

A DESCOBERTA DO MODO DE AÇÃO GÊNICA

Décima quinta aula (T15)

Texto adaptado de:
MOORE, J. A. Science as a Way of Knowing - Genetics. *Amer. Zool.* v. 26: p. 583-747, 1986.

Objetivos

1. Explicar a hipótese de Garrod para a origem da alcaptonúria.
2. Identificar nos experimentos de transplantes de olho em *Drosophila melanogaster* a origem da teoria um gene - uma enzima.
3. Analisar as diferentes estratégias utilizadas na caça ao suposto precursor do pigmento do olho dos insetos.
4. Explicar a interação entre os genes *vermilion*, *cinnabar* e *white* com base na teoria um gene - uma enzima.
5. Explicar o papel que tiveram os inibidores de enzimas no estudo das vias metabólicas celulares.
6. Discutir as razões que levaram Beadle a trocar *Drosophila melanogaster* por *Neurospora crassa* nos estudos sobre o modo de ação dos genes.
7. Explicar a estratégia usada por Beadle e Tatum para identificar e cultivar mutantes de *Neurospora crassa* com interrupções em cadeias metabólicas essenciais.
8. Explicar como se pode distinguir em *Neurospora crassa* mutantes de um mesmo gene de mutantes de genes diferentes, no caso de as mutações afetarem uma mesma via metabólica.

O QUE FAZEM OS GENES?

Ao final da terceira década do século XX não restavam mais grandes questões sobre os mecanismos de transmissão dos genes. Assim, a ênfase mudou para questões como “O que os genes fazem?” e “Qual a natureza química dos genes?”. É claro que já havia interesse nessas questões desde o início do século, mas, com as técnicas disponíveis, havia pouca possibilidade de se obter qualquer resposta mais aprofundada. Nenhuma das técnicas de rotina atuais, tais como microscopia eletrônica, isótopos radioativos, computadores, cromatografias e instrumentos incredivelmente sofisticados estavam disponíveis naquela época. Também não havia muito apoio financeiro para pesquisa, e assistentes de laboratório e pós-doutorandos eram escassos. Ensino e pesquisa eram considerados como de igual importância nas grandes Universidades, de modo que menos tempo era dedicado à

pesquisa. E. B. Wilson foi uma exceção, pois conseguiu realizar pesquisa de altíssimo nível e ter uma quantidade incrível de publicações científicas, mesmo com uma carga horária de ensino que seria insuportável para a maioria dos biólogos de hoje.

Neste contexto, os campos referentes à estrutura e à função do gene – Biologia Celular e Bioquímica – não alcançaram um estágio em que as questões pudessem ser respondidas de maneira definitiva. Porém um ingrediente importante para a pesquisa científica, de fato *sine qua non*, não estava faltando: havia “cérebros”. No momento em que as técnicas se tornaram disponíveis, alguns drosofilistas pioneiros já haviam estabelecido, de maneira pouco questionável, que os genes atuam controlando as atividades metabólicas das células. O estágio estava pronto para que Watson e Crick formalizassem, em 1953, o paradigma central da Genética – que em breve se transformou no paradigma central das Ciências Biológicas.

ENZIMAS E GENES

As técnicas disponíveis antes de 1953, apesar de pouco sofisticadas em comparação com as atuais, possibilitaram descobertas importantes sobre a função dos genes. Entre essas técnicas estavam aquelas desenvolvidas para o estudo de enzimas.

Durante a primeira metade do século XX, um dos mais frutíferos campos de pesquisa da Biologia Celular e da Bioquímica foi o estudo de enzimas. Enzimas eram consideradas fatores essenciais à vida e era opinião geral que os tipos de reações que se sabia, ou se suspeitava, que ocorressem nas células simplesmente não poderiam acontecer sem estes catalisadores orgânicos.

Em um desses estranhos episódios na história das idéias, a primeira ligação entre genes e enzimas aconteceu em uma época em que muito pouco era conhecido sobre ambos. Um médico inglês, Archibald E. Garrod (1857-1936), atendeu um paciente, um bebê, com uma doença rara chamada alcaptonúria. O nome dessa doença deriva do fato de a urina dos pacientes afetados conter corpos de alcaptona, compostos fundamentalmente por ácido homogentísico. Essa substância se torna vermelha escura ou preta ao se oxidar. Uma pista que indicou a doença do bebê foram as manchas escuras em suas fraldas, decorrentes da oxidação da alcaptona da urina.

Garrod sabia que os pais do bebê eram primos em primeiro grau, o que sugeria uma possível causa hereditária para a alcaptonúria. Em 1902 ele consultou Bateson, que lhe sugeriu que a doença poderia ser devida a um alelo recessivo. Garrod chamou a alcaptonúria e outras doenças semelhantes de “erros inatos do metabolismo”. Bateson continuou interessado no problema e escreveu em 1913: “*Alcaptonúria deve ser considerada como decorrente da falta de um determinado fermento [= enzima], o qual tem a capacidade de decompor a substância alcaptona. Em uma pessoa normal, esta substância não está presente na urina porque ela foi degradada pelo fermento, mas quando a pessoa não consegue produzir este fermento, a alcaptona é excretada na urina.*”

A hipótese, então, seria “um gene, um fermento”. Trinta anos mais tarde, com a terminologia atualizada, isto iria se tornar uma das mais importantes hipóteses que guiaria a pesquisa genética.

Nem Garrod e nem alcaptonúria são mencionados em nenhum dos livros escritos pela escola de Morgan nos anos das grandes descobertas. Mesmo que tenha tido conhecimento das hipóteses de Garrod e de Bateson, Morgan as ignorou. Morgan era tão a favor da ciência experimental e contrário a todo o resto – incluindo ciência não-experimental – que ele pode ter considerado a hipótese de Garrod como mera especulação. Mas é possível imaginar outras explicações para o desinteresse dos drosofilistas pioneiros pela hipótese de Garrod. Quando programas de pesquisa estão se desenvolvendo de modo rápido e produtivo, como estavam para os que trabalhavam com *D. melanogaster*, há pouco estímulo para a procura de novas coisas para fazer.

Foi somente na terceira década do século XX, quando a transmissão genética estava satisfatoriamente explicada, que os geneticistas começaram um estudo intensivo do tipo de problema levantado pela hipótese de Garrod.

O GENE VERMILION E GINANDROMORFISMO EM *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Morgan e Bridges (1919) usaram a teoria cromossômica da determinação do sexo para explicar a origem dos ginandromorfos em *D. melanogaster*. Eles concluíram que as partes femininas dos ginandromorfos continham dois cromossomos **X** e as partes masculinas, apenas um **X**. A origem de um ginandromorfo seria, portanto, um zigoto fêmea (**XX**) que, por perda de um cromossomo **X** em uma das mitoses embrionárias, apresentaria uma população de células **X0** que desenvolveriam fenótipo masculino. Eles realmente verificaram que, muitas vezes, ginandromorfos originados em cruzamentos entre fêmeas selvagens e machos portadores de mutações recessivas ligadas ao sexo apresentavam a parte feminina do corpo com fenótipo selvagem e a masculina com a mutação paterna.

Em 1920, Sturtevant publicou o achado de um ginandromorfo, obtido em um cruzamento de uma fêmea heterozigótica, portadora dos alelos recessivos dos genes *cosen*, *ruby*, *vermilion* e *forked* em um de seus cromossomos **X** e dos alelos selvagens desses genes no outro **X**, com um macho que portava em seu cromossomo **X** os alelos recessivos dos genes *scute*, *echinus*, *cut*, *vermilion*, *garnet* e *forked*. O cruzamento está esquematizados na figura 51.

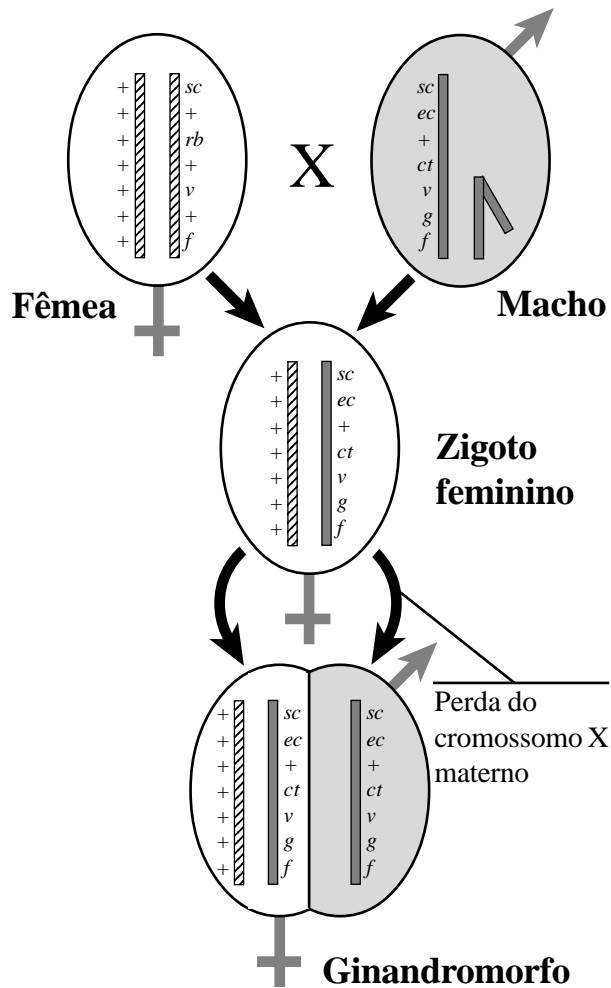


Figura 51. Representação esquemática do cruzamento realizado por Sturtevant, onde foi descoberto o ginandromorfo que mostrou a não-autonomia da mutação *vermilion*.

A publicação do encontro desse ginandromorfo se justificava pelo fato dele possuir um fenótipo inesperado. Ele era selvagem na parte feminina do corpo e *scute*, *echinus*, *cut* e *forked* na parte masculina. Isso indicava que o zigoto do qual ele havia se originado continha um cromossomo X portador dos alelos selvagens da mãe e o cromossomo X único do pai, e que a parte masculina do corpo havia se originado de uma célula que tinha perdido o X materno, uma vez que apresentava as mutações recessivas do pai. O fato inesperado, que chamou a atenção de Sturtevant e motivou a publicação daquele trabalho, foi o olho da parte masculina do corpo apresentar coloração selvagem. Uma explicação possível seria a do alelo *vermilion* presente no cromossomo X paterno ter sofrido mutação reversa. Mas Sturtevant descartou tal hipótese por considerá-la altamente improvável, ou seja, um mesmo indivíduo ter sofrido um distúrbio cromossômico e uma mutação reversa simultaneamente.

A hipótese aventada por Sturtevant foi de que a coloração *vermilion* (olhos vermelho-claros) do olho da *D. melanogaster* não seria uma característica autônoma, ou seja, desenvolvida pelas células portadoras da mutação gênica independentemente do genótipo das demais células do corpo. Ele imaginou que a coloração *vermilion* da *D. melanogaster* seria devida à ausência de alguma substância produzida pelo alelo selvagem do gene homônimo e que, no ginandromorfo em questão, essa substância havia se difundido do olho selvagem da parte feminina do corpo para o olho da parte masculina, tornando-o fenotipicamente selvagem (olhos vermelho-escuros).

Na época era praticamente impossível testar essa hipótese, pois ginandromorfos eram bastante raros. Além disso, havia muitas outras coisas interessantes a serem investigadas na “Sala das Moscas” e para as quais podiam ser aventadas hipóteses testáveis, bem ao gosto de Morgan – o paradigma continuava a ser a teoria cromossômica da herança. O paradigma em que o trabalho de Sturtevant se encaixava só surgiria cerca de 15 anos mais tarde.

HIPÓTESE SOBRE O MODO DE AÇÃO DOS GENES

Três nomes estão associados ao início das investigações sobre o modo de ação dos genes: George W. Beadle (1903-1989), Boris Ephrussi (1901-1979) e Edward L. Tatum (1909-1979).

Beadle recebeu seu Ph.D. em 1931 e foi contemplado com uma bolsa de estudos do *National Research Council Fellowship* para um treinamento de pós-doutorado no laboratório de Morgan no *California Institute of Technology*. No *Caltech*, Beadle começou a fazer pesquisas com *D. melanogaster*, ao mesmo tempo em que concluía o trabalho sobre citogenética de milho iniciado em seu doutoramento em *Cornell*. Em 1934, Boris Ephrussi chegou no *Caltech*; ele vinha de Paris para aprender genética de *D. melanogaster* com Morgan e Sturtevant. Seu interesse já era no modo de ação gênica, um assunto que logo passaria a interessar Beadle, de quem se tornou muito amigo. Ephrussi era hábil nas técnicas de cultura de tecidos e de transplantes e ele e Beadle planejaram um trabalho colaborativo em *D. melanogaster* utilizando essas técnicas, com o objetivo de testar a hipótese de Sturtevant sobre a não-autonomia do gene *vermilion*.

Em meados de 1935, Beadle foi para Paris realizar os experimentos no laboratório de Ephrussi no *Institute de Biologie*. Suas tentativas de cultivar discos imaginais *in vitro* falharam, mas eles desenvolveram um método para transplantar discos imaginais de uma larva para outra e obter o desenvolvimento do disco implantado quando a larva hospedeira sofria metamorfose para pupa e adulto (também chamado de imago nos insetos).

O que são discos imaginais?

Antes de continuarmos essa história talvez seja necessário esclarecermos o que são discos imaginais.

Nos insetos, a maioria dos órgãos dos adultos, tais como olhos compostos, pernas, antenas, asas, peças bucais, genitália etc. se desenvolvem a partir de aglomerados de células primordiais formados no final da fase embrionária, os chamados discos imaginais (relativos às imagos) Os discos imaginais permanecem indiferenciados até a fase de pupa, quando, então, um aumento da concentração de hormônios na hemolinfa induzem seu crescimento e diferenciação nas estruturas adultas para as quais estavam pré-determinadas.

Beadle e Ephrussi dissecavam larvas de *D. melanogaster*, separavam os discos imaginais de olhos e, através de uma micropipeta de vidro, implantavam esses discos na cavidade do corpo de outras larvas. O disco implantado continuava a se desenvolver na cavidade do corpo da larva hospedeira e durante a metamorfose desta (fase pupal), ele se diferenciava em um olho que ficava solto na cavidade abdominal da mosca hospedeira. A mosca hospedeira podia, então, ser dissecada e a cor do olho implantado na sua cavidade abdominal podia ser observada. A coloração do olho não sofria alteração decorrente da operação de implantação e nem pelo fato de ter se desenvolvido no interior da cavidade abdominal.

Beadle e Ephrussi realizaram transplantes entre 26 diferentes mutantes para cor de olho de *D. melanogaster*. Eles verificaram que discos de olhos de larvas mutantes implantados em larvas selvagens, ou

vice-versa, se desenvolviam autonomamente, isto é, produziam olhos com a cor de seu próprio genótipo, não sendo afetados pelo genótipo do hospedeiro. Ocorreram, no entanto, duas importantes exceções: os discos imaginais de larvas mutantes *vermilion* e *cinnabar* não se comportavam autonomamente. Essas duas mutações produziam o mesmo fenótipo, olho vermelho-claro, apesar de serem dois genes distintos, localizados em cromossomos diferentes: o gene *vermilion* está localizado no **X** (posição 33,0) e o *cinnabar*, no cromossomo **2** (posição 57,5). (Fig. 52)

Discos imaginais de larvas mutantes *vermilion* implantados em larvas do tipo selvagem desenvolvem olhos selvagem e não *vermilion* como seria esperado de acordo com o seu genótipo. Esses resultados confirmaram a hipótese original de Sturtevant de que o olho *vermilion* não teria desenvolvimento autônomo, sua coloração seria modificada em função do genótipo de outras células do corpo do indivíduo.

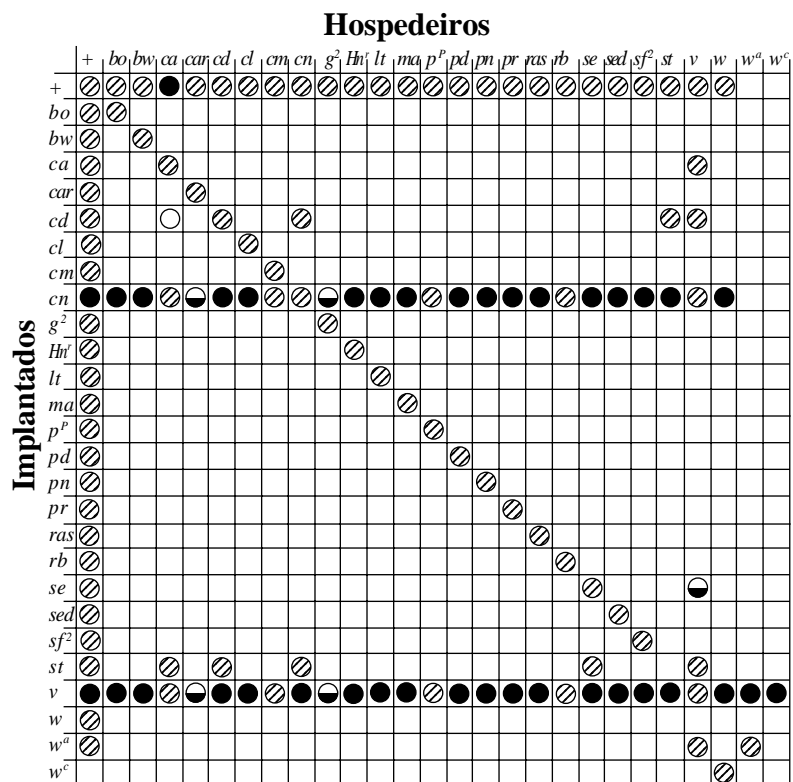


Figura 52. Representação esquemática dos resultados de transplantes de olhos em *Drosophila*. Os círculos listados indicam desenvolvimento autônomo; por exemplo, discos *brown* (*bw*) implantados em larvas selvagens desenvolvem coloração marrom. Os círculos em preto indicam desenvolvimento não-autônomo da pigmentação. Círculos metade branco e metade preto indicam que o resultado do implante foi uma coloração intermediária. (Tirado de Beadle e Ephrussi, 1935)

À semelhança do *vermilion*, os discos imaginais de olhos de larvas mutantes *cinnabar*, quando implantados em hospedeiros de linhagens selvagem ou de alguns tipos de linhagem mutante de cor de olho, desenvolviam coloração selvagem.

Em sua publicação de 1935, Beadle e Ephrussi escreveram: “*Sturtevant havia mostrado que a cor de olho vermilion é, sob certas condições, não-autônoma em seu desenvolvimento em mosaicos. Nos implantes elas foram igualmente não-autônomas, um [disco imaginal para] olho vermilion (v) implantado em um hospedeiro selvagem desenvolve [olhos com] pigmentação característica do tipo selvagem. Por meio de tranplantes nós fomos capazes de estudar muitas combinações que não são facilmente obtidas em mosaicos naturais e dessa forma nós verificamos que cinnabar (cn), uma cor de olho fenotipicamente similar ao vermilion, também não é autônoma na diferenciação de sua pigmentação. Outros dois mutantes de cor de olho, scarlet (st) e cardinal (cd), também fenotipicamente similares ao vermilion, são, no entanto, completamente autônomos no desenvolvimento de sua pigmentação em todas as com-*

binhações em que os estudamos.” (Fig. 53)

Os transplantes recíprocos entre mutantes *vermilion* e *cinnabar* levaram a resultados inesperados. Discos imaginais de larvas mutantes *vermilion* quando implantadas em larvas mutantes *cinnabar*, desenvolviam coloração tipicamente selvagem. No entanto, na situação inversa, ou seja, quando discos mutantes *cinnabar* eram implantados em larvas mutantes *vermilion*, eles desenvolviam a coloração vermelho-clara típica dos mutantes. Beadle e Ephrussi relataram esses resultados nos seguintes termos: “*Nós verificamos que um disco v em um hospedeiro cn dá origem a um olho do tipo selvagem, mas que um disco cn em um hospedeiro v origina um olho cn ... implantes de discos v e cn se comportam da mesma forma ... em um hospedeiro claret (ca), ambos são autônomos; em hospedeiros st ou cd ambos são modificados para o tipo selvagem. Isso corrobora a conclusão tirada dos transplantes recíprocos entre v e cn ao indicar que as influências hospedeiro-implante em v e cn são geneticamente – e presumivelmente quimicamente – estreitamente relacionadas.*”

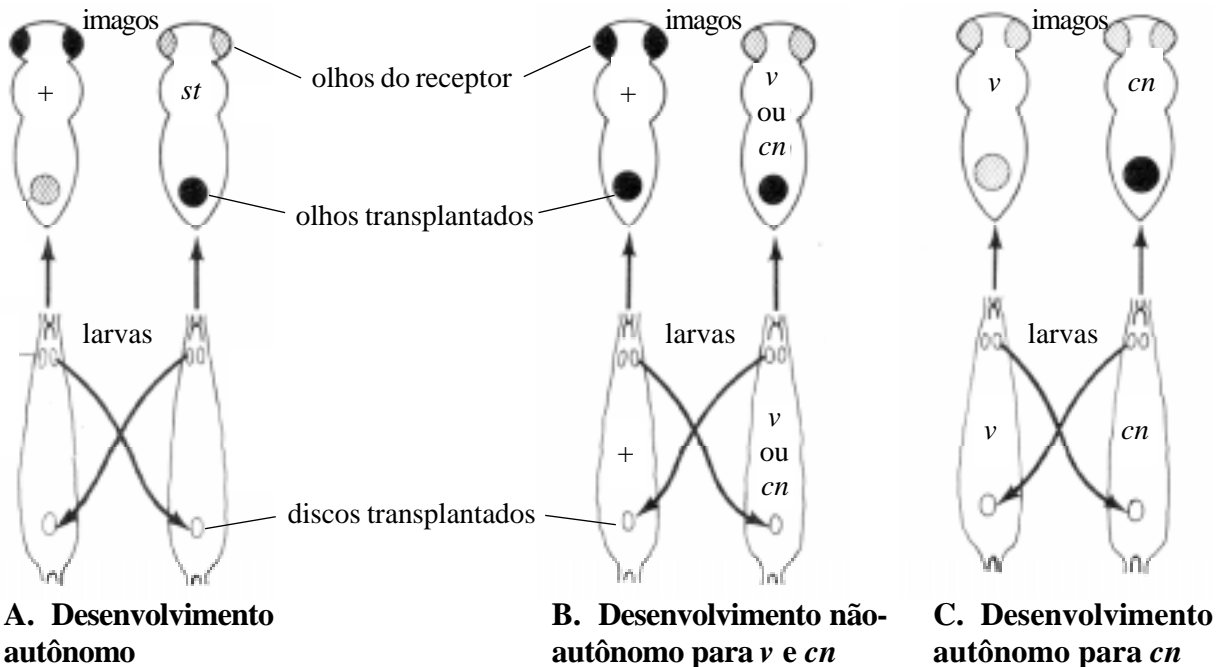


Figura 53. Esquema de experimentos de transplante de olhos em *Drosophila* mostrando o desenvolvimento autônomo e não-autônomo de alguns genótipos. Em **A**, desenvolvimento autônomo do mutante *scarlet* (*st*) e do tipo selvagem: disco *scarlet* implantado num receptor selvagem desenvolve pigmentação *scarlet*; disco selvagem implantado em receptor *scarlet* desenvolve pigmentação selvagem. Em **B**, desenvolvimento não-autônomo dos mutantes *vermilion* (*v*) e *cinnabar* (*cn*); discos imaginais de olhos desses mutantes implantados em hospedeiros selvagens desenvolvem pigmentação selvagem. Em **C**, é mostrado o desenvolvimento não autônomo do olho *vermilion* em hospedeiro *cinnabar* e o desenvolvimento autônomo do disco *cinnabar* em hospedeiro *vermilion*.

O comportamento não-autônomo dos discos imaginiais de olho *vermilion* e *cinnabar* sob certas condições requeria uma hipótese explicativa que não apenas os relacionasse, mas que também explicasse como essas mutações produziam seus efeitos nos transplantes.

Beadle e Ephrussi propuseram o seguinte: “Uma hipótese simples, e a nosso ver, plausível pode ajudar a responder essas questões. Essa hipótese assume que as substâncias ca^+ , v^+ e cn^+ são produtos sucessivos em uma cadeia de reações. As relações entre estas substâncias podem ser indicadas de um modo diagramático simples da seguinte maneira: substância ca^+ → substância v^+ → substância cn^+ . Neste esquema nós assumimos que ... o alelo mutante ca de alguma forma produz uma mudança que a cadeia de reações é interrompida em algum ponto antes da formação da substância ca^+ ; dessa forma uma mosca ca não possui as substâncias ca^+ , v^+ e cn^+ ... O alelo mutante cn interrompe a reação essencial para a transformação da substância v^+ em cn^+ ; assim uma mosca cn não possui substância cn^+ mas tem as substâncias ca^+ e v^+ .”

Posteriormente eles descobriram que o gene *claret* não controlava nenhum passo na cadeia de reações do pigmento, mas era um modificador da reação controlada pelos genes *vermilion* e *cinnabar*.

Em outras palavras, Beadle e Ephrussi estavam propondo que os resultados podiam ser explicados assumindo o seguinte:

- a. os alelos selvagens dos dois genes controlam a produção de duas substâncias específicas, chamadas v^+ e cn^+ , ambas necessárias para a formação do pigmento marrom dos olhos;
- b. a substância v^+ é precursora da substância cn^+ ;
- c. a mutação do gene bloqueia a formação da substância correspondente.

No entanto, apenas mais tarde ficou claro que as duas hipotéticas substâncias seriam, na verdade, precursores do pigmento.

Essa hipótese sugeria que o desenvolvimento de um organismo poderia ser consequência de conjuntos de reações químicas sequenciais, controladas pelos genes. Apesar de parecer modesta para os padrões atuais de desenvolvimento da Genética, essa idéia era bastante avançada para a época, e foi ela que abriu caminho para as investigações que se seguiram nessa linha, ao implantar em Beadle os germes da idéia **um**

gene - uma enzima, a partir da qual iria florescer toda a Genética Molecular.

O passo seguinte a ser dado na investigação do papel dos genes *vermilion* e *cinnabar* era testar a hipótese proposta, o que demandava a identificação das substâncias v^+ e cn^+ e comprovação de sua capacidade de corrigir os fenótipos dos mutantes *vermilion* e *cinnabar*.

A colaboração entre Beadle e Ephrussi (1935 e 1937) foi extremamente produtiva: eles publicaram 30 trabalhos nesse período, a maioria originais. Com isso, avançaram rapidamente em suas carreiras científicas. Ephrussi foi nomeado diretor de um novo laboratório de Genética na *École des Hautes Études*, onde liderava um laboratório de *Drosophila* com 4 assistentes e alguns técnicos. Biólogos jovens e brilhantes, como Jacques Monod, foram atraídos para ali pelos trabalhos de transplantes. Ephrussi contratou o químico orgânico Khouvine para trabalhar na química dos pigmentos do olho.

Para Beadle, o trabalho com transplantes em *D. melanogaster* rendeu um cargo de professor assistente na *Harvard University* em 1936 e, no ano seguinte, o cargo de *full professor* na *Stanford University*. Com uma verba de 3 mil dólares da *Rockefeller Foundation*, Beadle contratou Edward Tatum, um jovem bioquímico de bactéria, para trabalhar em tempo integral na caça aos precursores do pigmento do olho da *D. melanogaster*.

Assim, os dois drosofilistas começaram a deslocar o enfoque do trabalho de transplante da Genética clássica para a Bioquímica. Essa mudança de enfoque, que à primeira vista pode parecer de menor importância, iria provocar profundas transformações na Genética: o gene até então uma entidade abstrata iria se transformar em uma entidade hipotética passível de ser investigada. Com isso abria-se o caminho para a identificação da natureza molecular e da função do gene. Mas quais foram essas mudanças tão importantes no enfoque de trabalho?

Na tentativa de se identificar os precursores do pigmento do olho, larvas mutantes passaram a ser injetadas ou alimentadas com possíveis candidatos a precursor. A idéia era a seguinte: se a substância precursora for injetada ou fornecida na alimentação dos mutantes existe a possibilidade de alteração fenotípica do olho. Essas estratégias transformaram *D. melanogaster* em uma ferramenta bioquímica. Ephrussi coloca isso de modo

bem sugestivo: “... moscas são como ‘reagentes’ para a detecção de quantidades mínimas de substâncias biologicamente ativas.”

Ephrussi e Khouvine passaram a usar uma estratégia tipo “tiro no escuro” em sua caça ao precursor; eles injetavam ou alimentavam mutantes com substâncias que poderiam ser precursoras de pigmentos e verificavam se havia alteração fenotípica do olho. Beadle e Tatum trabalhavam com muito mais critério tentando quantificar o precursor em extratos de moscas e construir linhagens de moscas onde pudessem ser detectadas quantidades mínimas de precursor.

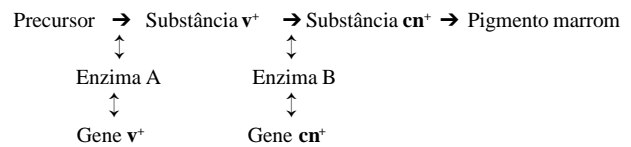
Ephrussi e Khouvine, usando uma das linhagens “sensíveis” e o método de ensaio biológico desenvolvidos por Tatum descobriram, por acaso, que a substância v^+ era quimicamente relacionada ao triptofano. Essa descoberta permitiu que o químico orgânico Adolf Butenandt, experiente em competições científicas, e que estava trabalhando no sistema de pigmentação do olho da mariposa *Ephestia kühniela*, percebesse que um caminho fácil e rápido para a identificação da substância v^+ seria testar cada uma das substâncias quimicamente relacionadas ao triptofano. Assim, Butenandt, Weidel e Becker (1940) descobriram que a quinurenina era o composto com as propriedades esperadas para a substância v^+ . Larvas *vermilion* alimentadas com quinurenina desenvolviam olhos selvagens. Nessa época Tatum havia obtido cristais da substância v^+ e estava realizando sua identificação.

Ser vencido pelos alemães foi uma pílula amarga, especialmente para Tatum que havia trabalhado tão duro para aperfeiçoar *Drosophila* como um “reagente” bioquímico. Mas essa era a regra do jogo no campo da bioquímica nutricional, onde anos de trabalho podiam ser superados por um golpe de sorte de um competidor. Era um jogo diferente do que os drosofilistas estavam acostumados, onde a reciprocidade, a abertura e a sensibilidade para se evitar competição acirrada eram a regra. Beadle rejeitava essa atitude “*derube seu competidor se você tiver oportunidade*” dos bioquímicos.

Foi nesse contexto que Beadle concluiu ser necessário um método diferente para lidar diretamente com o problema da ação gênica. E ele estava certo, a identificação da substância cn^+ demandou enormes esforços e muitos anos de trabalho ao grupo de Butenandt.

A VIA BIOQUÍMICA DO PIGMENTO MARROM DO OLHO DA *Drosophila melanogaster*

A partir dos resultados dos laboratórios de Beadle e de Ephrussi foi possível chegar à hipótese de que os v^+ e cn^+ atuariam no controle da via bioquímica de síntese do pigmento marrom do olho da *Drosophila*, como mostrado no esquema abaixo:



A enzima A seria produzida pelo gene v^+ e a enzima B seria produzida pelo gene cn^+ . Um mutante *vermilion* não seria capaz de produzir a enzima A e, portanto, não teria a substância v^+ ; ele produziria a enzima B, mas não teria substância cn^+ , pois a enzima B não teria o que transformar nessa substância. Com isso não haveria produção do pigmento marrom (omocromo) e os olhos, contendo apenas pigmento vermelho (pteridina), teriam coloração vermelho-clara e não selvagem.

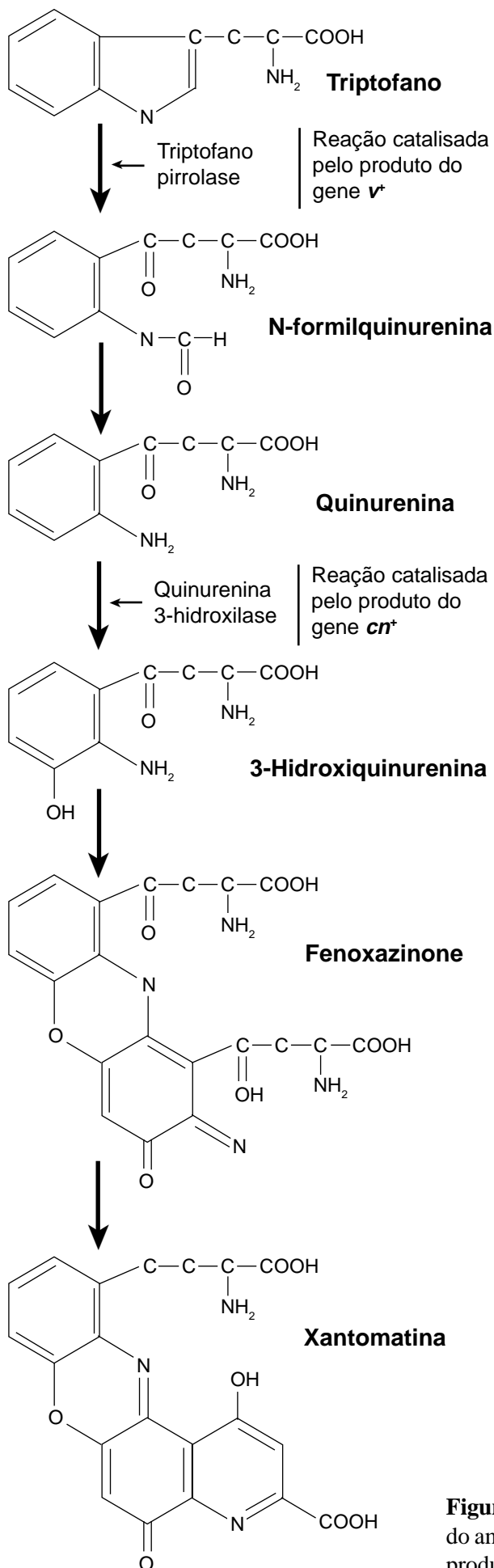
Um mutante *cinnabar* produziria a substância v^+ normalmente, mas não teria a enzima B para transformá-la na substância cn^+ . Com isso não haveria produção do pigmento marrom e os olhos, como no caso anterior, conteriam apenas pigmento vermelho, tendo coloração vermelho-clara e não selvagem.

No caso do transplante de disco imaginal *vermilion* em um hospedeiro *cinnabar* a situação seria a seguinte:

- o disco não produziria substância v^+ , mas teria a enzima B;
- o hospedeiro produziria a substância v^+ , mas não teria a enzima B para transformá-la em substância cn^+ ;
- a substância v^+ produzida pelo hospedeiro se difundiria para o interior das células do disco implantado onde, por ação da enzima B, seria transformada em substância cn^+ e subsequentemente em pigmento marrom, o que faria o olho desenvolver pigmentação selvagem.

Estudos posteriores nessa área desvendaram a cadeia de reações na via de síntese do pigmento marrom e mostraram que a hipótese original estava correta. (Fig. 54)

Uma dúvida que surge com frequência é sobre o papel do gene *white* na síntese dos pigmentos



do olho. Na verdade, o gene *white* está envolvido não na síntese, mas na distribuição dos pigmentos omocromo (marrom) e pterina (vermelho) no olho e em alguns outros órgãos da mosca. A função da proteína codificada pelo alelo selvagem do gene *white* ainda é desconhecida, mas acredita-se que seja uma proteína de membrana, envolvida no transporte dos precursores dos pigmentos do olho para dentro das células.

ELUCIDAÇÃO DAS VIAS METABÓLICAS

George W. Beadle, Edward L. Tatum e Boris Ephrussi foram líderes na busca de informações sobre o modo de ação dos genes. Foram eles que introduziram um novo paradigma e lançaram a semente de um novo ramo dentro da Biologia: a Genética Bioquímica.

No final da década de 1930, havia uma considerável quantidade de informação sobre o metabolismo celular. A reação fundamental para toda as formas de vida – $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$ – havia sido decifrada em dezenas de reações separadas, cada uma controlada por uma enzima específica.

A elucidação desta via metabólica demandou esforços de muitos cientistas por muitos anos. Um dos maiores problemas era a velocidade das reações, as quais, com frequência, ocorriam em frações de segundo; uma reação terminava antes que o investigador pudesse detectar o seu início. A maneira usual foi utilizar substâncias químicas (“venenos de enzimas”) que bloqueavam a ação de uma enzima específica. O resultado, nesse caso, era o acúmulo do substrato da enzima, o qual podia, então, ser detectado e identificado.

Considere, por exemplo, que uma via metabólica nas células envolve uma modificação da molécula **A** na molécula **B** e, em seguida, de **B** em **C** e, assim, sucessivamente até a molécula **Z**, passando por todo o alfabeto. Assuma, também, que a modificação de **A** em **B** é controlada pela enzima **A-ase**, de **B** em **C** pela enzima **B-ase** e, assim, sucessivamente. Tudo que sabemos no início é que a célula transforma a molécula **A** na molécula **Z**. Uma hipótese inicial é que a conversão pode ser conseguida por apenas uma enzima, em apenas uma reação.

Figura 54. Via de biossíntese do pigmento omocromo a partir do aminoácido triptofano, mostrando os locais onde atuam os produtos dos genes *vermilion* e *cinnabar*.

Vamos supor que foi usado o cianeto como primeiro veneno de enzima. Nessa situação, observamos que não há produção de **Z**, e que uma outra molécula, ainda não conhecida, **M**, é detectada nas células. O que podemos concluir? A explicação mais plausível é que a conversão de **A** em **Z** pela célula ocorre em pelo menos duas etapas: **A** é convertido em **M** e, então, **M** é convertido em **Z**. O cianeto estaria bloqueando a ação da enzima que catalisa a transformação de **M** num produto subsequente.

Outros venenos poderiam ser tentados e com o tempo seria possível saber mais e mais sobre o metabolismo normal, por meio da interferência dessas drogas nas engrenagens bioquímicas da célula.

Os estudos iniciais de Beadle e Ephrussi sobre a maneira como os genes para a cor dos olhos de *D. melanogaster* produziam seus efeitos indicavam que a ação do gene poderia ser mediada por enzimas. Foi descoberto o suficiente para se compreender que a hipótese “um gene - uma enzima” poderia ser uma abordagem promissora. No entanto, as primeiras tentativas de usar *D. melanogaster* como “reagente bioquímico” mostraram que esse sistema era muito complexo para se testar aquela hipótese e, pela primeira vez, aquele animal nobre deixou os geneticistas sem rumo.

Então, uma postura experimental antiga foi invocada: se os experimentos não podem ser feitos em uma espécie, procure uma outra que sirva a seus propósitos.

NEUROSPORA CRASSA E A GENÉTICA BIOQUÍMICA

A musa inspiradora da estratégia que iria revolucionar não apenas a Genética mas toda a Biologia desceu inesperadamente em Beadle enquanto ele estava sentado, um dia, no início de 1941, assistindo uma aula que Tatum ministrava em um curso sobre bioquímica comparada.

Horowitz relata como Beadle contava essa história: “*Nessa aula Beets [apelido de Beadle] aprendeu que os microorganismos diferem quanto a suas necessidades nutricionais, apesar de todos eles compartilharem a mesma bioquímica básica. Se essas diferenças são de origem genética, ele pensou, seria possível induzir mutações gênicas que iriam produzir novas necessidades nutricionais no organismo testado. Se bem sucedida, essa estratégia levaria diretamente aos*

genes que governam compostos bioquímicos conhecidos, e não a genes para substâncias desconhecidas que requereriam anos de trabalho para serem identificadas, como era o caso de quase todas as mutações conhecidas na época.”

Para por em prática essa idéia seria necessário um organismo que pudesse ser submetido a testes genéticos e que crescesse em um meio de cultura quimicamente definido. Beadle conhecia tal organismo. Ele ouvira falar de *Neurospora crassa*, o bolor vermelho do pão, quando ainda era estudante de graduação em *Cornell*, em uma palestra ministrada por B. O. Dodge.

Dodge teve um papel importante na história da *N. crassa*; foi ele quem descobriu que os ascósporos desse fungo só germinam após terem sido submetidos ao calor. Com isso o ciclo de vida pôde ser completado em laboratório e o organismo submetido a estudos básicos de Genética. No entanto, os requisitos nutricionais de *N. crassa* ainda eram desconhecidos em 1940. No laboratório de Dodge, esse fungo era cultivado em ágar nutritivo, isto é, complementado com diversas substâncias orgânicas. Foi Tatum quem logo mostrou que *Neurospora* podia crescer em um meio bastante simples, composto por açúcar, sais minerais e um único fator de crescimento, a vitamina biotina. Esse meio ficou conhecido como “meio mínimo”.

Ciclo de vida de *Neurospora*

A fase vegetativa de *Neurospora* foi descrita inicialmente por microbiologistas franceses, cerca de um século antes do trabalho de Beadle e Tatum. Esse fungo chamou a atenção dos pesquisadores quando, em 1842, em um verão muito quente e úmido, os pães das padarias de Paris se deterioraram pelo crescimento de grande quantidade de um bolor alaranjado. Foi, então, constituída uma comissão pelo Ministério da Guerra francês para determinar as causas da infecção e fazer as recomendações devidas para evitá-la. O resultado desse estudo foi a descrição de diversas características do fungo, tais como, tipo de colônia, forma dos micélios, dos conidióforos e dos conídios do “bolor vermelho do pão”.

Um segundo estudo científico de *Neurospora* foi feito pelo botânico holandês F. A. F. C. Went no começo do século XX. Durante o período em que trabalhou no famoso Jardim Botânico de

Buitzenjorg (atualmente, *Borgor*) na Indonésia, na época uma colônia da Holanda, Went conheceu o *oncham*, uma espécie de bolo alaranjado comumente encontrado nas feiras livres de Java. Esses bolos eram produzidos pelos nativos pela inoculação de um fungo em prensados de pasta de amendoim ou de soja que resultavam da extração de óleo. Os bolos alaranjados eram apetitosos e altamente nutritivos, seu sabor assemelhava-se ao do cogumelo *champignon*. A preparação do *oncham* é um costume que persiste até hoje em certas regiões de Java.

A prática de produção do *oncham* chamou a atenção do botânico holandês, que, na virada do século, isolou o fungo e passou a utilizá-lo em experimentos científicos. Foi ele quem descreveu o fungo *N. crassa* e seu método de cultivo, tendo-o utilizado também em uma série de experimentos sobre os efeitos de diversos substratos em enzimas como a trealase, a invertase e a tirosinase.

Todas essas observações iniciais sobre *N. crassa* foram feitas usando a fase vegetativa do organismo e os esporos produzidos assexuadamente, chamados **conídios** (esporos vegetativos). As características da fase sexuada do ciclo só se tornaram conhecidas na segunda década do século XX, quando Dodge descobriu que os esporos (ascósporos) produzidos sexuadamente só germinavam após terem sido submetidos ao calor.

N. crassa, diferentemente dos animais e das plantas em geral, é um organismo haplóide. Em sua fase vegetativa normal o organismo é constituído por filamentos (**hifas**) entrelaçados que, em conjunto, formam uma estrutura esponjosa, o **micélio**. As hifas são segmentadas e cada segmento contém, em geral, alguns núcleos haplóides idênticos. No entanto, hifas de indivíduos diferentes, crescendo em estreita proximidade, podem, ocasionalmente, se fundir, formando hifas **heterocarióticas**. Os núcleos das hifas fundidas não se unem, mantendo-se separados. As hifas heterocarióticas, no entanto, originam por divisão mitótica de seus núcleos haplóides novas hifas heterocarióticas.

A reprodução assexuada pode acontecer de duas formas: por crescimento e fragmentação de hifas, e pela formação de um tipo especial de esporo haplóide, o **conídio**. A germinação de um conídio dá origem a um novo micélio geneticamente idêntico ao tipo parental. (Fig. 55)

Um micélio pode formar corpos de frutificação imaturos (**protoperitécios**) contendo núcleos haplóides maternos e filamentos sexuais especiais, chamados **tricóginos**, que se estendem para fora do corpo de frutificação. Quando um fragmento de hifa ou conídio de um sexo (**A** ou **a**) entra em contato com um tricógeno do sexo oposto (**a** ou **A**) ele penetra no corpo de frutificação, sofre inúmeras divisões mitóticas e, cada núcleo originado se funde com um núcleo materno. Formam-se, assim, zigotos diplóides que ficam contidos no interior de bolsas ovais denominadas **ascos**. Um corpo de frutificação de *Neurospora* pode conter até 300 ascos.

O zigoto de cada asco sofre meiose imediatamente, originando quatro núcleos haplóides, que sofrem, então, uma mitose. No final, formam-se, portanto, oito células que se diferenciam em esporos (**ascósporos**), os quais ficam arranjados em ordem no interior do asco. Finalmente, os ascósporos se libertam: quatro são do tipo sexual **A** e quatro, do tipo **a**. O ciclo de *Neurospora crassa*, desde a germinação de um esporo até a produção de novos esporos pelo novo micélio, se completa em cerca de duas semanas.

Os ascósporos de *N. crassa* são grandes o suficiente para serem isolados manualmente, sem necessidade do uso de micromanipulador. Dessa forma, os quatro produtos de uma meiose podem ser facilmente recuperados e analisados individualmente. A ordenação dos esporos resultantes em um asco heterozigótico permite a determinação imediata da ocorrência ou não de permutação entre um dado gene e o centrômero.

O TRABALHO DE BEADLE E TATUM EM NEUROSPORA

A idéia fundamental de Beadle e Tatum (1941) era que as mutações alteravam os genes tornando-os incapazes de produzir enzimas. Com isso, o organismo não podia realizar a reação química correspondente e, como consequência, expressava o fenótipo mutante. No caso em que a reação bloqueada fosse essencial ao organismo, o mutante não sobreviveria, ou seja, a mutação seria letal.

Para testar essa hipótese, Beadle e Tatum começaram tentando induzir mutações letais em *Neurospora crassa*, por meio de radiação, e estudar seus efeitos bioquímicos. Isso parece, à

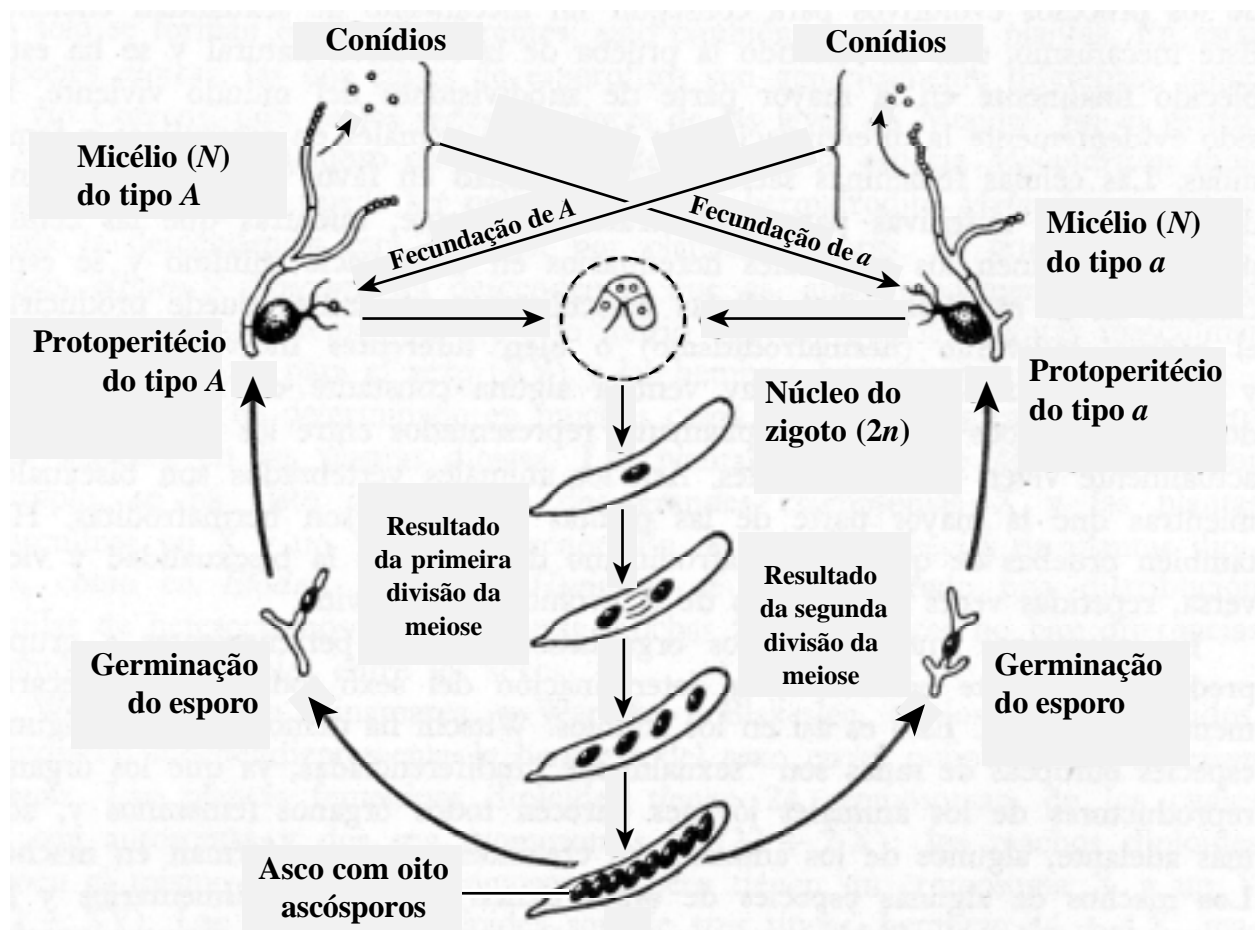


Figura 55. Esquema do ciclo de vida do fungo *Neurospora crassa*. O corpo vegetativo do fungo consiste de filamentos segmentados chamados hifas. Conídios são esporos assexuados que podem se desenvolver diretamente em um novo micélio ou podem fertilizar células de organismos de sexo oposto. O protoperitécio se desenvolve em uma estrutura na qual numerosas células sofrem meiose originando ascos com ascósporos. (De acordo com Hartl, 1994)

primeira vista, um problema insolúvel, uma vez que: se o letal mata o indivíduo, ele não pode ser estudado. Beadle e Tatum resolveram o problema com uma das mais inovativas e produtivas linhas de experimentação do século XX; por isso eles ganharam, em 1958, o Prêmio Nobel para Medicina e Fisiologia.

Beadle e Tatum concluíram que os inúmeros compostos orgânicos que constituem as células de *Neurospora crassa* são produzidos a partir de ar, água, sais inorgânicos, sacarose e a vitamina biotina, pois o fungo se desenvolve normalmente apenas com esses nutrientes. Assim, a partir dessa matéria prima simples, o fungo é capaz de sintetizar todos os tipos de aminoácidos, de proteínas, de gorduras, de carboidratos, de ácidos nucleicos, de vitaminas e de outras substâncias presentes em suas células.

Como um exemplo dos muitos experimentos feitos por Beadle e Tatum, vamos discutir aqueles referentes à síntese do aminoácido arginina. A hipótese era que genes específicos controlam a produção de enzimas específicas responsáveis por reações que levam à formação da arginina. Presumivelmente esses genes poderiam mutar para formas alélicas incapazes de fazer as enzimas. Como arginina é essencial para a vida da *N. crassa*, pois entra na formação das proteínas, tais mutações seriam letais.

Beadle e Tatum desenvolveram, então, um método para a identificação de mutantes letais relacionados à síntese de arginina e para o crescimento e a manutenção desses mutantes. Isto pode parecer impossível, especialmente quando levamos em consideração que *Neurospora crassa* é haplóide na maior parte de seu ciclo de vida e

que, portanto, qualquer mutação que impedisse a síntese de arginina seria letal. Como fazer com que esses mutantes sobrevivessem de modo que pudessem ser estudados? Esse era o grande desafio.

Primeiro, poderia se usado raio -X para induzir mutações. Eles assumiram que todo tipo de mutação poderia ser produzida, mas que, dentre elas, algumas poderiam estar envolvidas na produção da arginina. Quando lembramos o quanto é rara uma mutação específica, a possibilidade de obtenção da mutantes desejados pode parecer extremamente pequena. Mas isso pode ser resolvido, aumentado-se o número de esporos irradiados.

Os esporos irradiados poderiam ser colocados em meio mínimo; parte deles iria crescer, seriam esporos selvagens ou mutantes de genes não-essenciais, ou seja, que não impediam que a *N. crassa* sintetizasse todas suas substâncias essenciais a partir dos poucos produtos químicos do meio mínimo. Outros esporos não iriam germinar, e entre eles poderiam estar mutantes bioquímicos que não conseguiam produzir as enzimas necessárias para o crescimento e desenvolvimento normal. Alguns desses últimos poderiam ser mutantes de genes envolvidos na síntese da arginina. Como poderiam ser encontrados? Isso era realmente um problema, pois esses esporos não germinariam em meio mínimo e, assim, estavam, em termos práticos, “mortos”.

A solução encontrada por Beadle e Tatum foi genial na sua simplicidade e eficiência. Se esporos não podiam sintetizar sua própria arginina, porque não dá-la a eles? E isto foi exatamente o que eles fizeram. Os esporos irradiados eram semeados em meio mínimo suplementado com arginina. Como esperado, parte dos esporos não cresceu; deveriam ser aqueles com defeitos que não eram corrigidos pela arginina adicionada ao meio. No meio suplementado era esperado que crescessem os selvagens, os portadores de mutações não-letais e os mutantes letais de genes envolvidos na síntese de arginina. Mas como distingui-los?

Beadle e Tatum transferiram parte de cada micélio que havia crescido em meio suplementado com arginina para meio mínimo. Aqueles que crescessem também em meio mínimo seriam ou selvagens ou portadores de mutações não-letais. Já os que haviam crescido em meio suplementado com arginina, mas não em meio mínimo, deveriam ser os mutantes procurados. (Fig. 56)

O próximo e crítico passo na análise era ter certeza que o defeito dos esporos era realmente herdado. Não se poderia concluir que um evento de mutação fosse a causa de os esporos “letais” crescerem em arginina,. Procedeu-se, então, à análise genética.

FUNDAMENTOS DA GENÉTICA DE *NEUROSPORA CRASSA*

O ciclo de vida do fungo *Neurospora crassa* torna-o ideal para alguns tipos de análise genética. As colônias são haplóides por quase toda a vida do organismo. Há dois tipos sexuais, **A** e **a**, que não podem ser distinguidos, exceto pelo seu comportamento sexual. Se colônias de **A** e **a** entrarem em contato, parte de seus núcleos se fundem originando zigotos diplóides. A meiose ocorre imediatamente após a formação do zigoto, originando quatro núcleos haplóides. Estes se dividem, por mitose, e produzem oito esporos haplóides. Os esporos ficam arrançados no interior do asco em ordem linear, que reflete as duas divisões da meiose e a única mitose. Os ascas podem ser abertos sob um estereomicroscópio e esporos removidos e colocados em meio de cultura. Portanto, é possível obter todos os produtos da meiose de apenas um zigoto.

Para determinar se uma característica de *N. crassa* é hereditária, o micélio portador é cruzado com uma linhagem normal (selvagem) do sexo oposto. Os esporos são, então, isolados e colocados para se desenvolver e gerar micélios-filhos. Se verificarmos que metade dos esporos é do tipo selvagem e metade apresenta a característica alterada, pode-se concluir que a característica é devida a um alelo mutante. Por exemplo, suponha que a *N. crassa* selvagem tenha um gene **B**, que seja necessário para a síntese de arginina, e que a radiação tenha causado uma mutação de **B** para **b**. Esta última forma é incapaz de ter qualquer papel essencial na síntese de arginina. O cruzamento de um fungo selvagem (**B**) com o mutante **b** produzirá um heterozigoto, que ao sofrer meiose originará quatro esporos **B** e quatro **b**. Com esse procedimento, Beadle e Tatum puderam demonstrar que as diversas linhagens de *Neurospora* que estavam sendo obtidas em seus experimentos de radiação eram, realmente, decorrentes de mutações gênicas. (Tab. 1)

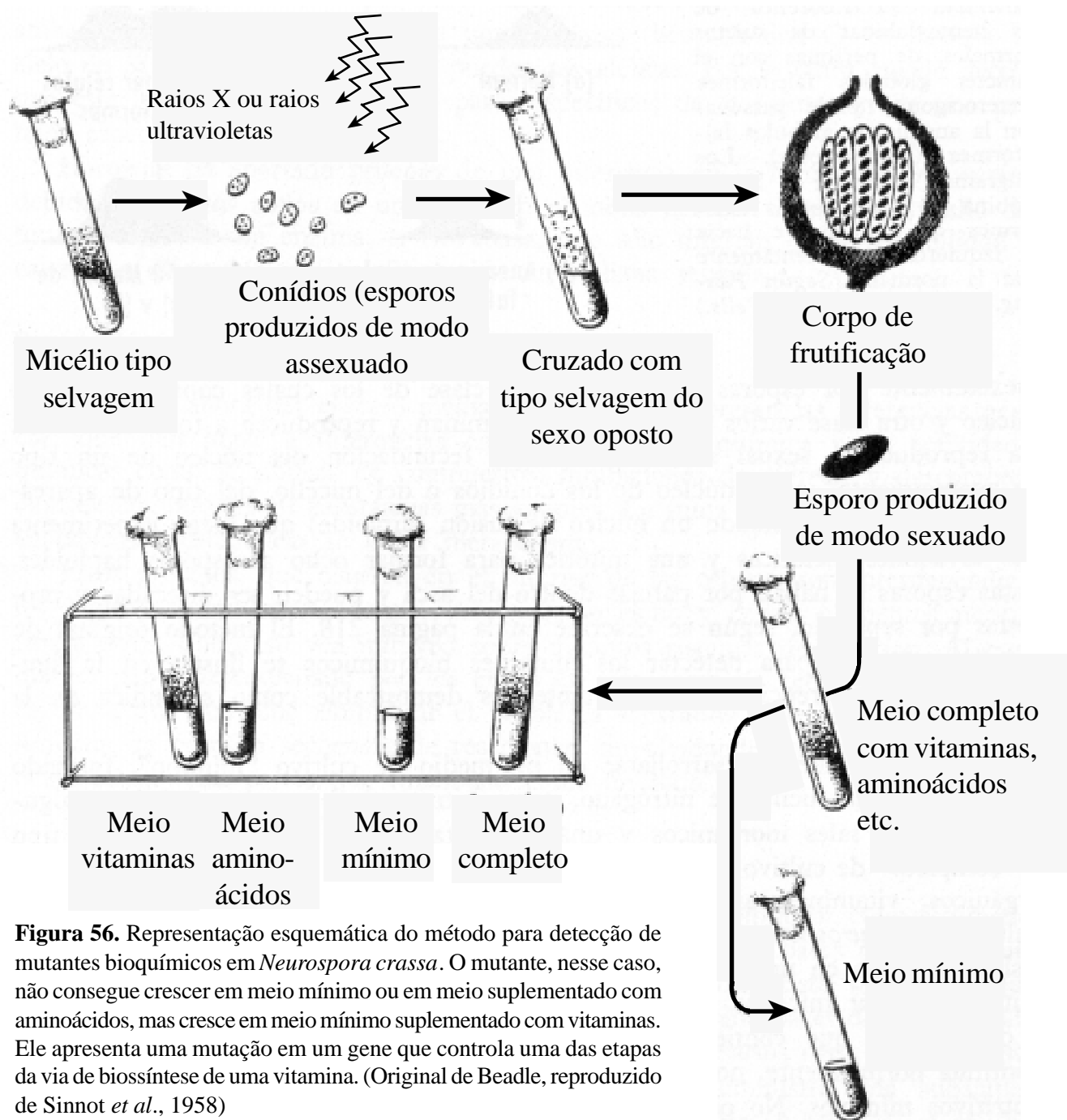


Figura 56. Representação esquemática do método para detecção de mutantes bioquímicos em *Neurospora crassa*. O mutante, nesse caso, não consegue crescer em meio mínimo ou em meio suplementado com aminoácidos, mas cresce em meio mínimo suplementado com vitaminas. Ele apresenta uma mutação em um gene que controla uma das etapas da via de biossíntese de uma vitamina. (Original de Beadle, reproduzido de Sinnot *et al.*, 1958)

Tabela 1. Dados originais de Beadle e Tatum (1941) referentes a uma análise dos esporos de 7 ascas produzidos num cruzamento entre uma linhagem mutante dependente de piridoxal (vitamina B6) e outra selvagem. Os ascósporos isolados ordenadamente de cada asco foram colocados para germinar em meio contendo a vitamina, onde cresceram tanto mutantes quanto selvagens. Em seguida, eram transferidas para meio mínimo, para a identificação dos mutantes, que não crescem nesse tipo de meio.

Espero	1	2	3	4	5	6	7	8
17	-	<i>pdx</i>	<i>pdx</i>	<i>pdx</i>	N	N	N	-
18	-	-	N	N	-	-	<i>pdx</i>	<i>pdx</i>
19	-	<i>pdx</i>	-	-	-	-	-	N
20	-	-	N	-	-	-	-	<i>pdx</i>
22	-	-	N	-	-	-	-	-
23	-	*	*	*	N	N	<i>pdx</i>	<i>pdx</i>
24	N	N	N	N	<i>pdx</i>	<i>pdx</i>	<i>pdx</i>	<i>pdx</i>

N = crescimento normal em meio mínimo;
pdx = não cresceu em meio mínimo;
 * = esporos cujas posições foram misturadas; desses, dois germinaram e eram mutantes;
 - = esporos que não germinaram.

Foram obtidos diversos mutantes que dependiam de uma mesma substância para crescer. Isso levantou um outro tipo de questão: seriam essas linhagens genéticas idênticas, ou teriam mutações em genes diferentes envolvidos na produção de uma mesma substância? Por exemplo, pode-se imaginar diversos genes envolvidos na síntese da arginina: A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , etc. Uma mutação em qualquer desses genes poderia originar alelos (a_1 , a_2 , etc.) que bloqueariam a produção de arginina. O resultado seria um mesmo fenótipo: incapacidade de crescimento em meio mínimo sem arginina.

Por meio de cruzamentos entre mutantes de mesmo fenótipo seria possível distinguir entre um caso de mutantes de genes diferentes ou de mutantes de um mesmo gene. Se apenas um gene estivesse envolvido, o cruzamento entre as duas linhagens produziria esporos incapazes de crescer em meio sem arginina. Alternativamente, caso se tratasse de mutantes de genes diferentes, alguns esporos iriam crescer como colônias selvagens, pela razão descrita a seguir.

Considere um cruzamento entre dois mutantes diferentes $a_1 \times a_2$. Cada um dos mutantes teria o alelo normal do outro gene: a linhagem mutante a_1 teria A_2 e a linhagem mutante a_2 teria A_1 . Assim, o cruzamento seria entre a_1A_2 e A_1a_2 , o que produziria zigotos diplóides com o genótipo $A_1a_1A_2a_2$. Caso esses genes estivessem em cromossomos diferentes, eles se segregariam independentemente, originando os seguintes tipos de esporo:

- 1/4 A_1A_2 (crescem em meio mínimo);
- 1/4 A_1a_2 (requerem arginina, pois a_2 não funciona);
- 1/4 a_1A_2 (requerem arginina, pois a_1 não funciona);
- 1/4 a_1a_2 (requerem arginina, pois nenhum dos genes funciona).

Se, por acaso, os dois genes estivessem em um mesmo cromossomo, as frequências dos 4 tipos de esporos iriam depender da quantidade de permutação entre eles.

ESTABELECENDO A SEQUÊNCIA DE ATUAÇÃO DOS GENES

No início de seus experimentos, Beadle e Tatum descobriram 7 mutantes que requeriam meio suplementado com arginina para seu crescimento normal. Foi investigada, então, a relação

entre esses mutantes na produção da arginina. A estratégia foi partir do que já era conhecido sobre a síntese desse aminoácido em outros organismos.

Em 1932, o bioquímico Hans A. Krebs descobriu que, em algumas células de vertebrados, arginina é formada a partir de citrulina, e que citrulina é formada a partir de ornitina; o precursor da ornitina, no entanto, ainda era desconhecido. Se *N. crassa* tivesse uma via metabólica similar, seria possível determinar como as sete linhagens mutantes estavam envolvidas na cadeia de reações. Isso poderia ser feito verificando-se qual, se algum, dos sete mutantes crescia em meio suplementado com citrulina ou com ornitina no lugar de arginina.

Muitos experimentos foram feitos. Quatro das linhagens mutantes cresceram em meios suplementados com qualquer uma das três substâncias. Isto sugeriu que essas quatro mutações afetavam genes envolvidos em reações anteriores ao estágio de ornitina. Se ornitina era fornecida aos mutantes, as etapas enzimáticas seguintes, sendo normais, poderiam continuar até a produção da arginina.

Duas das linhagens não cresceram em meio suplementado apenas com ornitina, mas cresceram normalmente quando citrulina ou arginina foram adicionadas ao meio. Nesses casos, concluiu-se que o bloqueio era entre ornitina e citrulina.

Finalmente, uma das linhagens cresceu apenas em meio suplementado com arginina. Isto sugeriu que, neste caso, alguma enzima entre citrulina e arginina era deficiente ou defeituosa.

Então, Beadle e Tatum foram capazes de concluir que, para *Neurospora crassa* sintetizar arginina, era necessária uma série de reações controladas enzimaticamente, e que dois dos intermediários eram ornitina e citrulina.

A hipótese que a função dos genes era controlar a produção de enzimas específicas ganhou apoio experimental. Não se poderia concluir, no entanto, que essa seria a única coisa que os genes fariam.

Da mesma forma que Sutton ligou a Citologia e à Genética no início do século XX. Beadle e Tatum ligaram efetivamente a Genética à Bioquímica quarenta anos mais tarde. O tipo de experimentação que eles desenvolveram foi usada imediatamente por numerosos investigadores de fungos, leveduras e bactérias. Esta abordagem levou diretamente à Biologia Molecular de hoje.

Enquanto tudo isto estava sendo feito, outra estratégia para se estudar genética em nível molecular estava a caminho. Foi essa segunda linha de investigação que levou à identificação do gene como sendo *DNA*, trazendo a nós a formulação do paradigma atual da Genética por Watson e Crick em 1953.

Bibliografia utilizada na complementação deste texto:

CARLSON, E. A. **The gene: a critical history**. Filadélfia: W. B. Saunders., 1966.

HARTL, D. L. **Essential Genetics**. Massachusetts: Jones and Bartlett, 1994.

HOROWITZ, N. H. **George Wells Beadle (1903-1989)**. *Genetics* 124, 1-6, 1990.

JENKINS, J. B. **Genetics** 2ª ed. Boston: Houghton Mifflin, 1979.

KOHLER, R. E. **Lords of the fly**. Chicago: The University of Chicago, 1994.

PERKINS, D. D. **Neurospora: The Organism Behind the Molecular Revolution**. *Genetics* 130, 687-701, 1992.

SINNOTT, E. W., DUNN, L. C. & DOBZHANSKY, TH. **Principles of Genetics**. 5ª ed. New York: McGraw Hill, 1958.

STRICKBERGER, M. W. **Genetics**. 2ª ed. New York: MacMillan, 1976.

EXERCÍCIOS

PARTE A: REVENDO CONCEITOS BÁSICOS

Complete as frases de 1 a 4 com uma das alternativas abaixo:

- (a) alcaptonúria (c) enzima
(b) disco imaginal (d) ginandromorfo

1. Uma substância de natureza protéica que regula a velocidade de uma reação metabólica é chamada ().

2. Um organismo que possui parte do corpo formado por células femininas e parte por células masculinas é um ().

3. () é uma doença genética em que o indivíduo não consegue degradar o ácido homogentísico e o excreta na urina.

4. Um grupo de células que se mantém indiferenciado nas larvas e que, durante a metamorfose, origina uma estrutura do corpo do inseto adulto é chamado ().

Complete as frases de 5 a 10 com um das alternativas abaixo:

- (a) asco (c) conídio (e) meio mínimo
(b) ascósporo (d) hifa (f) micélio

5. () é um tipo de esporo que se forma durante a fase assexuada do ciclo de vida de certos fungos.

6. () é um tipo de esporo que se forma durante a fase sexuada do ciclo de vida de fungos ascomicetos.

7. Cada um dos filamentos celulares que constituem o corpo de um fungo é chamado ().

8. O conjunto mais simples de nutrientes que permite o desenvolvimento de um determinado microorganismo é chamado ().

9. O conjunto de filamentos celulares que constitui o corpo de um fungo é chamado ().

10. A bolsa, em forma de saco geralmente alongado, onde ficam alojados os esporos, que se formam durante o ciclo sexuado de um fungo ascomiceto é chamado ().

PARTE B: LIGANDO CONCEITOS E FATOS

Utilize as alternativas abaixo para responder as questões de 11 a 13:

- (a). Beadle e Ephrussi (c). Morgan
(b). Garrod (d). Sturtevant

11. A idéia de que os genes atuam controlando reações químicas do metabolismo foi proposta originalmente por (), no começo do século.

12. Foi () quem, a partir da descoberta de um ginandromorfo particular, aventou a hipótese de que a coloração *vermillion* do olho da *Drosophila melanogaster* não era uma característica autônoma.

Para cada uma das frases de 13 a 18 escreva no parênteses a letra V, caso a afirmação seja verdadeira, ou a letra F, no caso dela ser falsa.

13. A localização de um disco imaginal implantado no corpo de uma larva determina o tipo de estrutura que ele originará. ()

14. A hipótese “um gene - uma enzima” postula que os genes atuam controlando a síntese das enzimas. ()

15. Diversas vias metabólicas foram elucidadas por meio do uso de venenos que bloqueavam a ação de enzimas específicas. ()

16. *Neurospora crassa* foi um material ideal para a elucidação do modo de ação dos genes por apresentar, naturalmente, maior número de mutantes visíveis que *D. melanogaster*. ()

17. *Neurospora crassa* é um organismo que apresenta alternância de gerações haplóide e diplóide em seu ciclo de vida. ()

18. Beadle e Tatum conseguiram manter mutantes incapazes de produzir substâncias essenciais à vida, acrescentando essas substâncias ao meio de cultura. ()

PARTE C: QUESTÕES PARA PENSAR E DISCUTIR

19. O que levou Garrod a suspeitar que a alcaptonúria fosse hereditária?

20. Que tipo de resultado levou Sturtevant a suspeitar que a mutação *vermilion* em *Drosophila melanogaster* não tinha desenvolvimento autônomo?

21. Com que objetivo Beadle e Ephrussi iniciaram as pesquisas de transplante de discos imaginais em *Drosophila melanogaster*?

22. Como se comporta um disco *vermilion* ou *cinnabar* transplantado para um hospedeiro selvagem? E um disco selvagem transplantado para um hospedeiro *vermilion* ou *cinnabar*?

23. Como se comporta um disco *vermilion* transplantado para um hospedeiro *cinnabar*? E um disco *cinnabar* transplantado para um hospedeiro *vermilion*?

24. Qual foi a hipótese levantada por Beadle e Ephrussi para explicar os resultados obtidos nos transplantes envolvendo os mutantes *vermilion* e *cinnabar*?

25. Que características da *Neurospora crassa* fizeram com que Beadle a escolhesse como material para o estudo do modo de ação dos genes?

26. Qual era a idéia fundamental do trabalho de Beadle e Tatum em *Neurospora crassa*?

27. Como Beadle e Tatum puderam estudar mutações letais induzidas por raio X?

28. Como Beadle e Tatum identificavam e mantinham mutantes incapazes de sintetizar arginina?

29. Como se demonstrou que os defeitos dos esporos irradiados eram de natureza genética?

30. De que maneira a ordenação dos esporos de *Neurospora crassa* no interior do asco reflete

as duas divisões da meiose e a última mitose?

31. Qual o procedimento usado para verificar se mutantes que dependem de uma mesma substância para crescer têm mutações em um mesmo gene ou em genes diferentes?

32. Determine as proporções genótípicas e fenotípicas (olhos selvagens ou vermelho-claros) nas gerações F₁ e F₂ de um cruzamento de *Drosophila melanogaster* entre fêmeas mutantes *vermilion* e machos mutantes *cinnabar*? (Lembre-se que o gene *vermilion* é ligado ao sexo, enquanto o *cinnabar* é autossômico.)

33. Qual o resultado esperado no cruzamento entre dois mutantes que dependem de uma mesma substância para crescer, no caso de mutações:

- a. no mesmo gene;
- b. em genes diferentes localizados em um mesmo cromossomo;
- c. em genes localizados em cromossomos diferentes?

34. O cruzamento de dois camundongos albinos (albinismo recessivo), provenientes de laboratórios diferentes, produziu 100% de descendentes selvagens. Explique como isso é possível.

35. Foram isolados cinco mutantes de fungo que necessitam de um composto G para crescer. O precursor e os produtos intermediários da via metabólica biossintética que leva ao produto final G são conhecidos. Esses compostos foram fornecidos para os mutantes a fim de verificar se havia (+) ou não (-) crescimento na presença de cada composto. Os resultados estão apresentados na tabela a seguir:

Mutantes	Composto fornecido no meio					
	A	B	C	D	E	G
1	-	-	-	+	-	+
2	-	+	-	+	-	+
3	-	-	-	-	-	+
4	-	+	+	+	-	+
5	+	+	+	+	-	+

a. Qual é a ordem dos compostos na via metabólica?

b. Em qual passo da via metabólica cada mutante apresenta bloqueio?