

J. RUBIKAS

Tyrimo lygiai genetikoje ir geno sąvoka

Kiekvienos mokslo šakos retrospektyva padeda geriau suprasti dabartinę būklę, atskleisti sprendžiamų uždavinių svarbą bei informatyvumą, parodo metodologijos reikšmę atskirų etapų kaitoje. Istorinė retrospektyva padeda išvelgti žinių visumoje mokslo vystymosi postūmių taškus, kertinius teiginius, išryškina tyrimo lygių buvimą bei jų pereinamumą, priklausančią ne nuo laiko, bet nuo klausimų – metodų – atsakymų kompleksu.

Genetika savo tyrimais siekia atsakyti į klausimą: kas yra paveldėjimas? Todėl genetika yra platus mokslas, jungiantis daugelį biologijos šakų, nes paveldėjimas apima gyvojo organizmo dauginimąsi ne tik kaip struktūrų atgaminimą, bet kartu ir kaip galimybę įdėti naują indėlį į organizmo genotipą kiekvieno dauginimosi akto metu. Tačiau genetikos klausimų sfera labai susiaurėja, kai apsiribojama paveldėjimo mechanizmo tyrimu vienu aspektu arba to mechanizmo tyrimu atskiroje organizmų grupėje. Ir vienu, ir kitu atveju genetikos mokslo strategija lieka ta pati – paveldėjimas. Ji nesikeičia nei tada, kai tiriami gamtoje esamų organizmų genomai, nei tada, kai genų inžineriniais metodais konstruojami genomai, suteikiantys organizmui ar ląstelei naujų savybių. Todėl genetika yra savaip unikalus mokslas, kuris nuo savo ištakų, pirmųjų tyrimų iki šių dienų turėjo ir turi vieną tikslą, vieną uždavinį – atsakyti į klausimą: kas yra paveldėjimas? Aišku, šis uždavinys yra įvairiai formuluojamas, turi įvairių atspalvių, reikalauja įvairaus tikslumo atsakymo.

Tai, kad genetikos mokslo tikslas nesikeičia ilgametėje mokslo raidoje, leidžia pamatyti genetikos retrospektyvoje tarsi stovinčias bangas – tyrimo lygius, besiskiriančius metodologiniu požiūriu.

Tyrimo lygis – metodologinė kategorija. Ji apima klausimų grupę, tyrimo metodų arsenalą, būtiną tiems klausimams atsakyti, patogius tyrimo objektus, patikimą rezultatų aiškinimą atsakymus, iš to išplaukiančias naujas sąvokas, naujas hipotezes ir bręstančius naujus klausimus, į kuriuos negalima atsakyti šio lygio tyrime. Vieno lygio tyrimas savo rezultatais pagrindžia naujo metodologinio šuolio, naujo tyrimo lygio atsiradimą.

Tyrimo lygio negalima tapatinti su istoriniu etapu. Tiesa, jis atsiranda tam tikru metu: chronologijos skalėje, tačiau kitas, vėliau atsiradęs lygis jo neišstumia, nepanaikina, nepaneigia. Kiekvieno lygio pateiktų klausimų yra daugiau, negu suspėjama į juos atsakyti per to lygio apogėjų. Tyrimai tęsiasi, ir tyrimo kokybė priklauso ne nuo to, ar naudojami kito, aukštesnio lygio

metodai, bet nuo klausimo ir atsakymui į jį naudojamų metodinių priemonių optimalaus atitikimo.

Kiekvieną tyrimo lygį charakterizuoja tyrimo objektas ir to objekto vertinimo kriterijus. Genetikoje tyrimo objektas yra genetinis aparatas: plačiau prasme – organizmas, o siauriau – ląstelė, chromosoma, DBR molekulė (DBR – dezoksiribobranduolio rūgštis; RBR – ribobranduolio rūgštis). Tyrimo objektas ir lemia vieną ar kitą tyrimo lygį, nes klausimų, į kuriuos ieškoma atsakymo, pobūdis dažniausiai priklauso nuo objekto.

Genetikoje objekto vertinimo kriterijus yra požymis. Tai, ką konkrečiais atvejais laikome požymiu, lemia tyrimo objektas ir, aišku, tyrimo lygis. Vieno lygio tyrime požymis yra morfologinė struktūra (lapas, kojos kaulai, kaukolė, plaukuotumas) arba medžiaga bei energijos apykaitos tipas (gebėjimas naudotis maisto šaltiniu, įsavinimo kelias); kito lygio tyrime požymis – fermento vykdoma reakcija, amino rūgščių seka baltyme. Todėl, peržvelgdami tyrimo lygius, ryškiai matome objekto vertinimo kriterijaus – požymio – ir klausimų grupės tarpusavio priklausomybę tyrimo lygio viduje bei šių dalykų kaitą vienam tyrimo lygiui keičiant kitą. Kiekvienas tyrimo lygis, būdamas savitas metodologiniu požiūriu (klausimai, objektas, metodai, atsakymų aiškinimas), kuria savus apibrėžimus, savus terminus. Geno, kaip paveldimumo vieneto, sąvoka nekinta vienam tyrimo lygiui pereinant į kitą. Tačiau bendrąją geno sąvoką kiekvienas lygis detalizuoja, duodamas geno apibrėžimą, atitinkantį to lygio tyrimo objektą, vertinimo kriterijų bei duomenų aiškinimą, t. y. apibrėžimą, atitinkantį lygio metodologiją. Todėl konkretus geno apibrėžimas ne tik atspindi tam tikro lygio tyrimo objekto ir vertinimo kriterijaus santykį, bet kartu yra to lygio tyrinėtojų mąstymo įrankis. Vieno lygio geno apibrėžimą taikant kitam lygiui, geno sąvoka gali būti suprasta klaidingai.

Pirmasis tyrimo lygis: organizmas – požymis.

Šiame tyrimo lygyje į organizmą žiūrima kaip į požymių visumą; požymiai nulemia organizmo vietą sistematikos hierarchijoje. Tačiau kartais tie patys požymiai randami įvairiose organizmų grupėse ir kinta tam tikrose ribose grupės viduje. Šiame tyrimo lygyje yra sukurta rūšies sąvoka, tiriama rūšies pastovumas ir naujų rūšių atsiradimas, požymio – individo – populiacijos santykis. Nustatoma požymio vertė charakterizuojant individą ar rūšį. Tai įgalina, savo ruožtu, rasti skirtingų rūšių bendrumus bei skirtumus tos pačios rūšies viduje. Todėl šio lygio keliami klausimai liečia sistematiką, populiacijų struktūrą, populiacijų judėjimą, ekologinių bendrijų susidarymą. Chronologiniu požiūriu toks lygis buvo XVIII a. pabaigoje, kai K. Linėjus (Carl von Linné) kūrė pirmąją gyvųjų organizmų sistemą. Nuo to laiko iki šiol sisteminiai

bei populiacijų tyrimai priskiriami šiam lygiui. Tik vertinimo kriterijumi gali būti gana skirtingi požymiai: pavyzdžiui, vienais atvejais – plunksnų, lapų forma bei spalva, kitais atvejais – skirtingų rūšių individuose esančių baltymų, atliekančių tokią pačią funkciją, pirminės struktūros, t. y. amino rūgščių sekos palyginimas.

Šio lygio tyrimai remiasi rūšį ar populiaciją sudarančių individų genetiiniu stabilumu: tėvai ir palikuomys yra (santykinai) identiški. Paveldėjimo, genetinio stabilumo arba požymio kitimo priešasčių čia nenagrinėjame, tad šis lygis yra tarytum ir rūšies ar populiacijos statiško pjūvio atspindys.

Antrasis tyrimo lygis: ląstelė – požymis.

Šio tyrimo lygio pagrindas yra tai, kad organizmui pradžią duoda viena ląstelė. Aukštesniųjų organizmų atveju pirmoji ląstelė – zigota susidaro susiliejus moteriškai ir vyriškai lytinėms ląstelėms. Vienaląsčių organizmų atveju ta pati ląstelė yra ir gyvenimo forma, ir pradžią duodanti ląstelė, nes dalindamasi duoda palikuonių. Gausių tarpinių gyvybės formų atvejais organizmas pradeda vystytis taip pat nuo vienos ląstelės. Šiame lygyje akcentuojamas kitimo momentas: organizmas – ląstelė – organizmas; organizmo požymis visuma tarsi koncentruojasi vienoje ląstelėje ir vėl pasklinda iš jos susidariusiame naujame organizme. Toji viena lytinė ląstelė yra ryšys, jungiantis senąjį ir naująjį organizmus, per ją senojo organizmo požymių kompleksas perduodamas naujajam. Šio lygio tyrime jau svarstomas klausimas: kaip, kokiu mechanizmu, kokiais dėsniais požymiai perduodami iš kartos į kartą? Šio lygio tyrimo, kartu ir genetikos mokslo, pradininkas yra Johanas Gregoras Mendelis (Johann Gregor Mendel), 1865 m. paskelbęs savo tyrimų rezultatus. Jis kryžmino dviejų linijų žirnelius, besiskiriančius keletu požymių, ir analizavo šių požymių pasiskirstymo statistiką palikuonių kartose; nustatė pagrindinius paveldėjimo dėsnius: požymiai paveldimi nepriklausomai vienas nuo kito; abiejų tėvų lytinės ląstelės lygiavertiškai dalyvauja susidarant palikuonių požymiams; gametose – lytinėse ląstelėse – yra veiksniai, lemiantys vienareikšmę požymių išraišką (gametų grynumo dėsnis); yra šių veiksmių vyraujanti ir užgožtoji pasirinktinės būsenos. Kryžminant organizmus, viename iš jų požymis yra užgožtas, kitame – vyraujantis; palikuonyse šie požymiai pasiskirsto tokiu santykiu: trijuose palikuonyse pasireiškia vyraujantis ir viename – užgožtasis.

Sukurtas metodologinis genetikos principas: požymių statistinė analizė palikuonių kartose. Įvesta genetiinių simbolių kalba leido nagrinėti požymio paveldėjimą, nepriskiriant jo kokiai nors konkrečiai organizmų grupei. Susidarė geno, kaip paveldimumo vieneto, sąvoka.

Šio lygio tyrime genas apibrėžiamas kaip *atskirinė dalelė, esanti ląstelėje ir lemianti požymį*.

Taip tiriamos augalų, gyvūnų, mikroorganizmų populiacijos; atliekama norimus požymius turinčių individų atranka po mutagenezės ar kryžminimo.

Trečiasis tyrimo lygis: chromosoma – požymis.

Šio lygio tyrimo būdingas bruožas – požymių paveldėjimo kartose su-
gretinimas su chromosomų persitvarkymais, rekombinacijomis mejozės metu, vykstančiomis savaime ir dėl mutageninių poveikių arba suliejus tapačias bei skirtingas ląsteles. Šio lygio tyrimai prasidėjo, kai buvo sukaupta pakankamai duomenų apie ląstelių vidaus struktūras ir jų kitimą dalijantis ląstelei, apie branduolį, chromosomas, apie mitozę bei mejozę. Citologiniais tyrimais nustatyta, jog dalijantis ląstelei, išnyksta branduolys, jo vietoje ryškėja chromosomos, kurios pasiskirsto griežtai po lygiai, po dvigubą vienodų chromosomų rinkinį naujose ląstelėse. Tačiau susidarant lytinėms ląstelėms, t. y. mejozės metu, vyksta sudėtingesni procesai: chromosomos padvigubėja, ir susidaro keturgubas chromosomų rinkinys, tapačios keturios chromosomos glaudžiai suartėja ir gali apsikeisti įvairaus ilgio segmentais; paskui vyksta vienas po kito du dalijimaisi, kurių metu chromosomos pasiskirsto keturiose ląstelėse po viengubą rinkinį.

Branduolio ir chromosomų struktūros kitimai ląstelės mitozinio dalijimosi metu yra labai ryškūs ir rodo, jog vienintelės struktūros ląstelėse, kuriose gali būti požymius lemiančios atskirinės dalelės – genai, yra chromosomos. Požymių paveldėjimo dėsniai gali būti nusakomi vien tik iš chromosomų pasiskirstymo mitozės bei mejozės metu.

Tokios palyginti gausios žinios apie ląstelę grindė pirmuosius šio lygio T. H. Morgano (Thomas Hunt Morgan) darbus. Jais įrodyta, jog sukryžminus skirtingų požymių vaisines muses (*Drosophilla melanogaster*), požymių pasiskirstymas muselių palikuonių kartose atspindi chromosomų pasiskirstymą bei apsikeitimą segmentais mejozės metu. Šie duomenys leido sudaryti pirmąjį drozofilos požymių planą chromosomose – genolapį.

Buvo atliekami dirbtinio požymių keitimo – mutagenezės tyrimai. Pa-
veikus organizmą rentgeno, ultravioletiniais bei radioaktyviais spinduliais arba cheminiais agentais, galima sukelti mutacijas ir tuo labai suaktyvinti kintamumą; galima gauti individų su įvairias mutantiniais, t. y. pakitusiais, požymiais ir panaudoti juos kryžminimui bei genolapių sudarymui.

Šio lygio tyrimai plačiai atliekami nagrinėjant mutagenezės, citogenetikos klausimus, sudarant organizmų genolapius ir, ypač pastaruoju metu, tiriant tarprūšinės hibridizacijos procesą suliejus ląsteles, paimtas iš skirtingų rūšių organizmų. Klasikiniuose vaisinės muselės tyrimuose, taip pat sudarant

bakterijų bei jų virusų – bakteriofagų genolapius, naudojamas tas pats principas: kryžminami keletu skirtingų požymių individai, ir palikuonyse tiriamas vieno požymio buvimas, nebuvimas arba pakitimas kito požymio atžvilgiu. Kryžminimo rezultatai įvertinami skaičiuojant palikuonis su atkurtais nepakenktais požymiais. Požymiai atkuriami įvykus chromosomų rekombinavimui. Juo požymį lemiančiame gene mutacijos arba pakitę mutantiniai genai yra toliau vienas nuo kito, tuo rekombinacijos tarp jų tikimybė bus didesnė, juo nuotolis tarp mutacijų arba mutantinių genų yra mažesnis, tuo mažesnė tikimybė, kad įvyks chromosomų rekombinacija tarp šių mutacijų. Taip iš palikuonių skaičiaus su atkurto normaliu požymiu arba požymiais nustatomas santykinis nuotolis tarp šių dviejų mutacijų. O jei tarsime, kad mutacijos yra skirtinguose genuose, tai iš kryžminimo rezultatų galime nustatyti santykinį nuotolį tarp šių genų. Šiuo atveju naudojame lyg ir atvirkštinį geno buvimo įrodymą. Geno buvimą ir vietą galima nustatyti, kai jis kinta (kinta kartu ir požymis), kai jo nėra arba kai genas keičia vietą chromosomoje (susidaro naujos sukibusių požymių grupės). Pagal kryžminimo rezultatus genolapyje nustatoma abstraktaus geno reliatyvi vieta, nes, pirma, mutacijos negalima tapatinti su genu, antra, vertinimo kriterijus yra dėl mutacijos pakitęs požymis, o tai rodo tik mutacijos chromosomoje ir požymio santykį; trečia, nustatoma ne absoliuti topografinė geno padėtis chromosomoje, bet rekombinacijos dažnumu pagrįstas santykinis nuotolis nuo kitų dviejų abipus esančių genų.

Šio lygio tyrime *genas apibrėžiamas kaip mažiausias fragmentas, kuriuo apsiikeičia chromosomos rekombinacijos metu.*

Istoriniu požiūriu labai svarbūs yra G. V. Bidlo, E. L. Teitumo (G. W. Beadle, E. L. Tatum, 1941, 1942) atlikti mutantinių *Neurospora* grybelių kryžminimo eksperimentai, analogiški jau minėtiems drozofilų tyrimams. Kryžminant du *neurosporos* mutantus, nesugebančius sintetinti vienos amino rūgšties ir augti minimalioje terpėje, gaunami palikuonys, augantys minimalioje terpėje: jie dėl rekombinacijos atgavo sugebėjimą sintetinti tą amino rūgštį. Šiuo būdu tiriant *neurosporos* mutantus, buvo nustatytos kai kurių amino rūgščių sintezės grandys. Remiantis tais tyrimais buvo duotas funkcinis geno apibrėžimas: *vienas genas – vienas fermentas.*

Ketvirtas tyrimo lygis: DBR molekulė – požymis.

Pagrindinis šio lygio bruožas yra tas, kad genetiniai tyrimai atliekami su gryna žinomos cheminės sudėties bei struktūros genetinė medžiaga, ir pagrindiniai genetiniai procesai aiškinami remiantis genetinės medžiagos modeliu.

Ankstesniuose tyrimo lygiuose objektas ir vertinimo kriterijus buvo neapibrėžti: buvo tiriamas lytinėse ląstelėse esančio veiksnio arba chromosomos fragmento ryšys su požymiu, nedetalizuojant jų tikrosios funkcinės priklausomybės. Šiame tyrime objektas yra jau žinomos cheminės sudėties, struktūros ir dydžio molekulė, o kriterijus – požymis, pasireiškiantis dėl baltymo molekulės veiklos arba neveiklos. Vadinasi, objekto (genetinės medžiagos) ir kriterijaus (požymio) ryšys reiškiasi per baltymo molekulę.

Šis tyrimo lygis formavosi kaupiantis duomenims apie ląstelės ir atskirų struktūrų cheminę sandarą, funkciją, apie mikroorganizmų vykdomą medžiagų apykaitą. Gana detaliai buvo ištirtos ląstelės branduolio pagrindinės sudėties dalys – baltymai, dezoksiribobranduolio rūgštis (DBR) ir ribobranduolio rūgštis (RBR); aprašytos daugelio fermentų savybės ir jų vykdomos cheminės reakcijos. Panaudojant specifinius dažus nustatyta, jog ta pati, branduolyje esanti, medžiaga, ląstelei dalijantis, randama ir išryškėjusiose chromosomose. Mikroorganizmuose taip pat rastos aukštesniųjų organizmų branduolyje esančios medžiagos – DBR ir RBR. Šių gana gausių chemijos žinių apie ląstelę pagrindu susiformavo naujasis tyrimo lygis: DBR molekulė – požymis, kuriam pradžią davė O. T. Eiverio, C. M. Makleodo ir M. Mkarčio (O. T. Avery, C. M. Macleod, M. McCarty, 1944) eksperimentai, įrodę, jog ieškoma genetinė medžiaga yra DBR, nes iš vieno kamieno bakterijų išskirta DBR paveldimus požymius galima perduoti kitų kamienu bakterijoms. Šie darbo veiksmai buvo pavadinti bakterijų genetiniu pakeitimu. Buvo aprašytos ir kitos sistemos, kurias pasitelkus įrodoma, jog genetinė medžiaga yra DBR arba RBR, ir tyrinėjamas jų, kaip genetinės medžiagos, pasireiškimo mechanizmas. 1. Bakterijų sisijungimas: susijungus dviem bakterijoms, specialiu tilteliu iš vienos bakterijos į kitą pereina plazmidės DBR, kartais pertempdama ir chromosomos viengrandę DBR; bakterijai kartu perduodami plazmidiniai ir chromosominiai požymiai. 2. Bakteriofagų infekcija: bakteriofagai užkrečia bakterijas, įleidami savo chromosomą – DBR arba RBR, ir panaudoja bakterijų sintezės aparatą savų branduolio rūgščių ir baltymų sintezei. 3. Bakteriofagų pakeitimas: bakterinė ląstelė, kurioje yra fago DBR molekulių, infekuojama mutantiniu fagu. Ląstelės viduje vyksta fago DBR ir fago chromosomos rekombinacija ir ištaisoma fago chromosomos klaida, net jei tai būtų didelio fragmento, pavyzdžiui, viso geno trūkumas. 4. Virusų atstatymas: iš skirtingų mutantinių tabako mozaikos virusų išskiriama RBR ir baltymai. Sukeičiami baltymai, ir sudarius tinkamas sąlygas *in vitro* susidaro virusai, kurių savybes lemia RBR. 5. Virusinės DBR arba RBR infektyvumas: bakterijų arba aukštesniųjų organizmų virusų chromosoma (DBR arba

RBR), įdėta į ląstelių kultūrą arba in vivo įleidus į audinius, patenka į ląsteles ir ten skatina pilnaverčių virusų susidarymą.

Šiame tyrimo lygyje duodamai cheminei objekto charakteristikai reikia tikslesnio kriterijaus – požymio aprašymo. Kaip požymis čia dažnai būna baltymo molekulė. Ji gali būti vertinama dviem aspektais: pirmuoju – kai baltymas, kaip fermentas, dalyvauja tam tikroje reakcijoje, ir požymis yra to fermento veiklos rezultatas, pastebimas, dažniausiai netiesiogiai, pavyzdžiui, bakterijų atveju – pagal terpėje pasikeitusią indikatoriaus spalvą; antruoju aspektu tiriama pati baltymo molekulė, jos pirminė struktūra, amino rūgšties pakeitimo ryšys su atliekama funkcija. Čia priskirtini ir į ląstelės membranos struktūrą įeinantys baltymai, atliekantys gyvybiškai svarbią funkciją. Ji pasireiškia bendrais požymiais, pavyzdžiui, ląstelės gyvybingumu. Šiuo atveju požymis yra pati baltymo molekulė, jos buvimas, nebuvimas arba dėl mutacijos nesugebėjimas sudaryti reikiamos sąveikos, pavyzdžiui, membranos struktūroje.

Tačiau veikianti baltymo molekulė dažnai būna sudaryta iš dviejų, keturių arba keleto polipeptidinių (sudarytų iš amino rūgščių) grandinių, kurių kiekviena atskirai negali atlikti baltymo funkcijos ir lemti požymį. Polipeptidinės grandinės gali būti koduojamos skirtingose chromosomose arba jos dalyse ir sintetinos panaudojant skirtingas informacines RBR. Kiekvienos šių grandinių įtaka požymio formavimui yra vienodai svarbi – baltymo molekulė – fermentas veikia tik esant visų reikiamų polipeptidinių grandinių kompleksui. Įvykus mutacijai ir sintetinant bent vieną polipeptidą klaidingai, sutrinka viso fermento funkcija ir pakinta požymis. Todėl, jei nekeisime objekto vertinimo kriterijaus – požymio sąvokos, sukursime paradoksalią situaciją: objektas – DBR molekulė koduoja polipeptidą, kuris nelemia požymio. Tokių baltymų pavyzdys gali būti šarminė fosfatazė, sudaryta iš dviejų, hemoglobinas ir imunoglobulinas – iš keturių polipeptidinių grandinių. Ypač įdomi šiuo požiūriu yra RBR polimerazė – fermentas, sintetinantis RBR. Jo šerdį sudaro penkios polipeptidinės grandinės – subdalelės: dvi alfa, beta, beta-štrichas ir omega subdalelė. Veiklusis fermentas susidaro prisijungus dar dviem subdalelėms: sigma subdalelei, kuri lemia specifiškumą fermento veikimo pradžioje, ir ro dalelė, kuri stabdo fermento veikimą. Sudarančios fermentą subdalelės atlieka atskiras funkcijas, būtinąs RBR sintezei. Tad šiuo atveju kriterijumi – požymiu gali būti visa fermento molekulė ir jos veikimas – RBR sintezė arba atskiros subdalelės ir jų funkcija.

Be to, šio lygio tyrime požymio sąvoka apima RBR molekules, kurios sintetinos nurašant genomą, tačiau nėra panaudojamos baltymo sintezei: tai transportinės RBR bei ribosomų RBR. Jos aptarnauja baltymų sintezės

sistemą, todėl jų atliekamos funkcijos yra gyvybiškai svarbios, nors nepasireiškia kaip specifinis požymis. Todėl tRBR ir rRBR atveju požymiu laikoma šių molekulių sintezė, jų buvimas arba nebuvimas.

Vis dėlto šiame lygyje bene svarbiausia tai, kad buvo sukurta genetinės informacijos sąvoka, įgalinusi suprasti ryšį tarp genetinės medžiagos ir baltymo molekulės struktūrų. Pagrindiniai teiginiai yra šie: 1. DBR ir RBR molekulėse svarbiausia yra struktūros vienetų – nukleotidų išsidėstymo seka. 2. Amino rūgščių seka baltyme yra užkoduota DBR arba RBR molekulėje nukleotidų arba, tikriaus, jų trejetų seka (vieną amino rūgštį koduoja trys greta esantys nukleotidai). Baltymų sintezės sistemoje ši seka yra dekoduojama transportinėmis (nešančiomis amino rūgštį) RBR. 3. Yra nukleotidų sekos, nuo kurių nurašomos transportinės, ribosomų RBR bei kai kurios kitos RBR, ir sekos, kurias atpažįsta baltymai. Apibendrinant galima teigti, jog ląstelę sudaro genetinė informacija ir jos išraiškos produktai. Todėl į ląstelių dalijimąsi, organizmų dauginimąsi bei ontogenezę galima žiūrėti kaip į genetinės informacijos dvigubėjimą ir palaipsnį tos informacijos išraišką. Ląstelėje, organizme genetinė informacija yra tam tikru laipsniu atskirta nuo išraiškos, informacija yra pirminė, santykinai savarankiška. Tai yra šio lygio požūris į gyvųjų organizmų ir gyvybės esmę apskritai. Atsižvelgiant į minėtus teiginius šio lygio tyrime geno apibrėžimas yra toks: *genas – tai tam tikro dydžio DBR arba RBR molekulės fragmentas, turintis informacijos arba vienai polipeptidinei grandinei, arba nepanaudojamoms baltymo sintezei RBR arba sąveikai su baltymais ir su RBR*. Taip apibrėžtas genas atitinka dar klasikinės genetikos išryškintas geno savybes: genas gali mutuotis (kisti), rekombinuotis (apsikeisti dalimis), keisti vietą. Tačiau šis geno apibrėžimas yra painus, ryškinantis detales, netikslus konkrečiu atveju (pavyzdžiui, pasirinktiniai atvejai: DBR arba RBR; informacija polipeptido grandinei, kuri yra arba pilnavertis baltymas, arba tik jo subdalelė). Šis lygis jau duoda pagrindo bendram, abstrakčiam geno apibrėžimui, tačiau jis bus labiau pagrįstas jau kito lygio darbuose.

Penktasis tyrimo lygis: DBR arba RBR nukleotidų seka – funkcija

Šio lygio tyrimo pagrindą sudaro trys metodinės priemonės: 1. Atrastos kirpimo endonukleazės, t. y. fermentai, kerpantys DBR griežtai specifinės sekos vietoje. 2. Iškirptų fragmentų klonavimas – dauginimas kitoje ląstelėje. 3. Produktyvus ir palyginti nesudėtingas nukleotidų sekos nustatymas. Šias priemones panaudojus buvo nustatyta kai kurių mažųjų genomų (plazmidžių, fagų), įvairių organizmų genomo fragmentų, atskirų genų bei jų sudėtinių dalių nukleotidų seka, taip pat atskirų sekų funkcija ir koduojamo polipeptido struktūra.

Be šių pagrindinių, plačiai naudojamos dar ir kitos metodinės priemonės: cDBR sintezė – tai DBR, kuri yra RBR kopija, susintetinta pasitelkus atvirkštinę transkriptazę; DBR – DBR, DBR – RBR hibridizacija; hibridų elektroninė mikroskopija, leidžianti pamatyti hibridinamų sekų gebėjimą papildyti viena kitą; ultracentrifugavimas tankio gradientu; vienakryptė ir dvikryptė elektroforezė įvairiuose geliuose ir dar daugelis kitų metodų, įgalinančių charakterizuoti genomo DBR, RBR, cDBR, genomo nurašymo bei dekodavimo produktus įvairiuose genetinės informacijos išraiškos etapuose.

Šio lygio tyrimo techninės priemonės padėjo nustatyti dvi faktų grupes, keičiančias ankstesniųjų lygių pažiūrą į genomo funkcinę struktūrą bei genetinės informacijos organizaciją. Viena faktų grupė: nustatyta genomo nukleotidų sekų funkcija bei sekų ryšys su koduojamos struktūros funkcija. Pavyzdžiui, nustatyta sekos funkcija promotoriaus – operatoriaus bei baigmės srityse, t. y. geno nenurašomose dalyse; nustatyta priekinės sekos informacinėje RBR paskirtis; aprašyti informacinės RBR, taip pat ribosomų bei transportinės RBR brendimo metu įvykstantys pokyčiai, pašalinant veikiančią struktūrai nereikalingas sekas; nustatytas nekoduojančių, iškerpamų sekų vaidmuo aukštesniųjų organizmų genų išraiškoje.

Antroji faktų grupė parodė genomo koduojančios nukleotidų sekos ir koduojamo veikiančio produkto struktūrinį neatitikimą, net jeigu bus atsižvelgta į tai, jog baltymo vieną amino rūgštį koduoja trys nukleotidai.

Genetinės informacijos išraiškos kelyje susidarant veikiančiai struktūrai, pirminiai nurašymo ir baltymų sintezės produktai yra pakeičiami iki veikimui tame etape optimalios struktūros (RBR molekulei pašalinamos kraštinės sekos ir viename gale – 5' – pridamas metilintas nukleotidas guanosinas, o kitame – 3' – gale prisegama įvairaus ilgio adenosino nukleotidų seka, pašalinamos nekoduojančios sekos – iškarpos; baltymo molekulei pašalinamos nereikalingos galinės bei viduje esančios amino rūgštys ir susidaro tretinė veiklioji struktūra). Tai parodo, pavyzdžiui, fermento aktyvųjį centrą sudarančių amino rūgščių padėties, jam veikiant ir pirminėje fermento struktūroje ištiesus baltymo molekulę, palyginimas su jas koduojančių trejetų padėtimi genome: fermento aktyvusis centras susidaro baltymo molekulei susilanksčius taip, kad reikiamos amino rūgštys suartėja; ištiestoje molekulėje jos gali būti įvairiai nutolusios viena nuo kitos; informacinėje RBR jas koduojantys nukleotidų trejetai gali būti atskirti nekoduojančių sekų – iškarpų; o genome – DBR molekulėje, jos aktyvaus centro amino rūgštis koduojantys trejetai bus dar labiau nutolę vienas nuo kito, o kartais reikiamų trejetų ir nerasime, nes jis susidarys tik pašalinus iškarpa.

Veikliojo baltymo (arba RBR molekulės) ir jį koduojančios DBR struktūrinis neatitikimas yra labai svarbi aplinkybė aptariant šio tyrimo lygio apibrėžimą. Atrodo paradoksalu, kad, žinodami didžiulio DBR fragmento nukleotidų seką, negalime taip pat tiksliai nustatyti jame esančio geno ribų. Klasikinėje geno sąvokoje genas sutapatinamas su požymiu. Jei požymis yra fermento veiklos rezultatas, tai galima tiksliai nustatyti amino rūgštis, sudarančias fermento aktyvųjį centrą ir kartu lemiančias požymį, tačiau šias amino rūgštis koduojantys trejetai genome bus labai išsibarstę, tarsi netekę tarpusavio funkcinio ryšio. Vadinas, ląstelės gyvenime nėra būtinas geno ir koduojamo produkto struktūrinis atitikimas; lemiamas vaidmuo genome tenka esamos informacijos ir koduojamos struktūros funkcijos ryšiui, vienybei. Genome esanti informacija išraiškos kelyje yra perduodama iš vienos struktūros – DBR, kitai struktūrai – RBR, o pastaroji perduoda informacijos išraiškos aktu trečiajai struktūrai – baltymui, kuris sintetinamas dekodavimo sistemoje. Pirminė baltymo molekulė taip pat yra keičiama, kol pagaliau tampa veikliuoju baltymu. Pabrėžtina, jog šios struktūrinės kaitos metu – tiek struktūros, turinčios informaciją (RBR), tiek struktūros, turinčios funkciją (baltymas) – kitimai skirti optimizuoti informacijos išraišką ir funkciją. Struktūrų neatitikimas neturi reikšmės, svarbu, kad genomo informacija optimaliu keliu reikštūsi tam tikra funkcija.

Minėti teiginiai duoda pagrindą šio lygio geno apibrėžimui: *genas – tai struktūra, turinti funkcijos informaciją*. Šis apibrėžimas abstraktus, nėra ribojamas koduojančios ir koduojamos struktūrų, nedetalizuoja pastarojo lygio tyrimo specifiškumą. Todėl šis geno apibrėžimas kartu yra bendras visų tyrimo lygių geno apibrėžimas ir sutampa su geno sąvoka.

Pastarasis tyrimo lygis yra šių dienų biologijos tyrimo lygis. Jo metodologija ir atskleisti faktai papildo arba pakeičia seniau aprašytų faktų vertinimą, duoda pagrindo nagrinėti genetinės informacijos organizaciją įvairaus sudėtingumo genomuose. Genų inžineriniai darbai – tiek pirmieji, fantastiškai atrodantys eksperimentai, tiek ir pramonės praktikoje patvirtinti rezultatai – parodė beribes gyvųjų organizmų genomų konstravimo laboratorijoje galimybes kuriant norimų savybių individus.

Aprašytieji penki tyrimo lygiai tik santykinai padalina genetikos mokslą tarsi žinių gradiete į atskirus sluoksnius, kuriuos sudaro tyrimų objektų, naudojamų metodų, rezultatų bei jų vertinimo, sąvokų, laiko dvasios, asmenybių protų sandauga. Tyrimų lygiai ryškūs istorinėje retrospektyvoje, ypač kai atskiro lygio pradininkas buvo geniali asmenybė: Gregoras Mendelis, Tomas H.Morganas. Ketvirtojo ir penktojo tyrimo lygių istoriniame pamate yra keletas darbų, kelių laboratorijų pastangos. Laiko ir minties dvasia tarsi laukė

kibirkšties, kad didžiuliu darbų sprogimu atidarytų kelią naujojo lygio srautui.

Ką laikyti tyrimo lygio pradžia? Kokie atradimai yra tyrimo lygio kaitos akstinas? Imant artimesnius laikus, matyti, kad ketvirtojo lygio pradžia yra gana tiksliai nustatoma: O.T.Eiverio ir bendradarbių darbo rezultatų paskelbimo metai. Šių autorių darbai genetikams davė į rankas chemiškai švarią, žinomos struktūros genetinę medžiagą – DBR. Tai iš pagrindų pakeitė sąvokas, faktų interpretavimą, sukūrė naują metodologiją. Tačiau liko klasikinės genetikos naudoti mutagenezės ir rekombinacijos, kaip atsitiktinių, tikimybių procesų, vertinimai.

Labai svarbus atradimas – DBR dvigubos spiralės struktūros nustatymas. Tačiau jis netapo naujo lygio pradžia, lygio keitimo akstinu, nes naujasis atradimas – dvispiralė DBR struktūra – tik paaiškino daugelį procesų, reiškinių, papildė kai kurias prielaidas, bet nieko nepakeitė tyrimų metodologijoje. Todėl dar teko laukti du dešimtmečius, kol pasirodė darbai, davę akstiną keisti tyrimo lygį – tai nukleodų sekos nustatymas.

Šiandieninėje genetikoje toks padalijimas į tyrimo lygius yra daugiau teorinio pobūdžio. Tyrimo lygiai ryškėja analizuojant genetikos mokslo raidą ir esamą būklę būtent šiandieninės genetikos požiūriu ir padeda suprasti, jog nėra senos ir naujos, klasikinės ir šiandieninės genetikos, o yra tik genetikos mokslo keliami klausimai ir ieškomi atsakymai, griežtai laikantis produktyvumą lemiančios taisyklės: klausimo – tyrimo metodų – atsakymo atitikimo. Tik toks metodologiškai harmoningas tyrimas duoda naujų rezultatų, atsako dar į vieną žmogiškojo smalsumo keliamą klausimą, tampa dar vienu žingsniu siekiant naujo, dar nežinomo tyrimo lygio.