

TRIPLE COLOCALIZACIÓN Y MAPEO MOLECULAR

Julio Buonfigli (1), Teresa Damiani (1)

(1) Instituto de Histología y embriología de Mendoza (IHEM), Mendoza, Argentina.
juliobuonfigli@yahoo.com.ar

Sea por limitaciones de resolución óptica o por la complejidad topológica de las estructuras a estudiar, las relaciones entre las moléculas marcadas puede ser difícil de visualizar directamente en una imagen. En estos casos análisis de colocalización (y su validación estadística) pueden ayudar a inferir dichas relaciones. En este trabajo presentamos una aplicación para ImageJ (Molecular Mapping) que permite hacer análisis de doble y triple colocalización y su significancia estadística. Además dicha aplicación se vale de los resultados de validación estadística de relaciones dobles y triples, para inferir posibles distribuciones relativas entre moléculas. Una manera de validar estadísticamente los porcentajes de colocalización es usando imágenes generadas a partir de las imágenes reales que simulan la distribución aleatoria para uno de los fluoróforos (proceso denominado scrambling [1]). Entonces el nivel de colocalización real se compara con el encontrado luego de llevar a cabo el proceso de scrambling. Si la colocalización real es significativamente superior a la generada por scrambling se considera que la colocalización es significativa (**SC**). Si la colocalización real es significativamente inferior a la generada se considera exclusión significativa (**SE**), lo que significa que los fluoróforos tienden a evitar la cercanía unos con otros. Cualquier otro caso se considera que la colocalización es no significativa (**NS**) [2]. Para doble colocalización se compara solamente la relación entre dos canales. Con tres fluoróforos, existen tres relaciones dobles y cuatro relaciones triples (tabla 1), lo que da un total de siete relaciones con tres resultados posibles cada una. Con esta información la aplicación genera una tabla de estados (cada fila de la tabla 1) que se corresponde con una distribución de moléculas en particular (figura 1). Es decir, cada distribución de la figura 1 tiene una tabla de estados diferente y cada tabla de estados (tabla 1) define una distribución relativa particular. La figura 2 muestra imágenes adquiridas con un microscopio de epifluorescencia (Leica DMRXA2) de una célula HeLa cotransfectada con GM130 y TGN46 e inmunomarcada con Rab6. Las tres moléculas se encuentran en el complejo de Golgi. Rab6 (verde) y TGN46 (rojo) se encuentran mayoritariamente en la cara trans del complejo de Golgi mientras que GM130 (azul) se encuentra en la cara cis del complejo. Los análisis dan como resultado una tabla de estados igual que la fila e de la tabla 1. Es decir que existe una tendencia de las moléculas a organizarse según la figura 1e. Esto es coherente con la distribución relativa de estas proteínas, dos en la cara trans del complejo de Golgi y una en la cara cis. Como se ve en la tabla 1 existen otros escenarios con los mismos resultados de relaciones dobles que el anterior (tabla 1e y 1k) pero diferentes relaciones triples y consecuentemente, diferentes distribuciones relativas. Los análisis de triple colocalización agregan información útil para inferir posibles distribuciones relativas. La distribución espacial relativa de biomoléculas marcadas da indicios de relaciones funcionales entre dichas moléculas. Sin embargo, en muchos casos, por ejemplo cuando el compartimiento en estudio tiene una estructura tridimensional compleja (figura 2), la distribución relativa de moléculas no es tan obvia a simple vista. Por otro lado cuando el análisis se restringe a regiones reducidas del espacio, probablemente el límite de resolución del equipo óptico tampoco permita ver directamente en la imagen la distribución relativa de las moléculas en cuestión. Con esta aplicación intentamos aportar a los análisis de colocalización tradicionales, interpretando las correlaciones entre moléculas para mapear su posible distribución relativa.

REFERENCIAS

- [1]S. V Costes, D. Daelemans, E. H. Cho, Z. Dobbin, G. Pavlakis, and S. Lockett, (2004) "Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells", *Biophys. J.*, 86(6): 3993–4003.
[2]S. BOLTE and F. P. CORDELIÈRES, (2006), "A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy", *J. Microsc.*, 224(3): 213–232.

FIGURAS

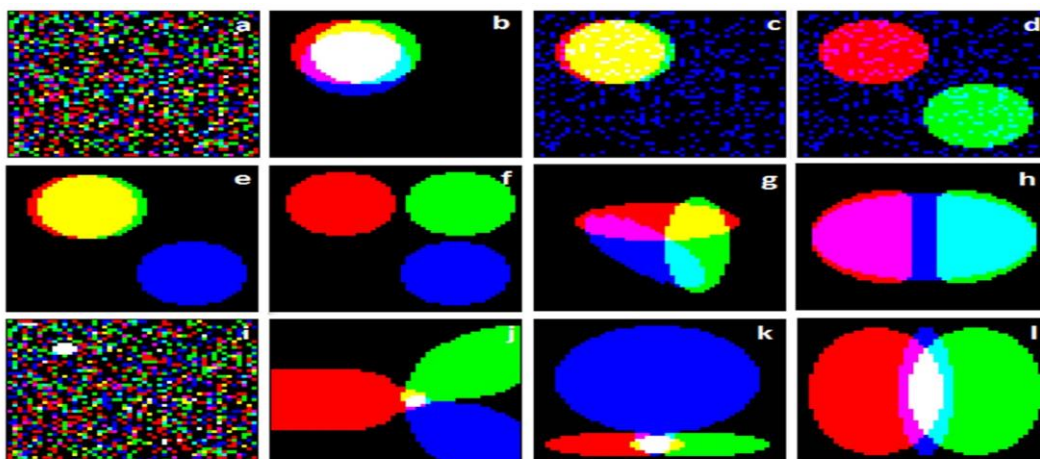
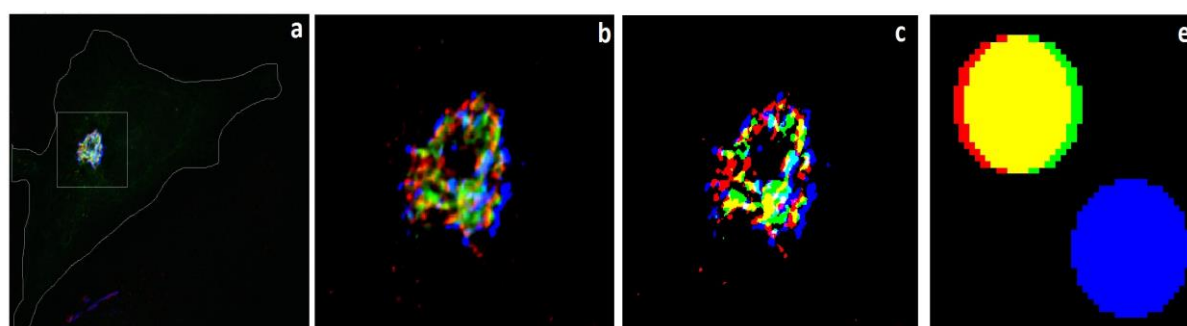


Figura 1: Diferentes escenarios de relaciones posibles entre tres moléculas. En rojo, verde y azul cada molécula. La colocalización entre el rojo y el verde se ve en amarillo, en magenta la de rojo y azul, en cian la de verde y azul, y en blanco la triple colocalización.

	Significancia estadística de relaciones dobles			Significancia estadística de relaciones triples			
	Rojo con Verde	Rojo con Azul	Verde con Azul	ROJO con verde y azul	VERDE con rojo y azul	AZUL con rojo y verde	Triple aleatorización
a	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
b	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
c	SC	NS	NS	SC	SC	NS	SC
d	SE	NS	NS	SE	SE	NS	SE
e	SC	SE	SE	NS	NS	SE	SE
f	SE	SE	SE	NS	NS	NS	SE
g	SC	SC	SC	SE	SE	SE	SE
h	SE	SC	SC	SE	SE	NS	SE
i	NS	NS	NS	SC	SC	SC	SC
j	SE	SE	SE	SC	SC	SC	NS
k	SC	SE	SE	SC	SC	SC	SC
l	SE	SC	SC	SC	SC	SC	SC

Tabla 1: Estados de colocalización para cada uno de los escenarios de la figura 1. SC: colocalización significativa, SE: exclusión significativa, NS: no significativo.



d	Significancia estadística de relaciones dobles			Significancia estadística de relaciones triples			
	Rojo con Verde	Rojo con Azul	Verde con Azul	ROJO con verde y azul	VERDE con rojo y azul	AZUL con rojo y verde	Triple aleatorización
e	SC	SE	SE	NS	NS	SE	SE

Figura 2: Ejemplo de una triple relación en el complejo de Golgi. a) Célula HeLa cotransfectada (GM130 y TGN46) e inmunomarcada contra Rab6. b) Inset del complejo de Golgi. c) Inset del complejo de Golgi binarizado. d) Tabla de estados de colocalización para este ejemplo. e) Distribución