**פרויקט גמר בקורס פייתון למתקדמים – Mice Protein Expression**

מגישות: אליאנה הייטנר 209569730

שירה פסטרנק 211539838

מערכת העצבים המרכזית היא אחת המערכות המורכבות והחשובות בגוף האדם, והיא אחראית על עיבוד מידע, זיכרון, למידה ותפקודים קוגניטיביים רבים נוספים. בפרויקט זה נבחנה השפעתם של טיפולים תרופתיים על רמות הביטוי של חלבונים נוירולוגיים בשתי קבוצות עכברים – עכברים בריאים ועכברים המהווים מודל לחקר תסמונת דאון. הפרויקט מתמקד בשני חלבונים מרכזיים **BDNF** :  
חלבון הקשור לפלסטיות עצבית, ו**pCREB** חלבון המעורב בתהליכי שעתוק גנים בתגובה לאותות חיצוניים ופנימיים.

**שאלת המחקר**

השאלה הכללית שעניינה אותנו לבדוק, היא כיצד סוג הטיפול משפיע על רמות ביטוי החלבונים בעכברים בריאים וחולים. עם זאת, הבנו שזו שאלה יחסית רחבה, ולא בטוח שבמסגרת הפרויקט נוכל להסיק מסקנות על כלל החלבונים. לכן , בחרנו להתמקד בשתי שאלות מרכזיות בנוגע לחלבונים נוירולוגים שעניינו אותנו באופן אישי:

1. מהי השפעת סוג הטיפול על רמות החלבון BDNF בעכברים בריאים ובעלי תסמונת דאון?
2. האם ההשפעה של סוג הטיפול משתנה עבור החלבון pCREB בעכברים בריאים מול עכברים בעלי תסמונת דאון?

**פירוט מערך הנתונים**

מערך הנתונים במחקר זה כולל מידע שנאסף מ-72 עכברים, המחולקים לשתי קבוצות גנטיות: עכברים בריאים (Control) ועכברים המשמשים כמודל לתסמונת דאון (Ts65Dn) . לכל עכבר בוצעו 15 מדידות לכל חלבון, ובסך הכול נבדקו 77 חלבונים נוירולוגיים, המתואמים לתהליכים שונים במערכת העצבים המרכזית. מתוכם, המחקר התמקד בשני חלבונים מרכזיים: **BDNF** ו **pCREB**. בנוסף לרמות הביטוי של החלבונים, הנתונים כוללים מידע רקע כגון הגנוטיפ של העכבר וסוג הטיפול שקיבל – מלנטין (Memantine) או תמיסת מלח וכן עמודות נוספות המתעדות מאפיינים התנהגותיים ומדדים ביוכימיים נוספים.

תהליך ניקוי הנתונים בוצע בקפידה על מנת להבטיח אמינות ומובהקות סטטיסטית בניתוחים. ראשית, הוסרו עמודות שבהן למעלה מ-50% מהערכים היו חסרים, שכן חוסר זה עלול היה להוביל להטיות במסקנות. לאחר מכן, ערכים חסרים בנתונים הנותרים הושלמו באמצעות ממוצע הקבוצה אליה השתייכו, תוך התחשבות בגנוטיפ ובסוג הטיפול, על מנת לשמור על המאפיינים הביולוגיים הייחודיים לכל קבוצה. לבסוף, זוהו והוסרו ערכים חריגים באמצעות שיטת **IQR** המאפשרת איתור נתונים קיצוניים שעלולים להשפיע על הניתוחים הסטטיסטיים. לבסוף שמרנו את הדאטה המנוקה הרלוונטי רק לחלבונים שבחרנו. שלבים אלו נועדו להבטיח שהנתונים שנותרו יהיו תקפים ומהימנים, ויספקו בסיס מדויק להסקת מסקנות מדעיות.

**ממצאים עיקריים וניתוח נתונים**

לפני בחירת המבחנים, בדקנו את נורמליות הנתונים עם Shapiro-Wilk ואת שוויון השונויות עם Levene’s Test, כדי לוודא שהבחירה שלנו נכונה. מצאנו שהנתונים לא מתפלגים נורמלית באופן סדיר, ושישנן שונויות בין הקבוצות. לביצועים הסטטיסטיים בחרנו בp value= 0.05 שזהו ערך סטנדרטי למחקרים במדעי החיים.

**רמות הביטוי של BDNF**

כדי לבחון את השפעת הטיפול התרופתי על רמות הביטוי של החלבון BDNF השתמשנו במבחן Welch's ANOVA שמיועד למצבים שבהם שונות הקבוצות אינה אחידה, וההתפלגות לא בדיוק נורמלית. תוצאות המבחן הראו שהטיפול במלנטין גרם לשינויים מובהקים ברמות הביטוי החלבון   
BDNF (F=4.8392, P=0.028). משמעות התוצאות היא שהטיפול במלנטין משפיע באופן מובהק על רמות הביטוי של החלבון, עם הבדלים בולטים בין קבוצות הגנטיקה והטיפולים. בשל השונויות בין הקבוצות, קשה לראות בגרף 1 את המובהקות הסטטיסטית, אך לפי הנתונים (p value ו-F) ראינו מובהקות.

גרף 1: השפעת הטיפול במלנטין על רמות BDNF בקרב עכברים בריאים ועכברי תסמונת דאון

תמונה שמכילה טקסט, צילום מסך, תרשים, קו

התיאור נוצר באופן אוטומטי

**רמות הביטוי של pCREB**

לצורך ניתוח רמות הביטוי של החלבון pCREB השתמשנו במבחן Two-Way ANOVA שבדק את ההשפעות של הטיפול התרופתי והגנטיקה, שהם המשתנים הבלתי תלוים, אך גם בדק את האינטרקציה בינהם. התוצאות הראו שגם הטיפול התרופתי (P= 0.006) וגם הגנטיקה (P< 0.001) משפיעים באופן מובהק על רמות הביטוי של החלבון. עם זאת, אינטראקציה בין המשתנים לא נמצאה מובהקת (P = 0.1016) כלומר כל משתנה השפיע באופן עצמאי. ממצאים אלו מדגישים את השפעתם הבלתי תלויה של הטיפול והגנטיקה.

גרף 2: השפעת הטיפול והגנוטיפ על רמות pCREB ללא אינטראקציה מובהקת

תמונה שמכילה טקסט, קו, עלילה, צילום מסך

התיאור נוצר באופן אוטומטי

**מסקנות**

הפרויקט הדגים כי לטיפולים תרופתיים יש השפעה על רמות הביטוי של חלבונים נוירולוגיים, אך עוצמת והשפעת הטיפול משתנות בהתאם לסוג החלבון ולגורמים נוספים. נמצא כי עבור החלבוןBDNF הטיפול במלנטיןגרם לשינוי מובהק ברמות הביטוי, מה שמעיד על השפעתו הפוטנציאלית על מנגנוני פלסטיות עצבית. לעומת זאת, עבור החלבון pCREBההשפעה של הטיפול הייתה קיימת אך לא נמצאה תלות בין סוג הטיפול לבין הגנוטיפ, כלומר, התרופה השפיעה באופן דומה על שתי קבוצות העכברים ללא אינטראקציה בין המשתנים. מסקנות אלו מדגישות את המורכבות של מערכת העצבים המרכזית וממחישות את הצורך להמשיך ולחקור את השפעותיהם של טיפולים תרופתיים בהקשרים גנטיים שונים, במטרה להבין טוב יותר את מנגנוני הפעולה שלהם ואת הפוטנציאל שלהם לתרום לפיתוח טיפולים מותאמים אישית

**מגבלות המחקר**

אחת המגבלות המרכזיות במחקר הייתה חוסר ההתפלגות הנורמלית של הנתונים בחלק מהקבוצות. כדי להתמודד עם בעיה זו, השתמשנו במבחן Shapiro-Wilk כדי לבדוק נורמליות ובמבחן Levene על מנת לבדוק שוויון שונויות. מאחר שחלק מהקבוצות לא עמדו בהנחת הנורמליות, ומבחן Levene הראה שהשונויות לא שוות, נאלצנו לבחור ב-Welch’s ANOVA במקום ANOVA רגיל, כדי למנוע הטיות בתוצאות. השימוש ב Welch’s ANOVA אמנם פותר את בעיית השונויות הלא שוות, אך הוא פחות רגיש להבדלים קטנים מאשר ANOVA רגיל, מה שעשוי היה לגרום לנו לפספס הבדלים עדינים יותר בין הקבוצות.

בנוסף, השימוש ב-Two-Way ANOVA לבדיקת האינטראקציה בין הגנוטיפ לבין הטיפול הראה כי ההשפעה של הטיפול הייתה עצמאית מהגנוטיפ, כלומר לא נמצאה אינטראקציה מובהקת (p=0.1016) . מגבלה זו נובעת מגודל המדגם המצומצם (72 עכברים בלבד), אשר עשוי להקטין את הכוח הסטטיסטי של המבחן. ייתכן שבמדגם גדול יותר הייתה מתגלה אינטראקציה מובהקת, אך במסגרת הנתונים שבידינו, לא ניתן היה להוכיח קשר סטטיסטי חזק בין המשתנים.

מגבלה נוספת קשורה להיקף הנתונים שנבדקו. מערך הנתונים המקורי כלל 77 חלבונים, אך מסיבות חישוביות ומתודולוגיות התמקדנו בניתוח של שני חלבונים בלבד. המשמעות היא שייתכן כי קיימות תגובות חלבוניות נוספות לטיפול ב Memantine שלא נבדקו כאן.