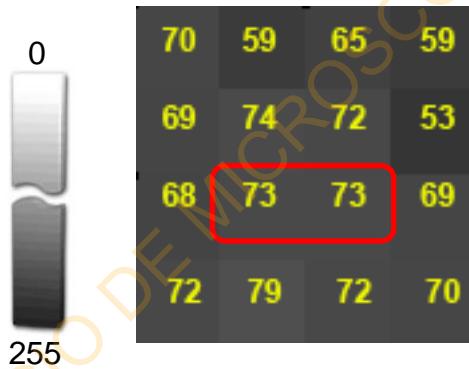
¿Dudas? Consultad al personal del SMOC

12 Bits = + Información Intensidad



8Bits

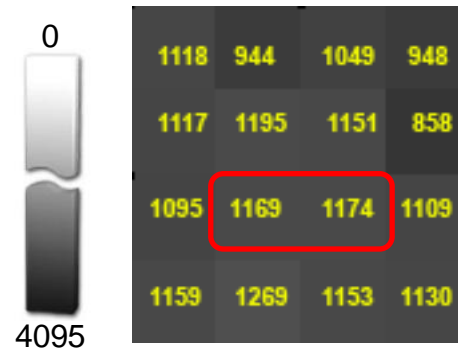
256 niveles de grises



¿ = Intensidad ?

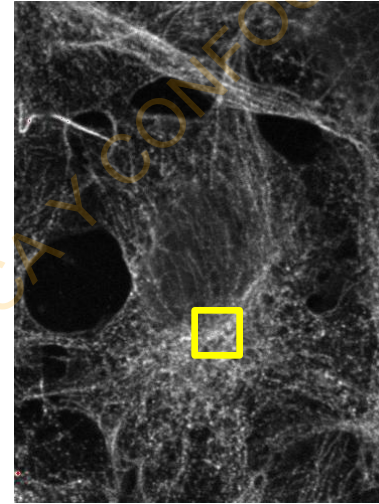
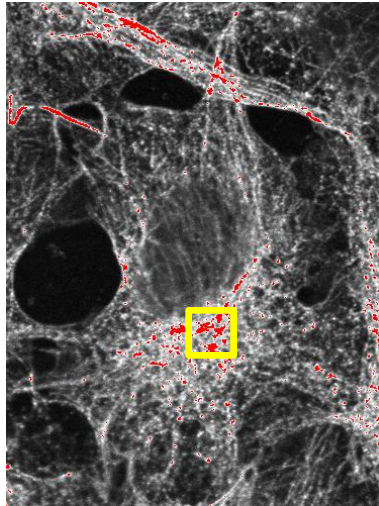
12 Bits

4096 niveles de grises



¡ ≠ Intensidades !

Saturación = Pérdida de Información



212	225	223
251	255	255
253	255	255



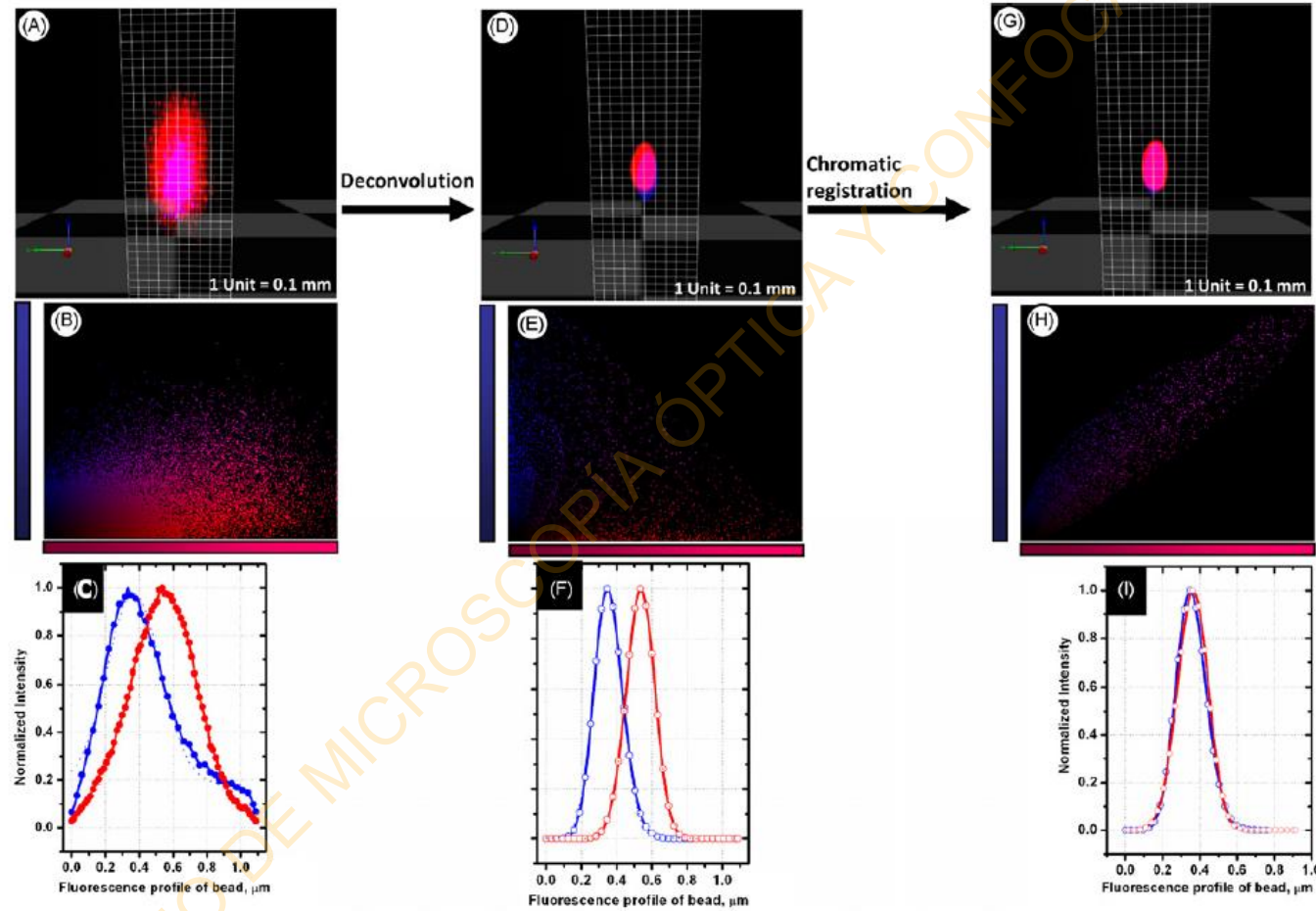
74	80	112
73	80	106
82	117	124

¿ = Intensidad ?

¡ ≠ Intensidades !

SERVICIO DE MICROSCOPIA ÓPTICA Y CONFOCAL (SMOC)

Deconvolución. Corrección Shift y Background



Deconvolution and chromatic aberration corrections in quantifying colocalization of a transcription factor in three-dimensional cellular space

Thomas Abraham^{a,*}, Sarah E. Allan^b, Megan K. Levings^b

Micron 41 (2010) 633–640

Colocalización Cuantitativa

paso a paso...

1 Adquisición de la Imagen
Deconvolución. Corrección Bleedthrough, Shift, Background

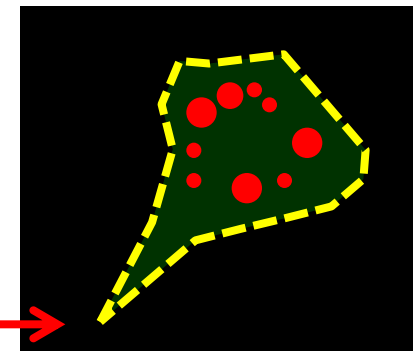
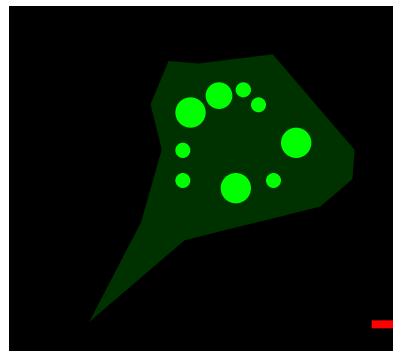
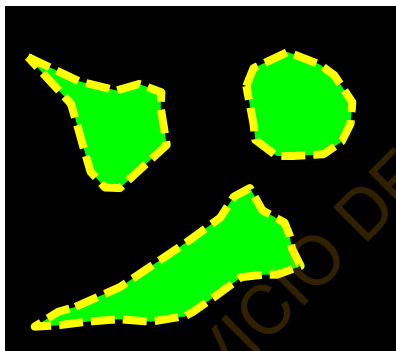
2 Definir estructura de interés
ROI (áreas)
Threshold (umbral de intensidad)

3 Método Colocalización
Intensidad
Objetos
¿Colocalización Verdadera o Azar?

No es Conveniente Realizar el Análisis sobre la Imagen Completa

Regiones de Interés (Region of Interest, ROI):

- No hay pautas que indiquen tipo, tamaño o número...
- Seguir criterios lo más objetivos posibles.
- Mejor analizar células individuales.
- Podemos combinar ROIs con Threshold para restringir todavía más la zona de análisis (Ej. Análisis de orgánulos subcelulares)



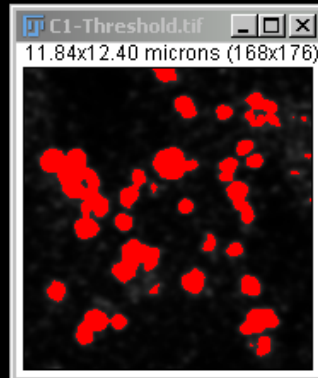
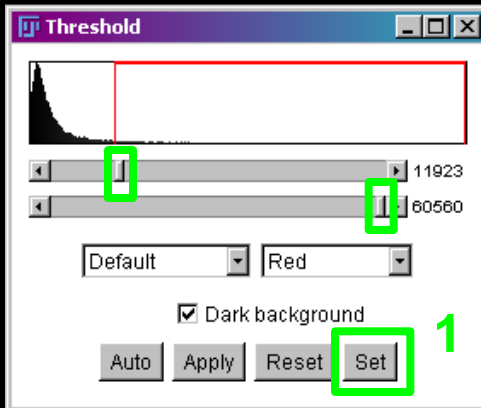
Threshold+ROI

¿ Threshold ?

Elección de objetos/pixels de interés según valor de Intensidad

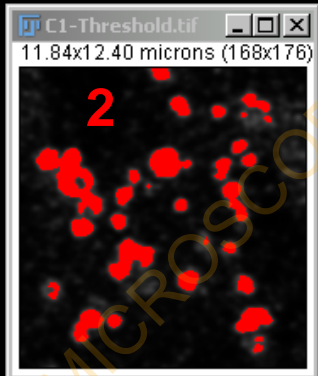
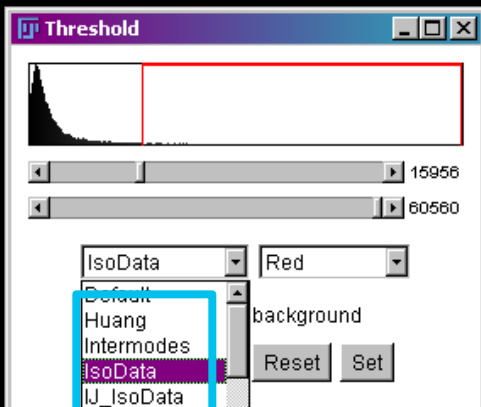
	Visual	Costes	Algoritmos AutoThreshold
Rapidez	😊	😐	😊
Ajuste	Subjetivo (visual)	Objetivo (nivel correlación)	Subjetivo (visual)
Reproducibilidad	😐 (memorizar valor umbral)	😊	😊
Resultado	😊 (visual)	😐 (a veces, valor umbral bajo)	😊 (visual)

Threshold Visual y AutoThreshold



Podemos aplicar un umbral de intensidad desde el panel Threshold.

1. Para establecer el intervalo de valores de los pixels que queremos incluir, podemos ir al botón **Set** o modificar directamente los **extremos** desde el histograma.



2. Los **pixels que incluyamos dentro del umbral** aparecerán en color rojo.

3. También podemos utilizar los umbrales que establecen los **algoritmos de autothreshold**.

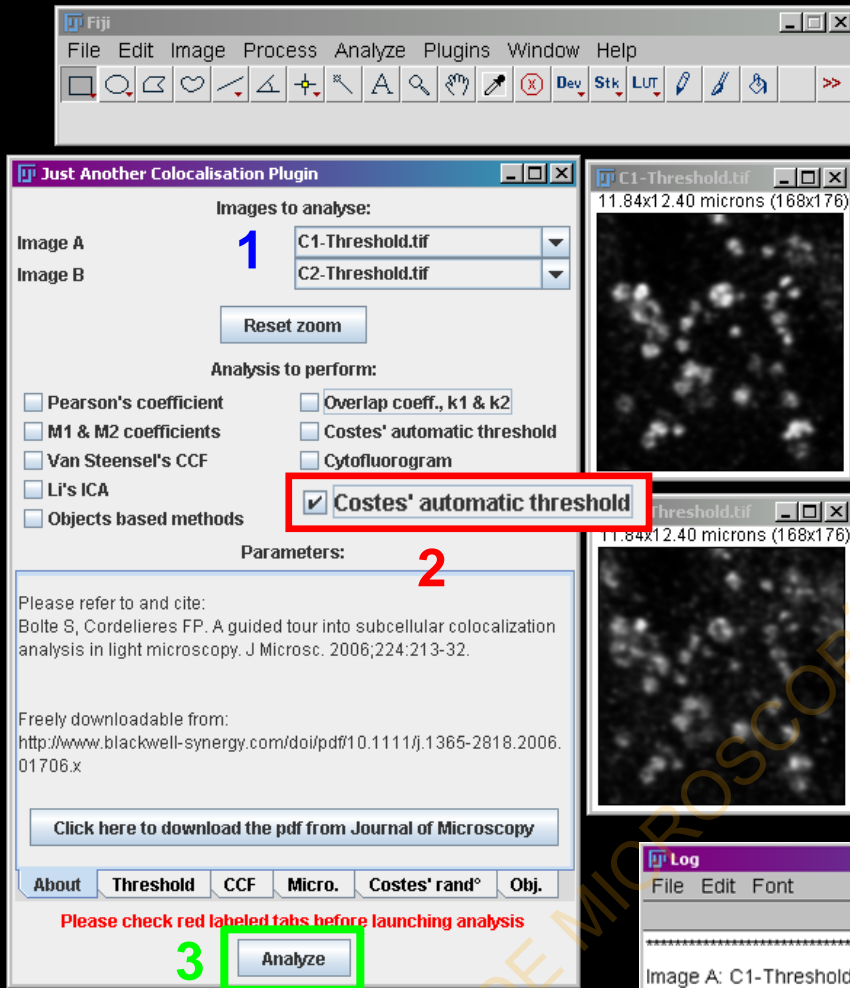
3

Más información en:

<http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/user-guide.pdf>

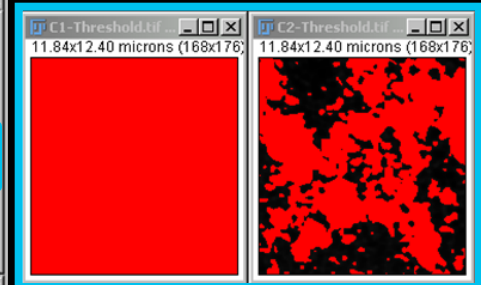
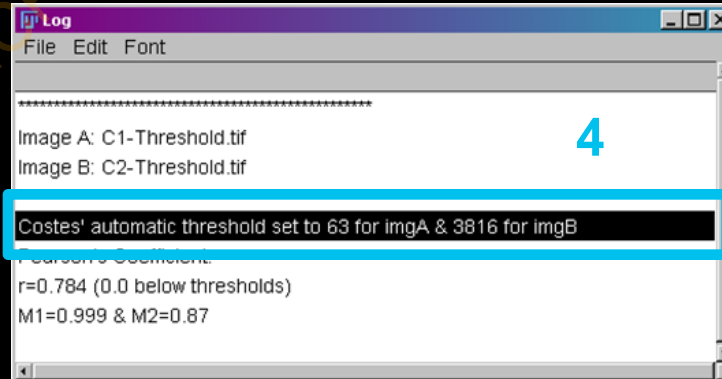
http://pacific.mpi-cbg.de/wiki/index.php/Auto_Threshold

Threshold Automático de Costes (JACoP)



El threshold automático de Costes viene implementado en varios plugins, entre ellos el plugin JACoP.

1. Seleccionamos **las imágenes a analizar**
2. Activamos la opción de **Costes' automatic threshold**
3. Hacemos clic en **Analyze**.
4. Una vez transcurrido el tiempo de cálculo del umbral, revisar los valores obtenidos en el **Log de resultados**, ya que pueden estar muy por debajo del umbral deseado.



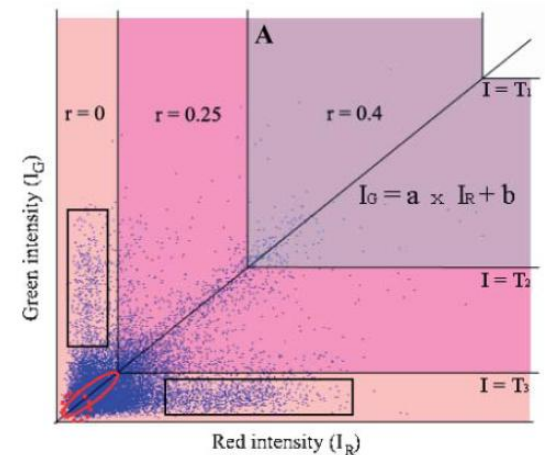
Threshold Automático de Costes

- Basado en el coeficiente de Pearson.
- Deja fuera del threshold o umbral aquellos pixels que no correlacionan (umbral cuando Pearson=0).
- **Precaución:** Para algunas imágenes elige un umbral por debajo del establecido por observación visual.
- **Comprobar siempre el resultado obtenido.**

Biophysical Journal Volume 86 June 2004 3993-4003

Automatic and Quantitative Measurement of Protein-Protein Colocalization in Live Cells

Sylvain V. Costes,^{*†} Dirk Daelemans,[‡] Edward H. Cho,^{*} Zachary Dobbin,^{*} George Pavlakis,[‡] and Stephen Lockett^{*}



Colocalización Cuantitativa

paso a paso...

1 Adquisición de la Imagen
Deconvolución. Corrección Bleedthrough, Shift, Background

2 Definir estructura de interés
ROI
Threshold

3 **Método Colocalización**
Intensidad – Grado Correlación-Coeficientes
Objetos – Solapamiento grupos pixels

¿Colocalización Verdadera o Azar?

Principales Plugins ImageJ/Fiji

Actualmente existe una gran variedad de plugins en ImageJ/Fiji para realizar cálculos de Colocalización Cuantitativa.

Es importante destacar que no todos tienen por qué aplicar las fórmulas de los coeficientes de la misma manera. Hay diferencias, por ejemplo, en la forma de tratar los pixels que quedan dentro del umbral de intensidad o threshold.

Utilizar siempre el mismo plugin para comparar los datos de un mismo experimento.

Hay que tener en cuenta que algunos de estos plugins pueden no recibir soporte para la resolución de fallos o “bugs”, y que es necesario estar al corriente de posibles actualizaciones.

Podéis encontrar más información sobre las diferencias entre los distintos plugins en la lista de ImageJ:

<https://list.nih.gov/cgi-bin/wa.exe?A0=IMAGEJ>

Principales Plugins ImageJ/Fiji

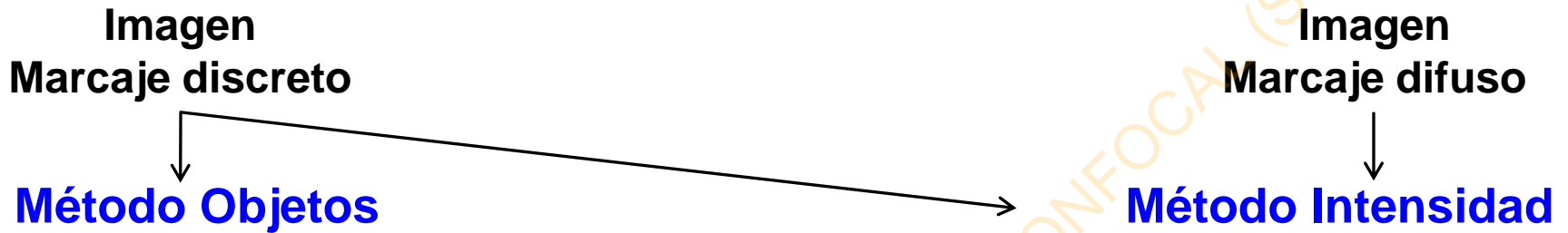
	JACoP <i>Just Another Colocalization Plugin</i>	ICA <i>Intensity Correlation Analysis</i>	Colocalization Colormap	Colocalization Analysis (Beta)
Coeficientes	P, M, ICQ	P, M, ICQ	Icorr	P, M, ICQ
Threshold	Visual/Costes	ImageJ/Fiji	✗	Costes
ROIs	✗	✓	✗	✓
Objetos	✓ Lachmanovich	✗	✓ Jaskolski	✗
Análisis Estadístico	✓ Costes, Van Steensel	✗	✗	✓ Costes
Gráficos	Scatterplot, Van Steensel, ICAPlots	Scatterplot, ICAPlots	nMDP	Scatterplot, ICAPlots
BITs	8 y 16	8 y 16	8	8 y 16

Otros Plugins ImageJ/Fiji

	PSC Pearson-Spearman Colocalization Plugin	OBCOL Organelle Based Colocalization	Colocalization Test	Colocalization Threshold
Coeficientes	P, S	✗	P	P, M
Threshold	✓	✓	✗	Costes
ROIs	✓	✗	✓	✓
Objetos	✗	✓	✗	✗
Análisis Estadístico	✗	✗	✓ (Costes, Van Steensel, Fay)	✗
Gráficos	Scatterplot	✗	✗	Scatterplot
BITs	RGB	8	8 y 16	8 y 16

SERVICIO DE MICROSCOPIA Y COLocal (SMOC)

Colocalización Cuantitativa



Dentro de la Colocalización Cuantitativa podemos agrupar las distintas herramientas en métodos que se basan en el análisis de objetos y métodos que se basan en la intensidad de los pixels de la imagen.

No hay criterio establecido a seguir a la hora de elegir entre los distintos métodos.

Una manera sencilla es utilizar el patrón fluorescente como referencia.

Los métodos basados en objetos normalmente aplican filtros para detección de objetos (grupos de pixels asociados o que forman una estructura), y funcionan mejor cuando tenemos un marcaje discreto (de tipo punteado).

Cuando el marcaje es difuso es casi imposible detectar objetos, así que se suelen emplear los métodos que utilizan los valores de intensidad de los pixels.

Colocalización Cuantitativa

Imagen
Marcaje discreto

Método Objetos

Jaskolski

Coloc. Colormap

Lachmanovich

JACoP

¿Intensidad Homogénea?

Sí

No

Centre of mass

Geometrical centre

Pequeños
Redondeados
ch1 y ch2

Pequeños
Redondeados
sólo ch1

**Distances
between centres**

**Centres-particles
coincidence**

Imagen
Marcaje difuso

Método Intensidad

¿Varias muestras a comparar?

No

**Coefficientes
Scatterplot
ICAplots**

**Colocalización:
¿real o azar?**

Van Steensel

Costes' randomization

CDA

JACoP

**Colocalization
Analysis (Beta)**

Sí

Coloc. Colormap

**Coefficientes
Scatterplot
ICAplots**

JACoP

ICA

**Colocalization
Analysis (Beta)**

Colocalización Cuantitativa

Imagen
Marcaje discreto

Imagen
Marcaje difuso

Método Objetos

Método Intensidad

Jaskolski

Lachmanovich

Coloc. Colormap

JACoP

¿Intensidad Homogénea?

Sí

No

Centre of mass

Geometrical centre

Pequeños
Redondeados
ch1 y ch2

Pequeños
Redondeados
sólo ch1

Distances
between centres

Centres-particles
coincidence

El primer ejemplo que vamos a ver de métodos basados en la detección de objetos es el plugin

Colocalization Colormap.

Utiliza el método descrito por Jaskolski y colaboradores

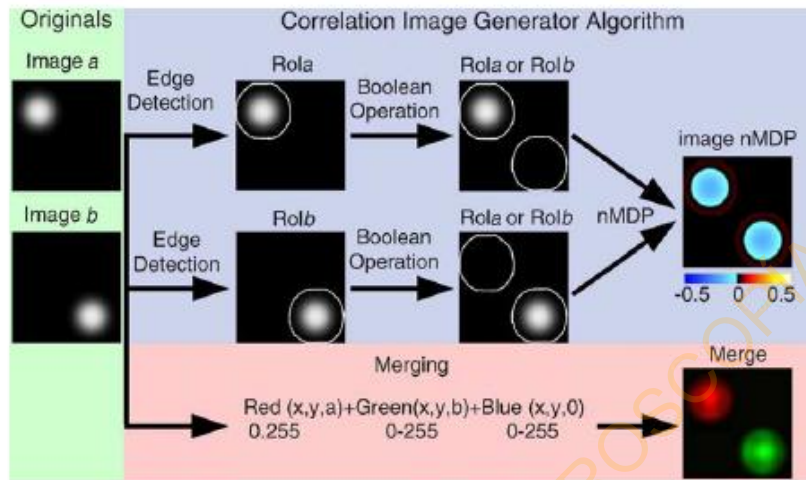
Colocalization Colormap (Jaskolski et al., 2005)

Journal of Neuroscience Methods 146 (2005) 42–49

www.elsevier.com/locate/ynbmech

An automated method to quantify and visualize colocalized fluorescent signals

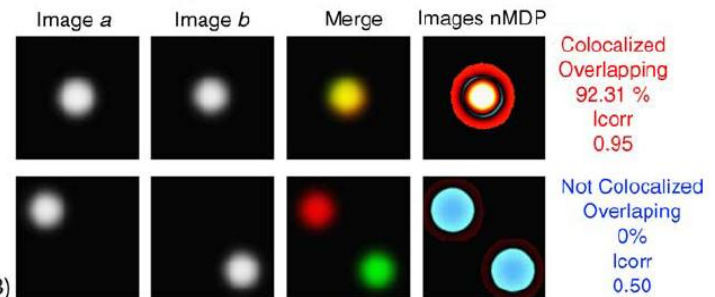
Frédéric Jaskolski^{a,*}, Christophe Mulle^a, Olivier J. Manzoni^b



nMDP Calculation

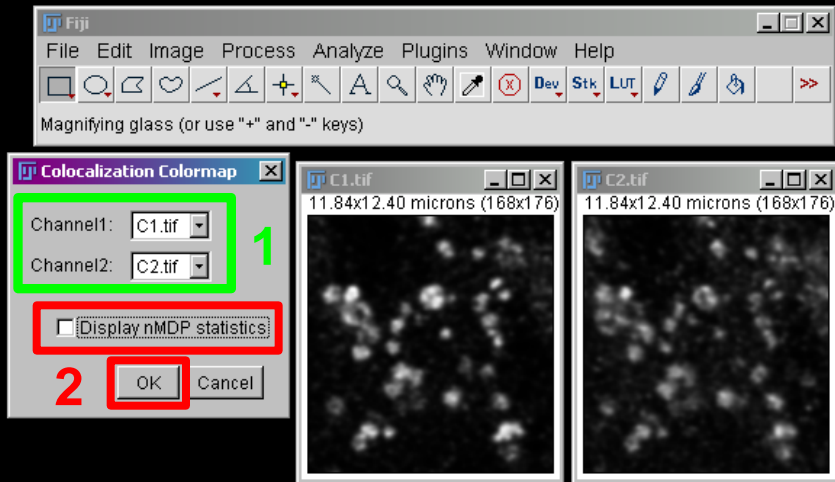
$$nMDP_{xy} = \frac{(Ia_{xy} - \bar{Ia})(Ib_{xy} - \bar{Ib})}{(Ia_{max} - \bar{Ia})(Ib_{max} - \bar{Ib})}$$

(A) Simulated images



- + Directo, sencillo, muy visual.
- ! Depende de segmentación: mejor en marcajes discretos.
- Sólo imágenes 8Bit.
- No aporta coeficientes Pearson, Manders, ICQ, etc.

Colocalization Colormap



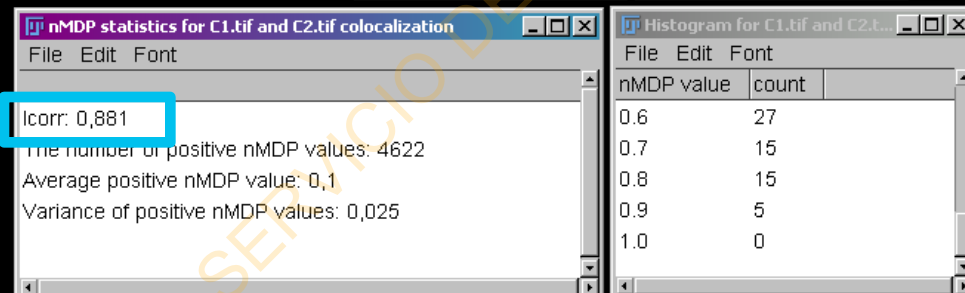
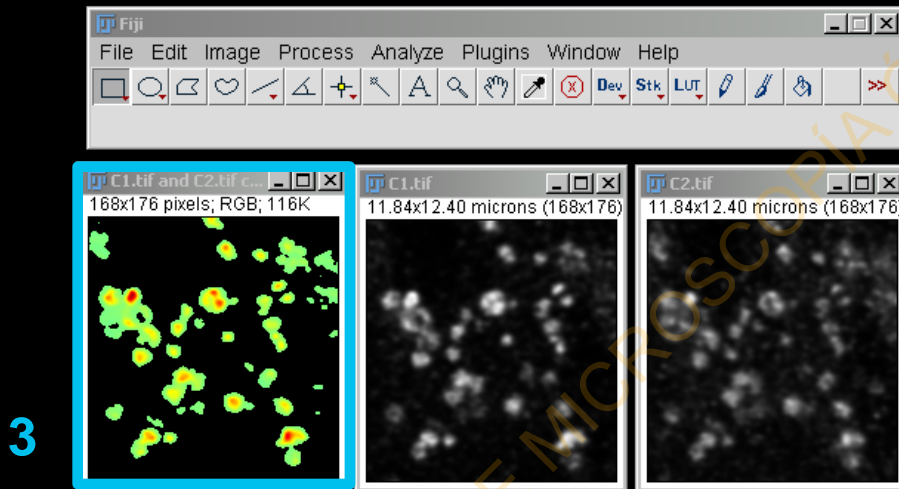
1. Abrimos el plugin y seleccionamos nuestra **pareja de imágenes** (deben estar a 8 BITS).

2. Activamos la opción **Display nMDP statistics**. Hacemos clic en **OK**.

3. Como resultado obtenemos una **imagen** con una paleta de color especial:

Tonos cálidos = zonas con alta correlación.
Tonos fríos = zonas con baja correlación.

En el **Log de resultados** también obtendremos un Índice de Correlación **Icorr**, que a mayor correlación tendrá un valor más cercano a 1.



Colocalización Cuantitativa

Imagen
Marcaje discreto

Imagen
Marcaje difuso

Método Objetos

Método Intensidad

Jaskolski

Coloc. Colormap

Lachmanovich

JACoP

¿Intensidad Homogénea?

Sí

No

Centro de Masas

Centro Geométrico

Pequeños
Redondeados
ch1 y ch2

Pequeños
Redondeados
sólo ch1

Distancia entre
Centros

Coincidencia
Centros-Partículas

El siguiente ejemplo viene implementado en el plugin **JACoP**.

Utiliza el método descrito por Lachmanovich y colaboradores.

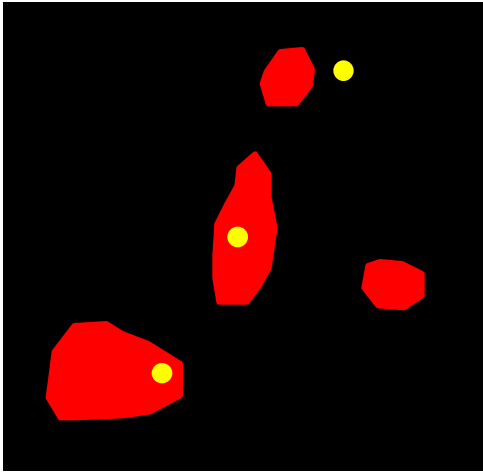
JACoP (Método Lachmanovich)

Podemos realizar 2 tipos de análisis:

Coincidencia Centros-Partículas

Colocalización = centro de masas objeto Imagen A en área de objeto de Imagen B.

Sólo una de las imágenes con marcaje punteado.



Distancia entre Centros

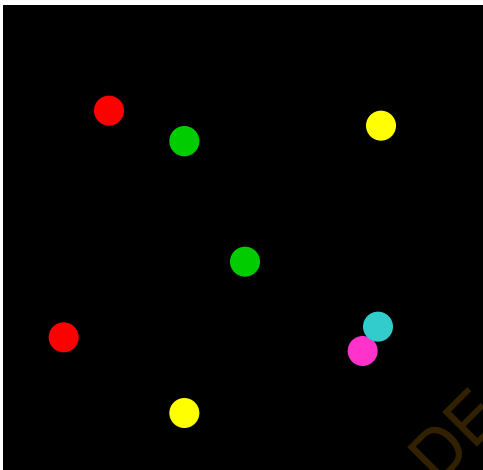
Colocalización = coincidencia centroide objeto Imagen A y centroide objeto Imagen B dentro de umbral (resolución x, y, z).

Objetos bien definidos y de forma regular.

Verde y Rojo = Centros que no colocalizan.

Amarillo = Colocalización perfecta entre centros.

Cian y Magenta = Centros que colocalizan dentro de distancia umbral.



JACoP Analisis basado en Objetos

(Lachmanovich et al., 2003)

Intensidad
homogénea

Intensidad
heterogénea

Filtrado de los objetos por tamaño

The screenshot shows the JACoP software interface with several options highlighted by colored boxes:

- Centre of mass** (red box)
- Geometrical centre** (blue box)
- Show full table** (black box)
- Show coloc° only table** (black box)
- Min. particle size (pix.)** 0 (black box)
- Max. particle size (pix.)** 1048576 (black box)
- Work on distances between centres** (green box)
- Show centres map** (black box)
- Work on centres-particles coincidence** (purple box)
- Show centres-particles map** (black box)

Nearest-Neighbour Distance Approach

Overlap Approach

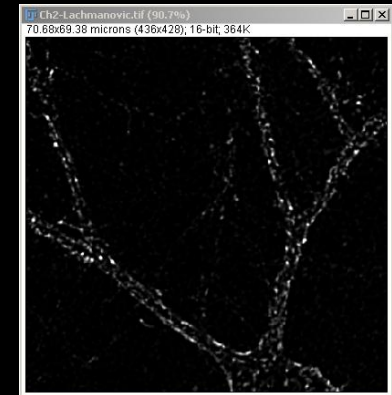
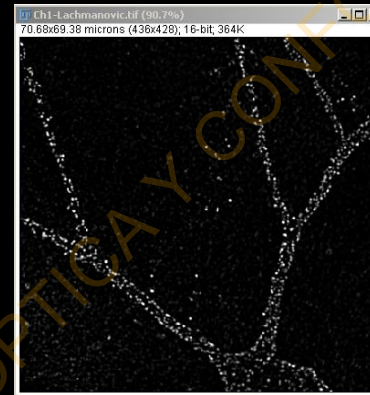
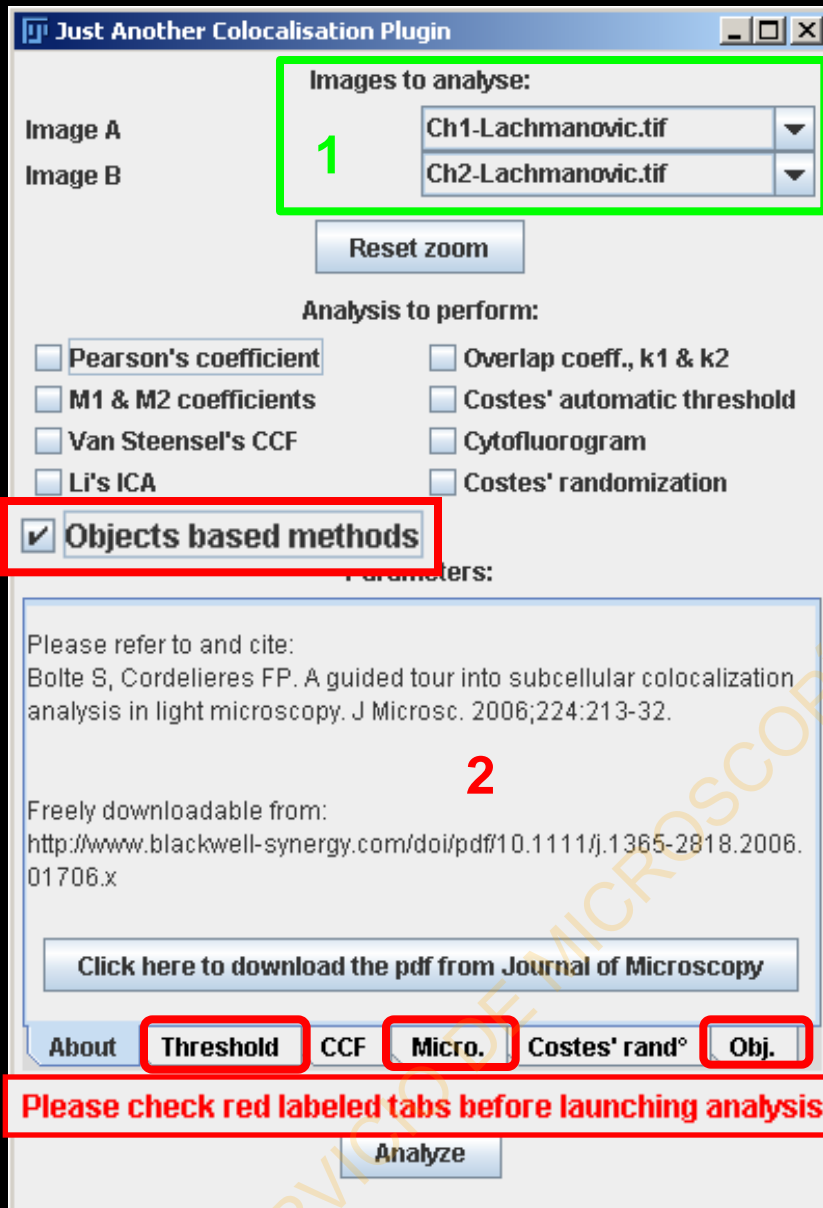
- + Directo, sencillo, visual.
- Depende de segmentación: mejor en marcajes discretos.
- Sólo concurrencia de objetos, no correlación de intensidades.

Journal of Microscopy, Vol. 212, Pt 2 November 2003, pp. 122–131

Received 14 January 2003; accepted 10 July 2003

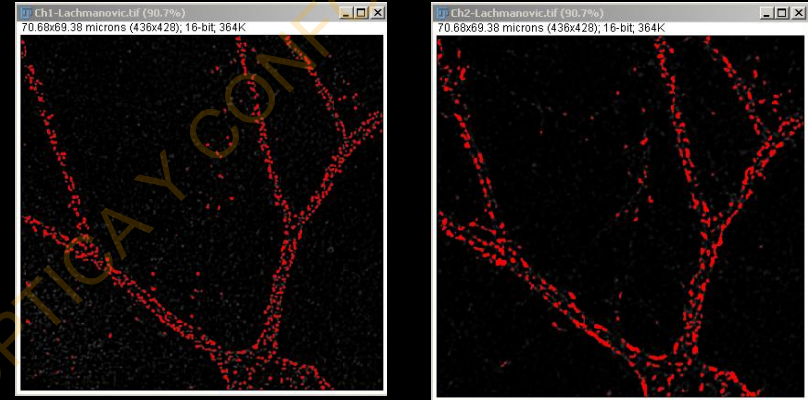
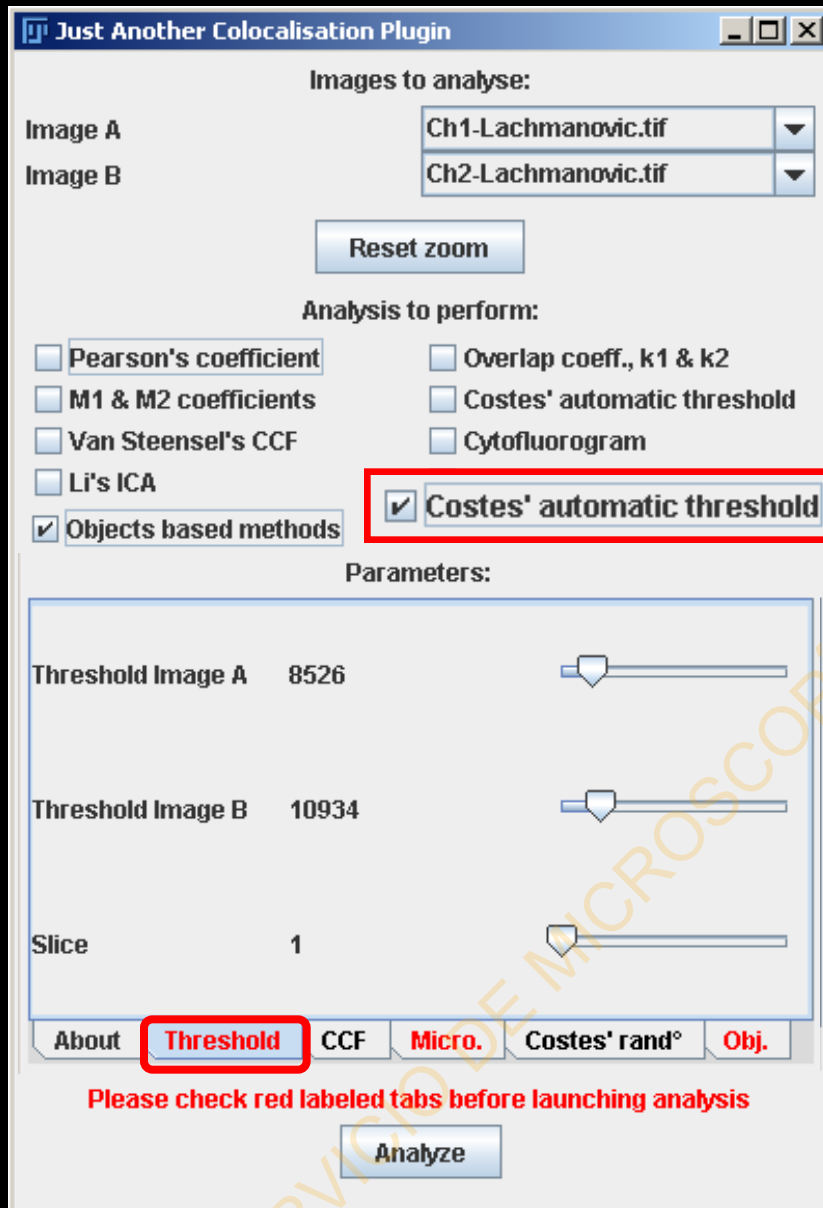
E. LACHMANOVICH, D. E. SHVARTSMAN*, Y. MALKA*,
C. BOTVIN*, Y. I. HENIS* & A. M. WEISS

Co-localization analysis of complex formation among membrane proteins by computerized fluorescence microscopy: application to immunofluorescence co-patching studies



1. Abrimos el plugin y seleccionamos nuestra **pareja de imágenes**.

2. Activamos la opción **Objects based methods**. Revisamos las **pestañas** que aparecen en color rojo.



3. Desde la pestaña Threshold, ajustamos el **Threshold** de manera visual o activamos la casilla del **Threshold automático de Costes**.

Just Another Colocalisation Plugin

Images to analyse:

Image A: Ch1-Lachmanovic.tif

Image B: Ch2-Lachmanovic.tif

Reset zoom

Analysis to perform:

Pearson's coefficient

M1 & M2 coefficients

Van Steensel's CCF

Li's ICA

Objects based methods

Overlap coeff., k1 & k2

Costes' automatic threshold

Cytofluorogram

Costes' randomization

Parameters: **4**

Wide-Field Confocal

Get calib. from ImgA Get calib. from ImgB

xy calib (nm) **5** 162.10700196878955

z calib (nm) 1000.0

Write calib. to images

Wavelength A (nm) 488

Wavelength B (nm) 555

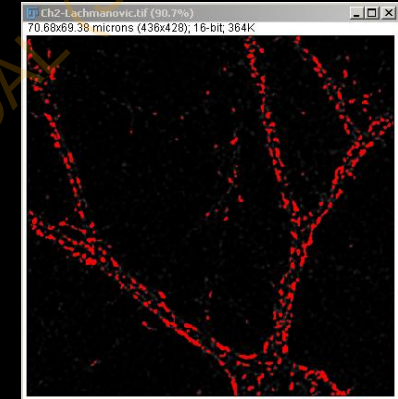
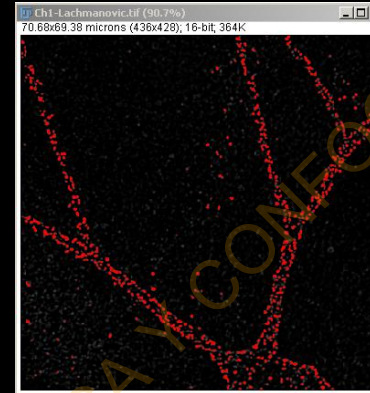
NA 1.4

Refractive index 1.518

About **Threshold** CCF **Micro.** Costes' rand° Obj.

Please check red labeled tabs before launching analysis

Analyze

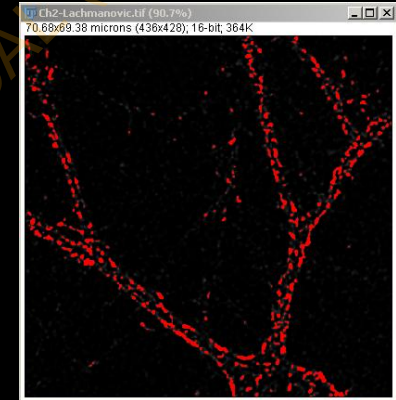
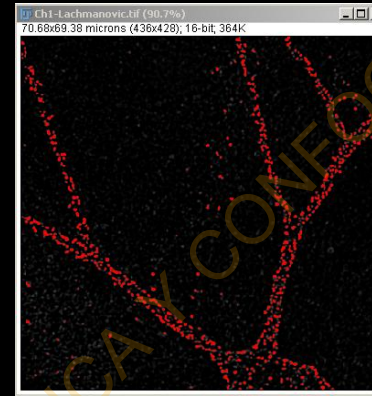
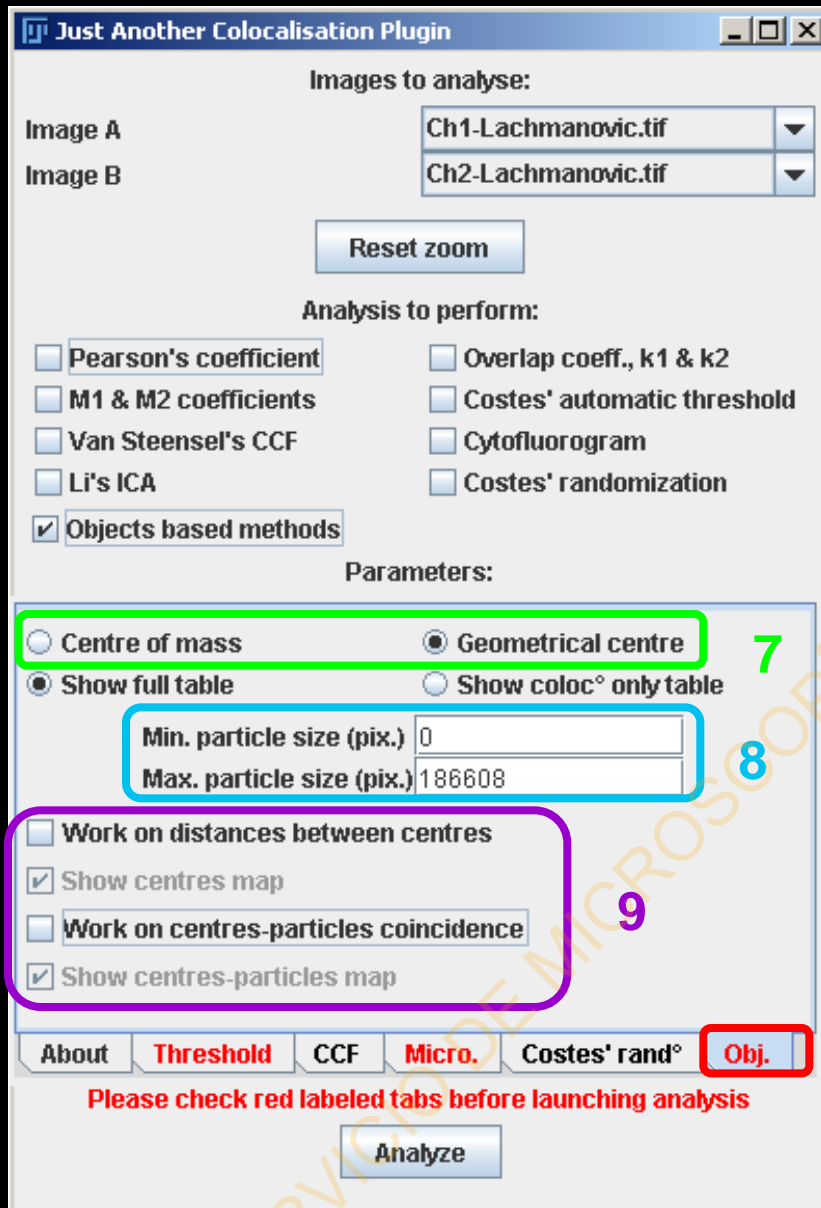


4. Desde la pestaña **Micro**, seleccionamos el **tipo de imágenes**: confocal o campo ancho.

5. Anotamos la **calibración** (equivalencia pixels/nm) o la obtenemos a partir de alguna de las imágenes desde Get calib. from Img.

6. Escribimos los **parámetros del microscopio** requeridos: longitudes de onda de excitación, apertura numérica e índice de refracción del medio de montaje.

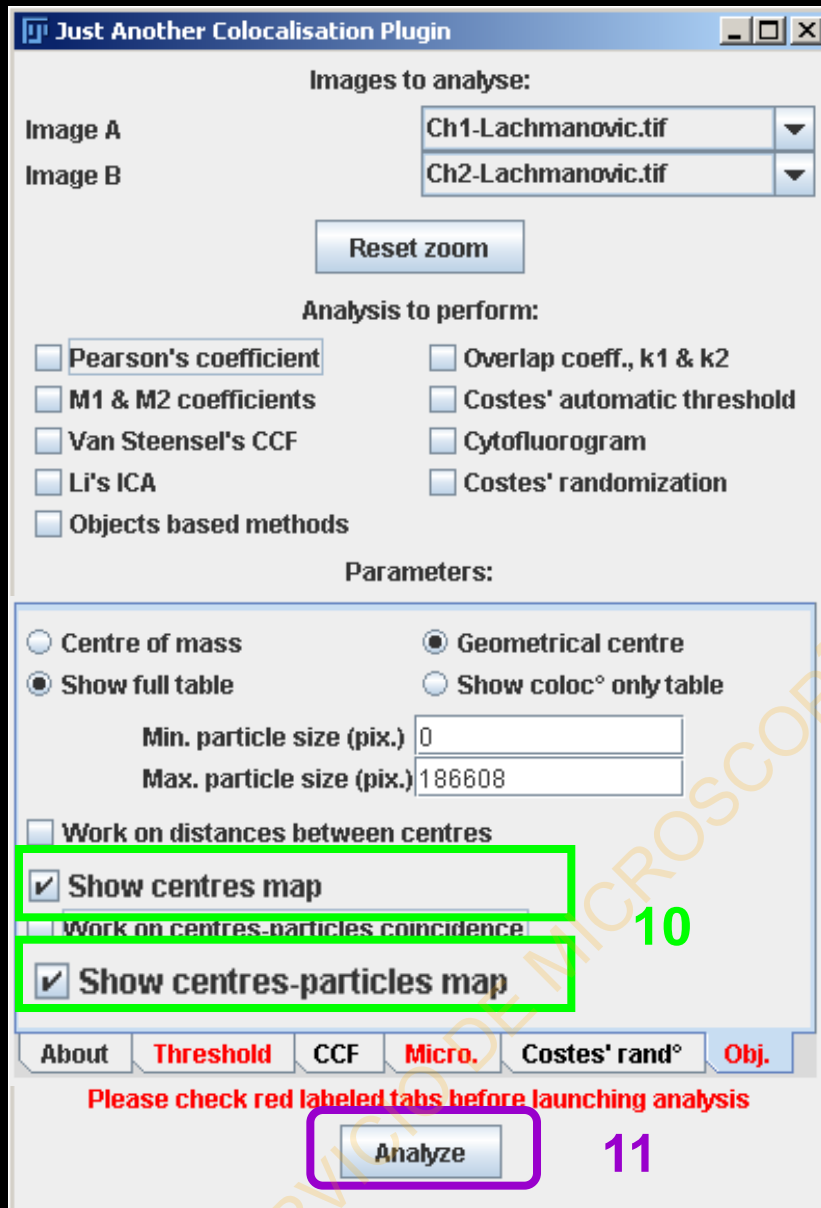
6



7. Desde la pestaña **Obj.**, elegimos en función de la distribución de intensidad de nuestros objetos entre **Centre of Mass** (intensidad homogénea) y **Geometrical Centre** (heterogénea).

8. Si es necesario, podemos realizar un **filtrado por tamaño**, para excluir aquellos objetos que sean mayores o menores de cierto valor.

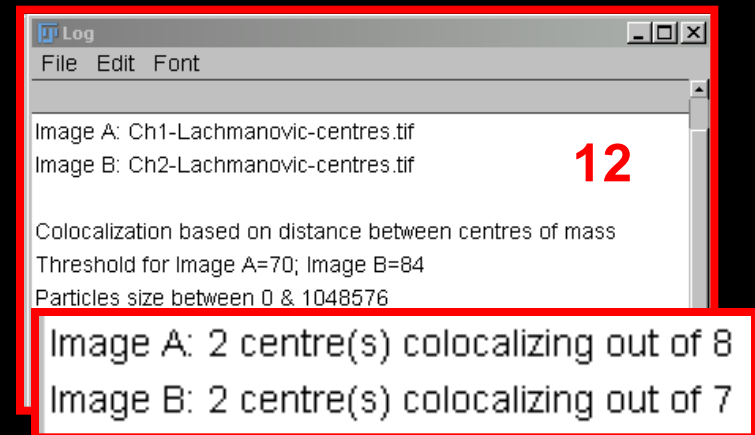
9. Elegimos entre los métodos de análisis disponibles: **work on distances between centres** (si tenemos patrón de tipo punteado en ambas imágenes) y **work on centres-particles coincidence** (si sólo hay patrón de tipo punteado en una de ellas).



10. En el resultado podemos obtener imágenes de los centros y de los centros-partículas activando **Show centres map** y **Show centres-particles map**, respectivamente.

11. Por último, hacemos clic en **Analyze** para obtener los resultados.

12. En el **log de resultados** obtendremos el número de objetos (centros o partículas) que colocalizan respecto del total para cada imagen.



Colocalización Cuantitativa

Imagen
Marcaje discreto

Método Objetos

Imagen
Marcaje difuso

Método Intensidad

¿Varias muestras a comparar?

Sí

Coloc. Colormap

Coefficientes
Scatterplot
ICApots

JACoP

ICA

Colocalization
Analysis (Beta)

Los **métodos basados la intensidad de los pixels** cuantifican principalmente el grado de correlación que existe entre las señales de ambas imágenes.

Implican el cálculo de los llamados coeficientes de colocalización, y normalmente los datos van acompañados de distintas representaciones gráficas.

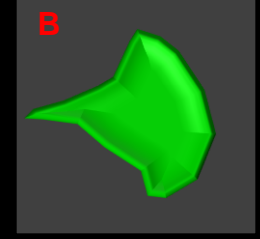
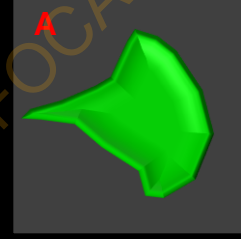
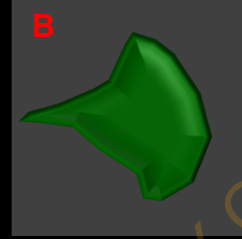
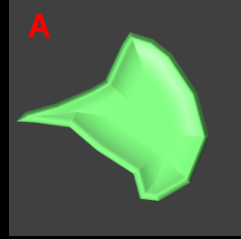
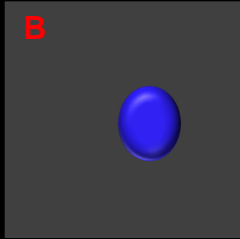
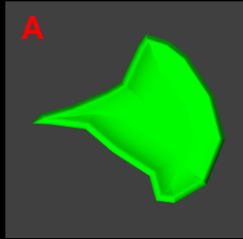
En la situación más sencilla tendremos distintas condiciones experimentales a comparar (wt y mutantes, control y tratamientos, etc).

Principales Coeficientes de Colocalización

Coeficiente	Rango Valores	Información	Representación Gráfica
Manders M1 y M2	0 a 1	Solapamiento	--
Pearson	-1 a +1	Correlación	Scatterplot
ICQ	-0.5 a +0.5	Correlación	ICA plots
Spearman	-1 a +1	Correlación no Lineal	--

- En la tabla se recogen los principales coeficientes de colocalización aceptados actualmente.
- Los valores de colocalización que podemos obtener varían según el coeficiente.
- Todos excepto los coeficientes M de Manders estudian el grado de correlación. Obtenemos un coeficiente M para cada canal.
- Los resultados de los coeficientes de Pearson e ICQ se suelen acompañar de representaciones gráficas: Para Pearson se utiliza el **Citofluorograma** o **Scatterplot**, y para ICQ los llamados **ICApots** (de Intensity Correlation Analysis).

Principales Coeficientes de Colocalización II



Pearson= 0.8

M1= 0.3 M2= 1

Pearson= 0.07

M1= 1 M2= 1

Pearson= 1

M1= 1 M2= 1

La Correlación y el Solapamiento no tienen porqué ir a la par.

En el ejemplo de la izquierda, tenemos un alto grado de correlación de las intensidades entre las imágenes A y B, pero un bajo grado de solapamiento: los pixels de la imagen A sólo solapan con pixels de la imagen B en aprox. un 30% ($M1=0.3$), mientras que todos los pixels de la imagen B coinciden con un pixel de la imagen A ($M2=1$).

En el ejemplo del centro, aunque hay un solapamiento total (ambos coeficientes M son iguales a 1, lo que indica 100% de coincidencia), la correlación entre las intensidades es baja como muestra el valor del coeficiente de Pearson (0.07).

Artículo que compara los distintos coeficientes de colocación:



Quantifying Colocalization by Correlation: The Pearson Correlation Coefficient is Superior to the Mander's Overlap Coefficient

Jeremy Adler, Ingela Parmryd*

Table 1. Comparison of correlation coefficients

	PCC	MOC	ICQ	SRC
Theoretical range	-1 to +1	0 to +1	-0.5 to +0.5	-1 to +1
Gain	Independent	Independent	Independent	Independent
Offset background subtraction	Unimportant	Important	Unimportant	Unimportant
Weighting	Departure from the mean	Magnitude	None	Departure from mean rank
Inclusion of background pixels	Sensitive	Insensitive	Sensitive	Sensitive
Inclusion of midrange pixels	Insensitive	Sensitive	Sensitive	Slightly sensitive
Sensitivity to correlation	Good	Poor	Good	Good

Colocalización Cuantitativa

Imagen
Marcaje discreto

Método Objetos

Imagen
Marcaje difuso

Método Intensidad

¿Varias muestras a comparar?

Para analizar la colocalización cuantitativa con **métodos basados la intensidad de los pixels** podemos utilizar diferentes plugins de ImageJ/Fiji.

Podríamos utilizar de nuevo el plugin **Colocalization Colormap**, ya que aporta un índice de correlación de las intensidades (**lcorr**).

En el siguiente ejemplo vamos a calcular los principales coeficientes de colocalización y representaciones gráficas utilizando el plugin **JACoP**.

Vamos a comparar los resultados de una pareja de imágenes con alta colocalización frente a otra pareja con baja colocalización.

Sí

Coloc. Colormap

Coefficientes
Scatterplot
ICAplots

JACoP

ICA

Colocalization
Analysis (Beta)

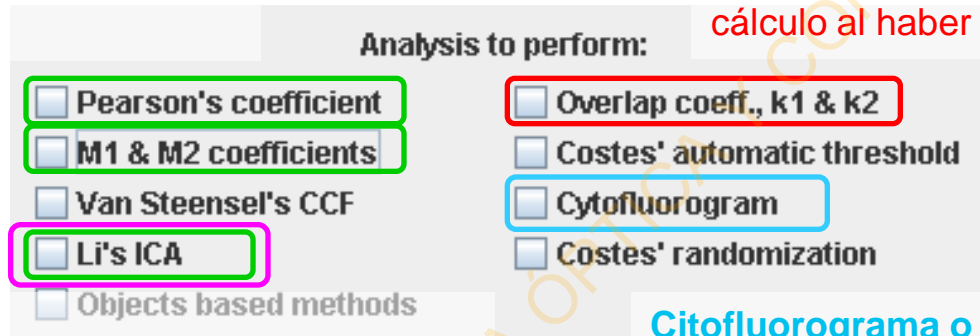
JACoP. Obtención de Coeficientes y Plots

Principales Coeficientes:

Pearson
M1 y M2 de Manders
ICQ de Li

Coeficiente: Overlap y k1/k2.

Hay estudios que no recomiendan su cálculo al haber mejores coeficientes.



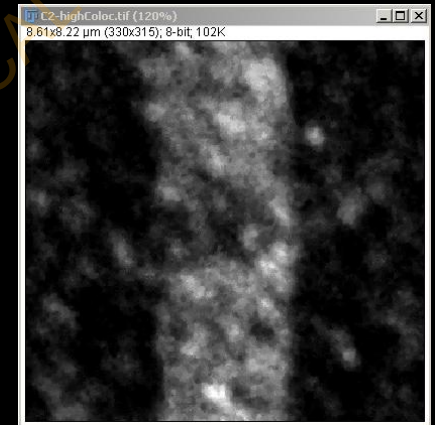
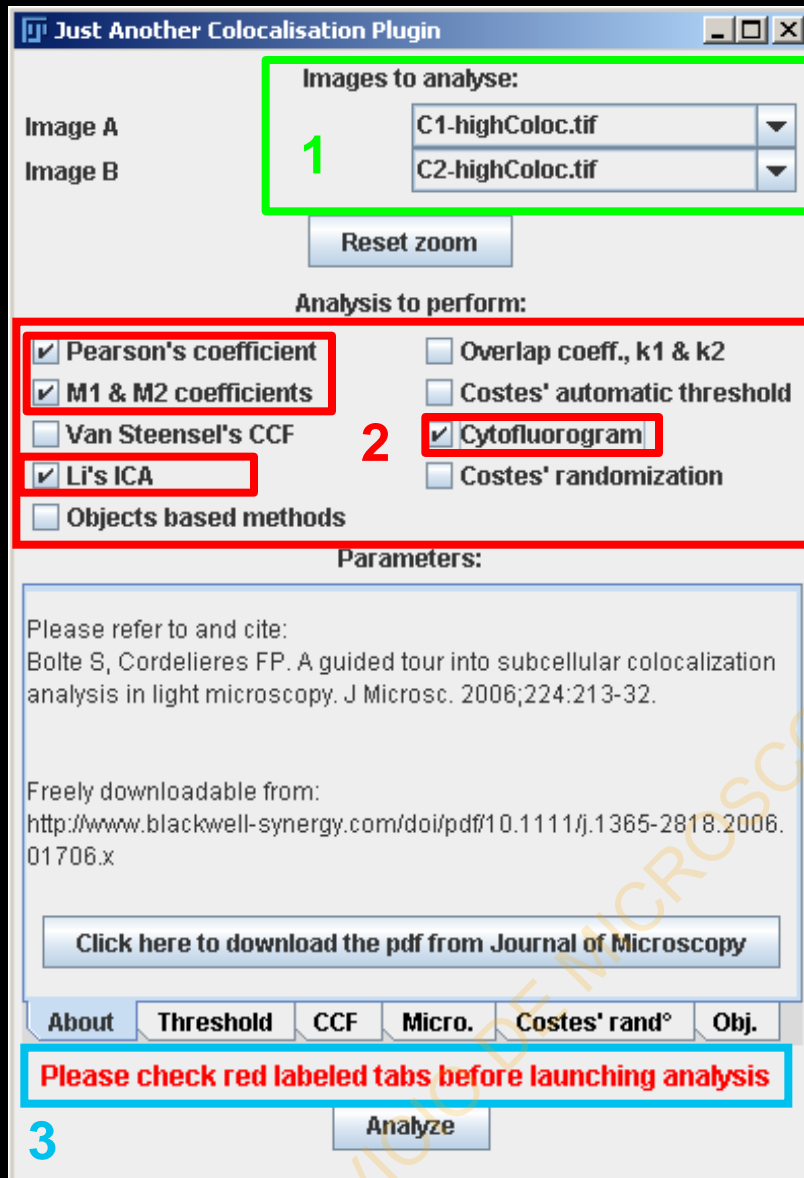
ICA plots:

Representación de los valores PDM de cada canal.

Citofluorograma o Scatterplot:

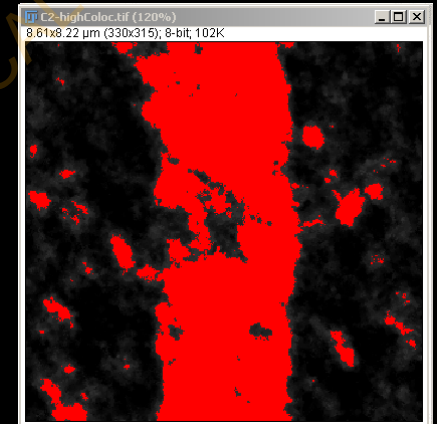
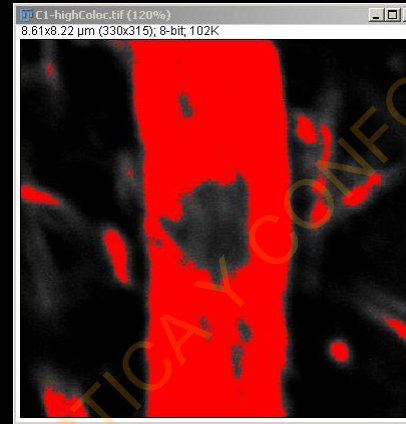
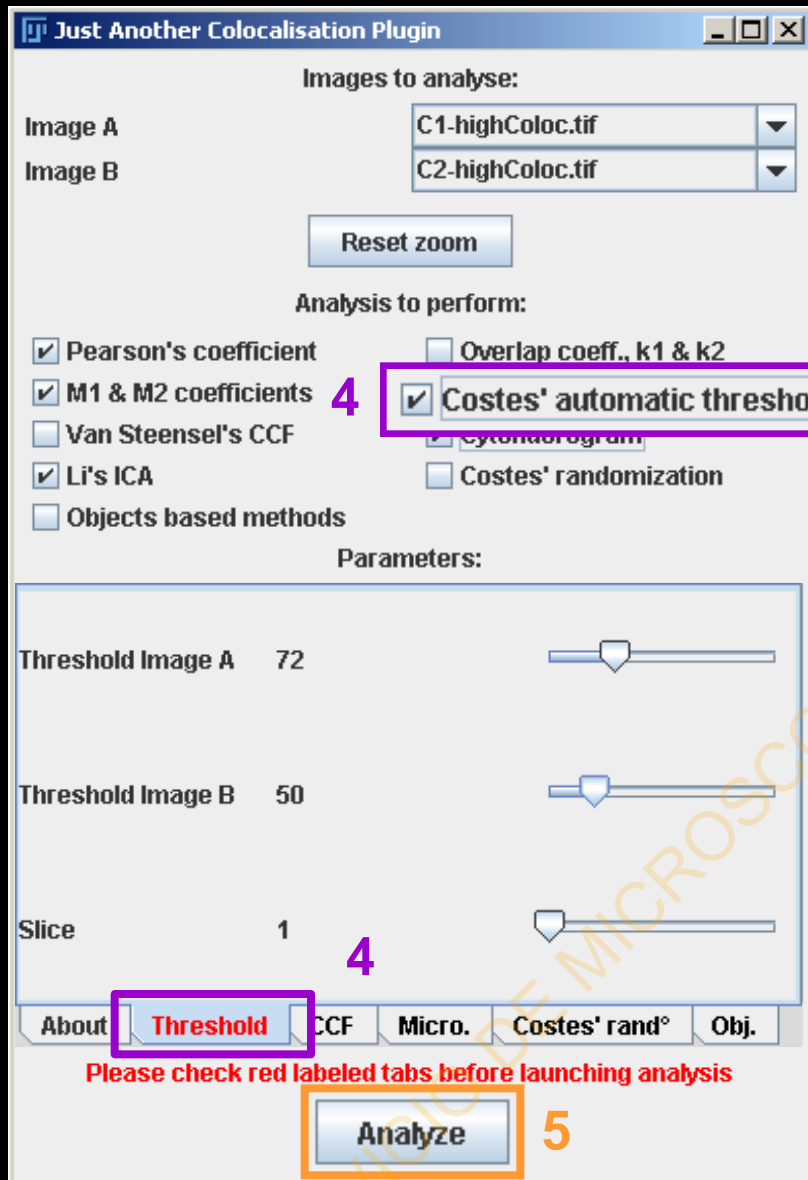
Representación pixel a pixel de la intensidad del Ch1 frente a la intensidad del Ch2.

- + Sencillo, Completo.
- + Threshold Manual y Threshold automático de Costes.
- No calcula coeficiente de Spearman.
- No permite el uso de ROIs (alternativa: recortar la imagen).



1. Abrimos el plugin y seleccionamos nuestra **pareja de imágenes**.
2. Activamos el cálculo de los **principales coeficientes de colocalización**.
3. Revisamos las **pestañas** que aparecen en color rojo.

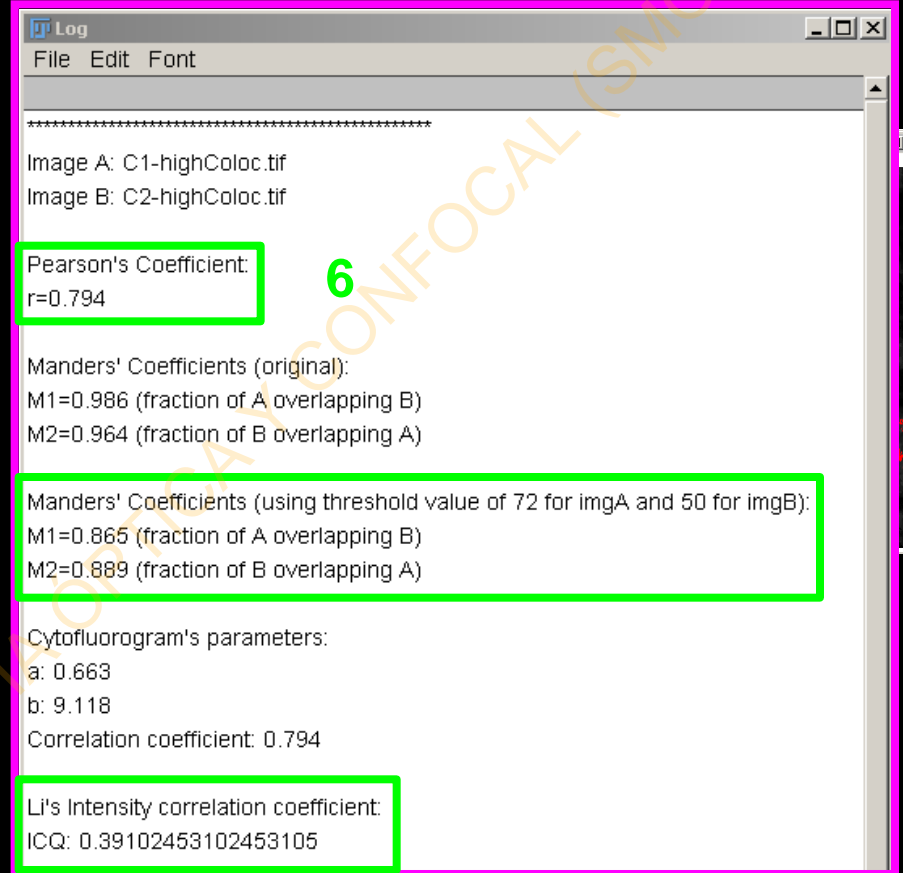
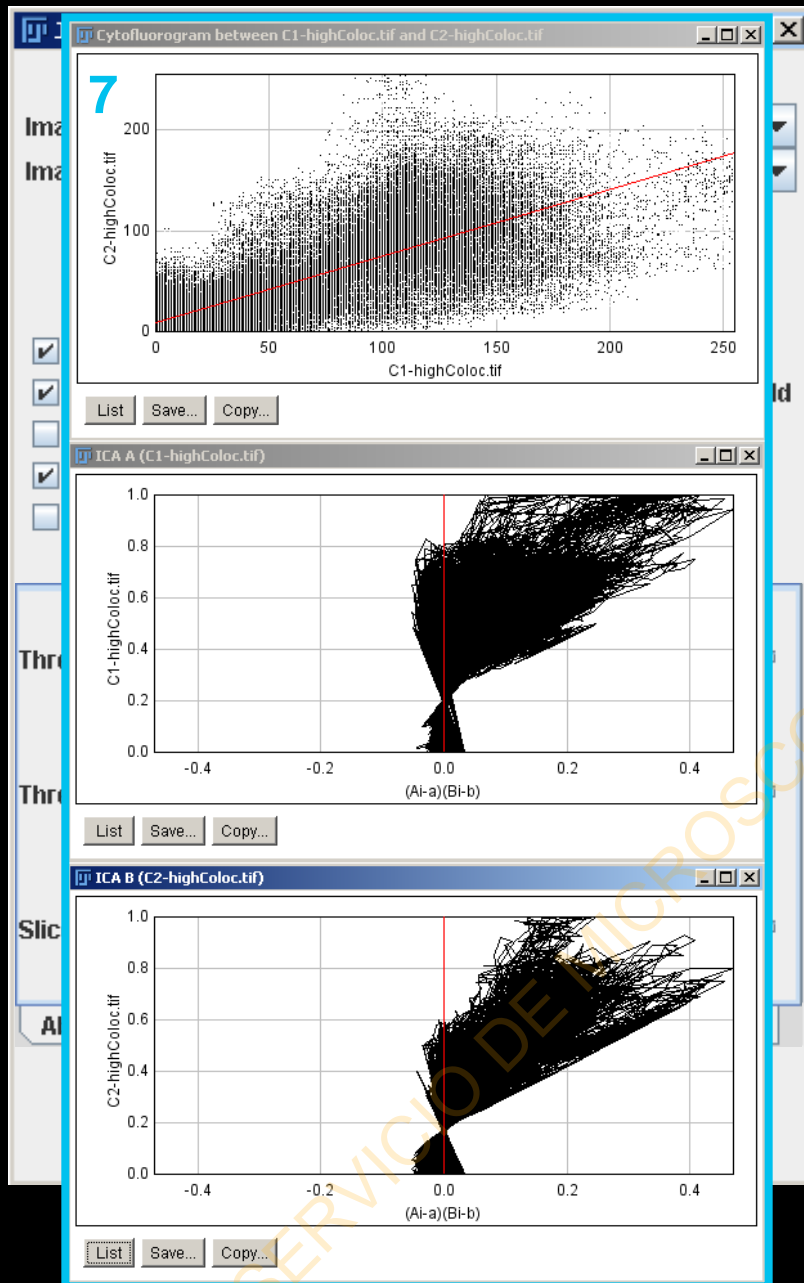
JACoP: Coeficientes y Plots 2



4. Desde la pestaña Threshold, ajustamos el **Threshold** de manera visual o activamos la casilla del **Threshold automático de Costes**.

5. Por último, hacemos clic en **Analyze** para obtener los resultados.

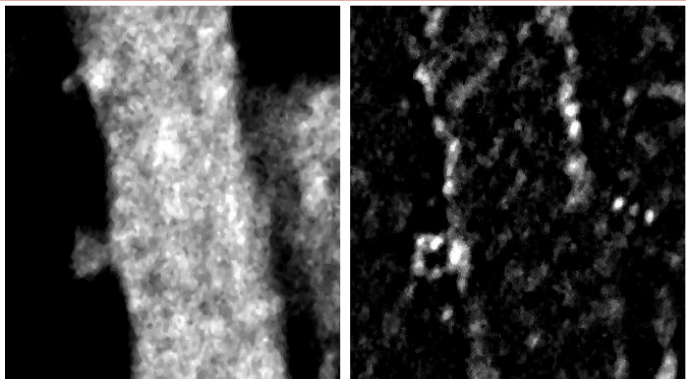
JACoP: Coeficientes y Plots 3



6. En el **log de resultados** obtendremos los valores de los distintos **coeficientes de colocalización**.

IMPORTANTE: Siempre utilizar el valor de los coeficientes de Manders obtenidos utilizando el threshold.

7. También obtenemos **representaciones gráficas**: Scatterplot e ICAplots.



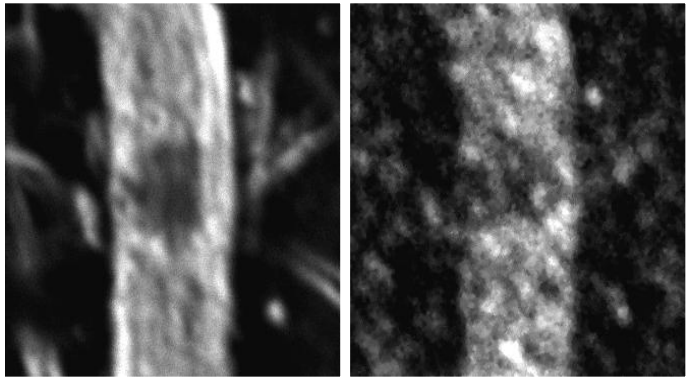
Baja Colocalización

Pearson 0.15

ICQ 0.06

M1 0.13

M2 0.76



Alta Colocalización

Pearson 0.79

ICQ 0.39

M1 0.80

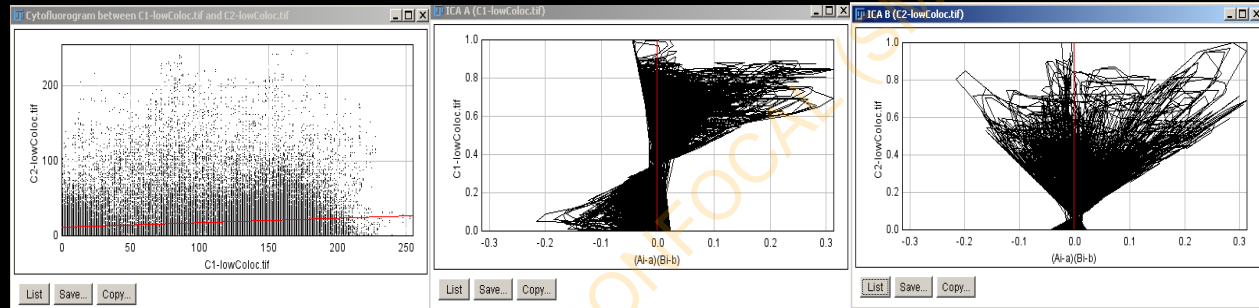
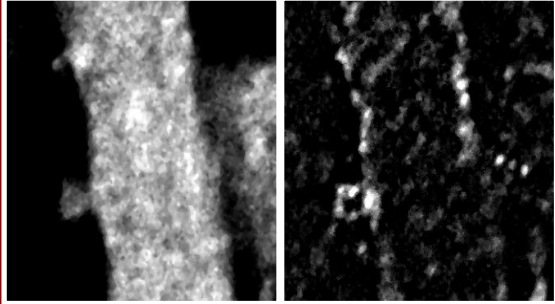
M2 0.91

Como podemos ver por los resultados obtenidos, los coeficientes de Pearson e ICQ son menores en la pareja de imágenes con baja colocalización.

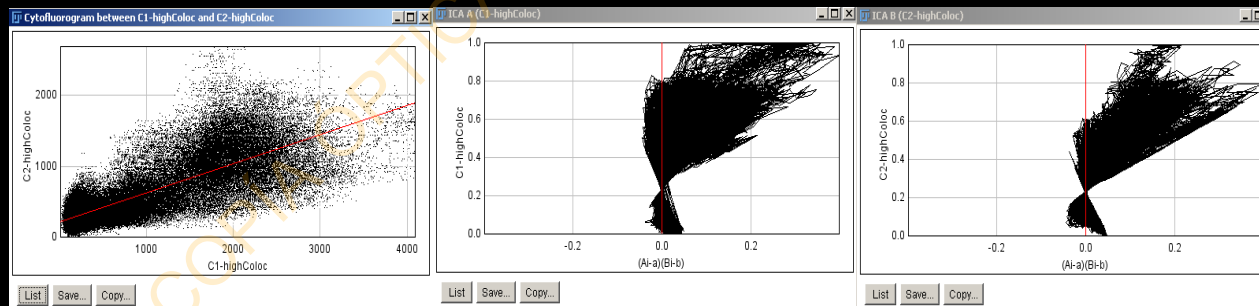
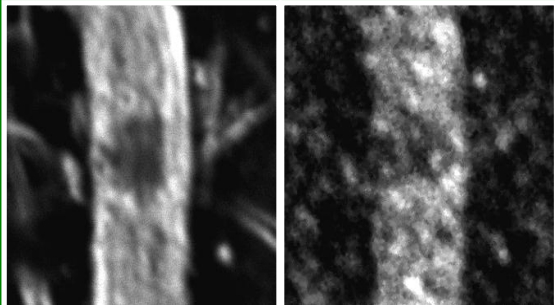
Respecto a los coeficientes de Manders, en la pareja con alta colocalización el grado de solapamiento es elevado (0.8 y 0.9) para ambas imágenes.

En la pareja con baja colocalización tenemos valores bastante distintos para Manders. Esto se debe a que uno de los marcajes apenas solapa con el otro (M1=0.13).

Baja Colocalización



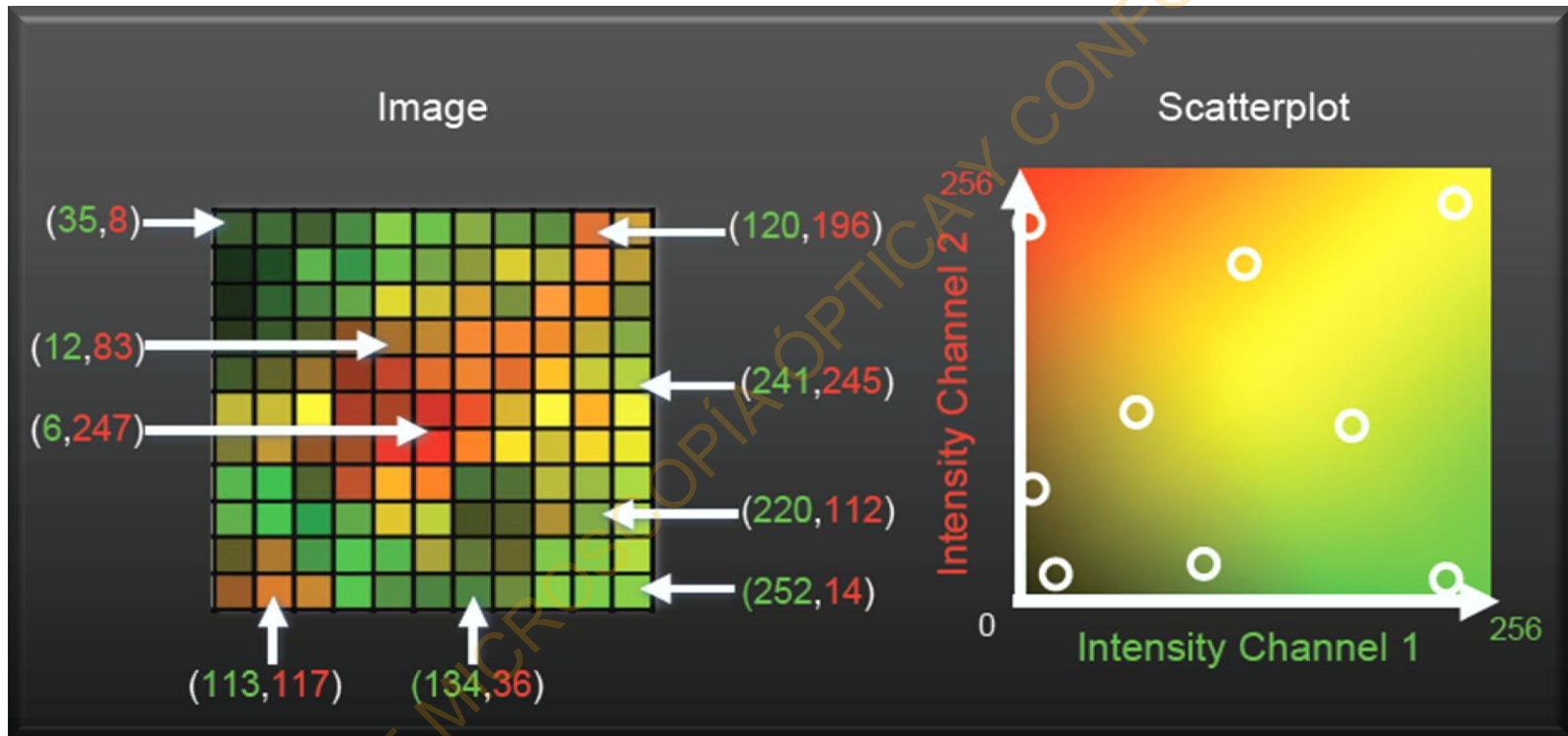
Alta Colocalización



En las representaciones gráficas también podemos observar las diferencias en el grado de colocalización: En el Scatterplot, los datos de la imagen con mayor nivel de colocalización se sitúan más cerca de la diagonal del gráfico (en $y=x$), y los datos de los ICAplots están más concentrados en la mitad derecha del gráfico.

En las siguientes páginas se muestran variaciones en la distribución de los datos de los gráficos en función de los niveles de colocalización de las imágenes.

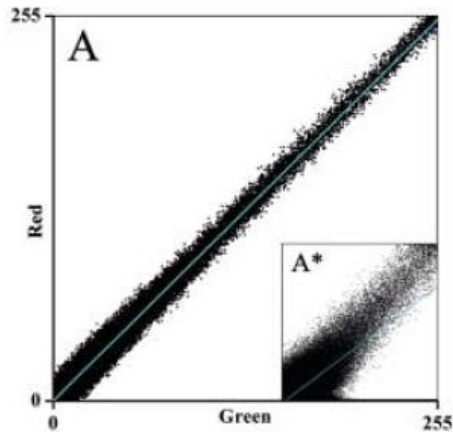
Correlación de Intensidades: Scatterplot o Fluorograma



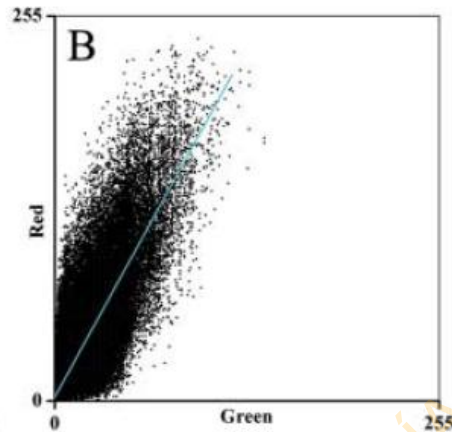
Un Scatterplot es la representación de las parejas de valores de los niveles de intensidad del canal 1 y del canal 2.

Scatterplot o Fluorograma

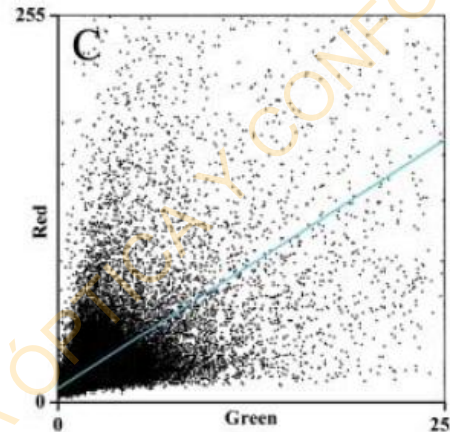
Colocalización Total



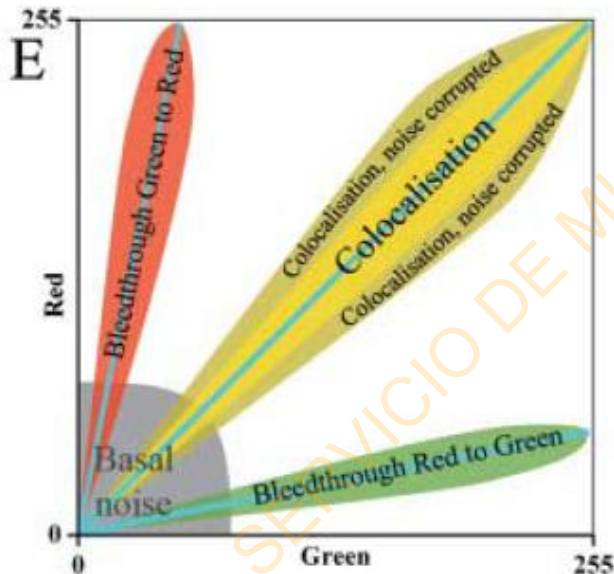
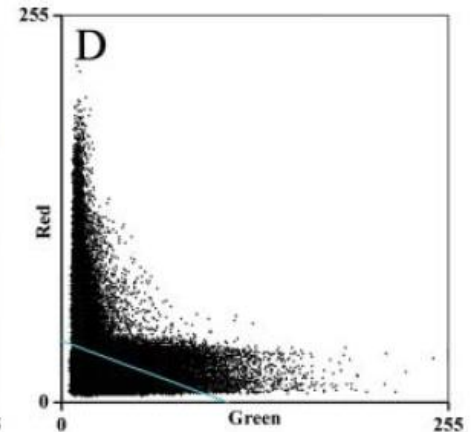
Colocalización Total
≠ Intensidad



Colocalización
Parcial



No
Colocalización



A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy

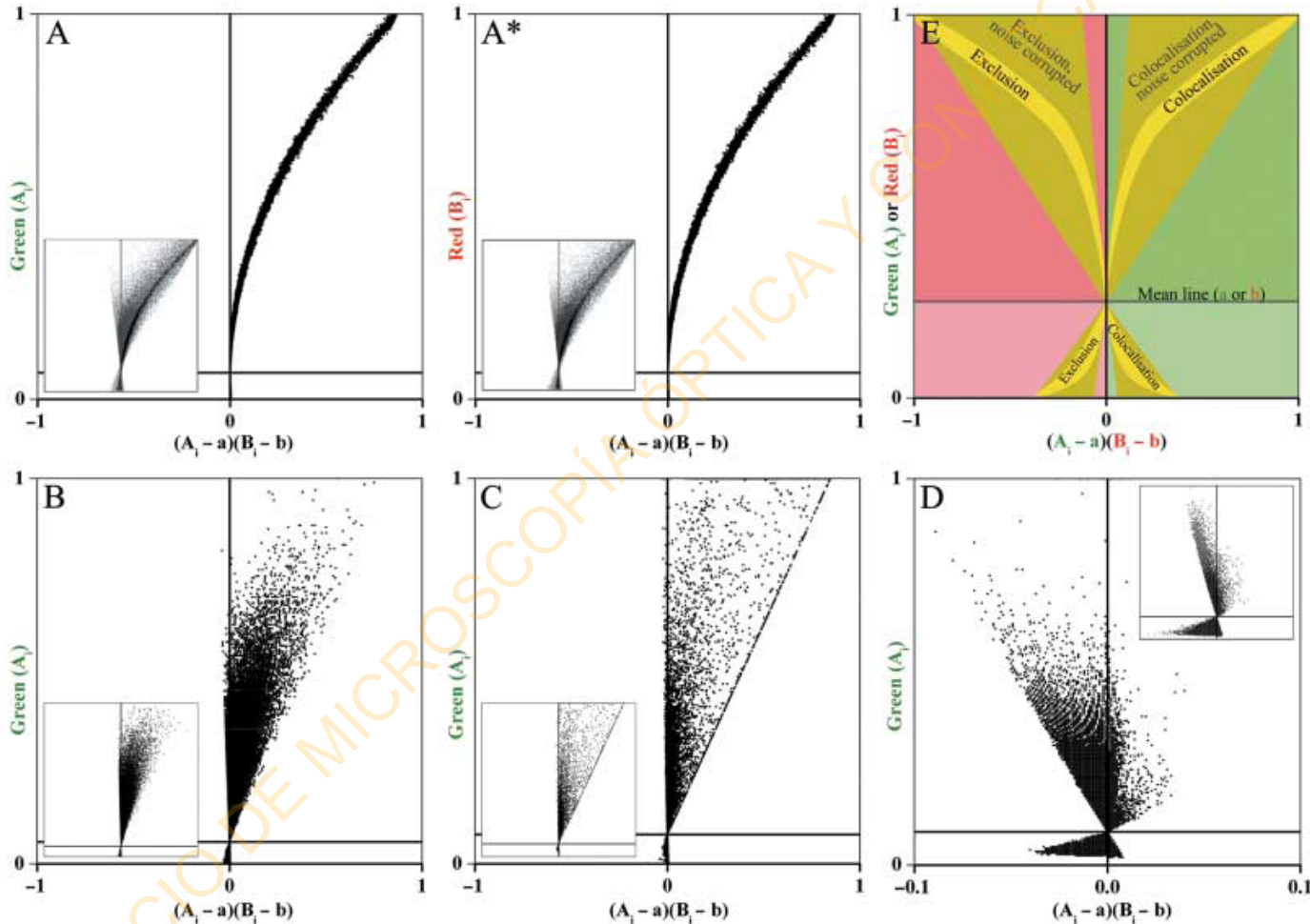
S. BOLTE* & F. P. CORDELIÈRES†

Journal of Microscopy, Vol. 224, Pt 3 December 2006, pp. 213–232

Received 13 April 2006; accepted 28 June 2006

ICA (Intensity Correlation Analysis) plots

Colocalización Total



Colocalización Total
≠ Intensidad

Colocalización
Parcial

No
Colocalización

Colocalización Cuantitativa

Imagen
Marcaje discreto

Método Objetos

Imagen
Marcaje difuso

Método Intensidad

¿Varias muestras a comparar?

Sí

Coloc. Colormap

Coefficientes
Scatterplot
ICAplots

JACoP

ICA

Colocalization
Analysis (Beta)

En el siguiente ejemplo vamos a calcular los principales coeficientes de colocalización y representaciones gráficas utilizando el plugin **ICA (Intensity Correlation Analysis)**.

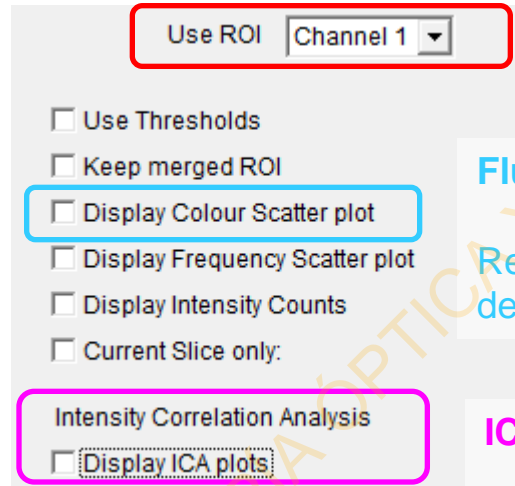
Vamos a comparar los resultados de los niveles de colocalización entre 2 células en una pareja de imágenes.

ICA. Obtención de Coeficientes y Plots

Uso de ROIs (regiones de interés)

Principales Coeficientes:

Pearson (Rr)
M1 y M2 de Manders
ICQ de Li



The screenshot shows a software interface with several options and checkboxes. At the top, there is a dropdown menu labeled 'Use ROI' with 'Channel 1' selected. Below this are several checkboxes: 'Use Thresholds', 'Keep merged ROI', 'Display Colour Scatter plot', 'Display Frequency Scatter plot', 'Display Intensity Counts', and 'Current Slice only:'. At the bottom, there is a section titled 'Intensity Correlation Analysis' with a checkbox labeled 'Display ICA plots'.

Fluorograma o Scatterplot:

Representación pixel a pixel de la intensidad del Ch1 frente a la intensidad del Ch2.

ICA plots:

Representación de los valores PDM (*Product of the Differences from the Mean*) de cada canal.

- + Sencillo, Completo.
- + Permite el uso de ROIs.
- ! Sólo Threshold visual ó AutoThreshold. No Threshold Costes.
- No calcula coeficiente de Spearman.

<http://www.uhnresearch.ca/facilities/wcif/software/Plugins/ICA.html>

<http://www.uhnresearch.ca/facilities/wcif/PDF/ICA.pdf>

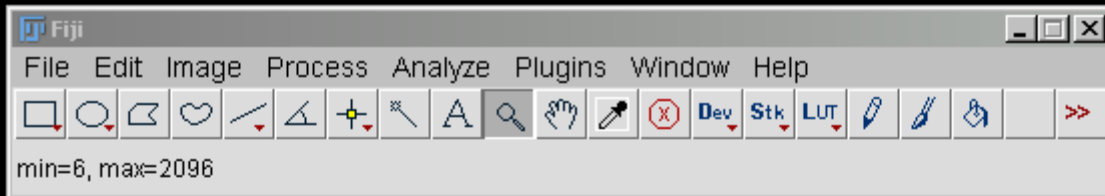
ICA. Intensity Correlation Analysis

A Syntaxin 1, $G\alpha_o$, and N-Type Calcium Channel Complex at a Presynaptic Nerve Terminal: Analysis by Quantitative Immunocolocalization

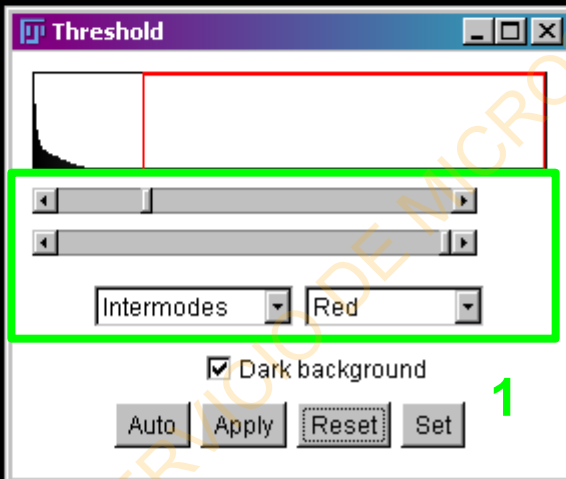
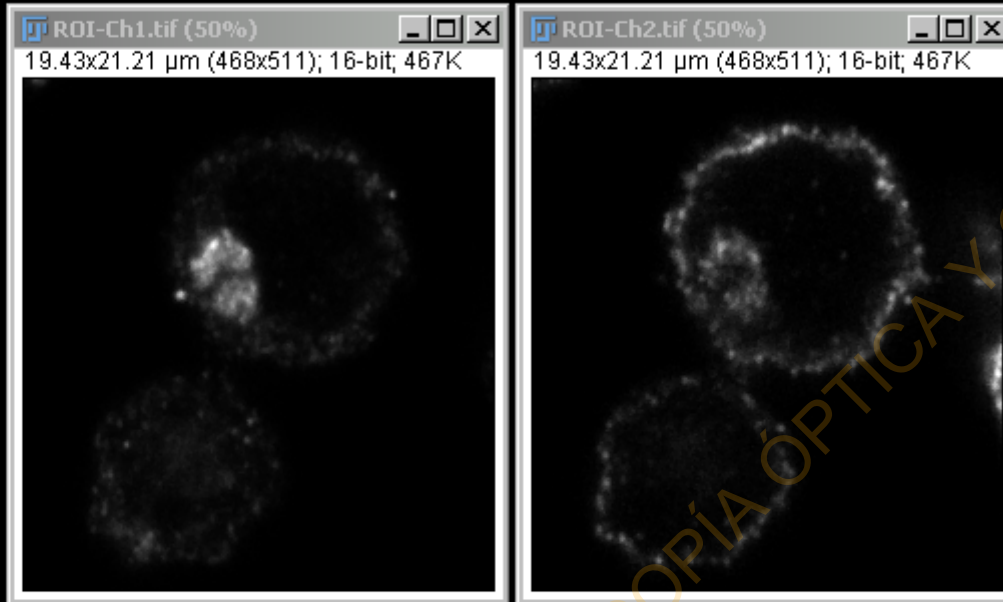
Qi Li,* Anthony Lau,* Terence J. Morris,* Lin Guo, Christopher B. Fordyce, and Elise F. Stanley

The Journal of Neuroscience, April 21, 2004 • 24(16):4070–4081

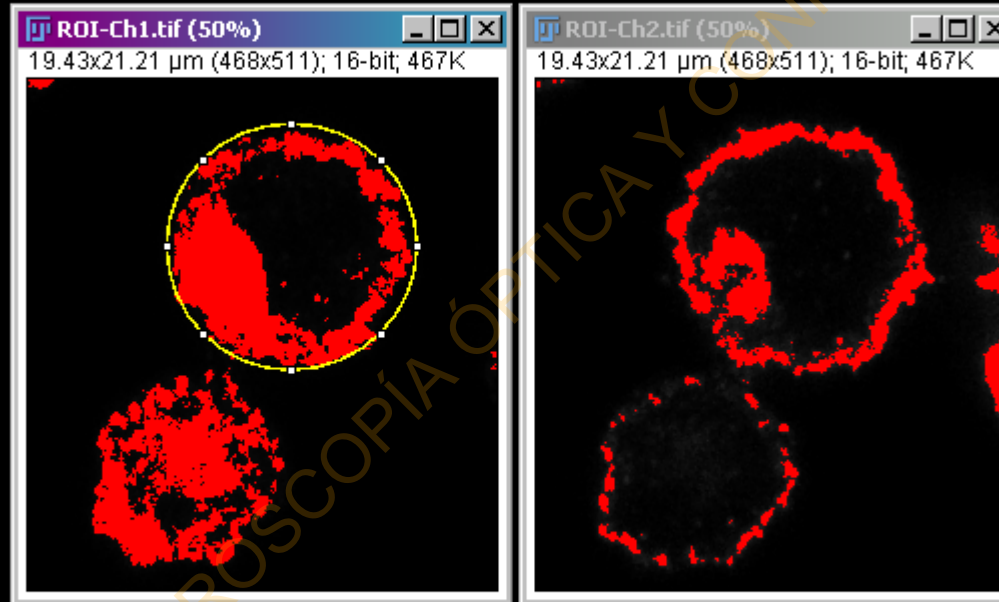
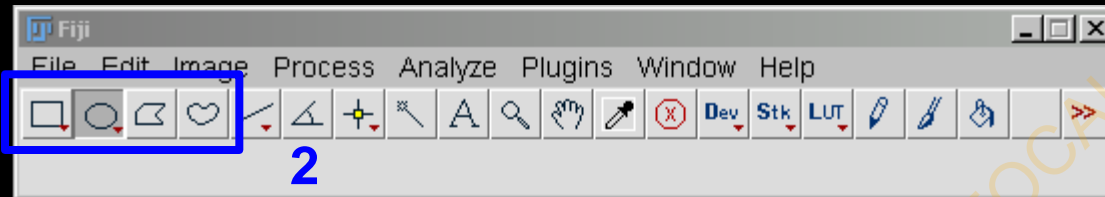
Artículo con el método desarrollado por Li y col., con información sobre el coeficiente ICQ e ICAplots.



ICA: Coeficientes y Plots 1

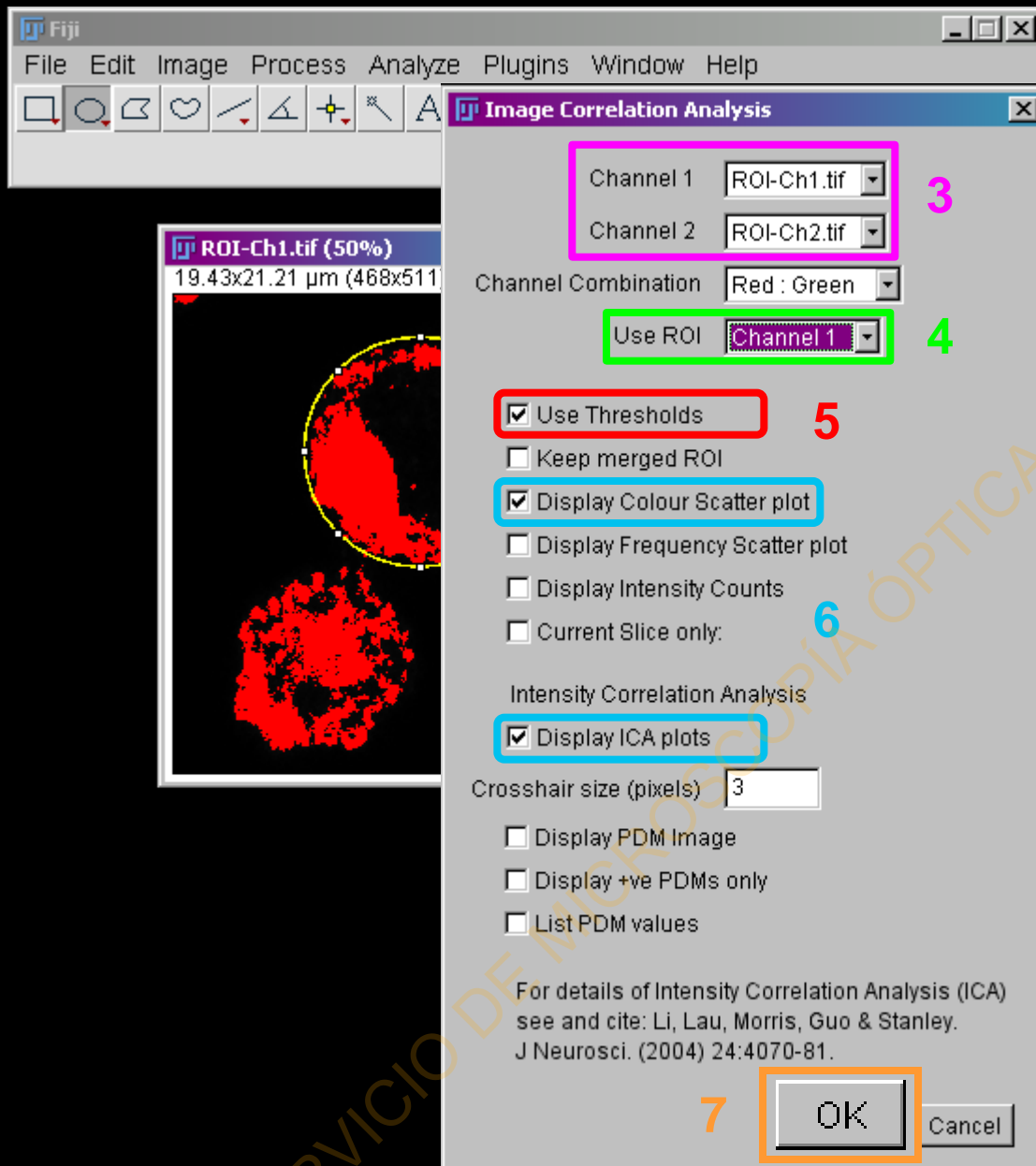


1. Abrimos las imágenes y ajustamos el **threshold** visualmente o mediante alguno de los algoritmos de autothreshold.



2. Con la ayuda de las herramientas de dibujo, dibujamos una **ROI** en la zona de la imagen donde vamos a llevar a cabo el análisis. Es suficiente con dibujar la ROI en uno de los 2 canales.

IMPORTANTE: sólo permite analizar las regiones de una en una.



ICA: Coeficientes y Plots 3

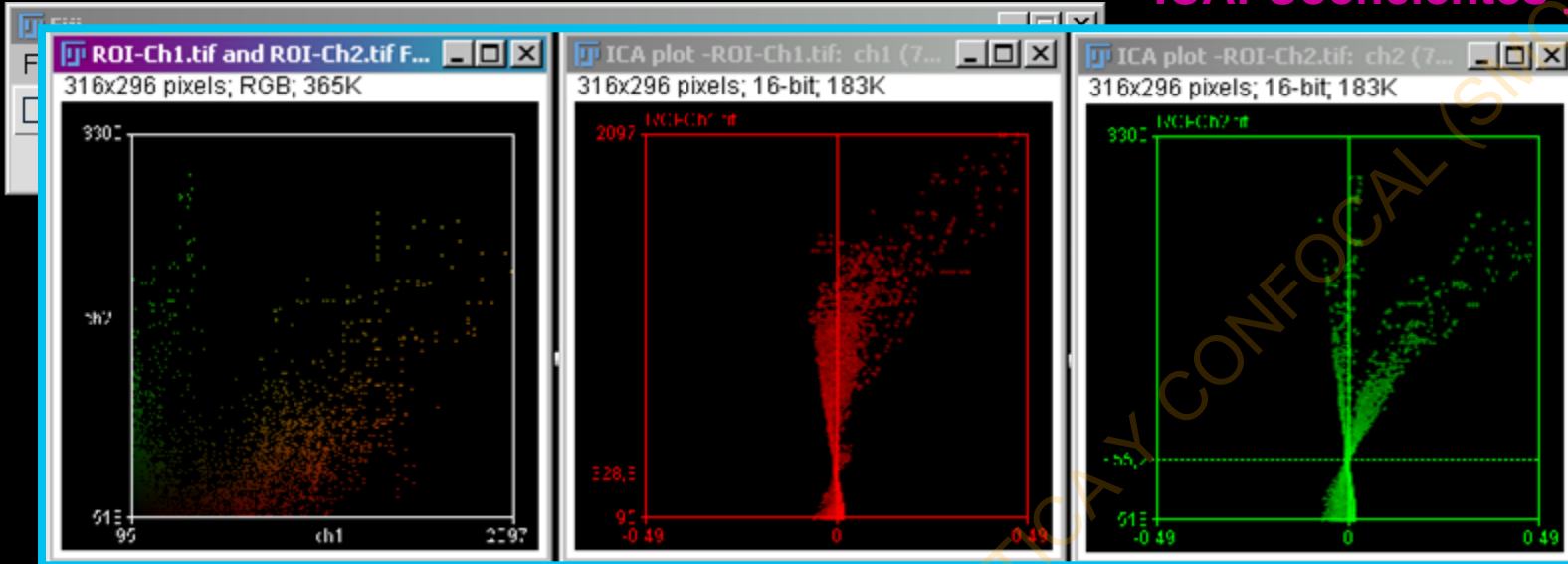
3. Abrimos el plugin ICA y seleccionamos nuestra **pareja de imágenes**.

4. Indicamos en qué canal hemos dibujado la ROI en **Use ROI** (no es obligatorio dibujar una ROI para el cálculo con este plugin, también nos da la opción de analizar la imagen completa).

5. Indicamos que queremos que utilice los umbrales de intensidad que hemos aplicado en la imagen, activando la opción **Use Threshold**.

6. Al activar las opciones de **Display Colour Scatter plot** y **Display ICA plots**, obtendremos ambas representaciones gráficas en los resultados.

7. Al terminar hacemos clic en **OK** para obtener los resultados.



9

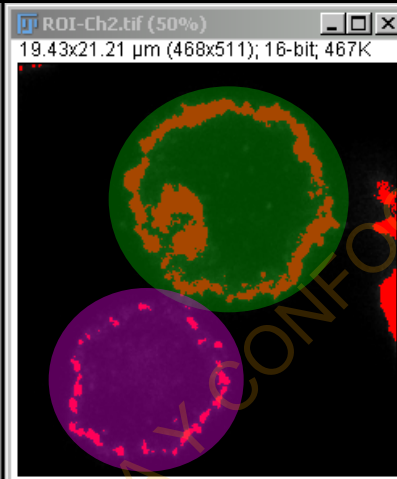
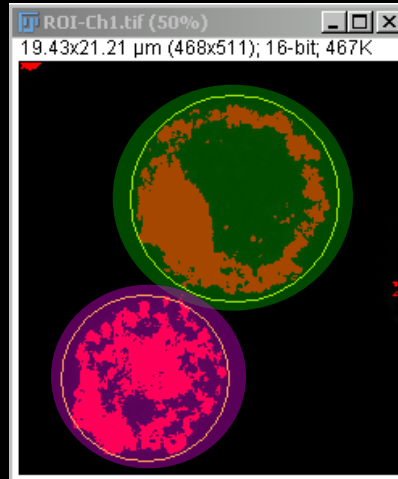
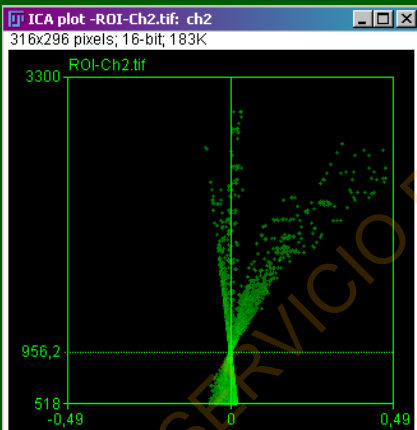
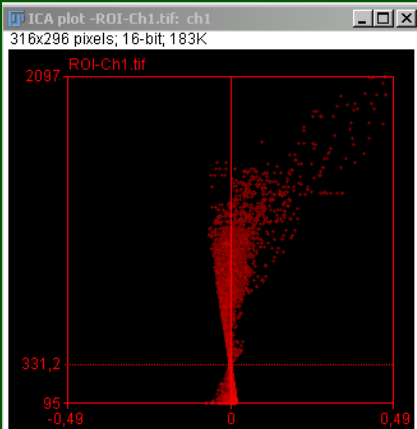
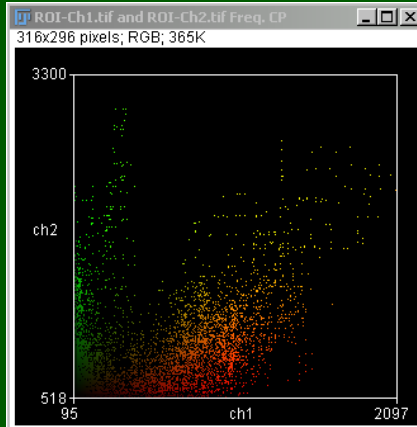
Image	Rr	R	ch1:ch2	M1	M2	N+ve	Ntotal	ICQ	Ch1 Thresh	Ch2 Thresh
ROI-Ch1.tif and ROI-Ch2.tif x 0 y0 w468 h511	0,336	0,808	1,583	0,549	0,586	4336	47516	0,084	96; 2096	519; 4095

8

8. En el **Log de resultados** obtendremos el coeficiente de **Pearson (Rr)**, los coeficientes de **Manders M1 y M2**, y el coeficiente **ICQ**.

9. Obtendremos las representaciones gráficas del **Scatterplot** e **ICApots**.

NOTA: Si se quiere analizar otra ROI de la imagen, se repite todo el proceso.

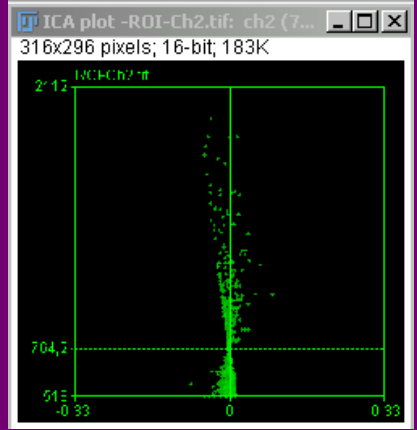
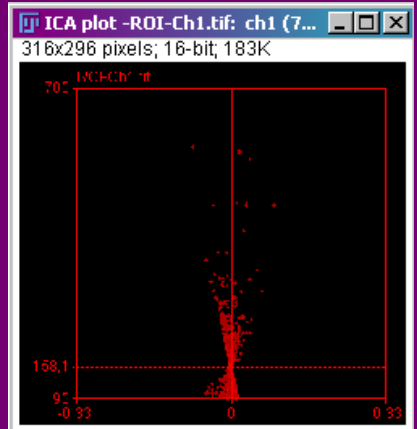
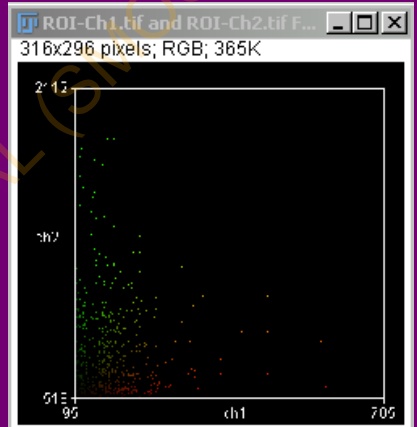


Pearson 0.34 **Pearson** -0.05

M1 0.55 **M1** 0.06
M2 0.59 **M2** 0.51

ICQ 0.08 **ICQ** 0.00

Resultados obtenidos al analizar ambas células (verde y magenta) por separado.



Colocalización Cuantitativa

Imagen
Marcaje discreto

Método Objetos

Imagen
Marcaje difuso

Método Intensidad

¿Varias muestras a comparar?

Sí

Coloc. Colormap

Coefficientes
Scatterplot
ICAplots

JACoP

ICA

Colocalization
Analysis (Beta)

En el siguiente ejemplo vamos a calcular los principales coeficientes de colocalización y representaciones gráficas utilizando el plugin **Colocalization Analysis**.

PRECAUCION: Por el momento sólo está disponible una versión Beta en pruebas. Puede tener fallos y sufrir variaciones.

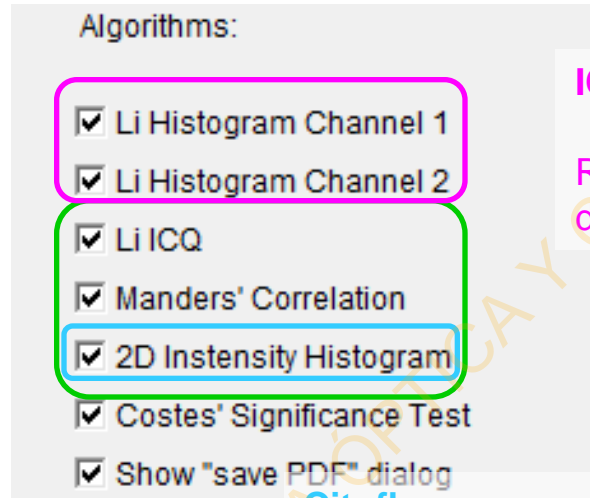
Más información sobre este plugin en:

http://fiji.sc/wiki/index.php/Colocalization_Analysis

Colocalization Analysis (Beta) Obtención de Coeficientes y Plots

Principales Coeficientes:

Pearson
M1 y M2 de Manders
ICQ de Li



ICA plots:

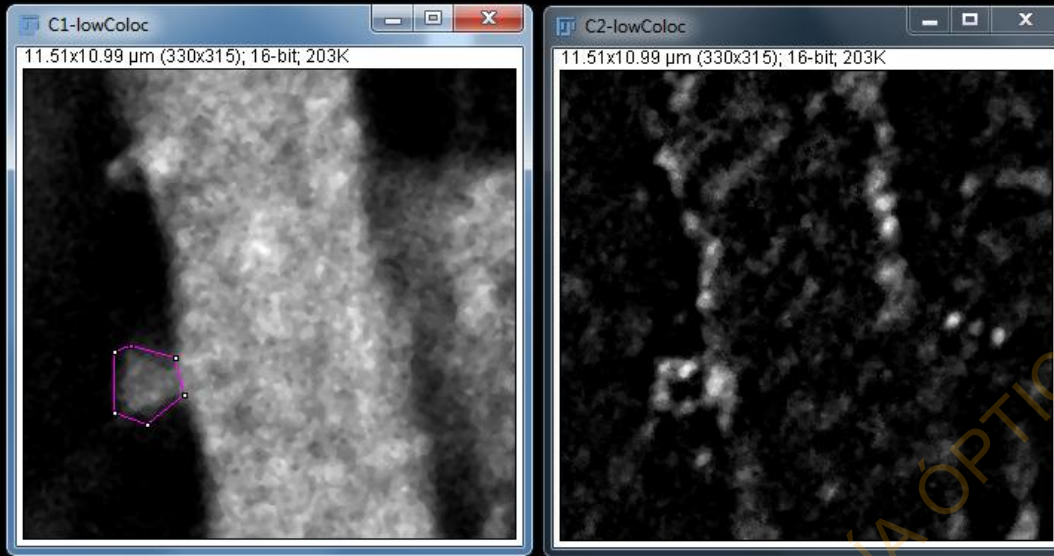
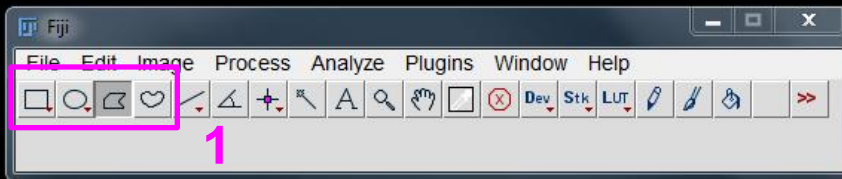
Representación de los valores PDM de cada canal.

Citofluorograma o Scatterplot:

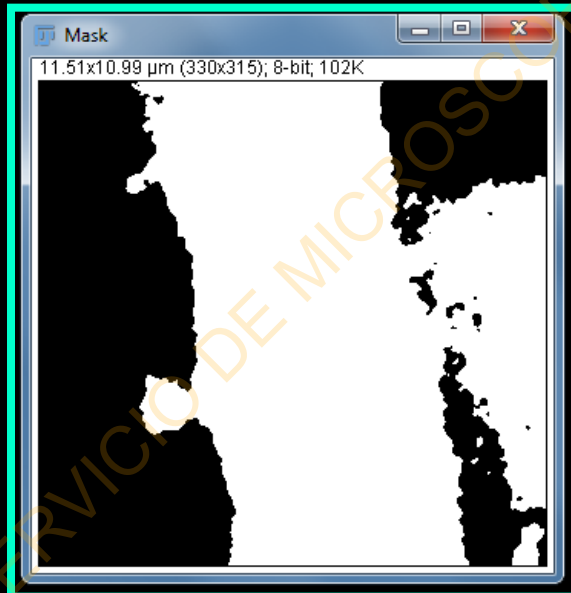
Representación pixel a pixel de la intensidad del Ch1 frente a la intensidad del Ch2.

- + Sencillo, Completo. Resultados en formato PDF.
- + Permite el uso de ROIs. También selección a través de máscara binaria.
- ! **SÓLO** Threshold automático de Costes.
- Versión BETA en pruebas.
- No calcula coeficiente de Spearman.

Colocalization Analysis: Coeficientes y Plots 1

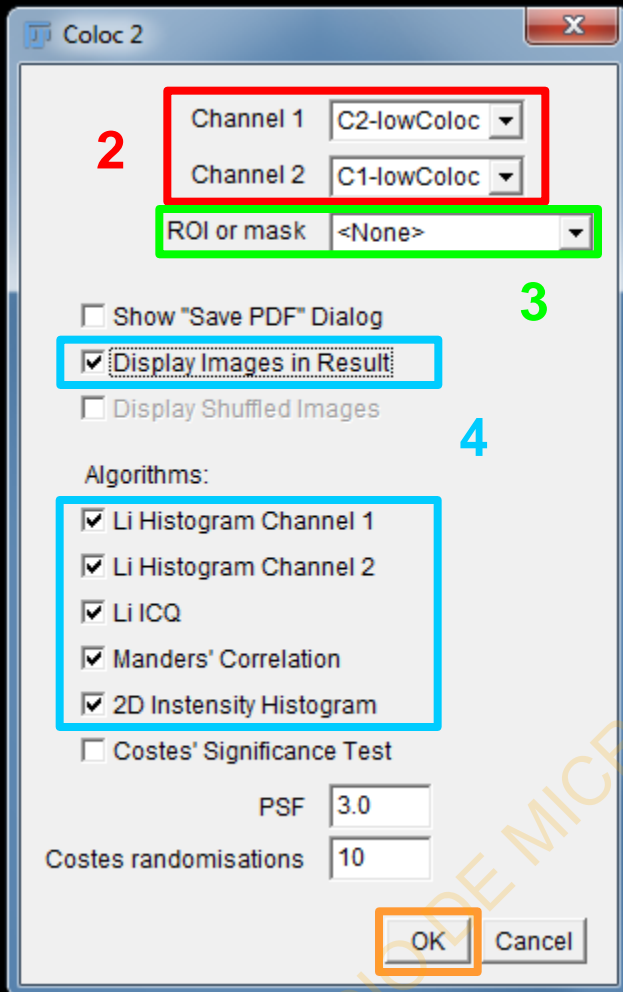


1. Con la ayuda de las herramientas de dibujo, dibujamos una **ROI** en la zona de la imagen donde vamos a llevar a cabo el análisis. Es suficiente con dibujar la ROI en uno de los 2 canales.



1'. También permite trabajar con una **máscara binaria** en lugar de ROIs, es decir, una imagen binaria (sólo 2 colores, blanco y negro) que delimite la zona de análisis.

Colocalization Analysis: Coeficientes y Plots 2



2. Abrimos el plugin y seleccionamos las **imágenes a analizar**.

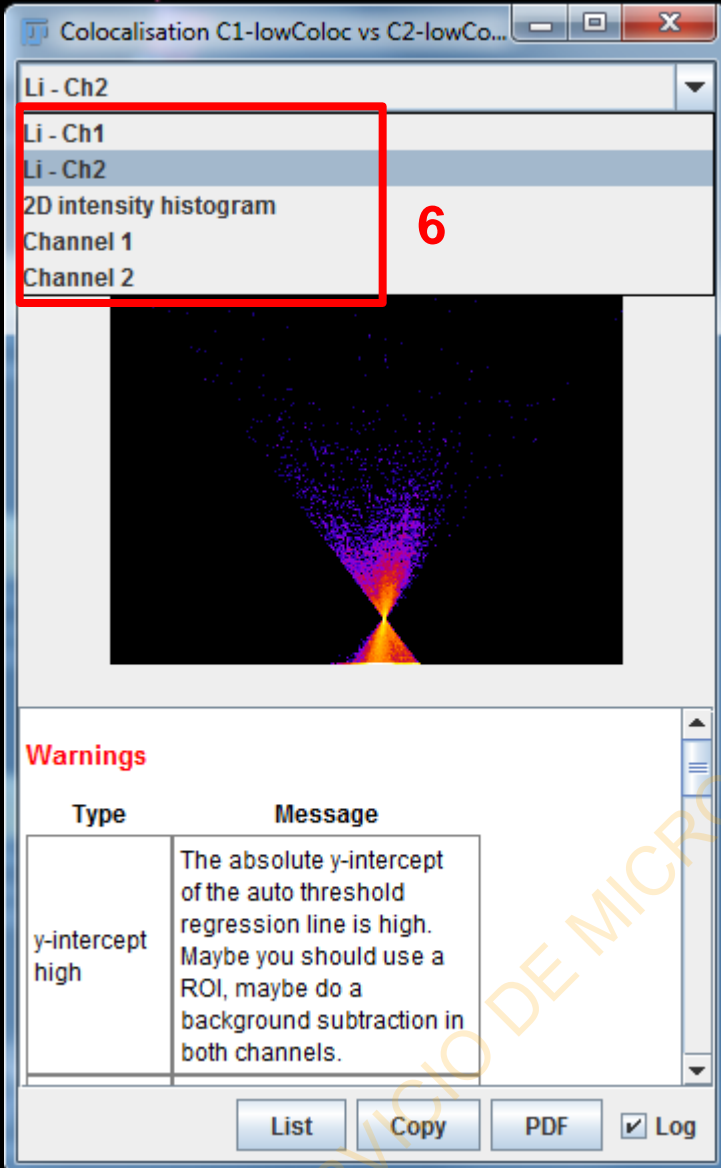
3. En **ROI or mask**, seleccionamos en qué canal tenemos dibujada la región, o qué imagen se corresponde con la máscara binaria. También nos permite analizar la imagen completa (None).

4. Activamos las siguientes opciones para obtener los coeficientes de colocalización y sus representaciones gráficas:

Display Images in Result
Li Histogram Channel 1 y 2
Li ICQ
Manders' Correlation
2D Intensity Histogram

5. Hacemos clic en **OK** para obtener los resultados.

Colocalization Analysis: Coeficientes y Plots 3



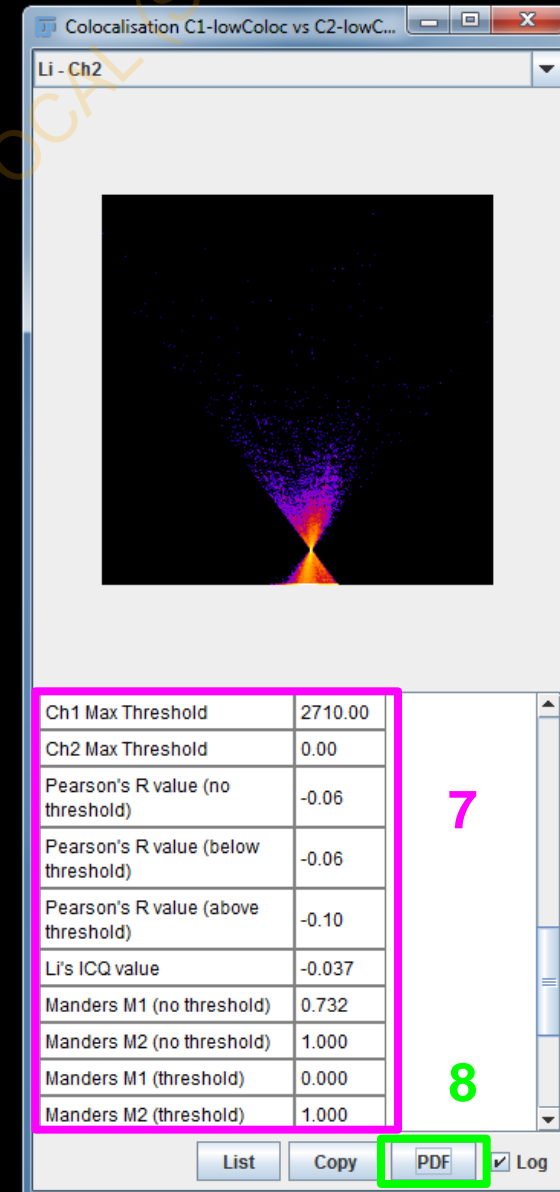
The screenshot shows the 'Colocalisation C1-lowColoc vs C2-lowCo...' window. The menu is open, highlighting 'Li - Ch1', 'Li - Ch2', '2D intensity histogram', 'Channel 1', and 'Channel 2'. A red box highlights the 'Li - Ch1' and 'Li - Ch2' options, with a red number '6' next to it. Below the menu is a scatterplot showing the relationship between the two channels. At the bottom, there is a 'Warnings' section with a table of messages and buttons for 'List', 'Copy', 'PDF', and 'Log'.

Type	Message
y-intercept high	The absolute y-intercept of the auto threshold regression line is high. Maybe you should use a ROI, maybe do a background subtraction in both channels.

6. En la parte superior de la ventana de resultados tendremos los gráficos del **scatterplot** e **ICApots**, además de las imágenes de los canales teniendo en cuenta el threshold aplicado por Costes.

7. En la parte inferior tendremos los **límites del threshold** calculado por Costes (COMPROBAD SIEMPRE ESTE VALOR) y los **resultados de los coeficientes** (teniendo o no en cuenta este threshold automático de Costes).

8. Finalmente, podemos generar un documento **PDF** con los resultados.



The screenshot shows the 'Colocalisation C1-lowColoc vs C2-lowCo...' window. The scatterplot is visible at the top. Below it is a table of results. A red box highlights the table, with a red number '7' next to it. At the bottom, there are buttons for 'List', 'Copy', 'PDF', and 'Log'. The 'PDF' button is highlighted with a red box, with a red number '8' next to it.

Ch1 Max Threshold	2710.00
Ch2 Max Threshold	0.00
Pearson's R value (no threshold)	-0.06
Pearson's R value (below threshold)	-0.06
Pearson's R value (above threshold)	-0.10
Li's ICQ value	-0.037
Manders M1 (no threshold)	0.732
Manders M2 (no threshold)	1.000
Manders M1 (threshold)	0.000
Manders M2 (threshold)	1.000

Colocalización Cuantitativa

Imagen
Marcaje discreto

Método Objetos

Imagen
Marcaje difuso

Método Intensidad

No ¿Varias muestras a comparar?

Coeficientes
Scatterplot
ICAplots

Colocalización:
¿real o azar?

Van Steensel

Costes,
randomization

CDA

JACoP

Colocalization
Analysis (Beta)

Quando sólo tenemos una condición experimental (y nada con qué comparar), es fácil entender los resultados de la colocalización cuando tenemos o valores muy altos (por ejemplo, Pearson de 0.9) o valores muy bajos.

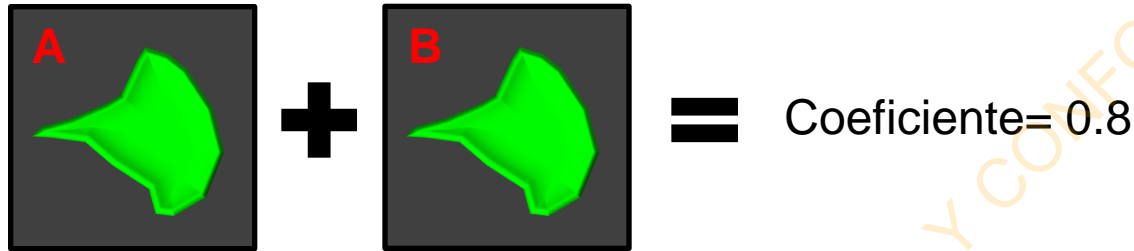
Pero, ¿qué ocurre cuando obtenemos valores intermedios, como un Pearson de 0.4?

En estos casos es especialmente importante distinguir una colocalización real de una debida a la coincidencia azarosa de los marcajes.

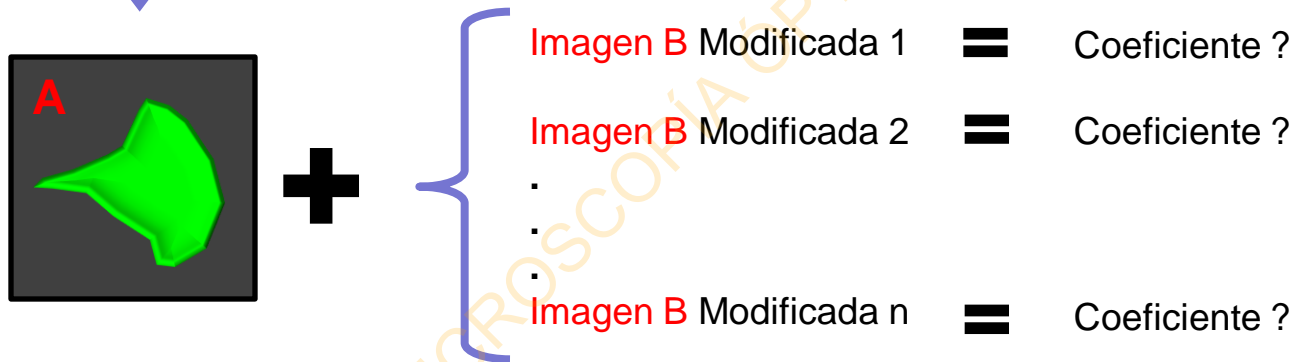
Actualmente existen varios tests implementados en distintos plugins que analizan cómo de real es la colocalización observada.

Colocalización Real o Azar

Pareja Imágenes Original



Parejas de Imágenes Aleatorias



Estos métodos tienen un funcionamiento similar: si partimos de una imagen A y una imagen B con un valor de correlación determinado, estos test calculan el grado de correlación entre la imagen A original y numerosas imágenes B modificadas.

Al comparar el valor obtenido para la pareja original con los valores obtenidos entre las parejas que contienen la imagen modificada, podemos calcular un valor de probabilidad del resultado de la colocalización, es decir, ¿cuántas parejas tenían valores similares a los de la pareja original?

Principales Tests Colocalización Real o Azar

**Costes
Randomization**

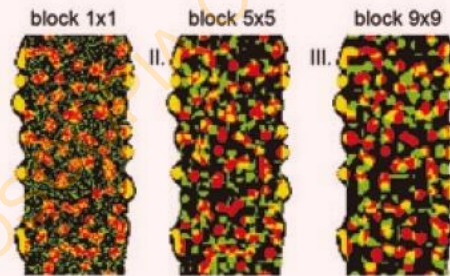
Van Steensel

CDA
Confined Displacement
Algorithm

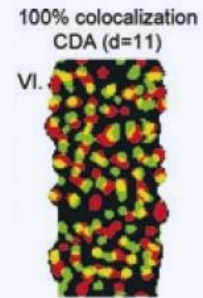
Método	Dividir en bloques	Desplazar en x	Desplazamiento Radial xy
Coeficiente	Pearson	Pearson, CCF	Manders
Resultado	P-Value > 95%	CCF máx. $dx \approx 0$	P-Value > 95%



Original



Costes

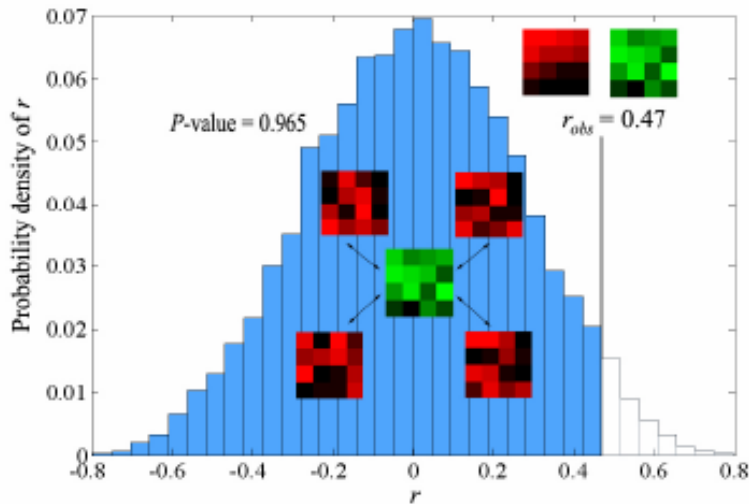


CDA

Dependiendo del método, hay varias opciones para generar estas imágenes B modificadas: se pueden fragmentar en bloques que se dispondrán al azar (Costes), se pueden trasladar sus pixels una cierta distancia (Van Steensel), o se puede rotar el marcaje dentro de una zona determinada para tratar de mantener el patrón fluorescente(CDA).

A continuación vamos a ver un pequeño ejemplo de estos 3 métodos. Recomendamos la lectura de los artículos originales para una mejor comprensión.

Costes' Randomization



Biophysical Journal Volume 86 June 2004 3993–4003

Automatic and Quantitative Measurement of Protein-Protein Colocalization in Live Cells

Sylvain V. Costes,^{*†} Dirk Daelemans,[‡] Edward H. Cho,^{*} Zachary Dobbin,^{*} George Pavlakis,[‡] and Stephen Lockett^{*}

+ Comparación estadística en base al coeficiente de Pearson.

! Basado en la fragmentación de la imagen.

NOTA: Costes y colaboradores recomiendan que el tamaño de los bloques se calcule en función del tamaño del PSF (resolución del microscopio), pero otros autores (Dunn y col., 2011) recomiendan que su tamaño \geq objetos de la imagen. ¡Precaución!

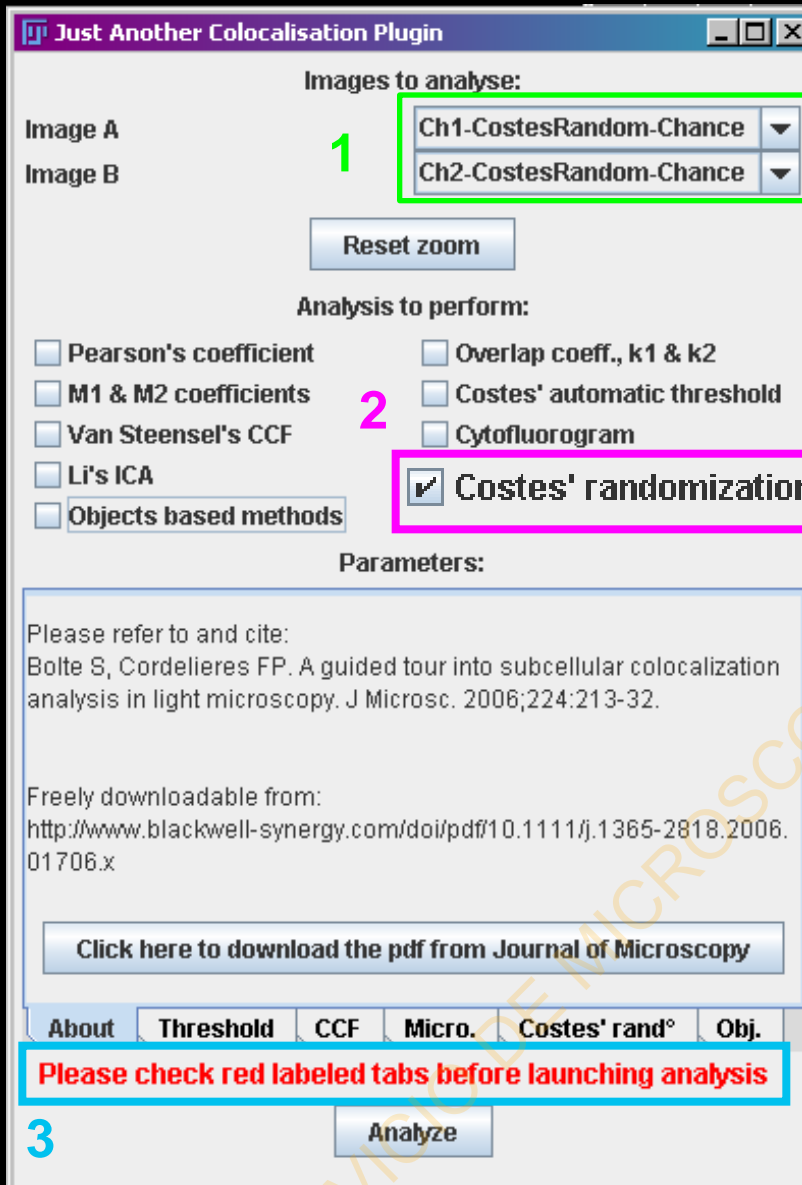
! Recomendables \approx 100-200 rounds.

A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy

Kenneth W. Dunn,¹ Malgorzata M. Kamocka,¹ and John H. McDonald²

Am J Physiol Cell Physiol 300: C723–C742, 2011.

Costes' Randomization 1



1. Abrimos el plugin y seleccionamos nuestra **pareja de imágenes**.

2. Activamos la opción **Costes' randomization**.

3. Revisamos las **pestañas** que aparecen en color rojo.

Costes' Randomization 2

Just Another Colocalisation Plugin

Images to analyse:

Image A: Ch1-CostesRandom-Chance

Image B: Ch2-CostesRandom-Chance

Reset zoom

Analysis to perform:

Pearson's coefficient Overlap coeff., k1 & k2

M1 & M2 coefficients Costes' automatic threshold

Van Steensel's CCF Cytofluorogram

Li's ICA Costes' randomization

Objects based methods

Parameters: 4

Wide-Field Confocal

Get calib. from ImgA Get calib. from ImgB

xy calib (nm) 5: 140

z calib (nm): 1000

Write calib. to images

Wavelength A (nm): 488

Wavelength B (nm): 555

NA: 1.4

Refractive index: 1.518

6

About Threshold CCF **Micro.** Costes' rand° Obj.

Please check red labeled tabs before launching analysis

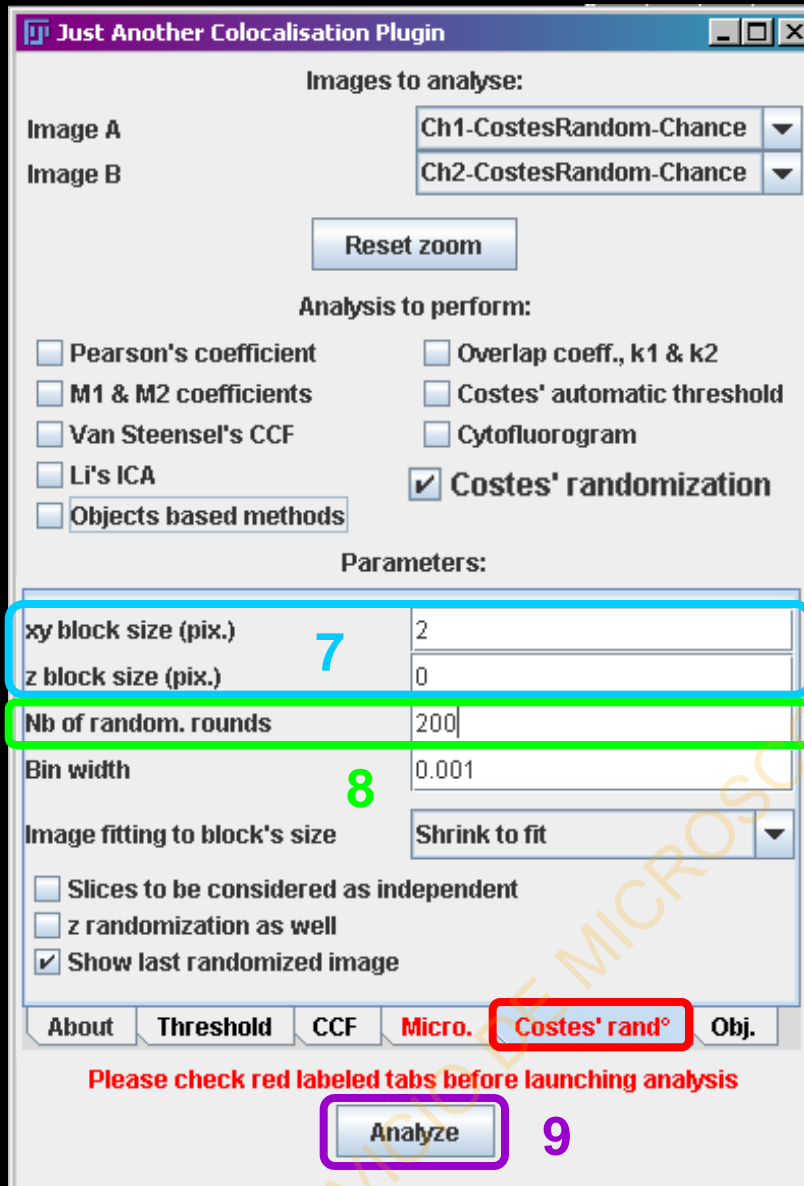
Analyze

4. Desde la pestaña **Micro**, seleccionamos el **tipo de imágenes**: confocal o campo ancho.

5. Anotamos la **calibración** (equivalencia pixels/nm) o la obtenemos a partir de alguna de las imágenes desde Get calib. from Img.

6. Escribimos los **parámetros del microscopio** requeridos: longitudes de onda de excitación, apertura numérica e índice de refracción del medio de montaje.

Costes' Randomization 3

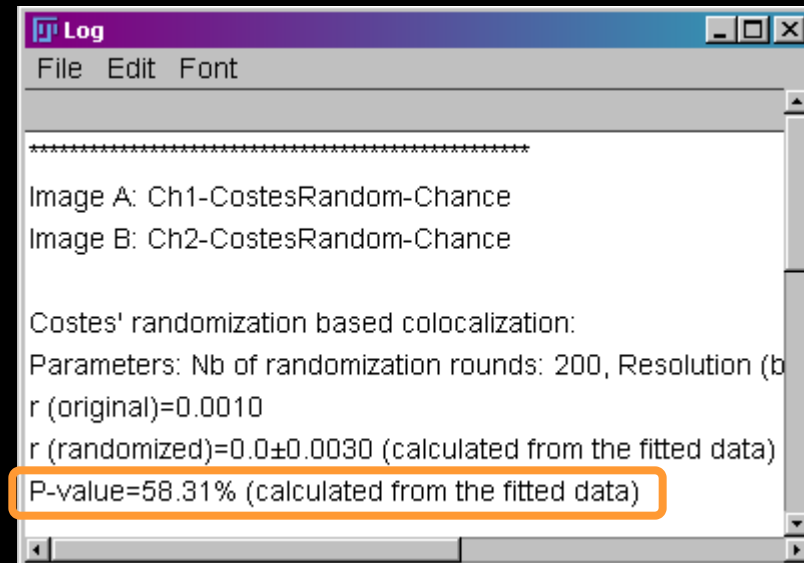


7. En la pestaña **Costes' rand°**, el **tamaño del bloque en xyz** se calcula automáticamente a partir de los valores de la pestaña "Micro". Hay autores (Dunn y col., 2011) que recomiendan que el tamaño de los bloques sea igual o mayor que los objetos de la imagen B (que es la que se va a fragmentar).

8. Elegir en **Nb of random. Rounds** un valor entre 100-200.

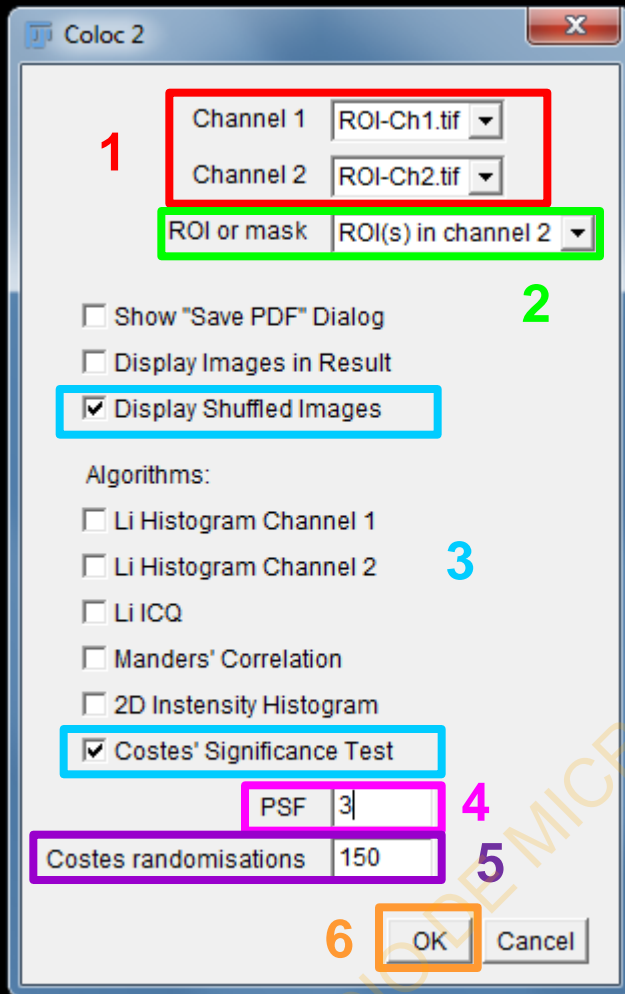
9. Hacer clic en **Analyze**.

10. En el Log con el resultado, comprobar el **p-valor** obtenido (debe ser mayor de 95%)



El procedimiento a seguir con el plugin Colocalization Analysis (versión Beta) es muy parecido al del plugin JACoP:

Colocalization Analysis: Costes' Randomization 1



1. Abrimos el plugin y seleccionamos las **imágenes a analizar**.

2. En **ROI or mask**, seleccionamos en qué canal tenemos dibujada la región, o qué imagen se corresponde con la máscara binaria. También nos permite analizar la imagen completa (None).

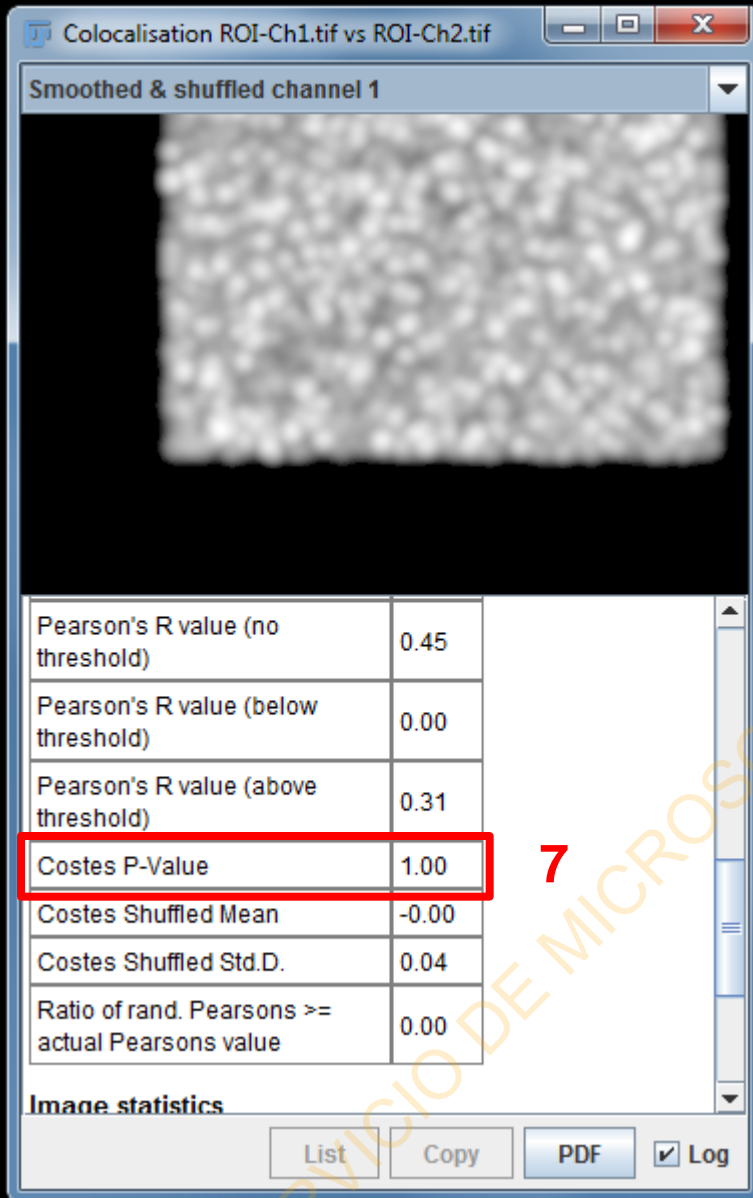
3. Activamos las opciones **Display Shuffled Images** (muestra una de las imágenes modificadas) y **Costes' Significance Test**.

4. Calculamos el **tamaño del PSF**, que será el tamaño de los bloques en que fragmentaremos la imagen, o bien indicar el tamaño aproximado de los objetos de la imagen (ver artículos Costes y col. 2004 y Dunn y col. 2011 para discusión del método). Para calcular el tamaño del PSF: <http://www.svi.nl/NyquistCalculator>

5. Definir un número de **randomisations** ($\approx 100-200$).

6. Hacemos clic en **OK** para obtener los resultados.

Colocalization Analysis: Costes' Randomization 2



7. En el Log de resultados, comprobar el **Costes P-Value**.

Van Steensel (Cross-Correlation Function)

Partial colocalization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in discrete compartments in nuclei of rat hippocampus neurons

Bas van Steensel^{1,*}, Erica P. van Binnendijk¹, C. Diane Hornsby², Hans T. M. van der Voort³, Zygmunt S. Krozowski⁴, E. Ronald de Kloet² and Roel van Driel^{1,†}

Journal of Cell Science 109, 787-792 (1996)

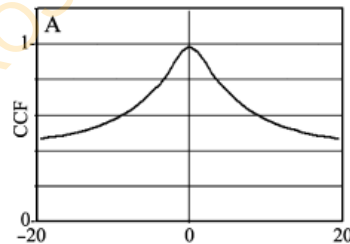
- + Medida basada en el coeficiente de Pearson.
- ! Realiza un desplazamiento de la imagen en el eje x.

Este método se basa en que si la colocalización es verdadera, el valor del coeficiente de Pearson disminuirá a medida que aumente el desplazamiento en x. La función CCF se obtiene al representar el valor de Pearson obtenido frente al desplazamiento en x.

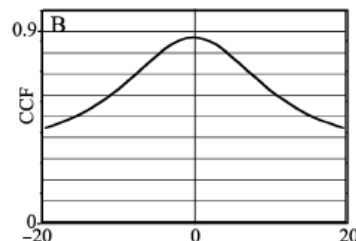
El valor máximo de Pearson debería alcanzarse cuando el desplazamiento sea nulo (aunque puede haber un cierto desplazamiento, por ejemplo, por aberración cromática).

- ! Funciona mejor en marcajes discretos.

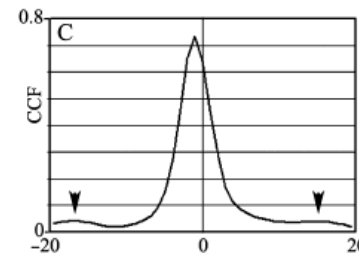
Colocalización Total



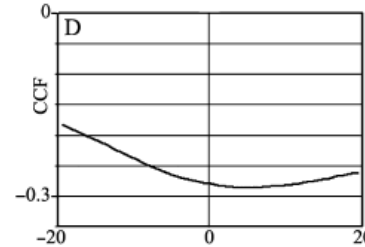
Colocalización Total
≠ Intensidad



Colocalización Parcial

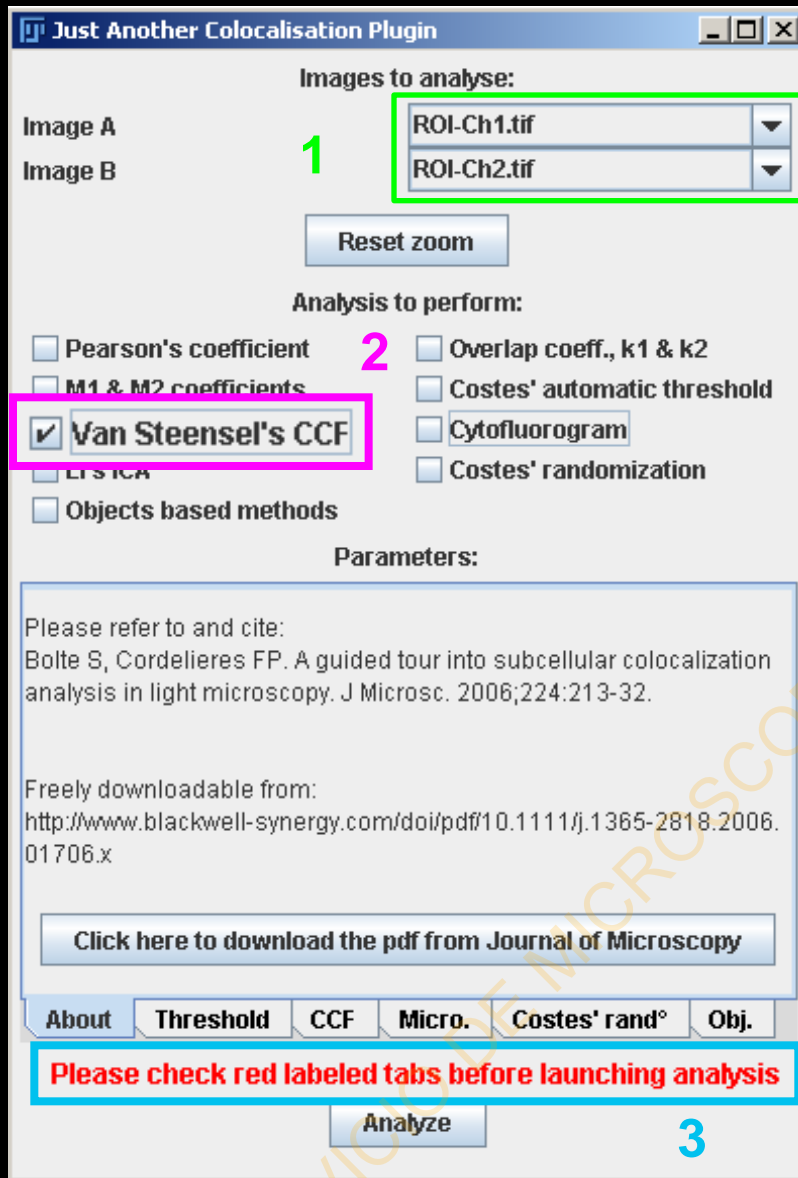


No Colocalización



JACoP:

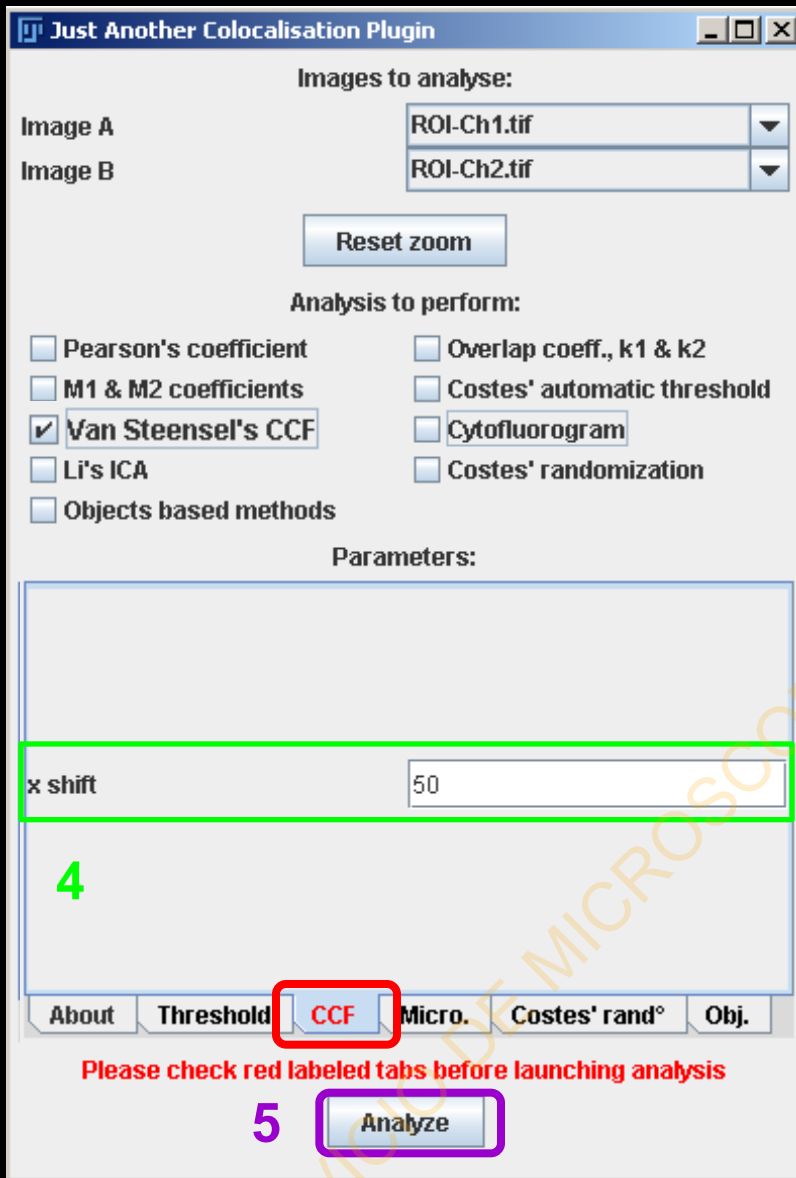
Van Steensel's CCF 1



Esta herramienta viene implementada en el plugin JACoP:

1. Abrimos el plugin y seleccionamos nuestra **pareja de imágenes**.
2. Activamos la opción **Van Steensel's CCF**.
3. Revisamos las **pestañas** que aparecen en color rojo.

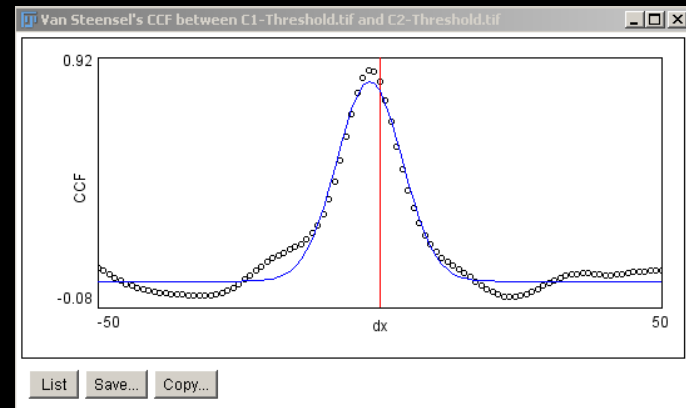
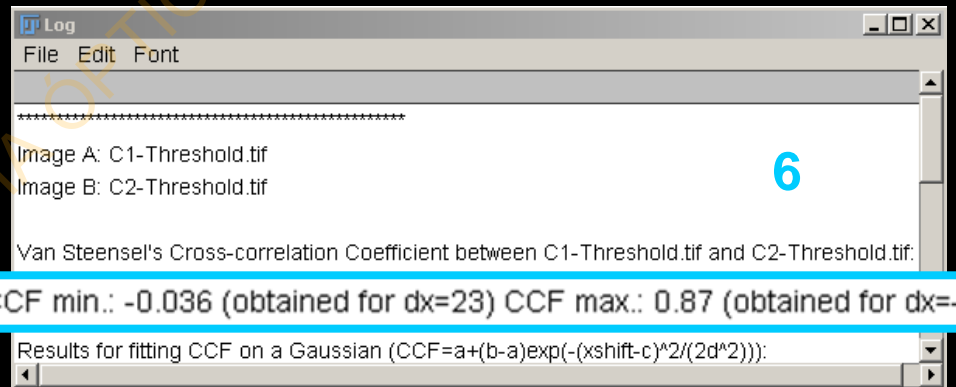
Van Steensel's CCF 2



4. Desde la pestaña **CCF**, seleccionamos el **desplazamiento en x**.

5. Hacemos clic en **Analyze**.

6. En el Log de resultados revisar los **valores máximos y mínimos de CCF**.



CDA (Confined Displacement Algorithm) plugin

Journal of Microscopy, 2010

Received 12 October 2009; accepted 7 January 2010

doi: 10.1111/j.1365-2818.2010.03369.x

Confined displacement algorithm determines true and random colocalization in fluorescence microscopy

J Microsc 239: 173–183.

O. RAMÍREZ^{*,†,§}, A. GARCÍA^{*}, R. ROJAS^{*,‡}, A. COUVE^{†,§}
& S. HÄRTEL^{*,§}

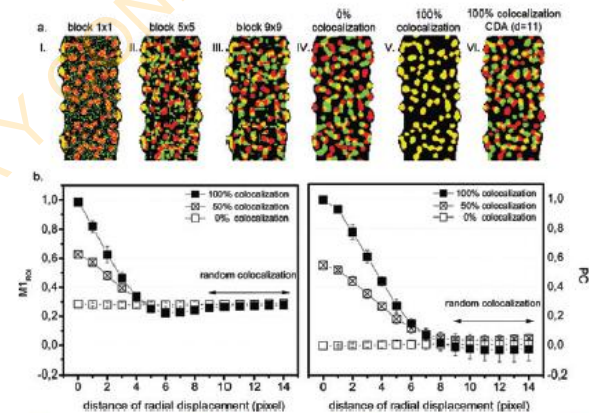
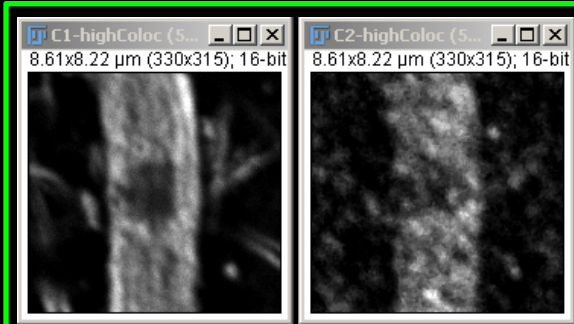
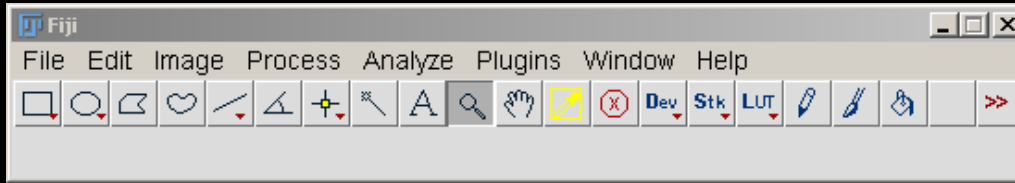


Fig. 3. CDA leads to random scenarios without compromising the subjacent fluorescence pattern. (a) Block scrambling for block sizes 1×1 , 5×5 and 9×9 (I–III), dendrite models with 0% and 100% colocalization (IV, V), and CDA ($d = 11$) for 100% colocalization (VI). (b) CDA plots for $M1_{ROI}$ (left) and PC (right) in model dendrites with 0%, 50% and 100% colocalization (black, crossed and open squares). Mean values and corresponding SD are plotted for each distance. Arrows mark the random regime for colocalization in the asymptotic region of the plot ($9 \leq d \leq 14$).

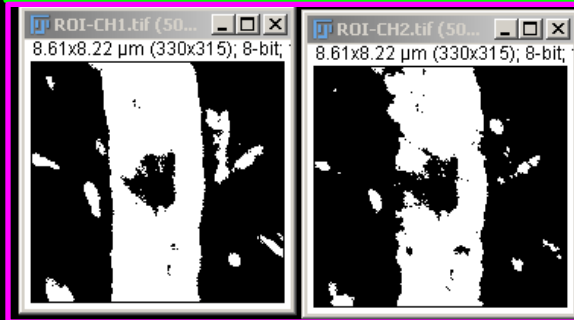
- + Basado en la rotación de la imagen. Usa los coeficientes de Manders.
- + Alternativa a fragmentar en bloques (mantiene el patrón fluorescente y limita la región donde se produce el desplazamiento de los pixels, es decir, dejamos fuera del análisis los pixels del fondo).
- ! Necesitamos 5 imágenes:
Ch1, Ch2, ROI Ch1, ROI Ch2 y ROI colocalización
- Procesamiento bastante lento. Recomendable hacer el análisis de un recorte de la imagen.



1

1. Abrimos nuestra **pareja de imágenes**.

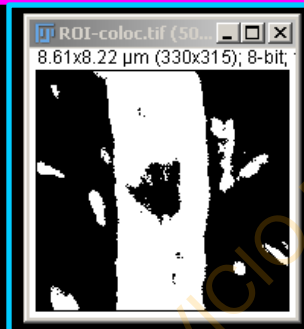
2. Duplicamos cada canal y aplicamos un threshold para obtener imágenes binarias de las zonas donde queremos estudiar la colocalización.



2

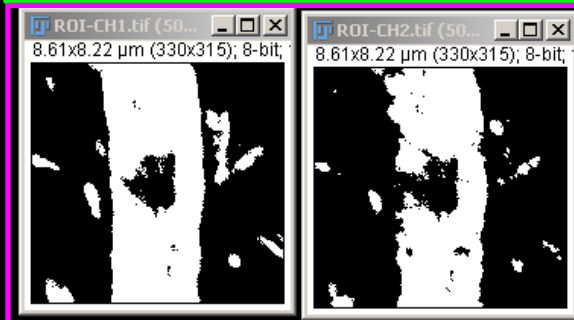
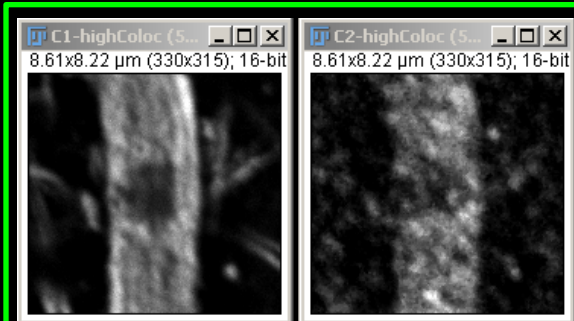
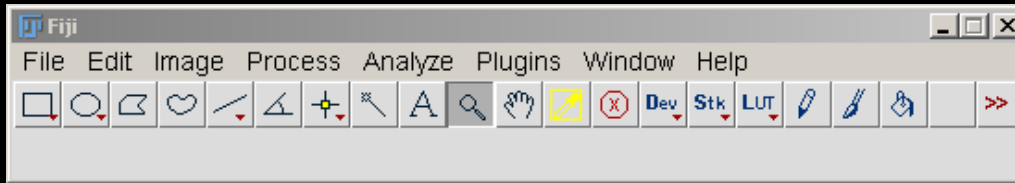
Estas imágenes serán las **ROI for channel 1** y **ROI for channel 2** en el plugin.

3. También debemos generar una imagen binaria para limitar la zona de análisis del algoritmo CDA (sólo se producirá desplazamiento de los pixels que queden dentro de la parte blanca de esta imagen).



3

Será el llamado **Confined Compartment** en el plugin.

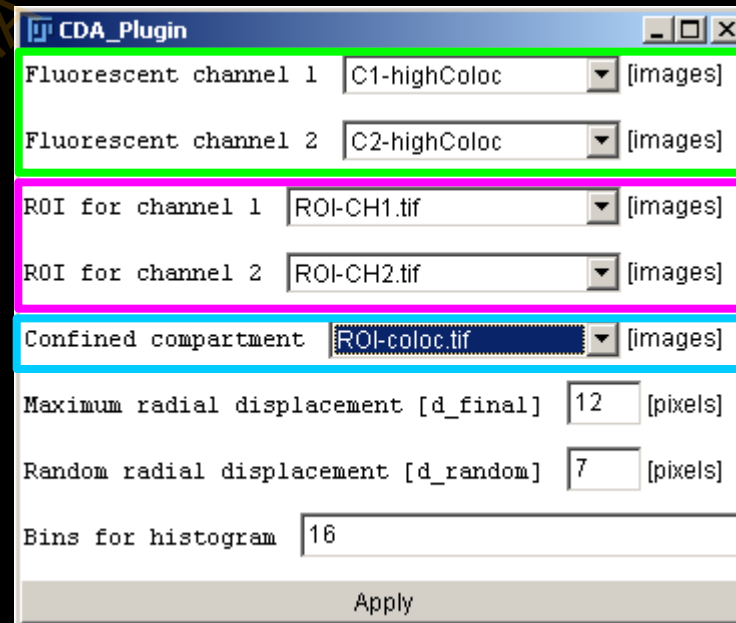


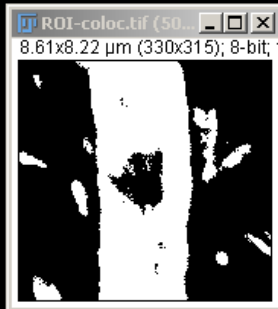
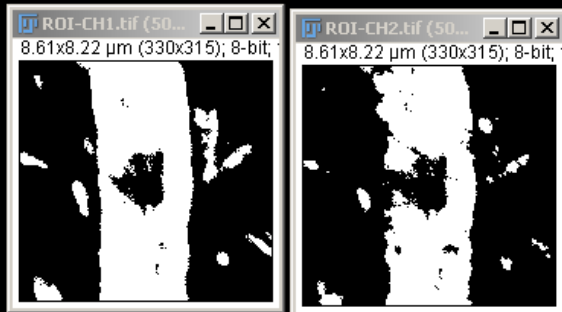
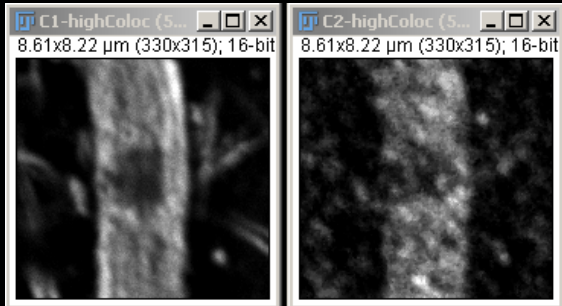
4. Abrimos el plugin y asignamos cada una de las 5 imágenes en su apartado correspondiente:

-**Fluorescent channel 1 y 2:** Imágenes originales en escala de grises.

-**ROI for channel 1 y 2:** imágenes binarias de cada canal.

-**Confined compartment:** zona de la imagen donde ocurrirá el desplazamiento.



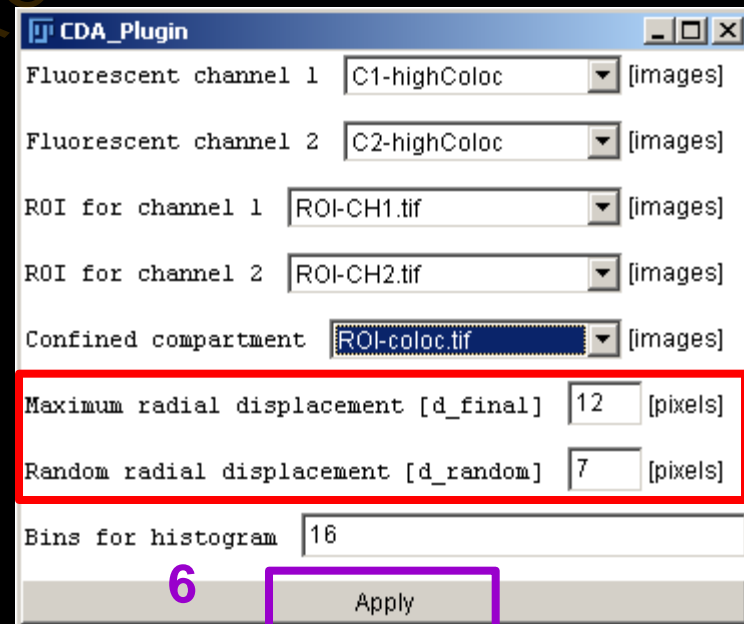


5. Seleccionamos un valor para los siguientes parámetros:

-**Maximum radial displacement**: distancia máxima que recorre el desplazamiento.

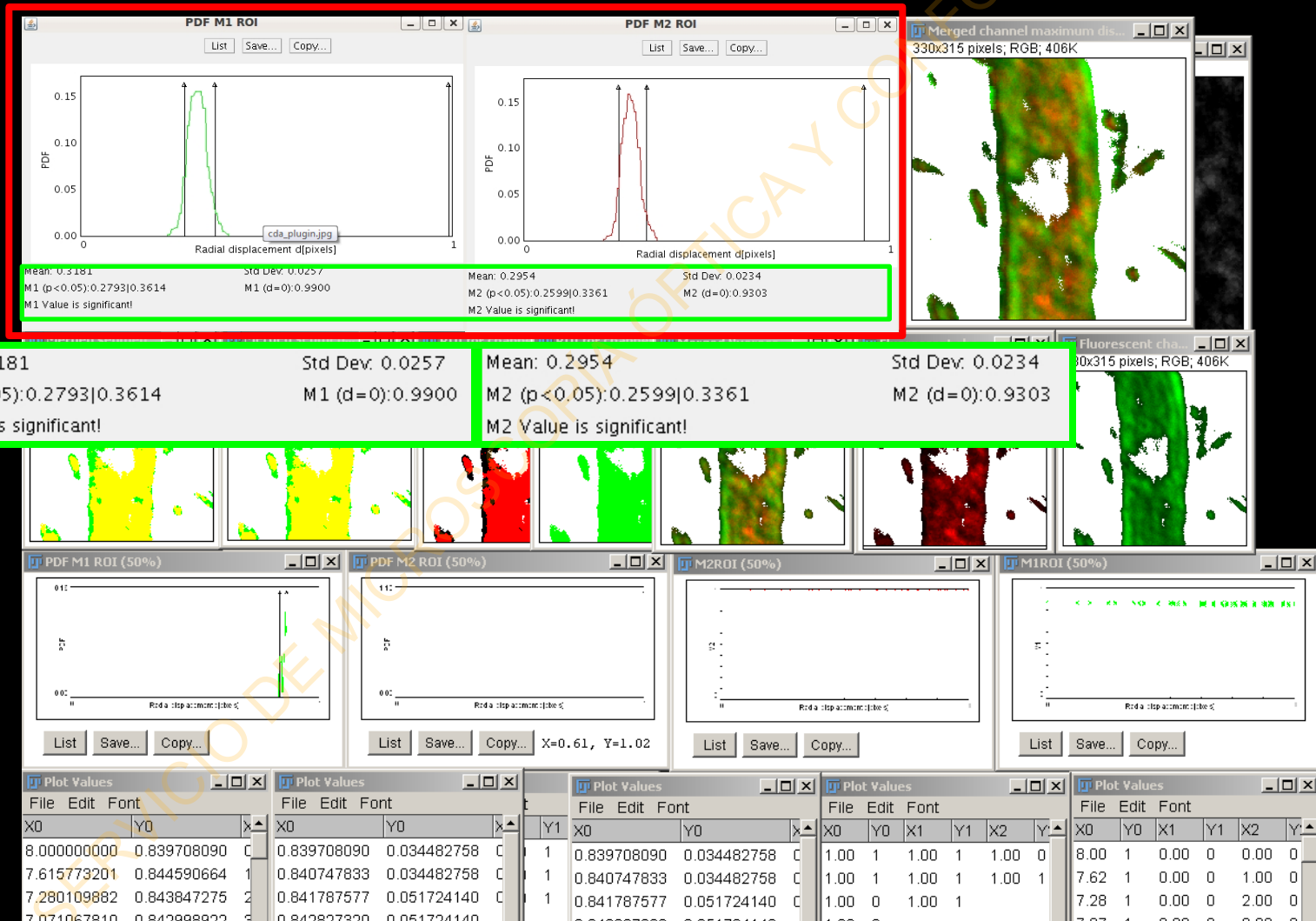
-**Random radial displacement**: distancia a partir de la cual se considera que el sistema entró en el régimen de aleatorio (las 2 señales están desacopladas y el algoritmo genera valores de M1 y M2 que representan estados “randomizados” entre las señales).

6. Hacemos clic en **Apply** para iniciar el procesamiento (¡paciencia!).



7. De entre los numerosos resultados obtenidos, revisar en los **gráficos PDF** si los **valores de M1 y M2** son significativos.

7



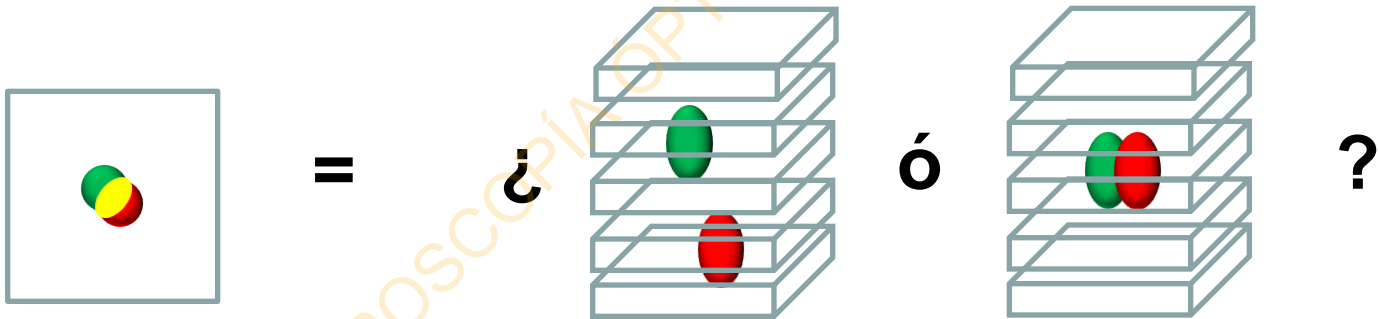
Colocalización Cuantitativa

Conclusiones

- Colocalización \neq Interacción
- Buena calidad de Imagen y Controles!!
- Utilizar = plugin para = experimento ¿Updates? ¿Mantenimiento?
- Threshold y ROIs ¿Tiene sentido biológico? ¿Subjetivo?
- No Proyecciones Perdemos información en Z (ver siguiente página)

Z-Stack. No Analizar Proyecciones

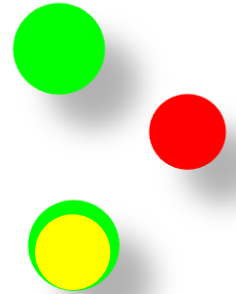
Proyección = Eliminar Información en Z



PROYECCIÓN XY
¿Colocalización?

Z STACK
¿Colocalización?

BIBLIOGRAFÍA Y ENLACES DE INTERÉS



SERVICIO DE MICROSCOPIA ÓPTICA Y CONFOCAL (SMOC)

- Artículos científicos:

Dunn et al. (2011). [A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy.](#) *American Journal of Physiology. Cell Physiology.* 300, C723-C742. **(Muy recomendable)**

Adler and Parmryd. (2010). [Quantifying colocalization by correlation: the Pearson correlation coefficient is superior to the Mander's overlap coefficient.](#) *Cytometry Part A.* 77A, 733-742.

Abraham et al. (2010). [Deconvolution and chromatic aberration corrections in quantifying colocalization of a transcription factor in three-dimensional cellular space.](#) *Micron.* 41, 633-640.

Ramírez et al. (2010). [Confined displacement algorithm determines true and random colocalization in fluorescence microscopy.](#) *Journal of Microscopy.* 239, 173-183.

Bolte and Cordelieres. (2006). [A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy.](#) *Journal of Microscopy.* 224, 213-232. **(Muy recomendable)**

Jaskolski et al. (2005). [An automated method to quantify and visualize colocalized fluorescent signals.](#) *Journal of Neuroscience Methods.* 146, 42-49.

Costes et al. (2004). [Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells.](#) *Biophysical Journal.* 86, 3993-4003.

Li et al. (2004). [A syntaxin 1, Gα_o, and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: análisis by quantitative immunocolocalization.](#) *The Journal of Neuroscience.* 24, 4070-4081.

Lachmanovich et al. (2003). [Co-localization analysis of complex formation among membrane proteins by computerized fluorescence microscopy: application to immunofluorescence co-patching studies.](#) *Journal of Microscopy.* 212, 122-131.

Van Steensel et al. (1996). [Partial colocalization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in discrete compartments in nuclei of rat hippocampus neurons.](#) *Journal of Cell Science.* 109, 787-792.

- Enlaces Web a plugins y manuales de ImageJ/Fiji:

Just Another Colocalization Plugin – **JACoP** :

http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:analysis:jacop_2.0:just_another_colocalization_plugin:start

http://imagejdocu.tudor.lu/lib/exe/fetch.php?media=plugin:analysis:jacop_2.0:just_another_colocalization_plugin:jacop_ijconf2008.pdf

Intensity Correlation Analysis - **ICA**:

<http://www.uhnresearch.ca/facilities/wcif/software/Plugins/ICA.html>

<http://www.uhnresearch.ca/facilities/wcif/PDF/ICA.pdf>

Colocalization Colormap:

<https://sites.google.com/site/colocalizationcolormap/home>

Colocalization Analysis (Beta):

Se instala automáticamente al actualizar Fiji.

http://fiji.sc/wiki/index.php/Colocalization_Analysis#

Confined Displacement Algorithm:

http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:analysis:confined_displacement_algorithm_determines_true_and_random_colocalization:start

Pearson- Spearman Colocalization – **PSC** – Plugin:

<http://www.cpiib.ac.uk/tools-resources/psc-colocalization-plugin/>

Organelle Based Colocalization – **OBCOL**:

<http://obcol.imb.uq.edu.au/>

Colocalization Test:

http://fiji.lbl.gov/mediawiki/phase3/index.php/Colocalization_Test

Colocalization Threshold:

http://pacific.mpi-cbg.de/wiki/index.php/Colocalization_Threshold

MosaicSuite (Squassh):

<http://mosaic.mpi-cbg.de/?q=downloads/imageJ>

AutoThreshold:

<http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/user-guide.pdf>

http://pacific.mpi-cbg.de/wiki/index.php/Auto_Threshold

ImageJ mailing list:

<https://list.nih.gov/cgi-bin/wa.exe?A0=IMAGEJ>

- Otros enlaces de interés:

http://www.biu.helsinki.fi/coursematerial/BIU_2010_Advanced_Methods.pdf

<http://www.cytometry.ca/events/Symposium2009/O29-LacosteJ.pdf>

http://fiji.sc/wiki/index.php/Colocalization_-_hardware_setup_and_image_acquisition

<http://www.svi.nl/NyquistCalculator>

- Más enlaces sobre colocación en la página Web del SMOC:

http://www2.cbm.uam.es/mkfactory.esdomain/webs/CBMSO/plt_Servicio_Pagina.aspx?IdServicio=19&IdObjeto=275

Agradecimientos

Han colaborado en este seminario prestando sus imágenes:

Argentina Lario

Javier Díez Guerra

María Férez

María Recuero

