



Causalità di Wiener-Granger applicata a serie temporali estratte da *C. elegans*

Laureanda: Greta Grassmann

Relatore: Prof. Luigi Rigon

Supervisore: Prof. Edoardo Milotti

Tesi triennale

Laurea in Fisica

Università degli Studi di Trieste

Sommario

In questo lavoro di tesi ho applicato il test di causalità di Wiener-Granger per studiare la relazione tra due neuroni presenti all'altezza della faringe del verme nematode fasmidario *Caenorhabditis elegans*. I neuroni scelti sono un neurone sensore ed un interneurone, direttamente connessi tramite una sinapsi. In una prima fase della tesi ho effettuato le misure nel laboratorio della Dott.ssa Folli, presso l'Istituto Italiano di Tecnologia (IIT) di Roma. In tal modo ho raccolto le coppie di sequenze temporali dei due neuroni scelti. Per misurare l'attività di questi due neuroni ho misurato la variazione nel tempo della concentrazione di calcio in loro presente. Tale concentrazione è indicatore indiretto della loro attività e viene valutata con la tecnica del *calcium imaging*. Una volta ottenute le coppie di serie temporali da esaminare, ne ho innanzitutto studiato lo spettro, e poi, dopo aver applicato un filtro per ridurre il rumore, ho costruito modelli "auto regressivi" (*AutoRegressive*, AR) e "auto regressivi con media mobile" (*AutoRegressive Moving Average*, ARMA) delle due serie utilizzando gli algoritmi numerici già esistenti per questo scopo in MatLab. Quindi ho cercato di verificare se la previsione prodotta dal modello AR per una delle serie, possa migliorare significativamente considerando il modello ARMA che tiene conto anche dei valori assunti dall'altra. Questa verifica è una dimostrazione dell'esito positivo del test di "causalità di Granger" tra le due serie.

Indice

1	Introduzione	1
2	Segnali nervosi e serie temporali di dati	2
3	Modelli di predizione lineare	3
4	Il criterio di causalità di Wiener-Granger	4
4.1	Introduzione	4
4.2	Formulazione matematica	5
4.3	Applicazione	6
5	Il caso in esame	7
5.1	C. elegans	7
5.2	I neuroni scelti	8
5.2.0.1	AWC	8
5.2.0.2	AIY	10
6	Raccolta delle serie temporali	12
6.1	Misure effettuate in laboratorio	12
6.1.1	Stimoli utilizzati	13
6.1.1.1	Saggio di chemiotassi	13
6.1.1.2	Calcium-imaging	14
6.2	Preparazione della linea neurale	15
6.2.0.1	G-Camp	16
6.2.0.2	mScarlet	16
6.3	Il laboratorio e la strumentazione usata	16
6.3.1	Chip	18
6.3.2	Collegamenti	19
6.3.3	LED e specchi	19
6.4	Procedure di misura	22
6.5	Acquisizione dati	23
6.6	Difficoltà e possibili miglioramenti	24
6.7	Risultati delle misure	25
7	Algoritmi e modelli utilizzati	29
7.1	Filtraggio	29
7.1.0.1	Lowpass	29
7.2	Modello AR	30
7.2.1	Individuazione dei parametri	30
7.2.1.1	Regress	30
7.2.2	Ordine del modello	31
7.3	Modello ARMA	34
7.3.1	Scelta dei parametri	35
7.4	Confronto	35
7.5	Verifica della correttezza dell'analisi	36
7.5.1	Test sulla funzione seno	36

7.5.2	Test su un oscillatore armonico forzato	40
8	Analisi	45
8.1	Spettri di potenza dei segnali neurali	45
8.2	Studio dei segnali neurali	48
8.2.1	Segnali ottenuti con stimolo olfattivo C_1 ripetuto per dieci volte .	48
8.2.2	Segnali ottenuti con uno stimolo olfattivo C_1	52
8.2.3	Segnali ottenuti con i quattro restanti procedimenti di presa dati .	54
8.2.3.1	Segnali ottenuti con l'alternanza di stimolo olfattivo C_1 e C_2	55
8.2.3.2	Segnali ottenuti con lo stimolo olfattivo C_2 ripetuto dieci volte	56
8.2.3.3	Segnali ottenuti con il metodo <i>gentle touch</i>	58
8.2.3.4	Segnali ottenuti con il metodo <i>harsh touch</i>	59
9	Conclusioni	61
10	Ringraziamenti	62
	Appendice	64

Elenco delle figure

5.1	Posizione dei neuroni di interesse in un <i>C.elegans</i>	8
5.2	AWC-off con i neuroni adiacenti e posizione sua e del suo neurone speculare nel <i>C. elegans</i>	10
5.3	AIY-right con i neuroni adiacenti e posizione sua e del suo neurone speculare nel <i>C. elegans</i>	11
6.1	Apparato sperimentale	17
6.2	Foto dell'apparato sperimentale.	17
6.3	Chip	18
6.4	Funzionamento del dicroico multibanda.	20
6.5	Effetto della illuminazione sul <i>C. elegans</i> dovuta a diversi LED (RED, BLUE, LIME).	21
6.6	Risposta di AWC e AIY agli odoranti C_1 e C_2 alternati e sovrapposizione dei segnali filtrati.	26
6.7	Risposta di AWC e AIY all'odorante C_2 ripetuto dieci volte e sovrapposizione dei segnali filtrati.	26
6.8	Risposta di AWC e AIY allo stimolo con odorante C_1 ripetuto 10 volte e sovrapposizione dei segnali filtrati.	27
6.9	Risposta di AWC e AIY allo stimolo con odorante C_1 ripetuto una sola volta e sovrapposizione dei segnali filtrati.	27
6.10	Risposta di AWC e AIY allo stimolo con variazione di pressione con metodo <i>gentle touch</i> e sovrapposizione dei segnali filtrati.	28
6.11	Risposta di AWC e AIY allo stimolo con variazione di pressione ripetuta per 10 volte con il metodo <i>harsh touch</i> e sovrapposizione dei segnali filtrati.	28
7.1	Istogramma dei residui ottenuti applicando il modello AR(1) al segnale di AIY di Figura 6.9 e Gaussiana che meglio si adatta all'istogramma.	32
7.2	Istogramma dei residui ottenuti applicando il modello AR(4) al segnale di AIY di Figura 6.9 e Gaussiana che meglio si adatta all'istogramma.	33
7.3	Istogramma dei residui ottenuti applicando il modello AR(60) al segnale di AIY di Figura 6.9 e Gaussiana che meglio si adatta all'istogramma.	34
7.4	Confronto tra la funzione y e modello AR(2)	38
7.5	Funzione sinusoidale con frequenza $\frac{\pi}{10} \frac{1}{s}$ alla quale è stato sovrapposto rumore bianco con media $\mu = 0$ e deviazione standard $\sigma = 0.3$	38
7.6	Confronto tra la funzione y con sovrapposto del rumore bianco e modello AR(5)	39
7.7	Medie degli scarti quadrati medi con un segnale costituito da un coseno e l'altro dalla sua forzante.	42
7.8	Confronto tra la funzione originale y' definita dall'equazione 7.20 e modello ARMA(1,1).	42
7.9	Funzione originale y' dopo la sovrapposizione di rumore bianco ($\mu = 0$ e $\sigma_{y''} = 10.0$) e funzione originale x' dopo la sovrapposizione di rumore bianco ($\mu = 0$ e $\sigma_{x''} = 0.3$)	43
7.10	Confronto tra la funzione y'' e il modello AR(5).	43
7.11	Medie degli scarti quadrati medi con un segnale costituito da un coseno e l'altro dalla sua forzante, entrambi con aggiunta di rumore bianco.	44
7.12	Confronto tra la funzione y'' e il modello ARMA(3,18).	45
8.1	Spettri dei segnali AWC e AIY di Figura 6.9.	46

8.2	Spettri dei segnali AWC e AIY di Figura 6.9 in funzione dei logaritmi delle frequenze.	46
8.3	Sovrapposizione di un andamento $\sim \frac{1}{f^2}$ agli spettri dei segnali AWC e AIY di Figura 6.9 in funzione dei logaritmi delle frequenze.	47
8.4	Confronto tra segnale AIY di Figura 6.8 e modello AR(13)	49
8.5	Medie degli scarti quadrati dai due segnali di Figura 6.8	50
8.6	Medie degli scarti quadrati dai due segnali di Figura 6.8	51
8.7	Medie degli scarti quadrati dai due segnali di Figura 6.8	52
8.8	Confronto tra segnale AIY di Figura 6.9 e modello AR(4)	53
8.9	Medie degli scarti quadrati dai due segnali di Figura 6.9	53
8.10	Medie degli scarti quadrati dai due segnali di Figura 6.9	54
8.11	Medie degli scarti quadrati dai due segnali di Figura 6.6	55
8.12	Medie degli scarti quadrati dai due segnali di Figura 6.6	56
8.13	Medie degli scarti quadrati dai due segnali di Figura 6.6	57
8.14	Medie degli scarti quadrati dai due segnali di Figura 6.6	57
8.15	Medie degli scarti quadrati dai due segnali di Figura 6.8	58
8.16	Medie degli scarti quadrati dai due segnali di Figura 6.10	59
8.17	Medie degli scarti quadrati dai due segnali di Figura 6.11	60
8.18	Medie degli scarti quadrati dai due segnali di Figura 6.8	60

1 Introduzione

Le relazioni di causalità tra oggetti biologici sono spesso oscure, diversamente da quanto accade normalmente in fisica. Per questo motivo c'è bisogno di un chiaro criterio matematico che consenta di stabilire una relazione di causalità. Nel 1969 [1] Granger, seguendo una proposta abbozzata inizialmente da Norbert Wiener, ha suggerito un criterio per individuare relazioni causali tra variabili senza avere alcuna conoscenza sul meccanismo alla loro origine.

La formulazione del criterio che oggi viene detto di "Wiener-Granger" richiede l'introduzione della "Teoria della predizione lineare". Per questo motivo nella prima parte della tesi introduco il concetto di modelli predittivi lineari, descrivendo in particolare quelli comunemente noti come modelli AR, MA e ARMA. Su questi si basa la formulazione matematica del criterio di causalità di Wiener-Granger. Nella tesi io applico questi concetti ai segnali prodotti da due neuroni di un piccolo organismo multicellulare, il nematode *C. elegans*. Gli studi esistenti mostrano che questi neuroni presentano un'attivazione correlata in risposta a stimoli olfattivi o di pressione.

Nella seconda parte della tesi descrivo i due neuroni scelti, AWC e AIY, e il loro ruolo all'interno di *C. elegans*. Quindi descrivo l'apparato sperimentale e il procedimento usato per raccogliere i valori della concentrazione del calcio internamente ai due neuroni. I segnali dei due neuroni sono definiti dal valore della concentrazione del calcio in funzione del tempo. I campioni raccolti costituiscono serie temporali che ho studiato prima analizzandone lo spettro, poi con un codice che applica il metodo AR e ARMA e ne paragona i risultati per cercare di stabilire la presenza di causalità.

La tesi si conclude con una discussione dei risultati ottenuti.

2 Segnali nervosi e serie temporali di dati

I campioni dell'ampiezza dei segnali nervosi di *C. elegans* studiati in questa tesi vengono raccolti con un campionatore digitale (*Analog to Digital Converter*, ADC) a frequenza fissata. Un insieme di dati di questo tipo costituisce una *serie temporale* e viene frequentemente analizzato con la Trasformata di Fourier Discreta (*Discrete Fourier Transform*, DFT) oppure con il formalismo AR o ARMA discussi in Sezione 3. In pratica, l'acquisizione dati fornisce sempre dei vettori $(x_0, x_2, \dots, x_{N-1})$ a cui si associa il tempo t_0 di inizio dell'acquisizione dati e l'intervallo di campionamento Δt .

Molte volte in fisica si considerano i segnali come somme di un processo deterministico, definito da equazioni del moto senza termini casuali, e di un processo stocastico che corrisponde alla misura. Altre volte il processo stocastico è inseparabile dall'equazione del moto: in questo caso si ottengono equazioni come quella di Langevin, che descrive il moto Browniano:

$$m \frac{dv}{dt} = -\gamma v(t) + n(t) \quad (2.1)$$

dove $n(t)$ è solitamente un processo di rumore bianco. È interessante notare che al variare della massa m , l'equazione descrive un moto praticamente del tutto deterministico (massa molto grande) oppure un processo completamente casuale (massa molto piccola).

I segnali nervosi assomigliano di più a questo secondo caso, dal momento che vengono descritti da una cinetica chimica che si esprime con equazioni differenziali stocastiche simili a quella di Langevin per masse piccole (ma non piccolissime). L'andamento che ci si può aspettare è quasi deterministico, ma con fluttuazioni casuali piuttosto grandi e non necessariamente prodotte dal processo di misura, ma intrinseche al processo biofisico di generazione e propagazione dei segnali nervosi.

In casi di questo tipo il rumore associato al segnale è colorato, con una piccola componente di rumore bianco, a causa della correlazione prodotta dal meccanismo matematico delle equazioni differenziali stocastiche.

3 Modelli di predizione lineare

Quando non si dispone di un modello teorico dei dati, si possono costruire dei modelli fenomenologici come il modello autoregressivo (Auto Regressive, AR), definito dalla formula generica:

$$y'_k = \sum_{j=1}^P a_j y_{k-j}, \quad (3.1)$$

dove P si dice ordine del modello (indicato anche come AR(P)), oppure il modello autoregressivo a media mobile (Auto Regressive Moving Average, ARMA)

$$Y_k = \sum_{j=1}^P a_j y_{k-j} + \sum_{j=0}^Q b_j x_{k-j}, \quad (3.2)$$

dove i valori $\{a_j\}$ e $\{b_j\}$ sono i coefficienti dei due modelli e P e Q gli ordini del modello (indicato anche come ARMA(P,Q)).

Si può dimostrare facilmente che i modelli AR sono analoghi a equazioni differenziali lineari a coefficienti costanti omogenee, mentre i modelli ARMA a equazioni differenziali lineari a coefficienti costanti non omogenee. Queste ultime sono caratterizzate da uno o più termini forzanti, rappresentati in pratica dai termini con la variabili indipendente x . Molto spesso il termine forzante è unico, e quindi la parte di modello a media mobile contiene solo un coefficiente numerico.

Questi due modelli fenomenologici sono lineari rispetto alle variabili x e y , e per ottenere i valori dei coefficienti $\{a_j\}$ e $\{b_j\}$ si utilizza il metodo dei minimi quadrati. La procedura è concettualmente semplice, ma considerazioni pratiche hanno portato all'elaborazione di diversi algoritmi numerici.

4 Il criterio di causalità di Wiener-Granger

4.1 Introduzione

Il lavoro descritto in questa tesi si basa sul concetto di causalità introdotto per la prima volta da Norbert Wiener (nel 1956), formulato matematicamente dall'economista Clive Granger (nel 1980) [2] e ulteriormente sviluppato da John Geweke: il poter prevedere i valori futuri di una serie temporale basandosi sulla conoscenza di quelli passati della serie stessa e di una o più altre che sono dette esserne causali. La causalità quindi quantifica l'interazione tra variabili e individua relazioni di causa-effetto.

Una serie temporale x si dice *Granger-causale* della serie temporale y a lei simultaneamente misurata se si può dimostrare che i valori di x danno informazioni statisticamente rilevanti sui valori futuri di y , ovvero se la predizione di y basata sui suoi stessi valori nel passato e su quelli nel passato di x è più esatta di quella basata solamente sui suoi valori passati. In questo caso si dice che c'è flusso di informazione da x a y .

La causalità di Granger sta acquistando un ruolo sempre maggiore per quegli studi dove non è possibile riconoscere le cause di un certo fenomeno, per cui anche se due eventi sono correlati non si capisce facilmente se lo sono perchè uno causa l'altro, perchè c'è una causa comune per entrambi o solo incidentalmente. Questa situazione si ha, ad esempio, nelle neuroscienze [3], campo in cui si sta ora puntando a passare dall'identificare le aree in cui avvengono certi processi all'individuare le connessioni tra questi ultimi.

Quella di Granger è un'analisi della connettività (cioè della capacità di certi sistemi di collegarsi tra loro e scambiarsi informazioni) di tipo funzionale. Si distingue così da altri metodi che invece riguardano l'analisi di connettività effettive, incentrata sulla ricerca del circuito più semplice possibile che possa decrivere i dati raccolti.

Per questo lavoro di tesi si sono studiate due serie, raccolte misurando la variazione dell'attività di due neuroni di un organismo semplice sottoposti a stimolo olfattivo o a variazione di pressione.

4.2 Formulazione matematica

La formulazione di Granger si basa su modelli lineari di predizione [4], descritti nella Sezione 3, di serie temporali simultaneamente raccolte. Questi sono modelli matematici in cui il valore di una certa variabile in un dato momento viene descritto come una somma pesata dei suoi stessi valori nel passato e di quelli, sempre nel passato, di un'altra variabile; ciascuna variabile è un processo vettoriale che rappresenta una serie temporale. L'applicazione di questo metodo si basa sul trovare dei pesi ottimali che minimizzino l'errore di stima.

Per implementare questo metodo è necessario stimare e paragonare due modelli diversi, uno basato solo sui dati delle serie in studio e il secondo considerando anche la seconda serie temporale simultaneamente raccolta. La significatività della causalità di Granger si ricava dalla differenza di valore degli errori di predizioni tra il primo e il secondo modello, ovvero da quanto più il secondo modello si avvicina a una predizione migliore dei dati reali rispetto al primo.

La causalità di Granger offre molti vantaggi:

- Dal punto di vista computazionale in generale è semplice da applicare dato che esistono già molti algoritmi standard per ottenere una stima ottimale dei modelli autoregressivi.
- Non è necessario assumere nulla sul meccanismo fisico che genera i dati.
- I modelli autoregressivi si possono studiare sia nel dominio del tempo che della frequenza: in quest'ultimo caso si possono fare stime spettrali della causalità.
- Non dipende dall'intensità del segnale dato che è invariante se si riscalano le variabili.

I maggiori svantaggi dell'approccio scelto per questa analisi sono l'incertezza nella scelta del numero di parametri da utilizzare (ovvero dell'ordine dei modelli) e la possibilità di non riuscire a studiare correttamente attività neurali dall'andamento molto piccato [5].

4.3 Applicazione

Siano x e y due serie temporali stazionarie. Per verificare che x Granger-causi y , in primo luogo si studia y con il metodo AR (descritto in Sezione 3), calcolando il miglior valore di m e dei parametri a_1, \dots, a_m tali che:

$$y'(t) = a_1y(t-1) + a_2y(t-2) + \dots + a_my(t-m) \quad (4.1)$$

Dove $y'(t)$ è la modellizzazione del dato reale $y(t)$ ottenuta con il metodo AR. Quindi si passa al metodo ARMA (descritto in Sezione 3) includendo anche i valori passati di x , ma considerando, volta per volta, ordini della parte AR con valori minori di m , che si è appena dimostrato dare il modello che meglio descrive i dati reali. Per ciascuno di questi nuovi ordini della parte AR si è calcolato il miglior ordine della parte MA e il valore dei rispettivi coefficienti. Si ottiene quindi:

$$Y(t) = a_1y(t-1) + a_2y(t-2) + \dots + a_{m'}y(t-m') + b_0x(t) + \dots + b_{q'}x(t-q') \quad (4.2)$$

Con $Y(t)$ modellizzazione del dato reale $y(t)$ ottenuta con il metodo ARMA.

Si dice che x Granger-causi y solo se esiste qualche valore di q' e dei corrispondenti parametri $b_0, b_1, \dots, b_{q'}$ che migliora significativamente la regressione temporale, dando una media dei quadrati residui del modello ARMA(m', q') più vicina a quella del modello AR(m) di quanto non lo sia quella data dal modello AR(m'). Dato però che, in generale, con l'aumentare del numero di parametri aumenta l'adattibilità di un modello e quindi la sua precisione, bisogna prestare attenzione anche al valore assunto dai parametri $b_0, b_1, \dots, b_{q'}$: se questi sono significativamente diversi da 0 si ha la certezza che i dati $x(t), x(t-1), \dots, x(t-q')$ abbiano portato informazione sull'andamento dell'altra serie temporale, permettendo di migliorare la corrispondenza del modello ai dati reali nonostante si sia ridotto il numero di dati della serie stessa $y(t-1), y(t-2), \dots, y(t-m')$ considerati. Se invece il valore assunto dai parametri $b_0, b_1, \dots, b_{q'}$ rimane vicino allo 0, questo suggerisce che non siano i dati $x(t), x(t-1), \dots, x(t-q')$ a contenere informazione sull'altra serie, ma abbia effetto solo l'aver a disposizione più parametri, indipendentemente dai dati che questi vanno a moltiplicare.

5 Il caso in esame

5.1 *C. elegans*

Il *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) è un nematode fasmidario, ovvero un verme cilindrico privo di apparato respiratorio e circolatorio, lungo circa 1 *mm*, provvisto di fasmidi, organi chemorecettori posti all'estremità posteriore del corpo.

Anatomicamente un *C. elegans* è composto da bocca, faringe, intestino, gonadi¹ e tegumentazione composta da collagene. Lungo il corpo corrono quattro bande muscolari, connesse con il sistema neurale che consente loro di far muovere il verme esclusivamente inarcandosi ventralmente o dorsalmente; solo la testa può muoversi a destra e sinistra. Dato questo movimento obbligato gli individui osservati su una superficie orizzontale (come per le misure descritte in questa tesi) tendono a giacere sul proprio fianco destro o sinistro.

In una popolazione adulta sono presenti principalmente individui ermafroditi (che contano 302 neuroni). Si trova un maschio (caratterizzato da 389 neuroni) in un caso ogni mille [6]. Si tratta di uno degli organismi più semplici in natura che presenta un sistema neuronale e ben si presta a uno studio di tipo neuroscientifico. Oltre ad essere il primo organismo multicellulare di cui si è sequenziato il genoma [7] ad oggi il *C. elegans* è l'unico organismo del cui connettoma si abbia una completa mappatura (parzialmente ottenuta tramite microscopia elettronica negli anni '80 [8] nel caso di individui ermafroditi e nel 2019 nel caso di quelli maschili con una nuova tecnica che riapplicata agli ermafroditi ha individuato 1500 sinapsi in più). Il connettoma è l'insieme di neuroni e connessioni sinaptiche tra essi, e può essere rappresentato, nel caso degli ermafroditi, come una matrice $302 * 302$; l'elemento ij della matrice rappresenta l'efficienza del trasferimento dell'informazione tra il neurone i ed il neurone j . Un blocco di questi sensori corrisponde agli amfidi, un paio di organi chemosensori (i più grandi presenti nel *C. elegans*) collocati lateralmente nella testa del verme e aperti all'esterno, ciascuno contenente uno dei neuroni sensori di 12 coppie, tra i quali quelli di interesse per questo studio sulla causalità [9].

¹Le gonadi sono organi che producono i gameti, cellule riproduttive.

5.2 I neuroni scelti

I dati di interesse sono stati raccolti osservando il comportamento di due particolari neuroni: un neurone sensore² e un interneurone³ ad esso direttamente connesso attraverso una sinapsi chimica. Si tratta rispettivamente di:

- neurone sensore AWC;
- interneurone AIY.

Figura 5.1 mostra dove si trovano, all' interno del *C. elegans*, i neuroni studiati. In Figura 5.1 vengono mostrati anche i neuroni BAG e URX che - come spiegato in Sezione 6 - sono utilizzati solo per individuare i primi due.

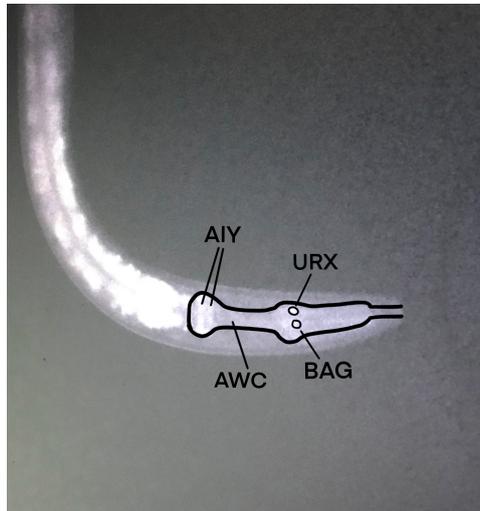


Figura 5.1: Collocazione dei neuroni di interesse in un *C. elegans*: AWC (neurone sensore), AIY (interneurone), BAG e URX (usati solo per individuare i primi due).

5.2.0.1 AWC

È una delle tre coppie di neuroni olfattori del *C. elegans*. I neuroni olfattori sono neuroni la cui attivazione è determinata dal legame dei recettori neuronali con odoranti specifici⁴. I recettori neuronali sono organuli costituiti da terminazioni di cellule nervose in grado di

²Un neurone sensore, detto anche sensitivo, partecipa all'acquisizione di stimoli, trasportando le informazioni dagli organi sensoriali al sistema nervoso centrale.

³Un interneurone ha in ingresso un neurone e in uscita un altro neurone. Integra i dati forniti dai neuroni sensoriali e li trasmette ai neuroni motori che controllano il movimento dei muscoli.

⁴Un odorante è una molecola volatile con basso peso molecolare (< 300 Dalton).

produrre un potenziale recettoriale che va a variare il potenziale di membrana⁵, ovvero una differenza di potenziale tra l'esterno e l'interno della cellula, depolarizzando la membrana cellulare (stimolando il neurone a trasmettere l'impulso, con il potenziale d'azione⁶), oppure iper-polarizzandola (diminuendo quindi la capacità del neurone di generare un potenziale d'azione). I potenziali recettoriali non determinano pertanto direttamente un potenziale d'azione, ma variano il potenziale di membrana fra l'interno e l'esterno della cellula per mezzo dell'apertura o della chiusura dei canali ionici. Questi sono proteine trans-membrana che consentono l'attraversamento, veloce ma selettivo, della membrana cellulare da parte delle varie specie ioniche presenti nelle cellule. L'iper-polarizzazione ha luogo quando attraverso la membrana dei neuroni si genera un potenziale elettrico il cui valore assoluto aumenta rispetto al potenziale di membrana dei neuroni a riposo. Questo avviene a causa della differente concentrazione di ioni all'interno e all'esterno della cellula.

Generalmente si hanno coppie di neuroni simmetriche rispetto all'asse longitudinale del corpo dell'animale (per questo denominate *left* o *right*) che presentano lo stesso comportamento. Invece i due neuroni AWC si distinguono non tra *left* e *right* ma tra *on* e *off*, e sono legati a reazioni diverse tra loro; il neurone AWC studiato è del tipo AWC-*off* ed è caratterizzato da una risposta odor-*off* (infatti la crescita nella concentrazione del calcio intracellulare è osservabile quando lo stimolo olfattorio viene rimosso - con un picco della risposta generalmente entro un secondo dalla rimozione dell'odorante) e viene selezionato sfruttando un promotore non presente sul neurone speculare. AWC-*off* modula solo l'attrazione all'odore.

Questo neurone, finora presentato come sensore, può anche agire da interneurone in caso di variazioni di pressione esterna avvertita da un altro neurone sensore.

Figura 5.2 mostra a sinistra la relazione del neurone AWC-*off* con i neuroni adiacenti. A destra è invece possibile vedere la posizione del neurone AWC-*off* e del suo neurone speculare all'interno del *C. elegans*.

⁵Tutte le tipologie cellulari presentano un potenziale di membrana a riposo che si aggira tra -60 mV e -70 mV , l'esterno è caricato positivamente, l'interno negativamente.

⁶Il potenziale d'azione è un fenomeno che prevede un rapido cambiamento di carica tra l'interno e l'esterno della loro membrana cellulare.

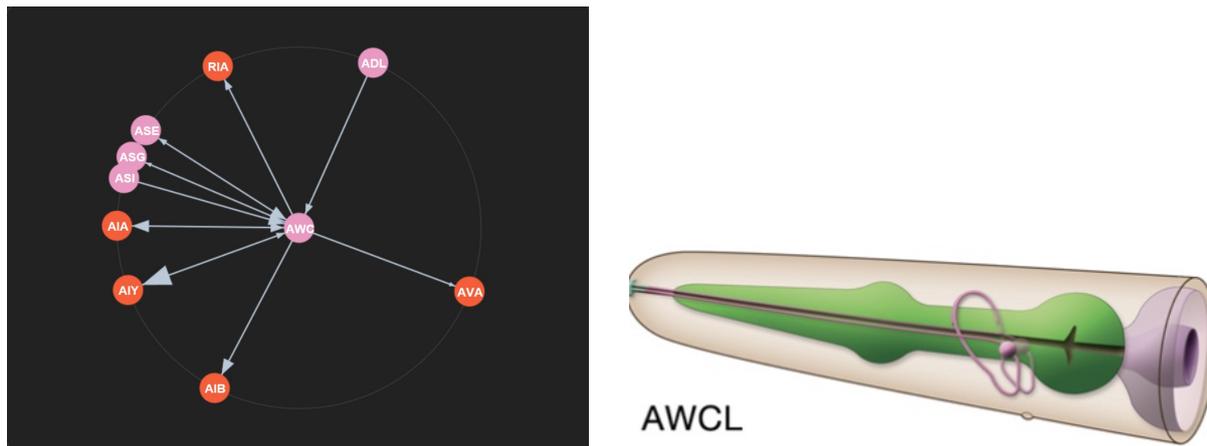


Figura 5.2: A sinistra: schema di AWC-off con i neuroni adiacenti. A destra: rappresentazione del neurone AWC-off e del suo neurone speculare all' interno del *C. elegans*.

5.2.0.2 AIY

L'interneurone che è stato studiato in questa tesi e la sua copia speculare si trovano nel ganglio ventrale (struttura nervosa che in doppia coppia forma un anello intorno alla faringe del verme) e, come già anticipato, sono interneuroni dell'amfide, e precisamente una delle quattro coppie del primo strato che riceve e processa output che provengono dai neuroni sensoriali. AIY è collegato a molti altri neuroni oltre che a AWC-off e anche per questo motivo tende a dare risposte non deterministiche anche se per lo più consistenti con il segnale dato da AWC. Figura 5.3 mostra a sinistra la relazione del neurone AIY-right con i neuroni adiacenti. A destra è invece possibile vedere la posizione del neurone AIY-right e del suo neurone speculare all' interno del *C. elegans*.

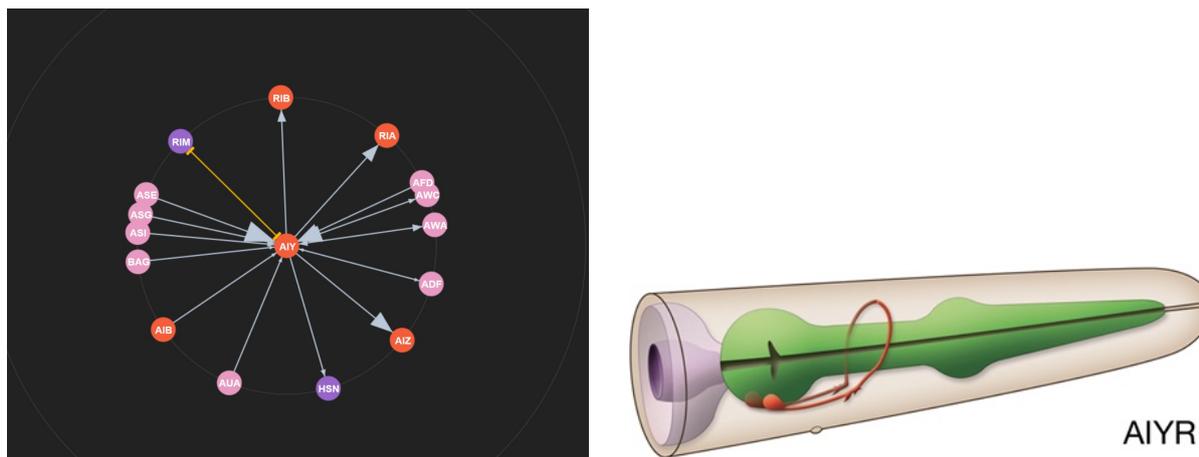


Figura 5.3: A sinistra: schema di AIY-right con i neuroni adiacenti. A destra: rappresentazione del neurone AIY-right e del suo neurone speculare all' interno del *C. elegans*.

È già stato dimostrato [9] che in condizioni di assenza di stimoli esterni su AWC, l'attività di riposo di quest'ultimo inibisce l'interneurone AIY. La presentazione di un odorante che legghi AWC induce una iper-polarizzazione di quest'ultimo che rilascia l'attività inibitoria su AIY, il quale a sua volta è in grado di attivarsi. I due neuroni dovrebbero quindi attivarsi in controfase.

6 Raccolta delle serie temporali

6.1 Misure effettuate in laboratorio

Per ottenere i dati da analizzare con l'algoritmo di Wiener-Granger si sono raccolte diverse coppie di serie temporali corrispondenti alla variazione della concentrazione di calcio nei due neuroni AWC e AIY. Per misurare questa concentrazione, come esposto nella Sezione 6.2, si misura la variazione percentuale di fluorescenza dei due neuroni nel tempo in relazione allo stimolo usato. Le due colonne di dati che costituiscono le serie da analizzare sono quindi costituite da valori del tipo:

$$F(t)_n = \frac{F(t) - F(0)}{F(0)} \quad (6.1)$$

dove $F(t)$ è la fluorescenza misurata sul neurone ad ogni frame t (ovvero l'intensità media dei pixel nell'area del neurone) mentre $F(0)$ è il valore di *baseline* della fluorescenza, ossia l'intensità media dei pixel nell'area del neurone quando questo è a riposo (si veda la Sezione 6.5). In questo modo si può studiare la variazione percentuale di fluorescenza del neurone rispetto al suo stato di riposo, e da questa capire se il neurone è in uno stato attivo o meno.

La risposta neuronale è stata quindi raccolta a seguito di stimoli olfattivi (sia con un odorante usato singolarmente che con due odoranti alternati durante una misura) e di pressione (ovvero una variazione della pressione con cui il buffer viene iniettato nel chip). In tutti i tipi di misure si nota come i segnali di risposta dei due neuroni siano sempre - come atteso - in controfase. Durante la stimolazione chimica o la variazione di pressione AWC è iper-polarizzato (la curva discende o rimane intorno allo zero, a seconda dell'espressione dell'indicatore di calcio) mentre AIY si attiva (crescita della sua fluorescenza, la sua curva aumenta). Una volta rimosso lo stimolo, si vede la crescita di fluorescenza di AWC (fase di de-polarizzazione) e in corrispondenza AIY torna ad essere inibito da AWC e la sua fluorescenza torna al valore di *baseline*.

Per ciascun tipo di presa dati si è utilizzato un campione di circa 30 individui.

6.1.1 Stimoli utilizzati

Si è usato per lo stimolo olfattivo l'alcool isoamilico (IAA), che a basse concentrazioni (fino a $10^{-4} mol/dm^3$) risulta attrattivo per *C. elegans*. A concentrazioni maggiori diventa repulsivo e impedisce l'analisi, dato che in caso di repulsione non è più AWC-off a mediare la risposta. Le diluizioni di IAA vengono fatte in Sbasal, un buffer (ovvero una sostanza neutra) salino che non induce nessun tipo di risposta in *C. elegans* (risposta neutra).

La risposta di *C. elegans* ad un determinato tipo di stimolo chimico può essere studiata principalmente in due modi: attraverso lo studio della reazione comportamentale allo stimolo chimico (saggi di chemiotassi) o attraverso la tecnica di *calcium imaging* (si veda la Sezione 6.1.1.2) dell'attività neurale (principalmente focalizzata sui neuroni olfattori se si è interessati alla risposta a uno stimolo chimico).

6.1.1.1 Saggio di chemiotassi

Il saggio di chemiotassi viene utilizzato per verificare il tipo di reazione, attrattiva o repulsiva, alla quale una certa sostanza dà origine. In una piastrina piena di Agar (sostanza gelatinosa in cui si muovono gli animali e i batteri di cui si nutrono) vengono definiti quattro poli agli angoli di questa e un centro. Sui due poli positivi vengono posizionate gocce di odorante, su quelli negativi un buffer neutro e nel punto centrale tra i 30 e gli 80 animali. Su ciascun polo viene depositata una goccia di una soluzione di azoturo di sodio che permette di immobilizzare gli animali una volta raggiunto il polo. Quindi si definisce come indice di chemiotassi:

$$I = \frac{N_+ - N_-}{N_+ + N_- + N_0} \quad (6.2)$$

Dove N_+ è il numero di vermi che si sono portati attorno ai poli positivi, N_- è il numero di vermi che si sono portati attorno ai poli negativi ed N_0 è il numero di vermi all'esterno di queste aree.

Se $I > 0$ la sostanza si definisce attrattiva, se $I < 0$ repellente.

6.1.1.2 Calcium-imaging

Con la tecnica del *calcium imaging* si controlla l'attività dei neuroni olfattori, tenendo presente che non tutti hanno gli stessi recettori e quindi non tutti daranno risposta ad una certa sostanza. Tale tecnica può anche essere usata per determinare se una sostanza è attrattiva o repulsiva, in base al tipo di neurone che mostra attivazione. Nel *C. elegans* i neuroni olfattori sono tre:

- AWC-attrazione
- AWB-repulsione
- AWA-attrazione ma per sostanze diverse da quelle che attivano AWC

Quando un odorante lega un recettore presente sulla membrana cellulare dello specifico neurone in esame, come già accennato il recettore subisce un cambio conformazionale che induce una "reazione a catena" intracellulare. Questa reazione ha, tra i vari effetti, quello di aprire i canali ioni del calcio. L'influsso di ioni calcio nel neurone ne favorisce la depolarizzazione e la conseguente attivazione. La concentrazione dello ione calcio aumenta dopo lo stimolo per rilascio da mitocondri⁷, reticolo endoplasmatico⁸ e specifici canali ionici presenti sulla membrana plasmatica⁹. Il calcio intracellulare è uno dei principali indicatori dell'attività neurale.

Una volta che l'input è stato raccolto dai neuroni sensori la risposta viene elaborata dagli interneuroni (AIA, AIB, AIY e AIZ). A seconda di quali di questi viene attivato si ha una risposta di *forward* (verso l'odore che quindi risulta essere attrattivo) o *backward* (lontano dallo stimolo che quindi risulta essere repulsivo). Si osserva come, anche in caso di odore attrattivo, la risposta non sia univoca ma presenti un certo grado di casualità dando origine a una componente casuale nel percorso del *C. elegans*.

⁷I mitocondri sono gli organelli addetti alla respirazione cellulare.

⁸Il reticolo endoplasmatico consiste in un sistema di canali membranosi uniti tra loro, situato all'interno del citoplasma.

⁹La membrana plasmatica è un sottile rivestimento che delimita la cellula, la separa dall'ambiente esterno e ne regola gli scambi di elementi e sostanze chimiche con questo.

6.2 Preparazione della linea neurale

Affinché le attività dei due neuroni di interesse fossero chiaramente visibili è stata preparata una linea transgenica. La transgenesi consiste nell'inserimento di uno o più geni esogeni all'interno del genoma di un certo organismo: in questo caso i transgeni vengono immessi nelle cellule presenti nelle gonadi di una serie di vermi ermafroditi. Questi, riproducendosi, danno origine a una stirpe di animali con la modifica transgenica necessaria. In questo caso si sono sfruttati tre promotori¹⁰:

- *ttx-3*, in cui sono stati inseriti l'indicatore di calcio G-Camp e un'altra proteina fluorescente detta mScarlet;
- *odr-1*, in cui è stato inserito G-Camp;
- *egl13;odr1*, in cui è stata inserita mScarlet.

Sono stati scelti questi particolari promotori perché espressi solo in certi neuroni: *ttx-3* solo in AIY, *odr-1* in AWC (e in un altro neurone, AWB, che non è però stato studiato in questa tesi), *egl13;odr1* in BAG e URX. Questi ultimi due vengono usati unicamente per rintracciare facilmente gli organismi nei quali la mutazione è presente.

Ttx-3 è citoplasmatico¹¹: lo si vede in tutto il neurone (schematicamente composto da soma¹², assone¹³ e dendriti¹⁴). *Egl13;odr1* e *odr-1* sono nucleari: si osserva il tag-fluorescente solo nel nucleo.

La scelta di due tipi di promotori diversi (uno citoplasmatico ed uno nucleare) è legata al fatto che la variazione di calcio in AIY è consistente principalmente nei neuriti e quindi un indicatore di calcio nucleare non avrebbe permesso di misurarne l'attività dato appunto che la variazione di calcio nel nucleo e nel soma non è così rilevante. Al contrario AWC-off presenta all'attivazione una variazione intensa di calcio sia nel soma che lungo assone e

¹⁰Si dice promotore una regione di DNA costituita da specifiche sequenze dette consenso, alla quale si lega la RNA polimerasi per iniziare la trascrizione di un gene.

¹¹Il termine citoplasma indica tutta la porzione di una cellula contenuta all'interno della membrana cellulare.

¹²Il soma è la parte centrale del neurone, in cui risiedono il nucleo e gli altri organelli.

¹³L'assone o neurite (in generale, anche i dendriti sono classificabili come neuriti) è un conduttore di impulsi in direzione centrifuga rispetto al corpo cellulare.

¹⁴I dendriti sono le fibre minori che si ramificano a partire dal neurone e trasportano il segnale nervoso verso il soma.

dendriti (i conduttori degli impulsi). Esprimendo quindi l'indicatore di calcio solo nel nucleo si evita di confondere i processi (dendriti/assone) di AWC con quelli di AIY.

6.2.0.1 G-Camp

Indicatore di calcio composto dalla proteina GFP (*Green Fluorescent Protein*, non esistente nell'organismo), da calmodulina e da MI3 (una sequenza peptidica). La GFP ha un picco di eccitazione a 475 nm ed emette intorno ai 505 nm: è quindi fluorescente nel verde. La calmodulina è una proteina che si lega al calcio. Quando si lega allo ione calcio c'è un cambio conformazionale che viene segnalato dal tag fluorescente attraverso l'emissione di fluorescenza.

6.2.0.2 mScarlet

È una *Red Fluorescent Protein*, che viene eccitata a 560 nm (cioè nel verde) ed emette a circa 585 nm (cioè nel rosso). A differenza del GCaMP, non è legata a nessuno ione. La sua fluorescenza è fissa, ed è quindi un tag fluorescente che serve semplicemente a visualizzare il neurone d'interesse.

6.3 Il laboratorio e la strumentazione usata

Tutte le misure necessarie per ottenere le serie temporali utilizzate in questa tesi sono state eseguite nel laboratorio della sede di Roma del CNLS (*Center for Life Nano Science*) dell' IIT.

L'apparato sperimentale utilizzato per queste misure è costituito da uno *stage* con chip microfluidico (che contiene il *sample* di vermi usato ad ogni presa dati) connesso a un set di valvole, a loro volta collegate ai flaconi di buffer e odorante e controllate con una maschera temporale di 0 e 1 (aperte o chiuse). Uno schema del setup è raffigurato in Figura 6.1. Figura 6.2 mostra invece una foto dell'apparato sperimentale.

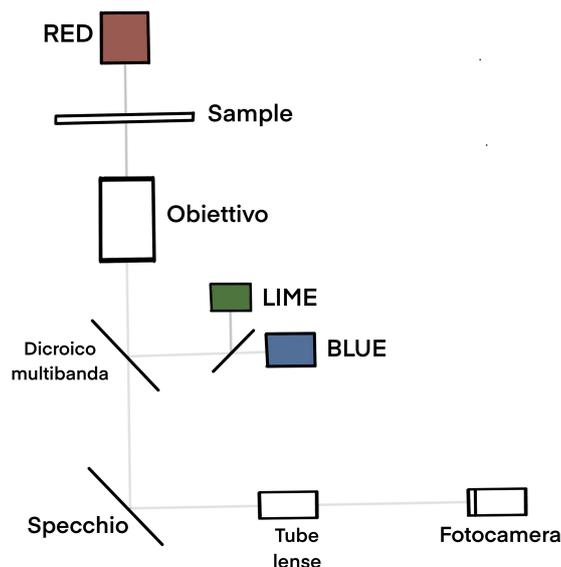


Figura 6.1: Schema del setup sperimentale utilizzato: si evidenzia la presenza dello *stage* su cui viene appoggiato il *sample*, dei tre LED necessari per l'osservazione e della fotocamera che raccoglie i dati. Compaiono anche il dicroico multibanda che indirizza BLUE e LIME, il filtro di emissione (nell'obiettivo indicato in Figura) che i segnali attraversano prima di essere riflessi dallo specchio per essere puliti e la lente a tubo (*tube lense*) in cui vengono focalizzati prima di arrivare alla telecamera.

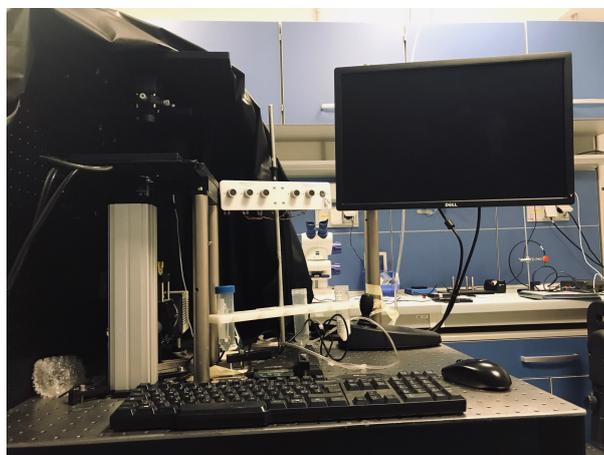


Figura 6.2: Foto dell'apparato sperimentale.

Lo stage viene direttamente illuminato in maniera non puntuale da un LED rosso che permette la visione degli animali. Per eccitare la fluorescenza di GCamP e mScarlet si utilizzano due LED a lunghezza d'onda rispettivamente 470 nm (BLUE) e 560 nm (LIME).

6.3.1 Chip

Il chip (il cui schema è mostrato in Figura 6.3) è costituito da un'arena dalle dimensioni di $3.2 * 3.1 \text{ mm}$ e un'altezza di $50 \mu\text{m}$, con al suo interno una struttura a 100 colonne (dette *pillar*) dal raggio di $100 \mu\text{m}$. Al suo interno possono essere contenuti circa $0.5 \mu\text{l}$ di fluido. Viene realizzato con una base in vetro su cui viene incollato chimicamente del PDMS (un polimero siliconico ad alta biocompatibilità) su cui è già stata creata una struttura microfluidica mediante *soft lithography*¹⁵ ed i seguenti fori:

- due per le microcannule che consentono l'ingresso dell'odorante; per quelle adibite allo scarico di odorante o buffer;
- uno per il canale di inserimento, detto *load*, attraverso il quale vengono iniettati i vermi nel chip.

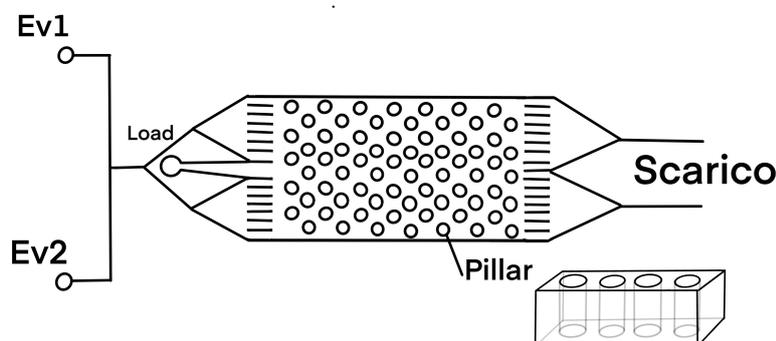


Figura 6.3: Schema del chip utilizzato per la raccolta delle serie temporali.

Il chip usato per le misure è di tipo *pulse-arena*: la struttura dei canali permette di alternare più liquidi in maniera temporalmente controllata (sono sufficienti uno o due secondi perchè ci sia un totale cambio di liquido nel chip). Ogni tipo di chip permette comunque il flusso in un solo verso attraverso il pavimento a colonne (la cui struttura evita che i vermi possano ammassarsi e di conseguenza rendere difficile l'identificazione delle attività neurali in corso).

¹⁵Si definisce *soft lithography* un insieme di tecniche usate per realizzare o replicare strutture (di solito nella scala di micrometri o nanometri) con elastomeri, ovvero polimeri gommosi come il PDMS.

Prima di ogni allestimento il chip va accuratamente pulito, data la sensibilità del *C. elegans* agli odori esterni, e de-gasificato in acqua sterile per evitare che lo stimolo olfattivo venga bloccato da una bolla d'aria.

6.3.2 Collegamenti

I cinque collegamenti sono costituiti da tubi di Tygon dal diametro $d = 0.0005 \text{ m}$ e lunghezza $l_1 = 0.5 \text{ m}$ per quelli tra chip e valvole che regolano il rilascio di odorante e buffer e $l_2 = 0.2 \text{ m}$ per quelli tra valvole e flaconi.

6.3.3 LED e specchi

Per le misure descritte in questa tesi si sono usati tre LED diversi, nel seguito descritti.

- RED: circa 660 nm . Viene usato per la visualizzazione degli animali attraverso la *bright-field microscopy*, ovvero la più semplice tecnica di illuminazione con microscopio ottico: l'oggetto viene illuminato dal basso, e dall'alto si osserva il contrasto dato dall'attenuazione della luce trasmessa nelle aree più dense dell'oggetto studiato.
- LIME: caratterizzato da una banda avente un massimo a 560 nm ma piuttosto larga: con un filtro MF542/20 si seleziona una banda $542 \pm 20 \text{ nm}$ per l'eccitazione della RFP. Questo LED eccita i tag fluorescenti nel rosso, in questo caso lo mScarlet (che emette a circa 585 nm). Viene utilizzato per identificare gli individui in cui la mutazione transgenica si è espressa, e non per studiarne l'attività dei neuroni.
- BLUE: caratterizzato da una banda avente un massimo a 470 nm : con un filtro MF475/35 si seleziona una banda $475 \pm 35 \text{ nm}$ per l'eccitazione della GFP. Eccita G-Camp (che emette a circa 505 nm) e permette di vedere l'attivazione dei neuroni che lo presentano. Infatti attraverso la misura di fluorescenza si monitora la concentrazione di calmodulina legata al calcio e si ha un'informazione indiretta sulla concentrazione di calcio.

Entrambi i filtri menzionati sono filtri di eccitazione¹⁶.

Entrambe le emissioni incontrano un dicroico multibanda MD498 della Thermolabs, un elemento ottico che trasmette alcune lunghezze d'onda e riflette le altre, come mostrato in Figura 6.4.

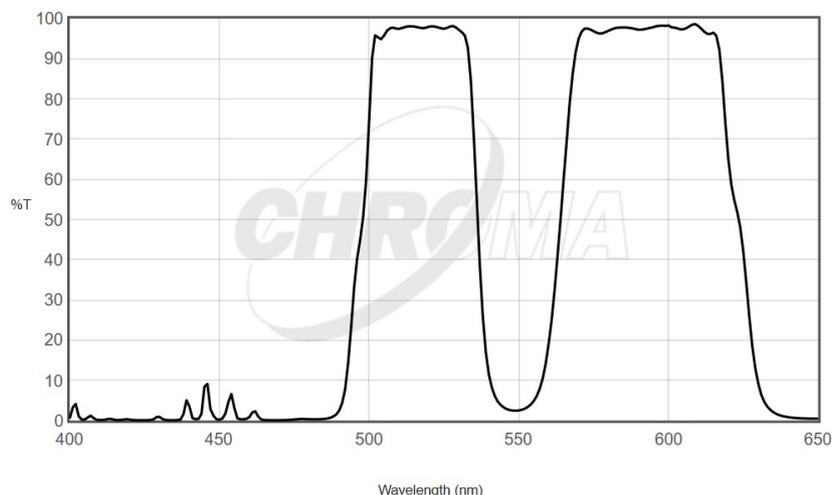


Figura 6.4: Funzionamento del dicroico multibanda.

In questo modo il dicroico riflette sia LIME che BLUE a 90° e li indirizza verso il chip, dove eccitano i fluorofori che riemettono a 505 nm (GFP) e 585 nm (RFP): entrambe le fluorescenze attraversano poi nuovamente il dicroico multibanda. Come appena detto, alle lunghezze d'onda di entrambe le fluorescenze questo lavora in trasmissione: la fluorescenza passa e viene rilevata da una Digital Camera CMOS (Complementary metal-oxide-semiconductor) Hamamatzu C11440 caratterizzata da un rapporto segnale-rumore¹⁷ molto buono (necessario per il *calcium imaging* in cui i segnali sono molto bassi) e un tempo di esposizione fino a 10 ms . Per questo studio è sufficiente registrare un'immagine ogni $200\ \mu\text{s}$ dopo che le radiazioni sono passate attraverso un ulteriore filtro 59004m della Chroma detto "filtro di emissione"¹⁸ (anch'esso utile a pulire il segnale), riflesse da uno specchio e focalizzate con una lente a tubo (*tube lense*).

Il filtro di emissione permette di eliminare parte del rumore luminoso. Bisogna infatti considerare, oltre alle fonti luminose esterne, il fatto che i filtri dicroici in realtà non

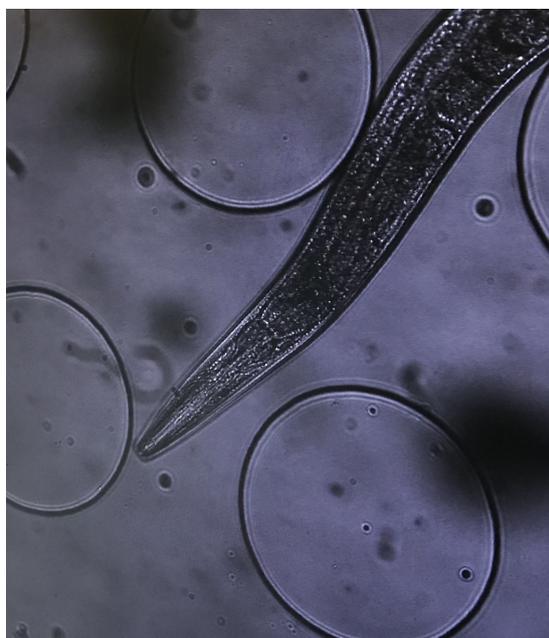
¹⁶Il filtro di eccitazione (chiamato anche eccitatore) trasmette solo quelle lunghezze d'onda della luce che eccitano efficientemente un colorante specifico.

¹⁷il rapporto segnale-rumore è una grandezza numerica che mette in relazione la potenza del segnale utile rispetto a quella del rumore del sistema di acquisizione.

¹⁸Il filtro di emissione attenua tutta la luce trasmessa dal filtro di eccitazione e trasmette la fluorescenza del campione.

arrestano mai completamente nessuna lunghezza d'onda: il segnale di risposta dovrebbe essere a soli 505 nm (emissione del G-Camp) e 585 nm (emissione mScarlet), ma ci si può avvicinare maggiormente a questo risultato solo aggiungendo questi filtri.

Figura 6.5 mostra gli effetti della illuminazione di LED di vari colori sul *C. elegans*.



C.

elegans illuminato da LED RED.



C.elegans illuminato da LED BLUE.



C.

elegans illuminato da LED LIME.

Figura 6.5: Effetto della illuminazione sul *C. elegans* dovuta a diversi LED (RED, BLUE, LIME).

6.4 Procedure di misura

Si comincia con l'inserimento dei vermi nel chip (circa una trentina per ognuna delle misure effettuate) e il loro lavaggio con buffer. Quindi i vermi vengono paralizzati (operazione necessaria perchè eventuali spostamenti complicherebbero il seguire l'attività del neurone) con Levamisol (tempo di azione pari a circa 30 minuti). Una volta individuati gli esemplari in cui è espressa la mutazione transgenica descritta in Sezione 6.2 si comincia la presa dati. Questa si articola in diverse fasi:

1. Sono fatti fluire nel chip per 10 s il buffer, per 30 s l'odorante (con concentrazione di alcohol $C_1 = 10^{-7} \text{ mol/dm}^3$) e di nuovo per 10 s il buffer.
2. Si prova a ridurre i tempi di buffer e odorante e si verifica il minimo arco temporale in cui è rilevabile una buona risposta, ovvero dei picchi distinguibili nella fluorescenza dei neuroni, ripetendo per tre volte l'apertura della valvola dell'odorante.
3. Utilizzando i periodi minimi ottimali trovati si sfrutta lo stimolo olfattivo con concentrazione di alcohol $C_2 = 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ e il protocollo di stimolazione è ripetuto per $n = 10$ periodi.
4. Utilizzando sempre i periodi minimi ottimali trovati si passa all'utilizzo della concentrazione di alcohol $C_1 = 10^{-7} \text{ mol/dm}^3$ e il protocollo di stimolazione è ripetuto per $n = 10$ periodi.
5. Si alternano le due concentrazioni C_1 e C_2 , senza più impiegare il buffer in modo da studiare la variazione della risposta dei neuroni in funzione della differenza di stimolo esterno. Si ripete la stimolazione per $n = 10$ periodi.
6. Per studiare la risposta neurale a una variazione di pressione si comincia con il metodo *gentle touch*: vengono alternati flussi di Sbasal a diverse pressioni (di cui si può solo variare l'intensità senza però conoscerne il valore) grazie al controllo dei servomotori¹⁹ su delle viti che stringono il tubo in circa 1 s.
7. Per proseguire lo studio sulla risposta allo stimolo pressorio si passa al procedimento *harsh touch*: i cambi di pressione vengono resi più bruschi grazie all'utilizzo delle

¹⁹Un servomotore è un tipo di motore, generalmente di piccola potenza, in grado di adattarsi molto velocemente a variazioni di velocità o coppia motrice.

elettrovalvole, dispositivi che strozzano i tubi in decimi di secondo. Anche in questo caso però non si conosce il valore esatto della variazione.

Per ciascuna presa dati si ha a disposizione come segnale di stimolo un'onda quadra la cui intensità non è regolabile, così come non è misurabile la pressione esercitata. Nei primi quattro casi al segnale nullo corrisponde la valvola del buffer aperta, altrimenti la valvola aperta è quella dell'odorante. Nel quinto caso si è usata una giunzione a T collegata a due flaconi ciascuno contenente una delle due diverse concentrazioni, e come nei casi precedenti a segnale nullo corrisponde l'apertura di una delle due parti della giunzione, altrimenti dell'altra.

Viene quindi fotografata la fluorescenza dei neuroni AWC e AIY ogni 200 μs . A partire da queste foto si costruiscono delle curve temporali di fluorescenza.

6.5 Acquisizione dati

Tutto il sistema è controllabile via software grazie ad un sistema di acquisizione dati (DAQ) che comunica con la CMOS e accende i LED che l'operatore desidera. Si utilizza un convertitore analogico-digitale per fornire al sistema una maschera di 0/1 che viene mandata a ogni clock - ogni step della matrice vale 100 μs - della DAQ e che regola il comportamento dei cinque sistemi qui di seguito elencati (a ogni colonna della matrice corrisponde un canale collegato a uno dei cinque sistemi) :

1. Valvola odorante (si ricorda che nella quinta presa dati la valvola regola l'erogazione di due diverse concentrazioni provenienti da due diversi flaconi con una giunzione a T);
2. Valvola buffer;
3. LED RED;
4. LED BLUE;
5. CMOS.

Il CMOS registra 1 frame ogni $200 \mu s$. Per prima cosa si calcola il fondo facendo la media dei primi dieci clock di ogni ciclo di somministrazione di odorante, quando la maschera dà segnale al LED BLUE (per l'eccitazione del G-Camp) di rimanere chiuso. Il fondo viene sottratto a ogni frame successivamente raccolto per ottenere un segnale il più possibile pulito.

Per quanto detto nella Sezione 6.6 si sceglie di non indicare come neuroni da seguire AIY e AWC, ma piuttosto dei punti che non mostrano cambiamenti in luminosità durante la misura ma hanno una fluorescenza abbastanza intensa per tutta la sua durata. Quindi nel frame dove si selezionano i neuroni di interesse (solitamente qualche frame dopo che l'odorante viene tolto, così che tutti i neuroni siano abbastanza visibili) si danno al codice le coordinate di AIY, AWC (presumendo che siano abbastanza visibili nel frame in questione) e dei due neuroni di riferimento, BAG e URX. Si calcola quindi la distanza di AWC e AIY rispetto a BAG e URX e si seguono i punti a questa stessa distanza anziché direttamente i due neuroni di cui si vuole studiare l'attività visto che quando questa diminuisce oltre un certo valore diventa indistinguibile dal rumore. Per studiare la variazione percentuale di fluorescenza è necessario calcolare anche il valore di *baseline* F_0 , utilizzato nell'equazione 8.1, corrispondente alla fluorescenza del neurone a riposo. Quindi il codice seleziona delle ROI (*Region Of Interest*) attorno a queste coordinate (che variano frame per frame), all'interno delle quali segue le coordinate indicate. In pratica effettua un "ritaglio" di $10 * 10 \text{ pixel}$ e calcola la fluorescenza del neurone in assenza di stimolo e sotto stimolo facendo la media su tutti i pixel inclusi. Viene infine applicato un filtro gaussiano che fa una media ogni tre pixel per eliminare il più possibile il rumore.

6.6 Difficoltà e possibili miglioramenti

Le misure effettuate hanno risentito di qualche difficoltà, legate al fatto che anche i neuroni inizialmente più visibili con il tempo mostrano una fluorescenza sempre più bassa, data la sempre più lunga esposizione alla luce o al LED BLUE. Quindi anche nelle situazioni più ottimali è difficile seguire la variazione di fluorescenza sia ad occhio sia con l'apposito programma (si veda la sezione 6.5), e anche se si è posto un parziale rimedio usando la triangolazione, anche questo metodo non riesce a seguire perfettamente i neuroni.

Contrariamente a quanto atteso invece la visione del AIY (che si ricorda esprime G-Camp solo su dendriti e assone) non si è rivelata più difficoltosa di quella del AWC, pur essendo quest'ultimo a espressione genetica nucleare per quanto riguarda il tag fluorescente. Questo grazie alla curva seguita dai suoi collegamenti: nel punto in cui la sinapsi passa sopra se stessa la fluorescenza è facilmente misurabile.

6.7 Risultati delle misure

Nelle figure da 6.6 a 6.11 si riporta per ognuna delle prese dati effettuate, le curve di fluorescenza per mostrare il comportamento di AWC e AIY a seconda dello stimolo. Già guardando i segnali raccolti nei vari tipi di misure si ha la conferma di quanto descritto in Sezione 5.2: in ogni misura i due segnali di AWC e AIY sono in antifase ed è chiaro che il comportamento di uno è collegato a quello del secondo, come già discusso in Sezione 5.2.0.2. Obiettivo dell'analisi vorrebbe essere la dimostrazione dell'esistenza di questo rapporto di causalità. Una volta visualizzati i grafici dei dati raccolti, risulta anche chiaro come per entrambi i neuroni al segnale vero e proprio si sovrapponga del rumore a una frequenza maggiore. Dato che per lo studio della causalità non è utile guardare il rumore, questi segnali vengono ulteriormente "puliti", seguendo il procedimento descritto in Sezione 7.1. Per mostrare quindi le curve sulle quali effettivamente vengono applicati i modelli regressivi su cui si basa questo lavoro di tesi, a ciascun segnale viene sovrapposto il segnale filtrato, vero soggetto dell'analisi. Come approfondito in Sezione 7.1 per ogni segnale viene selezionata una frequenza di taglio normalizzata (ripetto alla frequenza di campionamento) dal valore di 0.16.

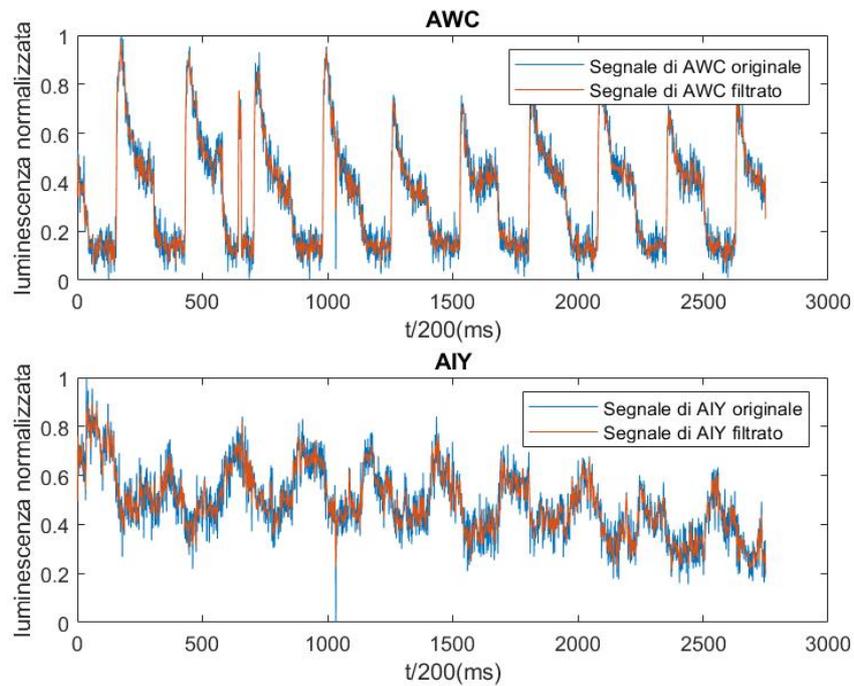


Figura 6.6: In alto: risposta di AWC agli odoranti C_1 e C_2 alternati. In basso: quella di AIY. Per entrambe la linea rossa mostra la sovrapposizione dei segnali filtrati.

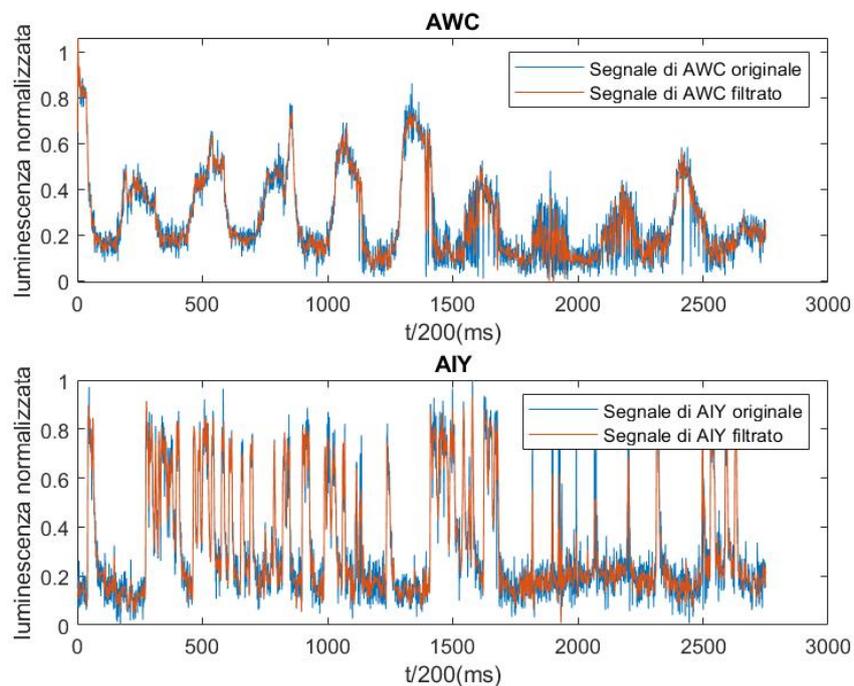


Figura 6.7: In alto: risposta di AWC all'odorante C_2 ripetuto dieci volte. In basso: quella di AIY. Per entrambe la linea rossa mostra la sovrapposizione dei segnali filtrati.

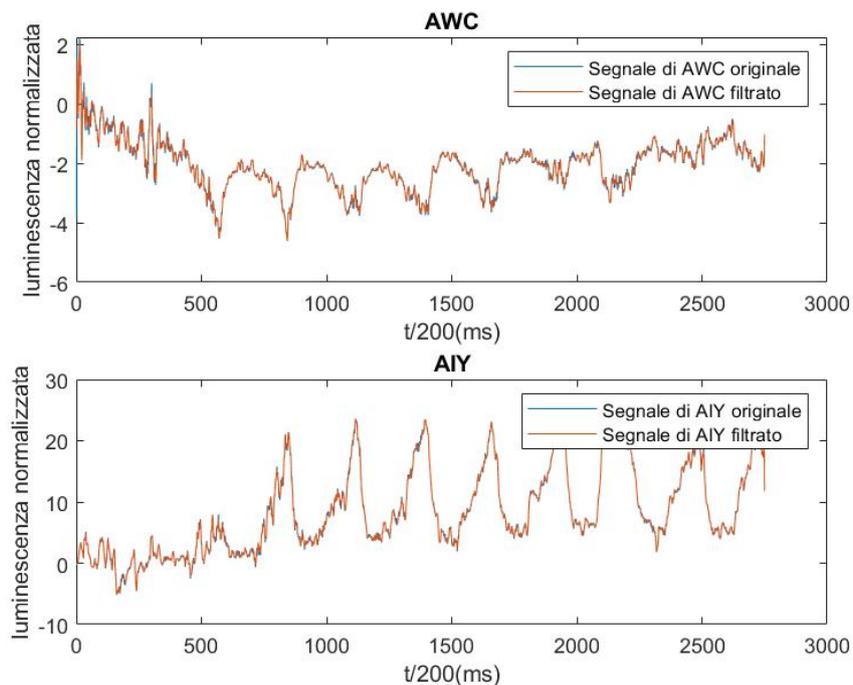


Figura 6.8: In alto: risposta di AWC allo stimolo con odorante C_1 ripetuto 10 volte. In basso: quella di AIY. Per entrambe la linea rossa indica la sovrapposizione dei segnali filtrati.

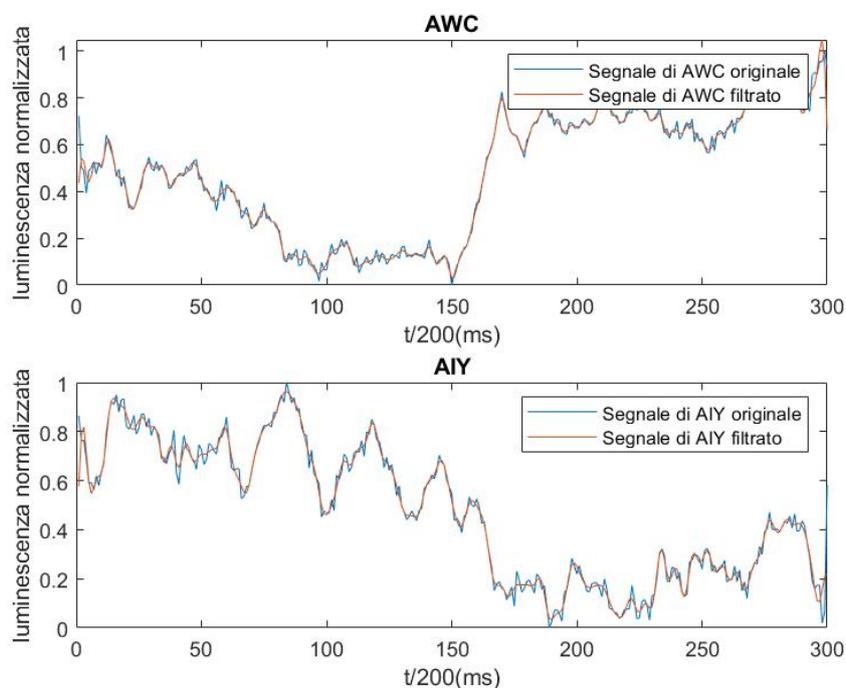


Figura 6.9: In alto: risposta di AWC allo stimolo con odorante C_1 ripetuto una sola volta. In basso: quella di AIY. Per entrambe la linea rossa mostra la sovrapposizione dei segnali filtrati.

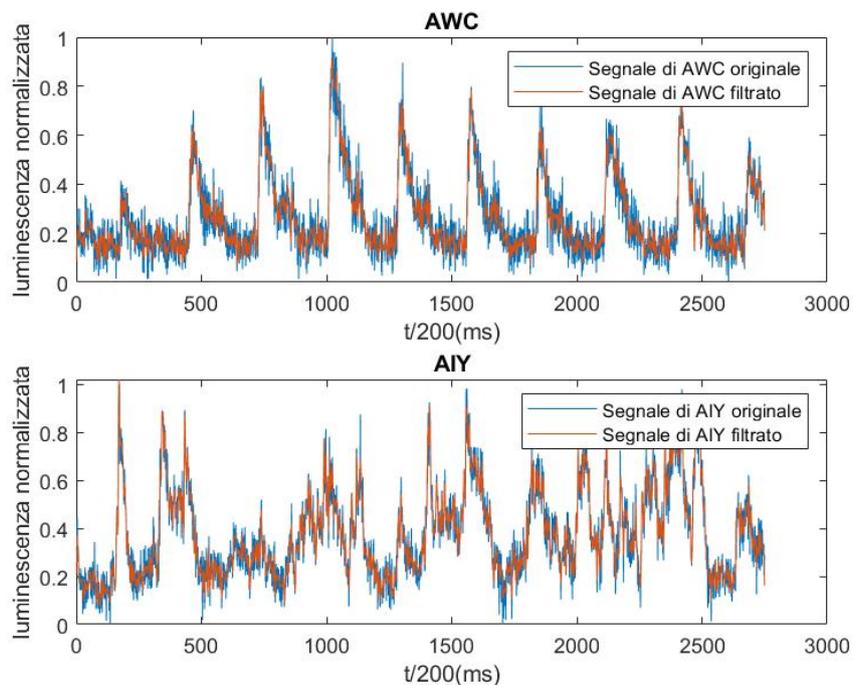


Figura 6.10: In alto: risposta di AWC allo stimolo con variazione di pressione con metodo *gentle touch*. In basso: quella di AIY. Per entrambe la linea rossa indica la sovrapposizione dei segnali filtrati.

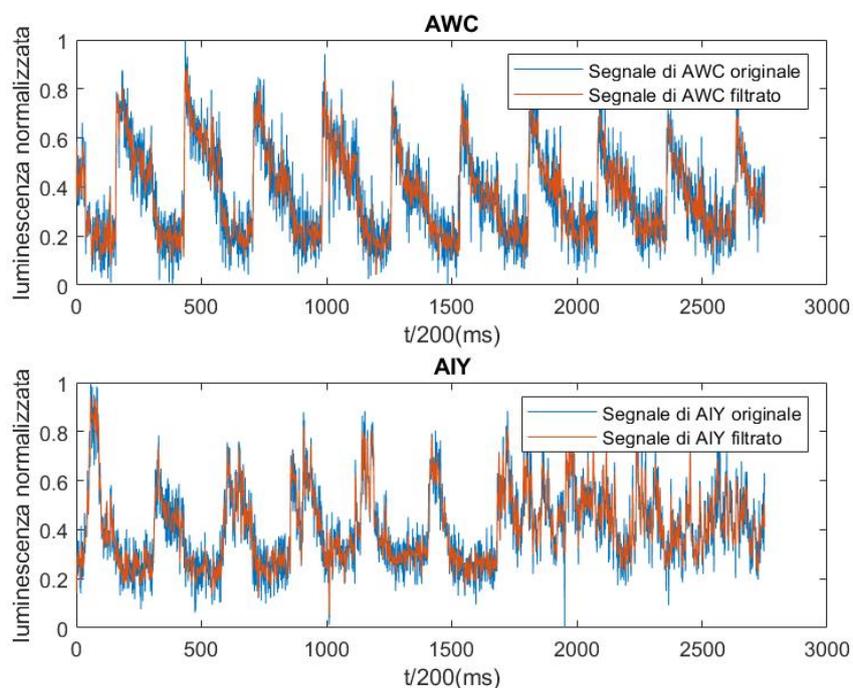


Figura 6.11: In alto: risposta di AWC allo stimolo con variazione il metodo *harsh touch*. In basso: quella di AIY. Per entrambe la linea rossa indica la sovrapposizione dei segnali filtrati.

7 Algoritmi e modelli utilizzati

Qui di seguito vengono discussi gli algoritmi e i modelli sviluppati per l'analisi descritta in Sezione 8.

7.1 Filtraggio

Per "pulire" i segnali e permettere uno studio più preciso del comportamento dei neuroni e della loro eventuale reciproca influenza si vuole guardare il più possibile all'effettiva attività neurale: si è quindi effettuato un filtraggio di entrambi i segnali di AWC e AIY utilizzando un filtro passa-basso²⁰. Per individuare la frequenza di taglio da utilizzare, si sono graficati gli spettri di potenza di entrambi i segnali in funzione della frequenza normalizzata (rispetto alla frequenza di campionamento, in modo che nel grafico al valore 0.5 in ascisse corrisponda la frequenza di Nyquist²¹).

La densità di potenza corrispondente ad una certa frequenza k è data da:

$$S_k = \frac{F_k^2}{N} \quad (7.1)$$

dove N è il numero di dati e F_k è la Trasformata di Fourier Discreta (DCT) la cui espressione è:

$$F_k = \sum_{n=0}^{N-1} y_n e^{-\frac{2\pi i k n}{N}} \quad (7.2)$$

Da questi grafici guardando i valori per cui la pendenza del grafico diminuisce, si sono scelte le frequenze di taglio utilizzate per la funzione di libreria di Matlab *lowpass*.

7.1.0.1 Lowpass

Questa funzione filtra il segnale in entrata utilizzando un filtro passa-basso in frequenze normalizzate. Questo filtro è caratterizzato da un'attenuazione delle frequenze al di sopra

²⁰Si dice passa-basso un filtro che permette unicamente il passaggio di frequenze al di sotto di una data soglia, detta frequenza di taglio.

²¹Si dice frequenza di Nyquist quella corrispondente a metà della frequenza massima.

di quella di taglio pari a 60 dB. Per tutte le coppie di serie in analisi è risultato sufficiente prendere come frequenza di taglio normalizzata il valore di 0.16 per eliminare il rumore.

7.2 Modello AR

Una volta puliti i segnali si vuole individuare l'ordine m del modello AR:

$$y'(t) = a_1y(t-1) + a_2y(t-2) + \dots + a_my(t-m) \quad (7.3)$$

che meglio prevede i dati sperimentali $y(t)$ raccolti osservando la risposta del neurone AWC a uno stimolo esterno, e il valore dei parametri a_1, a_2, \dots, a_m . Si vuole poi calcolare la media dei quadrati residui mqr_{AR} del modello AR(m) rispetto alla serie di AIY, definita come:

$$mqr_{AR} = \frac{\sum_{i=1}^{N-m} (\tilde{y}_i - y'_i)^2}{N-m} \quad (7.4)$$

dove con $N-m$ si indica il numero di punti che costituiscono il modello e con \tilde{y} il vettore ottenuto togliendo al vettore che contiene gli N dati sperimentali, y , i primi m valori.

7.2.1 Individuazione dei parametri

Poichè a priori non è noto l'ordine m del modello, si è sviluppato un codice che dato un certo valore massimo (*par1*) itera il processo di seguito descritto per ogni numero di parametri da 1 a *par1*. Per individuare i parametri migliori per ciascun ciclo di questa iterazione si è fatto ricorso alla funzione di libreria di Matlab *regress*, che fornisce in uscita i parametri corrispondenti al modello dell'ordine desiderato della serie in ingresso e per ciascuno di essi l'intervallo di confidenza al 95% (corrispondente a due σ).

7.2.1.1 Regress

Questa funzione dà in uscita un vettore di coefficienti ricavati da una regressione lineare multipla:

$$Y = \beta X \quad (7.5)$$

in cui Y è un vettore dato da:

$$\begin{pmatrix} y(1 + m') \\ y(2 + m') \\ \vdots \\ y(N) \end{pmatrix}$$

dove m' è l'ordine del modello AR preso in considerazione. β è il vettore in uscita dei parametri, contenente m' elementi, e X una matrice pari a:

$$\begin{pmatrix} y(1 + m' - 1) & y(1 + m' - 2) & \cdots & y(1) \\ y(2 + m' - 1) & y(2 + m' - 2) & \cdots & y(2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \\ y(N - 1) & y(N - 2) & \cdots & y(N - m') \end{pmatrix}$$

Il vettore dei parametri si ricava con il metodo dei minimi quadrati.

7.2.2 Ordine del modello

È quindi necessario individuare il numero di parametri che assicurano il miglior fit possibile, ovvero quelli che minimizzano la differenza tra modello e dati sperimentali. A questo scopo, per ogni valore dell'ordine del modello AR, si è studiato l'istogramma dei residui (ovvero delle differenze tra ciascun dato sperimentale e quello derivante dal modello usando i parametri migliori per l'ordine considerato). Per ognuno di questi istogrammi si è calcolata la media dei quadrati residui tra istogramma e gaussiana che meglio ne segue l'andamento. Nel caso dell'utilizzo di pochi parametri (ovvero per un ordine del modello troppo basso) l'istogramma dei residui dovrebbe presentare un picco e dei valori molto lontani da quest'ultimo, come mostrato in Figura 7.1, dove si vede l'istogramma dei residui per il modello AR(1) applicato ai segnali di Figura 6.9.

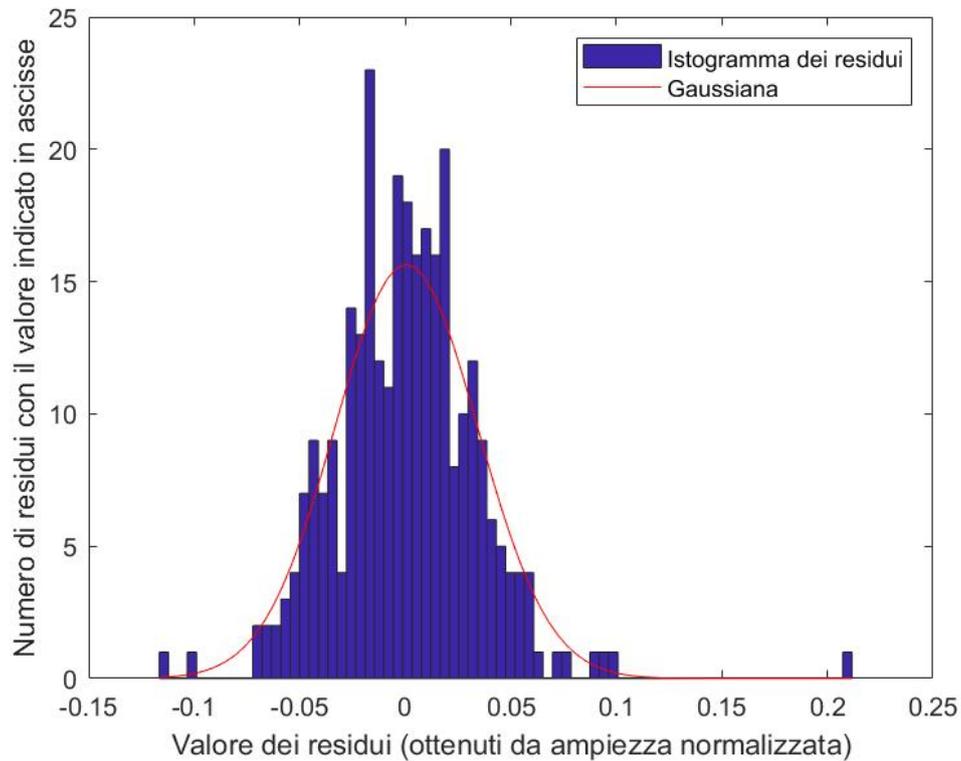


Figura 7.1: Istogramma dei residui ottenuti applicando il modello AR(1) al segnale di AIY di Figura 6.9. In rosso la Gaussiana che meglio descrive l'istogramma.

Per il numero di parametri corrispondente all'ordine del miglior modello AR possibile l'istogramma dei residui segue meglio un andamento gaussiano. Figura 7.2 mostra l'istogramma dei residui che si ottiene per il modello AR migliore, in questo caso AR(4), e la Gaussiana sovrapposta.

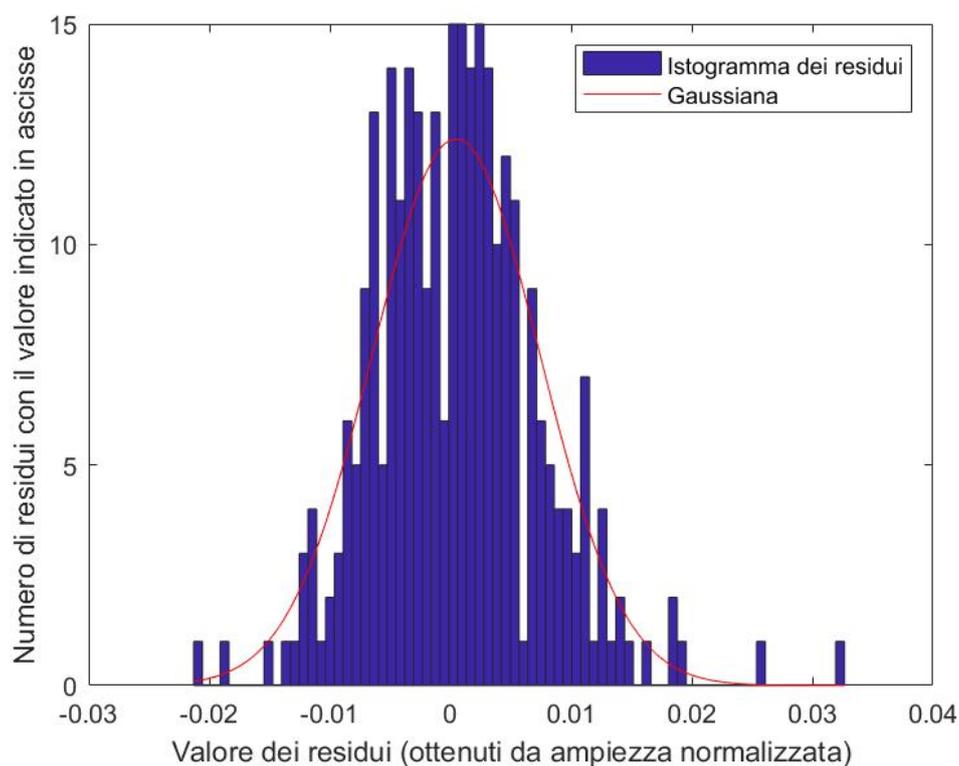


Figura 7.2: Istogramma dei residui ottenuti applicando il modello AR(4) al segnale di AIY di Figura 6.9. In rosso la Gaussiana che meglio descrive l'istogramma.

Nel caso invece si utilizzi un numero troppo alto di parametri l'istogramma presenta una distribuzione non propriamente gaussiana, come mostrato in Figura 7.3, dove si vede l'istogramma dei residui per il modello AR(60) applicato ai segnali di Figura 6.9.

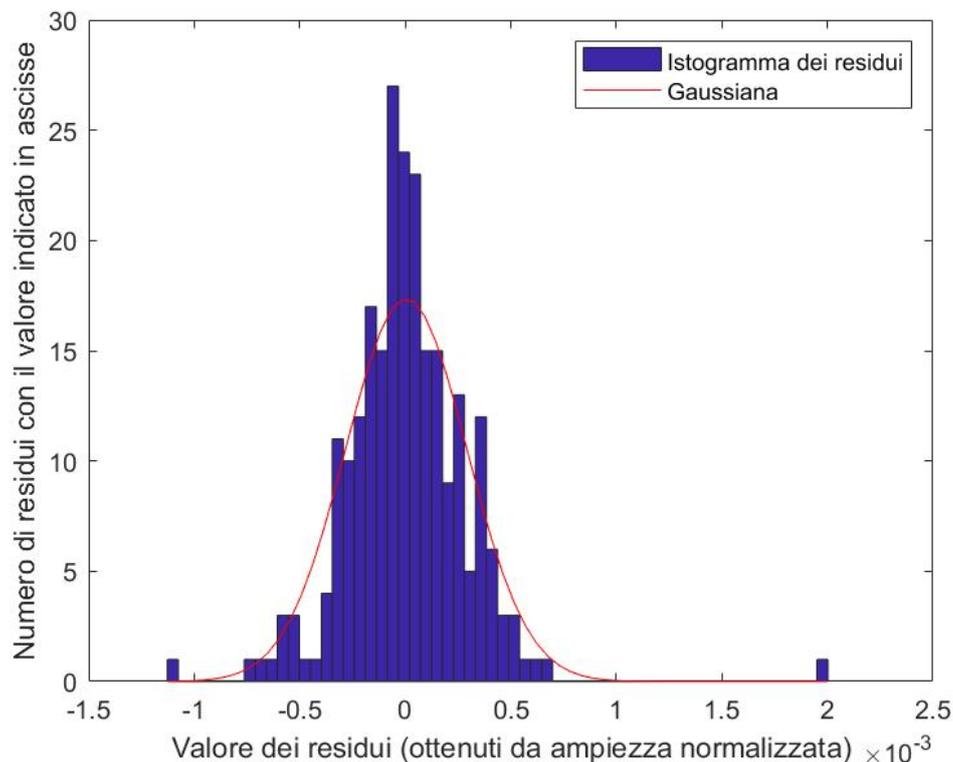


Figura 7.3: Istogramma dei residui ottenuti applicando il modello AR(10) al segnale di AIY di Figura 6.9. In rosso la Gaussiana che meglio descrive l'istogramma.

L'istogramma dei residui del modello dall'ordine migliore dovrebbe essere quello che meglio è descritto da una funzione gaussiana. Quindi facendo un grafico che mostri l'andamento della media dei quadrati residui tra modello e Gaussiana in funzione dell'ordine del modello si distingue un punto in cui si ha il primo minimo: a questo punto corrisponde l'ordine del miglior modello AR possibile.

7.3 Modello ARMA

Una volta ottenuto il modello AR dall'ordine migliore m e i parametri che lo ottimizzano si inizia una nuova analisi che tiene conto anche della serie temporale data dalla risposta allo stimolo olfattivo del neurone AWC per prevedere quella data da AIY, sfruttando il modello ARMA. Il programma esegue dei cicli in cui prende mano a mano ordini minori della parte AR rispetto all'ordine ottimale trovato. Per ciascun ordine viene eseguito un altro ciclo per diversi ordini della parte MA da aggiungere per ottenere il modello ARMA di cui poi si studierà l'accordo con i dati sperimentali del neurone AIY.

7.3.1 Scelta dei parametri

Per ciascuna coppia di valori p, q è necessario individuare i parametri di quel modello ARMA(p, q). Per farlo si sfrutta di nuovo la funzione di libreria di Matlab *Regress*. In questo caso Y è un vettore del tipo:

$$\begin{vmatrix} y(1 + M') \\ y(2 + M') \\ \vdots \\ y(N) \end{vmatrix}$$

dove il valore di M' dipende dal modello considerato. Se l'ordine della parte AR è maggiore di quello della parte MA allora M' =ordine della parte AR. In caso contrario M' =ordine della parte MA-1. Questo perchè il modello MA considera i dati dell'altra serie a partire da quello contemporaneo. Anche la matrice X dipenderà da questo, e sarà quindi espressa come:

$$\begin{vmatrix} y(1 + M' - 1) & \cdots & y(1 + M' - m') & x(1 + M') & \cdots & x(1 + M' - q') \\ y(2 + M' - 1) & \cdots & y(2 + M' - m') & x(2 + M') & \cdots & x(2 + M' - q') \\ \vdots & \ddots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ y(N - 1) & \cdots & y(N - m') & x(N) & \cdots & x(N - q') \end{vmatrix}$$

dove x è la serie temporale corrispondente all'attività del neurone AWC mentre q' è l'ordine della parte MA presa in considerazione. In questo caso il vettore β contiene $m' + q'$ elementi.

7.4 Confronto

Si trovano i valori delle medie dei quadrati residui per ciascun modello, definiti sempre come nell'equazione 7.4. Per concludere, si produce un plot per ogni valore della parte AR dei modelli presi in considerazione. In ciascuno di questi plot compare il valore numerico della media dei quadrati residui per il miglior modello AR in legenda, il valore della media dei quadrati residui ottenuta per il modello AR di quell'ordine (un valore costante che non

dipende dalle ascisse) e la media dei quadrati residui dei modelli ARMA il cui ordine della parte AR è quello dichiarato per quel plot, mentre quello della parte MA viene indicato dalle ascisse.

7.5 Verifica della correttezza dell'analisi

Prima di studiare le serie temporali raccolte, allo scopo di verificare il corretto funzionamento del programma si analizzano due casi molto semplici e facili da controllare, qui di seguito elencati:

- Una serie descritta da una funzione sinusoidale, descritta in Sezione 7.5.1;
- Una serie descritta da un moto armonico forzato e dalla sua forzante, descritta in Sezione 7.5.2.

7.5.1 Test sulla funzione seno

La prima verifica è stata eseguita su una funzione sinusoidale y , con frequenza $\omega = \frac{\pi}{10} \frac{1}{s}$ e costruita con 3000 punti, campionati ogni decimo di secondo. In generale l'equazione di un moto armonico è data da:

$$\frac{d^2y}{dt^2} = -\omega^2 y \quad (7.6)$$

con ω pari alla frequenza di oscillazione del sistema. Usando l'espansione:

$$\begin{aligned} y(t + \Delta t) + y(t - \Delta t) &\approx \left[y(t) + \frac{dy}{dt} \Delta t + \frac{1}{2} \frac{d^2y}{dt^2} \Delta t^2 \right] + \left[y(t) - \frac{dy}{dt} \Delta t + \frac{1}{2} \frac{d^2y}{dt^2} \Delta t^2 \right] \\ &\approx 2y(t) + \frac{d^2y}{dt^2} \Delta t^2 \end{aligned} \quad (7.7)$$

Si trova:

$$\frac{d^2y}{dt^2} \approx \frac{y(t + \Delta t) - 2y(t) + y(t - \Delta t)}{\Delta t^2} \quad (7.8)$$

Quindi:

$$\frac{y(t + \Delta t) - 2y(t) + y(t - \Delta t)}{\Delta t^2} \approx -\omega^2 y(t) \quad (7.9)$$

$$y(t + \Delta t) = (2 - \Delta t^2 \omega^2)y(t) - y(t - \Delta t) \quad (7.10)$$

Da cui si ottiene infine la relazione lineare autoregressiva:

$$y_{n+1} = (2 - \Delta t^2 \omega^2)y_n - y_{n-1} \quad (7.11)$$

Che descrive un modello AR(2) con valore dei parametri:

$$\begin{aligned} par1 &= 2 - \Delta t^2 \omega^2 \\ par2 &= -1 \end{aligned} \quad (7.12)$$

Si vuole verificare che applicando il metodo AR alla funzione sinusoidale y siano sufficienti due parametri per una perfetta previsione della funzione, come mostrato dall'equazione 7.11, e che questi abbiano gli stessi valori dati dalla 7.12.

Nel caso in esame, dove si è scelto $\omega = \frac{\pi}{10} \frac{1}{s}$, si avrebbe dunque $2 - \omega^2 \Delta t^2 = 1.9990$, con $\Delta t = \frac{1}{10} s$. Applicando il modello AR(2) si trova 1.9990 con una precisione perfetta in un intervallo di confidenza al 95%. Si dimostra così che una funzione sinusoidale può essere prevista con due soli parametri, che se moltiplicano i due dati subito precedenti a quello studiato hanno il valore dato dall'equazione 7.11. La Figura 7.4 mostra appunto la perfetta sovrapposizione alla funzione y del modello AR(2).

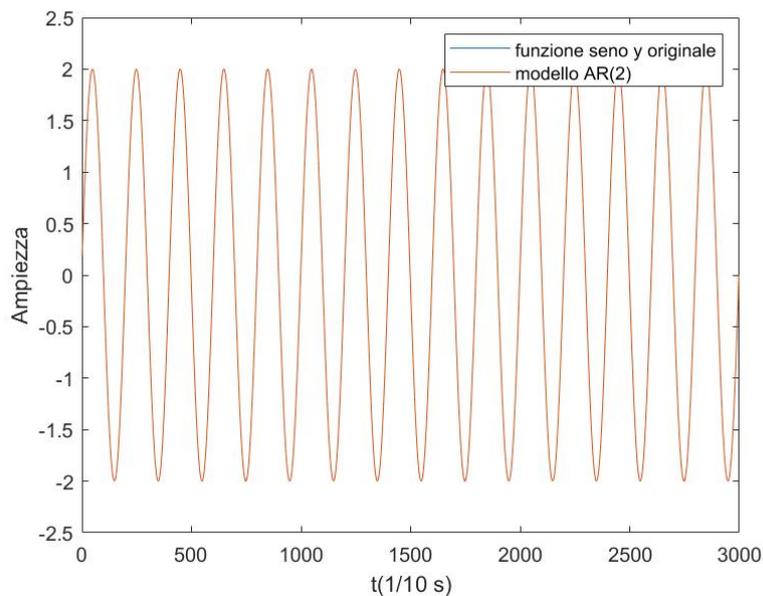


Figura 7.4: Confronto tra la funzione y (linea blu) e modello AR(2) (linea rossa).

Come seconda verifica, a y si sovrappone del rumore bianco di media $\mu = 0$ e deviazione standard $\sigma = 0.3$, ottenendo la funzione mostrata in Figura 7.5. Si applica quindi il metodo AR, per prevedere dai suoi stessi dati nel passato la funzione sinusoidale y avendo sovrapposto ad essa del rumore.

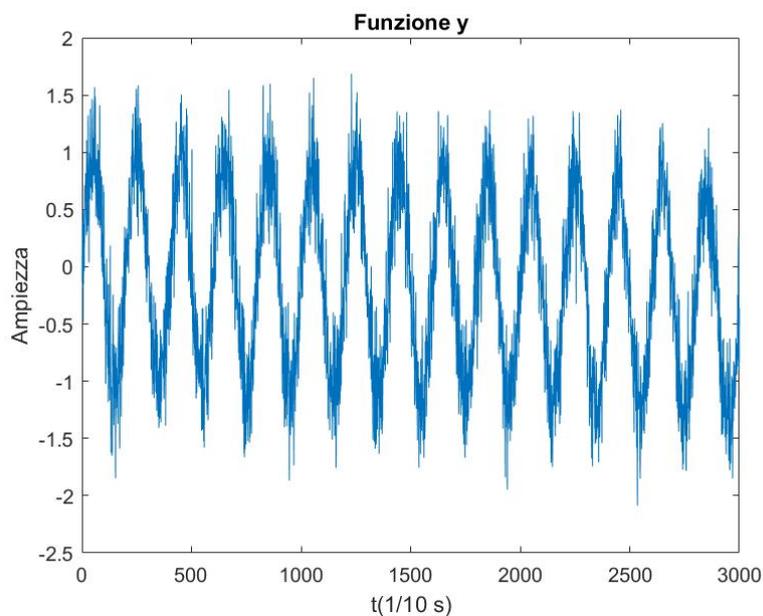


Figura 7.5: Funzione sinusoidale y con frequenza $\frac{\pi}{10} \frac{1}{s}$ alla quale è stato sovrapposto rumore bianco con media $\mu = 0$ e deviazione standard $\sigma = 0.3$.

Si trova che in questo caso il numero di parametri necessari per il metodo AR è pari a cinque.

Si nota che la deviazione standard σ_g della Gaussiana che meglio descrive il miglior modello AR ha valore $\sigma_g = 0.3295$, che corrisponde alla deviazione standard del rumore bianco $\sigma = 0.3$ aggiunto alla funzione y .

I parametri, con relative deviazioni standard, trovati in questo caso sono mostrati in Tabella 7.1:

Parametro	Valore numerico del parametro	σ
par1	0.19	0.02
par2	0.22	0.02
par3	0.20	0.02
par4	0.17	0.02
par5	0.17	0.02

Tabella 7.1: Lista dei parametri trovati con il modello AR(5) per la funzione mostrata in Figura 7.5, loro valore numerico e per ciascuno valore della deviazione standard σ

La Figura 7.6 mostra il confronto tra la funzione y con il rumore bianco sovrapposto (linea blu) ed il modello AR(5) (linea rossa).

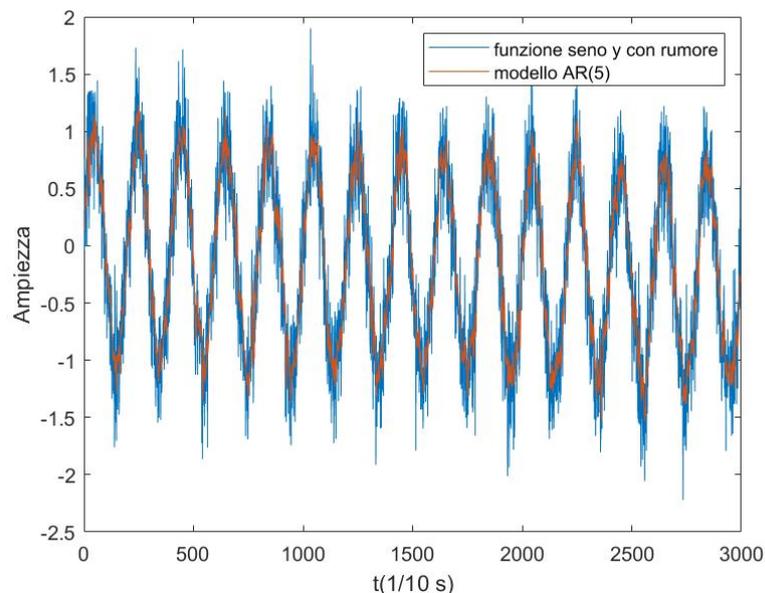


Figura 7.6: Confronto tra la funzione y con sovrapposto del rumore bianco (linea blu) e il modello AR(5) (linea rossa).

7.5.2 Test su un oscillatore armonico forzato

Come ultima verifica del buon funzionamento del programma, si applica l'algoritmo a un moto armonico forzato, con un'accelerazione caratterizzata da una variazione temporale sinusoidale data da:

$$x'(t) = B \cos(\omega_2 t) \quad (7.13)$$

dove B è l'ampiezza e ω_2 la frequenza.

In generale si ha che, data una forzante del tipo:

$$F(t) = A e^{i\omega t} \quad (7.14)$$

dove A è l'ampiezza e ω la frequenza, e un moto armonico forzato del tipo:

$$x(t) = X e^{i\omega_0 t} \quad (7.15)$$

con ampiezza X e frequenza ω_0 , l'equazione del moto è descritta da:

$$m \frac{d^2 x}{dt^2} = -\gamma \frac{dx}{dt} - \omega_0^2 m x + F(t) \quad (7.16)$$

$$F(t) = m \frac{d^2 x}{dt^2} + \gamma \frac{dx}{dt} + \omega_0^2 m x \quad (7.17)$$

$$-m\omega^2 X + i\omega\gamma X + \omega_0^2 m X = A \quad (7.18)$$

Da cui si ricava infine:

$$X = \frac{A}{m(\omega_0^2 - \omega^2) + i\omega\gamma} \quad (7.19)$$

Considerando quindi un moto armonico che viene sottoposto a un'accelerazione con variazione temporale sinusoidale data dalla funzione 7.13, il moto armonico forzato che ne risulta è descritto in campo reale da:

$$y'(t) = \frac{B}{\omega_1^2 - \omega_2^2} \cos(\omega_2 t + \phi) \quad (7.20)$$

dove ω_1 è la frequenza propria di oscillazione dell'oscillatore armonico sottoposto alla forza.

In questo esempio si considerano serie da 3000 punti, campionate ogni $\frac{1}{10}$ s, e caratterizzate da frequenze dal valore $\omega_1 = 0.008\pi \frac{1}{s}$ e $\omega_2 = 0.07\pi \frac{1}{s}$. Innanzitutto si nota come, per quanto riguarda il modello AR (previsione della serie y' dai suoi stessi dati passati) si trovino sempre due soli parametri diversi da zero. Considerando il modello AR(2) i risultati numerici sono in linea con le aspettative teoriche date dall'equazione 7.11. Nel caso in esame si avrebbe dunque $2 - \omega_2^2 \Delta t^2 = 1.9995$, con appunto $\Delta t = \frac{1}{10}$ s. Applicando il metodo AR i valori dei parametri risultano uguali a $par_1 = 1.9995$ e $par_2 = -1$, analiticamente precisi entro un intervallo di confidenza al 95% confermando quanto espresso dalla formula 7.11.

Si passa poi al modello ARMA, per cercare di dimostrare la causalità che sussiste tra il moto armonico forzato y' e la forzante x' . Per farlo si considerano anche i dati passati della serie x' in un modello ARMA in cui si considera un solo dato della y' stessa (AR(1)): se esiste un ordine della parte MA per cui questo modello ARMA raggiunge la precisione del modello AR(2), si può pensare di aver dimostrato la causalità. In Figura 7.7 si vede innanzitutto come il modello AR(1), la cui media degli scarti quadrati compare nel valore numerico in legenda, non sia assolutamente sufficiente a prevedere i dati sperimentali. Aggiungendo dati della serie x' la media dei quadrati residui diminuisce rispetto a quella del modello AR(1) e anche rispetto a quella del modello AR(2), indicata dalla linea rossa.

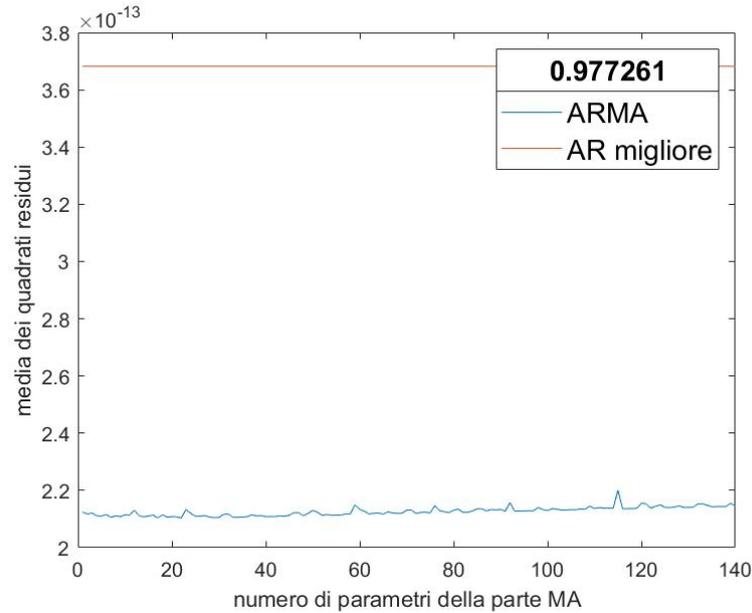


Figura 7.7: In blu: media dei quadrati residui dei modelli $ARMA(p,q)$ con $p=1$ e q indicato nelle ascisse. In rosso: valore della media dei quadrati residui del modello $AR(2)$. Il valore numerico in legenda indica la media degli quadrati residui del modello $AR(1)$.

La Figura 7.8 mostra la sovrapposizione tra la funzione originale y' definita dall'equazione 7.20 e il modello $ARMA(1,1)$. L'accordo è ottimo.

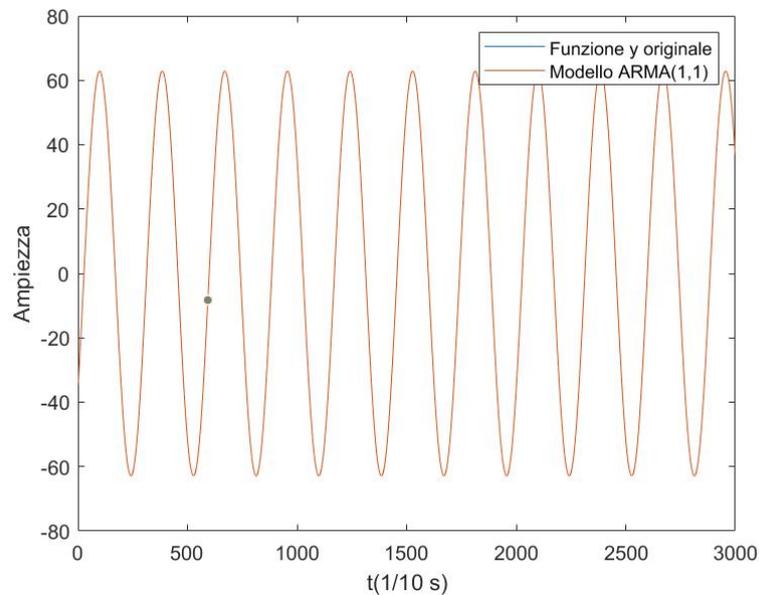


Figura 7.8: Confronto tra la funzione originale y' definita dall'equazione 7.20 (linea blu) e modello $ARMA(1,1)$ (linea rossa).

Per concludere, si considerano due nuovi segnali, y'' e x'' , ottenuti sovrapponendo alle

funzioni y' e x' del rumore bianco, di media $\mu = 0$ e deviazione standard rispettivamente $\sigma_{x''} = 0.3$ e $\sigma_{y''} = 10.0$. In Figura 7.9 vengono mostrati i due nuovi segnali così ottenuti.

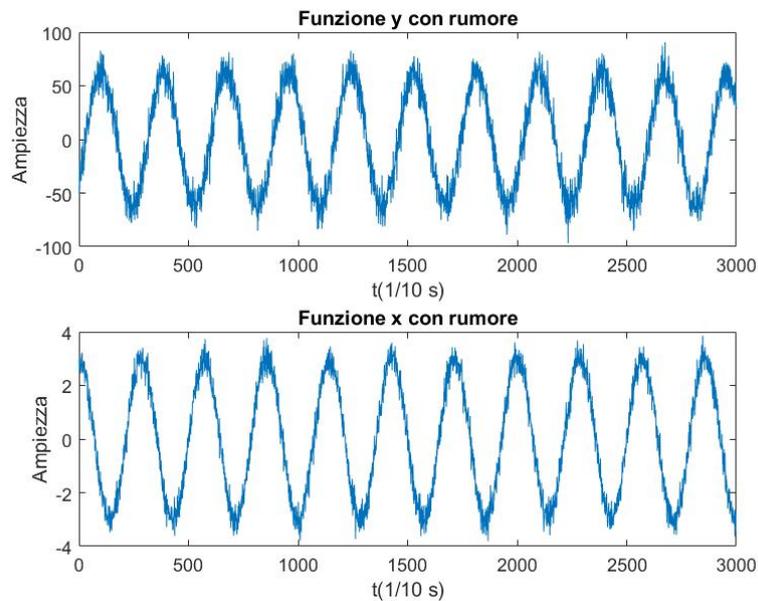


Figura 7.9: In alto: funzione originale y' dopo la sovrapposizione di rumore bianco ($\mu = 0$ e $\sigma_{y''} = 10.0$). In basso: funzione originale x' dopo la sovrapposizione di rumore bianco ($\mu = 0$ e $\sigma_{x''} = 0.3$).

In questo caso si ottiene un buon modello AR con cinque parametri: Figura 7.10 mostra il confronto tra y'' e il modello AR(5).

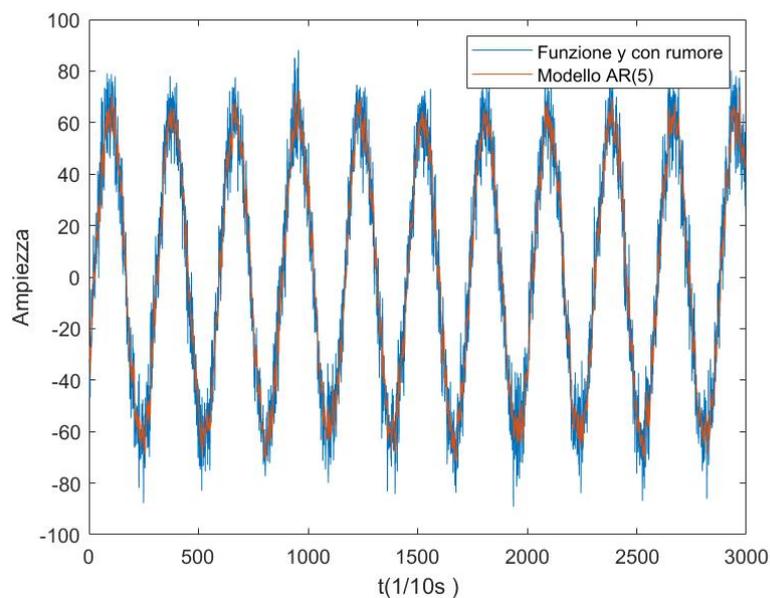


Figura 7.10: Confronto tra la funzione y'' (linea blu) e il modello AR(5) (linea rossa).

Si passa al modello ARMA per verificare se la causalità sia sempre rilevabile anche in presenza del rumore bianco sovrapposto. In Figura 7.11 all'aumentare dell'ordine della parte MA dei modelli ARMA, in cui la parte AR ha ordine tre, la media dei quadrati residui diminuisce rispetto a quella del modello AR(3) (indicata dal valore numerico in legenda), fino a raggiungere e superare quella del miglior modello possibile, AR(5), indicata dalla linea rossa.

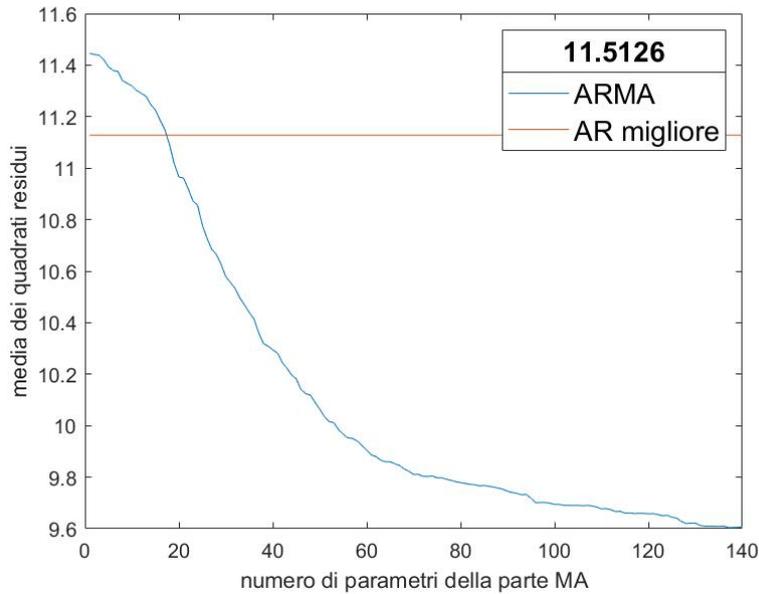


Figura 7.11: In blu: media dei quadrati residui dei modelli $ARMA(p, q)$ con $p=3$ e q indicato nelle ascisse per la funzione y'' . In rosso: valore della media dei quadrati residui del modello AR(5). In legenda la media dei quadrati residui del modello AR(3).

In Figura 7.12 si mostra il confronto tra la funzione y'' e il modello $ARMA(3, 18)$.

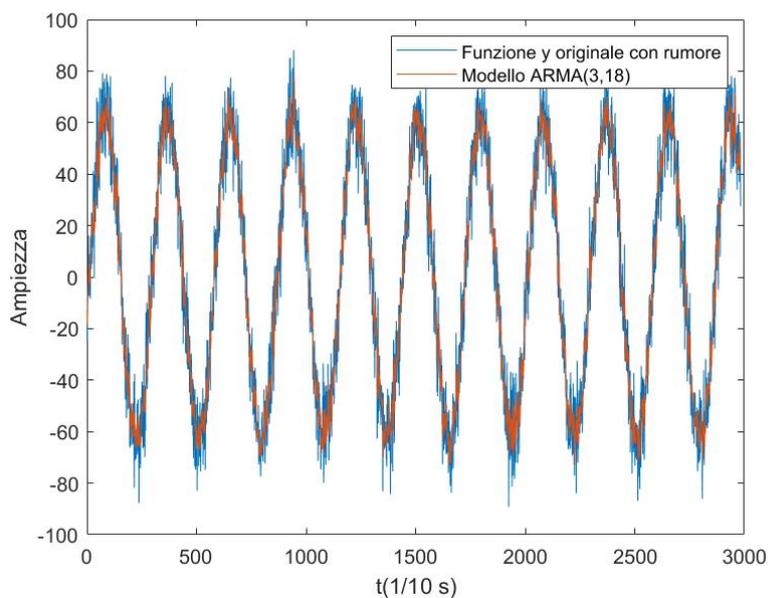


Figura 7.12: Confronto tra la funzione y'' (linea blu) e il modello ARMA(3,18) (linea rossa).

8 Analisi

Qui di seguito si effettua l'analisi vera e propria sui segnali neurali raccolti. Per prima cosa si studia il loro spettro di potenza, in Sezione 8.1, poi si applicano i modelli regressivi per la verifica della causalità di Granger.

8.1 Spettri di potenza dei segnali neurali

Prima dell'applicazione del filtro e dell'applicazione dei modelli regressivi si effettua uno studio preliminare delle serie raccolte studiandone gli spettri per individuare la frequenza di taglio utilizzata nel passa-basso descritto in Sezione 7.1. Per ogni segnale si ottiene uno spettro di potenza in dB con un picco a basse frequenze (a frequenze più alte corrisponde il rumore). In Figura 8.1 si mostrano come esempi gli spettri dei segnali AWC e AIY di Figura 6.9, che giustificano la scelta della frequenza di taglio a 0.16 (applicata poi per tutte le serie).

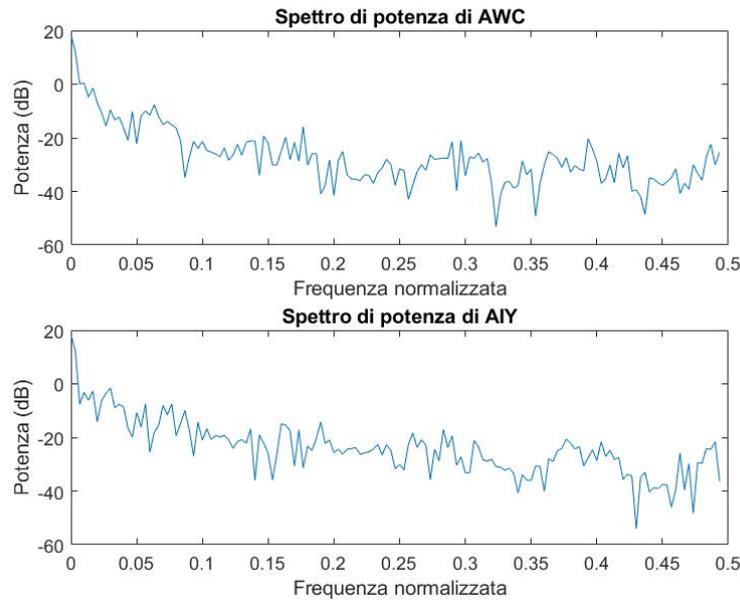


Figura 8.1: In alto: spettro di potenza in dB del segnale AWC di Figura 6.9 in funzione della frequenza normalizzata rispetto a quella di campionamento. In basso: spettro del segnale di AIY raffigurato in Figura 6.9.

Per evidenziare eventuali leggi di potenza si passa poi a una scala bi-logaritmica. Si ottengono così grafici come quello riportato in Figura 8.2.

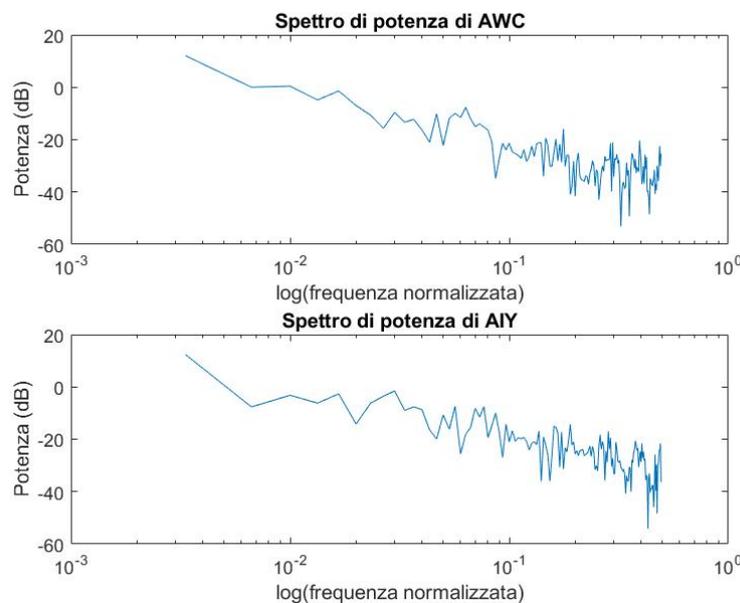


Figura 8.2: In alto: spettro di potenza in dB del segnale AWC di figura 6.9 in funzione del logaritmo delle frequenze normalizzate rispetto a quella di campionamento. In basso: spettro di potenza in dB del segnale AIY di figura 6.9 in funzione del logaritmo delle frequenze normalizzate rispetto a quella di campionamento.

Si nota un andamento rettilineo regolare che potrebbe essere riconducibile ad un rumore con uno spettro di potenza che va come $\sim \frac{1}{f^\alpha}$, dove f é la frequenza. In tutti i dispositivi elettronici e in molti sistemi biologici è ad esempio presente il *flicker noise*, che è caratterizzato da uno spettro di potenza che va come $\sim \frac{1}{f}$. È caratteristico dei sistemi biologici anche il rumore browniano (o *brown noise*), dallo spettro di potenza che va come $\sim \frac{1}{f^2}$.

In Figura 8.3 si vede che l'andamento dei grafici di Figura 8.2 viene invece ben seguito da una funzione con un andamento del tipo $\sim \frac{1}{f^2}$.

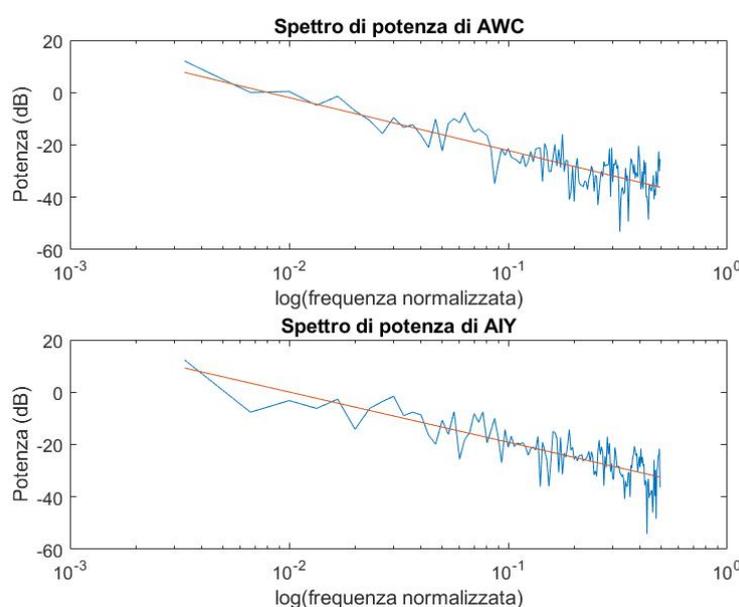


Figura 8.3: In alto: sovrapposizione di una funzione con andamento $\sim \frac{1}{f^2}$ allo spettro di potenza in *dB* del segnale AWC di Figura 6.9 in funzione del logaritmo delle frequenze normalizzate rispetto a quella di campionamento. In basso lo spettro di AIY con la sovrapposizione di una funzione con andamento $\sim \frac{1}{f^2}$, sempre di Figura 6.9.

Si ribadisce che questo studio viene effettuato prima dell'applicazione del filtro, su dei segnali quindi che presentano ancora tutto il rumore. Nello spettro di Figura 8.1 c'è una componente dovuta al rumore del segnale stesso, ma anche una che dipende dalla misura. In futuro sarà interessante fare un'indagine più approfondita sul tipo di rumore presentato dai processi neurali, per scoprire ad esempio se vi sono caratteristiche comuni con altri processi biologici.

8.2 Studio dei segnali neurali

Una volta verificato attraverso i test descritti in Sezione 7.5 che il codice fornisce i risultati previsti, ed è quindi affidabile, e aver studiato lo spettro dei segnali neurali, si passa all'applicazione dei modelli regressivi per testare il criterio di causalità di Granger. Per ciascun tipo di presa dati si riporta lo studio di una coppia di segnali AWC e AIY: si vuole verificare se l'algoritmo sviluppato è in grado di rintracciare la causalità tra i due segnali. Per ciascuna coppia si determina l'ordine del miglior modello AR, m' , quindi si passa al modello ARMA considerando degli ordini sempre più piccoli della parte AR rispetto a m' e studiando per ciascun caso l'andamento della media dei quadrati residui in funzione dell'ordine della parte MA. Per poter studiare dei segnali più puliti si applica il procedimento descritto in Sezione 7.1.

8.2.1 Segnali ottenuti con stimolo olfattivo C_1 ripetuto per dieci volte

In questo caso si hanno a disposizione i segnali della Figura 6.8, ciascuno costituito da 2750 dati. Il miglior modello AR risulta avere ordine 13. In Figura 8.4 si mostra la sovrapposizione tra il segnale AIY (linea blu) e la sua ricostruzione con il modello AR(13) (linea rossa).

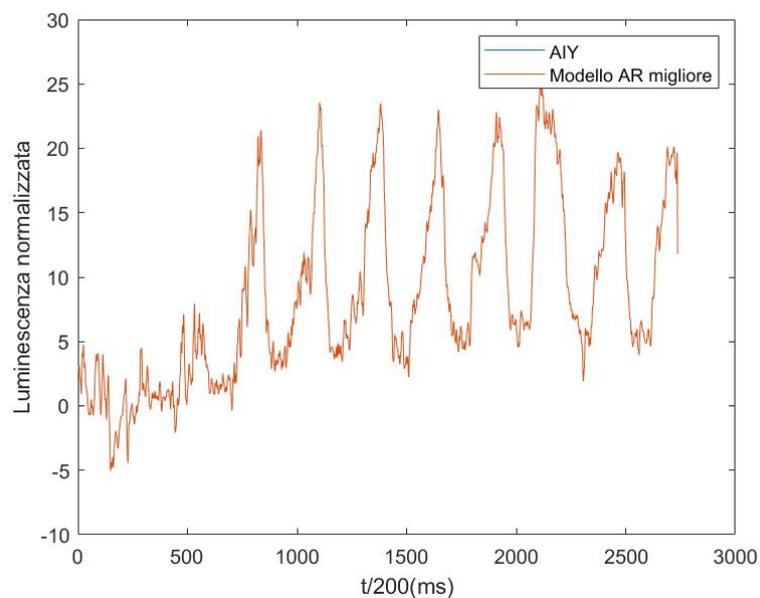


Figura 8.4: Confronto tra il segnale AIY di Figura 6.8 (linea blu) e il modello AR(13) (linea rossa).

Si vede dalla Figura 8.5 in blu l'andamento della media dei quadrati residui dei modelli ARMA, con ordine della parte AR uguale a 13 e quello della parte MA indicato dalle ascisse, in rosso quella calcolata con il miglior modello AR possibile e nella legenda il valore numerico della media dei quadrati residui del modello AR(13).

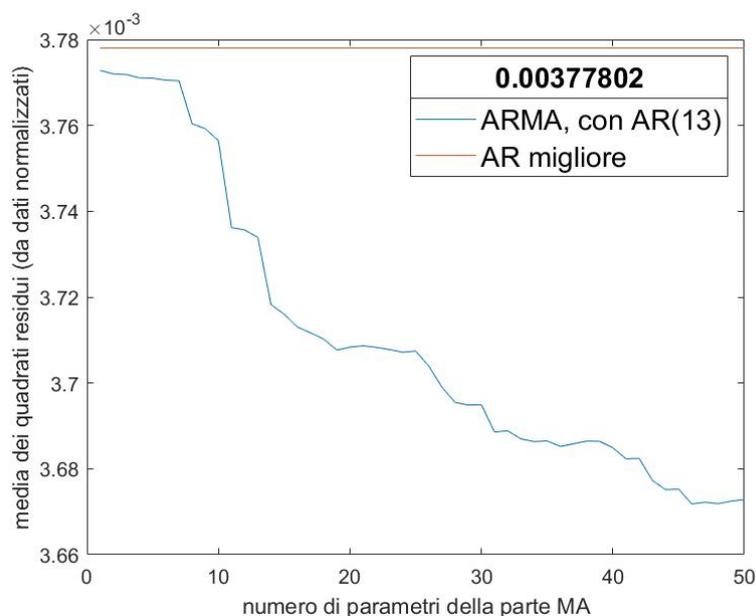


Figura 8.5: In blu: media dei quadrati residui dei modelli $ARMA(p, q)$ con $p=13$ e q indicato nelle ascisse. In rosso: valore della media dei quadrati residui del modello AR migliore, di ordine 13. Il valore numerico nella legenda indica la media dei quadrati residui del modello AR(13).

La Figura 8.5 mostra una diminuzione della media dei quadrati residui con l'aumentare della parte MA rispetto a quella che si ha con il modello migliore AR(13). Si vede poi in Figura 8.6 come anche considerando un parametro in meno della serie stessa si ritorni ad avere la stessa precisione del modello AR(13), per il modello ARMA(12,13).

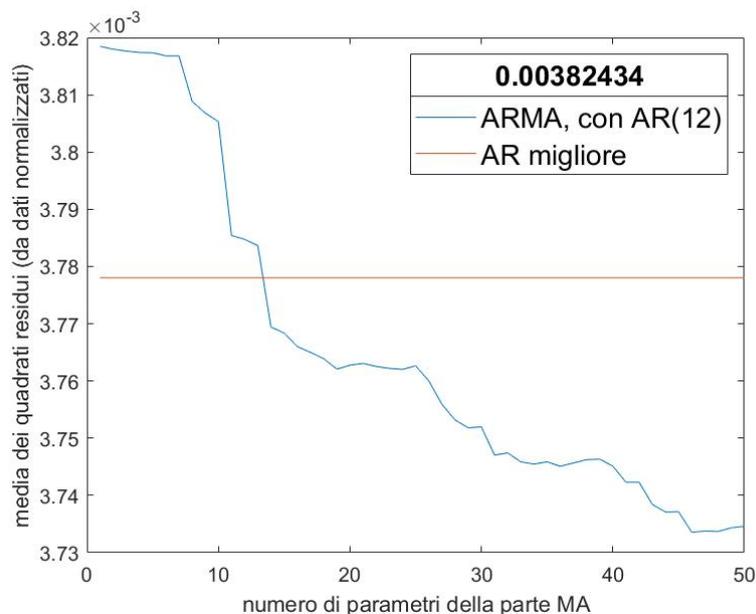


Figura 8.6: In blu: media dei quadrati residui dei modelli $ARMA(p, q)$ con $p=12$ e q indicato nelle ascisse. In rosso: valore della media dei quadrati residui del modello AR migliore, di ordine 13. Il valore numerico nella legenda indica la media dei quadrati residui del modello AR(12).

Anche se questa potrebbe sembrare essere una prova dell'esistenza della causalità, si vede in Figura 8.7 come considerando i modelli ARMA con parte AR di ordine 11 (ovvero avendo tolto solo due parametri rispetto al modello AR migliore) non si ritorni alla precisione del modello AR(13) per alcun valore della parte MA.

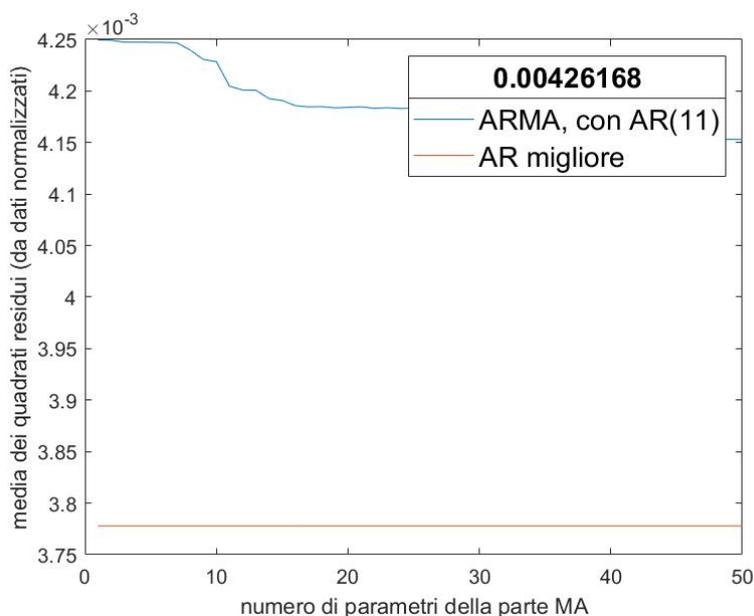


Figura 8.7: In blu: media dei quadrati residui dei modelli $ARMA(p, q)$ con $p=11$ e q indicato nelle ascisse. In rosso: valore della media dei quadrati residui del modello AR migliore, di ordine 13. Il valore numerico nella legenda indica la media dei quadrati residui del modello AR(11).

8.2.2 Segnali ottenuti con uno stimolo olfattivo C_1

In questo caso si hanno a disposizione i segnali della Figura 6.9, ciascuno costituito da 300 punti, e si ottiene che il miglior modello AR ha ordine quattro. In Figura 8.8 si mostra la sovrapposizione tra il segnale AIY (in blu) e la sua ricostruzione con il modello AR(4) (in rosso).

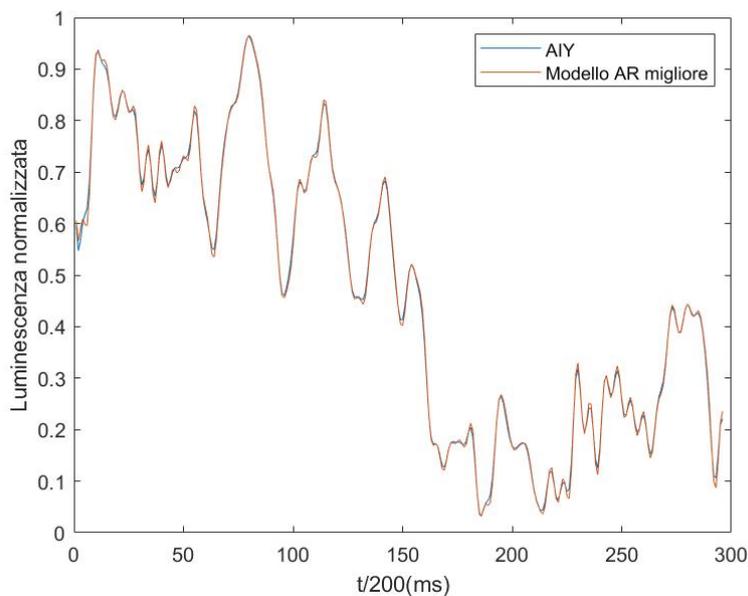


Figura 8.8: Confronto tra il segnale AIY di Figura 6.9 (linea blu) e il modello AR(4) (linea rossa).

Si vede in Figura 8.9 come la media dei quadrati residui dei modelli ARMA, con ordine della parte AR uguale a quattro e quello della parte MA indicato dalle ascisse, diminuisca rispetto quella prevista con il miglior modello AR possibile.

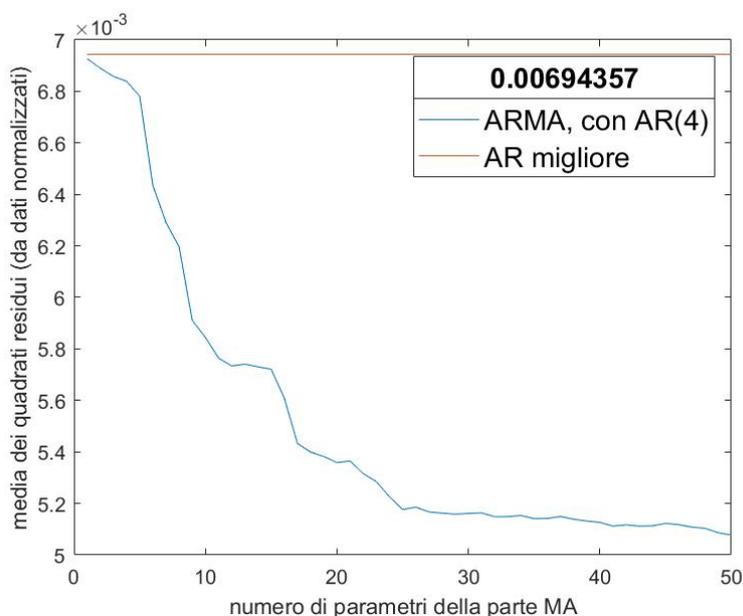


Figura 8.9: In blu: media dei quadrati residui dei modelli ARMA(p,q) con $p=4$ e q indicato nelle ascisse. In rosso: valore della media dei quadrati residui del modello AR migliore, di ordine quattro. Il valore numerico nella legenda indica la media dei quadrati residui del modello AR(4).

Tuttavia, questo miglioramento potrebbe dipendere solo dall'aver preso un maggiore numero di parametri (in generale maggiore è il numero di parametri migliore è il modello), e non è una dimostrazione della relazione di causalità: si vede infatti in Figura 8.10 come anche solo escludendo un solo parametro riferito alla serie stessa non si possa essere in grado di recuperare precisione nella previsione dai dati della seconda.

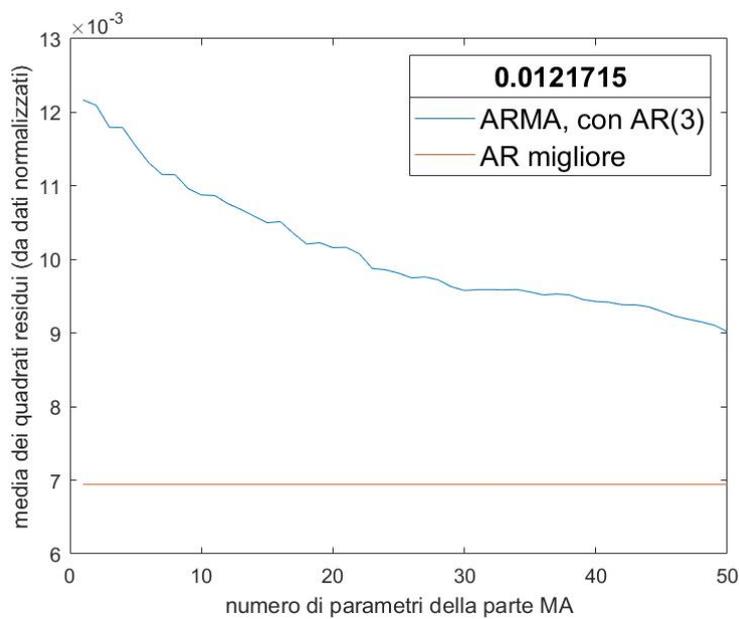


Figura 8.10: In blu: media dei quadrati residui dei modelli $ARMA(p, q)$ con $p=3$ e q indicato nelle ascisse. In rosso: valore della media dei quadrati residui del modello AR migliore, di ordine quattro. Il valore numerico nella legenda indica la media dei quadrati residui del modello AR(3).

8.2.3 Segnali ottenuti con i quattro restanti procedimenti di presa dati

Quanto visto in Sezione 8.2.2 si ripresenta anche per tutte le altre coppie di segnali neurali raccolte. Per ciascun tipo di presa dati si danno due grafici che riportano i seguenti valori:

- Media dei quadrati residui del modello ARMA, con ordine della parte AR uguale a quello del modello AR migliore, in funzione dell'ordine della parte MA (in blu), media dei quadrati residui del modello AR migliore (in rosso e come valore numerico in legenda);
- Media dei quadrati residui del modello ARMA, con ordine della parte AR minore di un'unità rispetto a quello del modello AR migliore, in funzione dell'ordine della

parte MA (in blu), media dei quadrati residui del modello AR migliore (in rosso) e media dei quadrati residui del modello AR con ordine minore di un'unità rispetto a quello dell'ordine del modello AR migliore (il valore numerico in legenda).

Quindi si può concludere per ognuno di questi casi che il calo della media dei quadrati residui del primo grafico dipende solo dall'aumento dei parametri, e che il secondo grafico mostra che considerando un parametro in meno della serie stessa non si riesce a raggiungere per nessun ordine della parte MA la precisione che si ottiene con il modello AR migliore.

8.2.3.1 Segnali ottenuti con l'alternanza di stimolo olfattivo C_1 e C_2

In questo caso si hanno a disposizione i segnali della Figura 6.6, ciascuno costituito da 2750 punti. Il modello AR migliore risulta essere AR(8).

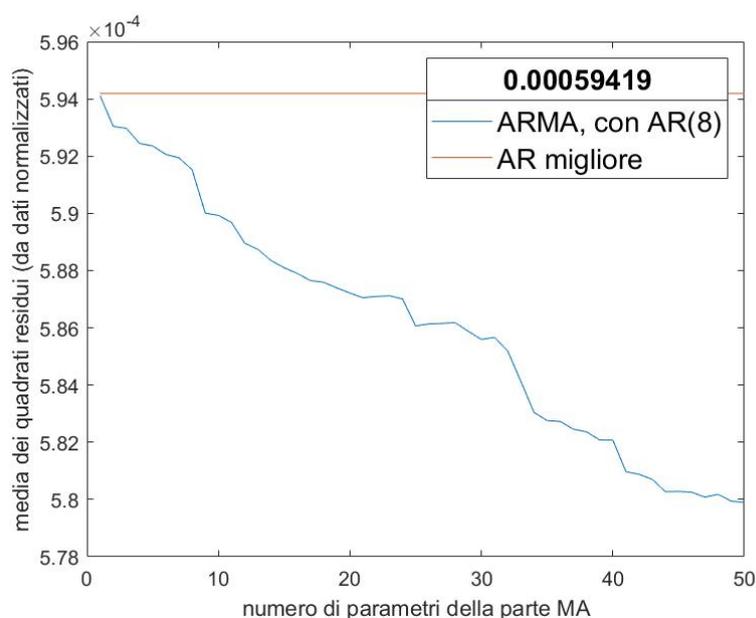


Figura 8.11: In blu: media dei quadrati residui dei modelli $ARMA(p, q)$ con $p=8$ e q indicato nelle ascisse. In rosso: valore della media dei quadrati residui del modello AR migliore, di ordine otto. Il valore numerico nella legenda indica la media dei quadrati residui del modello AR(8).

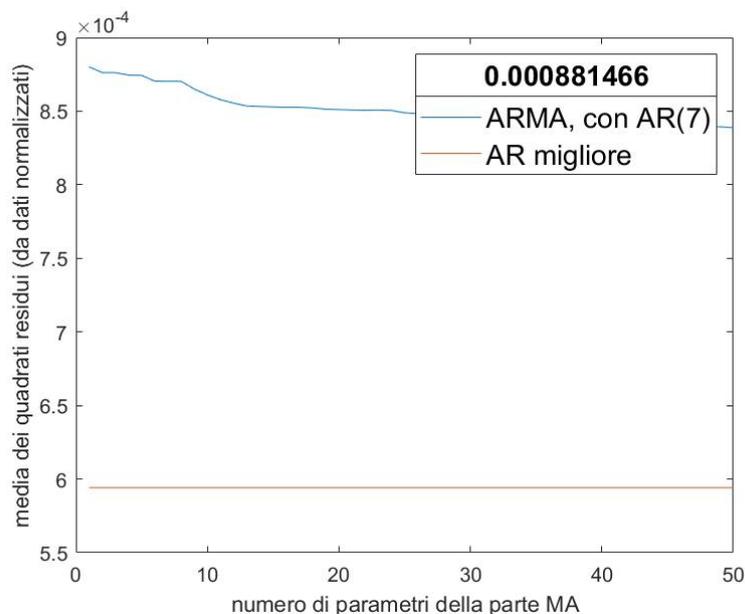


Figura 8.12: In blu: media dei quadrati residui dei modelli $ARMA(p, q)$ con $p=7$ e q indicato nelle ascisse. In rosso: valore della media dei quadrati residui del modello AR migliore, di ordine otto. Il valore numerico nella legenda indica la media dei quadrati residui del modello AR(7).

8.2.3.2 Segnali ottenuti con lo stimolo olfattivo C_2 ripetuto dieci volte

In questo caso si hanno a disposizione i segnali della Figura 6.7, ciascuno costituito da 2750 punti. L'ordine AR migliore è pari a sette.

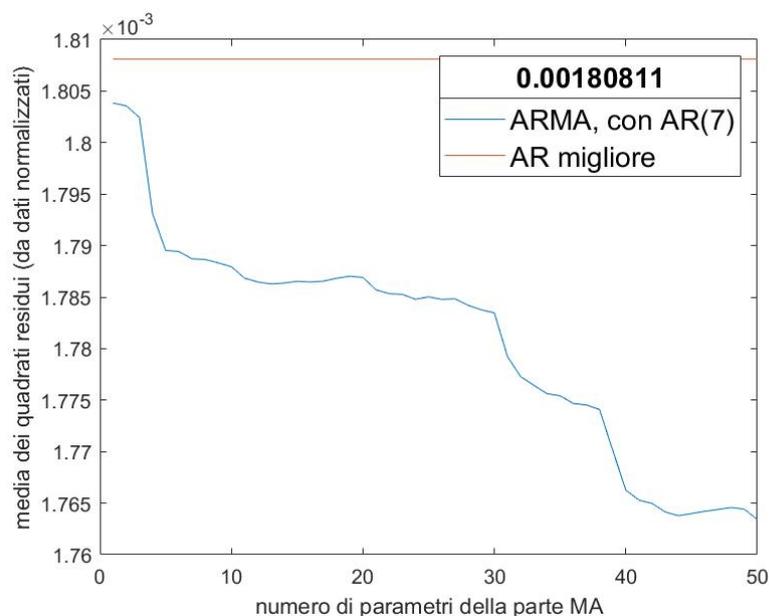


Figura 8.13: In blu: media dei quadrati residui dei modelli $ARMA(p, q)$ con $p=7$ e q indicato nelle ascisse. In rosso: valore della media dei quadrati residui del modello AR migliore, di ordine sette. Il valore numerico nella legenda indica la media dei quadrati residui del modello AR(7).

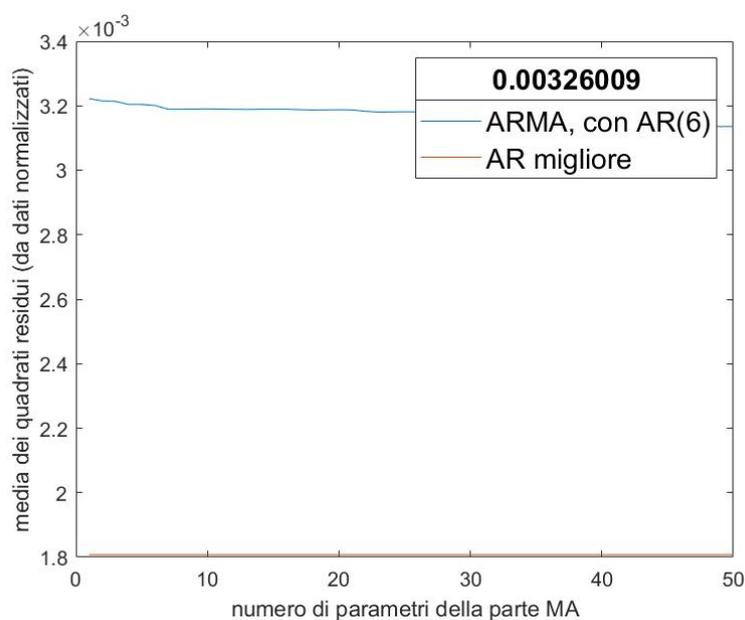


Figura 8.14: In blu: media dei quadrati residui dei modelli $ARMA(p, q)$ con $p=6$ e q indicato nelle ascisse. In rosso: valore della media dei quadrati residui del modello AR migliore, di ordine sette. Il valore numerico nella legenda indica la media dei quadrati residui del modello AR(6).

8.2.3.3 Segnali ottenuti con il metodo *gentle touch*

In questo caso si hanno a disposizione i segnali della Figura 6.10, ciascuno costituito da 2750 dati. Si trova che il miglior modello è dato da AR(15).

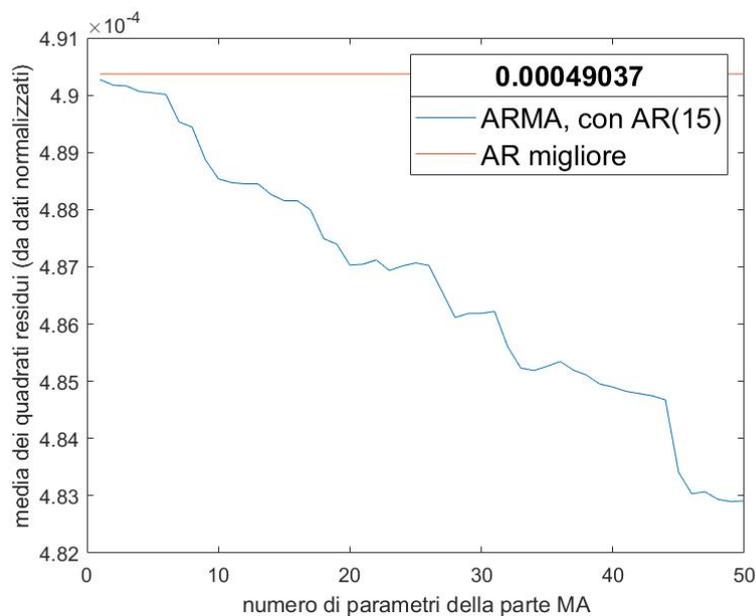


Figura 8.15: In blu: media dei quadrati residui dei modelli $ARMA(p, q)$ con $p=15$ e q indicato nelle ascisse. In rosso: valore della media dei quadrati residui del modello AR migliore, di ordine 15. Il valore numerico nella legenda indica la media dei quadrati residui del modello AR(15).

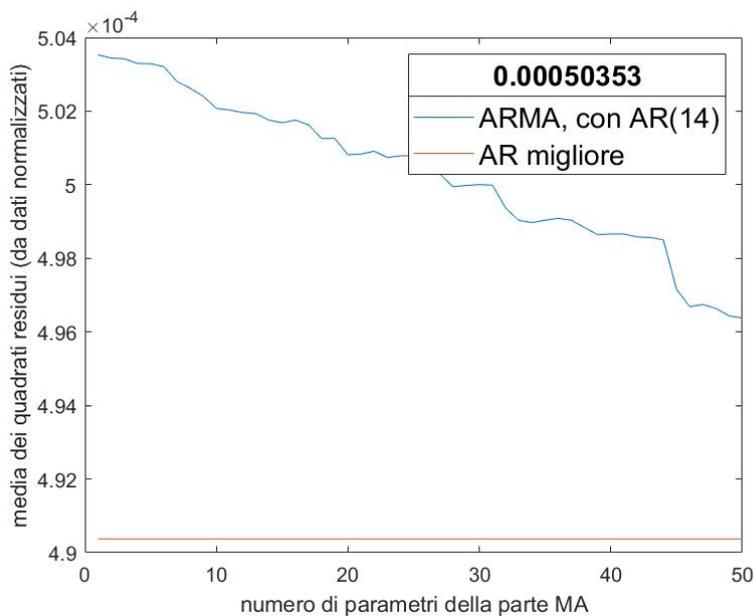


Figura 8.16: In blu: media dei quadrati residui dei modelli $ARMA(p, q)$ con $p=14$ e q indicato nelle ascisse. In rosso: valore della media dei quadrati residui del modello AR migliore, di ordine 15. Il valore numerico nella legenda indica la media dei quadrati residui del modello AR(14).

8.2.3.4 Segnali ottenuti con il metodo *harsh touch*

In questo caso si hanno a disposizione i segnali della Figura 6.11, ciascuno costituito da 2750 dati. Il modello AR migliore ha ordine 13.

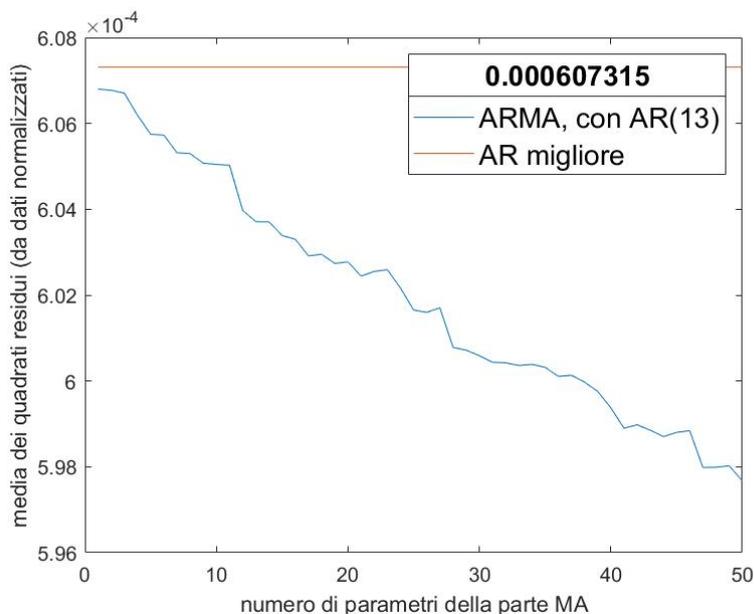


Figura 8.17: In blu: media dei quadrati residui dei modelli $ARMA(p,q)$ con $p=13$ e q indicato nelle ascisse. In rosso: valore della media dei quadrati residui del modello AR migliore, di ordine 13. Il valore numerico in legenda indica la media dei quadrati residui del modello AR(13).

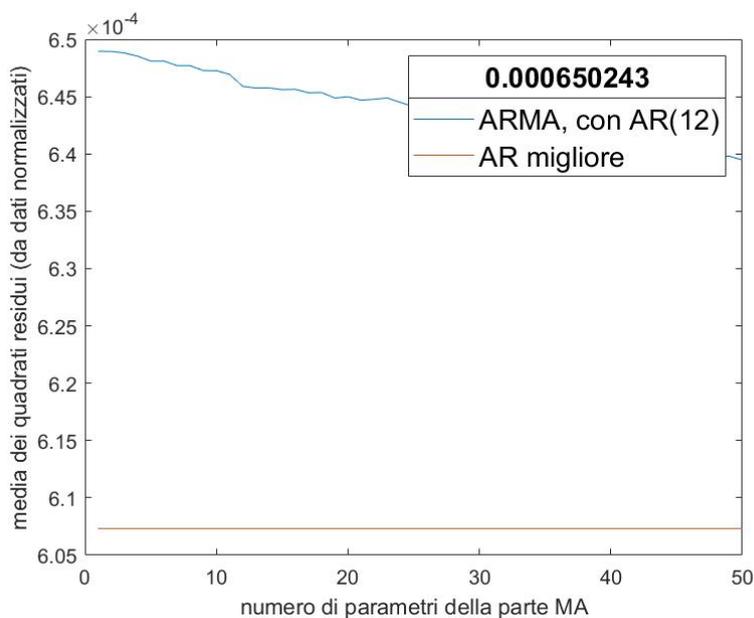


Figura 8.18: In blu: media dei quadrati residui dei modelli $ARMA(p,q)$ con $p=12$ e q indicato nelle ascisse. In rosso: valore della media dei quadrati residui del modello AR migliore, di ordine 13. Il valore numerico nella legenda indica la media dei quadrati residui del modello AR(12).

9 Conclusioni

Applicando il criterio di causalità di Granger non si è riusciti a dimostrare l'evidente causalità (già nota da studi biologici come discusso in Sezione 5.2.0.2) tra i segnali raccolti in laboratorio da due neuroni di *C. elegans*.

Il criterio di causalità di Wiener-Granger è semplice e intuitivo, ma non è di facile applicabilità. I problemi rilevati nel corso della tesi sono:

- Importanza degli errori numerici;
- Importanza del rumore di fondo;
- Difficoltà nella definizione di un criterio efficace relativamente al numero massimo di termini delle successioni AR e ARMA.

Questi problemi non sono esclusivi di questo lavoro di tesi ma si riscontrano anche nel lavoro di molti ricercatori che studiano segnali nervosi. In questo momento è difficile dire se il criterio di Wiener-Granger riuscirà a sopravvivere a queste difficoltà oppure si affermerà definitivamente grazie a qualche brillante soluzione numerica.

10 Ringraziamenti

Ringrazio inanzitutto la Dott.ssa Viola Folli e gli altri membri del gruppo dell'IIT di Roma che mi hanno aiutato ad effettuare la presa dati: Davide Caprini, Silvia Schwartz e Martina Nicoletti. E, ovviamente, grazie al Prof. Rigon e al Prof. Milotti.

Riferimenti bibliografici

- [1] Granger, Clive W. J. *Investigating causal relations by econometrics models and cross-spectral methods*. *Econometrica*, 37, 1969.
- [2] Granger, Clive W. J. *Testing for causality. A personal viewpoint*. *Journal of Economic Dynamic and Control*, 2, 1980.
- [3] Anil K. Seth, Adam B. Barrett, and Lionel Barnett. *Granger Causality Analysis in Neuroscience and Neuroimaging*. *The Journal of Neuroscience*, 2015.
- [4] Joun Makhoul. *Linear Prediction: A Tutorial Review*. *Proceedings of the IEE*, Vol. 63, 1975.
- [5] Sanggyun Kim, David Putrino, Soumya Ghosh, Emery N. Brown. *A Granger Causality Measure for Point Process Models of Ensemble Neural Spiking Activity*. *Proceedings of the IEE*, Vol. 63, 2011.
- [6] Oliver Hobert, Lori Glenwinkel, and John White. *Revisiting Neuronal Cell Type Classification in *Caenorhabditis elegans**. *Current Biology* 26, 2016.
- [7] The *C. elegans* Sequencing Consortium. *Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: a Platform for investigating Biology*. *Science* 282 (5386), pp 2012-2018, 1998.
- [8] White J. G., Southgate E., Thomson J. N., Brenner S. *The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans**. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 314 (1165), 1986.
- [9] Sreekanth H. Chalsani, Nikos Chronis, Makato Tsunozaki, Jesse M. Gray, Daniel Ramot, Miriam B. Goodman and Cornelia I. Bargmann. *Dissecting a circuit for olfactory behaviour in *Caenorhabditis elegans**. *Nature Publishing Group*, 2007.
- [10] Patrick A. Stokesa and Patrick L. Purdon. *A study of problems encountered in Granger causality analysis from a neuroscience perspective*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017.
- [11] Mariusz Maziarz. *A review of the Granger-causality fallacy*. *The Journal of Philosophical Economics: Reflections on Economic and Social Issues*, 2015.

Appendice

Di seguito si da un esempio del codice sviluppato per l'analisi descritta in questa tesi. Per eseguire i vari test sono state prodotte versioni più o meno modificate di questo programma.

```
clc ; clear ; close all

[A, delimiterOut]=importdata(filename);
dati=size(A,1);
t=A(:,1);
m=A(:,2);
x=A(:,3);
y=A(:,4);

nVals=(0:dati-1)*(1/dati);
fx=fft(x);
powerx1 = abs(fx).^2/dati;
fy=fft(y);
powery1 = abs(fy).^2/dati;

dati2=(dati/2)-1;
powerx=zeros(dati2,1);
powery=zeros(dati2,1);
powerx(1)=powerx1(1);
powery(1)=powery1(1);
for i=2:dati2
    powerx(i)=powerx1(i)*2;
    powery(i)=powery1(i)*2;
end
nVals2=(0:dati2-1)*(1/dati);

nVals3=zeros(dati2,1);
```

```
for i=1:dati2
    nVals3(i)=1/nVals2(i);
end

figure(100)
subplot(2,1,1);
plot(nVals2,10*log10(powerx))
xlabel('Frequenza_normalizzata')
ylabel('Potenza_(dB)')
title('Spettro_di_potenza_di_AWC')
subplot(2,1,2);
plot(nVals2,10*log10(powery))
xlabel('Frequenza_normalizzata')
ylabel('Potenza_(dB)')
title('Spettro_di_potenza_di_AIY')

prompt='frequenza_di_taglio '
ft=input(prompt)/2

awc = lowpass(x,ft,1);
aiy = lowpass(y,ft,1);

parlmax=20;
gauss=zeros(dati,1);
devs=zeros(parlmax,1);
chiq=zeros(parlmax,1);
for j=1:parlmax
    ar1=zeros(dati-j,1);
    arres1=zeros(dati-j,1);
    arresq=zeros(dati-j,1);
    AIY=zeros(dati-j,1);
    AR=zeros(dati-j,j);
```

```
    for i=1:dati-j
        AIY(i)=aiy(i+j);
        for k=1:j
            AR(i,k)=aiy(i+j-k);
        end
    end

arp=regress(AIY,AR);

    for i=1:dati-j
        armar1=zeros(dati-j,j);
        for k=1:j
            armar1(i,k)=arp(k)*AR(i,k);
        end
        ar1(i)=sum(armar1(i,:));
        arres1(i)=(AIY(i)-ar1(i));
        arresq(i)=(AIY(i)-ar1(i))^2;
    end

[hts, ctrs] = hist(arres1, fix((dati-j)/10));
area = sum(hts) * (ctrs(2)-ctrs(1));
xx = linspace(min(arres1),max(arres1), fix((dati-j)/10));
n=size(xx,2);

chi=zeros(n,1);
for p=1:n
    chi(p)=(area*normpdf(xx(p),mean(arres1),std(arres1))-hts(p))^2;
end
chiq(j)=sum(chi)/(n);
devs(j)=sqrt(sum(arresq)/(dati-j));
end
```

```
figure(333)
plot(chiq)

prompt='ordine_del_miglior_modello_AR'
par1=input(prompt);

AIYdef=zeros(dati-par1,1);
ARdef=zeros(dati-par1,par1);
resardef=zeros(dati-par1,1);
ardef=zeros(dati-par1,1);
for i=1:dati-par1

    AIYdef(i)=aiy(i+par1);
    for k=1:par1
        ARdef(i,k)=aiy(i+par1-k);
    end
end

arp=regress(AIYdef,ARdef);
armar=zeros(dati-par1,par1);
for i=1:dati-par1

    for k=1:par1
        armar(i,k)=arp(k)*ARdef(i,k);
    end

    ardef(i)=sum(armar(i,:));
    resardef(i)=(AIYdef(i)-ardef(i))^2;
```

```
end
devardef=sqrt(sum(resardef)/(dati-par1));

parmamax=250;
res3=zeros(par1 ,parmamax);

for par3=1:par1
    for pma3=1:parmamax

        if pma3<=par3
            M3=par3;
        else
            M3=pma3-1;
        end

        Y3=zeros(dati-M3,1);
        X3=zeros(dati-M3,par3+pma3);

        for i=1:dati-M3
            Y3(i)=aiy(i+M3);

                for k=1:par3
                    X3(i ,k)=aiy(i+M3-k);
                end

                for k=(par3+1):par3+pma3

                    X3(i ,k)=awc(i+M3-k+par3+1);
                end
```

```
end

pararma3=regress(Y3,X3);

aiys3=zeros(dati-M3,1);
arma3=zeros(dati-M3,par3+pma3);
arma=zeros(dati-M3,1);
diff3=zeros(dati-M3,1);
    for i=1:dati-M3
        aiys3(i)=aiy(i+M3);

        for k=1:par3+pma3
            arma3(i,k)=pararma3(k)*X3(i,k);
        end
        arma(i)=sum(arma3(i,:));
        diff3(i)=(aiys3(i)-arma(i))^2;
    end

res3(par3,pma3)=sqrt(sum(diff3)/(dati-M3));
end

end

devardefplot=zeros(parmamax,1);
    for pma3=1:parmamax
        devardefplot(pma3)=devardef;
    end
```

M3=150-1;

Y3ma=zeros(dati-M3,1);

X3ma=zeros(dati-M3,M3+1);

for i=1:dati-M3

 Y3ma(i)=aiy(i+M3);

for k=1:M3+1

 X3ma(i,k)=awc(i+M3+1-k);

end

end

parrma3=regress(Y3ma,X3ma);

arma3=zeros(dati-M3,M3+1);

mma=zeros(dati-M3,1);

diff3=zeros(dati-M3,1);

for i=1:dati-M3

for k=1:M3+1

 arma3(i,k)=parrma3(k)*X3ma(i,k);

end

 mma(i)=sum(arma3(i,:));

end