N&B analízis, kolokalizáció

Nagy Péter

DEOEC Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

Miért vizsgáljuk a kolokalizációt?

- Fluoreszcensen jelzett, biológiailag fontos molekulák kölcsönhatását szeretnénk kimutatni.
- A kölcsönhatást többféle szinten (nanométeres-mikrométeres), többféle módszerrel lehet vizsgálni (pl. FRET, korrelációs mikroszkópia, koprecipitáció, fluoreszcencia komplementáció, yeast two-hybrid, stb.).
- Kolokalizáció: egy helyen való elhelyezkedés.
- Hogy jöhet létre kolokalizáció?

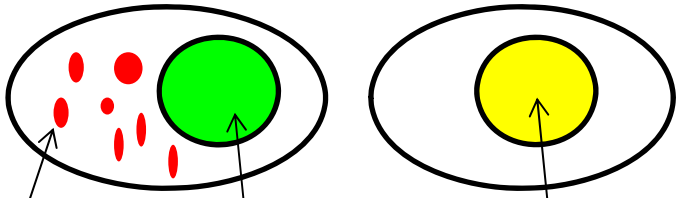
1. **véletlen** kolokalizáció (pl. túlzott mértékű overexpresszió miatt, amikor az overexpresszált fehérjék telítik a sejt szortírozó rendszereit, és ott is megjelennek, ahol normálisan nincsenek)
2. **látszólagos** kolokalizáció a nem megfelelő módszerek használata miatt (l. köv. ábra)
3. **valódi** kolokalizáció, ahol a feltételezés, hogy ha két molekula egy helyen található, akkor közöttük közvetlen vagy közvetett kölcsönhatás kell, hogy legyen, teljesül.

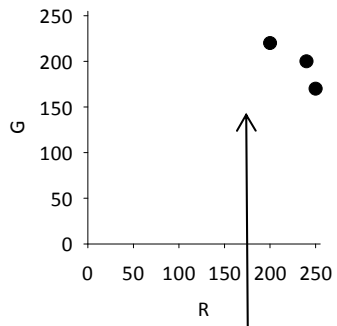
A kolokalizációs vizsgálatokat molekulák közötti kölcsönhatás bizonyítására használják.

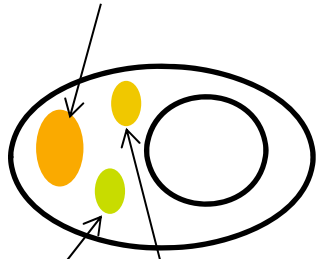
Mi a kolokalizáció?

Kolokalizáció: két fluoreszcens festékkel megjelölt minta esetében…

Hétköznapi definíció	**Tudományos definíció**
ha a két festék fluoreszcens jele ugyanott található	ha a két fluoreszcens jel közötti **korreláció** nagyobb, mint a véletlenszerű eloszlás esetén várható
Pl. egy vörös és zöld festékkel jelölt mintán sárga színű pixeleket látunk	







RGB: 250,170,0

RGB: 0,255,0

RGB: 255,255,0

RGB: 240,200,0

RGB: 200,220,0

RGB (red, green, blue) kód: 255,0,0

Bár a sárga szín alapján kolokalizáció feltételezhető, ezt a korreláció egyszerű vizsgálata nem támasztja alá.

Kvantitatív analízis szükséges.

Kolokalizáció kvantitatív analízisére használt módszerek

ICCB (intensity correlation coefficient-based)	**Objektum alapú analízis**
• Pearson korrelációs koefficiens • Manders koefficiens • Costes módszere • van Steensel módszere • Li módszere	Nehezebben klasszifikálható, kevésbé elterjedt, általában bonyolult.

A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy
S. Bolte, F.P. Cordelières
J. Microscopy, 224: 213-232 (2006)

ICCB 1: Pearson korrelációs koefficiens

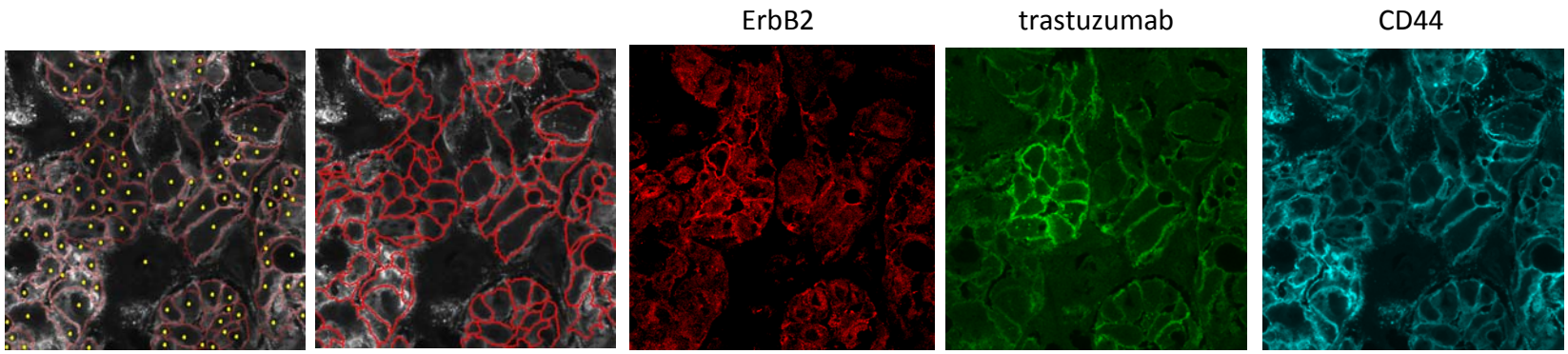
Karl Pearson (1857-1936) által bevezetett statisztika két változó (két fluoreszcencia intenzitás) közötti összefüggés vizsgálatára:

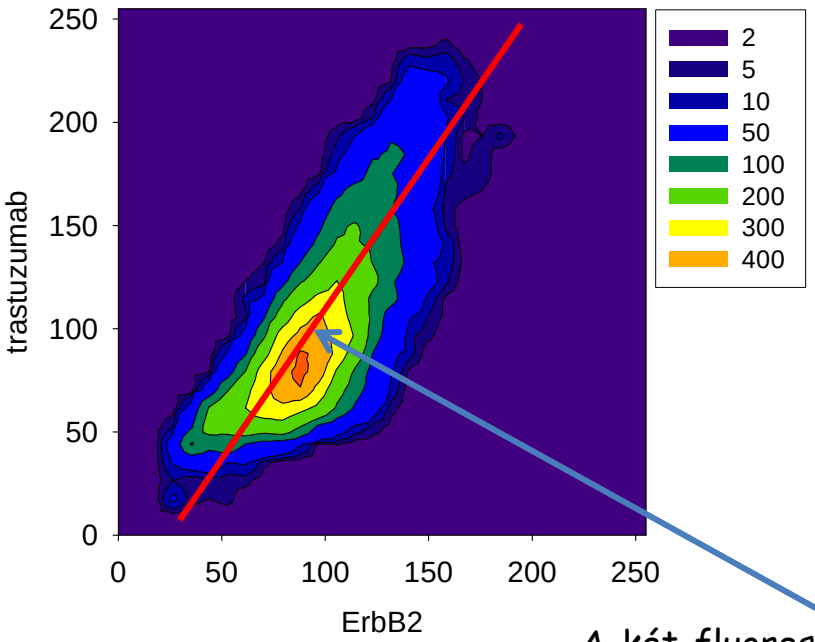
$$\rho = \frac{\operatorname{cov}(X,Y)}{\sigma_X \sigma_Y} = \frac{E\left[(X-\mu_X)(Y-\mu_Y)\right]}{\sigma_X \sigma_Y} = \frac{E(XY)-E(X)E(Y)}{\sqrt{E(X^2)-\left[E(X)\right]^2}\sqrt{E(Y^2)-\left[E(Y)\right]^2}}$$

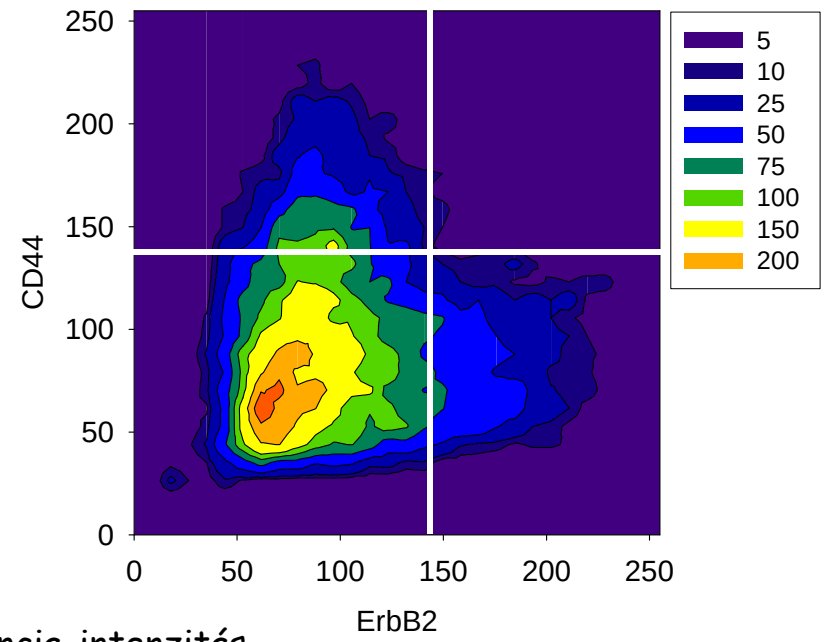
$$r = \frac{\sum_i (x_i-\bar{x})(y_i-\bar{y})}{\sqrt{\sum_i (x_i-\bar{x})^2}\sqrt{\sum_i (y_i-\bar{y})^2}} = \frac{n\sum_i x_i y_i - \sum_i x_i \sum_i y_i}{\sqrt{n\sum_i x_i^2 - \left(\sum_i x_i\right)^2}\sqrt{n\sum_i y_i^2 - \left(\sum_i y_i\right)^2}}$$

- A két változó közötti **LINEÁRIS** összefüggést vizsgálja, tehát azt adja meg, milyen jól lehet az ábrázolt x-y pontokra egy **EGYENEST** illeszteni.
- Értéke -1 és 1 között változik:
  - 1 – tökéletes lineáris korreláció
  - 0 – a lineáris korreláció teljes hiánya
  - -1 – tökéletes antikorreláció

A pixel intenzitások ábrázolása: pont ábra (dot plot), sűrűség ábra (density plot)

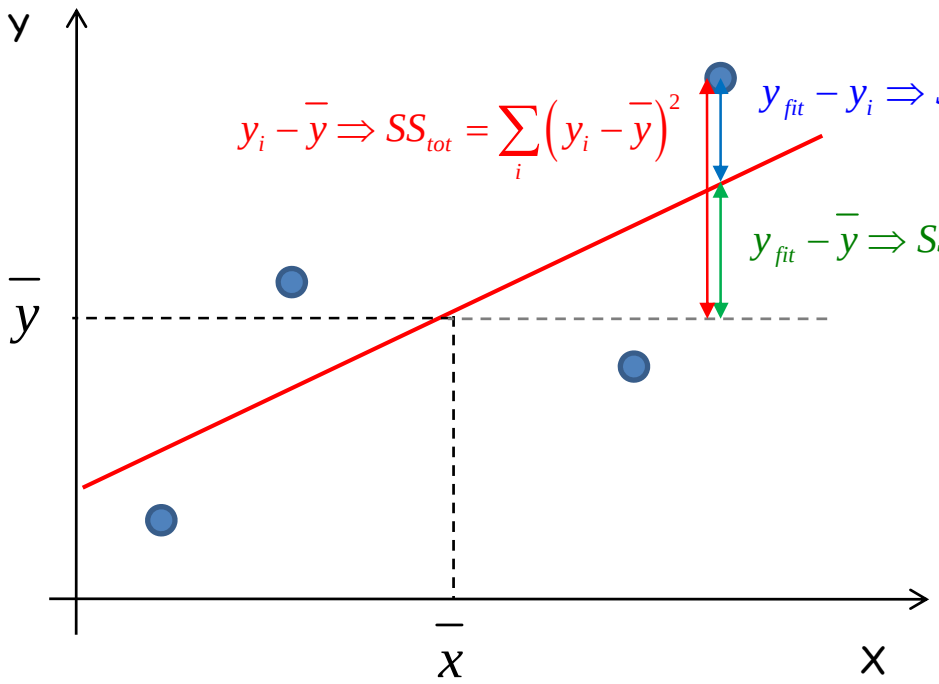






A két fluoreszcencia intenzitás egymás függvényében való ábrázolására illesztünk egyenest.

A Pearson korrelációs koefficiens tulajdonságai, problémái 1.



$$y_i - \bar{y} \Rightarrow SS_{tot} = \sum_i \left(y_i - \bar{y}\right)^2$$

$$y_{fit} - y_i \Rightarrow SS_{err} = \sum_i \left(y_{fit,i} - y_i\right)^2$$

$$y_{fit} - \bar{y} \Rightarrow SS_{reg} = \sum_i \left(y_{fit,i} - \bar{y}\right)^2$$

$$SS_{reg} + SS_{err} = SS_{tot}$$

Goodness of fit (coefficient of determination):

$$\frac{SS_{reg}}{SS_{tot}} = 1 - \frac{SS_{err}}{SS_{tot}} = r^2$$

A "goodness of fit" megadja, hogy a függő változó (y) varianciájának hány %-a magyarázható a független változó (x) változásával.

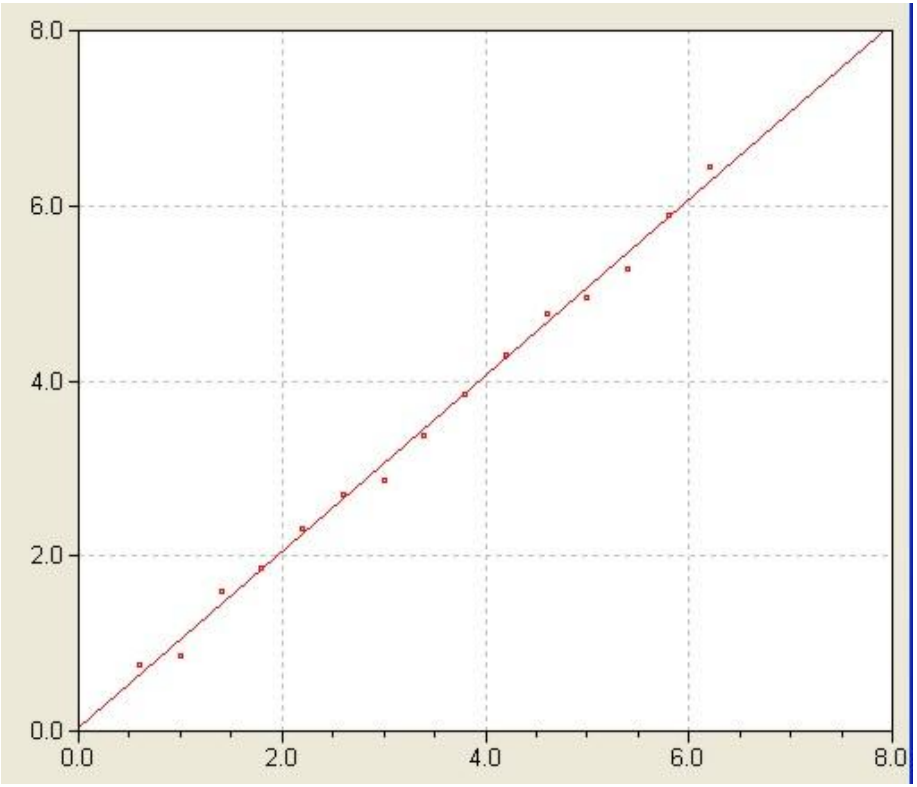
Pl.

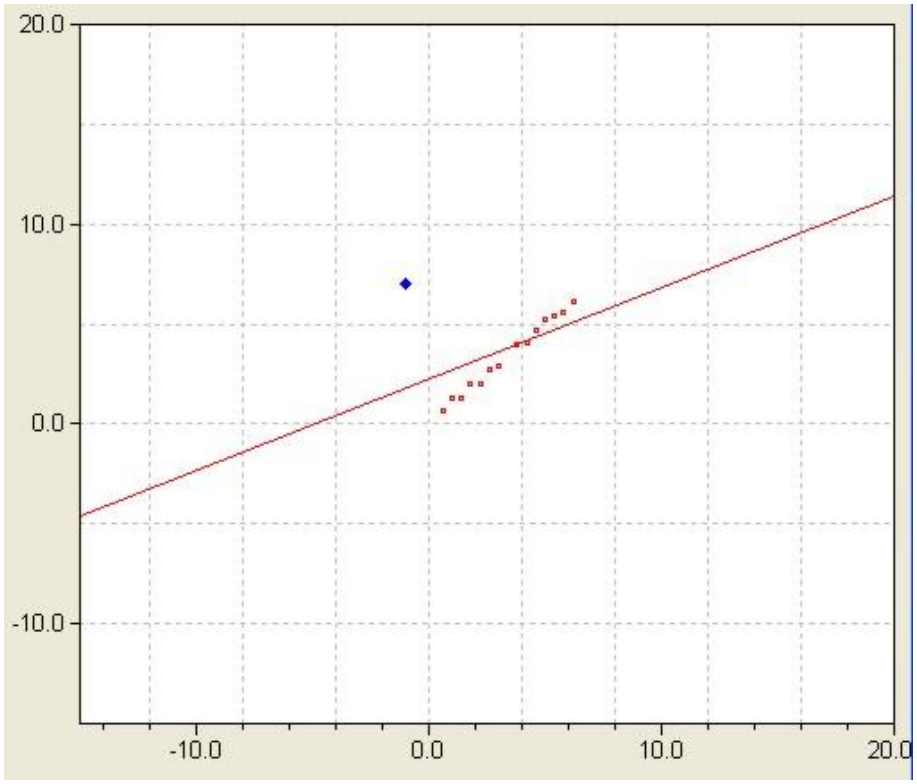
korrelációs koefficiens, r=0.7

$r^2 = 0.49$

Ezen viszonylag magas korrelációs koefficiens esetében is a függő változó varianciájának kb. 50%-a a hibából (SS_{err}) ered.

A Pearson korrelációs koefficiens tulajdonságai, problémái 2.



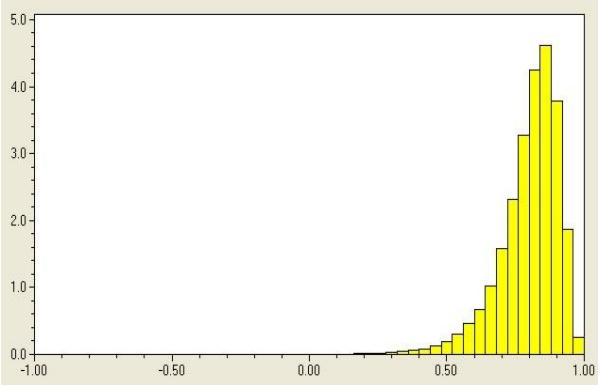


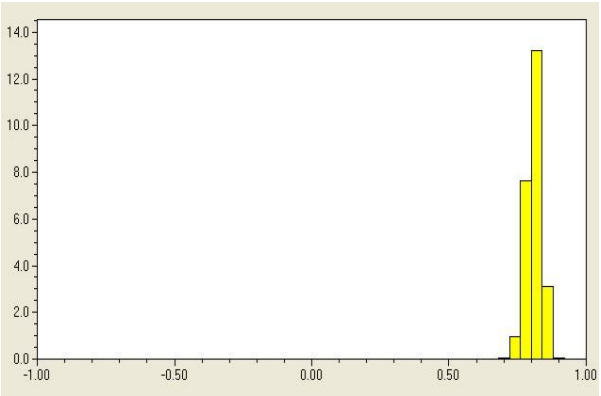
Egy kiugró érték is jelentősen rontja a korrelációt.

A Pearson korrelációs koefficiens tulajdonságai, problémái 3.

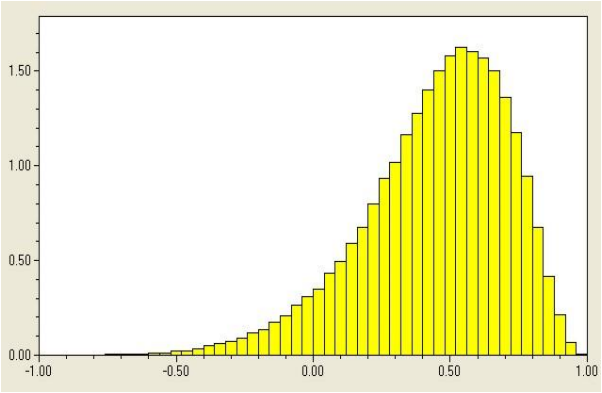
n=10 n=100

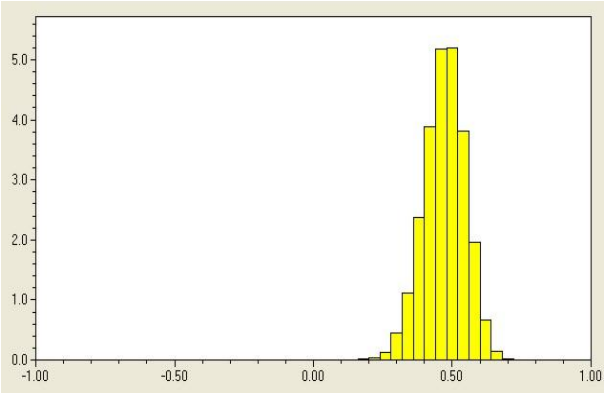
r=0.8



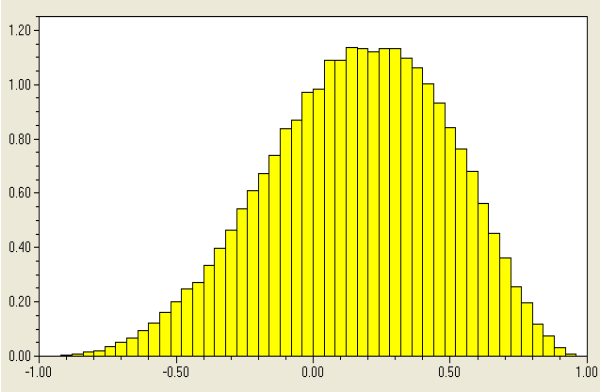


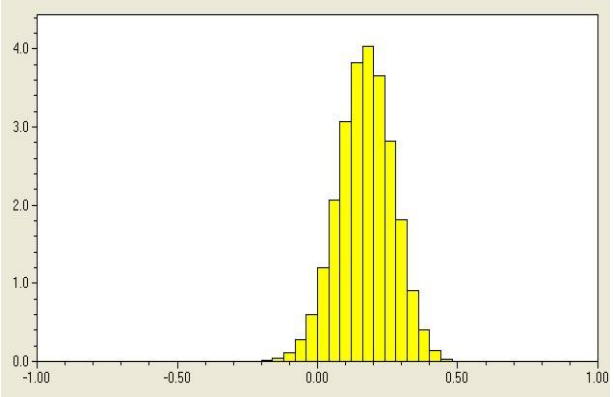
r=0.5





r=0.2

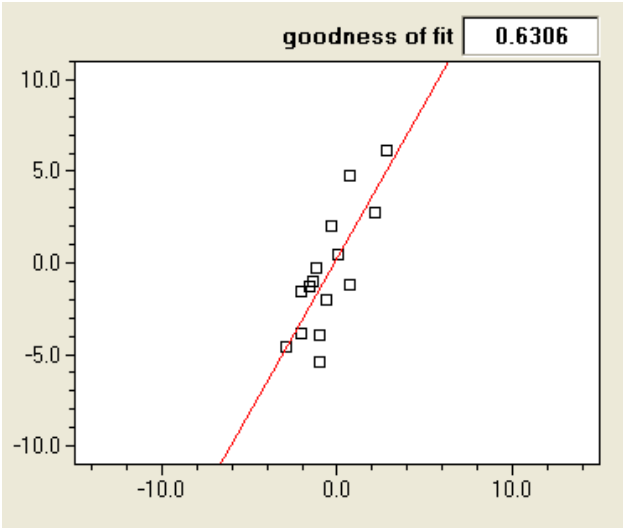


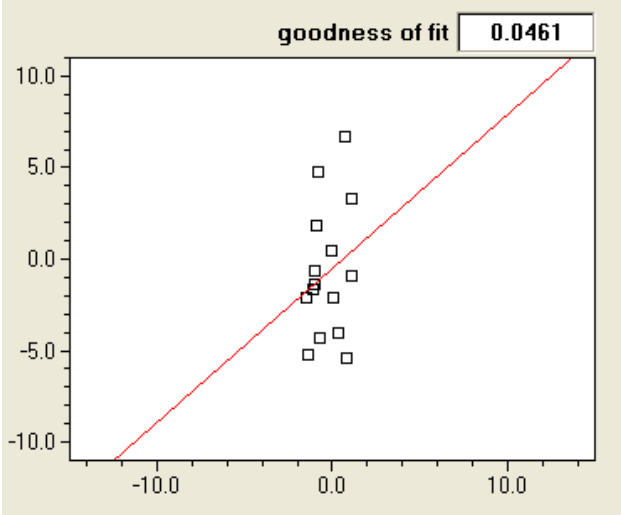


- A korrelációs koefficiensnek kis elemszám esetén nagy a szórása.
- Minél kisebb a korrelációs koefficiens, annál nagyobb a szórása.

Kis elemszám esetén kapott kis korrelációs koefficiens megbízhatatlan.

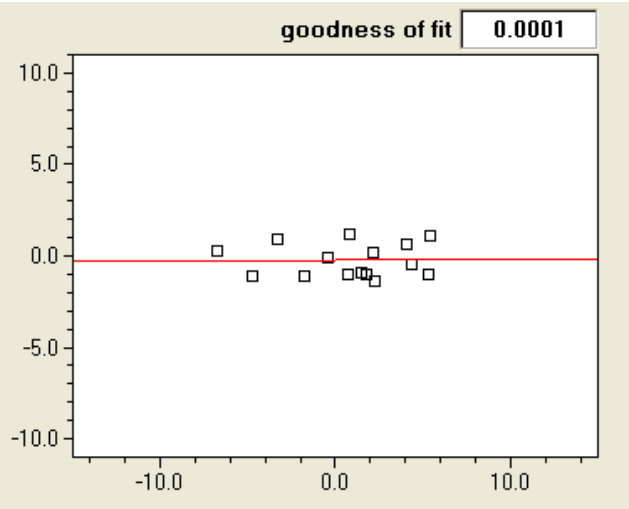
A Pearson korrelációs koefficiens tulajdonságai, problémái 4.

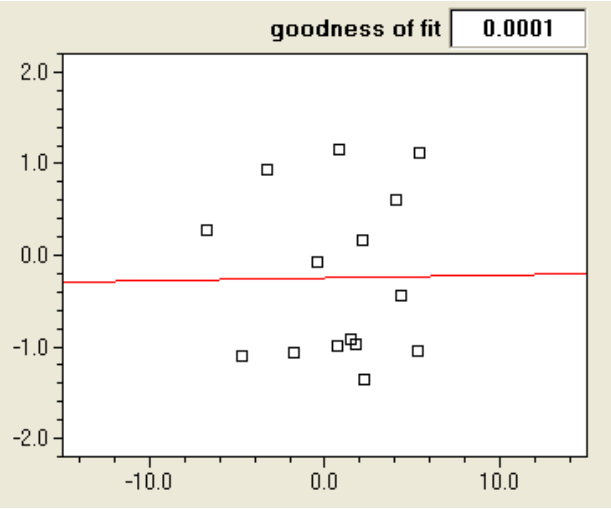




Ha $SD_x \ll SD_y$, akkor a korreláció nagyon erősen függ az x értékének kis ingadozásától.

A korrelációs koefficiens számításának csak akkor van értelme, ha az x és y változók varianciái hasonló nagyságrendűek.





Ha $SD_y \ll SD_x$, akkor az illesztés minősége (goodness of fit) rossz.

y tengely felnagyítása után látszik, hogy az illesztés az y varianciájának kis részét jósolja meg.

A Pearson korrelációs koefficiens tulajdonságai, problémái 5.

$$slope = r\frac{SD_y}{SD_x} \Rightarrow r = \boxed{slope}\frac{SD_x}{SD_y}$$

Ha a meredekség alacsony, a korrelációs koefficiens akkor is alacsony lesz, ha az egyenes illeszkedése tűrhető (feltéve, hogy SD_x/SD_y nem nagyon nagy).

Statisztikai tesztek a Pearson korrelációs koefficiensre

1. t-teszt

$$t_{n-2} = \frac{r\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

Nullhipotézis: ρ=0 (nincs lineáris korreláció)
Csak annak ellenőrzésére használható, hogy a korrelációs koefficiens nulla-e.

2. Fisher-féle z-transzformáció

A számolt korrelációs koefficienst (r) és a nullhipotézisben feltételezett korrelációs koefficienst (ρ) normál eloszlásúvá kell transzformálni:

$$z(r) = \frac{1}{2}\ln\left(\frac{1+r}{1-r}\right),\ z(\rho) = \frac{1}{2}\ln\left(\frac{1+\rho}{1-\rho}\right)$$

A z értékekre a következő statisztikát kell kiszámolni:

$$z = \frac{z(r) - z(\rho)}{\sqrt{\frac{1}{n-3}}}$$

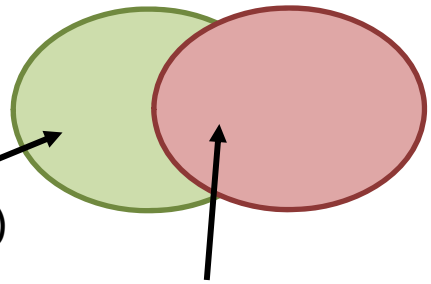
amely standard normális eloszlást mutat.

Nullhipotézis: r = ρ vagy r $\leq \rho$

ICCB 2: Manders koefficiens

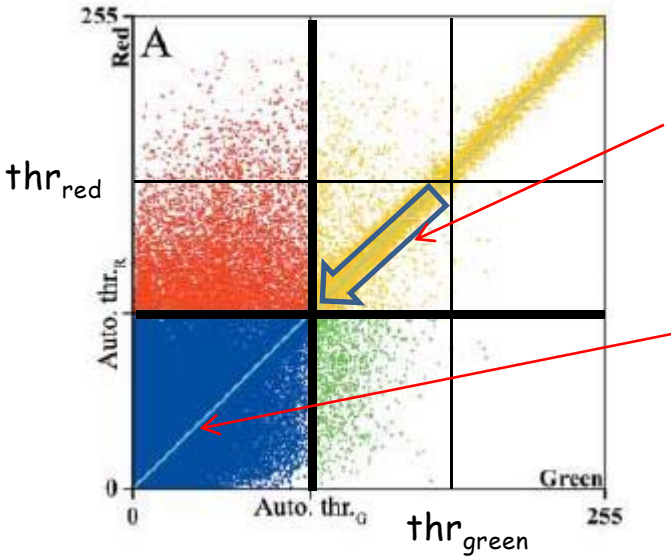
$$M_1 = \frac{\sum_{\text{küszöb fölött a vörös csatornában}} I_{zöld}}{\sum_{\text{összes pixel}} I_{zöld}}$$

$$M_2 = \frac{\sum_{\text{küszöb fölött a zöld csatornában}} I_{vörös}}{\sum_{\text{összes pixel}} I_{vörös}}$$



- értéke 0 és 1 között változik
- érzékeny a képekben levő zajra

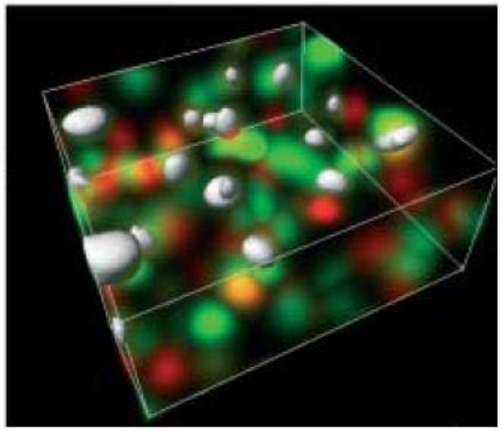
ICCB 3: Costes módszere

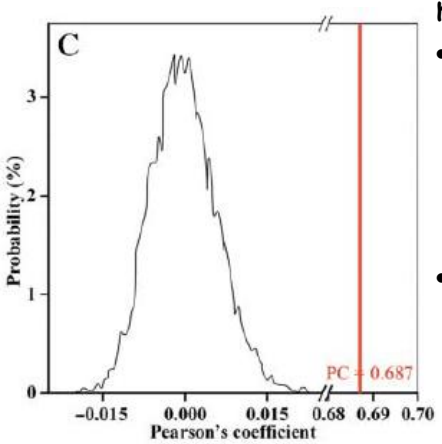


- A küszöböt addig csökkentik, amíg a nála alacsonyabb intenzitású pixelekre (kék terület) számolt korrelációs koefficiens nulla lesz.
- A sárga területen találhatók a kolokalizációt mutató pixelek.

$$I_{RED} = a\ I_{GREEN} + b$$

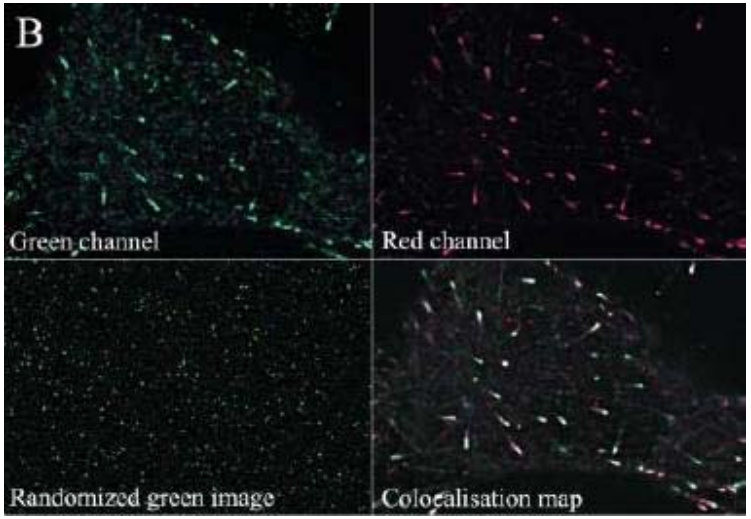
$$thr_{RED} = a\ thr_{GREEN} + b$$



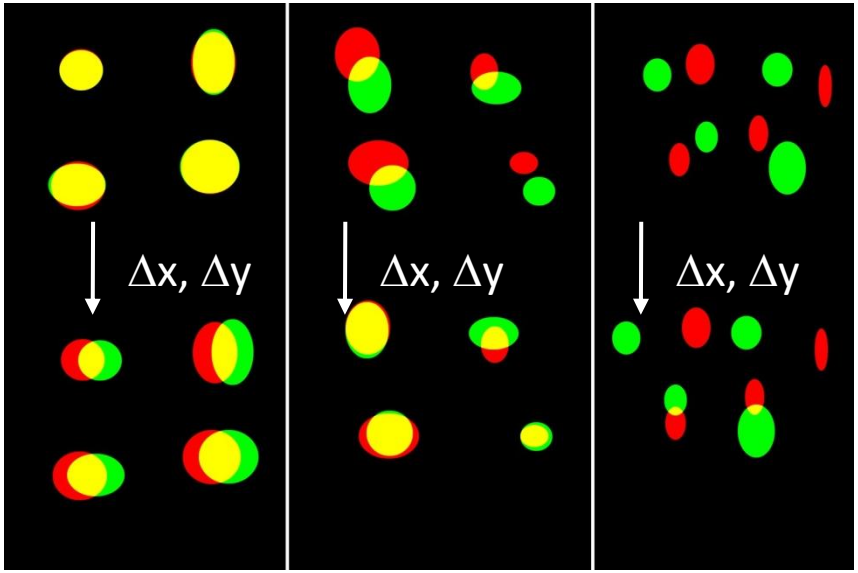


A korreláció szignifikanciájának meghatározása:

- Az egyik kép pixeleit véletlen-szerűen újrarendezik, és az így létrejött („scrambled") és a másik kép között kiszámolják a korrelációs koefficienst.
- A fenti eljárást több százszor elvégezve előállítják a korrelációs koefficiens eloszlását korrelációt nem mutató random képekre.
- Ha az eredeti képre kapott korrelációs koefficiens az eloszlás 95%-os konfidencia intervallumán kívül van, akkor szignifikáns a korreláció.



ICCB 4: van Steensel módszere

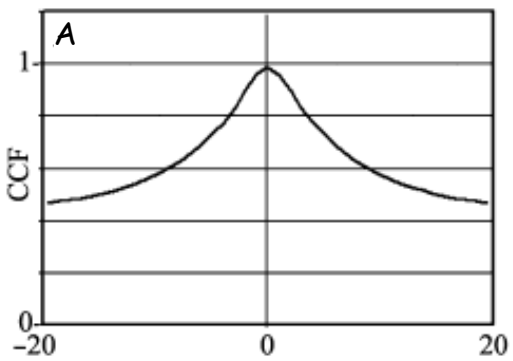


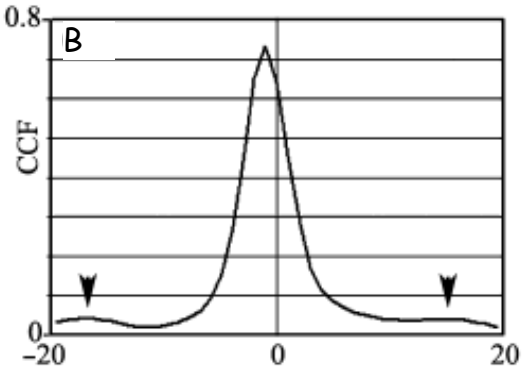
A. teljes kolokalizáció

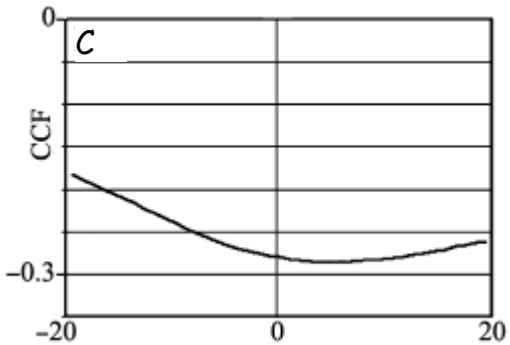
B. részleges kolokalizáció

C. exklúzió

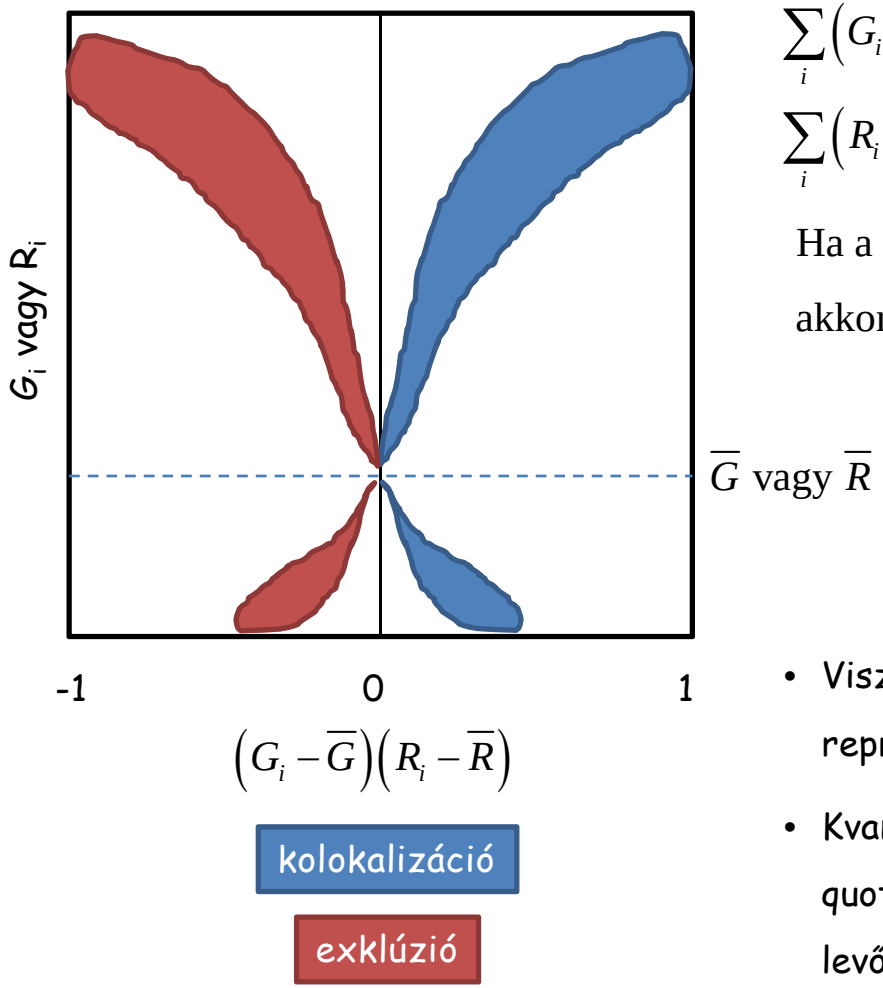
- A zöld képet *x* és *y* irányban elmozdítják a vörös képhez képest.
- Minden lépés után kiszámítják a korrelációs koefficienst (CCR – cross-correlation coefficient)
- Kolokalizációnál az várható, hogy a korreláció csökken (a sárga terület aránya) az elmozdítással.







ICCB 5: Li módszere



$$\sum_i \left(G_i - \overline{G}\right) = 0$$

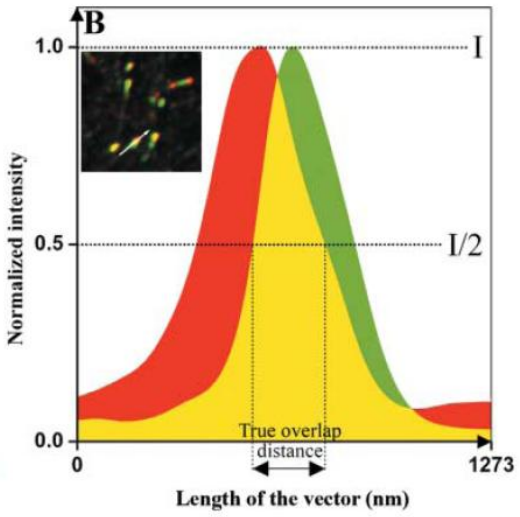
$$\sum_i \left(R_i - \overline{R}\right) = 0$$

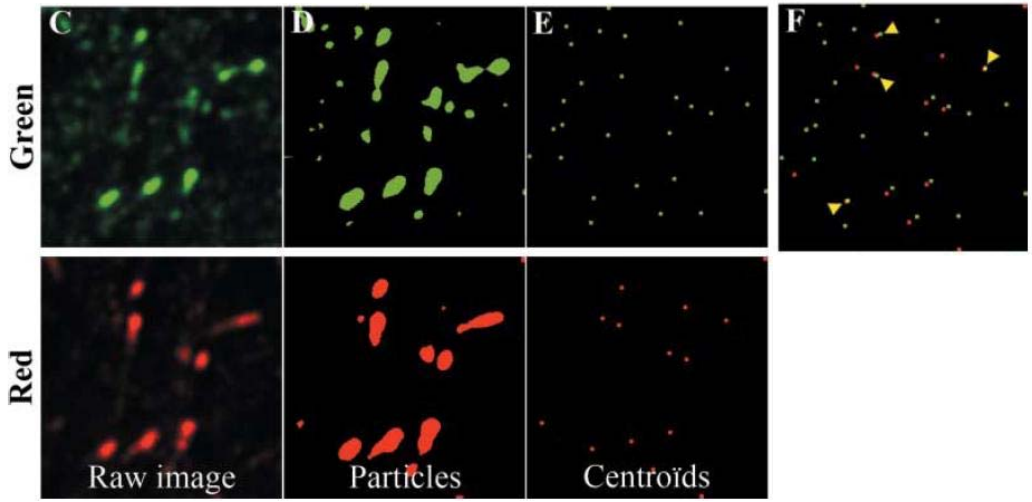
Ha a G_i ott tér el a $\overline{G}$-tól, ahol az R_i eltér az $\overline{R}$-tól (korreláció), akkor a $\sum_i \left(G_i - \overline{G}\right)\left(R_i - \overline{R}\right)$ értéke pozitív lesz.

- Viszonylag könnyen értelmezhető grafikus reprezentációt nyújt a kolokalizációról.
- Kvantitatív kiértékelés: ICQ – intensity correlation quotient (a vízszintes tengely pozitív tartományában levő pixelek aránya az összes pixelhez képest).

Objektum alapú kolokalizáció analízis

- Első lépése minden esetben mindkét kép szegmentálása, azaz a háttér és az objektumok (background, foreground) elkülönítése: minden pixelt vagy a háttérhez vagy az objektumokhoz rendelnek.
- A szegmentálást követően az objektumok különböző paramétereit vizsgáljuk:



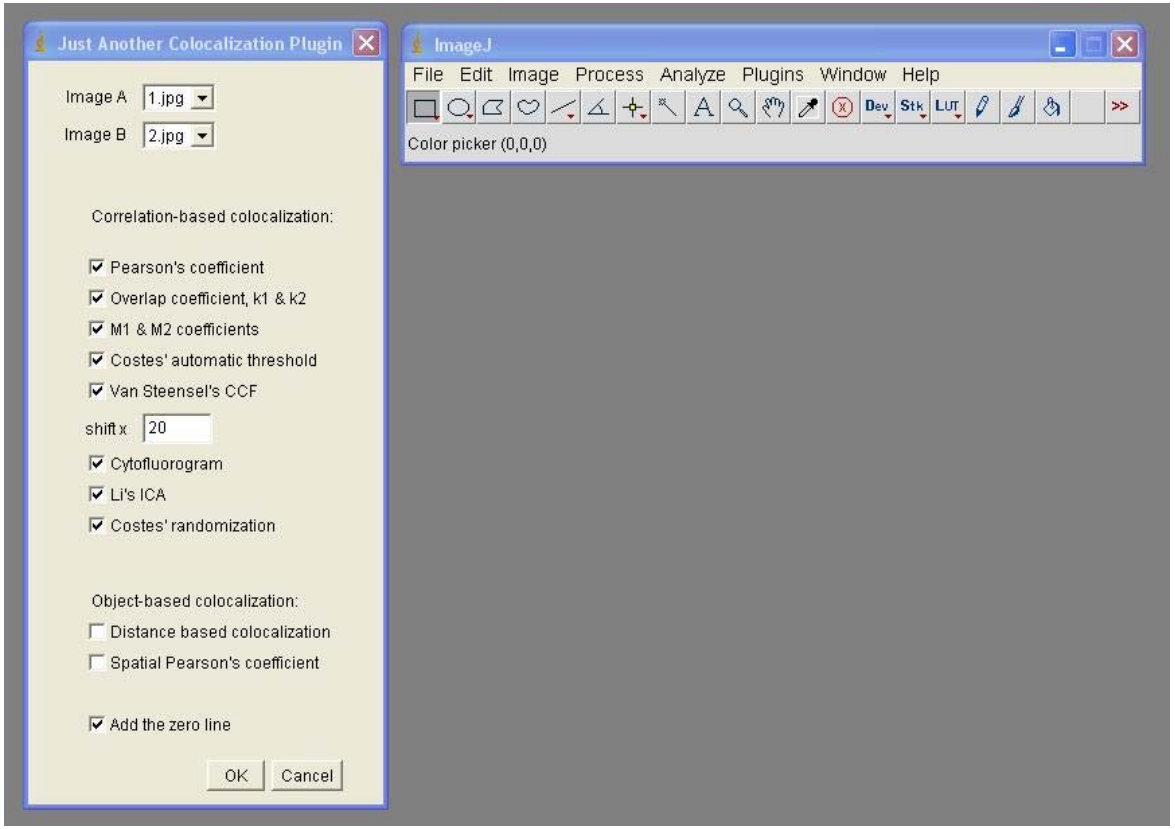


- Meghatározzuk az objektumokon keresztül húzott vonal menti normalizált intenzitás-profilt.
- Ha azon rész hossza, amelynél mindkét normalizált intenzitás $\frac{1}{2}$-nél magasabb („true overlap distance"), meghaladja a mikroszkóp feloldóképességét, kolokalizációt állapíthatunk meg.

- A vörös és zöld képeken meghatározzuk az objektumok centroidjait (súlypont vagy intenzitással súlyozott súlypont).
- Ha egy vörös és zöld centroid a mikroszkóp optikai feloldóképességénél kisebb távolságra van (sárga nyilak az F ábrán), akkor kolokalizációt állapítunk meg.

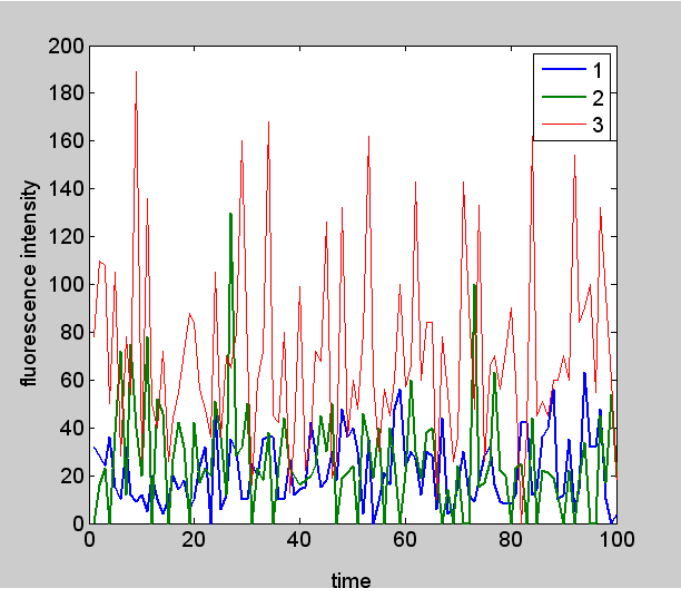
Milyen programmal lehet kolokalizációt számolni?

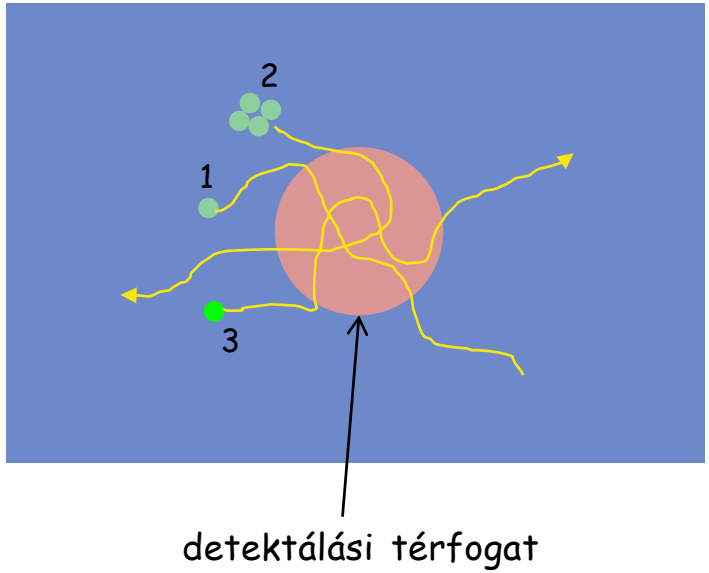
- Image J, JaCoP (Just Another Colocalization Plugin) és más plugin-ek (http://rsb.info.nih.gov/ij)
- Matlab, stb, stb…



Korrelációs spektroszkópiai módszerek molekuláris asszociációk vizsgálatára 1.

- Korrelációs spektroszkópia alapelve (a molekuláris asszociációk vizsgálata szempontjából): egy pixelben a fluoreszcencia intenzitás fluktuációjának nagysága (varianciája, ill. a fotonszámok eloszlása) összefüggésben van a diffundáló egységek fluoreszcencia intenzitásával.

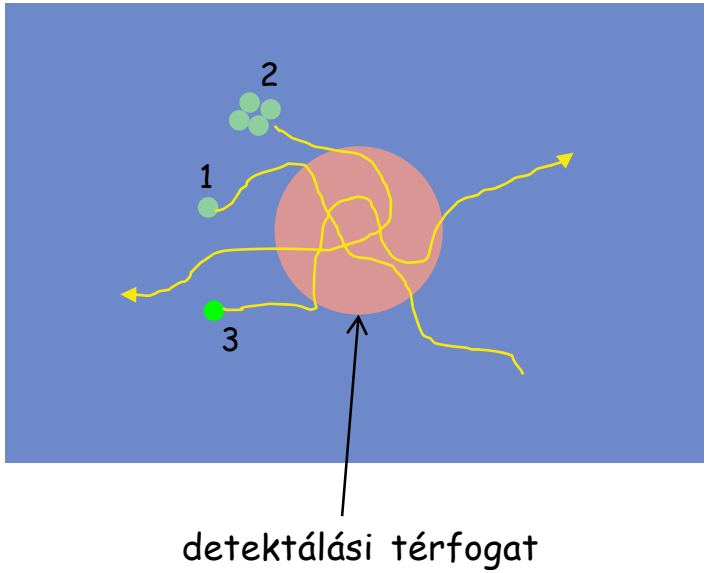




	átlag	variancia
1 – halvány részecske, c_1	21.9	204.6
2 – halvány részecske tetramer, $c_1/4$	25.8	510.4
3 – 3x fényesebb részecske, c_1	70.2	1520.6

Korrelációs spektroszkópiai módszerek molekuláris asszociációk vizsgálatára 2.

- Pixel tartózkodási idő (pixel dwell time): az az idő, amely alatt a mikroszkóp egy pixelből a fotonokat detektálja.
- Molekuláris fényesség (molecular brightness, ε): egy diffundáló egységből detektált, emittált fotonok száma a pixelidő alatt.



$$\varepsilon_2 = 4\varepsilon_1$$

$$\varepsilon_3 = 3\varepsilon_1$$

A klaszterméret meghatározásához a monomer molekuláris fényességét ismerni kell.

a variancia vagy a fotonszám eloszlás meghatározása

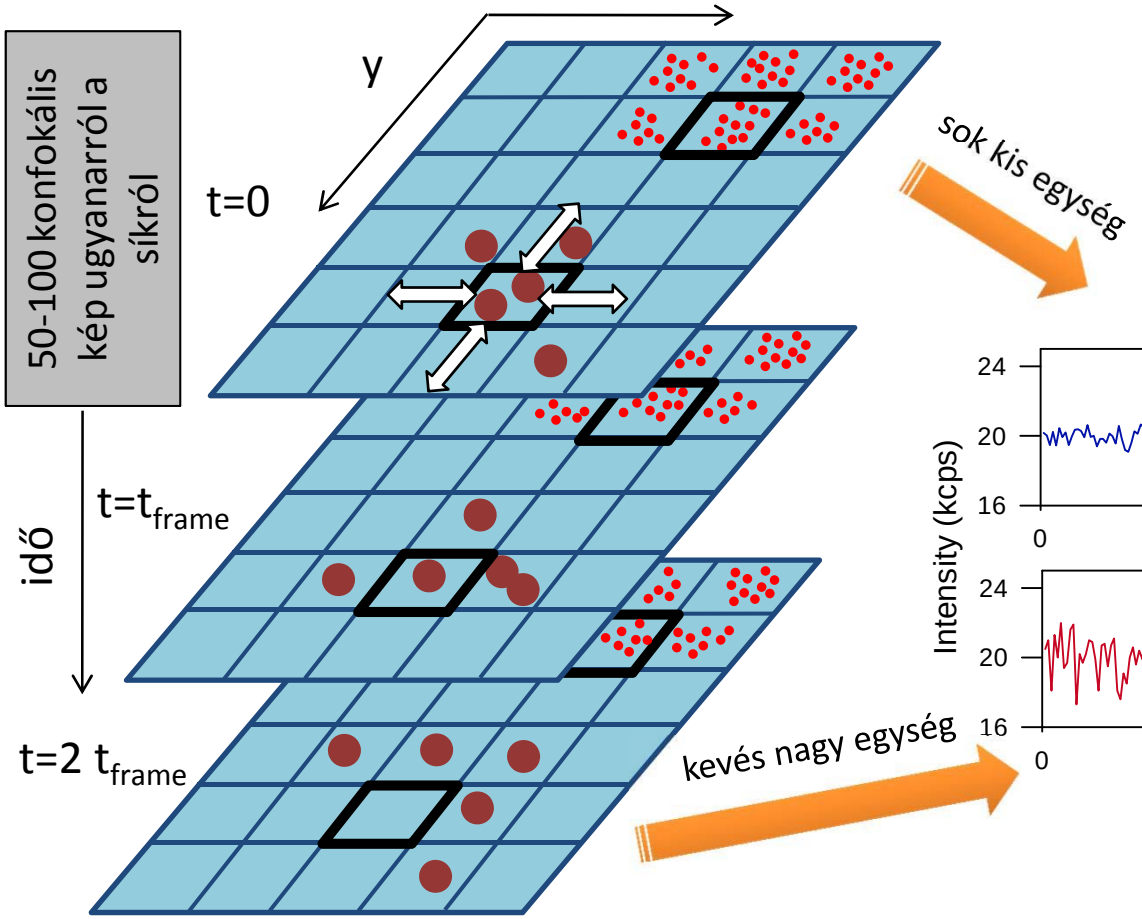
↓

molekuláris fényesség meghatározása

↓

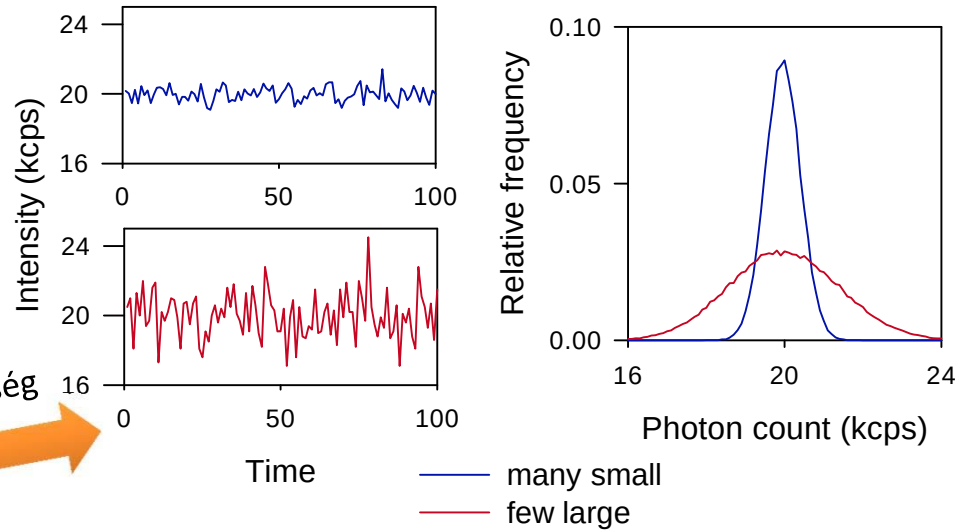
a monomer molekuláris fényesség ismeretében az asszociáció fokának meghatározása

Number and brightness analysis (N&B)



Molekuláris fényesség (molecular brightness): egy diffundáló egység által a pixel tartózkodási idő (dwell time) alatt emittált és detektált fotonok száma.

kis variancia



nagy variancia

Digman, M. A., R. Dalal, A. F. Horwitz, E. Gratton. (2008) Biophys J 94:2320-2332.

N&B analízis: a variancia forrása

A részecskeszám fluktuációja miatti variancia:

$$\sigma_n^2 = \varepsilon^2 n$$

A fotonszám-ingadozás miatti variancia:

$$\sigma_d^2 = \varepsilon n$$

Háttér info:

$$\sigma(k \cdot x) = k \cdot \sigma(x) \Rightarrow \sigma^2(k \cdot x) = k^2 \cdot \sigma^2(x)$$

n – molekulák átlagos száma egy pixelben

n – molekulák átlagos száma

A molekulaszám Poisson eloszlást mutat, átlaga és varianciája ***n***. Mi azonban a fotonokat detektáljuk.

$$\sigma^2(\textit{fotonszám}) = \sigma^2(\varepsilon \cdot N) =$$

$$= \varepsilon^2 \cdot \sigma^2(N) = \varepsilon^2 \cdot n$$

N - molekulák pillanatnyi száma

nε – átlagos fotonszám

Mivel a fotonszám Poisson eloszlást mutat, aminek átlaga és varianciája megegyezik, ezen komponens varianciája szintén ***nε***

a molekulaszám fluktuáció miatti variancia

$$B = \frac{\sigma^2}{\langle k \rangle} = \boxed{\frac{\sigma_n^2}{\langle k \rangle}} + \boxed{\frac{\sigma_d^2}{\langle k \rangle}} = \frac{\varepsilon^2 n}{\varepsilon n} + \frac{\varepsilon n}{\varepsilon n} = \varepsilon + 1$$

foton statisztika

$$N = \frac{\langle k \rangle^2}{\sigma^2} = \frac{\varepsilon n}{\varepsilon + 1}$$

σ – pixel variancia
⟨k⟩ – átlagos pixel intenzitás
n – a betöltési szám várható értéke
B – látszólagos fényesség (count/dwell time/mol)
N – molekulák látszólagos száma
ε – molekuláris fényesség

Ha σ_n=0 (tehát a molekulák száma nem fluktuál, immobilis molekulák):

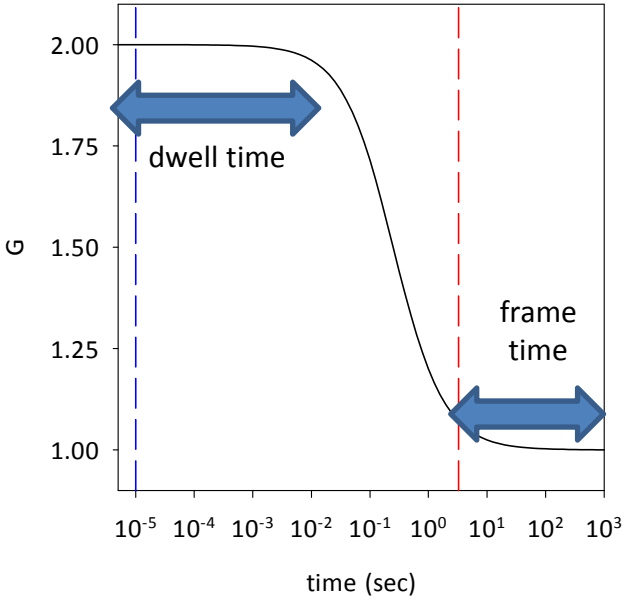
$$B = \frac{\sigma^2}{\langle k \rangle} = \frac{\sigma_d^2}{\langle k \rangle} = \frac{\varepsilon n}{\varepsilon n} = 1$$

- Immobilis molekulák látszólagos fényessége 1, függetlenül a molekuláris fényességtől.
- A N&B módszer használhatóságának feltétele az, hogy a molekulák mobilisek legyenek (mert egyébként B=1).

N&B analízis: a pixel tartózkodási idő és a teljes kép-idő megválasztása

Feltételek a

- pixel tartózkodási időre: ne legyen átlagolódás
- képfelvételi időre: ugyanazon pixel egymást követő két detektálása független legyen (elég hosszú idő teljen el közöttük)



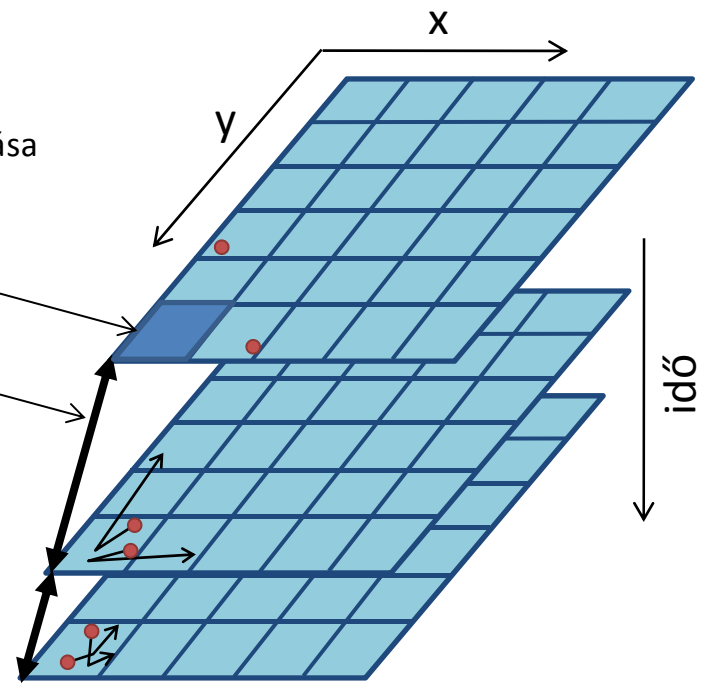
G(D=10^-10cm2/sec)
dwell time, 10 µs
resampling time, 3.3 s

$$\tau_D = \frac{\omega^2}{4D}$$

τ_D - diffusional correlation time

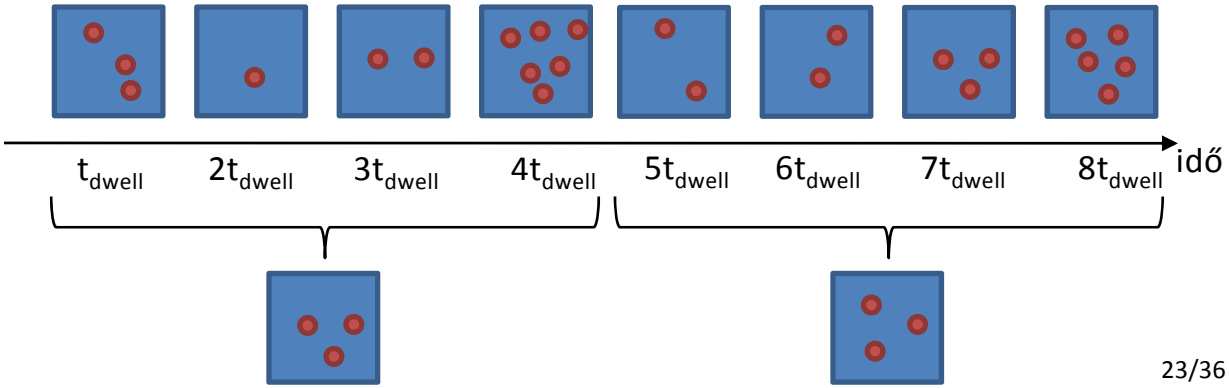
ω - radius of confocal detection volume

D - diffusion constant



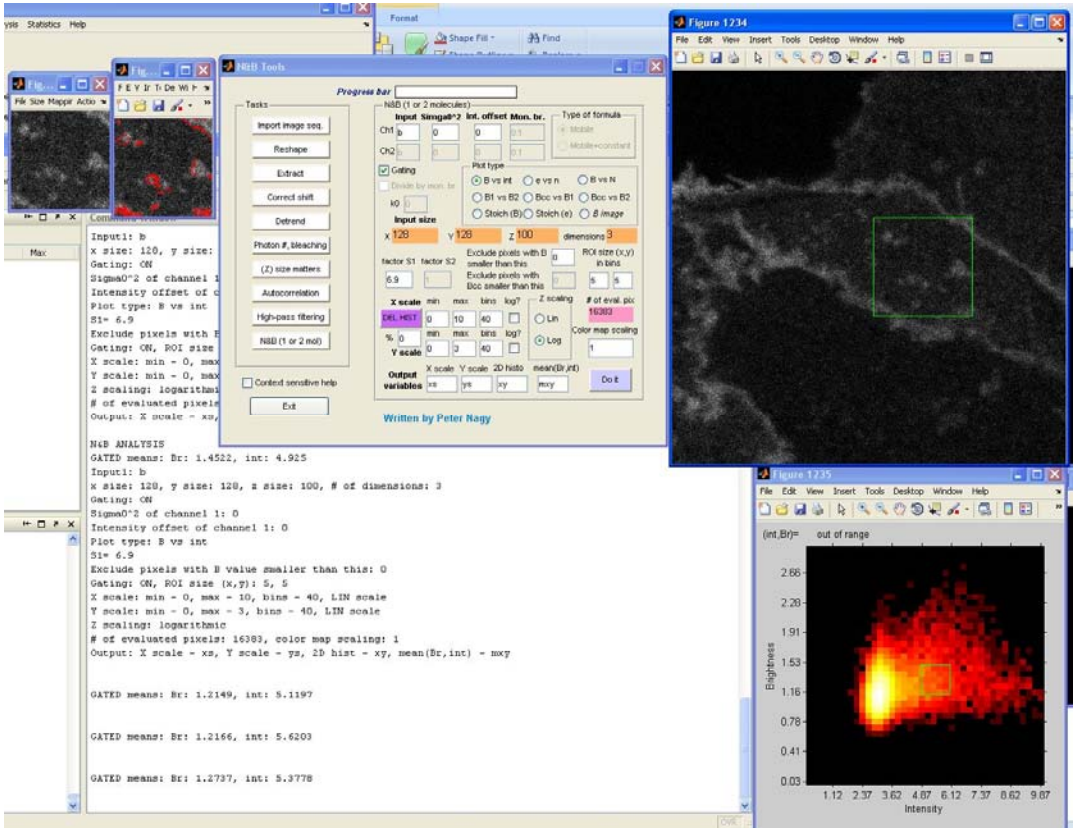
Rövid kép-idő esetén majdnem ugyanazok a molekulák vannak a pixelben az egymást követő mérések során → nem független, ami a Poisson statisztika feltétele

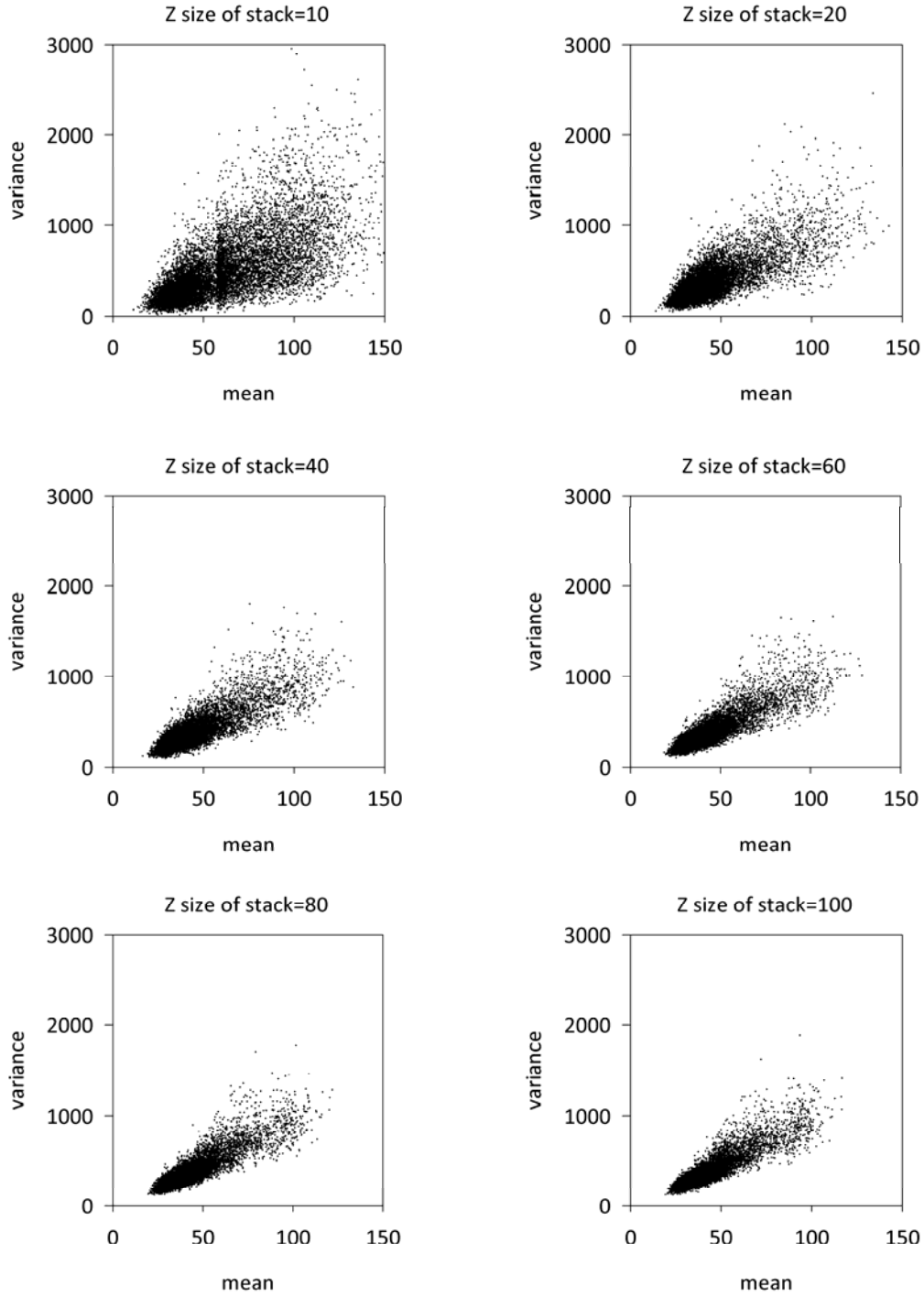
Ha a felső sorban látható pixeleket 4x hosszabb ideig detektáljuk, a részecskeszám változások kiátlagolódnak.



N&B mérések, kiértékelés

- Mérés kivitelezése: feltétel olyan mikroszkóp, amely fotonszámláló detektorral rendelkezik. Kalibráció után analóg detektorral rendelkező mikroszkópon is kivitelezhető.
- Kiértékelés: speciális, erre a célra kifejlesztett szoftverrel:
  - Globals, más néven SimFCS, http://www.lfd.uci.edu/globals/
  - Matlab, N&B Tools
- A kiértékelés a sejt minden pixelére megadja a molekulaszámot és a molekuláris fényességet.
- Kevert molekulapopuláció esetén (pl. 50% monomer, 50% dimer) az egyes klasztertípusok arányának kiderítése csak korlátozottan lehetséges.



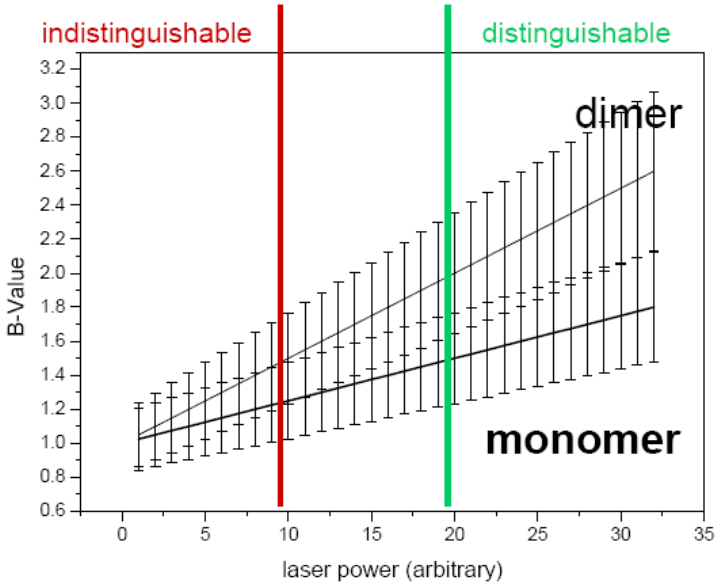


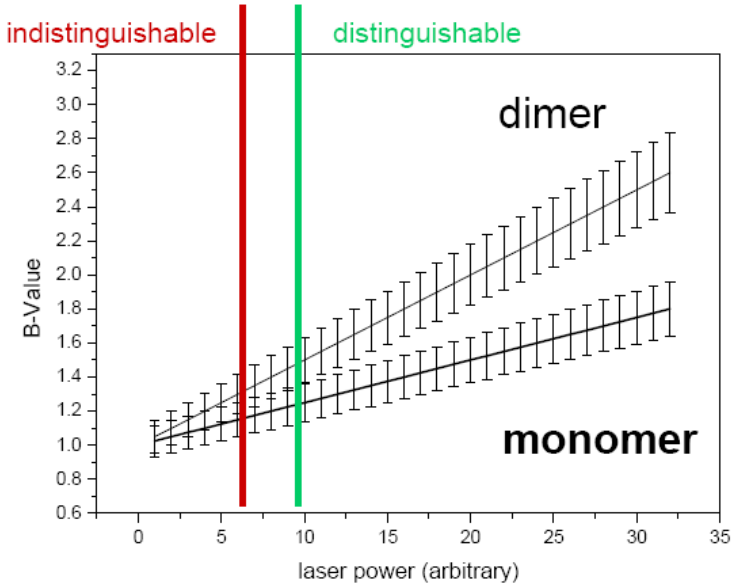
N&B mérések hibája 1: a képek száma.

A varianciának az átlaggal egyenesen arányosnak kell lennie.

Ez a zaj miatt csak akkor valósul meg, ha elég nagyszámú képet veszünk fel.

N&B mérések hibája 2: a képek száma.





N&B mérések hibája 3: immobilis molekulák.

Ha immobilis molekulák vannak jelen, pixelenkénti molekulaszámuk nem fog változni, azaz az ő σ_n^2 hozzájárulásuk a teljes varianciához nulla:

$$B^* = \frac{\sigma^2_{n,mobile} + \sigma^2_{d,mobile} + \sigma^2_{d,immobile}}{k_{mobile} + k_{immobile}} \quad \left(\sigma^2_{n,immobile} = 0\right)$$

$$B^* = \frac{\sigma^2_{n,mobile} + \sigma^2_{d,total}}{k_{total}} = \frac{f_M \sigma^2_{n,total} + \sigma^2_{d,total}}{k_{total}} \quad \left(\text{a variancia additív, } f_M - \text{ mobilis molekulák aránya}\right)$$

$$B^* = \frac{f_M n_{total} \varepsilon^2 + n_{total} \varepsilon}{n_{total} \varepsilon} = 1 + f_M \varepsilon$$

A mért látszólagos fényesség (B^*) kisebb immobilis molekulák jelenlétében.

$$B = 1 + \frac{B^* - 1}{f_M}$$

N&B mérések hibája 4: photobleaching, stage shift.

A mozdulatlan komponensek photobleaching-je, minta mozgás (stage shift):

egy új tagot eredményeznek a varianciában → a variancia és a „brightness" növekszik.

Megoldás: az adatsoron felül áteresztő szűrő (high-pass filter) alkalmazása, amivel az alacsony frekvenciájú (lassú) változásokat eliminájuk.

A mozgékony komponensek photobleaching-je:

általában elhanyagolhatónak tételezik fel azért, mert a photobleachelt mobilis molekulák helyére nem photobleacheltek érkeznek.

Ha a helyettesítés nem történik meg, akkor a varianciát és a „brightness"-t alulbecsüljük.

N&B: az S faktor (intenzitás egység/foton) meghatározása

- Sok fotonszámláló mikroszkóp sem valódi fotonszámokat ad meg, hanem a fotonszámmal arányos intenzitás egységet („pseudo photon counting").
- Az intenzitás egységet a fotonszám szerint kalibrálni kell:

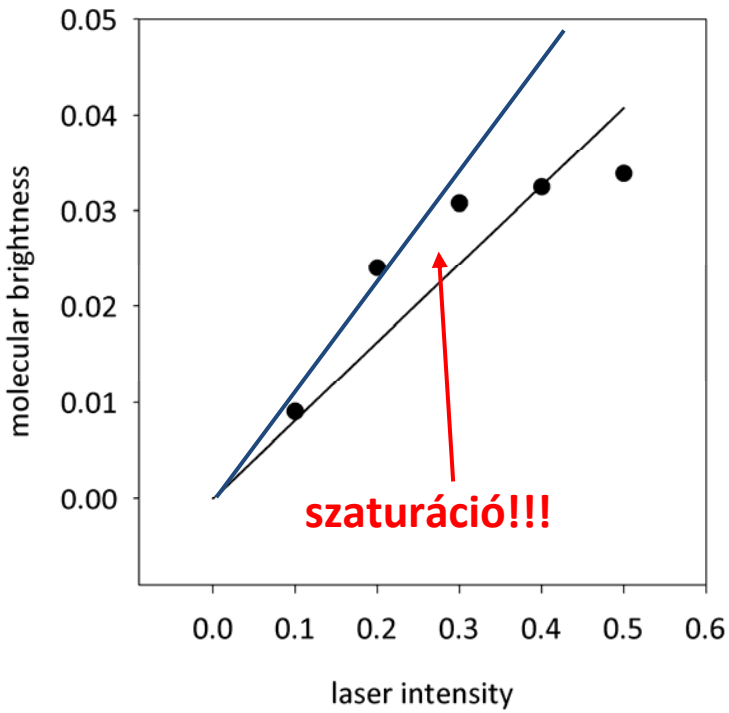
$$fotonszám = \frac{intenzitás\ egység}{S}$$

Immobilis részecskéket tartalmazó pixelek segítségével:
Mivel az immobilis részecskék látszólagos fényessége (*B*) egy, olyan *S* faktort kell keresni, amivel ez teljesül.

A lézer intenzitás változtatásával:
A molekuláris fényességnek (ε=*B-1*) egyenesen arányosnak kell lennie a lézer intenzitásával:
$\varepsilon \sim$lézer intenzitás (I_L)
$\varepsilon = a\ I_L$, ahol *a* egy állandó.
Ez akkor teljesül, ha az ε vs. I_L ábrára illesztett egyenes tengelymetszete nulla. Olyan *S* faktort kell találni, aminél ez teljesül.

A detektor szaturációja esetén a variancia-átlag intenzitásra megfogalmazott feltevések nem érvényesek.

N&B mérést csak nem telített detektorral lehet végezni.

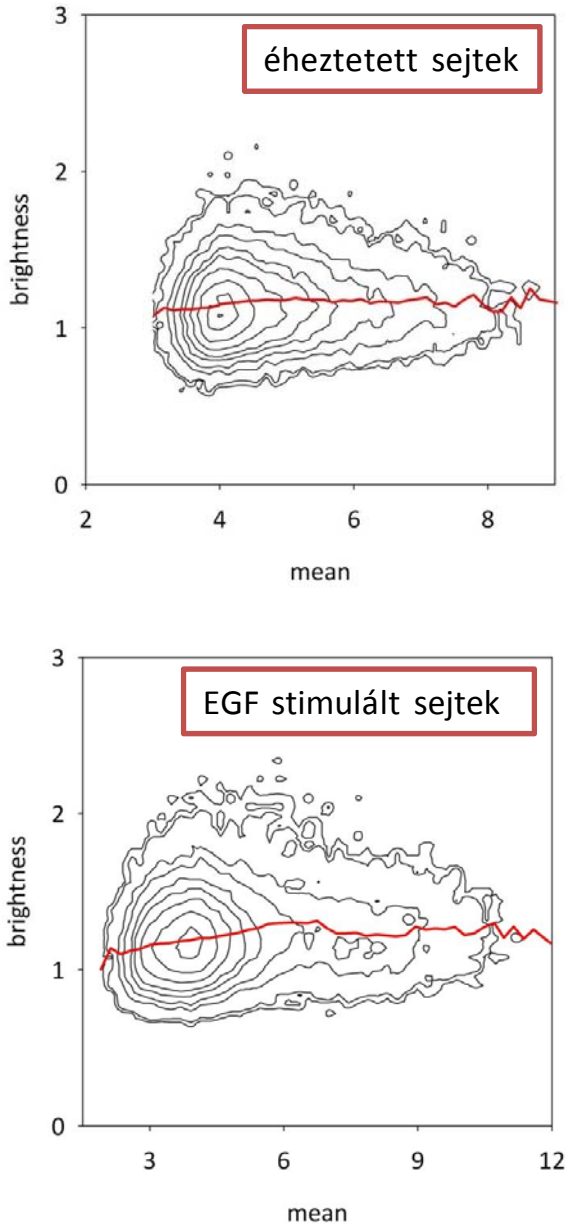


S=6.93 (mindkét módszer szerint, illesztés az első 2 pontra→kék vonal)

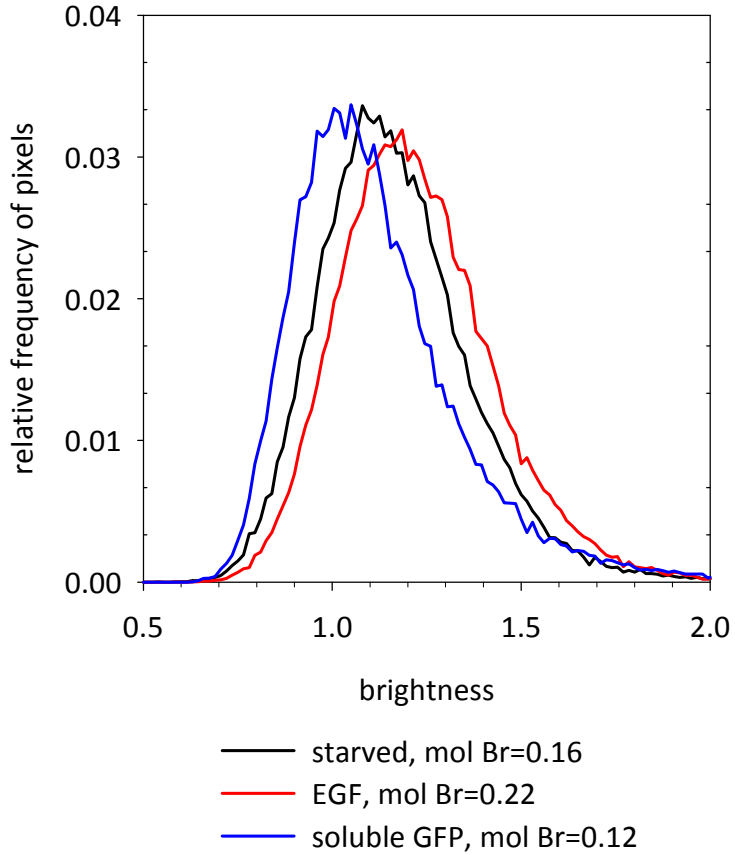
N&B analízis: milyen *B* értékeket várhatunk?

Beállítás	*B* értékek		Megjegyzés
	eGFP	Alexa	
max. lézer teljesítmény, hosszú dwell time (50 μs)	1.25	6	gyors fotobleaching, fototoxicitás
közepes lézer teljesítmény, közepes dwell time (32 μs)	1.08	2.6	jó kompromisszum
alacsony lézer teljesítmény, rövid dwell time (4 μs)	1.002	1.04	*B* túl alacsony

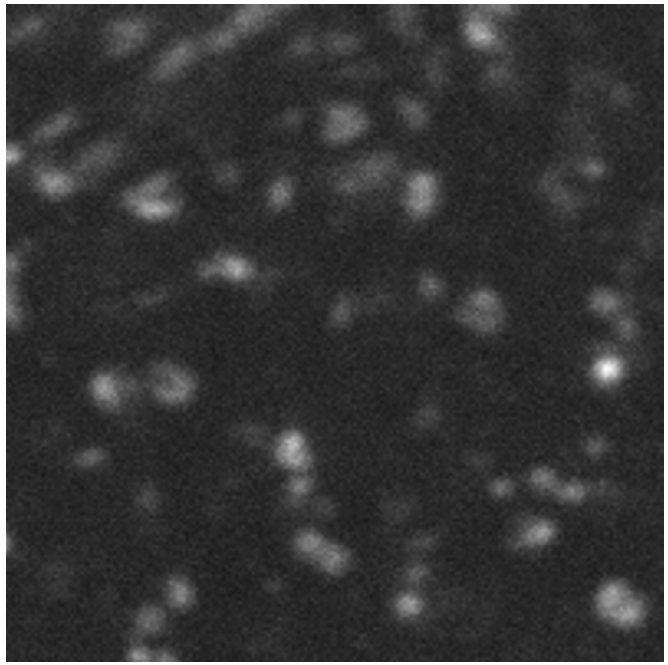
N&B mérések EGFR-eGFP receptort expresszáló sejteken



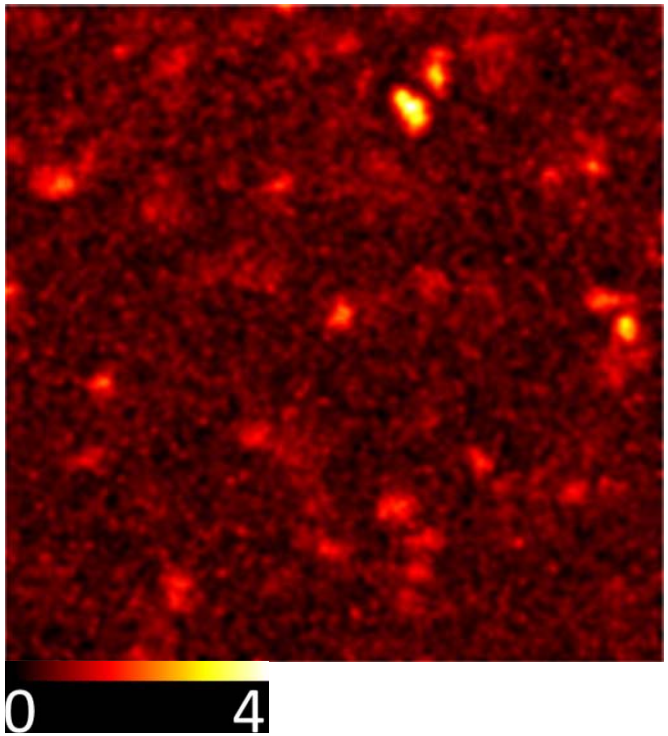
F1-4 sejtek: CHO sejtek, melyek ~6×10^5 EGFR-eGFP/sejt-tel lettek stabilan transzfektálva



N&B mérések EGFR-eGFP receptort expresszáló sejteken



Fluoreszcencia intenzitás



Látszólagos fényesség (*B*)

N&B: előnyök és hátrányok

Előny:
- egyszerű, az eredmények értelmezése magától értetődő
- szinte minden mikroszkóppal megvalósítható (bár fotonszámláló mikroszkóp a preferált)

Hátrány:
- csak mobilis molekulákat detektál
- minden olyan folyamat, amely a varianciát módosítja (pl. molekuláris „blinking", photobleaching) zavarja a mérést
- kevert molekula populációk zavarják a mérést, ill. az eredmények értelmezését

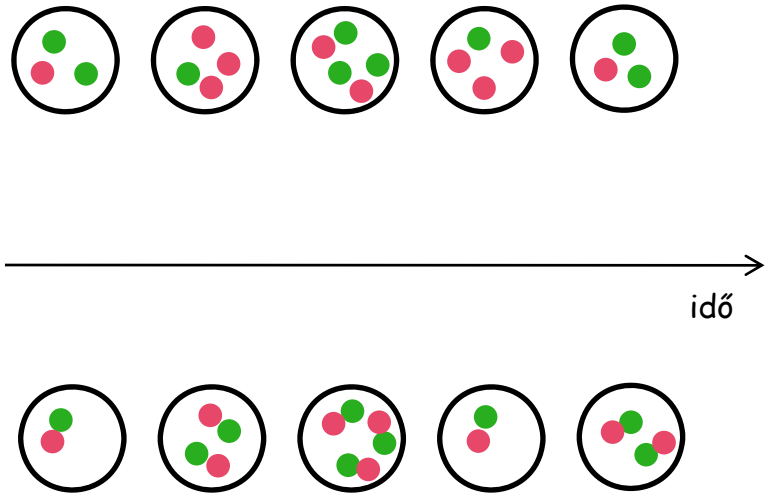
Célszerű figyelembe venni:
- használjunk alacsony lézer intenzitást (a szaturáció és a photobleaching elkerülése miatt)
- vegyünk fel sok képet
- kalibráljuk az „S" faktort (pszeudo-fotonszámláló detektor esetében)
- használjunk megfelelő „dwell time" és „repetition time" beállításokat

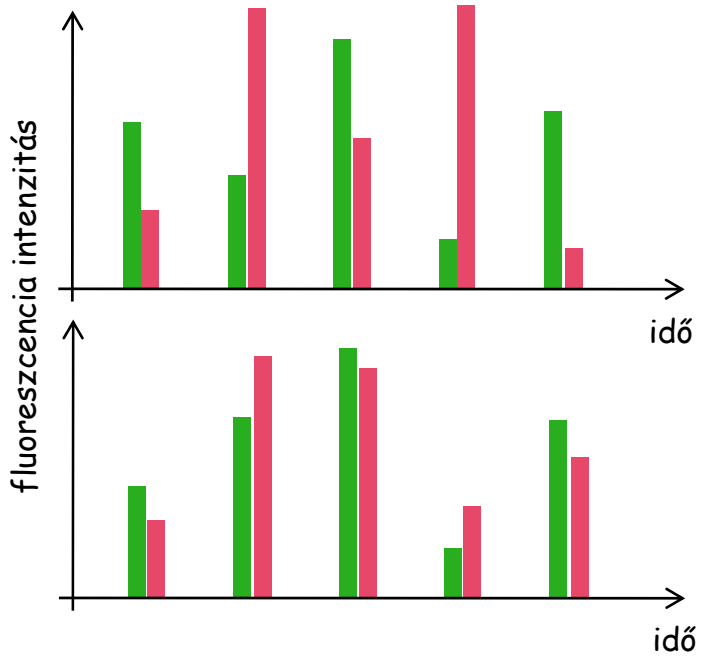
2-színű N&B analízis (kereszt N&B): molekuláris komplexek sztöchiometriája

- Sejteken két különböző molekulát két különböző fluoreszcens festékkel jelölünk meg.
- Cél: meghatározni, hogy a két molekula asszociál-e egymással, és ha igen, milyen a komplex sztöchiometriája.
- Meghatározzuk mindkét fluoreszcens csatornában a molekuláris fényességet (ε_1, ε_2) N&B analízis módszerrel az egyes csatornákban mérhető variancia alapján.
- Az így meghatározott ε_1 és ε_2 értékek nem bizonyítják, hogy a két molekula egymással komplexben fordul elő, hiszen az ε_1-t és ε_2-t a saját, másik csatornától független varianciája alapján számoltuk ki.
- Megoldás: Csak azon pixeleket kell figyelembe venni, ahol a két fluoreszcencia intenzitás korrelál egymással, melynek alapja az ún. kereszt variancia meghatározása.

Digman, M.A.,Wiseman P.W, Choi C, Horwitz A.R., Gratton E. (2009) PNAS 106: 2170-2175.

Kereszt variancia



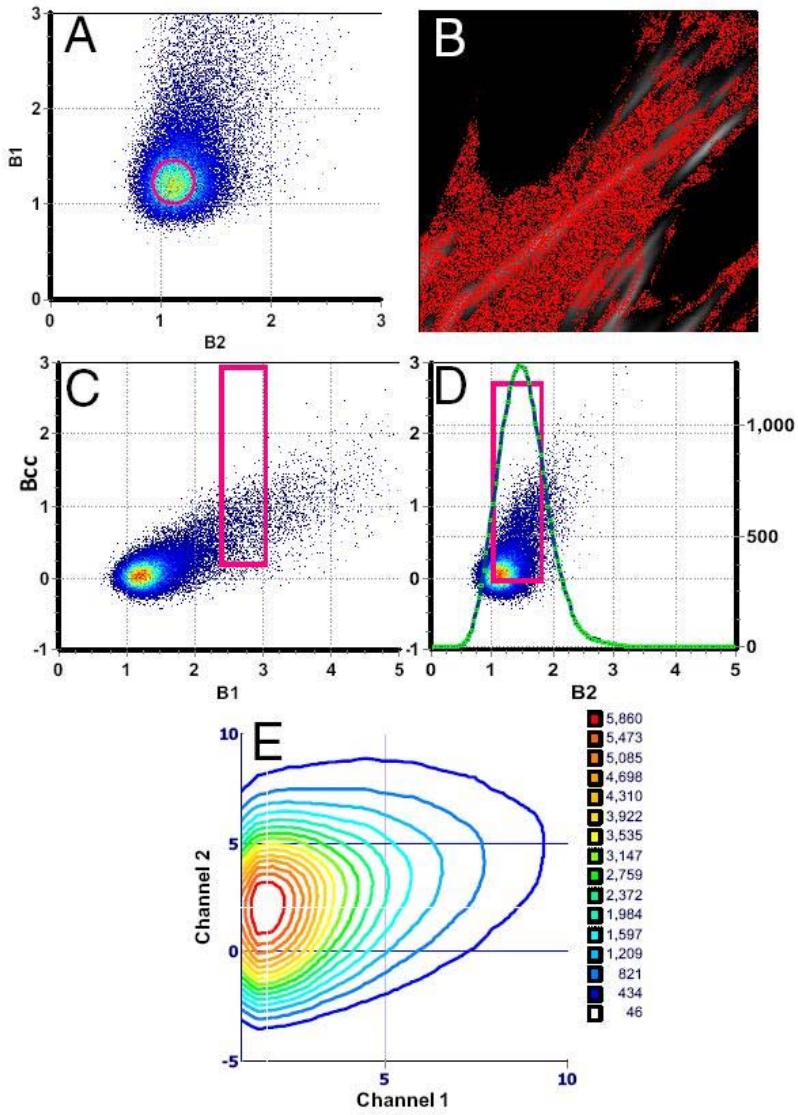


Ha a két molekula komplexet alkot, az intenzitások változása korrelál, σ_{cc} nagyobb lesz nullánál.

Kereszt variancia: $$\sigma_{cc}^2 = \frac{\sum_{i=1}^{k}\left(G_i - \overline{G}\right)\left(R_i - \overline{R}\right)}{k}$$

Kereszt fényesség: $$B_{cc} = \frac{\sigma_{cc}^2}{\sqrt{M(G)M(R)}}$$

A sztöchiometria meghatározása



- A pozitív kereszt variancia alapján csak azon pixelekben értékeljük ki a fényességeket, ahol a két molekula komplexet alkot egymással.
- A molekuláris fényességek ismeretében a sztöchiometria meghatározható.