

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

JOAO PAULO DA LUZ SILVA

**Ritmos diurnos de modificações pós-traducionais em
histonas de cana-de-açúcar**

Versão corrigida da dissertação defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG: 29/09/2020

JOAO PAULO DA LUZ SILVA

**Ritmos diurnos de modificações pós-traducionais em
histonas de cana-de-açúcar**

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título
de Mestre em Ciências (Bioquímica).*

Orientador: Prof. Dr. Carlos Takeshi Hotta

São Paulo
2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S586r Silva, João Paulo da Luz
Ritmos diurnos de modificações pós-traducionais em
histonas de cana-de-açúcar / João Paulo da Luz
Silva. - São Paulo, 2020.
113 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de
Bioquímica.

Orientador: Hotta , Carlos Takeshi

1. RITMOS BIOLÓGICOS. 2. CANA-DE-AÇÚCAR. 3.
PROTEÔMICA. 4. CROMATINA. I. T. II. Hotta , Carlos
Takeshi , orientador.

Agradecimentos

Ao professor Carlos Hotta pela oportunidade, orientação, paciência e perseverança.

Aos colegas de laboratório Douglas, Maira, Bruno, Alessandra, Erica pelo apoio.

Aos colegas Felipe, Ana Paula e Ruan pelo empenho em ajudar a realizar este trabalho.

Ao Laboratório Especial de Ciclo Celular do Instituto Butantã e ao grupo da pesquisadora Julia Cunha.

Ao CEPID REDOXOMA e ao grupo da pesquisadora Graziella Rosein, em especial a Amanda pelo enorme apoio.

Ao Laboratório de Transdução de Sinal do IQ-USP em especial a professora Glaucia Mendes Souza pelo suporte e aos seus colaboradores Augusto, Felipe e Maryke pela amizade e apoio.

A todos amigos que fiz no ambiente de IQ-USP, pois os considero como um pilar fundamental para realização deste trabalho.

A minha família pelo apoio

As agencias FAPESP (Projeto 15/06260-0), CNPQ (processo nº 133611/2017-5), CAPES e Serapilheira (Projeto Serra-1708-16001) pelo suporte financeiro.

Sumário

Lista de Abreviações	7
Lista de Figuras	9
Lista de Tabelas	17
Resumo	18
Abstract	19
1 Introdução	20
1.1 Importância econômica da cana-de-açúcar	20
1.2 Fisiologia vegetal	21
1.3 O relógio biológico das plantas	23
1.4 Cromatina	25
1.5 Espectrometria de massas voltada para o estudo de biomoléculas	28
2 Objetivos gerais	30
2.1 Hipóteses testadas	30
2.2 Objetivos específicos	30
3 Material e Métodos	31
3.1 Material biológico e condições de campo	31
3.2 Seleção de Genes relacionados com cromatina em cana-de-açúcar	33
3.2.1 Anotação de variantes de histona	33
3.3 Extração de RNA total	33
3.4 Síntese de cDNA	34
3.5 PCR Quantitativo	34
3.6 Enriquecimento dos núcleos	36
3.7 Digestão de proteínas	37
3.8 Nano LC-MS	39
3.8.1 Aquisição Dependente de Dados	39
3.8.2 Aquisição Independente de Dados	41
3.9 Análise de dados	41
3.9.1 Label Free Quantification	41
3.9.2 Análise por contagem de <i>scans</i>	42
3.9.3 Quantificação de peptídeos	42
4 Resultados	44

4.1	Genes associados à remodelagem de cromatina em cana-de-açúcar	44
4.2	Ritmos de transcrição em folhas e entrenós de cana-de-açúcar.....	46
4.3	Identificação de histonas em entrenós de cana-de-açúcar	57
4.4	Modificações pós traducionais em histonas de entrenó.....	65
4.5	Quantificação de PTMs em cana-de-açúcar	76
4.5.1	Quantificação de PTMs em H2A e H2B	87
5	Discussão	91
5.1	Importantes marcas epigenéticas foram identificadas em cana-de-açúcar	91
5.2	Histona H2A em cana-de-açúcar	91
5.3	Histona H2B em cana-de-açúcar	94
5.4	Histona H3 e H4 em cana-de-açúcar	95
6	Conclusão	102
7	Referências bibliográficas	103

Lista de Abreviações

AGC – Ganho Automático Alvo

CCA1 - Circadian Clock Associated 1

ChiP – Imunoprecipitação da Cromatina

CID – Collision Induced Association

DDA – Data Dependent Acquisition

DIA – Data independent acquisition

EE – Evening Element

ELF3 –Early Flowering 3

EM – Espectrometria de massa

ESI – *Electropray*

H3-K27 – Histona H3 lisina 27

H3K27me – Metilação da Lisina 27 na Histona 3

H3-K9 – Histona H3 lisina 9

H3K9SUVH4 – Histona lisina N-Metiltransferase H3 lisina 9 Específico SUVH4

H4-K20 – Histona H4 lisina 20

HCD – Higher Energy Collision Dissociation

HDAC6 – Histona Deacetilase 6

LC – Cromatografia Líquida

LFQ – Quantificação sem Marcação

LHY – Long Elongated Hupocotye

MCM – Minichromosome Maintenance Proteins

mL- Mililitro

µL – Microlitro

MS/MS – Espectros de Massa Tandem

MSI1 – Multicopy Supressor of IRA1

pb – Pares de Base

PRC2 – Polycomb

PRM – Parallel Reacting Monitoring

PRR5 – Pseudo Response Regulator 5

PRR7 – Pseudo Response Regulator 7

PRR7 – Pseudo-Response Regulator 7

PRR9 - Pseudo Response Regulator 9

PRR9 – Pseudo-Response Regulator 9

PTM – Modificações pós traducionais

RT-qPCR - PCR quantitativo em Tempo Real

SAS – Sugarcane Assembled Sequence

SRM – Selected Reacting Monitoring

SWI/SNF – Switch/ Sucrose Non-Fermentable

SWR1 – SW12/SNF2- Related

TCA – Ácido Trifluoracético

TOC1 – Timing of Cap Expression 1

XICS – Correntes Icônicas Extraídas

ZT – Tempo Zeitgeber

Lista de Figuras

- Figura 1.** Temperatura do campo durante a coleta. A temperatura em Graus Celsius (eixo Y) é apresentada por círculos e os valores são conectados por uma linha onde a cor azul indica o dia 4/9/2017 e amarela 5/9/2017. O eixo X mostra as horas correspondente ao fuso horário GMT -3. O período referente ao dia e noite é representado por uma barra branca e preta respectivamente ao lado do eixo X. Os pontos onde a coleta foi realizada está indicado pelos triângulos pretos com seus respectivos ZT. 32
- Figura 2.** Ilustração identificando órgãos folha +1 e entrenó 5. (A) A folha +1 (F+1) é a primeira folha do topo com uma bainha claramente visível (*). (B) Depois que todas as folhas são descascadas e removidas, todo o caule é exposto para que todos os nós e entrenós (E) possam ser vistos. Os dois primeiros entrenós (entrenós 1 e 2, o quinto entrenó (entrenós 5). Adaptado de DANTAS *et al.*, 2020. 32
- Figura 3.** Números de SAS putativos associado a cromatina em cana-de-acúcar. O número de genes putativos são apresentados com SAS) no eixo Y, as barras azuis possuem legenda com a anotação funcional dos genes baseados em homologia. 45
- Figura 4.** Nível de transcrição dos genes centrais do relógio biológico. Expressão relativa a *ScGAPDH* para o gene (A) *ScLHY* e (B) *ScTOC1* nos órgãos folha +1 (linha azul) e entrenó 5-6 (linha vermelha). 48
- Figura 5.** Nível diurno de transcrição para componentes da cromatina. Os gráficos mostram diferenças na expressão de mRNA relativo a *ScGAPDH* para os genes *MSI1* em folha (A) e entrenó (B) para cinco momentos diferentes (com n = 3 para cada momento) ao longo de um dia. A linha pontilhada conecta a mediana entre os diferentes pontos temporais. A barra branca na parte inferior indica o período correspondente ao dia e a barra preta indica o período da noite... 52
- Figura 6.** Nível diurno de transcrição para componentes da cromatina. Os gráficos mostram diferenças na expressão de mRNA relativo a *ScGAPDH* para os genes *H3K9SUV4* em folha (A) e entrenó (B) para cinco momentos diferentes (com n = 3 para cada momento) ao longo de um dia. A linha pontilhada conecta a mediana entre os diferentes pontos temporais. A barra branca na parte inferior indica o período correspondente ao dia e a barra preta indica o período da noite... 53
- Figura 7.** Nível diurno de transcrição para componentes da cromatina. Os gráficos mostram diferenças na expressão de mRNA relativo a *ScGAPDH* para os genes *SWI/NSF* em folha (A) e

entrenó (B), para cinco momentos diferentes (com n = 3 para cada momento) ao longo de um dia. A linha pontilhada conecta a mediana entre os diferentes pontos temporais. A barra branca na parte inferior indica o período correspondente ao dia e a barra preta indica o período da noite... 54

Figura 8. Nível diurno de transcrição para componentes da cromatina. Os gráficos mostram diferenças na expressão de mRNA relativo a *ScGAPDH* para os genes HDAC6 em folha (A) e entrenó (B) para cinco momentos diferentes (com n = 3 para cada momento) ao longo de um dia. A linha pontilhada conecta a mediana entre os diferentes pontos temporais. A barra branca na parte inferior indica o período correspondente ao dia e a barra preta indica o período da noite... 55

Figura 9. Nível diurno de transcrição para componentes da cromatina. Os gráficos mostram diferenças na expressão de mRNA relativo a *ScGAPDH* para os genes H2A.W.1 em folha (A) e entrenó (B) para cinco momentos diferentes (com n = 3 para cada momento) ao longo de um dia. A linha pontilhada conecta a mediana entre os diferentes pontos temporais. A barra branca na parte inferior indica o período correspondente ao dia e a barra preta indica o período da noite... 56

Figura 10. Extrato derivado de cana-de-açúcar enriquecido com histonas. (A) Perfil eletroforético (SDS-PAGE) para histonas de folha (2) e entrenó (3). (B) Perfil eletroforético (SDS-PAGE) para extrato enriquecido em histonas derivadas de cana de açúcar (2) e não enriquecido (4) e para o padrão BSA (3) a banda associada a H1 é apontado pela barra roxa enquanto a barra azul aponta as bandas associadas as histonas H3, H2B, H2A e H4 em ordem decrescente de peso molecular. 57

Figura 11. Variação diurna do nível de histonas H3 e H4 em entrenó de cana-de-açúcar. Histonas H3 (A) e H4 (B) de entrenós 5 e 6 de cana-de-açúcar (SP80 3280) foram quantificadas pelo método LFQ. A quantidade de proteína detectada está representada pelo log2 da intensidade LQF. Os valores observados em cada réplica biológica (retângulos cinzas) estão conectados pela média das réplicas (linha vermelha). O período do dia (retângulo branco) e da noite (retângulo preto) estão representados ao lado do eixo X. A análise estatística foi realizada usando o teste t heteroescedástica de distribuição bicaudal para os pontos com maior amplitude, e as diferenças foram consideradas significativas para valores de p calculados < 5% destacados pelo símbolo “*” 60

Figura 12. Variação diurna do nível de histonas H2A em entrenó de cana-de-açúcar. Histonas H2A de entrenós 5 e 6 de cana-de-açúcar (SP80 3280) foram quantificadas pelo método LFQ. H2A.W.1(A) e H2A.W.2 (B) não apresentaram variação significativa ao longo do. A quantidade

de proteína detectada está representada pelo log2 da intensidade LQF. Os valores observados em cada réplica biológica (retângulos cinzas) estão conectados pela média das réplicas (linha vermelha). Os horários de dia (retângulo branco) e de noite (retângulo preto) estão representados. A análise estatística foi realizada usando o teste t heteroescedástica de distribuição bicaudal para os pontos com maior amplitude, e as diferenças foram consideradas significativas para valores de p calculados < 5% destacados pelo símbolo “*”..... 62

Figura 13. Variação diurna do nível de histonas H2A em entrenó de cana-de-açúcar. Histonas H2A de entrenós 5 e 6 de cana-de-açúcar (SP80 3280) foram quantificadas pelo método LFQ. H2A canônica não apresentou variação significativa ao longo do dia. (B) H2A.Z.1 apresentou um a tendência de aumento significativo (p-valor 0,016) entre o dia (ZT4 + ZT7 x ZT17 + ZT22). A quantidade de proteína detectada está representada pelo log2 da intensidade LQF. Os valores observados em cada réplica biológica (retângulos cinzas) estão conectados pela média das réplicas (linha vermelha). Os horários de dia (retângulo branco) e de noite (retângulo preto) estão representados. A análise estatística foi realizada usando o teste t heteroescedástica de distribuição bicaudal para os pontos com maior amplitude, e as diferenças foram consideradas significativas para valores de p calculados < 5% destacados pelo símbolo “*”..... 63

Figura 14. Variação diurna do nível de histonas H2B em entrenó de cana-de-açúcar. Histonas H2B de entrenós 5 e 6 de cana-de-açúcar (SP80 3280) foram quantificadas pelo método LFQ. (A) H2B.1 apresentou uma redução 1,46x (ZT7 x ZT12) (p valor = 0.016). (E) H2B.2 não apresentou variação significativa. A quantidade de proteína detectada está representada pelo log2 da intensidade LQF. Os valores observados em cada réplica biológica (retângulos cinzas) estão conectados pela média das réplicas (linha vermelha). Os horários de dia (retângulo branco) e de noite (retângulo preto) estão representados. A análise estatística foi realizada usando o teste t heteroescedástica de distribuição bicaudal para os pontos com maior amplitude, e as diferenças foram consideradas significativas para valores de p calculados < 5% destacados pelo símbolo “*”..... 64

Figura 15. PTMs presentes em H3. Ilustração das modificações presentes em histonas H3.1, H3.3, H3L.1 e H3L.2. Os aminoácidos são representados aqui pelo código de uma letra. Para cada sequência é apresentado o tipo da histona, e logo abaixo do nome da histona é demonstrado o SAS correspondente a aquela proteína. As lisinas modificadas são destacadas em vermelho e as

argininas são destacadas em azul, para ambas a posição na proteína é mostrada logo abaixo do símbolo de uma letra. Os aminoácidos vizinhos são apresentados em preto. 65

Figura 16. PTMs presentes em H4. Ilustração das modificações presentes em histonas H4. Os aminoácidos são representados aqui pelo código de uma letra. Para cada sequência é apresentado o tipo da histona, e logo abaixo do nome da histona é demonstrado o SAS correspondente a aquela proteína. As lisinas modificadas são destacadas em vermelho e as argininas são destacadas em azul, para ambas a posição na proteína é mostrada logo abaixo do símbolo de uma letra. Os aminoácidos vizinhos são apresentados em preto. 66

Figura 17. PTMs identificadas em H2A. Figura demonstrando PTMs identificadas em (A) H2A canônica, (B) H2A.Z e (C) H2A.X. Os aminoácidos são representados aqui pelo código de uma letra. O grupo acetil é identificado como “ac”, o grupo metil e identificado como “me” enquanto o número de grupos é identificado por números. Para cada sequência é apresentada a anotação da histona, e logo abaixo do nome da histona é demonstrado o SAS correspondente a aquela proteína. As lisinas modificadas são destacadas em vermelho e as argininas são destacadas em azul, para ambas a posição na proteína é mostrada logo abaixo do símbolo de uma letra. Os aminoácidos vizinhos são apresentados em preto. 67

Figura 18. PTMs identificadas nas histonas variantes H2A.W.1 e H2A.W.2. Os aminoácidos são representados aqui pelo código de uma letra. O grupo acetil é identificado como “ac”, o grupo metil e identificado como “me” enquanto o número de grupos é identificado por números. Para cada sequência é apresentada a anotação da histona, e logo abaixo do nome da histona é demonstrado o SAS correspondente a aquela proteína. As lisinas modificadas são destacadas em vermelho e as argininas são destacadas em azul, para ambas a posição na proteína é mostrada logo abaixo do símbolo de uma letra. Os aminoácidos vizinhos são apresentados em preto. 68

Figura 19. PTMs identificadas nas histonas variantes H2A.W. Os aminoácidos são representados aqui pelo código de uma letra. O grupo acetil é identificado como “ac”, o grupo metil e identificado como “me” enquanto o número de grupos é identificado por números. Para cada sequência é apresentada a anotação da histona, e logo abaixo do nome da histona é demonstrado o SAS correspondente a aquela proteína. As lisinas modificadas são destacadas em vermelho e as argininas são destacadas em azul, para ambas a posição na proteína é mostrada logo abaixo do símbolo de uma letra. Os aminoácidos vizinhos são apresentados em preto. 69

Figura 20. PTMs identificadas na histona H2B. As 9 variantes de H2B foram anotadas como H2B.1 a H2B.9. Os aminoácidos são representados aqui pelo código de uma letra. Para cada sequência é apresentado o tipo da histona, neste caso H2B, e logo abaixo do nome da histona é demonstrado o SAS correspondente a aquela proteína. As lisinas modificadas são destacadas em vermelho e as argininas são destacadas em azul, para ambas a posição na proteína é mostrada logo abaixo do símbolo de uma letra. Os aminoácidos vizinhos são apresentados em preto. 71

Figura 21. Perfil da abundância de PTMs em histonas de Cana-de-açúcar. (A) distribuição de MS/MS scans para peptídeos modificados. (B) Sítios modificados por tipo de histonas. 74

Figura 22. Perfil diurno para o número de sítios modificados em histonas de Cana-de-açúcar. (A) histona H2A, (B) histona H2B, (C) histona H3, (D) histona H4. O número de sítios modificados para cada replica biológica e apresentado pelo círculo azul. O período correspondente ao dia é indicado pela barra branca no eixo X enquanto o período noturno é indicado pela barra preta. O eixo Y representa o número de sítios modificados encontrados a nível intra peptídeo..... 75

Figura 23. Perfil diurno de abundância de PTMs para o peptídeo 9-KSTGGKAPR-17 em H3. A: H3K9me1K14ac foi observada uma redução média de 33,5% (min 16,1%/ max 47,1%/ +/- 6.38% p-valor 0,022) dessa combinação de PTMs entre o meio do dia (ZT7) e o meio da noite (ZT17). B: Não há diferenças significativas para os diferentes grupos para a forma não modificada H3K9K27. O período correspondente ao dia é indicado pela barra branca no eixo X enquanto o período noturno é indicado pela barra preta. A análise estatística foi realizada usando o teste t heteroescedástica de distribuição bicaudal para os pontos com maior amplitude, e as diferenças foram consideradas significativas para valores de p calculados < 5% destacados pelo símbolo “*” 77

Figura 24. Abundância relativa de PTMs para o peptídeo 9-KSTGGKAPR-17. O eixo Y apresenta a abundância relativa em uma escala que vai de 0 a 1, onde 0 representa nenhuma quantidade e 1 representa 100%. As barras correspondem aos valores médios da abundância relativa, enquanto a barra de erro apresenta o desvio padrão. Cada barra possui sua respectiva PTM na legenda do eixo X, e a barra do peptídeo não modificado está rotulado como “UnMod”. 78

Figura 25. Abundância relativa de PTMs para o peptídeo 18-KQLATKAAR-26. O eixo Y apresenta a abundância relativa em uma escala que vai de 0 a 1, onde 0 representa nenhuma quantidade e 1 representa 100%. As barras correspondem aos valores médios da abundância

relativa, enquanto a barra de erro apresenta o desvio padrão (19 replicas). Cada barra possui sua respectiva PTM na legenda do eixo X, e a barra do peptídeo não modificado está rotulado como “UnMod”. 79

Figura 26. Perfil diurno de abundância de PTMs para o peptídeo 18-KQLATKAAR-26 em H3. (A) para H3K18acK23ac foi observada uma redução média de 30% (min 25,3%/ max 37,5%, +/- 6,04% p-valor 0,0005) dessa combinação de PTMs entre o fim do dia (ZT12) e o fim da noite (ZT22). B: para H3K18ac foi observada uma redução média de 31,9% (min 20,9%/ max 46,4%. +/- 7,14% p-valor 0,001) o fim do dia (ZT12) e o fim da noite (ZT22). O período correspondente ao dia é indicado pela barra branca no eixo X enquanto o período noturno é indicado pela barra preta. A análise estatística foi realizada usando o teste t heteroescedástica de distribuição bicaudal para os pontos com maior amplitude, e as diferenças foram consideradas significativas para valores de p calculados < 5% destacados pelo símbolo “*” 80

Figura 27. Perfil diurno de abundância de PTMs para o peptídeo 18-KQLATKAAR-26 em H3. (A) para H3K23acR26me1 foi observada uma redução média de 28% (min 20,5% / max 36,4. +/- 5,15% p-valor 0.0005) quando comparado o fim do dia (ZT12) e o fim da noite (ZT22). (B) A forma não modificada apresentou redução média de 17% (min 7,9%/ max 21,5%. +/- 1,8% p-valor 0.0009) (ZT12 x ZT22). O período correspondente ao dia é indicado pela barra branca no eixo X enquanto o período noturno é indicado pela barra preta. A análise estatística foi realizada usando o teste t heteroescedástica de distribuição bicaudal para os pontos com maior amplitude, e as diferenças foram consideradas significativas para valores de p calculados < 5% destacados pelo símbolo “*” 81

Figura 28. Abundância relativa de PTMs para o peptídeo 27-KSAPATGGVKKPHR-40. O eixo Y apresenta a abundância relativa em uma escala que vai de 0 a 1, onde 0 representa nenhuma quantidade e 1 representa 100%. As barras correspondem aos valores médios da abundância relativa, enquanto a barra de erro apresenta o desvio padrão (19 replicas). Cada barra possui sua respectiva PTM na legenda do eixo X, e a barra do peptídeo não modificado está rotulado como “UnMod”. 82

Figura 29. Abundância relativa de PTMs para o peptídeo 27-KSAPTTGGVKKPHR-40. O eixo Y apresenta a abundância relativa em uma escala que vai de 0 a 1, onde 0 representa nenhuma quantidade e 1 representa 100%. As barras correspondem aos valores médios da abundância relativa, enquanto a barra de erro apresenta o desvio padrão. Cada barra possui sua respectiva

PTM na legenda do eixo X, e a barra do peptídeo não modificado está rotulado como “UnMod”.

..... 83

Figura 30. Abundância relativa de PTMs para o peptídeo 27-KSAPATGGVKKPHR-40 em H3.1. A: H3.1K27me1K36acK37me1 não apresentou variação significativa entre os diferentes pontos. B: a forma não modificada não apresentou diferença significativa entre os pontos. O período correspondente ao dia é indicado pela barra branca no eixo X enquanto o período noturno é indicado pela barra preta. A análise estatística foi realizada usando o teste t heteroescedástica de distribuição bicaudal para os pontos com maior amplitude, e as diferenças foram consideradas significativas para valores de p calculados < 5% destacados pelo símbolo “*”..... 84

Figura 31. Abundância relativa de PTMs para o peptídeo 27-KSAPTTGGVKKPHR-40 em H3.3. A H3.3K27me1K36acK37me1 apresentou redução média de 48% (min 28,6%/ max 70,3%. +/- 11,9%. p-valor 0,007) quando comparado o fim do dia (ZT12) com o início do dia (ZT4). B H3.3K37me1 apresentou redução média de 64,4% (min 36%/ max 80%. +/- 1% p-valor 0,01) quando comparado o início do dia (ZT4) com o fim do dia (ZT12). O período correspondente ao dia é indicado pela barra branca no eixo X enquanto o período noturno é indicado pela barra preta. A análise estatística foi realizada usando o teste t heteroescedástica de distribuição bicaudal para os pontos com maior amplitude, e as diferenças foram consideradas significativas para valores de p calculados < 5% destacados pelo símbolo “*”..... 85

Figura 32. Abundância relativa da forma não modificada para o peptídeo 27-KSAPTTGGVKKPHR-40 em H3.3. a forma não modificada não apresentou mudanças significativas. O período correspondente ao dia é indicado pela barra branca no eixo X enquanto o período noturno é indicado pela barra preta. A análise estatística foi realizada usando o teste t heteroescedástica de distribuição bicaudal para os pontos com maior amplitude, e as diferenças foram consideradas significativas para valores de p calculados < 5% destacados pelo símbolo “*”..... 86

Figura 33. Abundância relativa de PTMs para os peptídeos quantificados em H2A e H2B. O eixo Y apresenta a abundância relativa em uma escala que vai de 0 a 1, onde 0 representa nenhuma quantidade e 1 representa 100%. As barras correspondem aos valores médios da abundância relativa, enquanto a barra de erro apresenta o desvio padrão (19 replicas). Cada barra possui sua respectiva PTM na legenda do eixo X, e a barra do peptídeo não modificado está rotulado como “UnMod”. As cores sinalizam peptídeos diferentes..... 88

Figura 34. Abundância relativa de PTMs em H2A. (A) não foi observado ritmo significativo na variação diurna da abundância relativa de H2A.W.1.K151me2 e (B) H2A.W.1.K151me1K154me1. O período correspondente ao dia é indicado pela barra branca no eixo X enquanto o período noturno é indicado pela barra preta. A análise estatística foi realizada usando o teste t heteroescedástica de distribuição bicaudal para os pontos com maior amplitude, e as diferenças foram consideradas significativas para valores de p calculados < 5% destacados pelo símbolo “*”..... 89

Figura 35. Abundância relativa de PTMs em H2A e H2B. (A) não foi observado ritmo significativo na variação diurna da abundância relativa de H2B.2K32acR33me1. (B) H2A.W.5.K139me3 apresentou redução média de 70,2% (min 44,9%/ max 85,5%, +/- 6,4% p-valor 0,002) quando comparado o início do dia (ZT4) com o fim do dia (ZT12). A análise estatística foi realizada usando o teste t heteroescedástica de distribuição bicaudal para os pontos com maior amplitude, e as diferenças foram consideradas significativas para valores de p calculados < 5% destacados pelo símbolo “*”..... 90

Lista de Tabelas

Tabela 1. Área plantada, área colhida e produção das lavouras no Brasil em 2019 (IBGE - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, março 2020)	21
Tabela 2. Sequência dos primers utilizados.....	35
Tabela 3. Gradiente utilizado para todos experimentos.....	40
Tabela 4. Percentual de modificadores de histona rítmicos em cana-de-açúcar.	46
Tabela 5. Amplitude do acúmulo de transcritos para os genes do oscilador central do relógio biológico TOC1 e LHY.	47
Tabela 6. Alinhamento entre os SAS alvos e seus homólogos em <i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench e <i>Zea mays</i> L.A coluna “ANOTAÇÃO” traz o nome do gene, a coluna “SAS” mostra o SAS correspondente, a coluna “ORGANISMO” mostra os organismos usados para realizar BLAST, a coluna “TOTAL SCORE” demonstra o score do alinhamento enquanto que a coluna “QUERY COVER” demonstra a cobertura do alinhamento, a coluna “IDENTIDADE” apresenta a identidade entre as sequências. A coluna “ACCESSION” traz o código referente as sequências de <i>Sorghum bicolor</i> e <i>Zea mays</i> depositadas no banco de dados NCBI.....	49
Tabela 7. Anotação das histonas identificadas para o entrenó 3-5. A sigla SAS se refere ao gene depositado na base de dados SUCEST. “Variante” se refere a anotação para cada tipo de histona identificada, Cobertura [%] demonstra em porcentagem qual extensão da proteína foi identificada neste estudo, “AA” demonstra o a extensão de aminoácidos para cada histona, “LFQ log2” demonstra a média da quantidade de proteína, “SD” mostra o desvio padrão enquanto “N” apresenta o número de réplicas biológicas para os dados quantidade de proteína, a última coluna apresenta o número de MS/MS identificados.....	59
Tabela 8. Peptídeos modificados mais abundantes em cana-de-açúcar. Os peptídeos com o percentil acima de 0,9 para número de scans foram colocados em ordem decrescente para o número de scans. A coluna peptídeo mostra a sequência do peptídeo juntamente com as modificações, as quais são representadas como o seguinte, monometilação = “me1”; dimetilação = me2; trimetilação me3; acetilação = “ac”; propionilação = “pr”; oxidação = “ox”. A coluna “AA” indica o primeiro e último peptídeo, a coluna “Scans” apresenta a contagem de scans. A coluna “SAS” se refere a ao gene correspondente em cana-de-açúcar	72
Tabela 9. Peptídeos de H2A quantificados exclusivamente na forma modificada.....	87

Resumo

(Silva, J. P. L.) **Ritmos diurnos de modificações pós-traducionais em histonas de cana-de-açúcar.** 2020. (118p). Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Os ritmos circadianos regulam uma ampla variedade de processos fisiológicos e metabólicos. O relógio circadiano consiste em redes complexas de sinalização nos níveis transcricional e traducional, geralmente descritas através de feedbacks de inibição regulados por fatores de transcrição. Esse sistema modula a expressão de mais de um terço dos transcritos em cana-de-açúcar. Mudanças dinâmicas na cromatina também são reguladas por ativadores e repressores circadianos, que recrutam uma ampla variedade de modificadores que regulam o epigenoma dependendo da hora do dia. Assim, acredita-se que o relógio circadiano possa conectar o metabolismo energético, remodelação da cromatina e fisiologia circadiana. Em plantas, observou-se que modificações rítmicas em histonas ocorrem associadas aos genes do relógio circadiano. Portanto, criamos a hipótese de que as modificações pós-traducionais (PTMs) são rítmicas nas histonas no cultivar híbrido de cana SP80-3280. Para testar isso, avaliamos, por PCR quantitativo, os níveis transcricionais de genes relacionados à regulação da cromatina. Também realizamos um estudo proteômico das histonas de cana-de-açúcar extraídas do entrenó em 5 momentos do dia (4h, 7h, 12h, 17h e 22h após o nascer do sol). As histonas foram purificadas a partir de núcleos isolados e propioniladas. As PTMs presentes em nossa amostra foram avaliadas por cromatografia nano-líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS). Realizamos uma abordagem não-direcionada para quantificar mais de 100 peptídeos das histonas H3, H2A e H2B. Encontramos evidências de ritmos no acúmulo de PTMs nos peptídeos 18-KQLATKAAR-26, 18-KQLATKAAR-26 e 27-KSAPTTGGVKKPHR-40 para H3. Também descrevemos novas modificações nas histonas H2A e H2B. Esse resultado é a primeira evidência apontando a existência de acúmulo diurno de PTMs em histonas de cana-de-açúcar. Esses resultados também apontam para a conservação na regulação da cromatina do relógio circadiano em plantas.

Palavras-chave: Relógio circadiano; modificações pós-traducionais; Cana-de-açúcar; Histonas

Abstract

(Silva, J. P. L.) **Diurnal rhythms in sugarcane histones post translational modification.** 2020. (118p). Master's Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Circadian rhythms regulate a wide variety of physiological and metabolic processes. The circadian clock consists of complex signaling networks at transcriptional and translational level usually described as inhibitory feedback loops regulated by transcription factors. This system modulates the expression of more than one third of transcripts in sugarcane. Dynamic changes in the chromatin are also regulated by circadian activators and repressors that recruit a wide array of modifiers that mediate the epigenome according with the time of day. Thus, the circadian clock is thought to connect energetic balance, chromatin remodeling and circadian physiology. In plants, it was observed that rhythmic modifications in histones occur associated with circadian clock genes. Therefore, we hypothesized that post-translational modifications (PTMs) are rhythmic in histones in the sugarcane hybrid cultivar SP80-3280. To test that, we evaluated, by quantitative PCR, the transcriptional levels of genes related to chromatin regulation. We also carried a proteomic study of the sugarcane histones extracted from internode in 5 times of the day (4h, 7h, 12h, 17h, and 22h after sunrise). Histones were purified from isolated nuclei and propionylated. PTMs present in our sample was assessed by nano liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS). We performed an untargeted approach to quantify more than 100 peptides from histones H3, H2A and H2B. We found evidence of rhythms in PTMs accumulation at the peptides 18-KQLATKAAR-26, 18-KQLATKAAR-26, and 27-KSAPTTGGVKKPHR-40 from H3. We also described new modifications on histones H2A and H2B. This result is the first evidence that there might be diurnal accumulation of histone PTMs in sugarcane. These results also point to the conservation in chromatin regulation of the circadian clock in sugarcane.

Key words: Circadian clock; Post-translational modifications; Sugarcane; Histones

1 Introdução

1.1 Importância econômica da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma monocotiledônea da família Poaceae (VAN DILLEWIJN, 1952). Assim como outras espécies dessa família, a cana-de-açúcar possui grande importância econômica e é uma cultura de pequenos, médios e grandes produtores (SILVA, 2016). Dentre seus produtos, o álcool e o açúcar são os mais importantes (D'HONT *et al.*, 2008). Entretanto, outros produtos também se destacam, tais como: melado, açúcar mascavo, rapadura e aguardente. Também é válido pontuar que a cana-de-açúcar é valiosa como ração animal, já o bagaço é um produto que pode ser utilizado para alimentação de gado, além da fabricação de papel, da produção de etanol de segunda geração e da produção de energia termoelétrica (DIAS *et al.*, 2012; PANDEY *et al.*, 2000).

A cana-de-açúcar contribui amplamente com a economia do Brasil. No período de 2013 a 2014, o setor sucroenergético contribuiu com 2% do PIB brasileiro e 1,3% de todo o emprego formal (NEVES, MARCOS FAVA; TROMBIM, 2014). Além disso, o cultivo e a indústria da cana-de-açúcar trazem ganhos sociais para as localidades em que está presente (MORAES; OLIVEIRA; DIAZ-CHAVEZ, 2015). O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar no mundo. Para a safra de 2020/21, a produção estimada é de 630 milhões de toneladas em uma área de 8,4 milhões de hectares, onde a produção de açúcar deverá atingir 35,3 milhões de toneladas e 31,9 bilhões de litros de álcool (CONAB, 2020).

Outro ponto que vale destacar é a geração de energia. No Brasil existe um grande uso de fontes renováveis de energia, onde a cana-de-açúcar representou 38,4% da oferta interna de energia entre as fontes renováveis em 2018. Em relação à matriz elétrica, o bagaço de cana representou 6,7 % da oferta interna de energia elétrica em 2018 (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2018). Devido ao enorme potencial energético da cana-de-açúcar, pesquisas têm focado no aprimoramento de variedades voltadas para o aumento da produtividade em termos de biomassa, o que pode ser o novo paradigma de produção de energia no Brasil (LIMA, 2016).

A produtividade mundial de cana-de-açúcar pode variar bastante. Bons rendimentos nos trópicos úmidos de uma cultura totalmente de sequeiro podem estar na faixa de 70 a 100 t ha⁻¹ de cana-de-açúcar, e nos trópicos secos e subtropicais com irrigação, 110 a 150 t ha⁻¹ de cana (FAO

2020). No Brasil, a produtividade está na ordem de 70 t ha⁻¹(CONAB, 2020), valor este superior a outros cultivares comuns no Brasil (Tabela 1). No entanto, alguns desafios têm mantido as médias brasileiras inferiores a 80 t ha⁻¹, entre eles pode se destacar: o envelhecimento das lavouras, a baixa taxa de renovação, a falta de investimento em algumas regiões e a redução do pacote tecnológico (IPEA, 2016). Além disso, o setor sucroalcooleiro enfrenta dificuldades no aumento de produtividade causado pela falta de investimento em desenvolvimento tecnológico (BNDS, 2014). A falta de abordagens biotecnológicas para melhorar a cana-de-açúcar é um dos principais obstáculos ao aumento do rendimento das culturas (DAL-BIANCO *et al.*, 2012). Dessa forma, é necessário o contínuo investimento em pesquisas voltadas para essa cultura a fim de contribuir com o desenvolvimento tecnológico.

Tabela 1. Área plantada, área colhida e produção das lavouras no Brasil em 2019 (IBGE - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, março 2020).

Lavouras	Área plantada (Hectares)	Produção (Toneladas)	Produtividade (t ha⁻¹)
Cana-de-açúcar	9.627.539	667.532.475	69,30
Soja	35.843.444	113.488.489	3,16
Milho (1ª Safra)	4.905.875	25.985.997	5,29
Arroz	1.711.687	10.260.474	5,99
Algodão herbáceo	1.629.676	6.894.169	4,23
Feijão (1ª Safra)	1.603.417	1.284.007	0,80

1.2 Fisiologia vegetal

A cana-de-açúcar é uma monocotiledônea C4 que armazena sacarose em seu caule, possui grande acúmulo de biomassa, e possui um genoma altamente poliploide e aneuplóide, devido a múltiplas hibridações interespecíficas entre *Saccharum officinarum L.* e *S. spontaneum L.* (GARSMEUR *et al.*, 2018).

A grande importância da cultura de cana-de-açúcar é produto, em última análise, da sua fisiologia, com destaque para a fotossíntese C4, que é um mecanismo de concentração de CO₂. Em plantas C4, a enzima Rubisco está localizada no interior de uma camada imediatamente ao

redor dos tecidos vasculares das folhas e caules fotossintéticos, chamadas de células da bainha. A enzima fosfoenol piruvato carboxilase, expressa nas células da bainha, usa o íon bicarbonato para formar ácido oxalacético, que é convertido para malato ou um aminoácido, e é transportado para as células da bainha. Em seguida, o ácido de quatro carbonos (ou ácido C4) é descarboxilado para liberar CO₂, resultando assim no seu acúmulo. Esse processo reduz a atividade oxigenase da Rubisco, que é elevada em climas quentes, e o carbono nas células da bainha é então processado em açúcares pelo modo C3 da fotossíntese (WANG *et al.*, 2012). As plantas C4 geralmente têm capacidades fotossintéticas mais altas do que as plantas C3 acima de 30 °C, mas menor capacidade fotossintética abaixo 18 °C. Como consequência, as plantas C4 tendem dominar habitats abertos, onde as condições quentes prevalecem durante a estação de crescimento (SAGE, 2008).

Os carboidratos sintetizados em forma de sacarose nos órgãos fotossintetizantes são a principal fonte de energia para o desenvolvimento das plantas. Durante o dia, ocorre a síntese de sacarose e o acúmulo de amido que é degradado à noite (GRAF *et al.*, 2010). Esse metabolismo é sensível a mudanças ambientais na quantidade, qualidade e fotoperíodo da luz. As informações relativas as mudanças diárias e rítmicas são fornecidas ao relógio biológico, que controlam diretamente muitos processos de desenvolvimento, relacionados aos metabólitos primários (KIM *et al.*, 2017).

Assim como *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., as variedades comerciais de cana-de-açúcar têm um relógio circadiano robusto. Vias importantes, como as envolvidas na fotossíntese, metabolismo de carboidratos, metabolismo de aminoácidos, processamento de informações genéticas e sinalização de hormônios, exibem ritmos circadianos (HOTTA; NISHIYAMA; SOUZA, 2013). Portanto, a cana-de-açúcar tem forte influência regulatória do relógio circadiano.

De fato, o estudo da regulação do metabolismo e da fisiologia de plantas pelo relógio circadiano é fundamental para entender processos chave que serão fundamentais para resolver problemas ligados ao aumento da demanda por produtos agrícolas (AUGUSTIJN; DE GROOT; ALIA, 2019).

1.3 O relógio biológico das plantas

Nosso planeta gira em torno do seu próprio eixo, criando um ritmo de escuridão e luz que sempre foi parte deste mundo. Os seres vivos evoluíram e se adaptaram à essas condições rítmicas (PANDA; HOGENESCH; KAY, 2002). As plantas são provavelmente os organismos que estão mais intimamente conectados com a luz solar e, por consequência, seus ritmos. Assim, as plantas conseguem responder e antever aos eventos rítmicos de intensidade luminosa, temperatura, ataque de herbívoros e comportamento de polinizadores (ATAMIAN *et al.*, 2016; GESSLER *et al.*, 2017; HASSIDIM *et al.*, 2017).

Muitas características das plantas são prontamente percebidas como rítmicas por um observador atento como por exemplo os movimentos foliares ou a abertura de flores (DARWIN, 1881). Além dessas mudanças visíveis, muito mais da bioquímica e fisiologia vegetal possui perfil rítmico (WEBB *et al.*, 2019). O conjunto de processos biológicos que possui ritmos de cerca de 24 h, que são endógenos, autossustentáveis e que se mantêm constantes mesmo com mudança de temperatura são denominados ritmos circadianos (do latim “circa” (cerca) e “dies” (dia)) (MCCLUNG, 2006).

Essa capacidade inata de medir o tempo é orquestrada por um relógio biológico que possui suas bases moleculares em uma complexa rede de sinalização que integra sinais externos, como luz e temperatura (*inputs* do relógio) e permite a regulação de diversos processos celulares (*outputs* do relógio). Essa rede possui no seu cerne um sistema de oscilação central composto por genes que se auto regulam para manter graus diferentes de transcritos conforme a hora do dia (MCCLUNG, 2011).

O modelo inicial para a formação do relógio circadiano consistia em um sistema de um único componente onde um produto proteico inibe seu próprio transcrito e, dessa forma, um ritmo de acumulação e inibição de transcritos era formada de maneira autossustentada (ALABADÍ *et al.*, 2001). Embora tenha sido demonstrado que o mecanismo de geração de ritmos é vastamente mais complexo do que este modelo inicial, o paradigma de um sistema baseado em retroalimentação negativa se provou sustentado por sólidas evidências (WULUND; REDDY, 2015).

Em plantas, o modelo de funcionamento do relógio biológico foi desenhado a partir de estudos em *Arabidopsis*. Assim como em outros organismos, o relógio circadiano de plantas é

composto por ciclos de retroalimentação. De maneira simplificada, o modelo do funcionamento do relógio biológico de *Arabidopsis* pode ser apresentado da seguinte forma: ao amanhecer, a dupla de fatores Myb-like *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1* (CCA1) e *LONG ELONGATED HYPOCOTYL* (LHY) reprimem a expressão de genes *outputs* do relógio circadiano e genes do oscilador central através da ligação deles ao *EVENING ELEMENT* (EE), motivo presente como um elemento em cis nos promotores dos genes alvos. LHY e CCA1 têm como alvos os genes *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 5* (PRR5), *PRR7*, *PRR9* e *TIMING OF CAB EXPRESSION 1* (TOC1). Esses alvos, por sua vez, levam à repressão de LHY e CCA1, levando a redução considerável dos seus níveis no começo da noite até o começo do dia (CREUX; HARMER, 2019).

O paradigma atual do relógio circadiano inclui pelo menos 3 circuitos de feedbacks interligados (SAINI; JASKOLSKI; DAVIS, 2019). Em monocotiledôneas, estudos mostraram que o relógio circadiano do arroz se assemelha ao de *Arabidopsis*, e há um paralelo entre os perfis de expressão circadiana dos genes putativos do relógio de arroz e os homólogos de *Arabidopsis* (SONG; ITO; IMAIZUMI, 2010). Além disso, evidências envolvidas no sistema circadiano de *Lemna gibba* L. e *Arabidopsis* apontam para um relógio circadiano conservado entre monocotiledôneas e dicotiledôneas, embora alguns componentes possam ter papéis distintos em espécies específicas (SERIKAWA *et al.*, 2008).

O relógio circadiano sincroniza o metabolismo, a fotossíntese, os níveis hormonais, a sinalização e muitas características do desenvolvimento, incluindo padrões diários de crescimento (ADAMS; CARRÉ, 2011). Ele é importante para a viabilidade da planta, adequação e inúmeras respostas ao estresse, incluindo resposta contra patógenos (PARK; KIM; YUN, 2016; ZHANG *et al.*, 2013). Assim, o relógio circadiano confere às plantas vantagens competitivas em um ambiente rítmico (DODD *et al.*, 2005).

Estudos mostraram que 10% a 30% de todos os transcritos de um determinado tecido exibem regulação circadiana (REY; REDDY, 2013). De fato, cerca de um terço do transcriptoma de *Arabidopsis* e cana-de-açúcar (híbrido de *Saccharum*) está sob controle circadiano (COVINGTON *et al.*, 2008; HOTTA; NISHIYAMA; SOUZA, 2013). Evidências sugerem que os genes do relógio circadiano atuam como parceiros das enzimas modificadoras da cromatina, onde o relógio circadiano pode contribuir como programador epigenético rítmico e regulador transcricional da expressão e metabolismo gênico (FENG; LAZAR, 2012; GRIMALDI *et al.*,

2009; HURLEY; LOROS; DUNLAP, 2016). O controle circadiano das redes reguladoras da transcrição com as informações espaciais e temporais são entrelaçadas com complexa regulação da cromatina que incluem muitos mecanismos moleculares (CHEN; MAS, 2019).

1.4 Cromatina

As histonas são os blocos de construção do nucleossoma, que juntamente com o DNA formam o componente fundamental da cromatina (STRAHL; ALLIS, 2000). Estudos anteriores demonstraram que o nucleossoma é uma unidade repetitiva da cromatina. Cada unidade de nucleossoma é composta por um octâmero constituído por duas cópias das histonas H2A, H2B, H3 e H4, onde aproximadamente 146 pares de bases (pb) de DNA se envolvem. O nível mais baixo de condensação da cromatina forma uma fibra de 10nm. Uma compactação adicional de 10nm resulta em um estado de cromatina condensada com o auxílio da histona H1 e outras proteínas (KOUZARIDES, 2002). Na fase S do ciclo celular, as histonas canônicas são rapidamente sintetizadas e depositadas atrás das forquilhas de replicação. Alternativamente, as histonas não-canônicas substituem as histonas canônicas em certos locais, independentemente da replicação. Essas histonas variantes causam alterações na composição e estrutura da cromatina que são importante para desempenhar diversos papéis na replicação, transcrição e formação de heterocromatina (HENIKOFF; SMITH, 2015).

Dentre as variantes de histona, pode se destacar alguns exemplos que ilustram seu papel. H2A.Z tem um papel conservado no início da transcrição, que, no entanto, varia entre organismos e contextos celulares. H2A.Z é encontrada em promotores e em alguns *enhancers*, e pode recrutar a RNA polimerase (OSAKABE *et al.*, 2018). H2A.Z é necessário para a manutenção da heterocromatina em animais, porém, não é presente em heterocromatina de plantas (TALBERT; HENIKOFF, 2017). Nas plantas, H2A.W, que envolve 162pb de DNA, é necessário para a condensação da heterocromatina (KAWASHIMA *et al.*, 2015). Outra importante variante de histona é H3.3, pois é encontrada em altas taxas em elementos regulatórios, como *enhancers* e é associada à ativação da transcrição (WOLLMANN *et al.*, 2017).

A cromatina exibe um equilíbrio altamente dinâmico entre uma conformação aberta e uma compactada. Essas mudanças estruturais dinâmicas são moduladas por complexos de remodelação de nucleossomas dependentes de ATP e modificações pós-traducionais (*post-*

translational modification, ou PTMs) de histonas. Os fatores de remodelação de nucleossomas dependentes de ATP facilitam a dinâmica da cromatina, agindo pelo reposicionamento de nucleossomas, interações histona-DNA, desmontagem de nucleossomas e troca de histonas canônicas e variantes (LI et al., 2010). Notadamente, o complexo remodelador de cromatina dependente de ATP SWI / SNF (*SWITCH / SUCROSE NONFERMENTABLE*) é um componente importante na remodelação circadiana de nucleossomas em *Neurospora crassa* Shear & B.O. Dodge (WANG et al., 2014), mamíferos (TAO et al., 2011) e plantas (JÉGU et al., 2017).

Além da remodelagem de cromatina, as PTMs das histonas modulam a estabilidade nucleossoma e desempenham papéis importantes na regulação do recrutamento de proteínas (FUCHS; LARIBEE; STRAHL, 2009). Esse processo dinâmico leva a alterações na expressão ou função dos genes que não implicam em alterações na sequência de DNA subjacente, ou seja, um evento epigenético (LI et al., 2012). Essas PTMs de histonas ocorrem preferencialmente, mas não apenas, nas caudas do terminal N e incluem acetilação da lisina; metilação de lisina e arginina; e fosforilação de serina, treonina e tirosina (MORAES et al., 2015). As evidências mostram que as PTMs são predominantes em aparelhos reguladores no centro do relógio circadiano. Os níveis de acetilação de H3 (H3K56ac, K9ac), trimetilação de H3K4 (H3K4me3) e H3K4me2 exibem ritmo circadiano, e a inibição dessas PTMs perturbam a expressão do gene do oscilador em *Arabidopsis*, o que indica que a expressão de genes do relógio circadiano (*CCA1, LHY, TOC1*) juntamente com a correta deposição de PTMs, são fundamentais para manter o ritmo circadiano nas plantas (MALAPEIRA; KHAITOVA; MAS, 2012).

Entre muitas PTMs, a acetilação da histona é catalisada por enzimas que transferem a fração acetila do acetil-CoA para o grupo ϵ -amino dos resíduos de lisina (TURNER, 1991). A acetilação da histona é geralmente associada à ativação da transcrição, diminuindo a interação entre histonas, DNA e nucleossomas. Dessa maneira, um conjunto diversificado de fatores de ligação ao DNA pode se ligar à cadeia de DNA em nucleossomas desestabilizados e promover a transcrição, reparo do DNA e vários outros processos (BRUCE ALBERTS et al., 2002). A acetilação produz resultados distintos em muitos processos celulares dependendo da posição específicas dessa PTM na histona e do contexto da cromatina. Por exemplo, montagem de nucleossomas por histonas chaperonas, o grau de compactação da cromatina, a formação de heterocromatina e, criticamente, a transcrição de genes são influenciados por marcas de acetilação em histonas (SHAHBAZIAN; GRUNSTEIN, 2007).

A metilação da histona ocorre de forma proeminente em suas caudas nas posições de lisina e arginina nas histonas H3 e H4. Cada uma dessas posições individuais de lisina pode existir em três estados distintos de metilação: mono-, di e trimetilação (LACHNER *et al.*, 2004). A metilação da histona pode ter um impacto ambíguo na transcrição, dependendo do contexto específico em que a marca de metilação está localizada. A lisina 36 (H3-K36) está correlacionada com o aumento da cromatina acessibilidade e atividade transcricional, enquanto a metilação da histona H3 lisina 9 (H3-K9), lisina 27 (H3-K27) e histona H4 lisina 20 (H4-K20) é uma marca presente nas estruturas repressivas da cromatina (KOUZARIDES, 2002).

Embora a fosforilação tenha sido descrita há bastante tempo, sua função ainda não é bem compreendida em histonas. De fato, muitos detalhes sobre a fosforilação de histonas permanecem obscuros e ainda estão sob investigação. As histonas fosforiladas foram associadas a vários processos celulares, por exemplo, a fosforilação na serina 139 na histona H2AX está relacionada ao reparo do DNA (SHARMA; SINGH; ALMASAN, 2012), a fosforilação da treonina 119 na histona H2A está associada a eventos do ciclo celular (AIHARA *et al.*, 2004), e a fosforilação da histona H4 na histidina 18 e 75 facilita a replicação do DNA (BESANT; ATTWOOD, 2012). A fosforilação da serina e treonina parece estar relacionada à condensação da cromatina durante a mitose e meiose (BANERJEE; CHAKRAVARTI, 2011). Evidências iniciais em plantas apontam para a família Aurora quinase como um importante fator no ciclo celular através da fosforilação da histona H3 (HOUBEN *et al.*, 2007).

Estudar o papel das PTMs nas histonas é crucial para entender melhor quais mecanismos medeiam a relação entre o relógio circadiano e o epigenoma. Esse conhecimento pode ser usado para melhor conhecer a fisiologia vegetal. Dada a relevância das PTMs na regulação da expressão gênica e o papel do relógio biológico nesse processo, concentramos nossos esforços na cana de açúcar, uma monocotiledônea C4 que armazena sacarose em seu caule. Como *Arabidopsis*, as variedades comerciais de cana-de-açúcar têm um relógio circadiano robusto. Vias importantes do metabolismo e fisiologia vegetal como as envolvidas na fotossíntese, metabolismo de carboidratos, metabolismo de aminoácidos, processamento de informações genéticas e sinalização de hormônios, exibem ritmos circadianos (HOTTA; NISHIYAMA; SOUZA, 2013). Portanto, os processos que orquestram a regulação molecular do relógio circadiano na cana-de-açúcar podem estar intimamente relacionados à remodelagem da cromatina.

1.5 Espectrometria de massas voltada para o estudo de biomoléculas

A espectrometria de massa (EM) é uma poderosa ferramenta analítica usada em todo mundo para identificar, quantificar e caracterizar biomolécula em um profuso número de condições biológicas ou tipos de amostras (WALTHER; MANN, 2010). À medida que houve avanços na instrumentação, a cromatografia líquida (LC) de alto rendimento foi acoplada a um espectrômetro de massa em tandem (MS/MS) graças ao advento da fonte de íons gerada por ionização por eletrospray (ESI), o que permitiu que experimentos analisando centenas a milhares de proteínas se tornassem comuns (AEBERSOLD; MANN, 2003). Atualmente diversas formas de preparar a amostra proteica de interesse existe, entre elas destaca se a metodologia “*Bottom-up*” onde a proteína é digerida em peptídeos e esses são separados por cromatografia líquida e ionizados por meio de ESI (LERMYTE *et al.*, 2019).

Diversas metodologias foram desenvolvidas para o estudo de proteínas por meio da espectrometria de massa. Entre as numerosas abordagens utilizadas, o meio para aquisição de dados é utilizado como termo geral para classificar grande parte das abordagens comumente empregadas. As três principais formas de aquisição de dados são: aquisição dependente dos dados (*Data-dependent acquisition* ou DDA), a aquisição de dados com monitoramento de alvo específico (*Parallel Reaction Monitoring* ou PRM e *Selected reaction monitoring* ou SRM), e aquisição independente dos dados (*Data-independent acquisition* ou DIA) (DOERR, 2014). Vale notar que o modo de aquisição de dados não é uma metodologia experimental fechada, permitindo diversas abordagens distintas que empregam o mesmo método de aquisição de dados.

Na tradicional aquisição dependente de dados (DDA), uma amostra é ionizada e analisada por espectrometria de massa em uma varredura completa de massas (*full scan*). Os peptídeos também são selecionados para fragmentação, de maneira estocástica, produzindo espectros de massa em tandem (MS/MS) que podem ser comparados aos espectros em um banco de dados (DOERR, 2014). Embora essa abordagem seja extremamente poderosa, os peptídeos são aleatoriamente escolhidos para fragmentação e aqueles com o sinal mais forte são privilegiados. Assim, continua sendo um desafio quantificar reprodutivamente peptídeos, especialmente os de baixa abundância, pela abordagem DDA.

Na aquisição de dados com monitoramento de alvo específico, ensaios de espectrometria de massa são implantados para detectar peptídeos que representam proteínas de interesse com alta

precisão quantitativa e alta sensibilidade. A técnica pode acompanhar especificamente um íon e seu fragmento, o que é chamado de monitoramento de reação selecionado (SRM) (METHOD OF THE YEAR 2012, 2013) ou acompanhar especificamente um íon e todos seus fragmentos paralelamente (PRM) (DOERR, 2012). Apesar de também ser bastante poderosa, essa abordagem não é adequada para experimentos baseados em descoberta, pois é necessário conhecer o alvo analisado em detalhe (DOERR, 2014).

Finalmente, a aquisição independente de dados (DIA), que em teoria combina as vantagens do DDA e SRM todos os peptídeos em um intervalo de massa (leia se m/z), são fragmentados e esse intervalo de massa é alterado de modo que toda a faixa de m/z seja analisada. Na prática isso permite que todos os peptídeos (leia se íons) sejam fragmentados independentemente de eventos aleatórios, abundância e conhecimento prévio da amostra. Isso resulta em quantificação precisa de peptídeos sem se limitar a criar um perfil de peptídeos predefinidos de interesse, no entanto é necessária uma análise de dados mais robusta e cautelosa devido à elevada complexidade do espectro gerado (ZHANG *et al.*, 2020).

A combinação dos métodos de descoberta DDA e do método de DIA permite que peptídeos identificados com alta confiabilidade pelo método de DDA sejam quantificados de maneira robusta pelo método DIA (GUAN *et al.*, 2019).

A análise de dados pode ser realizada pelas plataformas gratuitas, aqui destacamos o programa *MaxQuant* que permite anotar os espectros de massas em tandem por meio de uma busca baseada em sequência de proteína fornecida ao programa (COX; MANN, 2008) e ao programa *Skyline* que permite inspecionar a qualidade dos dados manualmente e quantificar peptídeos (MACLEAN *et al.*, 2010).

2 Objetivos gerais

Este trabalho tem como objetivo procurar por ritmos na frequência de PTMs em histonas de cana-de-açúcar, bem como avaliar perfil de transcrição de fatores de regulação da cromatina em cana-de-açúcar.

2.1 Hipóteses testadas

- Genes relacionados com a regulação de cromatina em cana-de-açúcar possuem ritmo diurno.
- Histonas H2A e H2B possuem PTMs em cana-de-açúcar.
- Os níveis de proteína de histona não variam ao longo do dia em cana-de-açúcar.
- Os níveis de PTMs variam ao longo do dia em cana-de-açúcar.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar o número de transcritos rítmicos relacionados com a regulação de cromatina com o padrão global de transcritos;
- Quantificar a expressão de genes relacionados a remodeladores de cromatina em plantas de cana-de-açúcar cultivada em campo;
- Quantificar os níveis de histonas ao longo do dia;
- Identificar PTMs em histonas de cana-de-açúcar;
- Quantificar as abundâncias relativas de PTMs para os peptídeos de histonas de cana-de-açúcar;
- Procurar por ritmos diurnos de PTMs em histonas.

3 Material e Métodos

3.1 Material biológico e condições de campo

O material biológico deste trabalho foi o cultivar de cana-de-açúcar SP803280 (*Saccharum spp*) cultivada em condições de campo nas dependências da Universidade Federal de São Carlos, campus de Araras – São Paulo (coordenadas geográficas 22°18'41.0"S, 47°23'05.0"W). A coleta do material foi realizada nos dias 4 e 5 de setembro de 2017. O nascer do sol se deu às 6:16 da manhã e o pôr do sol às 18:01, totalizando aproximadamente de 12h de claro e 12h de escuro. A temperatura máxima foi 28, e a mínima foi 14 (Figura 1). As plantas estavam com 9 meses de idade. As amostras foram coletadas nos seguintes horários: 4 h, 7 h, 12 h, 17 h e 22 h após o nascer do sol. O Tempo Zeitgeber (ZT), uma notação padronizada de 24 onde o ZT 0 indica o início do dia, ou a fase clara, e ZT 12 é o início da noite, ou a fase escura, foi usada para indicar os pontos de coleta (Figura 1). Os órgãos coletados foram a folha +1 e os entrenós 5 e 6 (Figura 2). A folha +1 é um órgão fotossintético caracterizado como uma fonte de carbono e é definida como a primeira folha do ápice meristemático de cada planta a ter bainha individual. Os entrenós são órgãos dreno, onde o carbono é armazenado em forma de sacarose. O entrenó 5-6 são órgãos que estão em um estágio de desenvolvimento no qual eles iniciam o acúmulo de sacarose. Para cada ponto de coleta ao longo do dia, foram coletados 4 pools formados pela mistura de tecidos de 10 indivíduos a fim de para reduzir a variabilidade biológica. Para a coleta, cada órgão foi processado em pedaços, colocados em tubos, identificados, e congelado em nitrogênio líquido. Durante o transporte o material foi acondicionado em gelo seco. O material foi armazenado em freezer -80 até a realização dos experimentos.

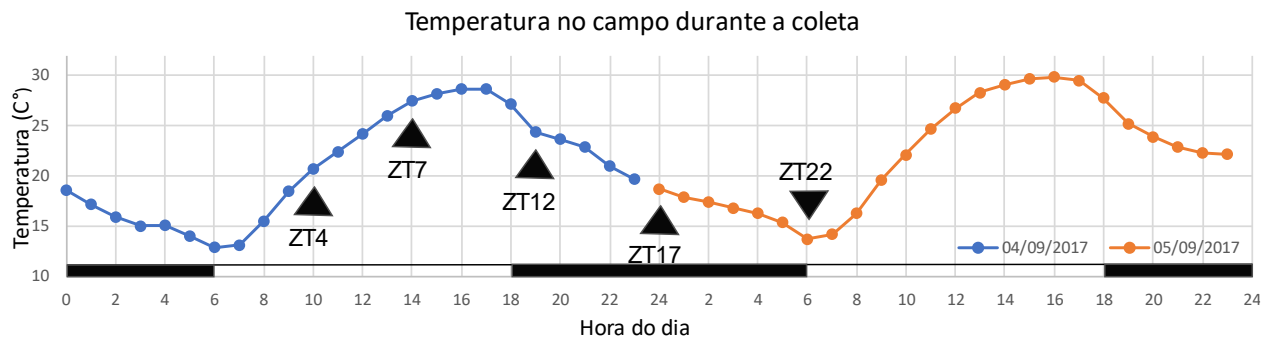


Figura 1. Temperatura do campo durante a coleta. A temperatura em Graus Celsius (eixo Y) é apresentada por círculos e os valores são conectados por uma linha onde a cor azul indica o dia 4/9/2017 e amarela 5/9/2017. O eixo X mostra as horas correspondente ao fuso horário GMT -3. O período referente ao dia e noite é representado por uma barra branca e preta respectivamente ao lado do eixo X. Os pontos onde a coleta foi realizada está indicado pelos triângulos pretos com seus respectivos ZT.

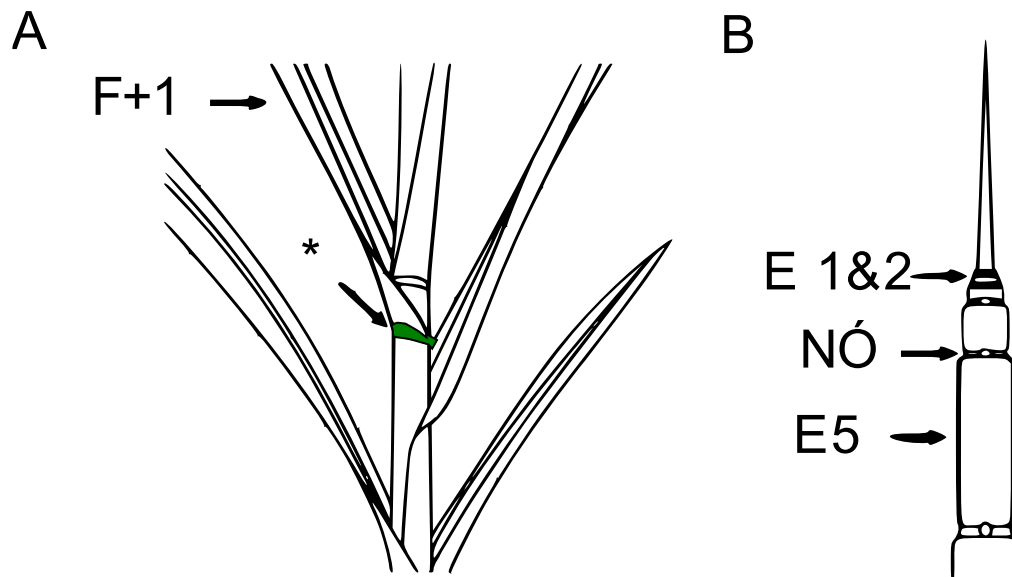


Figura 2. Ilustração identificando órgãos folha +1 e entrenó 5. (A) A folha +1 (F+1) é a primeira folha do topo com uma bainha claramente visível (*). (B) Depois que todas as folhas são descascadas e removidas, todo o caule é exposto para que todos os nós e entrenós (E) possam ser vistos. Os dois primeiros entrenós (entrenós 1 e 2, o quinto entrenó (entrenós 5). Adaptado de DANTAS *et al.*, 2020.

3.2 Seleção de Genes relacionados com cromatina em cana-de-açúcar

Para identificar os genes relacionados à cromatina em cana-de-açúcar, 559 genes foram obtidos do banco de dados ChromDB: Chromatin Database (www.chromdb.org) (GENDLER; PAULSEN; NAPOLI, 2008) e suas sequências foram baixadas do banco de dados TAIR (www.arabidopsisthaliana.org). Essas sequências foram usadas nas buscas no TBLASTX do banco de dados de EST de cana-de-açúcar SUCEST (sucest-fun.org/wsapp). Os resultados retornaram sequências de cluster de EST que representam um gene ou o máximo de uma região genica coberta por sequências de EST. Esse Cluster de EST é denominado SAS (Sugarcane assembled sequence). Um cut off menor do que $1e-30$ foi utilizado para selecionar os SAS que demonstraram homologia e estes foram utilizados com banco de dados para buscas de homologia através de TBLASTX com *Arabidopsis thaliana* como query. Essa busca retornou 487 SAS com alta identidade a genes relacionados a cromatina em *Arabidopsis thaliana*, que foram anotados quanto a sua função molecular. Esse catálogo foi utilizado para subsequente escolha de primers.

3.2.1 Anotação de variantes de histona

As histonas H2A foram anotadas segundo a estrutura primaria traduzida. Para isso as sequências foram alinhadas utilizando a ferramenta webPRANK (LÖYTYNOJA; GOLDMAN, 2010) e foram usados os parâmetros estabelecidos na literatura (OSAKABE *et al.*, 2018) para se estimar as semelhanças nas estrutura das caudas N-terminal e C-terminal, além do motivo L1. Já as histonas H3 foram anotadas seguindo o que descrito na literatura (STROUD *et al.*, 2012). H4 possui apenas uma versão. As variantes de H2B foram anotadas arbitrariamente, conforme a abundância dessas em entrenó.

3.3 Extração de RNA total

Os órgãos de cana-de-açúcar congelados foram pulverizados em um cadinho com auxílio de pistilo em nitrogênio líquido. A extração de RNA total foi realizada com 100 mg deste material pulverizado utilizando o reagente Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), seguida por tratamento com 2 U de DNase I (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) a 37°C por

30 min. Posteriormente, o RNA total foi avaliado quanto a integridade através de eletroforese em gel desnaturante de agarose (ARANDA; LAJOIE; JORCYK, 2012), observando a integridade das bandas de RNA ribossomal. A qualidade do RNA também foi avaliada através de espectrofotometria a 230nm e 280nm em nano espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Finalmente, o RNA total foi quantificado através do kit Qubit 3 Fluorometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). As amostras foram armazenadas a -80°C.

3.4 Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total. Para a síntese de cDNA foi seguido o protocolo do fabricante e o kit usado foi o *SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Foram utilizados 1 µg de primers de hexâmetros randômicos a 25 µM, mais 1 µg de primers oligo-(dT) a 50 µM. O volume final de cDNA obtido, de 20 µl, foi armazenado a -20°C.

3.5 PCR Quantitativo

A técnica de PCR quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR) foi a abordagem de escolha para quantificar de maneira relativa os alvos escolhidos.

As reações de RT-qPCR foram compostas de 6 µl de *FAST SYBR® Green Master Mix* (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) mais 2,4 µl de solução de par de primers (sentido 5' e sentido 3') gene específico na concentração de 10 µM, além de 3,6 µl de cDNA diluídos 5x a partir da amostra sintetizada inicialmente. As reações foram adicionadas a placas de 96 poços em triplicata técnica e elas foram acompanhadas no aparelho *Fast 7500/7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Os primers específicos (Tabela 2) para os alvos escolhidos foram avaliados quanto a eficiência da amplificação através da construção de curva de diluição utilizado o cDNA sintetizado e somente foram utilizados primers cuja eficiência era igual a 100% permitido um desvio de 5%. A especificidade dos primers foi avaliada através de curvas de *melt*, onde somente um pico era aceito para cada par de primer. Os primers foram finalmente testados para auto amplificação através de controles negativos de reação utilizado água e RNA total ao invés de

cDNA. Para o par de primers do gene de normalizados foi adotado os primers já descritos *GAPDH* (HOTTA; NISHIYAMA; SOUZA, 2013). Os primers para os genes *LHY* e *TOC1* foram os descritos anteriormente (HOTTA; NISHIYAMA; SOUZA, 2013).

Tabela 2. Sequência dos primers utilizados

Nome do par de primers	SAS referência SUCEST	Primer fita + & - (5'-3')
<i>scMSI</i>	SCJLLR1011H01.g	tgcaactggttctactgacaaga
		tttgacagtcaaaggtgtgc
<i>scHDAC6</i>	SCEPAM1024H12.g	tcagatgaaggatgaacca
		gaccatcccattgaccactc
<i>scH2A.5</i>	SCCCLR2001C09.g	agtgggtggtggtcatggga
		gttgaccgatgcaaaccagag
<i>scH3K9SUVH4</i>	SCRLFL1010H02.g	gcaaaccctgttgagatgttc
		gagcccaaagcagttgtattt
<i>scSWI/NSF_SWI3A</i>	SCSFRT2068G06.g	gttcgccaaaaggtaagtgaat
		gacagacgtggagacgttac
<i>scEPL101</i>	SCVPLB1018E12.g	ggatgctttgattaagagcgaag
		aggtagtcccatcgtcaaca
<i>ScGAPDH</i>		cacggcactggaagca
		tcctcagggttctctgatgcc
<i>LHY</i>		ccaccacggcctaaaagaaa
		tggtttgtgactgtcattgg
<i>TOC1</i>		ttctgcctgaattggcaagtg
		ggcatcgagcacaccaatgc

3.6 Enriquecimento dos núcleos

Para identificar PTMs presentes nas amostras, primeiramente foi realizada a extração de núcleos a partir de 40g de entrenós derivadas de cana-de-açúcar conforme metodologia estabelecida por Bowler e colaboradores (BOWLER *et al.*, 2004) e adaptada por Moraes (MORAES *et al.*, 2015). Para lisar as resistentes paredes celulares de maneira a não quebrar os núcleos celulares, o material foi adicionado a um liquidificador 500 W (Arno, São Paulo, SP, Brasil) juntamente com 300 ml de tampão de lise gelado, composto por de hexileno glicol 1M (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), de tampão PIPES/KOH 10 mM pH 7 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 2-mercaptoetanol 10mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), PMSF 0.5 mM (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany), NaF 10mM (Fischer, Hampton, NH, USA), sódio butirato 20mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). O material foi triturado com 60 pulsos de aproximadamente 1s com a menor potência com intervalos de aproximadamente 1s entre os pulsos. Posteriormente, foi adicionado Triton X-100 (Fischer, Hampton, NH, USA) até a concentração de 0.5 % e então o material foi filtrado por duas camadas de Miracloth (Merck, Darmstadt, Germany) e foi deixado incubar por 10min em um béquer condicionado no gelo. Após o período de incubação, o material foi dividido em tubos de 50mL e centrifugados por 10 min a 300g a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido gentilmente com ajuda de pipeta de 5ml com um tampão de lavagem formado por hexileno glicol 0,5M, tampão PIPES/KOH 10mM pH 7,0, 2-mercaptoetanol 10mM, PMSF 0,5mM, NaF 10mM, sódio butirato 20mM em Triton X-100 0,5%. O material foi lavado no total duas vezes nas condições de centrifugação descritas anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o pellet armazenado a -80 °C até posterior processamento.

Uma vez que todas as réplicas estavam prontas para serem extraídas, o pellet foi ressuspendido em uma solução de 3ml de cloridrato de guanidina 40% (Tocris bioscience, Bristol, United Kingdom) em tampão fosfato pH 6,8 onde foi adicionado prontamente 2-mercaptoetanol para concentração final de 10mM e PMSF 0,1mM. O *pellet* foi dissolvido com ajuda de vórtex e posteriormente ele passou por 1 min em banho ultrassônico. Então foi adicionado ácido sulfúrico 250N e deixado incubar por 30 min em gelo. Em seguida, para formar um pellet com as proteínas que precipitaram em baixo pH o material foi centrifugado a 10000 g por 10 min. O sobrenadante foi coletado e o pH foi neutralizado com hidróxido de potássio. O

volume da solução restante foi dividido igualmente em dois tubos de 15ml, então em cada tubo foi adicionado 500 µl de resina biorex70 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), previamente lavada sucessivas vezes com uma solução de cloridrato de guanidina 5% (GUCl 5%) em tampão fosfato pH 6,8 e armazenados ao abrigo da luz em um tubo contendo metade do volume composto por resina e a outra GUCl 5%.

Após a adição da resina a concentração de guanidina foi trazida para 5% com adição de tampão fosfato pH 6.8. Então, a solução foi incubada por uma noite no incubador rotacional HulaMixer™ (Fisher Scientific, Leicestershire, UK). Após a incubação, a resina foi lavada 3 vezes com aproximadamente 20 ml de GUCl 5%, e então a resina foi transferida para um tubo de 2 ml onde foi adicionado 500 ul de GUCl 40% com intuito de remover as proteínas ligadas a resina. Para isso, o tubo foi incubado por 30 min em rotação e o volume foi coletado e este processo repetido por mais 3 vezes, formando assim um volume final de 2ml.

Para remover o sal de guanidina, e concentrar as amostras, foi utilizado um filtro de centrifugação com um *cut-off* de 3000 Daltons (Amicon Merck, Darmstadt, Germany) de 500ml. A amostra foi lavada 4 vezes com água deionizada e o volume final foi aproximadamente 100ml. Para quantificar as amostras de proteínas, foi utilizado o kit Qubit 3 Fluorometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), e para verificar o perfil das proteínas extraídas, as amostras foram separadas em eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante com SDS (SDS-PAGE)

3.7 Digestão de proteínas

Após o enriquecimento com histonas, uma alíquota de 20µg foi adicionada a tubos de 1,5mL, e estes foram secos em centrífuga concentradora a vácuo. Uma vez secos as amostras foram submetidas à derivatização química com anidrido propiônico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), seguindo o protocolo adaptado proposto por Garcia e colaboradores (GARCIA *et al.*, 2007). Este processo é uma abordagem comumente utilizada para o estudo de histonas em proteômica devido ao grande número de resíduo de lisinas presentes na cauda N-terminal das histonas. As caudas N-terminais, ricas em lisinas e argininas, são submetidas a diversas modificações pós traducionais e estas são o alvo deste estudo. Devido a essa característica, a simples digestão das histonas com tripsina geraria peptídeos de tamanho reduzido, que têm baixa retenção em colunas C18. Dessa forma a derivatização com anidrido é uma boa escolha pois este

reage especificamente com as cadeias laterais das lisinas, assim a tripsina apenas cliva nas posições que possuem argininas. Para facilitar ainda mais a retenção em sistemas de cromatografia, uma segunda etapa de propionilação foi realizada após a digestão com tripsina. Essa segunda etapa promove a propionilação de amino terminal dos novos peptídeos gerados. Dessa forma, a combinação entre a propionilação das lisinas e dos aminos terminais gera peptídeos mais hidrofóbicos, que têm melhor retenção nos sistemas cromatográficos que empregam colunas C18.

Para realizar a derivatização com anidrido propiônico, o seguinte protocolo foi utilizado: inicialmente as amostras previamente secas foram e ressuspendidas em 20µl de 50mM bicarbonato de amônia e o pH 8,0 foi checado com indicador universal de pH (Merck, Darmstadt, Germany). Então, em uma capela de exaustão, uma alíquota de 10 µl de anidrido propiônico e a essa alíquota foi adicionada 30µl de 2-propanol imediatamente antes do seu uso, solução suficiente para 3 amostras. 10µl dessa mistura foi adicionada à amostra de histonas anteriormente ressuspendida. O pH foi ajustado para aproximadamente 8,0 com adição de hidróxido de amônia. Posteriormente, o tubo foi brevemente homogeneizado com vórtex e incubado por 15 min a 37 °C sob agitação. Após o período de incubação, a amostra foi seca em centrífuga a vácuo e a reação repetida mais uma vez. Duas propionilações consecutivas garantem melhor rendimento.

Uma vez concluída a primeira etapa de derivatização química, as amostras foram digeridas com tripsina. Para iniciar a digestão, as amostras foram secas em centrífuga a vácuo e ressuspendidas em 20µl de bicarbonato de amônia 100 mM. O pH foi ajustado para aproximadamente 8,0 com ajuda de uma solução saturada de bicarbonato de amônio, então foi adicionado 1mg de tripsina, e o pH foi conferido mais uma vez como aproximadamente pH 8,0. Finalmente, as amostras foram incubadas a 37°C por uma noite, e posteriormente foi adicionado ácido trifluoracético para o pH aproximadamente 4,0.

Após a digestão, os peptídeos recém-formados passaram por mais uma etapa de propionilação seguindo os mesmos passos aqui descritos. As amostras passaram por um processo de remoção de sais conforme o seguinte protocolo de limpeza por *stage tip*: primeiro foi adicionada com agulha sem ponta dois discos da resina C18 Empore (Merck, Darmstadt, Germany) em uma ponteira de 200ml e estes foram acomodados na ponteira através de um bastão de sílica fundida. Em seguida, a ponteira foi lavada com 200 ml de metanol grau LC-MS

em centrífuga a 4000 rpm através de um adaptador manufaturado com auxílio de tubos de 1,5ml e 2ml. Então, a resina foi lavada 2 vezes com solução de ácido trifluoracético 0,1% (TCA). Quarto, a amostra foi carregada duas vezes na resina, posteriormente a resina foi lavada 10 vezes com 100ml de TCA. Finalmente, os peptídeos foram eluidos com ajuda de uma solução de aceto nitrila 60% e ácido trifluoracético 0,1% e posteriormente secos em centrífuga a vácuo.

3.8 Nano LC-MS

Os experimentos de LC-MS ocorreram em colaboração com o laboratório da pesquisadora Júlia C. J. Cunha (Instituto Butantã), onde uma parte experimental foi executada, e do laboratório da pesquisadora Graziella Rosein (IQ-USP) onde parte do desenho experimental foi planejado e executado. Os dados gerados foram depositados no repositório Panorama (SHARMA *et al.*, 2018), que é servidor de código aberto disponível gratuitamente para ensaios de espectrometria de massa que se integra ao Skyline. Os dados gerados estão disponíveis para auditoria e conferência (entrar em contato por luzjpaulo@gmail.com).

3.8.1 Aquisição Dependente de Dados

Dois experimentos foram realizados para criar a biblioteca de peptídeos de histona de cana-de-açúcar.

Experimento 1

O equipamento NanoAcquity (Waters Corp, Milford, MA, USA) foi utilizado para a separação de peptídeos com um método linear onde foi utilizado gradiente do solvente A (0.1% ácido fórmico) e do solvente B (acetonitrila 0.1% ácido fórmico) (Tabela 3). Todas as 20 réplicas biológicas foram analisadas. Cada amostra foi carregada em uma coluna *nanoAcquity UPLC® 2G-V/MTrap 5µm Symmetry® C18* 180 µm x 20 mm (Waters Corp, Milford, MA, USA) por 3 min em um fluxo de 7 µL/min. Após esse período, os peptídeos foram eluídos em uma coluna *C18 nanoAcquity UPLC® 1.7 µm BEH130* 100 µm x 100 mm (Waters Corp, Milford, MA, USA) com o fluxo de 0.4 µl min⁻¹. A aquisição dos dados foi realizada usando um espectrômetro de massa MAXIS 3G (Bruker, Billerica, MA, USA) com a fonte de íons CaptiveSpray (Bruker, Billerica, MA, USA) com um fluxo de gás de 3 l min⁻¹ a 150 °C e 2000 V. A varredura completa

MS1 foi seguida por varreduras MS2 dependentes de dados. A resolução foi 60000. O intervalo de 20 m/z a 2200 m/z foi monitorado. Cada varredura completa foi seguida por uma aquisição MS2 dependente de dados, e o método de colisão foi CID (*collision induced dissociation*).

Tabela 3. Gradiente utilizado para todos os experimentos

Minutos	Porcentagem de B
0	2
1	2
60	30
65	85
70	85
75	2
85	2

Experimento 2

O equipamento Easy-nLC 1200 UHPLC (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) foi utilizado para a separação de peptídeos com um método linear. Foi utilizado gradiente do solvente A (0,1% de ácido fórmico) e do solvente B (0,1% ácido fórmico em acetonitrila a 80%) (Tabela 3). As amostras de cada grupo foram unificadas em pool totalizando 5 pools para as 19 réplicas. Cada amostra foi carregada em uma coluna de captura (nanoViper C18, 3 μm , 75 μm \times 2 cm, (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) com 12 μL de solvente A 980 bar. Após esse período, os peptídeos presos foram eluidos em uma coluna C18 (nanoViper C18, 2 μm , 75 μm \times 15 cm, Thermo Scientific) a uma vazão de 300 nl min^{-1} . A aquisição dos dados foi realizada usando um espectrômetro de massa Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) com a fonte de íons um nanospray Flex NG (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha). A varredura completa MS1 foi seguida por varreduras MS2 dependentes de dados em um intervalo de 3 segundos. A resolução para MS1 foi definido como 120.000 (a 200 m/z) e o ganho automático alvo (AGC) em 4×10^5 . O intervalo 400-1600 m/z foi monitorado. Cada varredura completa foi seguida por uma aquisição MS2 dependente de dados com uma resolução de 30.000

(a 200 m/z), janela de isolamento de 1,2 m/z, e o método de colisão foi HCD (*Higher Energy Collisional Dissociation*).

3.8.2 Aquisição Independente de Dados

Análises pela DIA foram realizadas usando o espectrômetro de massa um Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) equipado com uma fonte de íons nanospray Flex NG (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha). A resolução foi fixada em 15.000 (a 200 m/z). O método de colisão foi HCD e a janela de isolamento de 15 m/z onde foi analisado a região de 395,5 m/z a 1235,5 m/z. Foi utilizado o mesmo gradiente já mencionado assim como os mesmos parâmetros de corrida do experimento 2.

3.9 Análise de dados

Os dados crus obtidos das corridas de Nano LC-MS pelo método DDA foram analisados nos programas de busca MaxQuant (COX; MANN, 2008) utilizando como banco de dados os arquivos FASTA das sequências das histonas de cana de açúcar montadas pelo pesquisador Armando Casas (MORAES *et al.*, 2015) que possui as histonas H3, H4, H2A e H2B (54 sequências no total). Os parâmetros das buscas foram ajustados para: ± 10 ppm de tolerância para erro de massa do íon precursor, ± 0.4 Da de erro de massa para o íon fragmento; tripsina como enzima de digestão e 3 miscleavages de tolerância; a modificação determinada como modificação fixa foi propionilação N-terminal (propionyl [Peptide N-term] /+56,026). As modificações determinadas com variáveis foram as seguintes: Propionil[K]/+56.026, Acetil [K]/+42,011, Monometil + Propionil[K]/+70,042, metil [R]/+14,015, Dimetil [K/R] /+28,031 Trimetil [K]/+42,047 (me3). O FDR (false Discovery rate) foi definido como 1%.

3.9.1 Label Free Quantification

Para quantificar as histonas foi utilizado a quantificação sem marcação (LFQ) disponível na plataforma MaxQuant (COX *et al.*, 2014; COX; MANN, 2008). Esse método aproxima a abundância de proteínas com maior relação sinal/ruído (S/N) e precisão quantitativa para sinais de baixa intensidade usando correntes iônicas extraída (XICs) de MS1, que podem ser adquiridos em um ciclo de serviço mais alto e em uma faixa m/z mais ampla do que eventos MS / MS discretos (por exemplo, durante a contagem espectral). Os dados foram processados a fim de eliminar contaminantes, sequências reversas e proteínas identificadas apenas por peptídeos modificados que não possuem contagem de *scans*.

Os dados obtidos foram plotados como log2 e foi feita o teste T heteroescedástica de distribuição bicaudal somente para os pontos com maior amplitude. A diferença de quantidade entre os pontos de maior amplitude fora expressada levando em consideração o número absoluto. Além disso foi feita uma comparação geral entre o dia e a noite tomando os grupos referentes ao ZT4 e ZT7 como dia, e ZT17 e ZT22 como noite.

3.9.2 Análise por contagem de *scans*

A contagem de *scans* foi também explorada para mostrar os principais peptídeos identificados. Os dados de busca gerados pelo Maxquant foram analisados no Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA), para isso, o arquivo contendo os *scans* anotados (msms.txt) foi filtrado com os seguintes parâmetros: Delta score > 40, PEP < 0,025, Localization prob > 0,99. Assim como para a quantificação LFQ, os possíveis contaminantes foram excluídos. Posteriormente, o número de *scans* para cada peptídeo foi contado e plotado em um gráfico. Aqui, a definição de *scans* deve ser entendida como o número de eventos de MS/MS que foram anotados para um dado peptídeo. Além disso, o número de sítios modificados também foi contado. O número de sítios modificados foi definido como a contagem de PTMs intra peptídeo para cada *scan*.

3.9.3 Quantificação de peptídeos

A partir dos dados obtidos pela busca no MaxQuant, foi criada uma biblioteca de peptídeos de cana-de-açúcar no programa Skyline com o intervalo de confiança de 95%. Foram utilizados peptídeos que não eram alvos como normalizadores entre as diferentes corridas

cromatográficas. Subsequentemente, os picos dos peptídeos analisado pelo método DIA foram integrados e inspecionados manualmente para garantir a detecção e integração corretas dos dados. O sinal absoluto de um peptídeo foi calculado somando a área extraída de todos os íons de fragmentos (i.e., transições) únicos para cada peptídeo. A abundância relativa do peptídeo foi calculada considerando todos os peptídeos que compartilham a mesma sequência de aminoácidos (aa) como 100%. A análise estatística foi realizada usando o teste t heteroscedástica de distribuição bicaudal para os pontos com maior amplitude, e as diferenças foram consideradas significativas para valores de p calculados $< 5\%$. Essa metodologia foi anteriormente descrita na literatura (KREY *et al.*, 2018; SIDOLI *et al.*, 2015). A diferença entre os pontos com maior amplitude foi apresentada em porcentagem levando sempre em consideração a redução de abundância relativa do maior ponto comparado com o menor, além disso foi apresentando o intervalo de variação (range).

A variação experimental também foi levada em consideração, para isso, 4 alíquotas idênticas foram adicionadas entres as corridas de LC-MS e posteriormente cada peptídeo foi quantificado e então o coeficiente de variação (em porcentagem) obtidos foram apresentados na forma de \pm (valor) %. Essas alíquotas foram um pool das amostras analisadas a fim de que as alíquotas idênticas representassem a complexidade das amostras estudadas.

4 Resultados

4.1 Genes associados à remodelagem de cromatina em cana-de-açúcar

Para melhor entender os genes envolvidos com a remodelagem de cromatina em cana-de-açúcar, nós realizamos uma série de BLAST recíprocos para encontrar ortólogos putativos dos 559 genes de *Arabidopsis thaliana* presentes no banco de dados ChromeDB (<http://www.chromdb.org/>) (GENDLER; PAULSEN; NAPOLI, 2008), que enumera genes associados à remodelagem de cromatina, dentro do banco de dados de EST de cana-de-açúcar (SUCEST) (<http://sucest-fun.org>). Foram encontrados 485 SAS correspondentes a ortólogos putativos de genes relacionados à remodelagem de cromatina em *A. thaliana*. Foi observado que o terceiro grupo mais presente no nosso banco de dados foi composto por genes anotados como metil transferases o que correspondeu a 9.89% do total (Figura 3).

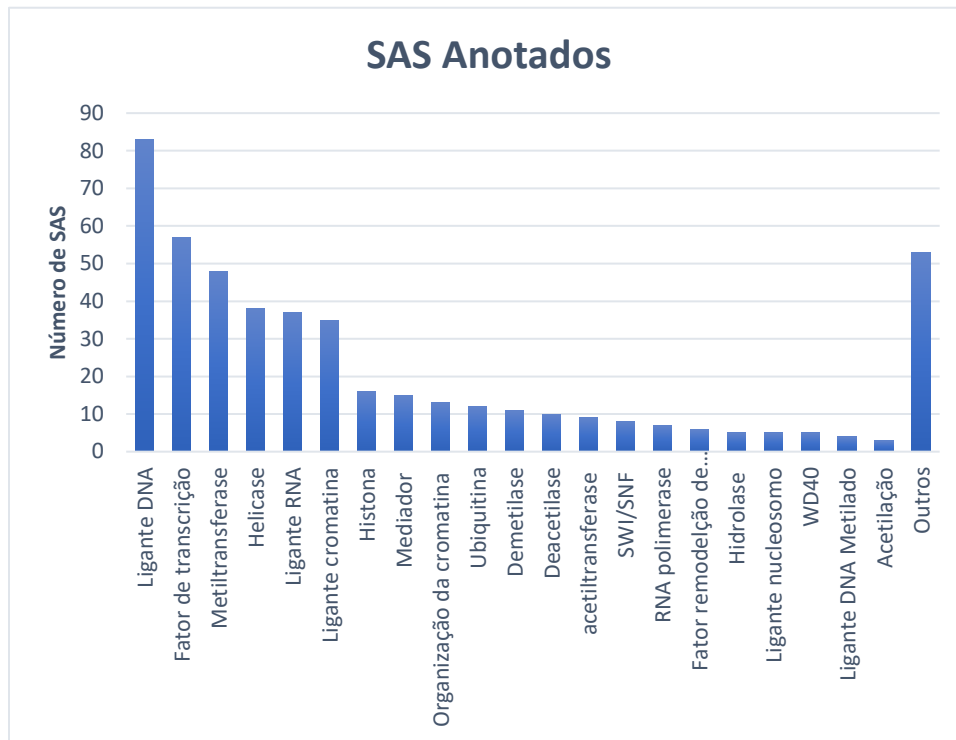


Figura 3. Números de SAS putativos associado a cromatina em cana-de-açúcar. O número de SAS é apresentado no eixo Y, as barras azuis possuem legenda com a anotação funcional dos genes baseados em homologia.

Então, utilizamos dados de transcrição de cana-de-açúcar já disponíveis no banco de dados SUCEST-FUN (NISHIYAMA JUNIOR *et al.*, 2013) para avaliar o perfil de transcrição dos 485 ortólogos putativos identificados em nossa análise de homologia. 188 SAS foram identificados como expressos em folha, 215 em entrenó 5 e 239 em entrenó 1. Quando observamos o perfil de expressão desses genes, verificamos que 111 SAS apresentam perfil rítmico em condições diurnas (59%) em folha. Em entrenó 5, 155 (72%) apresentam expressão rítmica diurna (Dantas *et al.* 2020). 52 SAS (28%) apresentam perfil rítmico em condições circadianas em folha (Hotta *et al.*, 2013).

Uma vez que encontramos o padrão global para a expressão dos genes disponíveis no nosso banco de dados, direcionamos atenção para os genes anotados como enzimas capazes de adicionar ou remover PTMs. Uma grande porcentagem dos transcritos anotados como enzimas

modificadoras de histonas apresenta enriquecimento rítmicos diurno, embora elas não apresentem o mesmo nível de transcritos rítmicos quando as plantas estão em condições circadianas (luz contínua) (Tabela 4).

Tabela 4. Percentual de modificadores de histona rítmicos em cana-de-açúcar.

Modificador de histona	SAS expressos em folha	SAS rítmicos diurno	SAS rítmicos circadiano
<i>Histone-lysine N-methyltransferase</i>	19	52,6%	26,0%
<i>Histone demethylase</i>	5	100,0%	0,0%
<i>JMJC domain protein</i>	3	66,7%	0,0%
<i>Histone acetyltransferase</i>	5	80,0%	20,0%
<i>Histone deacetylase</i>	7	57,0%	28,6%
Total de transcritos rítmicos em folha*		60,0%	32,0%

4.2 Ritmos de transcrição em folhas e entrenós de cana-de-açúcar

Como o primeiro passo, verificamos se as folhas +1 e o entrenó 5 e 6 de cana-de-açúcar comercial apresentavam ritmos biológicos. Para isso, foram medidos o nível de transcrição dos genes do oscilador central *ScLHY* e *ScTOC1* através de reações de RT-qPCR.

O maior nível de transcrição acumulada para *ScLHY* foi observado no ZT4. O pico para *ScTOC1* foi no ZT12 para ambos os órgãos (Figura 4). O menor nível de transcritos de *ScTOC1* se deu às 4 h após amanhecer para folha +1 (Figura 4). Por sua vez, o entrenó 5-6 apresentou o menor valor entre ZT22 e ZT4.

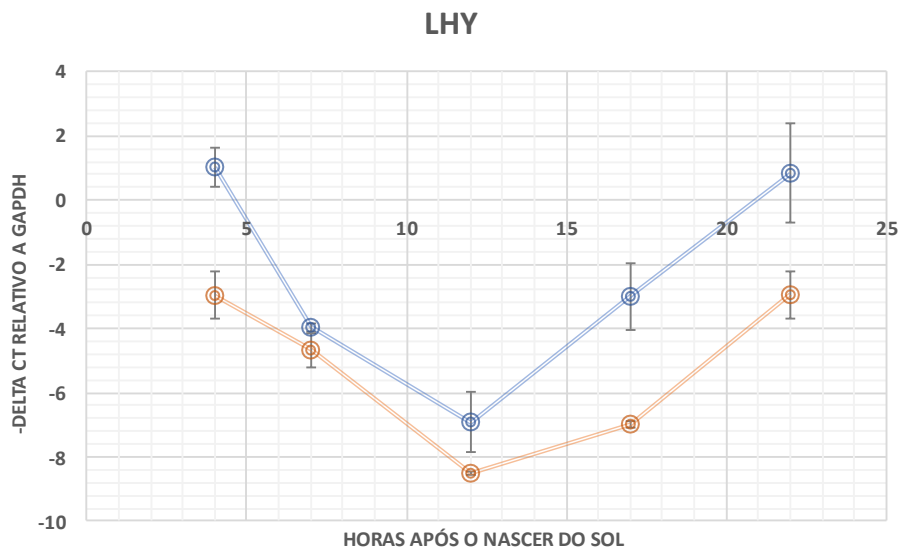
Diante desses dados, verificamos que a amplitude, que é a diferença entre o maior e o menor nível de expressão relativa a *ScGAPDH* para um dado gene, para os genes analisados foi consideravelmente menor em entrenó 5-6 do que em folha +1 (Tabela 5). Além disso, amplitude do nível de transcrição de *ScLHY* foi maior do que *ScTOC1*.

Tabela 5. Amplitude do acúmulo de transcritos para os genes do oscilador central do relógio biológico TOC1 e LHY.

Gene/Amplitude (x)	Folha+1	Entrenó 5-6
<i>ScLHY</i>	404.5 ± 197	112.2 ± 39
<i>ScTOC1</i>	41.6 ± 24	9.5 ± 4

O resultado do perfil do acúmulo dos transcritos para *ScLHY* e *ScTOC1* (Figura 4) concordam com o padrão já descrito para cana-de-açúcar (Hotta et al., 2013, Dantas et al. 2020). Esse resultado indica que o relógio biológico do nosso objeto de estudo estava funcional para os órgãos analisados.

A)



B)

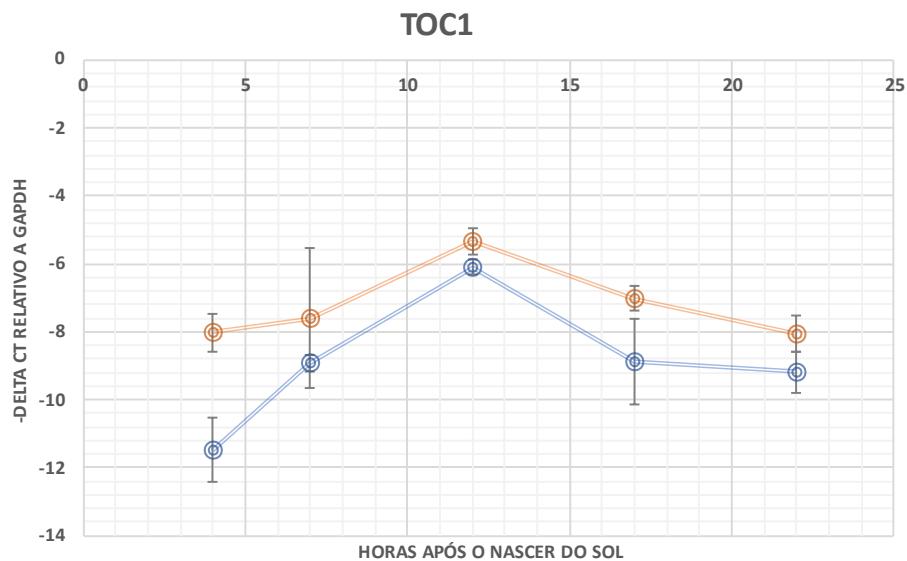


Figura 4. Nível de transcrição dos genes centrais do relógio biológico. Expressão relativa a *ScGAPDH* para o gene (A) *ScLHY* e (B) *ScTOC1* nos órgãos folha +1 (linha azul) e entrenó 5-6 (linha vermelha).

Após a análise dos genes do oscilador de cana-de-açúcar, foram escolhidos 5 genes envolvidos na estrutura e regulação da cromatina que foram estudados via PCR quantitativa (Tabela 6).

Tabela 6. Alinhamento entre os SAS alvos e seus homólogos em *Sorghum bicolor* (L.) Moench e *Zea mays* L. A coluna “Anotação” traz o nome do gene, a coluna “SAS” mostra o SAS correspondente, a coluna “Organismo” mostra os organismos usados para realizar BLAST, a coluna “Score total” demonstra o score do alinhamento enquanto a coluna “Cobertura” demonstra a cobertura do alinhamento (query cover), a coluna “identidade” apresenta a identidade entre as sequências. A coluna “Accession” traz o código referente as sequências de *Sorghum bicolor* e *Zea mays* depositadas no banco de dados NCBI.

Anotação	SAS	Organismo	Score total	Cobertura %	Identidade %	Accession
MSI1	SCJLLR1011H01.G	<i>Sorghum bicolor</i>	2580	100	95	XM_002464137.2
MSI1	SCJLLR1011H01.G	<i>Zea mays</i>	2497	98	95	NM_001112086.2
H3K9SUVH4	SCRLFL1010H02.G	<i>Sorghum bicolor</i>	1441	96	95	XM_021457963.1
H3K9SUVH4	SCRLFL1010H02.G	<i>Zea mays</i>	1441	96	95	XM_002456840.2
SWI/NSF	SCSFRT2068G06.G	<i>Sorghum bicolor</i>	987	100	96	XM_021463299.1
SWI/NSF	SCSFRT2068G06.G	<i>Zea mays</i>	904	100	94	BT067081.1
HDA6	SCEPAM102ZT412.G	<i>Sorghum bicolor</i>	2750	97	95	XM_002444204.2
HDA6	SCEPAM102ZT412.G	<i>Zea mays</i>	2444	89	94	BT042883.1
H2A.W.1	SCCCLR2001C09.G	<i>Sorghum bicolor</i>	1005	92	90	XM_002439115.2
H2A.W.1	SCCCLR2001C09.G	<i>Zea mays</i>	813	90	86	XM_008650410.2

O primeiro alvo escolhido foi o gene *MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA 1* (MSI1) (SCJLLR1011H01.g) que é membro da família de proteínas WD40. MSI1 faz parte de subunidades de muitos complexos proteicos que desempenham importante papel na regulação da cromatina, e pode ter função diretamente relacionada a manter a memória epigenética ao longo do desenvolvimento (HENNIG; BOUVERET; GRUISSEM, 2005) além de possuir papel na manutenção e modulação da cromatina em *Arabidopsis thaliana* (KÖHLER *et al.*, 2003).

Foi observado que o nível de transcrito para o ortólogo putativo de MSI1 em cana de açúcar apresentou amplitude consideravelmente maior em folha +1 ($6,09 \pm 1,8$; média \pm desvio padrão, $n = 3$) do que em entrenó 5-6 ($1,74 \pm 0,56$, $n = 3$) (Figura 5). O nível de transcrição de MSI1 foi similar entre os dois tecidos nos pontos temporais ZT4, ZT7, ZT12 e ZT17, apresentando maior diferença apenas em ZT22. Foi observado que o pico de acumulação de transcritos para MSI1 foi ZT17 para entrenó 5-6 e as ZT22 para folha +1.

O segundo alvo foi uma *HISTONA-LISINA N-METILTRANSFERASE H3 LISINA-9 ESPECÍFICO SUVH4* (*H3K9SUVH4*) (SCRLFL1010H02.g). Foi observado que a amplitude para *H3K9SUVH4* possui alta variância entre as réplicas biológicas tanto em folha +1 quanto em entrenó (Figura 6). Para folha +1, é possível inferir um pico de expressão noturna (entre ZT12 e ZT22). O mesmo padrão não é identificado no entrenó 5-6 onde existe uma grande variabilidade entre as réplicas biológicas.

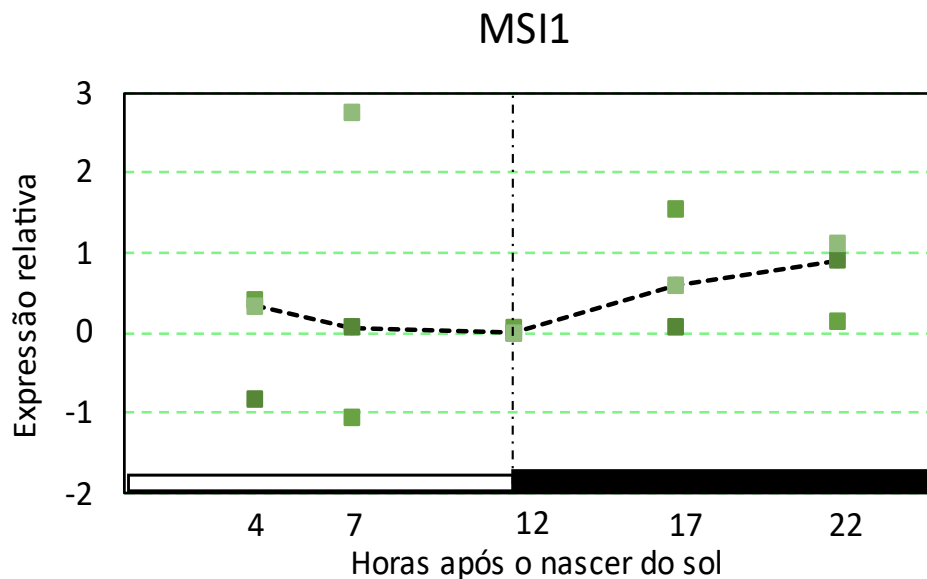
O terceiro alvo foi o *SWITCH/SUCROSE NON-FERMENTABLE* (*SWI/SNF*) (SCSFRT2068G06.g) que possui alta identidade com a subunidade SW13A do complexo de remodelação da cromatina dependente de ATP equivalente a SWI/SNF. O complexo SWI/SNF é necessário para a regulação positiva e negativa da expressão gênica de muitos genes inclusive do relógio biológico em plantas (YU *et al.*, 2016). No experimento de PCR quantitativo é possível observar que a dinâmica do nível de acúmulo de transcritos em folha +1 é similar ao entrenó 5-6 (Figura 7). Mais uma vez é possível observar que a amplitude para *SWI/SNF* é superior em folha +1.

O quarto alvo foi a *HISTONA DEACETILASE 6* (*HDAC6*) (SCEPAM102ZT412.g). Acetilação de histonas é um importante marca epigenética. Os agentes responsáveis pela deacetilação são as enzimas histona deacetilase (HDAC). Entre os vários membros da família de HDAC a HDAC6 se destaca como regulador epigenético crucial em plantas (PIKAARD; SCHEID, 2014). Observamos que em folha houve um acentuado aumento do acúmulo de

transcritos de *HDAC6* durante o período da noite (ZT17 e ZT22) (Figura 8), por outro lado, esse perfil não foi observado em entrenó.

Finalmente, a variante de histona *H2A.W.1* (SCCCLR2001C09) foi analisada. Foi evidenciado que o nível de acúmulo de transcrito para *H2A.W.1* é diferente entre folha e entrenó, onde esse gene apresentou um vale no crepúsculo (ZT12). O nível de transcrição foi 3.8 vezes maior no meio da noite (ZT17) quando comparado início da noite (ZT12) (Figura 9). Para folha houve uma grande variação entre as réplicas e não foi observada uma variação significativa entre os pontos temporais.

A)



B)

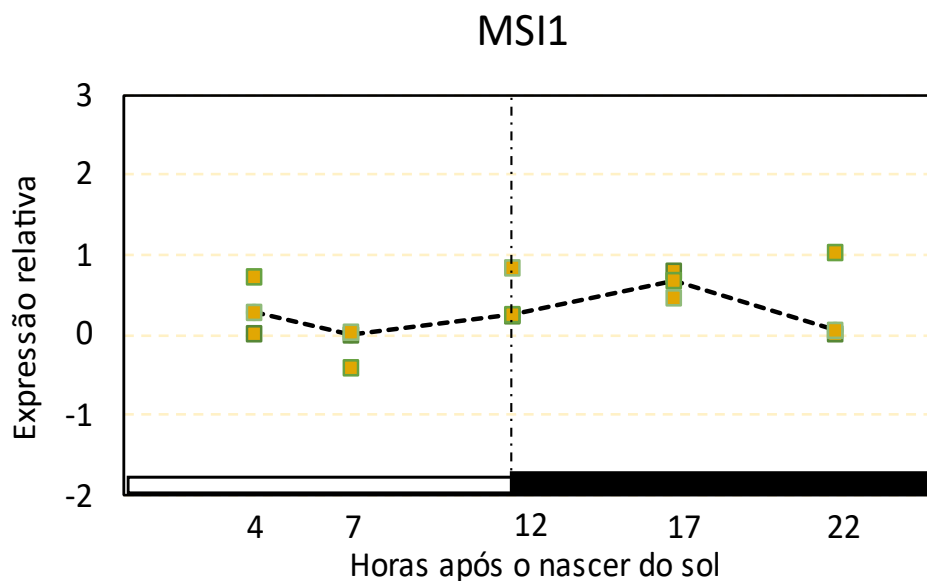
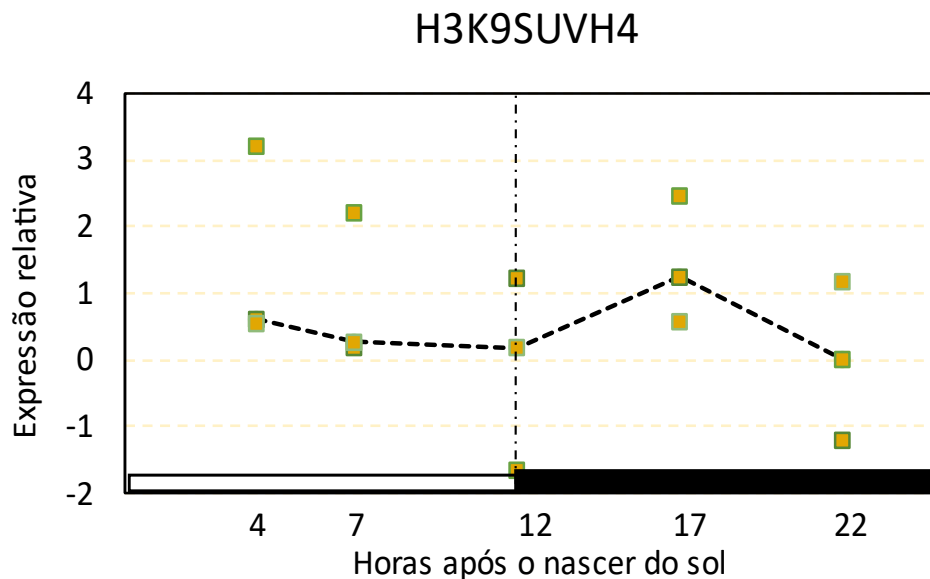


Figura 5. Nível diurno de transcrição para componentes da cromatina. Os gráficos mostram diferenças na expressão de mRNA relativo a *ScGAPDH* para os genes *MSI1* em folha (A) e entrenó (B) para cinco momentos diferentes (com $n = 3$ para cada momento) ao longo de um dia. A linha pontilhada conecta a mediana entre os diferentes pontos temporais. A barra branca na parte inferior indica o período correspondente ao dia e a barra preta indica o período da noite.

A)



B)

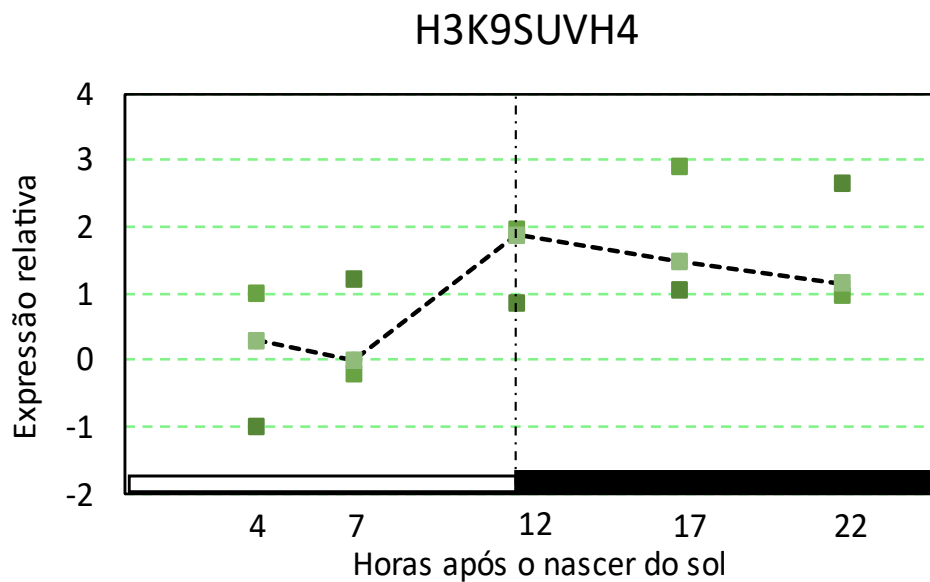


Figura 6. Nível diurno de transcrição para componentes da cromatina. Os gráficos mostram diferenças na expressão de mRNA relativo a *ScGAPDH* para os genes *H3K9SUV4* em folha (A) e entrenó (B) para cinco momentos diferentes (com $n = 3$ para cada momento) ao longo de um dia. A linha pontilhada conecta a mediana entre os diferentes pontos temporais. A barra branca na parte inferior indica o período correspondente ao dia e a barra preta indica o período da noite.

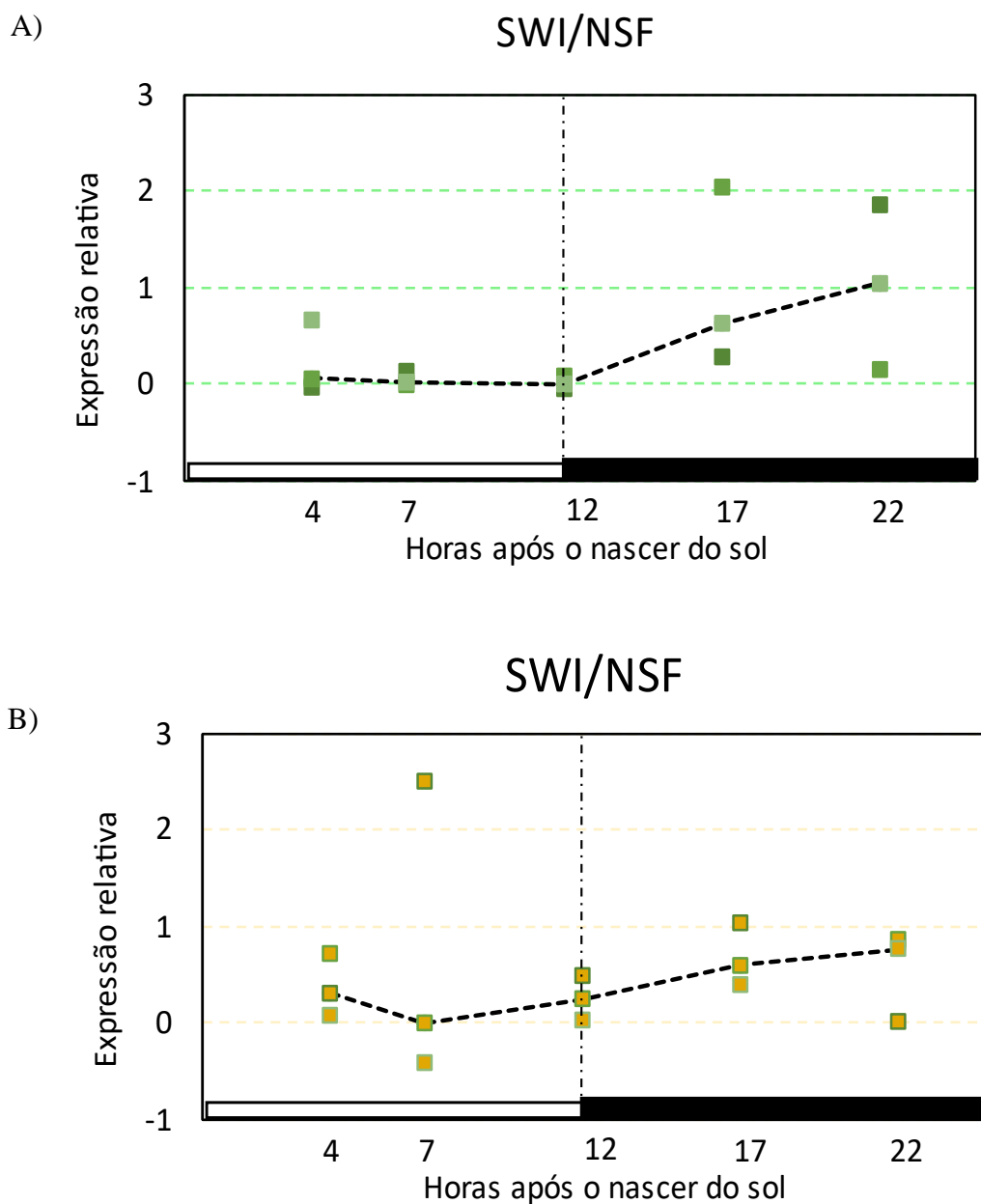


Figura 7. Nível diurno de transcrição para componentes da cromatina. Os gráficos mostram diferenças na expressão de mRNA relativo a *ScGAPDH* para os genes *SWI/NSF* em folha (A) e entrenó (B), para cinco momentos diferentes (com $n = 3$ para cada momento) ao longo de um dia. A linha pontilhada conecta a mediana entre os diferentes pontos temporais. A barra branca na parte inferior indica o período correspondente ao dia e a barra preta indica o período da noite.

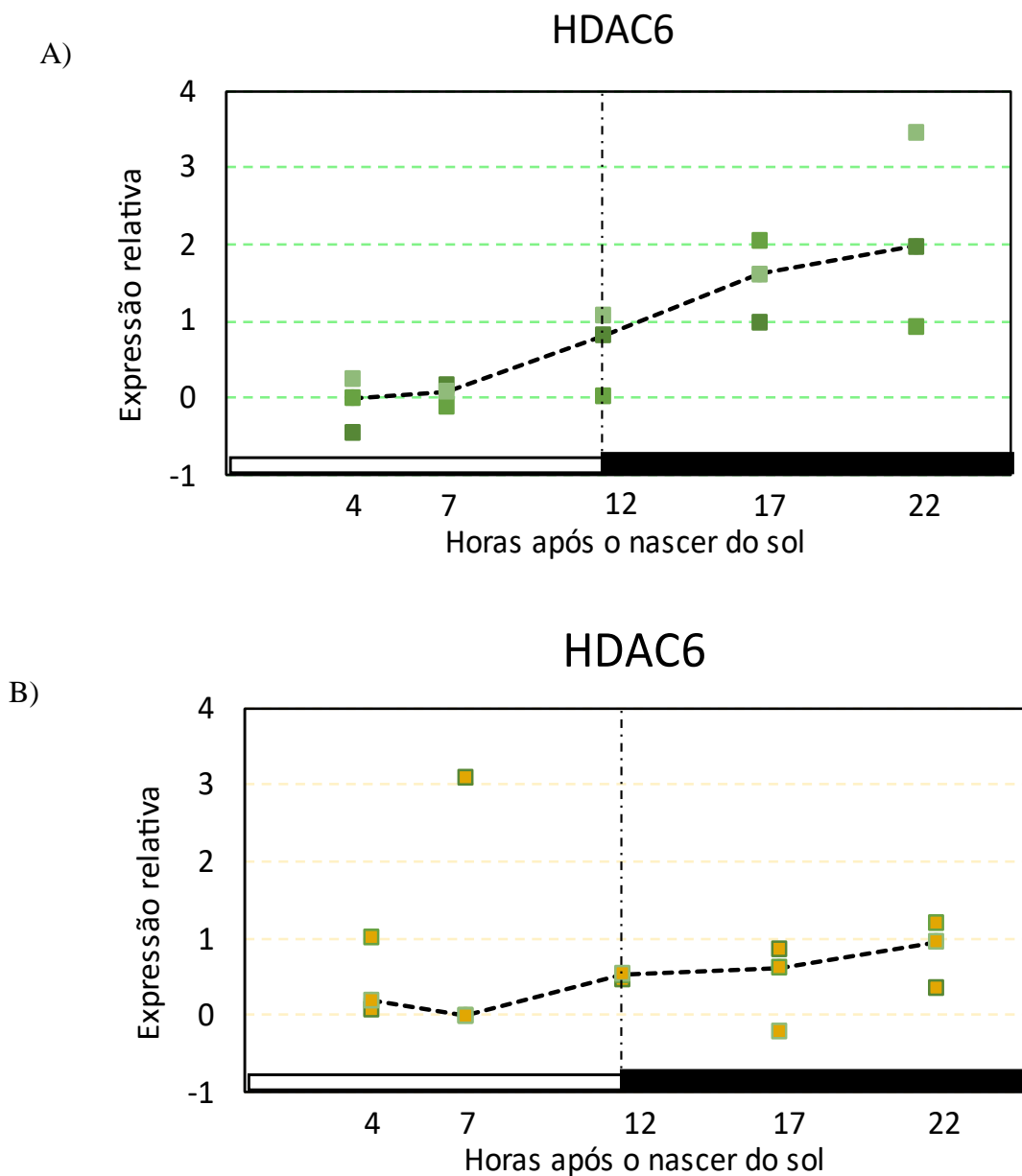


Figura 8. Nível diurno de transcrição para componentes da cromatina. Os gráficos mostram diferenças na expressão de mRNA relativo a *ScGAPDH* para os genes *HDAC6* em folha (A) e entrenó (B) para cinco momentos diferentes (com $n = 3$ para cada momento) ao longo de um dia. A linha pontilhada conecta a mediana entre os diferentes pontos temporais. A barra branca na parte inferior indica o período correspondente ao dia e a barra preta indica o período da noite.

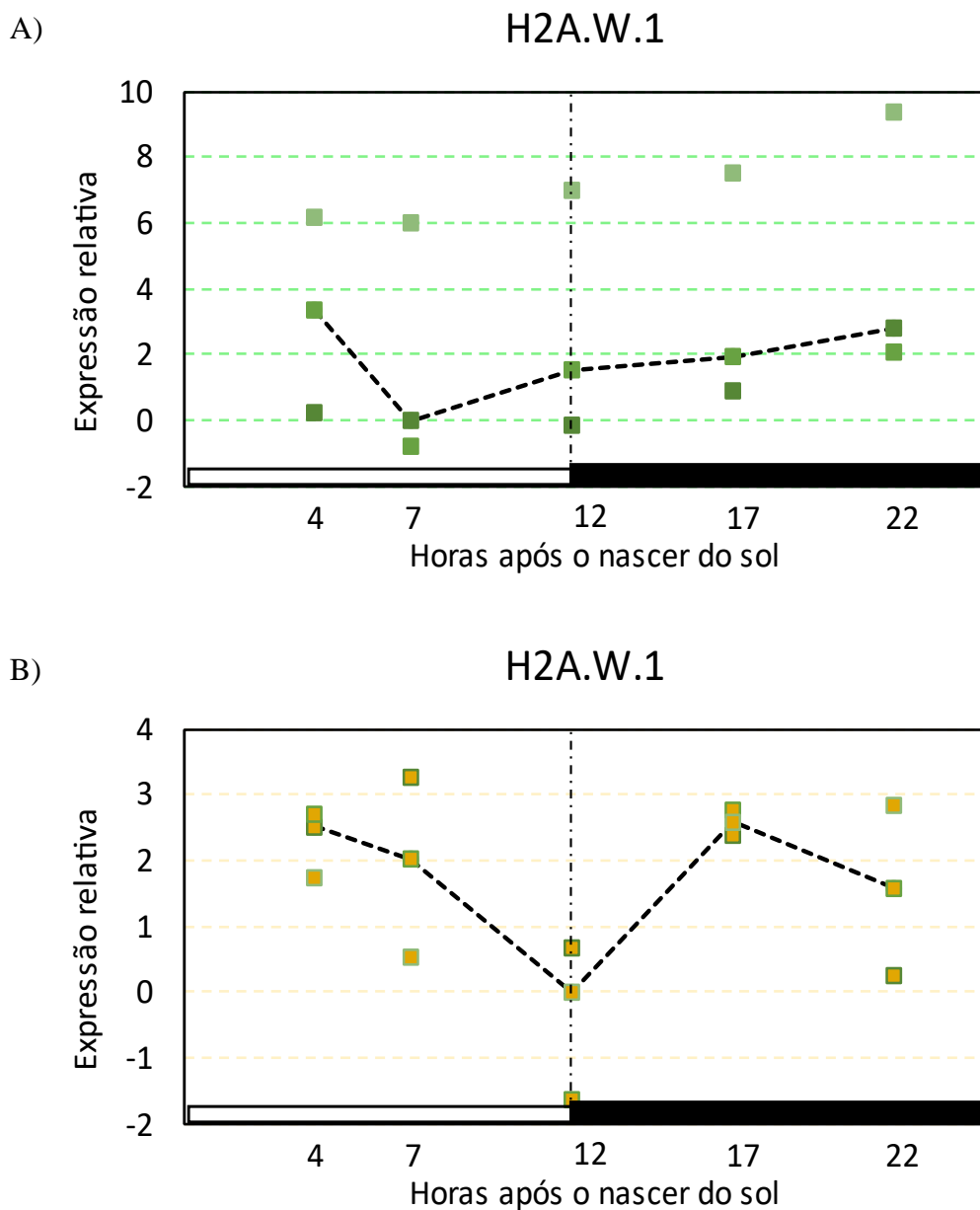


Figura 9. Nível diurno de transcrição para componentes da cromatina. Os gráficos mostram diferenças na expressão de mRNA relativo a *ScGAPDH* para os genes H2A.W.1 em folha (A) e entrenó (B) para cinco momentos diferentes (com $n = 3$ para cada momento) ao longo de um dia. A linha pontilhada conecta a mediana entre os diferentes pontos temporais. A barra branca na parte inferior indica o período correspondente ao dia e a barra preta indica o período da noite.

4.3 Identificação de histonas em entrenós de cana-de-açúcar

Para entender o comportamento da cromatina dentro do núcleo de células do entrenó, e sua dinâmica durante o dia, estudamos as histonas e suas PMTs em entrenós 5 e 6.

A primeira etapa deste estudo consistiu em purificar histonas. O perfil encontrado para o extrato de histonas foi semelhante ao descrito na literatura para plantas e cana-de-açúcar (MORAES *et al.*, 2015). Esse perfil quando comparado com o registrado na literatura e com o extrato total de folha demonstra que o extrato obtido foi enriquecido com histonas (Figura 10).

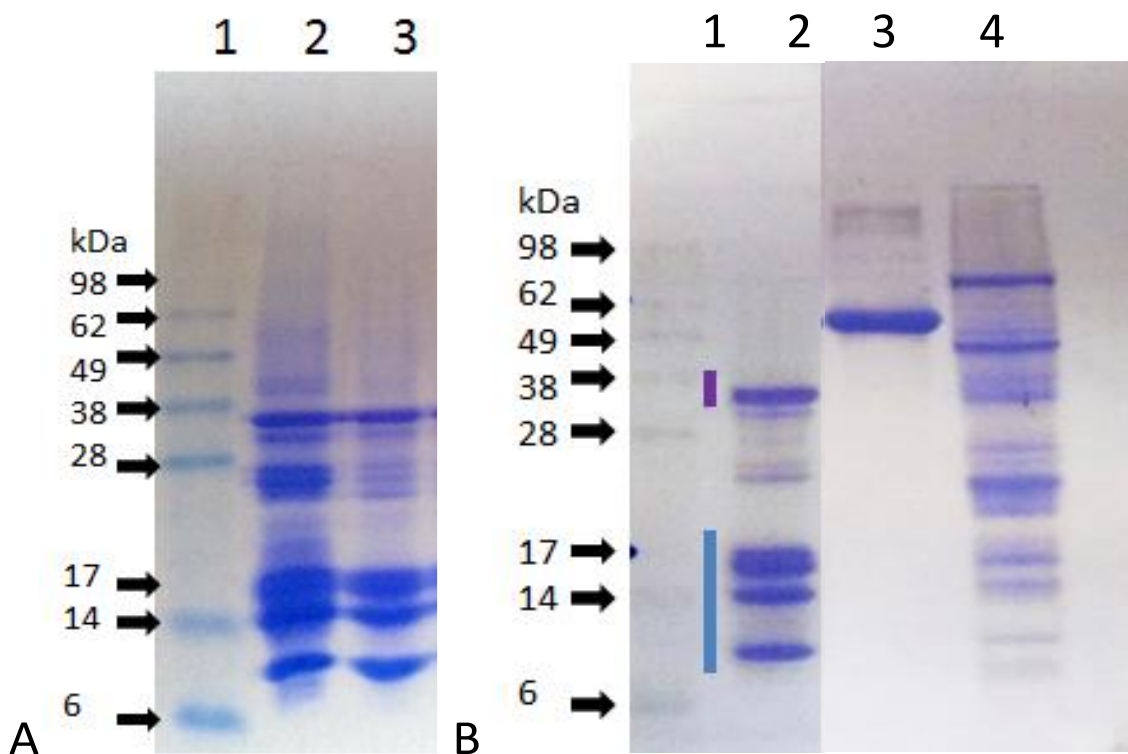


Figura 10. Extrato derivado de cana-de-açúcar enriquecido com histonas. (A) Perfil eletroforético (SDS-PAGE) para histonas de folha (2) e entrenó (3). (B) Perfil eletroforético (SDS-PAGE) para extrato enriquecido em histonas derivadas de cana de açúcar (2) e não enriquecido (4) e para o padrão BSA (3) a banda associada a H1 é apontado pela barra roxa enquanto a barra azul aponta as bandas associadas as histonas H3, H2B, H2A e H4 em ordem decrescente de peso molecular.

Após o processo de enriquecimento de histonas, prosseguimos com os experimentos de espectrometria de massas. Todas as histonas identificadas foram indexadas na tabela 7. H2A é a família de histonas que possui mais variantes. De fato, identificamos 11 grupos de variantes da histona H2A. Para H2B, identificamos 6 grupos de variantes. H3 identificamos 4 grupos de variantes e, finalmente, para H4 identificamos apenas 1. H4 é a histona mais conservada entre os eucariotos, variantes dessas histonas não são comuns (DELANGÉ *et al.*, 1969; WELLS; BROWN, 1991).

A Tabela 7 também possui dados de cobertura que mostra que nosso método conseguiu identificar uma porção expressiva das histonas estudadas. Embora nosso trabalho contou com 19 réplicas biológicas, a quantificação das histonas pelo método LFQ só apresentou valores quantitativos em parte das réplicas. Assim, foi possível quantificar apenas parte das variantes identificadas de maneira diurna. No entanto, trouxemos dados de LFQ média e contagem de MS/MS para cada histona avaliada. Esses dados trazem um panorama da abundância de cada histona. Dessa forma, podemos ter uma importante noção da quantidade de cada variante de histona, o que é inédito para cana-de-açúcar.

As histonas que apresentaram pelo menos 3 réplicas biológicas em cada ponto temporal foram demonstradas aqui em gráficos que permitem visualizar o perfil diurno.

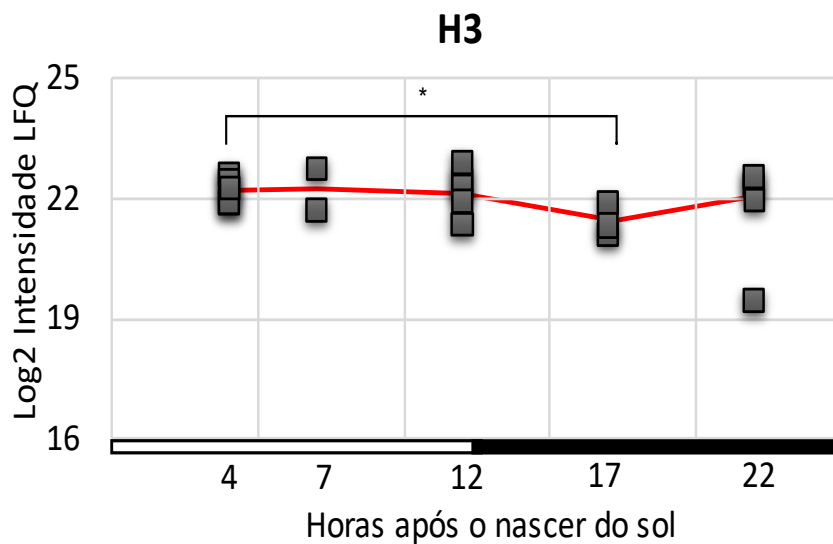
Observamos que os níveis de H3 estão menores no meio da noite (ZT17) que possui pequena diferença no início da manhã (ZT4), onde a quantidade de H3 é 1,81 (máx. 2,8/min 0,9) vezes maior do que o meio da noite (ZT17) (p valor =0,041) (Figura 11). Em relação aos outros pontos temporais, não houve variação significativa. Dessa forma, o perfil de acumulação de H3 parece envolver uma redução do nível de H3 no meio da noite e um posterior restabelecimento dos níveis de H3 para o resto do dia.

Por outro lado, H4 não apresentou diferença significativa entre os pontos ao longo do dia, embora uma pequena flutuação dos valores exista (Figura 11).

Tabela 7. Anotação das histonas identificadas para o entrenó 3-5. A sigla SAS se refere ao gene depositado na base de dados SUCEST. “Variante” se refere a anotação para cada tipo de histona identificada, Cobertura [%] demonstra em porcentagem qual extensão da proteína foi identificada neste estudo, “AA” demonstra o a extensão de aminoácidos para cada histona, “LFQ log2” demonstra a média da quantidade de proteína, “SD” mostra o desvio padrão enquanto “N” apresenta o número de réplicas biológicas para os dados de quantidade de proteína, a última coluna apresenta o número de MS/MS identificados.

	Variante	SAS ID	Cobertura [%]	AA	LFQ log2	SD	N	MS/MS count
H2A	H2A.W.1	SCCCLR2001C09	78.8	156	21.9	1.2	19	347
	CANON	SCVPLR2019A02	68.1	135	20.7	0.6	16	224
	H2A.W.2	SCCCRZ2002H03	72.3	155	19.5	0.6	18	211
	H2A.X.1	SCCCLR1068C05	52.2	136	18.9	0.8	6	47
	H2A.Z.1	SCEPLR1008D05	54.0	137	18.2	0.7	14	143
	H2A.W.3	SCCCLB1024F05	75.0	156	17.9	0.3	11	62
	H2A.W.4	SCCCLR1001C03	75.2	157	16.5	0.3	8	40
	H2A.Z.2	SCCCCL4007C09	48.6	138	16.1	-	1	14
	H2A.W.5	SCAGLR1021A12	74.8	155	16.0	-	1	6
	CANON	SCJLLR2013B11	35.1	134	13.7	-	1	6
	H2A.X.2	SCCCLR1001G05	52.2	136	13.3	-	1	1
	H2A.W.6	SCCCRZ2C03C04	68.2	157	-	-	0	0
H2B	H2B.1	SCCCLR1048C02	72.4	152	21.9	0.4	19	722
	H2B.2	SCEZLB1014E02	72.3	148	18.4	0.4	19	189
	H2B.3	SCQGLR1041C10	71.8	149	16.7	0.4	8	29
	H2B.4	SCCCLR2002G11	70.1	137	16.6	-	1	11
	H2B.5	SCSFFL3090D03	76.8	151	16.6	0.5	12	69
	H2B.6	SCCCRZ1001H04	77.3	154	16.6	0.3	9	50
	H2B.7	SCBGLR1002E03	72.4	152	15.8	-	1	6
	H2B.8	SCCCLR1024A09	71.1	152	15.2	-	1	16
	H2B.9	SCEPLB1042A02	74.8	151	13.7	-	1	1
H3	H3.1	SCEQLB1066C12	70.4	135	22.0	0.8	19	72
	H3.3	SCEQLR1094C02	70.4	135	20.5	0.4	4	1
	H3L.1	SCSGST1068D04	12.8	148	16.7	-	1	0
	H3L.2	SCMCRT2102E07	6.5	324	13.4	-	1	18
	H3cen	SCCCLR2004A05	29.5	156	-	-	0	406
H4	-	SCCCRZ2001G01	92.2	103	21.1	0.6	18	233

A)



B)

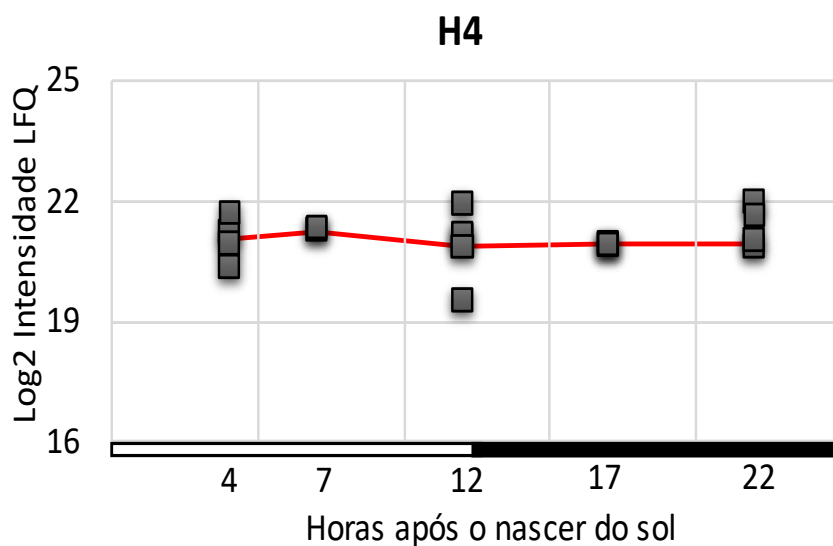


Figura 11. Variação diurna do nível de histonas H3 e H4 em entrenó de cana-de-açúcar. Histonas H3 (A) e H4 (B) de entrenós 5 e 6 de cana-de-açúcar (SP80 3280) foram quantificadas pelo método LQF. A quantidade de proteína detectada está representada pelo \log_2 da intensidade LQF. Os valores observados em cada réplica biológica (retângulos cinzas) estão conectados pela média das réplicas (linha vermelha). O período do dia (retângulo branco) e da noite (retângulo preto) estão representados ao lado do eixo X. A análise estatística foi realizada usando o teste t heteroescedástica de distribuição bicaudal para os pontos com maior amplitude, e as diferenças foram consideradas significativas para valores de p calculados $< 5\%$ destacados pelo símbolo “*”.

Para H2A não observamos diferenças para as variantes H2A.W1, H2A.W2 e H2A canônica (Figura 12 e 13). É interessante notar que o perfil de expressão de H2A.W1 parece não variar apesar do aparente ritmo transcricional para essa variante em entrenó 5 e 6 (Figura 9). No entanto, H2A.Z.1 apresentou uma tendência de aumento significativo (p -valor = 0,016) entre o período correspondente ao dia (ZT4 e ZT7) quando comparado à noite (ZT17 e ZT22) constituindo-se como a única histona identificada em cana-de-açúcar com esse perfil (Figura 13).

Em H2B, observamos uma redução 1,46x na quantidade de H2B.1 quando comparado o meio do dia (ZT7) com o fim do dia (ZT12) (p valor = 0.016) (Figura 14). Já H2B.2 apresentou uma variação não significativa (Figura 14).

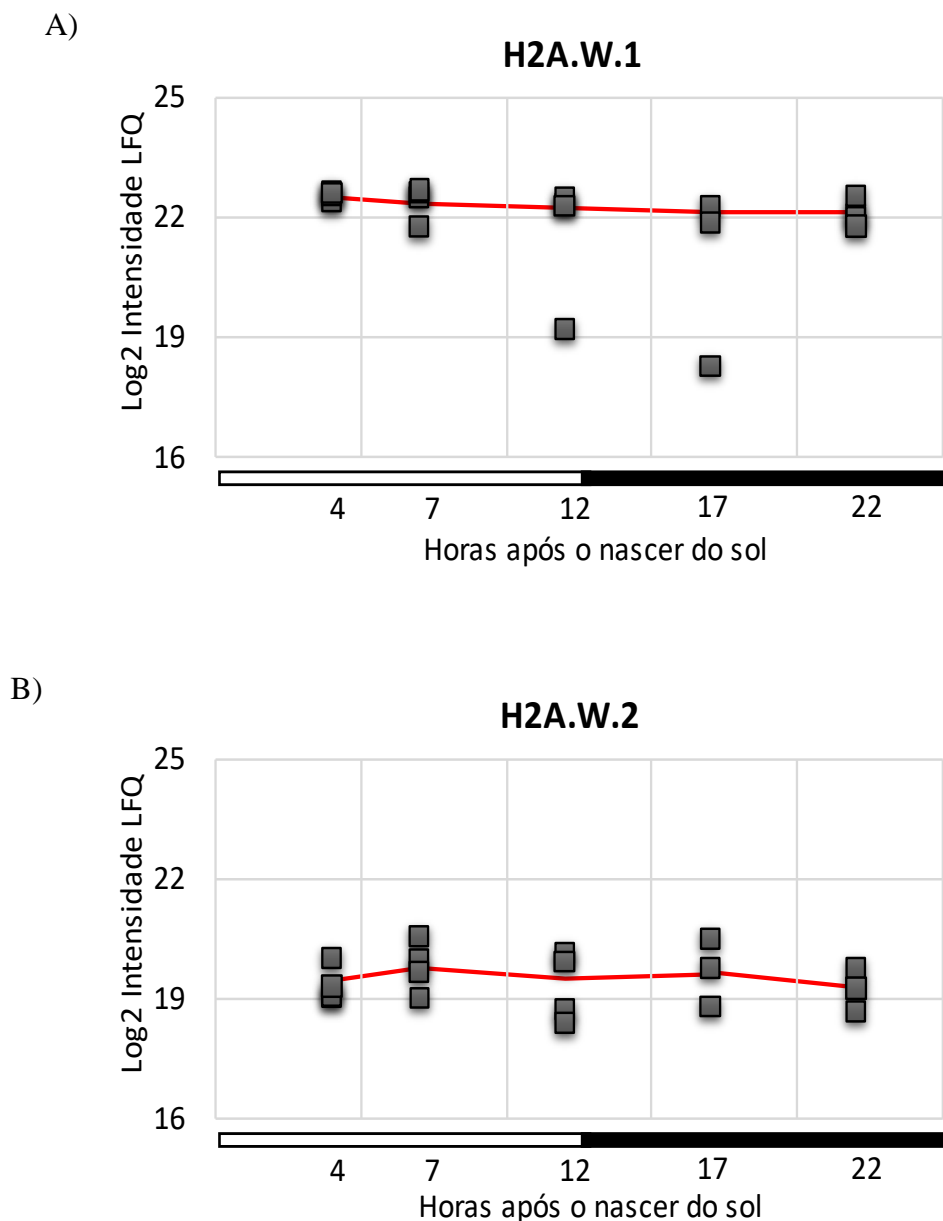


Figura 12. Variação diurna do nível de histonas H2A em entrenó de cana-de-açúcar. Histonas H2A de entrenós 5 e 6 de cana-de-açúcar (SP80 3280) foram quantificadas pelo método LFQ. H2A.W.1(A) e H2A.W.2 (B) não apresentaram variação significativa ao longo do dia. A quantidade de proteína detectada está representada pelo log₂ da intensidade LQF. Os valores observados em cada réplica biológica (retângulos cinzas) estão conectados pela média das réplicas (linha vermelha). Os horários de dia (retângulo branco) e de noite (retângulo preto) estão representados. A análise estatística foi realizada usando o teste t heteroscedástica de distribuição bicaudal para os pontos com maior amplitude, e as diferenças foram consideradas significativas para valores de p calculados < 5% destacados pelo símbolo “*”.

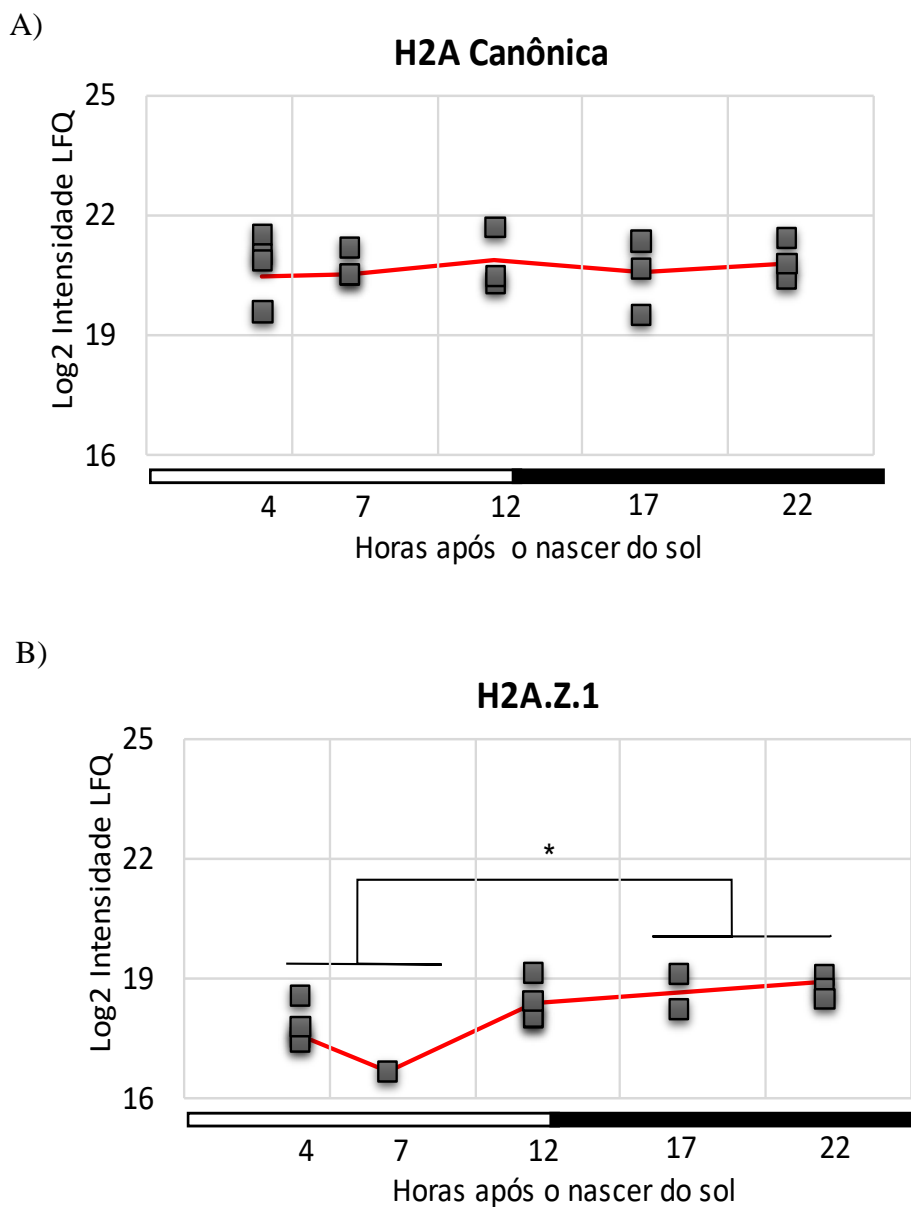


Figura 13. Variação diurna do nível de histonas H2A em entrenó de cana-de-açúcar. Histonas H2A de entrenós 5 e 6 de cana-de-açúcar (SP80 3280) foram quantificadas pelo método LFQ. H2A canônica não apresentou variação significativa ao longo do dia. (B) H2A.Z.1 apresentou uma tendência de aumento significativo (p -valor 0,016) entre o dia (ZT4 + ZT7 x ZT17 + ZT22). A quantidade de proteína detectada está representada pelo log2 da intensidade LQF. Os valores observados em cada réplica biológica (retângulos cinza) estão conectados pela média das réplicas (linha vermelha). Os horários de dia (retângulo branco) e de noite (retângulo preto) estão representados. A análise estatística foi realizada usando o teste t heteroescedástica de distribuição bicaudal para os pontos com maior amplitude, e as diferenças foram consideradas significativas para valores de p calculados $< 5\%$ destacados pelo símbolo “*”.

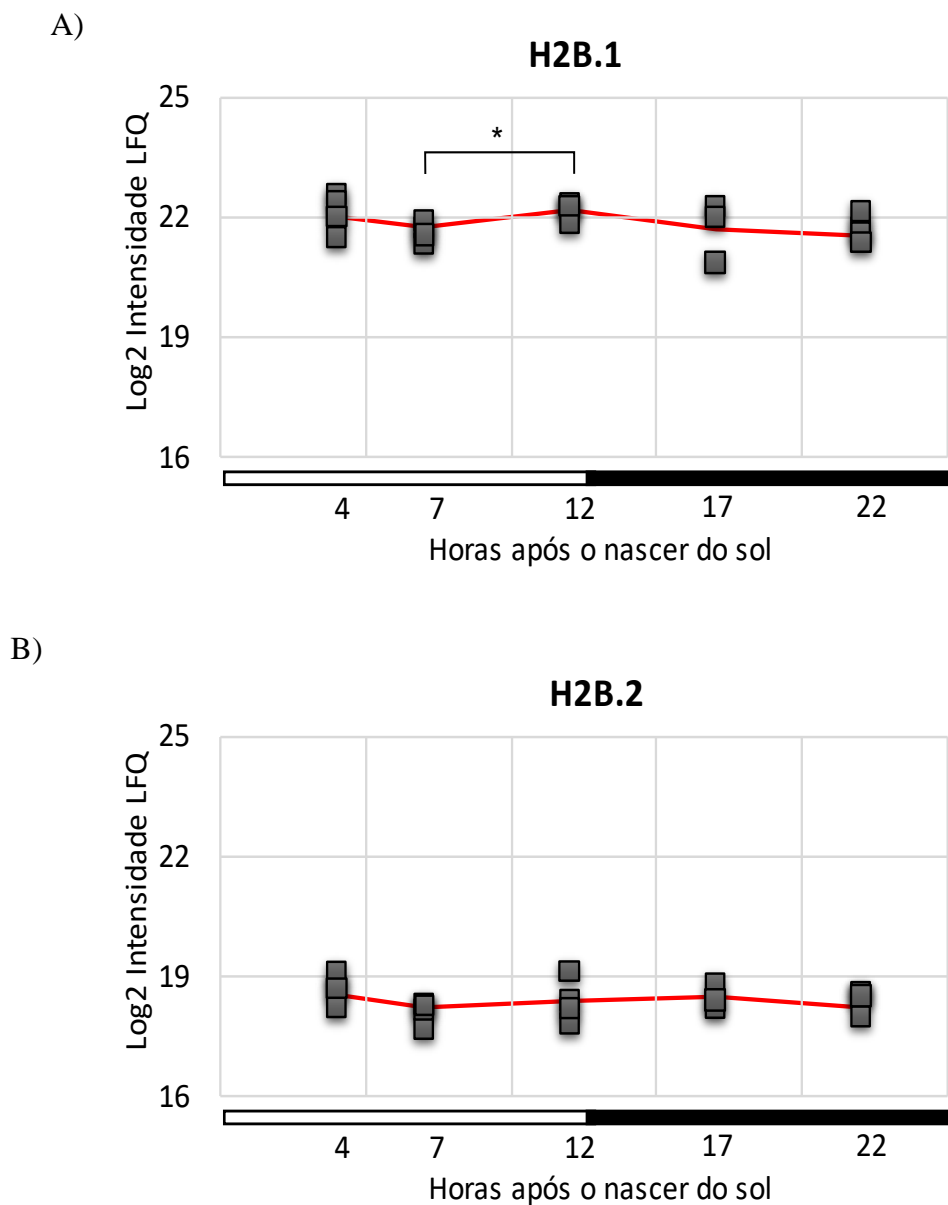


Figura 14. Variação diurna do nível de histonas H2B em entrenó de cana-de-açúcar. Histonas H2B de entrenós 5 e 6 de cana-de-açúcar (SP80 3280) foram quantificadas pelo método LFQ. (A) H2B.1 apresentou uma redução 1,46x (ZT7 x ZT12) (p valor = 0.016). (E) H2B.2 não apresentou variação significativa. A quantidade de proteína detectada está representada pelo log2 da intensidade LQF. Os valores observados em cada réplica biológica (retângulos cinzas) estão conectados pela média das réplicas (linha vermelha). Os horários de dia (retângulo branco) e de noite (retângulo preto) estão representados. A análise estatística foi realizada usando o teste t heteroescedástica de distribuição bicaudal para os pontos com maior amplitude, e as diferenças foram consideradas significativas para valores de p calculados $< 5\%$ destacados pelo símbolo “*”.

4.4 Modificações pós traducionais em histonas de entrenó

Posteriormente nosso foco foi identificar e catalogar as PTMs presentes nas histonas de cana-de-açúcar do órgão entrenó.

Para histonas H3.1 e H3.3 em entrenó foram identificadas as seguintes modificações: acetilação e monometilação nas lisinas 9, 14, 18, 23, 36 e 37; Dimetilação nas lisinas 9, 14, 23, 36, 37 e 56; Trimetilação nas lisinas 9, 36, 37 e 122. Já para as Argininas nos identificamos monometilação nas Argininas 8, 17 e 26. Para a histona H3.3 foi encontrado mono e dimetilação na arginina 40. Já para a variante H3L.1 foram identificadas monometilação nas argininas 8 e 17 e nas lisinas 195 e 197, além disso, foram identificadas dimetilação na Arginina 8, 14 e 194. Para a histona H3L.2 foi encontrado monometilação nas lisinas 9, 15 e 16 e dimetilação na lisina 9 (Figura 15).



Figura 15. PTMs presentes em H3. Ilustração das modificações presentes em histonas H3.1, H3.3, H3L.1 e H3L.2. Os aminoácidos são representados aqui pelo código de uma letra. Para cada sequência é apresentado o tipo da histona, e logo abaixo do nome da histona é indicado o SAS correspondente àquela proteína. As lisinas modificadas são destacadas em vermelho e as argininas são destacadas em azul, para ambas a posição na proteína é mostrada logo abaixo do símbolo de uma letra. Os aminoácidos vizinhos são apresentados em preto.

Em H4, foram identificadas monometilação nas lisinas 8, 12, 22, 79 e 92 e argininas 17, 23, 35, 36, 78 e 92. Também foi identificada uma trimetilação na lisina 44. Encontramos acetilação nas lisinas 8, 12, 16, 20, 31, 79, 91 (Figura 16).



Figura 16. PTMs presentes em H4. Ilustração das modificações presentes em histonas H4. Os aminoácidos são representados aqui pelo código de uma letra. Para cada sequência é apresentado o tipo da histona, e logo abaixo do nome da histona é demonstrado o SAS correspondente a aquela proteína. As lisinas modificadas são destacadas em vermelho e as argininas são destacadas em azul, para ambas a posição na proteína é mostrada logo abaixo do símbolo de uma letra. Os aminoácidos vizinhos são apresentados em preto.

Além de identificarmos PTMs em H3 e H4, nosso estudo se estendeu para H2A e H2B, onde PTMs foram descritas e identificadas. Este estudo é o primeiro que catalogou PTMs para H2A e H2B em cana-de-açúcar.

Em H2A, encontramos numerosos sítios ocupados com PTMs. Observamos extenso número de sítios modificados para as histonas H2A canônica assim como as variantes H2A.Z e H2A.X (Figura 17). Para a variante de histonas H2A.W, foram encontradas PTMs nas regiões da cauda N-terminal, domínio central e, digno de destaque, a cauda C-terminal incluindo o domínio KSPKK (Figura 18 e 19).

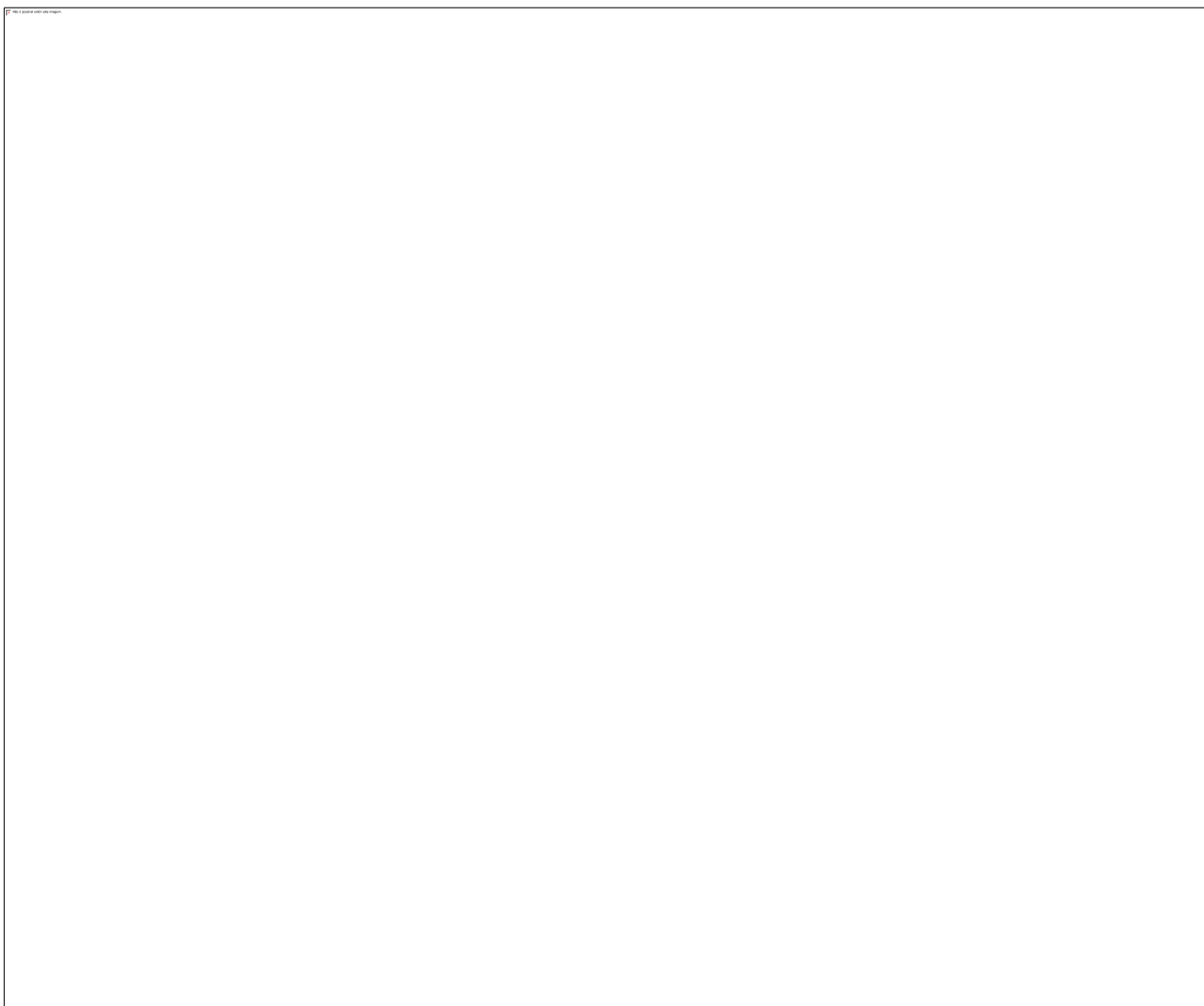


Figura 17. PTMs identificadas em H2A. Figura demonstrando PTMs identificadas em (A) H2A canônica, (B) H2A.Z e (C) H2A.X. Os aminoácidos são representados aqui pelo código de uma letra. O grupo acetil é identificado como “ac”, o grupo metil e identificado como “me” enquanto o número de grupos é identificado por números. Para cada sequência é apresentada a anotação da histona, e logo abaixo do nome da histona é demonstrado o SAS correspondente a aquela proteína. As lisinas modificadas são destacadas em vermelho e as argininas são destacadas em azul, para ambas a posição na proteína é mostrada logo abaixo do símbolo de uma letra. Os aminoácidos vizinhos são apresentados em preto.

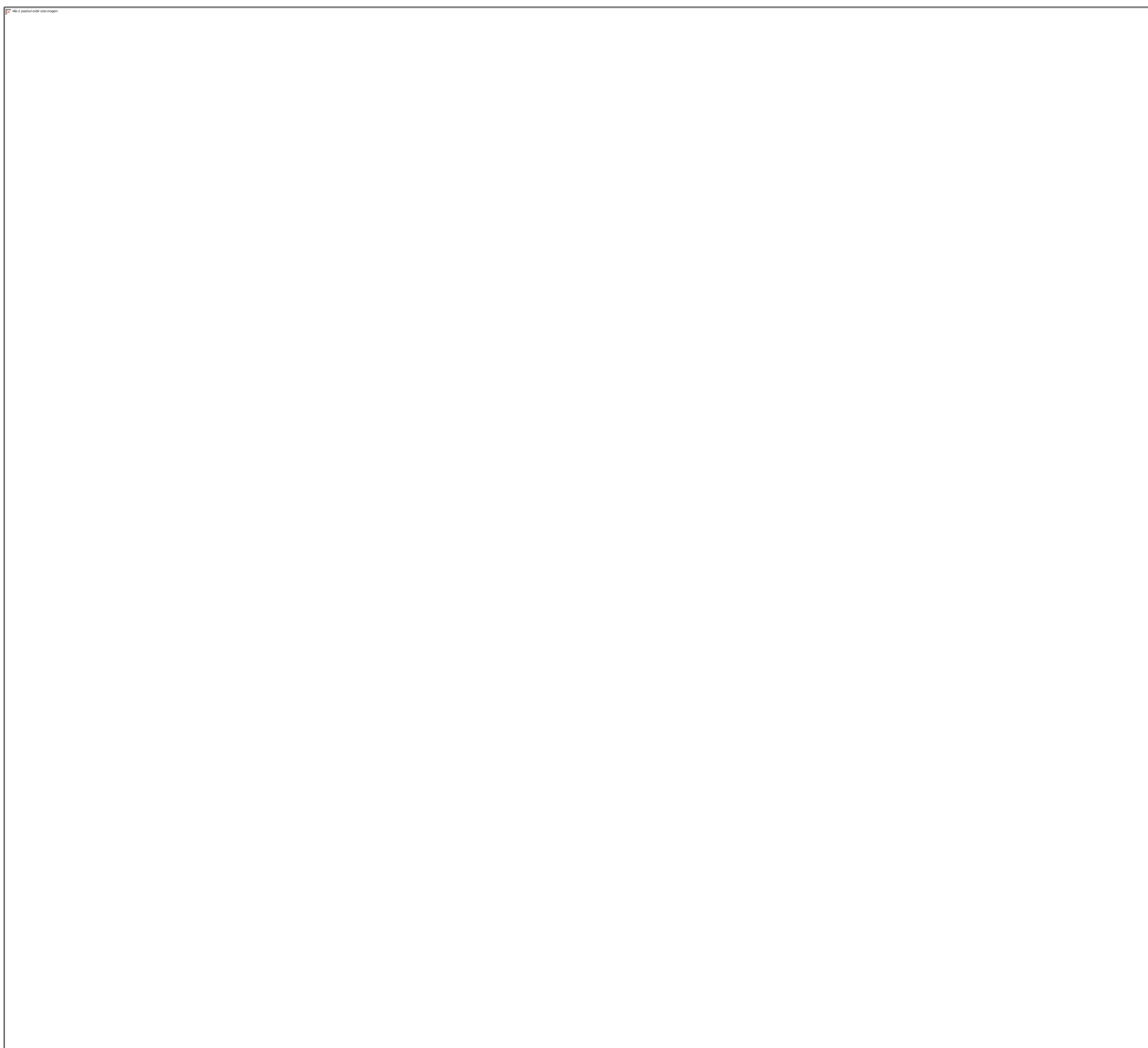


Figura 18. PTMs identificadas nas histonas variantes H2A.W.1 e H2A.W.2. Os aminoácidos são representados aqui pelo código de uma letra. O grupo acetil é identificado como “ac”, o grupo metil e identificado como “me” enquanto o número de grupos é identificado por números. Para cada sequência é apresentada a anotação da histona, e logo abaixo do nome da histona é demonstrado o SAS correspondente a aquela proteína. As lisinas modificadas são destacadas em vermelho e as argininas são destacadas em azul, para ambas a posição na proteína é mostrada logo abaixo do símbolo de uma letra. Os aminoácidos vizinhos são apresentados em preto.

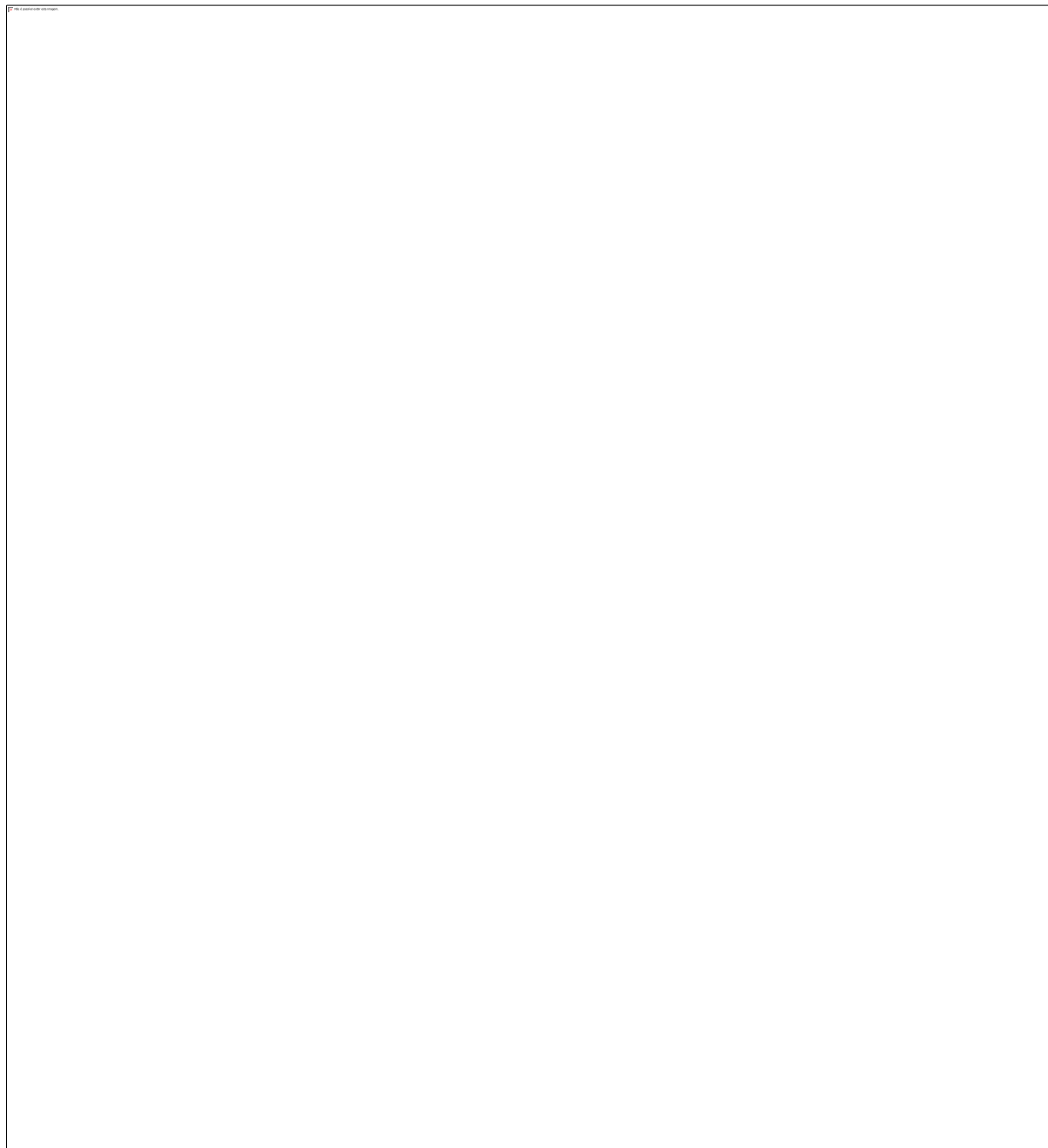


Figura 19. PTMs identificadas nas histonas variantes H2A.W. Os aminoácidos são representados aqui pelo código de uma letra. O grupo acetil é identificado como “ac”, o grupo metil e identificado como “me” enquanto o número de grupos é identificado por números. Para cada sequência é apresentada a anotação da histona, e logo abaixo do nome da histona é demonstrado o SAS correspondente a aquela proteína. As lisinas modificadas são destacadas em vermelho e as argininas são destacadas em azul, para ambas a posição na proteína é mostrada logo abaixo do símbolo de uma letra. Os aminoácidos vizinhos são apresentados em preto.

Em H2B, identificamos diversos sítios modificados. Identificamos PTMs na cauda N-terminal, no domínio central e na cauda C-terminal (Figura 20).

Uma vez que apresentamos as modificações encontradas, decidimos apresentar as modificações mais prevalentes através dos dados de contagem de *Scans*. Os peptídeos mais abundantes para histonas do entrenó 5-6 de cana de açúcar foram listados na tabela 8. Esses dados são provenientes do número de vezes que um peptídeo foi assinalado a um espectro de MS/MS e eles são proporcionais a abundância dos peptídeos e a capacidade de o peptídeo ionizar e ser analisado no equipamento de espectrometria de massas.

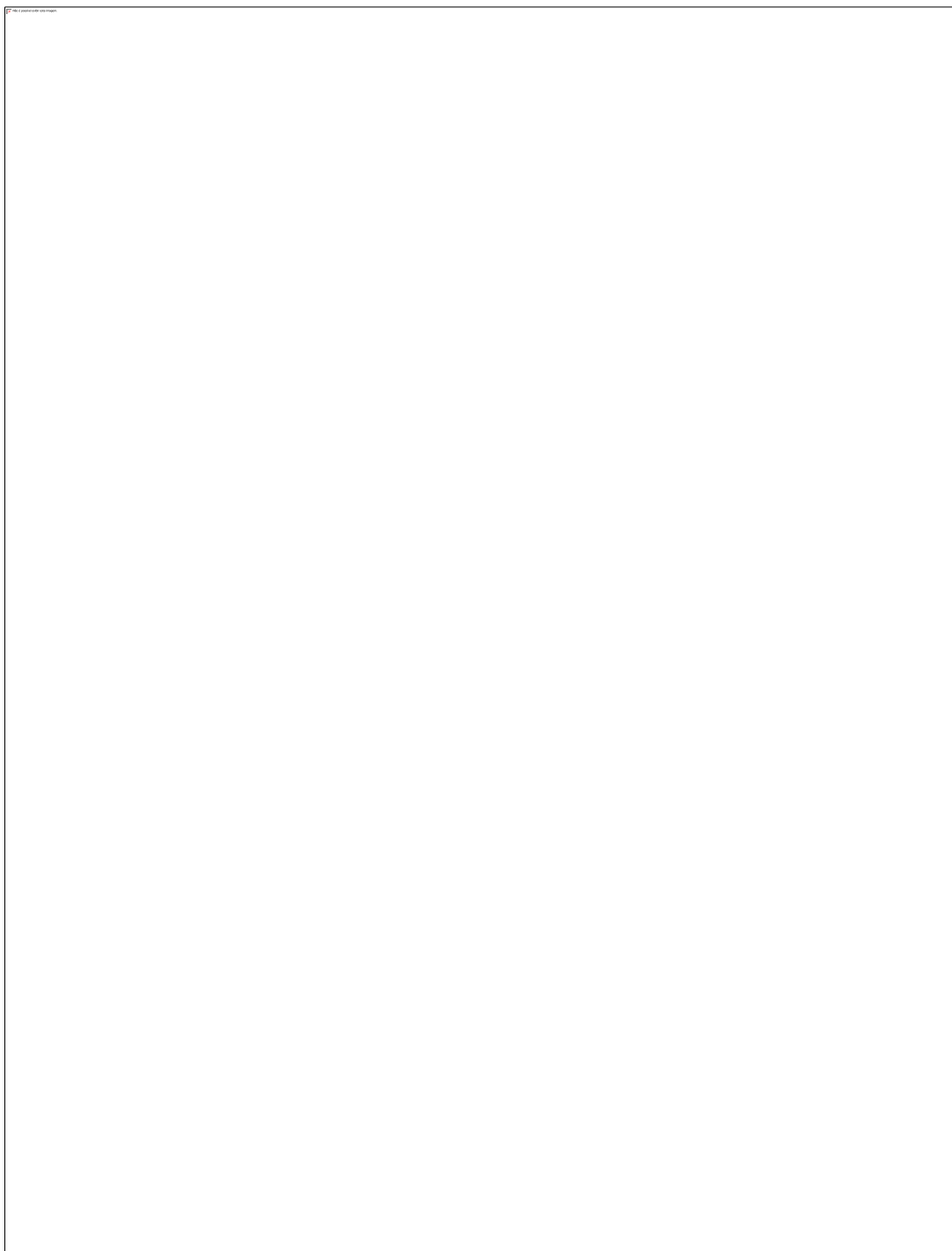


Figura 20. PTMs identificadas na histona H2B. As 9 variantes de H2B foram anotadas como H2B.1 a H2B.9. Os aminoácidos são representados aqui pelo código de uma letra. Para cada sequência é apresentado o tipo da histona, neste caso H2B, e logo abaixo do nome da histona é demonstrado o SAS correspondente a aquela proteína. As lisinas modificadas são destacadas em vermelho e as argininas são destacadas em azul, para ambas a posição na proteína é mostrada logo abaixo do símbolo de uma letra. Os aminoácidos vizinhos são apresentados em preto.

Tabela 8. Peptídeos modificados mais abundantes em cana-de-açúcar. Os peptídeos com o percentil acima de 0,9 para número de scans foram colocados em ordem decrescente pelo número de scans. A coluna peptídeo mostra a sequência do peptídeo juntamente com as modificações, as quais são representadas como o seguinte, monometilação = “me1”; dimetilação = me2; trimetilação me3; acetilação = “ac”; propionilação = “pr”; oxidação = “ox”. A coluna “AA” indica o primeiro e último peptídeo, a coluna “Scans” apresenta a contagem de scans. A coluna “SAS” se refere a ao gene correspondente em cana-de-açúcar

Peptídeo	AA	Scans	Histona	SAS
K(pr)STGGK (ac)APR	9-17	209	H3.1;H3.3	SCEQLB1066C12
K(me2)SAPATGGVK(pr)K(pr)PHR	27-40	86	H3.1	SCEQLB1066C12
K(me1)SAPATGGVK(pr)K(pr)PHR	27-40	67	H3.1	SCEQLB1066C12
M(ox)DASGAGGK(ac)AK(pr)K(pr)GAAGR	0-16	47	H2A	SCCCRZ2C03C04
APK(me3)AEK(pr)K(pr)PAAK	1-11	43	H2B	SCEPLB1042A02ed
K(ac)QLATK(pr)AAR	18-26	43	H3.1;H3.3	SCEQLB1066C12
K(me1)STGGK(pr)APR	9-17	41	H3.1;H3.3	SCEQLB1066C12
K(me2)SAPTTGGVK(pr)K(pr)PHR	27-40	37	H3.3	SCEQLR1094C02
K(ac)SAPATGGVK(pr)K(pr)PHR	27-40	35	H3.1	SCEQLB1066C12
APK(me3)AEK(pr)K(pr)PAEK(pr)	1-11	30	H2B	SCEPLB1042A02ed
K(me3)SAPATGGVK(pr)K(pr)PHR	27-40	28	H3.1	SCEQLB1066C12
K(me3)SAPTTGGVK(pr)K(pr)PHR	27-40	28	H3.3	SCEQLR1094C02
MDAGAK(ac)VPK(pr)K(pr)AAAGR	0-14	28	H2A	SCCCRZ2002H03
M(ox)DAGAK(ac)VPK(pr)K(pr)AAAGR	0-14	27	H2A	SCCCRZ2002H03
K(me2)SAPATGGVK(me1)K(pr)PHR	27-40	25	H3.1	SCEQLB1066C12
K(pr)SAPTTGGVK(me1)K(pr)PHR	27-40	25	H3.3	SCEQLR1094C02
M(ox)DSTGAGAGGK(ac)VK(pr)K(pr)GAGGR	0-18	25	H2A	SCCCLB1024F05
K(me1)SAPATGGVK(me1)K(pr)PHR	27-40	24	H3.1	SCEQLB1066C12
K(ac)QLATK(ac)AAR	18-26	22	H3.1;H3.3	SCEQLB1066C12
K(pr)SAPTTGGVK(me2)K(pr)PHR	27-40	22	H3.3	SCEQLR1094C02
APK(me1)AEK(me3)K(ac)PAAK(pr)	1-11	21	H2B	SCEPLB1042A02ed
K(me1)SAPTTGGVK(pr)K(pr)PHR	27-40	21	H3.3	SCEQLR1094C02
M(ox)DGGGTK(ac)VK(pr)K(pr)AAAGR	0-14	21	H2A	SCCCLR2001C09
K(me1)SAPTTGGVK(me1)K(pr)PHR	27-40	20	H3.3	SCEQLR1094C02
K(pr)SAPATGGVK(me3)K(pr)PHR	27-40	20	H3.1	SCEQLB1066C12

Outro dado que chama atenção, é a distribuição da contagem de MS/MS para peptídeos modificados (Figura 21). Observamos que a contagem de MS/MS possui uma distribuição

unicaudal onde a soma das contagens dos 5% dos peptídeos mais abundantes é maior que a soma das contagens dos 87% dos peptídeos menos abundantes. De maneira global, o maior número de MS/MS scans de peptídeos modificados são de histona H3, seguido por H2B (Figura 21). Portanto H3 é a histona que com maior abundância de PTMs em cana-de-açúcar identificadas pelo método utilizado. A Figura 22 apresenta o número de sítios modificados ao longo do dia, onde pode se notar novamente o maior número de sítios modificados em H3. Não há tendência clara de ritmos ao longo do dia.

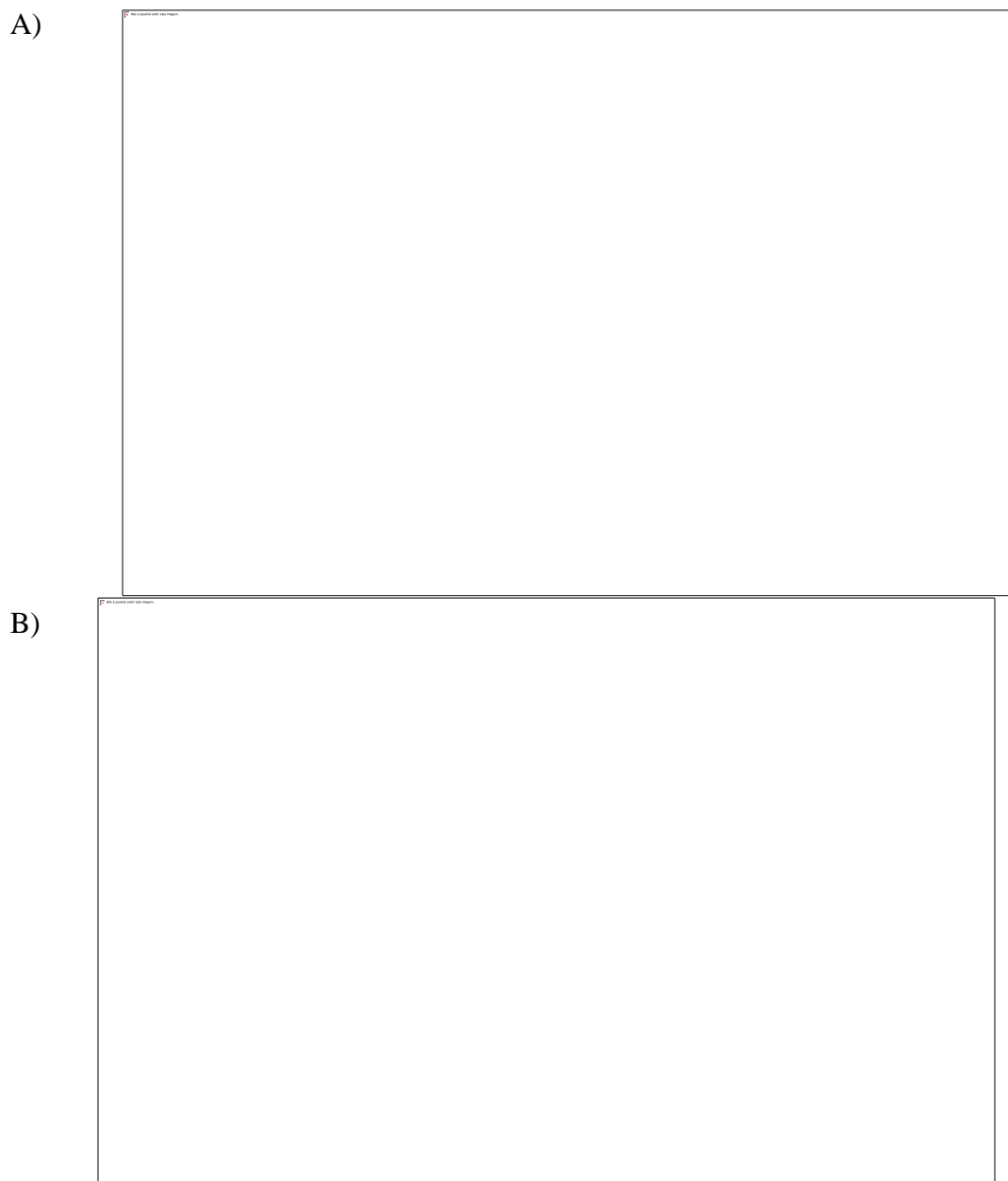


Figura 21. Perfil da abundância de PTMs em histonas de Cana-de-açúcar. (A) distribuição de MS/MS scans para peptídeos modificados. (B) Sítios modificados por tipo de histonas.

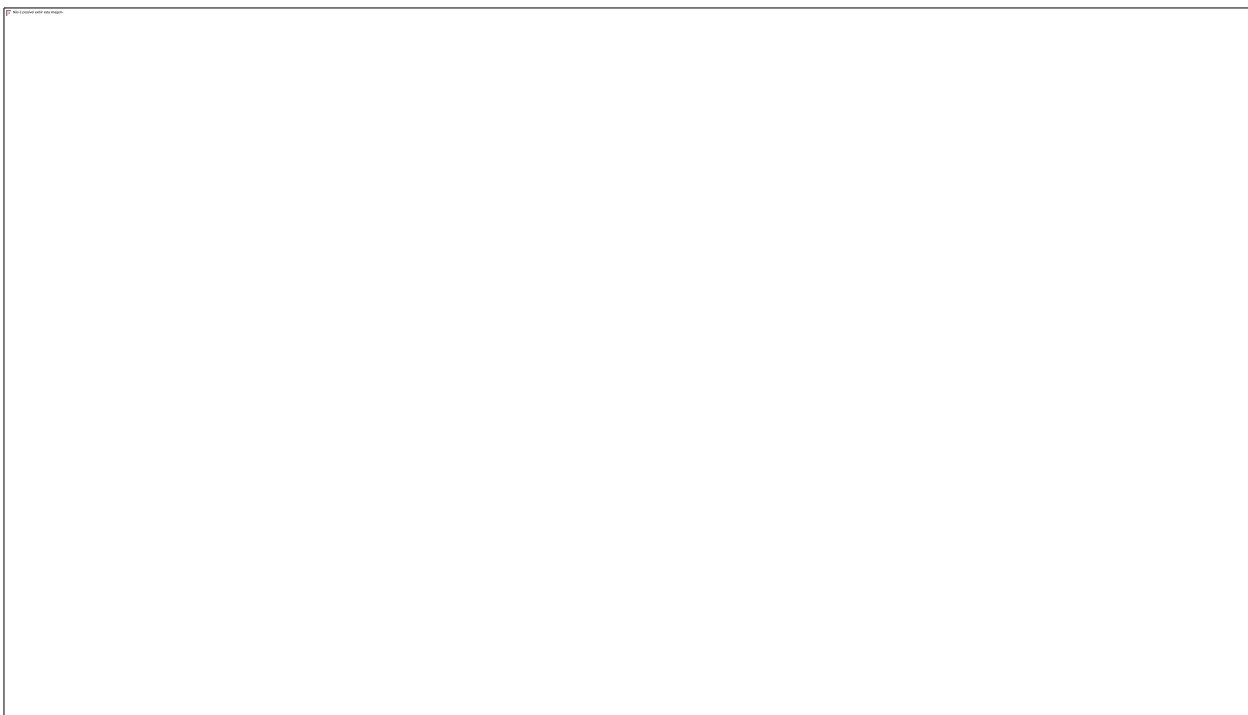


Figura 22. Perfil diurno para o número de sítios modificados em histonas de Cana-de-açúcar. (A) histona H2A, (B) histona H2B, (C) histona H3, (D) histona H4. O número de sítios modificados para cada replica biológica e apresentado pelo círculo azul. O período correspondente ao dia é indicado pela barra branca no eixo X enquanto o período noturno é indicado pela barra preta. O eixo Y representa o número de sítios modificados encontrados a nível intra peptídeo.

4.5 Quantificação de PTMs em cana-de-açúcar pelo método DIA

A distribuição diurna do número de sítios modificados foi baseada na contagem de MS/MS originados de dados de aquisição DDA que possuem uma natureza probabilística intrínseca. Assim para se ter uma melhor noção quantitativa das PTMs estudadas prosseguimos com a abordagem baseado no método de aquisição DIA.

O primeiro resultado que chamou nossa atenção foi a variação dos níveis de acetilação e metilação no peptídeo 9-KSTGGKAPR-17 (Figura 23). Observamos que, embora a maior parte das modificações nesse peptídeo não apresente uma variação aparente, H3K9me1K14ac apresentou um perfil rítmico.

Além dos dados de variação diurna das PTMs para esse peptídeo, decidimos mostrar de uma maneira geral quais são as PTMs quantificadas para esse peptídeo e em quais níveis elas estão presentes. Podemos observar que a acetilação na lisina 14 e a metilação na lisina 9 são as principais modificações encontradas para o peptídeo em questão (Figura 24). Notamos também que H3K14ac é a forma mais abundante do peptídeo KSTGGKAPR e essa afirmação é corroborada pelo número de *scans* (Tabela 8).

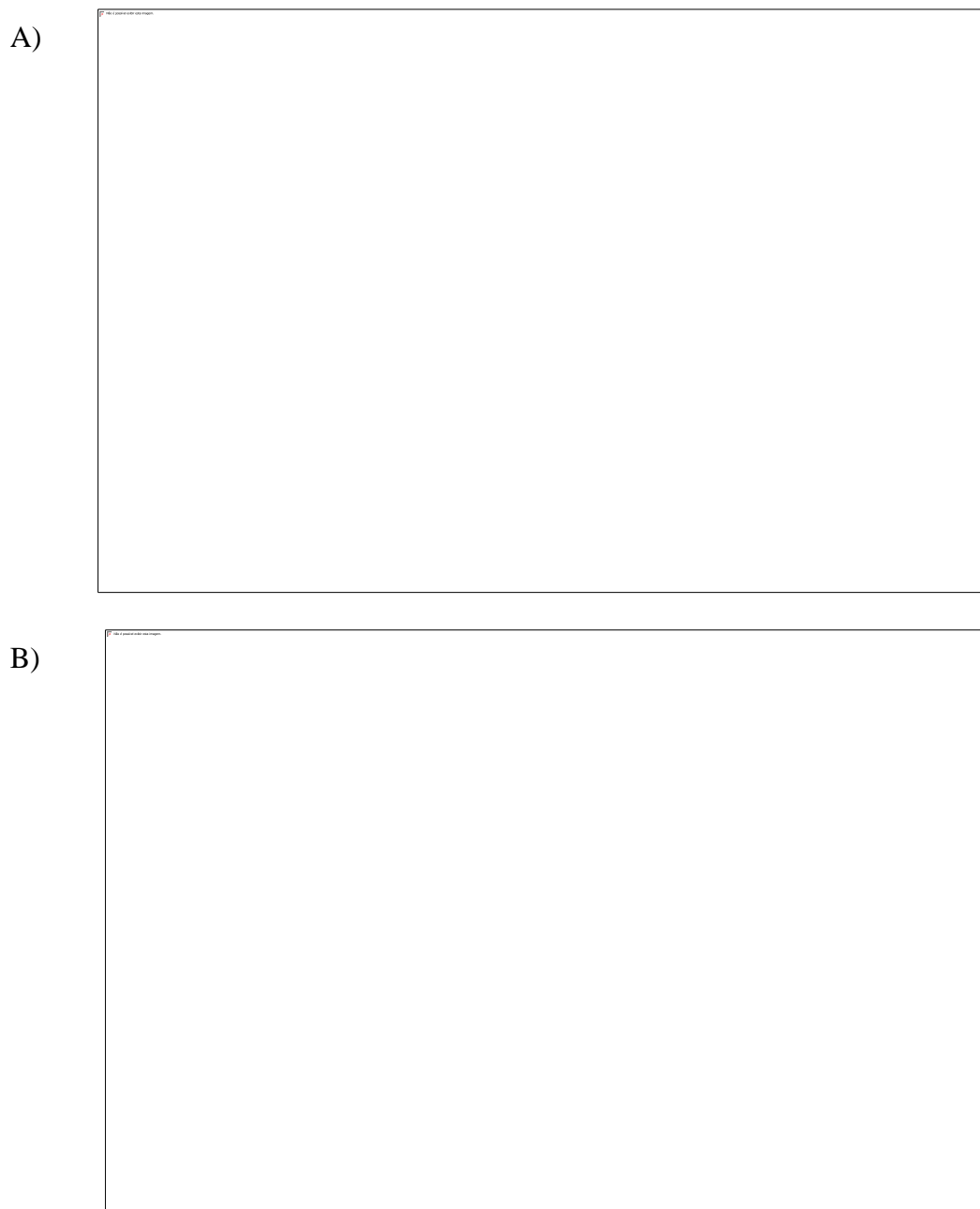


Figura 23. Perfil diurno de abundância de PTMs para o peptídeo 9-KSTGGKAPR-17 em H3. A: H3K9me1K14ac foi observada uma redução média de 33,5% (min 16,1%/ max 47,1%/ +/- 6.38% p-valor 0,022) dessa combinação de PTMs entre o meio do dia (ZT7) e o meio da noite (ZT17). B: Não há diferenças significativas para os diferentes grupos para a forma não modificada H3K9K27. O período correspondente ao dia é indicado pela barra branca no eixo X enquanto o período noturno é indicado pela barra preta. A análise estatística foi realizada usando o teste t heteroescedástica de distribuição bicaudal para os pontos com maior amplitude, e as diferenças foram consideradas significativas para valores de p calculados < 5% destacados pelo símbolo “*”.

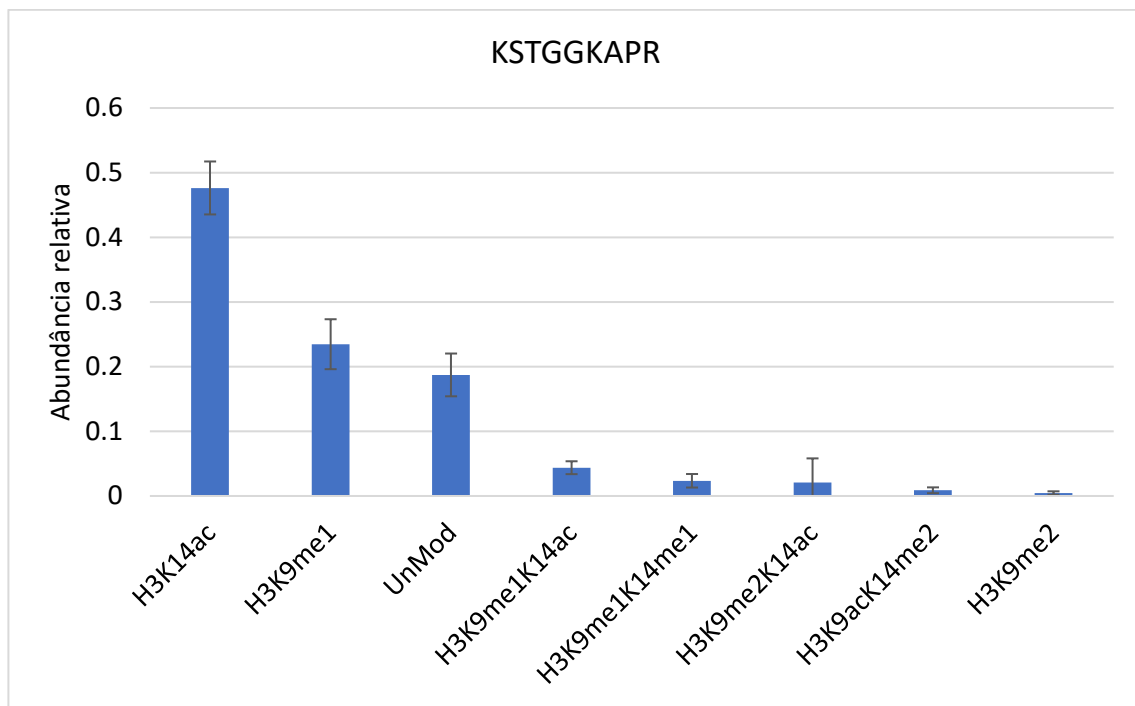


Figura 24. Abundância relativa de PTMs para o peptídeo 9-KSTGGKAPR-17. O eixo Y apresenta a abundância relativa em uma escala que vai de 0 a 1, onde 0 representa nenhuma quantidade e 1 representa 100%. As barras correspondem aos valores médios da abundância relativa, enquanto a barra de erro apresenta o desvio padrão. Cada barra possui sua respectiva PTM na legenda do eixo X, e a barra do peptídeo não modificado está rotulado como “UnMod”.

Outro peptídeo que se destaca para histona H3 é o 18-KQLATKAAR-26, esse peptídeo possui a maior intensidade no cromatograma dos peptídeos correspondentes a H3, onde mais de 40% dele se encontra na forma não modificada (Figura 25). Entre as modificações identificadas, H3K18ac apresenta um perfil diurno onde parece haver um pico no fim do dia (ZT12) e vale no fim da noite (ZT22) (Figura 26). Já para H3K23acR26me1 foi observada uma redução média de 28% quando comparado o fim do dia (ZT12) e o fim da noite (ZT22) (Figura 27). A versão não modificada desse peptídeo apresentou variação inversa ao perfil de acetilação, o que indica que acetilação é a principal modificação para esse peptídeo (Figura 27).

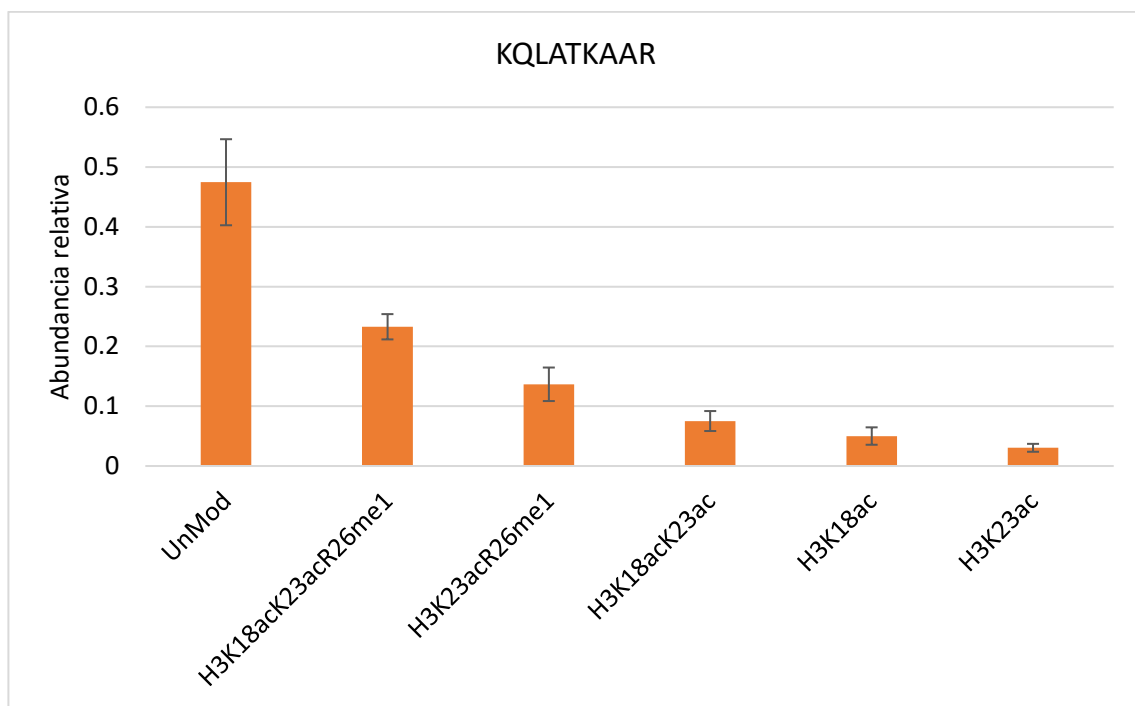


Figura 25. Abundância relativa de PTMs para o peptídeo 18-KQLATKAAR-26. O eixo Y apresenta a abundância relativa em uma escala que vai de 0 a 1, onde 0 representa nenhuma quantidade e 1 representa 100%. As barras correspondem aos valores médios da abundância relativa, enquanto a barra de erro apresenta o desvio padrão (19 réplicas). Cada barra possui sua respectiva PTM na legenda do eixo X, e a barra do peptídeo não modificado está rotulado como “UnMod”.

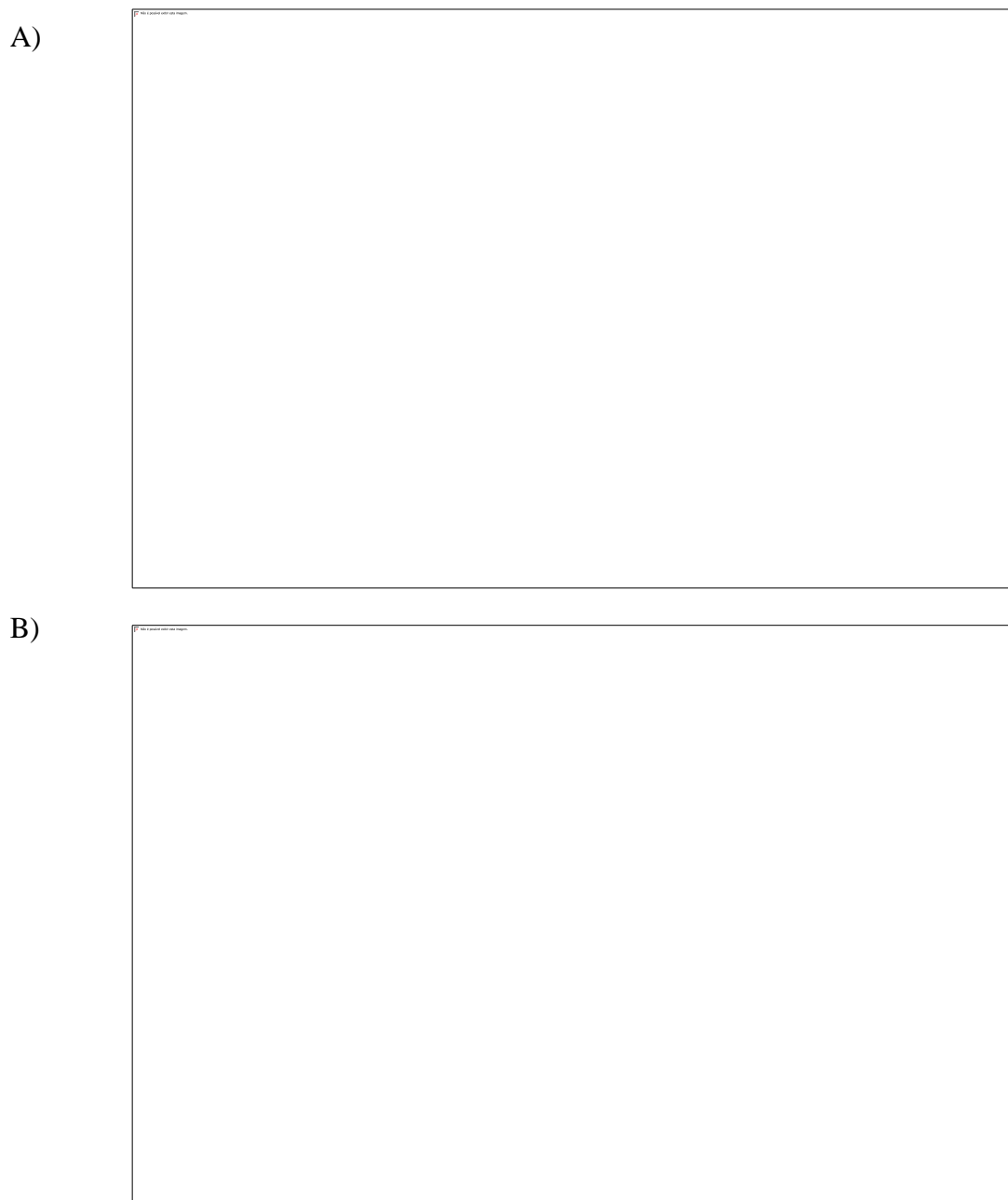


Figura 26. Perfil diurno de abundância de PTMs para o peptídeo 18-KQLATKAAR-26 em H3. (A) para H3K18acK23ac foi observada uma redução média de 30% (min 25,3%/ max 37,5%, +/- 6,04% p-valor 0,0005) dessa combinação de PTMs entre o fim do dia (ZT12) e o fim da noite (ZT22). B: para H3K18ac foi observada uma redução média de 31,9% (min 20,9%/ max 46,4%. +/- 7,14% p-valor 0,001) o fim do dia (ZT12) e o fim da noite (ZT22). O período correspondente ao dia é indicado pela barra branca no eixo X enquanto o período noturno é indicado pela barra preta. A análise estatística foi realizada usando o teste t heteroscedástica de distribuição bicaudal para os pontos com maior amplitude, e as diferenças foram consideradas significativas para valores de p calculados < 5% destacados pelo símbolo “*”.

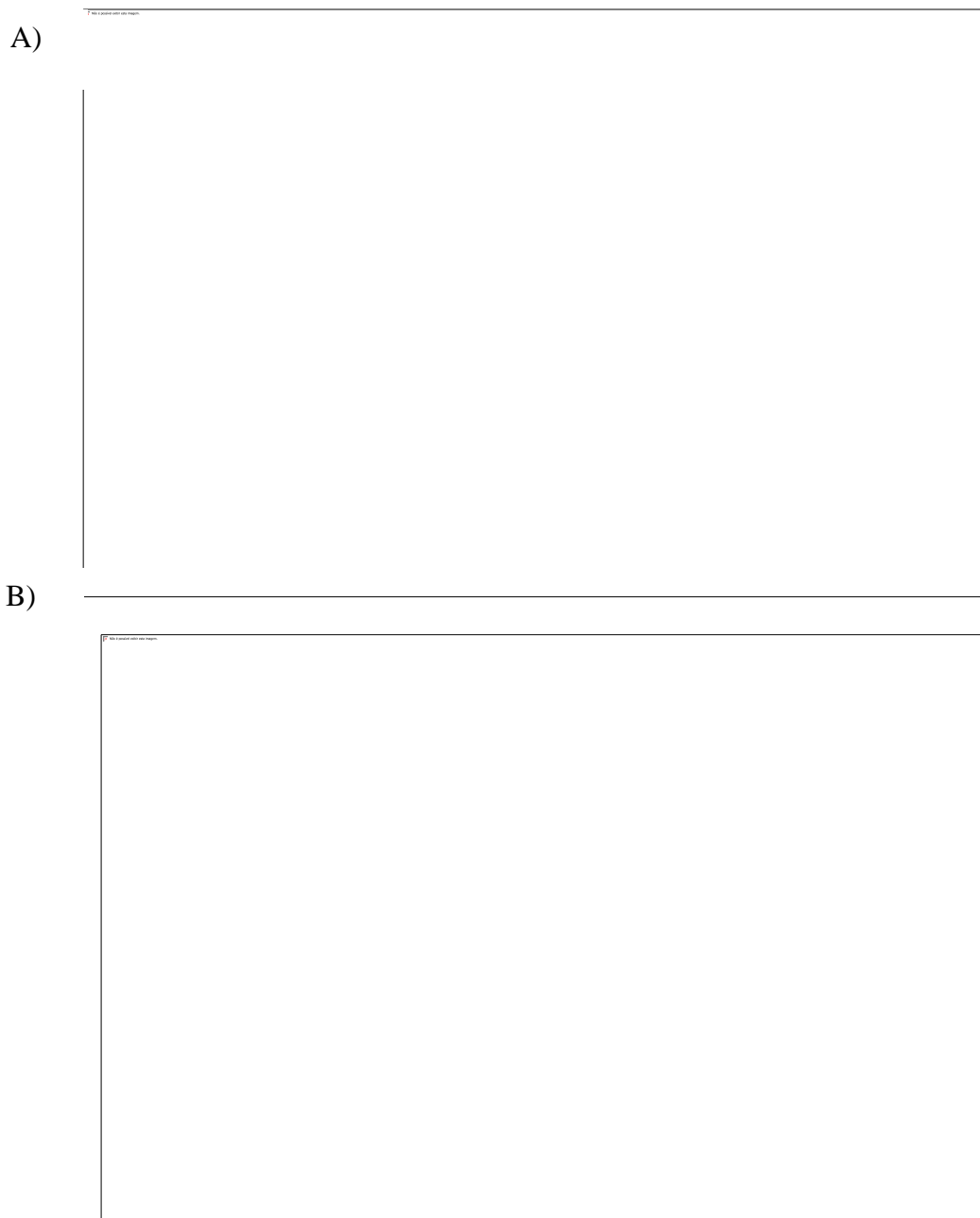


Figura 27. Perfil diurno de abundância de PTMs para o peptídeo 18-KQLATKAAR-26 em H3. (A) para H3K23acR26me1 foi observada uma redução média de 28% (min 20,5% / max 36,4. +/- 5,15% p-valor 0.0005) quando comparado o fim do dia (ZT12) e o fim da noite (ZT22). (B) A forma não modificada apresentou redução média de 17% (min 7,9%/ max 21,5%. +/- 1,8% p-valor 0.0009) (ZT12 x ZT22). O período correspondente ao dia é indicado pela barra branca no eixo X enquanto o período noturno é indicado pela barra preta. A análise estatística foi realizada usando o teste t heteroescedástica de distribuição bicaudal para os pontos com maior amplitude, e as diferenças foram consideradas significativas para valores de p calculados < 5% destacados pelo símbolo “*”.

Os peptídeos 27-KSAPATGGVKKPHR-40 e 27-KSAPTTGGVKKPHR-40, exclusivos para H3.1 e H3.3 respectivamente, são extensamente modificados, sendo identificadas 18 combinações de PTMs para H3.1 e 23 para H3.3. A forma modificada de H3.1 mais abundante foi H3.1K27me2 (Figura 28) enquanto H3.3K36me2K37me1 foi a forma mais modificada em H3.3 (Figura 29). As PTMs presentes em H3.1 não apresentaram indícios de ritmos diurnos (Figura 30). Por outro lado, H3.3K27me1K36acK37me1 e H3.3K37me1 apresentaram perfil diurno sugestivo para um possível ritmo (Figura 31). H3.3K37me1 demonstrou um pico no início do dia (ZT4) e o vale no final do dia (ZT12) (Figura 31). Já a versão não modificada de 27-KSAPTTGGVKKPHR-40 em H3.3 não apresentou variação significativa ao longo do dia (Figura 32).

Podemos conferir também que, embora as lisinas 27, 36 e 37 sejam amplamente modificadas em H3, o perfil de PTMs presentes nessas posições são diferentes entre H3.1 e H3.3.

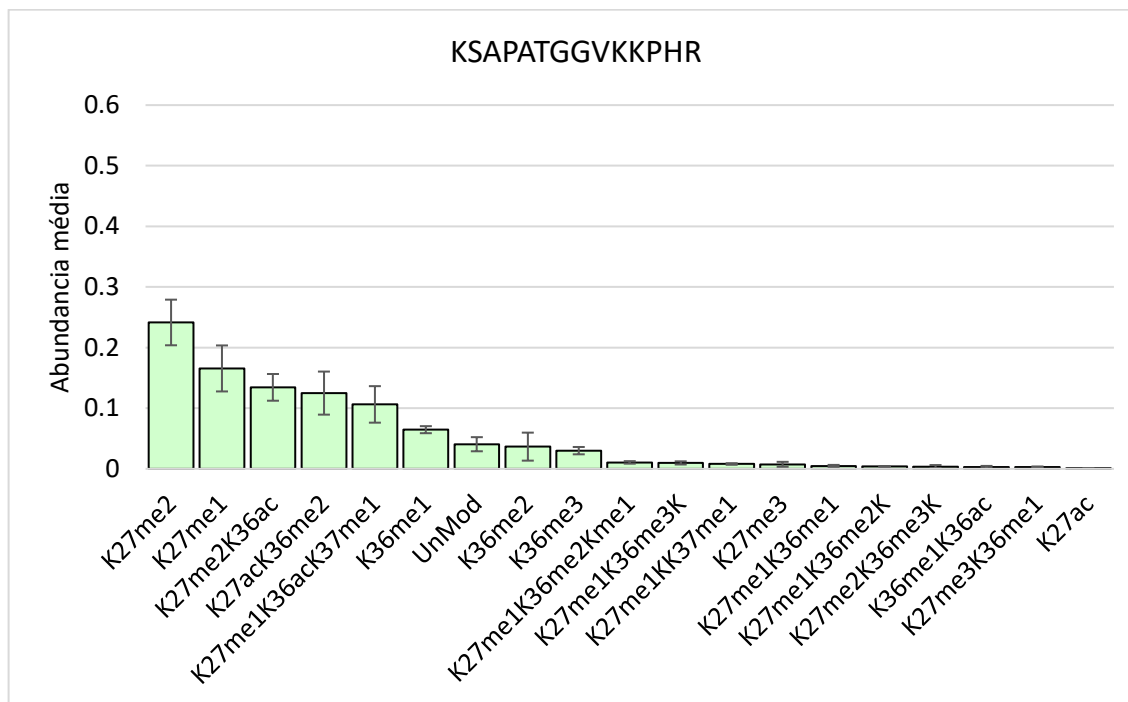


Figura 28. Abundância relativa de PTMs para o peptídeo 27-KSAPATGGVKKPHR-40. O eixo Y apresenta a abundância relativa em uma escala que vai de 0 a 1, onde 0 representa nenhuma quantidade e 1 representa 100%. As barras correspondem aos valores médios da abundância relativa, enquanto a barra de erro apresenta o desvio padrão (19 réplicas). Cada barra possui sua respectiva PTM na legenda do eixo X, e a barra do peptídeo não modificado está rotulado como “UnMod”.

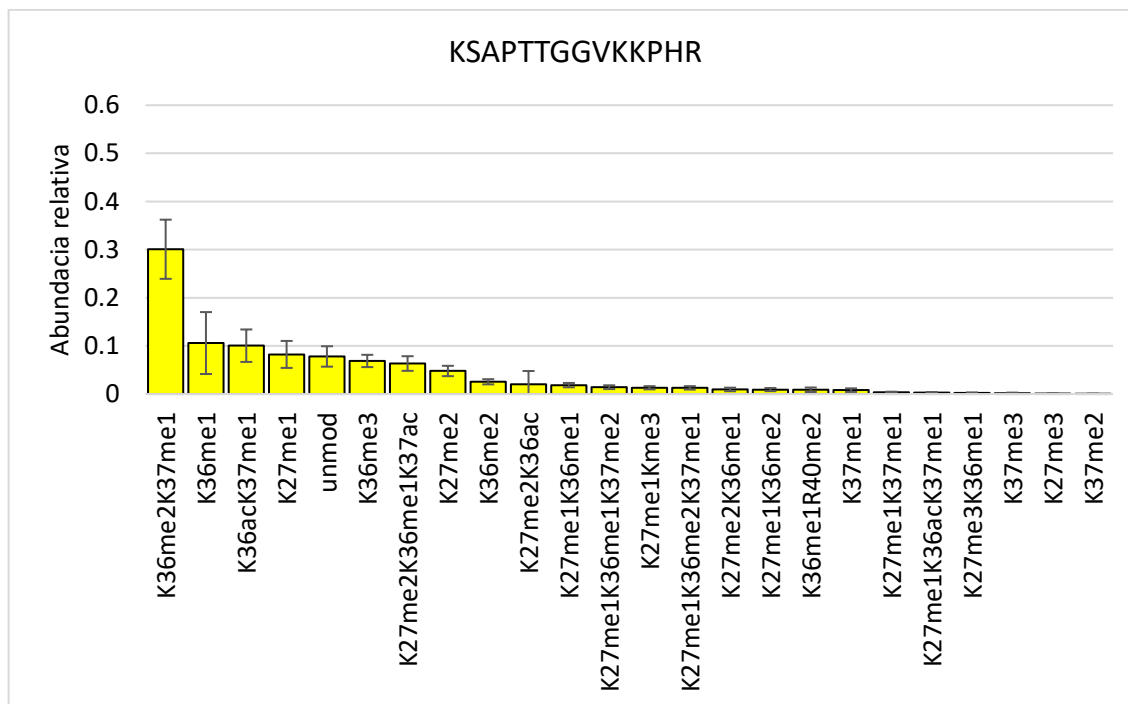


Figura 29. Abundância relativa de PTMs para o peptídeo 27-KSAPTTGGVKKPHR-40. O eixo Y apresenta a abundância relativa em uma escala que vai de 0 a 1, onde 0 representa nenhuma quantidade e 1 representa 100%. As barras correspondem aos valores médios da abundância relativa, enquanto a barra de erro apresenta o desvio padrão. Cada barra possui sua respectiva PTM na legenda do eixo X, e a barra do peptídeo não modificado está rotulado como “UnMod”.

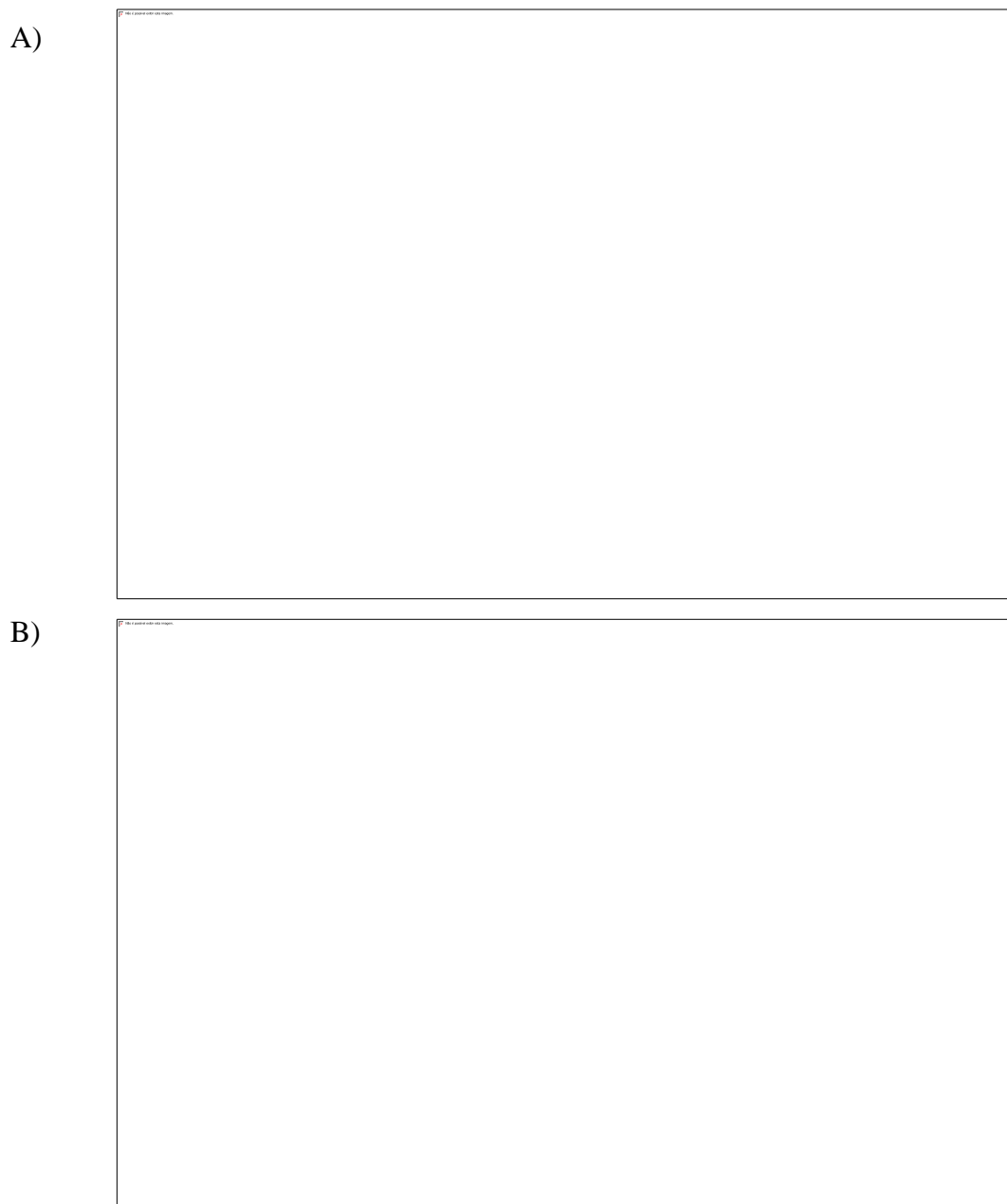


Figura 30. Abundância relativa de PTMs para o peptídeo 27-KSAPATGGVKKPHR-40 em H3.1. A: H3.1K27me1K36acK37me1 não apresentou variação significativa entre os diferentes pontos. B: a forma não modificada não apresentou diferença significativa entre os pontos. O período correspondente ao dia é indicado pela barra branca no eixo X enquanto o período noturno é indicado pela barra preta. A análise estatística foi realizada usando o teste t heteroescedástica de distribuição bicaudal para os pontos com maior amplitude, e as diferenças foram consideradas significativas para valores de p calculados < 5% destacados pelo símbolo “**”.

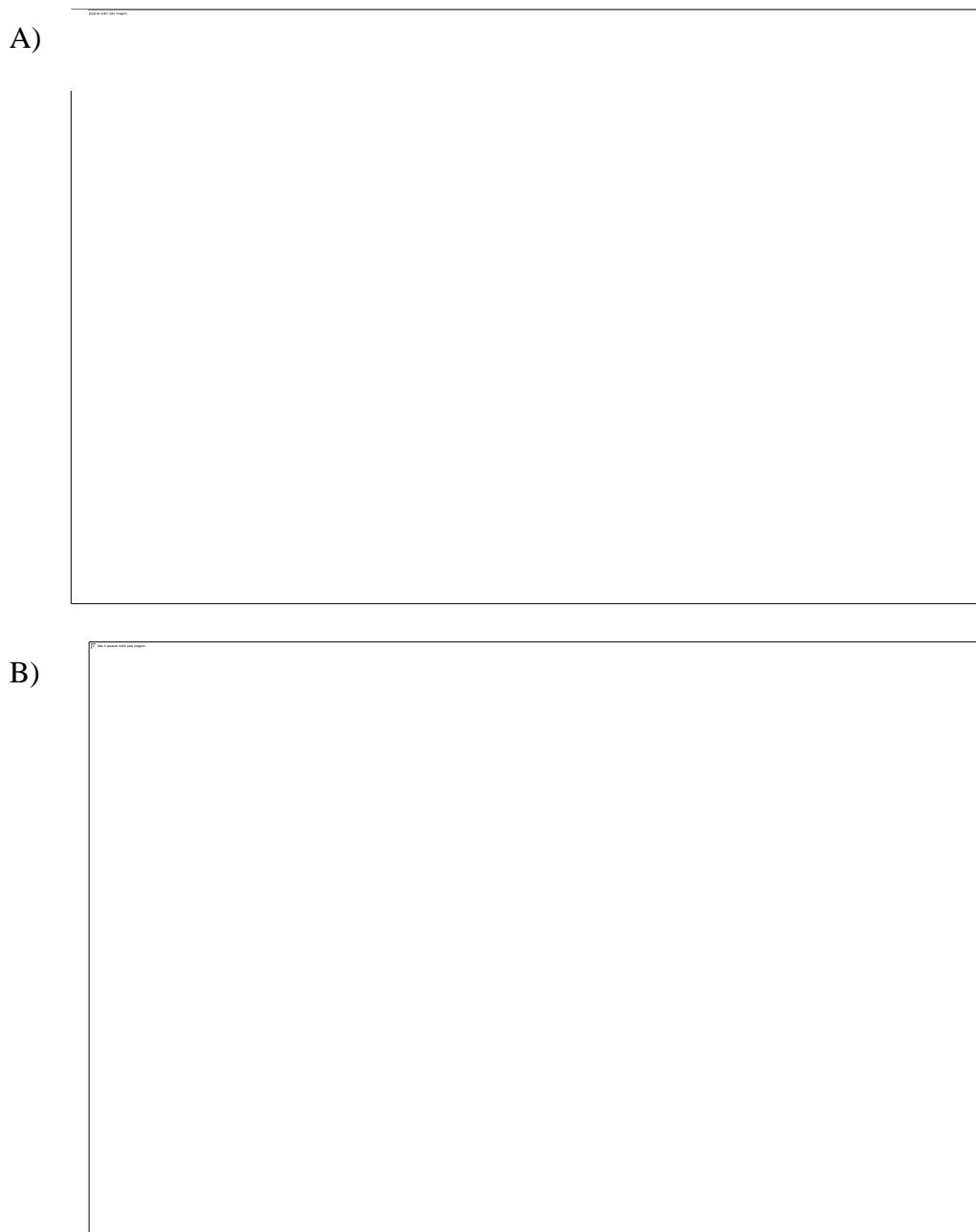


Figura 31. Abundância relativa de PTMs para o peptídeo 27-KSAPTTGGVKKPHR-40 em H3.3. A H3.3K27me1K36acK37me1 apresentou redução média de 48% (min 28,6%/ max 70,3%. +/- 11,9%. p-valor 0,007) quando comparado o fim do dia (ZT12) com o início do dia (ZT4). B H3.3K37me1 apresentou redução média de 64,4% (min 36%/ max 80%. +/- 1% p-valor 0,01) quando comparado o início do dia (ZT4) com o fim do dia (ZT12). O período correspondente ao dia é indicado pela barra branca no eixo X enquanto o período noturno é indicado pela barra preta. A análise estatística foi realizada usando o teste t heteroescdástica de distribuição bicaudal para os pontos com maior amplitude, e as diferenças foram consideradas significativas para valores de p calculados < 5% destacados pelo símbolo “*”.

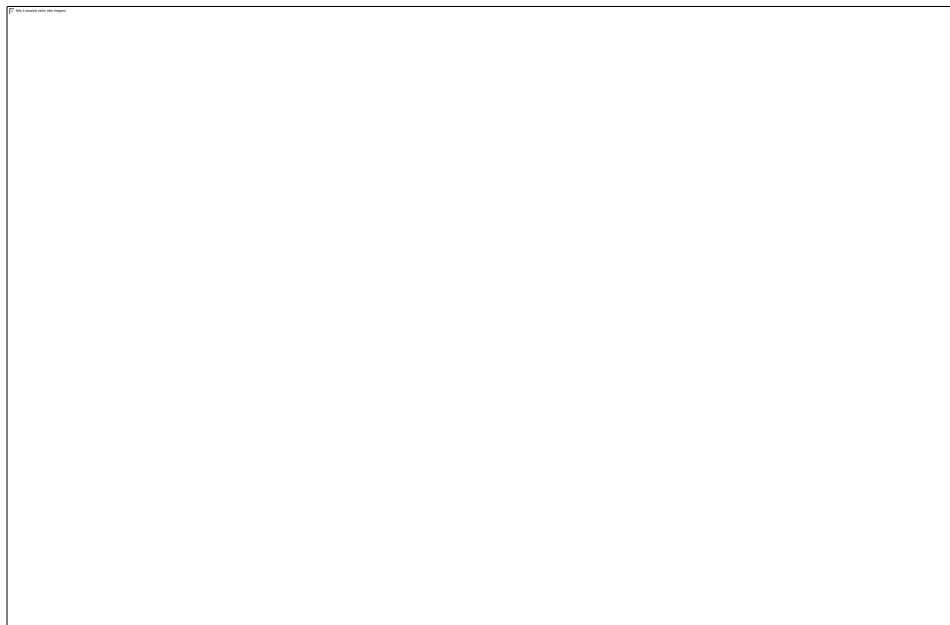


Figura 32. Abundância relativa da forma não modificada para o peptídeo 27-KSAPTTGGVKKPHR-40 em H3.3. a forma não modificada não apresentou mudanças significativas. O período correspondente ao dia é indicado pela barra branca no eixo X enquanto o período noturno é indicado pela barra preta. A análise estatística foi realizada usando o teste t heteroescedástica de distribuição bicaudal para os pontos com maior amplitude, e as diferenças foram consideradas significativas para valores de p calculados $< 5\%$ destacados pelo símbolo “*”.

4.5.1 Quantificação de PTMs em H2A e H2B

Para as histonas H2A e H2B nós observamos um panorama diferente de H3. Primeiramente, verificamos que apenas 13 peptídeos modificados em H2A e 3 em H2B, um número consideravelmente menor do que H3, foram quantificados pelo método empregado (Tabela 9).

No entanto, percebemos que em H2A existe peptídeos que são encontrados apenas na forma modificada, ou seja, não conseguimos identificar uma versão não modificada para os peptídeos em questão (Tabela 9). Esses dados demonstram que H2A é extensivamente modificada em certas posições em cana-de-açúcar. Além disso, constatamos que a cauda N terminal é marcada pela presença de acetilações, onde H2AK5ac é a PTM com maior intensidade.

Tabela 9. Peptídeos de H2A quantificados exclusivamente na forma modificada

Histona	PTM	Peptídeo
H2A.W.5	K10ac	MDVSGAGAGGKAKKGAAGR
H2A.W.3	K10acK12ac	MDSTGAGAGGKVKKGAGGR
H2A.W.4	K141me3	AAAKEPKSPK
H2A.W.4	K144me2K147me3	AAAKEPKSPK
H2A.X.1	K13me3	GTKAVTR
H2A.W.1	K6ac	MDGGGTVKVKAAAGR
H2A.W.1	K6acK10ac	MDGGGTVKVKAAAGR
H2A.W.1	K6acK9ac	MDGGGTVKVKAAAGR
H2A.W.2	K5ac	MDAGAKVPKKAAGRR

Além dos peptídeos encontrados predominantes na forma modificada em H2A, nós também identificamos outros três peptídeos em H2A e 1 em H2B que suas formas não modificadas também estavam presentes (Figura 33). Esses peptídeos contém as seguintes PTMs H2A.W.1K139me3, H2A.W.1K151me2, H2A.W.1K151me1K154me1 e H2B.2K32acR33me1 (Figura 35).

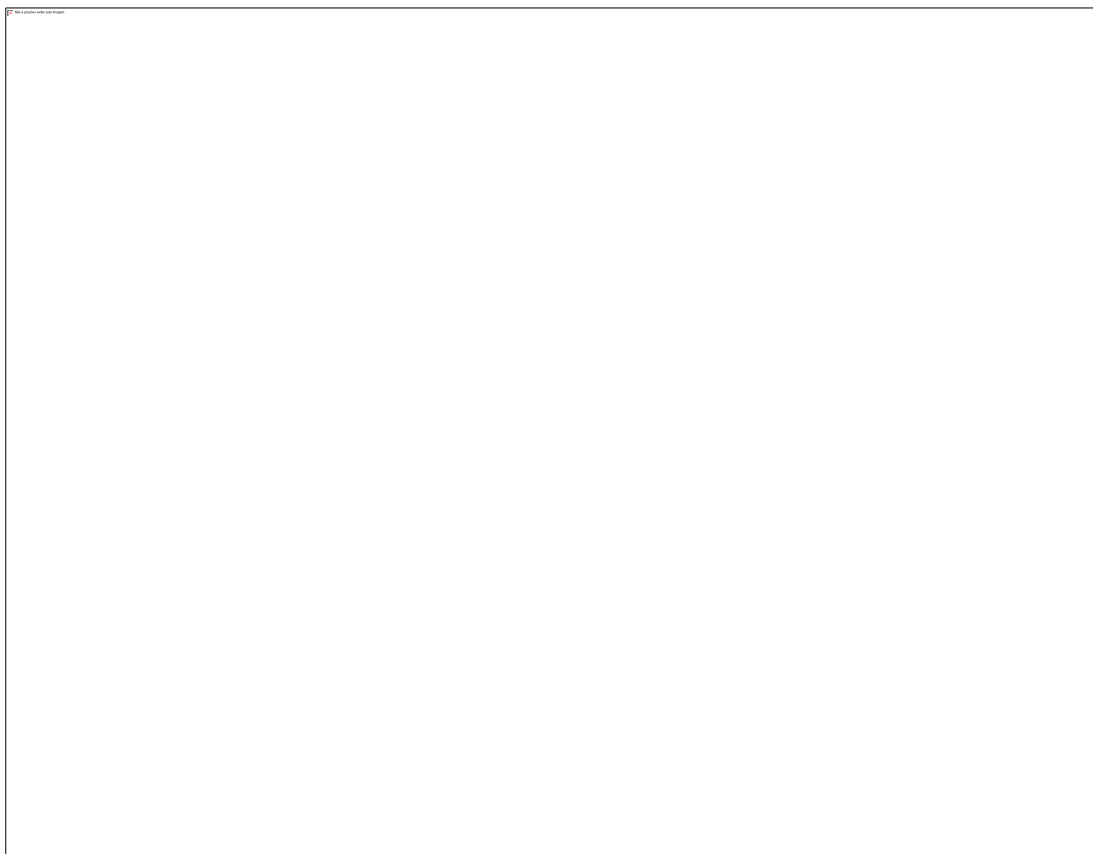


Figura 33. Abundância relativa de PTMs para os peptídeos quantificados em H2A e H2B. O eixo Y apresenta a abundância relativa em uma escala que vai de 0 a 1, onde 0 representa nenhuma quantidade e 1 representa 100%. As barras correspondem aos valores médios da abundância relativa, enquanto a barra de erro apresenta o desvio padrão (19 réplicas). Cada barra possui sua respectiva PTM na legenda do eixo X, e a barra do peptídeo não modificado está rotulado como “UnMod”. As cores sinalizam peptídeos diferentes.

Entre todos os peptídeos quantificados em H2A e H2B apenas a modificação H2AK139me3 demonstrou diferença significativa dos seus níveis em diferentes horários do dia. H2A.W.5.K139me3 demonstrou uma grande variação diurna demonstrando um pico no início do dia (ZT4) e o vale no final do dia (ZT12) (Figura 35). Em relação as modificações H2A.W.1K151me2 e H2A.W.1K151me1K154me1 encontradas no domínio C-terminal da histona H2A.W.1 não foi observado variações significativas ao longo do dia (figura 34).

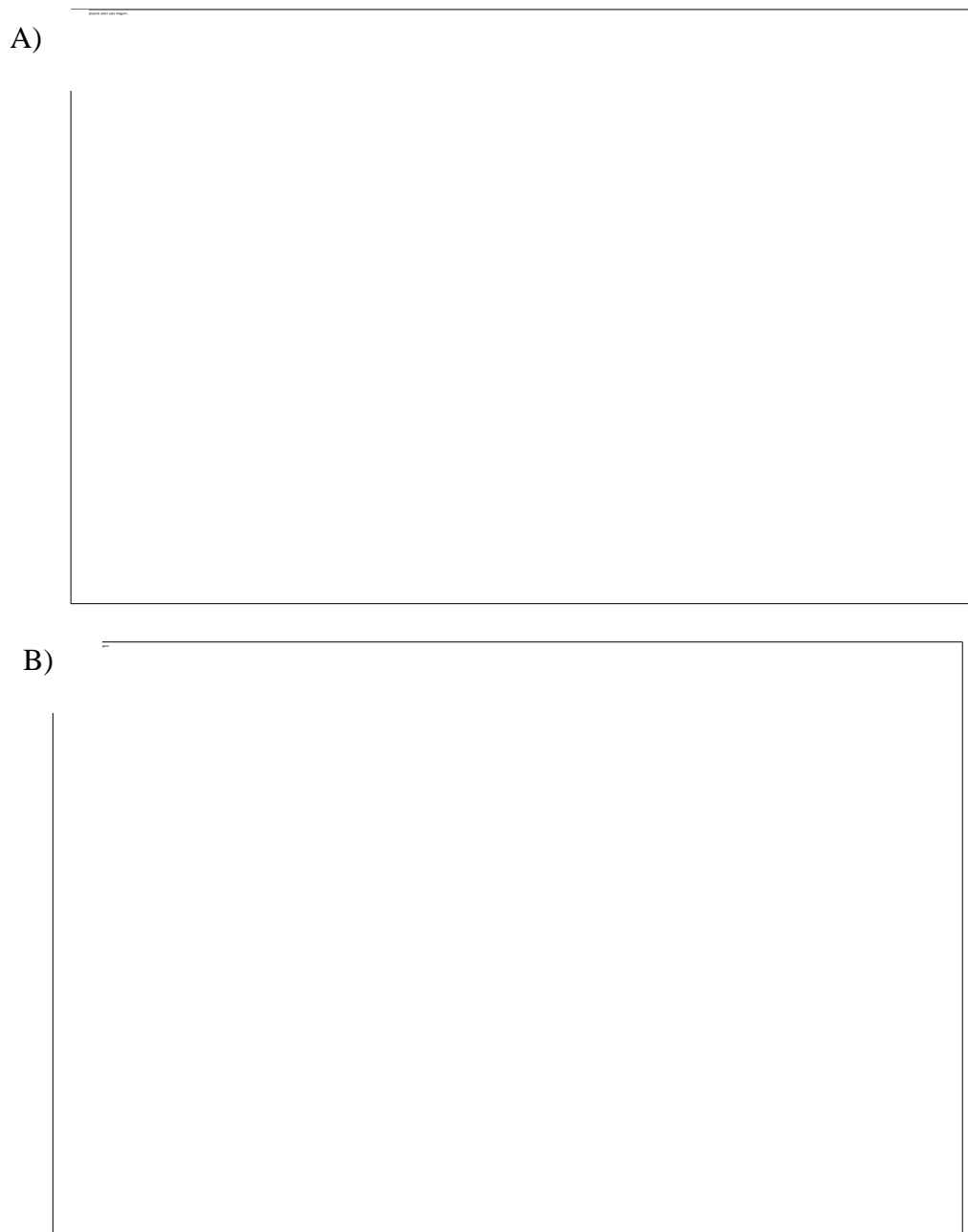


Figura 34. Abundância relativa de PTMs em H2A. (A) não foi observado ritmo significativo na variação diurna da abundância relativa de H2A.W.1.K151me2 e (B) H2A.W.1.K151me1K154me1. O período correspondente ao dia é indicado pela barra branca no eixo X enquanto o período noturno é indicado pela barra preta. A análise estatística foi realizada usando o teste t heteroscedástica de distribuição bicaudal para os pontos com maior amplitude, e as diferenças foram consideradas significativas para valores de p calculados $< 5\%$ destacados pelo símbolo “*”.

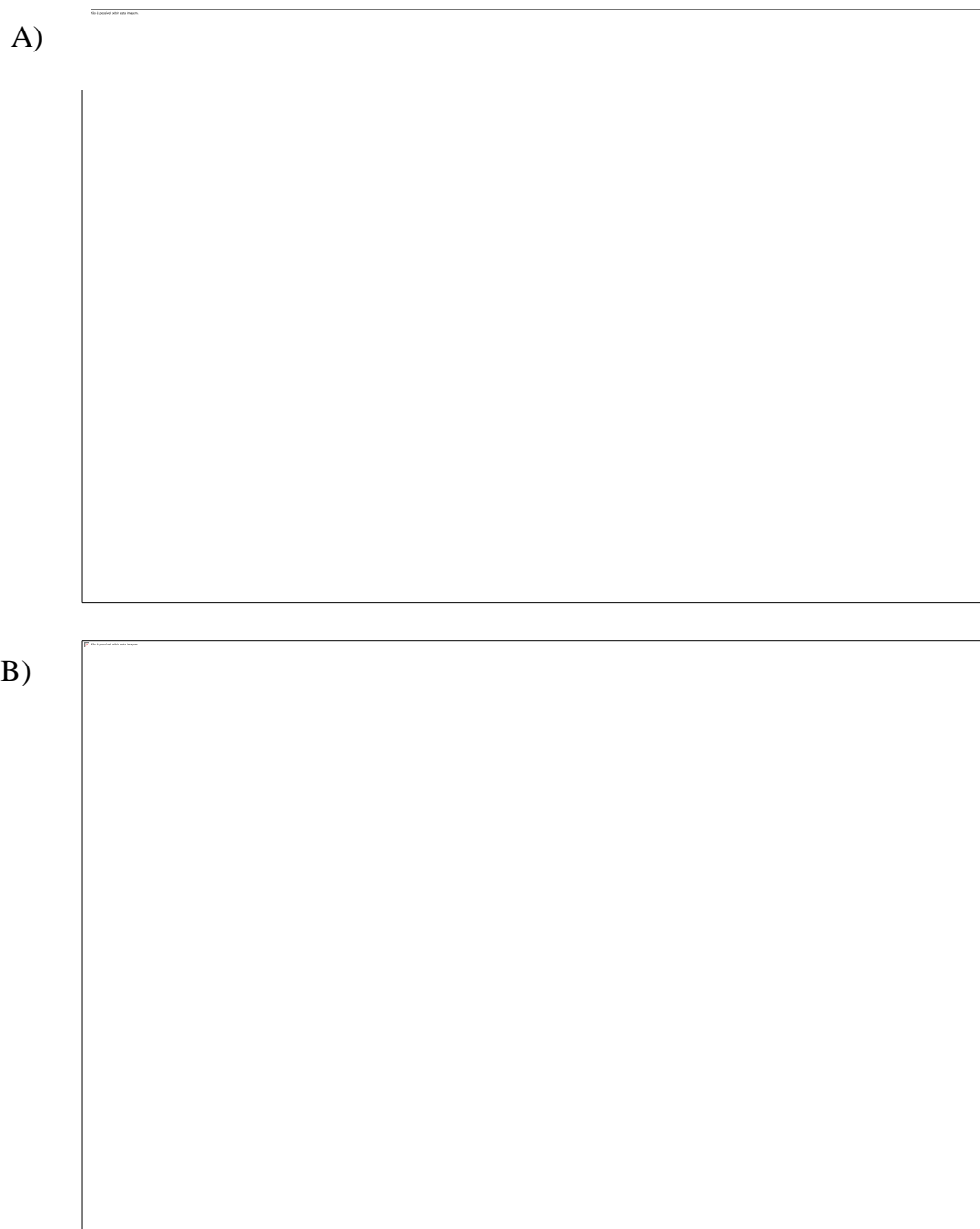


Figura 35. Abundância relativa de PTMs em H2A e H2B. (A) não foi observado ritmo significativo na variação diurna da abundância relativa de H2B.2K32acR33me1. (B) H2A.W.5.K139me3 apresentou redução média de 70,2% (min 44,9%/ max 85,5%, +/- 6,4% p-valor 0,002) quando comparado o início do dia (ZT4) com o fim do dia (ZT12). A análise estatística foi realizada usando o teste t heteroescedástica de distribuição bicaudal para os pontos com maior amplitude, e as diferenças foram consideradas significativas para valores de p calculados < 5% destacados pelo símbolo “*”.

5 Discussão

5.1 Importantes marcas epigenéticas foram identificadas em cana-de-açúcar

Histonas são os principais componentes estruturais da cromatina, atuando de maneira dinâmica, garantindo assim o acesso regulado à informação genética. Em histonas, uns dos principais eventos moleculares que alteram constantemente a organização da cromatina são as modificações pós-traducionais (*post-translation modifications*, ou PTMs). Neste trabalho, utilizamos uma combinação de técnicas baseadas em espectrometria de massas para mapear os diferentes tipos de modificações e suas respectivas posições. Além disso, nosso trabalho expandiu o conhecimento já disponível na literatura sobre PTMs em histonas de cana-de-açúcar ao quantificar relativamente os níveis de PTMs ao longo do dia e ao mesmo tempo expandir o conhecimento para além das Histonas H3 e H4, iniciadas em Moraes et al. (2015).

A maior parte das modificações em H3 e H4, acetilação e metilação, foram encontradas em diversos sítios já descritos tanto para cana-de-açúcar quanto para *Arabidopsis*. Além disso, novos sítios modificados também foram encontrados. Não obstante, este trabalho mapeou, pela primeira vez em cana-de-açúcar, modificações em H2A e H2B.

5.2 Histona H2A em cana-de-açúcar

Entre os eucariotos, as quatro histonas principais são extremamente conservadas, mas entre elas a histona H2A se diversificou, especialmente em plantas com flores, onde foi constatada expansões notáveis de variantes de H2A (KAWASHIMA *et al.*, 2015). Em entronó, identificamos 12 variantes de H2A pertencentes aos tipos H2A.W, H2A.Z, H2A.X e H2A Canônica (Tabela 7).

Em diferentes variantes de H2A, identificamos que a cauda N-terminal é predominante acetilada (lisinas 5 e 6, além de 9, 10 e 12, essa PTMs são equivalentes a H2AK5ac e H2AK9 em humanos) (Tabela 9). A acetilação da cauda N-terminal é descrita como uma característica conservada em diferentes organismos como leveduras (XIONG; WANG, 2011), humanos (TAFROVA; TAFROV, 2014) e também em *Arabidopsis* (ZHANG *et al.*, 2007). Esse resultado aponta para a conservação dessa característica também em cana-de-açúcar.

Entre as 12 variantes de histona H2A identificadas em entrenó, 6 foram anotados como pertencentes à classe de variante H2A.W (Tabela 7). A variante H2A.W é caracterizada pelo motivo C-terminal KSPKK e parece ser exclusiva de plantas com flores (KAWASHIMA *et al.*, 2015). A histona H2A.W é essencial para a condensação da cromatina e ao mesmo tempo exerce o papel crucial de definir heterocromatina em *Arabidopsis* (YELAGANDULA *et al.*, 2014). Neste trabalho, essa variante foi identificada como expressa em quantidades semelhantes a H2A canônica (Tabela 7). Levando em consideração o grande genoma poliploide de cerca de 10 Gb para cana-de-açúcar (GARSMEUR *et al.*, 2018), a abundância de H2A.W tanto em termos de quantidade de proteína e quanto a nível de número de variantes pode ter ligação com a importância da estabilidade de heterocromatina. Identificamos que as PTMS K141me3 K144me2 e K147me3 são as formas predominantes para a variante H2A.W.2 (Tabela 9). Além dessas modificações, identificamos outras PTM na cauda C-terminal de H2A.W que, aparentemente, são menos abundantes (Figura 19). Dentre as modificações identificadas, H2A.W4_K139me3 chamou atenção pela grande amplitude de variação ao longo do dia, porém essa modificação é ainda pouco conhecida (Figura 35B). PTMS na região C-terminal especialmente as que englobam o motivo C-terminal KSPKK provavelmente desempenham algum papel relevante para H2A.W, pois essa região é em parte responsável pela função de estabilizar o nucleossoma e interagir com a histona H1, o que leva a maior dificuldade de acesso ao DNA compactado (OSAKABE *et al.*, 2018). Dessa forma, é possível conjecturar que a célula poderia utilizar modificações pós tradicionais nessa região para regular o acesso à informação genética e devido ao fato de H2A.W4_K139me3 possuir variação diurna essa regulação pode inclusive envolver o relógio biológico. Assim, as modificações aqui descritas são importantes alvos para subsequentes estudos que pode lançar luz sobre a função dessas PTMs e sua possível interação com o relógio biológico.

H2A.X é outra variante de histona que foi identificada neste estudo. Verificamos que 2 histonas H2A.X são expressas em entrenó (Tabela 7). As variantes H2A.X contêm um motivo C-terminal conservado SQEF e a fosforilação dessa serina ocorre nos locais de dano ao DNA, H2A.X e um ponto crucial na orquestra da via de reparo do DNA (VAN ATTIKUM; GASSER, 2009). Neste trabalho verificamos que a PTM K13me3 é presente de forma predominante nessa histona em cana-de-açúcar (Tabela 9). H2AK13 foi recentemente identificada como um sítio que recebe a modificação ubiquitina e atua na resposta de quebra de dupla fita de DNA (HORN *et al.*, 2019). No entanto, pouco se sabe sobre a metilação desse resíduo. Além disso, nós também

identificamos as PTMs K10me1, K20me, K35me1, K38ac e R42me1 em H2A.X (Figura 17). Essas modificações podem participar do reparo de DNA em cana-de-açúcar, dado a função dessa variante. No entanto, é necessário mais estudo para avaliar essa possibilidade.

Entre as variantes de H2A em plantas, H2A.Z recebe considerável atenção devido seu papel crítico na regulação das respostas das plantas ao ambiente (KUMAR, 2018). Essa variante, no entanto, ainda possui um mecanismo de ação incerto. Em *Arabidopsis* o H2A.Z possui efeitos opostos na transcrição, dependendo da sua localização no gene (SURA *et al.*, 2017). Foi proposto que PTMs presentes em H2A.Z determinem o papel que essa variante possui na regulação da expressão gênica, enquanto a quantidade de H2A.Z nos genes é proporcional a atividade transcricional destes (GÓMEZ-ZAMBRANO; MERINI; CALONJE, 2019). Neste trabalho identificamos 2 histonas H2A.Z (Tabela 7). Os dados de expressão de H2A.Z.1 revelaram que há uma tendência de aumento da quantidade dessa histona no período noturno com o pico no fim da noite. Esse resultado está de acordo com resultados previamente descritos (Figura 13B). Por exemplo, em *Neurospora crassa*, foi demonstrado a deposição rítmica de H2A.Z no promotor do gene *FREQUENCY* que é fundamental para manter o relógio biológico funcional (LIU *et al.*, 2017). Em arroz, foram detectados 7099 genes com maiores deposições de H2A.Z nos tecidos à noite em comparação com 4597 genes apresentaram maiores deposições de H2A.Z durante o dia (ZHANG *et al.*, 2017). Em *Arabidopsis*, a deposição de H2A.Z é regulada pelo *Evening Complex* (EC) (TONG *et al.*, 2020). Informações de temperatura são integrados por EC que coordena sinais ambientais e endógenos (EZER *et al.*, 2017). EC reprime a expressão dos seus genes alvo no final do dia (SILVA *et al.*, 2020). Foi demonstrado que *EARLY FLOWERING 3* (ELF3), um componente do EC, interage diretamente com o complexo *SWI2 / SNF2-RELATED* (SWR1), e esse complexo por sua vez liga-se a *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR7* (PRR7) e PRR9 e catalisa a deposição de H2A.Z (GÓMEZ-ZAMBRANO *et al.*, 2018; MIZUGUCHI *et al.*, 2004; TONG *et al.*, 2020), o que coincide com a repressão desses genes ao entardecer. Esse mecanismo estabelece temporalmente os domínios repressivos da cromatina moldando assim a expressão ao entardecer (TONG *et al.*, 2020). Assim, diante da constatação de ritmos de H2A.Z em cana-de-açúcar e da importância dessa histona para o relógio biológico, é possível pensar que H2A.Z tem funções conservadas em cana de açúcar no que tange o relógio biológico.

Nosso trabalho também identificou acetilação das lisinas 12, 17 e 25 além de diferentes níveis de metilação nas lisinas 17, 21, 2 e 26 (Figura 17). No entanto, não foi possível quantificar

essas modificações de maneira diurna. A acetilação de H2A.Z na cauda N-terminal está associada a ativação da transcrição (BERR; SHAFIQ; SHEN, 2011; GIAIMO *et al.*, 2019). Já a metilação da cauda N-terminal de H2A.Z é pouco conhecida. Levando em consideração a importância de H2A.Z, esse trabalho ampliou o conhecimento para histona H2A, suas variantes e PTMs em cana-de-açúcar e estabeleceu importantes alvos para futuras investigações.

5.3 Histona H2B em cana-de-açúcar

Além de H2A, a histona H2B também foi avaliada. A H2B é classicamente descrita como a histona menos conservada do octâmero que forma os nucleossomas (CHABOUTÉ *et al.*, 1993). Em cana-de-açúcar, foram identificadas 9 histonas H2B expressas no entrenó (Tabela 7). Ao analisar a sequência dessas histonas, foi verificada uma grande similaridade entre as diferentes sequências com dissimilaridades concentradas na cauda N-terminal, característica essa comum em plantas (CHABOUTÉ *et al.*, 1993). As variantes de H2B são pouco conhecidas, apenas as isoformas H2BFWT e H2B1A expressas em testículo humano foram estudadas em profundidade até agora (MOLDEN *et al.*, 2015). Neste estudo, identificamos que duas variantes de H2B demonstraram uma pequena oscilação diurna (Figura 14). Como oscilações de H2A.Z desempenham papel importante no relógio biológico, é possível que existam um paralelo funcional para H2B. No entanto, são necessárias mais investigações sobre este ponto.

Neste trabalho também identificamos diversas PTMs em H2B. Dentre essas modificações, H2B.4K32acR33me1 (Figura 35) e H2B.K3me3 (Tabela 8) se destacam devido à sua maior facilidade de quantificação, o que pode ser explicado pela maior abundância. Em animais, H2BK32 faz parte do domínio N-terminal HBR (*H2B repression domain*) com lisinas fundamentais para facilitar a repressão transcricional através da estabilização histona H2B com o DNA (PARRA *et al.*, 2006). No entanto, dada a dissimilaridade da cauda N-terminal entre animais e plantas, não é possível afirmar que existe um paralelo funcional com animais, especialmente porque o domínio HBR possui homologia com a região correspondente as proximidades da lisina 50 em H2B de cana-de-açúcar. H2B.K3me3 já foi descrita em *Neurospora crassa* (ANDERSON *et al.*, 2010). Em H2B, os estudos de PTMs exploraram bem o papel da ubiquitinação, onde foi demonstrado que os genes do relógio são monoubiquitinados em plantas, e isso possui efeitos substanciais na expressão oscilatória dos genes do relógio circadiano (DU *et*

al., 2019). Dada as poucas informações na literatura a respeito das modificações nesta variante, as PTMs identificados neste trabalho se tornam alvos interessantes para investigações futuras.

5.4 Histona H3 e H4 em cana-de-açúcar

Para a histona H4, foram encontradas PTMs em toda a extensão da proteína, com destaque especial para o domínio central (Figura 17). As PTMs encontradas aqui acrescentam novas informações para o que foi descrito anteriormente para cana-de-açúcar (Moraes et al. 2015). Até então, as PTMs identificadas para H4 em cana-de-açúcar tinham sido localizadas apenas na cauda N-terminal. Essas diferenças podem ser explicadas por uma maior sensibilidade do método empregado neste trabalho, e ao maior número de corridas de LC-MS/MS. As modificações encontradas em H4 no domínio central e na cauda C-terminal já foram descritas em animais (LUENSE *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2019). No entanto, essas modificações ainda não foram bem estudadas em plantas. Embora várias PTMs em H4 tenham sido identificadas, nosso estudo não conseguiu quantificar modificações em histona H4 de maneira eficiente. Essa dificuldade em quantificar PTMs em H4 pode ter sua causa relacionada ao desenho experimental que utilizamos, que foi adaptado de protocolo anterior que obteve bons resultados para histona H3. Dessa forma, otimizações tais como adequações na cromatografia e no preparo da amostra seriam necessárias para um melhor estudo de PTMs em histonas H4.

De maneira geral, para a histona H3, as PTMs encontradas nesse trabalho foram semelhantes às previamente descritas na literatura (Figura 15). Assim como descrito por Moraes et al. (2015), observamos que a histona H3 parece possuir grupos acetil limitados à cauda N-terminal. No entanto, estudos utilizando a técnica ChiP demonstrou que a H3K56ac, localizada na região central da histona, é presente em *Arabidopsis* (ROUDIER et al., 2011). Assim, o método utilizado parece não sensível para essa modificação, o que é corroborado por outros estudos que também não encontraram acetilação no domínio central para histona H3 por meio de técnicas baseadas em espectrometria de massas (ZHANG et al., 2007; WU et al., 2009).

Em nosso trabalho, verificamos que as modificações mais abundantes e de fácil detecção foram a metilação e acetilação nas lisinas 9, 14, 18, 23, 27, 36 e 37 para H3. Em relação à mono e dimetilação em argininas, podemos detectar os sítios 8, 17, 26 e 40, sendo que esta última PTM foi exclusivamente identificada para H3.3 (Figura 15).

Entre as modificações observadas para H3, o peptídeo correspondente aos resíduos 27-40 é o único que possui modificações e é diferente para H3.1 e H3.3. Dessa forma, as PTMs identificadas podem ser atribuídas especificamente para H3.1 ou H3.3. Identificamos muitas combinações de PTMs nesse peptídeo, porém H3.3 possui mais combinações de PTMs do que H3.1 (Figura 15). Essa grande diversidade de modificações nesse peptídeo provavelmente reflete a importância dessa região para as funções dessas proteínas. H3.3 possui funções distintas de H3.1 em *Arabidopsis* (JACOB *et al.*, 2014). Enquanto a H3.3 está associada a genes ativamente expressos em animais e plantas, a H3.1 é incorporada no genoma na replicação e é associada a regiões não ativas transcricionalmente (HAKE; ALLIS, 2006; JACOB *et al.*, 2014; JIANG; BERGER, 2017). Estudos por imunoprecipitação da cromatina (ChiP) mostraram que o H3.3 se associa aos corpos dos genes (região entre o início e o de término da transcrição) e é positivamente associado com a transcrição. Foi proposto que H3.3 inibe a compactação da cromatina mediada por H1, permitindo o acesso de metiltransferases ao DNA, levando assim à metilação do corpo do gene (WOLLMANN *et al.*, 2017). Em H3.1 as PTMs mais abundantes foram K27me1/2 (Figura 28). A metilação da lisina 27 na histona H3 (H3K27me) pelo complexo repressivo Polycomb 2 (PRC2) é uma marca característica da heterocromatina facultativa em vários organismos (WILES; SELKER, 2017). Em plantas PRC1 e, principalmente, PRC2 operaram de maneira interdependentes de acordo com o contexto gênico para garantir a repressão da transcrição em áreas de heterocromatina (WANG; SHEN, 2018). Dessa forma, nossos resultados para cana-de-açúcar concordam com observado em outros organismos, pois as PTMs mais abundantes em H3.1 são marcas repressivas. No entanto, nosso trabalho demonstrou menor quantidade de H3.1K36me1 do que anteriormente descrito (MORAES *et al.*, 2015) e por outro lado a modificação H3.1K27ac foi encontrada (Figura 28).

Em relação à quantificação das modificações exclusivas de H3.1 ao longo do dia, não observamos nenhuma variação significativa em nenhuma combinação das modificações para o peptídeo 27-40 (Figura 28). Devido ao fato das modificações de H3.1 serem associadas com heterocromatina (STROUD *et al.*, 2012), realmente não é surpreendente não haver ritmos nessas modificações.

Entre as PTMs identificadas exclusivamente para H3.3 (peptídeo 27-40), verificamos que K36me2K37me1 é a PTM mais abundante, representando cerca de 30%, entre 24 combinações de PTMs identificadas (Figura 29). Em segundo lugar, K36me1/2/3 e K36ac representam cerca

de 10%. Embora PTMs em H3K36 sejam marcas para genes ativos conservadas entre diferentes organismos, plantas parecem utilizar mecanismos biológicos distintos de animais. Foi demonstrado que K36me_{2/3} é uma marca para transcrição ativa de genes envolvidos na regulação do tempo de floração e outros processos em *Arabidopsis* (XU *et al.*, 2008). A função primária de K36me₂ é ligada ao alongamento da transcrição e em plantas essa modificação é similar ao papel de K36m₃ em animais. Além disso, H3K36me₂ está altamente correlacionado com modificações de m⁶ e RNAm em plantas, o que mostra que essa modificação é importante para a correção das modificações em RNAm e do contexto da cromatina na transcrição (SHIM *et al.*, 2020). Em animais e leveduras, o H3K36me₃ está associado ao alongamento da transcrição com pico na extremidade 3'. Em contrapartida, H3K36ac em leveduras é restrita aos promotores. Em plantas, o H3K36me₃ atinge o pico na metade 5' dos genes, e H3K36ac é restrito a aproximadamente 480 pb distal do sítio de iniciação da transcrição. Em *Arabidopsis*, H3K36ac e H3K36me₃ são encontrados em regiões sobrepostas (a jusante do sítio de iniciação da transcrição) onde H3K36ac possui níveis inversos a H3K36me₃ (MAHREZ *et al.*, 2016). Nosso trabalho constatou que, em cana-de-açúcar, grande parte de K36ac é encontrada juntamente com K37me₁, enquanto K36me₃ é encontrada isoladamente (Figura 29). Esses resultados demonstram que PTMs presentes em H3.1 e H3.3 são, em grande parte, evolutivamente conservadas.

Este trabalho também identificou mono- e di- metilação em H3.3R40 (Figura 15). Essas PTMs foram recentemente descritas em células humanas (LI *et al.*, 2017), e, até então, suas funções foram pouco exploradas. Levando em consideração que a diferença estrutural entre H3.1 e H3.3 são somente 4 aminoácidos, nós hipostenizamos que H3.3R40me_{1/2} pode possuir papel nas funções específicas dessa histona.

Em relação às quantificações diurnas das modificações em H3.3, observamos dois peptídeos que apresentaram ritmos (Figura 31). O primeiro foi K37me₁, que apresentou um pico no início do dia e seu vale no crepúsculo. A função dessa PTM ainda não está clara em plantas. O H3K37me₁ antagoniza a H3K36me₁ no licenciamento de replicação de DNA, demonstrando que a mutação do K37 para alanina (A), que simula o fenótipo K37me₁, causou um atraso na transição G₁ para S e diminuiu a afinidade de ligação de todo o complexo do fator de licenciamento MCM (*mini-chromosome maintenance proteins*) (TESSARZ *et al.*, 2014) (KOUZARIDES, 2007). Além disso, foi demonstrado que, em *Schizosaccharomyces pombe*, a metiltransferase SET7 é responsável pela metilação de K37, e que a ocorrência desta modificação é importante no curso

da gametogênese (SHEN *et al.*, 2019). Em cana-de-açúcar, a abundância relativa dessa modificação, tomada de maneira isolada, representa entre 1% a 2% do peptídeo 27-40 de H3.3 (Figura 29). A variação diurna observada para essa variação pode ser um efeito secundário causado por outros ritmos ou mesmo essa modificação ser enriquecida em tecido específico. Dessa forma, são necessários mais estudos sobre essa modificação para melhor entender seu papel no relógio circadiano.

Encontramos também ritmos na combinação das modificações K27me1K36acK37me1 (Figura 31). Essa combinação de modificações possui um pico no crepúsculo e menor nível no início da noite. Essa modificação representa uma porcentagem consideravelmente pequena do total do peptídeo (0.5% a 1%), e possui uma amplitude pequena. Não se conhece o impacto dessa combinação de modificações para plantas. Esse ritmo pode ser um efeito secundário de outros ritmos biológicos, porém mais estudos são necessários para melhor entender essas modificações. No entanto, o estudo desse peptídeo pode ser muito árduo devido à baixa abundância e sua complexidade.

Além das modificações específicas, outras modificações em H3 também foram identificadas. H3K4m3 foi demonstrada como um importante ponto na regulação do relógio biológico em *Arabidopsis* (MALAPEIRA; KHAITOVA; MAS, 2012). A enzima responsável pela trimetilação de H3K4 em *Arabidopsis* é conhecida com ATXR3 ou SDG2. Para eucariotos se sabe que metilação em H3K4 é uma marca encontrada exclusivamente em promotores de genes ativos (FENG; JACOBSEN, 2011). Trabalhos conduzidos por Fiorucci *et al.* (2019) sugerem que H3K4me3 é importante para a indução efetiva de genes durante transições de estados celulares ao invés de ser uma marcar “on/off”. Foram identificados apenas monometilação em H3K4 em entrenó (Figura 15). De maneira geral nosso protocolo teve menor sensibilidade para identificar e quantificar essa modificação, isso se deve provavelmente à extensiva digestão do início da proteína que leva a peptídeos menores, assim uma adaptação deste protocolo poderia ser considerada para o estudo de PTMs em H3K4.

Outras modificações importantes são aquelas nas posições H3K9 e H3K14 encontradas no peptídeo correspondente aos resíduos 9-26 em H3. H3K9me3 é presente em heterocromatina em metazoários enquanto em plantas H3K9me2 possui esse atributo (FENG; JACOBSEN, 2011). Este trabalho identificou e quantificou metilação e acetilação em H3K9 e H3K14 (Figura 23 e 24). Observamos que as modificações mais abundantes foram H3K14ac, H3K9me1, e essas

modificação foram encontradas principalmente de forma isolada, provavelmente devido a funções antagônicas (Figura 24). Nossos achados são similares aos previamente encontrados para cana-de-açúcar, exceto no que tange H3K9me2, onde nosso trabalho demonstrou menor abundância relativa dessa PTM do que previamente relatado por Moraes e colaboradores (2015). Essa diferença pode conceber a hipótese de que a abundância de H3K9me2 pode variar de acordo com as condições experimentais. Aqui também observamos que o peptídeo de H3 correspondente aos resíduos 9-26 contendo a combinação H3K9me1K14ac apresentou um pico entre o início da manhã e o meio do dia enquanto seu vale se deu à noite (Figura 23). O achado de ritmo biológico para o peptídeo contendo a combinação das modificações H3K9me1K14ac pode ser causado por um efeito de transição onde durante o dia há maior atividade de remoção de metilação e concomitantemente adição de acetilação entre essas formas e, portanto, maior nível desse peptídeo durante o dia.

Esse achado faz sentido com as evidências que demonstram a correlação das marcas epigenéticas com os ritmos biológicos, por exemplo, foi constatado que a dinâmica de acetilação e deacetilação é importante para a regulação da expressão de *TOC1* em *Arabidopsis* (PERALES; MÁZ, 2007). Este trabalho também observou o aumento de RNAm de histona deacetilase no período noturno em folha (Figura 8) o que concorda com achados em *Arabidopsis* (PERALES; MÁZ, 2007). Posteriormente, foi demonstrado, também em *Arabidopsis*, que as regiões reguladoras dos genes centrais do relógio biológico *TOC1* e *LHY* acumulam as modificações H3K4me3 e H3K9/14ac, onde as marcas de acetilação correlacionam em fase com os níveis de RNA mensageiro para esses genes, enquanto que as marcas de metilação pareceriam demonstrar uma dinâmica de lenta acumulação e remoção nas regiões regulatórias, o que foi interpretado como um mecanismo que garante a existência de um ritmo molecular suave ao invés de um ritmo marcado por transições bruscas (SONG; NOH, 2012).

A importância de H3K4me3 e H3K9ac para o relógio biológico em plantas foi ainda mais explorado em um trabalho prévio realizado por Song et al (2019). Foi demonstrado que os genes do oscilador central *CCA1/LHY* estão regulam a expressão das demetilase *JMJ14* e da trimetiltransferase *SDG2* responsáveis por catalisar a remoção e a inserção de grupos metil na lisina 4 da histona H3. Além disso, as PTMs em K4me3 e K9ac influenciam na expressão de genes do oscilador circadiano, incluindo *CCA1* e *LHY*. Não obstante, foi mostrado que, embora essas modificações estejam associadas à regulação diurna de 20 a 30% dos genes expressos, onde

a maioria (86%) dos genes-alvo H3K4me3 e H3K9ac se sobrepõem, apenas 13% dos genes em fases da manhã e 22% das fases da noite tiveram picos de H3K4me3 e H3K9ac, sugerindo papéis específicos dessas modificações de histonas na expressão gênica diurna. Dessa forma, existe uma elaborada dança entre os genes do relógio circadiano, a expressão SDG2 e JMJ14, e as modificações de histonas. Este intrincado sistema recíproco entre modificadores de cromatina e osciladores circadianos do relógio circadiano orchestra a expressão gênica diurna que governa o crescimento e desenvolvimento das plantas (SONG *et al.*, 2019). No entanto, esse artigo utilizou da técnica de ChiP para detectar o ritmo dessas modificações associadas diretamente ao relógio. Levando em consideração que a abordagem por espectrometria de massas utilizada aqui detecta apenas oscilação geral das PTMs, modificações rítmicas específicas a um conjunto de genes podem ter sido diluídas diante de outros processos biológicos, e isso pode explicar a não detecção de um ritmo claro para H3K4me3 e H3K9ac. Dessa forma, para confirmar se este processo é conservado em cana-de-açúcar seria importante um estudo através de ChiP e estudo dos peptídeos específicos por técnicas de *target proteomics*.

O perfil de aumento do nível de acetilação durante o dia e posterior redução noturna proposto para *Arabidopsis* foi evidenciado para o peptídeo 18-KQLATKAAR-26 em H3 nos sítios K18 e K23 (Figura 26 e 27). Mesmo após observamos que esse peptídeo está predominantemente na forma não modificada (Figura 27), o que já foi demonstrado para cana-de-açúcar (MORAES *et al.*, 2015), as suas formas acetiladas juntamente com a monometilação em R26 apresentaram um perfil rítmico, o que pode sugerir que as modificações presentes nesses sítios podem também ser importante para o relógio biológico. Pouco foi estudado sobre as modificações em H3K18ac e H3K23 em plantas no contexto de ritmos biológicos. Foi demonstrado que essas modificações são associadas com status transcricional ativo em genes em *Arabidopsis* e arroz, e que H3K23ac é correlacionado com H4K16ac. Além disso, evidências apontam que essas modificações podem ter papéis específicos distintos em diferentes espécies (LU *et al.*, 2015). H3K18ac também parece está associado à demetilação do DNA em *Arabidopsis* (NIE *et al.*, 2019).

Os aumentos dos níveis de acetilação observados durante o período do dia para as modificações e sua subsequente queda noturna pode ser um reflexo de um complexo sistema que evolui diversos fatores. A redução noturna dos níveis de acetil está correlacionada com o aumento dos níveis de transcrição de histona deacetilase. Entre as deacetilases, HDA6 é

reconhecida como fator epigenético envolvido na manutenção da metilação em sítios CG e CHG, na regulação do desenvolvimento e silenciamento de genes (PIKAARD; SCHEID, 2014). Nossos resultados também evidenciaram que, dentre os genes modificadores de histona expressos em cana-de-açúcar sob condições circadianas, o grupo de histona deacetilase é o grupo com maior porcentagem de transcritos rítmicos, mais uma vez apontando a importância desse processo biológico. Recentemente foi demonstrado que Histona deacetilases podem atuar diretamente na regulação temporal dos genes *CCA1* e *PRR9* durante a fase noturna em *Arabidopsis*. Foi proposto que as proteínas de fase noturna AFR podem interagir com o complexo correpressor Sin3-HDAC e levar a deacetilação de H3 nas regiões do gene *CCA1* e *PRR9*, promovendo assim o declínio da expressão desses genes na fase noturna. Esse mecanismo atuaria como fator importante para a robustez dos ritmos moleculares (LEE; HONG; SEO, 2019).

Outro fator que poderia estar associado aos níveis rítmicos de acetilação seria uma correlação entre o estado metabólico e os ritmos circadianos através dos metabólitos e segundo mensageiros que funcionam como substratos e/ou cofatores que influenciam a atividade enzimática dos modificadores da cromatina, acoplando assim, a regulação gênica dependente da cromatina com o metabolismo energético da célula. Para mamíferos, foi proposto que os níveis flutuantes de NAD⁺, em função da disponibilidade de nutrientes, poderia influenciar a catálise da sirtuína que remove o grupo acetil nos resíduos de lisina em histonas (NAKAHATA *et al.*, 2008). Estudos filogenéticos demonstraram que plantas vasculares possuem ortólogos para sirtuína onde *SIRT4* e *SIRT6* foram encontrados em angiosperma (GREISS; GARTNER, 2009). Em *Arabidopsis*, foi identificada uma Sirtuína pertencente à classe II que interage com o metabolismo energético mitocondrial (KÖNIG *et al.*, 2014). Em cana-de-açúcar nós identificamos 3 sequências ortólogas à sirtuína.

6 Conclusão

O estudo de cana-de-açúcar cultivadas em campo demonstrou que o relógio biológico é funcional e que os genes estudados, no geral, possuem uma oscilação com amplitude menor nos órgãos entrenó (E 5/6) do que em folha. Os genes relacionados com a regulação de cromatina possuem maior número de transcritos rítmicos em condições diurnas do que em condições circadianas em folha. Além disso, demonstramos que, entre os genes estudados por RT-qPCR, HDAC6 possui um padrão de acúmulo noturno em folha.

A análise do nível de histonas ao longo do dia revelou que, para a variante H2A.Z.1 e para a histona H3, existem evidências para acúmulo diferencial dessas proteínas em pontos específicos do dia. O mesmo fenômeno não foi observado para H4 e as outras variantes de H2A e H2B. Os mecanismos por trás desses eventos, e sua importância ainda não são entendidas.

A abordagem experimental empregada foi capaz de identificar centenas de PTMs para histona de cana-de-açúcar, muitas dessas modificações já descritas anteriormente e algumas inéditas. Em especial, foi demonstrado que as histonas H2A e H2B possuem PTMs, e o primeiro catálogo de PTMs para essas histonas em cana-de-açúcar foi criado.

A cromatina de cana-de-açúcar possui PTMs que variam ao longo do dia. Foi identificado que as modificações H2A.W.1K139me3, H3.3K27me1K36acK37me1, H3.3K37me1, H3K18acK23ac, H3K18ac, H3K23acR26me1 e H3K9me1K14ac possuem acúmulo em pelo menos um ponto ao longo do dia. Essas modificações são descritas na literatura como importantes atores na regulação da expressão gênica. Assim, é possível especular que elas atuam juntamente com o relógio biológico em cana-de-açúcar a fim de manter o controle circadiano da fisiologia vegetal.

Este trabalho demonstrou evidências de acumulação rítmica de PTMs em histonas de maneira diurna e descobriu importantes alvos que podem contribuir para o melhor entendimento da influência do relógio biológico sob cana-de-açúcar. Levando em consideração que o relógio controla eventos fisiológicos como crescimento e florescimento, esse estudo pode abrir importantes caminhos para o futuro desenvolvimento de cultivares que ajudarão a sociedade enfrentar os desafios na área de produção de alimento e recursos energéticos.

7 Referências bibliográficas

- ADAMS, Sally; CARRÉ, Isabelle A. Downstream of the plant circadian clock: output pathways for the control of physiology and development. **Essays Biochem**, [S. l.], v. 49, p. 53–69, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BSE0490053>. Acesso em: 22 mar. 2017.
- AEBERSOLD, Ruedi; MANN, Matthias. **Mass spectrometry-based proteomics**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature01511>
- AIHARA, Hitoshi *et al.* Nucleosomal histone kinase-1 phosphorylates H2A Thr 119 during mitosis in the early *Drosophila* embryo. **Genes and Development**, [S. l.], v. 18, n. 8, p. 877–888, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/gad.1184604>. Acesso em: 22 ago. 2020.
- ALABADÍ, D. *et al.* Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the *Arabidopsis* circadian clock. **Science**, [S. l.], v. 293, n. 5531, p. 880–883, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1061320>. Acesso em: 22 ago. 2020.
- ANDERSON, D. C. *et al.* Extensive and varied modifications in histone H2B of wild-type and histone deacetylase 1 mutant *Neurospora crassa*. **Biochemistry**, [S. l.], v. 49, n. 25, p. 5244–5257, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi100391w>
- ARANDA, Patrick S.; LAJOIE, Dollie M.; JORCYK, Cheryl L. Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. **Electrophoresis**, [S. l.], v. 33, n. 2, p. 366–369, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/elps.201100335>
- ATAMIAN, Hagop S. *et al.* Circadian regulation of sunflower heliotropism, floral orientation, and pollinator visits. **Science**, [S. l.], v. 353, n. 6299, p. 587–590, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.aaf9793>
- AUGUSTIJN, Dieuwertje; DE GROOT, Huub J. M.; ALIA, A. A robust circadian rhythm of metabolites in *Arabidopsis thaliana* mutants with enhanced growth characteristics. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 14, n. 6, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218219>
- BANERJEE, Taraswi; CHAKRAVARTI, Debabrata. A Peek into the Complex Realm of Histone Phosphorylation . **Molecular and Cellular Biology**, 1752 N St., N.W., Washington, DC, v. 31, n. 24, p. 4858–4873, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MCB.05631-11>
- BERR, Alexandre; SHAFIQ, Sarfraz; SHEN, Wen Hui. **Histone modifications in transcriptional activation during plant development**. [S. l.]: Elsevier, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.07.001>
- BESANT, Paul G.; ATTWOOD, Paul V. **Histone H4 histidine phosphorylation: Kinases, phosphatases, liver regeneration and cancer**. [S. l.]: Portland Press, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BST20110605>. Acesso em: 22 ago. 2020.
- BNDS. **Perspectivas do investimento 2015-2018 e panoramas setoriais**. Rio de Janeiro: Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social, 2014. *E-book*. Disponível em: <https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/2842>. Acesso em: 24 mar. 2017.
- BOWLER, Chris *et al.* Chromatin techniques for plant cells. **Plant Journal**, [S. l.], v. 39, n. 5, p. 776–789, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02169.x>. Acesso em: 19 mar. 2017.

BRUCE ALBERTS *et al.* **Molecular Biology of the Cell**. 4th edition ed. New York: Garland Science, 2002. *E-book*. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/>. Acesso em: 19 abr. 2020.

CHABOUTÉ, M. E. *et al.* Histones and histone genes in higher plants: Structure and genomic organization. **Biochimie**, [S. l.], v. 75, n. 7, p. 523–531, 1993. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(93\)90057-Y](https://doi.org/10.1016/0300-9084(93)90057-Y)

CHEN, Z. Jeffrey; MAS, Paloma. **Interactive roles of chromatin regulation and circadian clock function in plants**. [S. l.]: BioMed Central Ltd., 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1672-9>

CONAB. ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA - Cana-de-açúcar. **Primeiro levantamento**, Brasília, p. 62, 2020. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>

COVINGTON, Michael F. *et al.* Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. **Genome Biology**, [S. l.], v. 9, n. 8, p. R130, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-8-r130>

COX, Jürgen *et al.* Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. **Molecular and Cellular Proteomics**, [S. l.], v. 13, n. 9, p. 2513–2526, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.031591>

COX, Jürgen; MANN, Matthias. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 26, n. 12, p. 1367–1372, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt.1511>. Acesso em: 29 mar. 2018.

CREUX, Nicky; HARMER, Stacey. Circadian rhythms in plants. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [S. l.], v. 11, n. 9, p. a034611, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034611>

D'HONT, Angélique *et al.* Sugarcane: A Major Source of Sweetness, Alcohol, and Bio-energy. In: **Genomics of Tropical Crop Plants**. [S. l.]: Springer New York, 2008. p. 483–513. *E-book*. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-0-387-71219-2_21

DAL-BIANCO, Maximiller *et al.* Sugarcane improvement: how far can we go? **Current Opinion in Biotechnology**, [S. l.], v. 23, n. 2, p. 265–270, 2012. Disponível em: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2011.09.002>

DANTAS, Luíza Lane de Barros *et al.* Rhythms of Transcription in Field-Grown Sugarcane Are Highly Organ Specific. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63440-7>. Acesso em: 26 ago. 2020.

DARWIN, Charles. **The movements of leaves [1]**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 1881. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/023603d0>

DELANGE, R. J. *et al.* Calf and pea histone IV. 3. Complete amino acid sequence of pea seedling histone IV; comparison with the homologous calf thymus histone. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 244, n. 20, p. 5669–5679, 1969.

DIAS, Marina O. S. *et al.* Improving second generation ethanol production through optimization of first generation production process from sugarcane. **Energy**, [S. l.], v. 43, n. 1, p. 246–252, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.energy.2012.04.034>

DODD, Antony N. *et al.* Cell biology: Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. **Science**, [S. l.], v. 309, n. 5734, p. 630–633, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1115581>

DOERR, Allison. **Mass spectrometry: Targeting with PRM**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2193>

DOERR, Allison. **DIA mass spectrometry**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nmeth.3234>

DU, Shenxiu *et al.* A Novel Loop: Mutual Regulation Between Epigenetic Modification and the Circadian Clock. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 10, p. 22, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00022>. Acesso em: 12 abr. 2020.

EZER, Daphne *et al.* The evening complex coordinates environmental and endogenous signals in Arabidopsis. **Nature plants**, [S. l.], v. 3, p. 17087, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.87>

FAO. **Sugarcane | Land & Water | Food and Agriculture Organization of the United Nations | Land & Water | Food and Agriculture Organization of the United Nations**. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <http://www.fao.org/land-water/databases-and-software/crop-information/sugarcane/en/>. Acesso em: 1 maio. 2020.

FENG, Dan; LAZAR, Mitchell A. Clocks, Metabolism, and the Epigenome. **Molecular cell**, [S. l.], v. 47, n. 2, p. 158–167, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.026>

FENG, Suhua; JACOBSEN, Steven E. **Epigenetic modifications in plants: An evolutionary perspective**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.12.002>. Acesso em: 10 fev. 2020.

FIORUCCI, Anne Sophie *et al.* Arabidopsis S2Lb links AtCOMPASS-like and SDG2 activity in H3K4me3 independently from histone H2B monoubiquitination. **Genome Biology**, [S. l.], v. 20, n. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1705-4>

FUCHS, Stephen M.; LARIBEE, R. Nicholas; STRAHL, Brian D. Protein Modifications in Transcription Elongation. **Biochimica et biophysica acta**, [S. l.], v. 1789, n. 1, p. 26–36, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2008.07.008>

GARCIA, Benjamin A. *et al.* Chemical derivatization of histones for facilitated analysis by mass spectrometry. **Nature protocols**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 933–938, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.106>. Acesso em: 20 dez. 2018.

GARSMEUR, Olivier *et al.* A mosaic monoploid reference sequence for the highly complex genome of sugarcane. **Nature Communications**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05051-5>

GENDLER, Karla; PAULSEN, Tara; NAPOLI, Carolyn. ChromDB: The Chromatin Database. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 36, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkm768>. Acesso em: 1 abr. 2020.

GESSLER, Arthur *et al.* Night and day – Circadian regulation of night-time dark respiration and light-enhanced dark respiration in plant leaves and canopies. **Environmental and Experimental Botany**, [S. l.], v. 137, p. 14–25, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.01.014>

- GIAIMO, Benedetto Daniele *et al.* **The histone variant H2A.Z in gene regulation.** [*S. l.*]: BioMed Central Ltd., 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13072-019-0274-9>
- GÓMEZ-ZAMBRANO, Ángeles *et al.* Arabidopsis SWC4 Binds DNA and Recruits the SWR1 Complex to Modulate Histone H2A.Z Deposition at Key Regulatory Genes. **Molecular Plant**, [*S. l.*], v. 11, n. 6, p. 815–832, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.03.014>. Acesso em: 23 ago. 2020.
- GÓMEZ-ZAMBRANO, Ángeles; MERINI, Wiam; CALONJE, Myriam. The repressive role of Arabidopsis H2A.Z in transcriptional regulation depends on AtBMI1 activity. **Nature Communications**, [*S. l.*], v. 10, n. 1, p. 1–12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10773-1>
- GRAF, Alexander *et al.* Circadian control of carbohydrate availability for growth in Arabidopsis plants at night. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [*S. l.*], v. 107, n. 20, p. 9458–9463, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0914299107>. Acesso em: 22 ago. 2020.
- GREISS, Sebastian; GARTNER, Anton. **Sirtuin/Sir2 phylogeny, evolutionary considerations and structural conservation.** [*S. l.*]: Springer, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10059-009-0169-x>
- GRIMALDI, Benedetto *et al.* Chromatin remodeling, metabolism and circadian clocks: The interplay of CLOCK and SIRT1. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [*S. l.*], v. 41, n. 1, p. 81–86, 2009. Disponível em: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2008.08.035>
- GUAN, Shenheng *et al.* DDIA: data dependent-independent acquisition proteomics - DDA and DIA in a single LC-MS/MS run. **bioRxiv**, [*S. l.*], p. 802231, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/802231>
- HAKE, Sandra B.; ALLIS, C. David. **Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: The “H3 barcode hypothesis”.** [*S. l.*: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0600803103>
- HASSIDIM, Miriam *et al.* CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 (CCA1) and the circadian control of stomatal aperture. **Plant Physiology**, [*S. l.*], v. 175, n. 4, p. 1864–1877, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.17.01214>
- HENIKOFF, Steven; SMITH, M. Mitchell. Histone Variants and Epigenetics. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [*S. l.*], v. 7, n. 1, p. a019364, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019364>
- HENNIG, Lars; BOUVERET, Romaric; GRUISSEM, Wilhelm. MSI1-like proteins: an escort service for chromatin assembly and remodeling complexes. **Trends in Cell Biology**, [*S. l.*], v. 15, n. 6, p. 295–302, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2005.04.004>. Acesso em: 7 jan. 2019.
- HORN, Velten *et al.* Structural basis of specific H2A K13/K15 ubiquitination by RNF168. **Nature Communications**, [*S. l.*], v. 10, n. 1, p. 1–12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09756-z>
- HOTTA, Carlos Takeshi; NISHIYAMA, Milton Yutaka; SOUZA, Glauca Mendes. Circadian Rhythms of Sense and Antisense Transcription in Sugarcane, a Highly Polyploid Crop. **PLoS ONE**, San Francisco, USA, v. 8, n. 8, p. e71847, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071847>
- HOUBEN, Andreas *et al.* Phosphorylation of histone H3 in plants—A dynamic affair. **Biochimica et**

Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression, [S. l.], v. 1769, n. 5–6, p. 308–315, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2007.01.002>. Acesso em: 27 mar. 2017.

HURLEY, Jennifer M.; LOROS, Jennifer J.; DUNLAP, Jay C. Circadian Oscillators: Around the Transcription–Translation Feedback Loop and on to Output. **Trends in Biochemical Sciences**, [S. l.], v. 41, n. 10, p. 834–846, 2016. Disponível em: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2016.07.009>

IPEA. **Quarenta anos de etanol em larga escala no Brasil : desafios, crises e perspectivas**. Brasília: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – ipea, 2016. *E-book*.

JACOB, Yannick *et al.* Selective methylation of histone H3 variant H3.1 regulates heterochromatin replication. **Science**, [S. l.], v. 343, n. 6176, p. 1249–1253, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1248357>. Acesso em: 12 abr. 2020.

JÉGU, Teddy *et al.* The Arabidopsis SWI/SNF protein BAF60 mediates seedling growth control by modulating DNA accessibility. **Genome Biology**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 114, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1246-7>. Acesso em: 28 maio. 2020.

JIANG, Danhua; BERGER, Frédéric. **Histone variants in plant transcriptional regulation**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.07.002>. Acesso em: 12 abr. 2020.

KAWASHIMA, Tomokazu *et al.* **Diversification of histone H2A variants during plant evolution**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.04.005>

KIM, Jin A. *et al.* The Importance of the Circadian Clock in Regulating Plant Metabolism. **International journal of molecular sciences**, [S. l.], v. 18, n. 12, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms18122680>. Acesso em: 13 ago. 2018.

KÖHLER, Claudia *et al.* Arabidopsis MSI1 is a component of the MEA/FIE Polycomb group complex and required for seed development. **The EMBO journal**, [S. l.], v. 22, n. 18, p. 4804–4814, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg444>. Acesso em: 7 jan. 2019.

KÖNIG, Ann-Christine *et al.* The Arabidopsis class II sirtuin is a lysine deacetylase and interacts with mitochondrial energy metabolism. **Plant physiology**, [S. l.], v. 164, n. 3, p. 1401–1414, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.113.232496>. Acesso em: 26 fev. 2020.

KOUZARIDES, Tony. Histone methylation in transcriptional control. **Current Opinion in Genetics & Development**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 198–209, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(02\)00287-3](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(02)00287-3). Acesso em: 19 mar. 2017.

KOUZARIDES, Tony. **Chromatin Modifications and Their Function**. [S. l.]: Elsevier, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>

KREY, Jocelyn F. *et al.* Data Descriptor: Mass spectrometry quantitation of proteins from small pools of developing auditory and vestibular cells. **Scientific Data**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 1–14, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sdata.2018.128>

KUMAR, S. Vinod. **H2A.Z at the Core of Transcriptional Regulation in Plants**. [S. l.]: Cell Press, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.07.002>

LACHNER, M. *et al.* Trilogies of Histone Lysine Methylation as Epigenetic Landmarks of the Eukaryotic Genome. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, [S. l.], v. 69, n. 0, p. 209–218, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/sqb.2004.69.209>. Acesso em: 19 mar. 2017.

LERMYTE, Frederik *et al.* Top or Middle? Up or Down? Toward a Standard Lexicon for Protein Top-Down and Allied Mass Spectrometry Approaches. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, [S. l.], v. 30, n. 7, p. 1149–1157, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13361-019-02201-x>. Acesso em: 29 jun. 2020.

LI, Keqin Kathy *et al.* Chemical and Biochemical Approaches in the Study of Histone Methylation and Demethylation. **Medicinal research reviews**, [S. l.], v. 32, n. 4, p. 815–867, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrr.20228>

LIMA, Elisangela de Cristina Trevisan. **Cana-energia como potencial fonte energética Caracterização dos subprodutos (frações sólida, líquida e gasosa) provenientes da pirólise**. 2016. - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, Campinas, 2016. Disponível em: www.tcpdf.org. Acesso em: 26 maio. 2020.

LIU, Xiao *et al.* DNA Replication Is Required for Circadian Clock Function by Regulating Rhythmic Nucleosome Composition. **Molecular Cell**, [S. l.], v. 67, n. 2, p. 203–213.e4, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.029>. Acesso em: 23 ago. 2020.

LÖYTYNOJA, Ari; GOLDMAN, Nick. WebPRANK: A phylogeny-aware multiple sequence aligner with interactive alignment browser. **BMC Bioinformatics**, [S. l.], v. 11, p. 579–579, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-579>

LU, Li *et al.* High-resolution mapping of H4K16 and H3K23 acetylation reveals conserved and unique distribution patterns in Arabidopsis and rice. **Epigenetics**, [S. l.], v. 10, n. 11, p. 1044–1053, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1104446>. Acesso em: 25 fev. 2020.

LUENSE, Lacey J. *et al.* Comprehensive analysis of histone post-translational modifications in mouse and human male germ cells. **Epigenetics and Chromatin**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 24, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13072-016-0072-6>. Acesso em: 12 abr. 2020.

MACLEAN, Brendan *et al.* Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 26, n. 7, p. 966–968, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq054>. Acesso em: 13 ago. 2018.

MAHREZ, Walid *et al.* H3K36ac is an evolutionary conserved plant histone modification that marks active genes. **Plant Physiology**, [S. l.], v. 170, n. 3, p. 1566–1577, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.15.01744>

MALAPEIRA, J.; KHAITOVA, L. C.; MAS, P. Ordered changes in histone modifications at the core of the Arabidopsis circadian clock. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 109, n. 52, p. 21540–21545, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1217022110>. Acesso em: 30 maio. 2017.

MCCLUNG, C. Robertson. **Plant circadian rhythms**. [S. l.]: American Society of Plant Biologists, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.106.040980>

MCCLUNG, C. Robertson. The genetics of plant clocks. In: **Advances in Genetics**. [S. l.]: Academic Press Inc., 2011. v. 74p. 105–139. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387690-4.00004-0>

Method of the year 2012. . [S. l.]: Nature Publishing Group, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2329>

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **Resenha Energética Brasileira - Exercício de 2018.** Brasília: MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2018.

MIZUGUCHI, Gaku *et al.* ATP-Driven Exchange of Histone H2AZ Variant Catalyzed by SWR1 Chromatin Remodeling Complex. **Science**, [S. l.], v. 303, n. 5656, p. 343–348, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1090701>. Acesso em: 23 ago. 2020.

MOLDEN, Rosalynn C. *et al.* Multi-faceted quantitative proteomics analysis of histone H2B isoforms and their modifications. **Epigenetics and Chromatin**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 15, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13072-015-0006-8>. Acesso em: 12 abr. 2020.

MORAES, Izabel *et al.* Analysis of Histones H3 and H4 Reveals Novel and Conserved Post-Translational Modifications in Sugarcane. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. e0134586, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134586>. Acesso em: 19 mar. 2017.

MORAES, Márcia Azanha Ferraz Dias; OLIVEIRA, Fabíola Cristina Ribeiro; DIAZ-CHAVEZ, Rocio A. Socio-economic impacts of Brazilian sugarcane industry. **Environmental Development**, [S. l.], v. 16, p. 31–43, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envdev.2015.06.010>. Acesso em: 24 mar. 2017.

NAKAHATA, Yasukazu *et al.* The NAD⁺-Dependent Deacetylase SIRT1 Modulates CLOCK-Mediated Chromatin Remodeling and Circadian Control. **Cell**, [S. l.], v. 134, n. 2, p. 329–340, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.002>

NEVES, MARCOS FAVA;TROMBIM, Vinicius Gustavo. **A dimensão do setor Sucreenergético: mapeamento e quantificação da safra 2013/14.** [s. l.], 2014. Disponível em: www.unica.com.br/download.php?idSecao=17&id=25818107. Acesso em: 24 mar. 2017.

NIE, Wen Feng *et al.* Histone acetylation recruits the SWR1 complex to regulate active DNA demethylation in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 116, n. 33, p. 16641–16650, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1906023116>

NISHIYAMA JUNIOR, Milton Yutaka *et al.* The SUCEST-FUN regulatory network database: Designing an energy grass. **Proceedings Internaional of Sugar Cane Technologists**, [S. l.], v. 12, p. 1–10, 2013.

OSAKABE, Akihisa *et al.* Histone H2A variants confer specific properties to nucleosomes and impact on chromatin accessibility. **Nucleic acids research**, [S. l.], v. 46, n. 15, p. 7675–7685, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gky540>. Acesso em: 12 abr. 2020.

PANDA, Satchidananda; HOGENESCH, John B.; KAY, Steve A. **Circadian rhythms from flies to human.** [S. l.]: Nature, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/417329a>

PANDEY, Ashok *et al.* Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 74, n. 1, p. 69–80, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00142-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00142-X)

PARK, Hee Jin; KIM, Woe-Yeon; YUN, Dae-Jin. A New Insight of Salt Stress Signaling in Plant. **Molecules and Cells**, [S. l.], v. 39, n. 6, p. 447–459, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.0083>

PARRA, M. A. *et al.* Deciphering the Roles of the Histone H2B N-Terminal Domain in Genome-Wide Transcription. **Molecular and Cellular Biology**, [S. l.], v. 26, n. 10, p. 3842–3852, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mcb.26.10.3842-3852.2006>

PERALES, Mariano; MÁZ, Paloma. A functional link between rhythmic changes in chromatin structure and the Arabidopsis biological clock. **Plant Cell**, [S. l.], v. 19, n. 7, p. 2111–2123, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.107.050807>. Acesso em: 9 fev. 2020.

PIKAARD, Craig S.; SCHEID, Ortrun Mittelsten. Epigenetic regulation in plants. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [S. l.], v. 6, n. 12, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019315>

REY, Guillaume; REDDY, Akhilesh B. Protein acetylation links the circadian clock to mitochondrial function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 110, n. 9, p. 3210–3211, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1300419110>

SAGE, R. F. Autotrophs. In: **Encyclopedia of Ecology, Five-Volume Set**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2008. p. 291–300. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00851-X>

SAINI, Reena; JASKOLSKI, Mariusz; DAVIS, Seth J. **Circadian oscillator proteins across the kingdoms of life: Structural aspects**. [S. l.]: BioMed Central Ltd., 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0623-3>

SERIKAWA, Masayuki *et al.* Functional conservation of clock-related genes in flowering plants: overexpression and RNA interference analyses of the circadian rhythm in the monocotyledon *Lemna gibba*. **Plant physiology**, [S. l.], v. 146, n. 4, p. 1952–1963, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.107.114611>. Acesso em: 19 mar. 2017.

SHAHBAZIAN, Mona D.; GRUNSTEIN, Michael. Functions of Site-Specific Histone Acetylation and Deacetylation. **Annual Review of Biochemistry**, [S. l.], v. 76, n. 1, p. 75–100, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.052705.162114>. Acesso em: 28 maio. 2020.

SHARMA, Arishya; SINGH, Kamini; ALMASAN, Alexandru. Histone H2AX Phosphorylation: A Marker for DNA Damage. In: [S. l.]: Humana Press, Totowa, NJ, 2012. p. 613–626. *E-book*. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-998-3_40. Acesso em: 22 ago. 2020.

SHARMA, Vagisha *et al.* Panorama public: A public repository for quantitative data sets processed in skyline. **Molecular and Cellular Proteomics**, [S. l.], v. 17, n. 6, p. 1239–1244, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/mcp.RA117.000543>

SHEN, Yunpeng *et al.* Set7 Is a H3K37 Methyltransferase in *Schizosaccharomyces pombe* and Is Required for Proper Gametogenesis. **Structure**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 631–638.e8, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.str.2019.01.011>. Acesso em: 3 mar. 2020.

SHIM, Sangrea *et al.* H3K36me2 is highly correlated with m6A modifications in plants. **Journal of Integrative Plant Biology**, [S. l.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jipb.12917>. Acesso em: 2 mar. 2020.

SIDOLI, Simone *et al.* Sequential window acquisition of all theoretical mass spectra (SWATH) analysis for characterization and quantification of histone post-translational modifications. **Molecular and Cellular Proteomics**, [S. l.], v. 14, n. 9, p. 2420–2428, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/mcp.O114.046102>

SILVA, Catarina S. *et al.* Molecular mechanisms of Evening Complex activity in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 117, n. 12, p. 6901–6909, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1920972117>

SILVA, S. D. dos A. e. Introdução e Importância Econômica da Cana-de-açúcar no Rio Grande do Sul. *In: Sistema de produção de cana-de-açúcar no Rio Grande do Sul*. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2016. p. 17–18. *E-book*. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/164594/1/Sistema-de-Producao-23-Incluido.pdf>

SONG, Qingxin *et al.* Diurnal regulation of SDG2 and JM14 by circadian clock oscillators orchestrates histone modification rhythms in Arabidopsis. **Genome Biology**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 170, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1777-1>. Acesso em: 3 mar. 2020.

SONG, Young Hun; ITO, Shogo; IMAIZUMI, Takato. Similarities in the circadian clock and photoperiodism in plants. **Current opinion in plant biology**, [S. l.], v. 13, n. 5, p. 594–603, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.05.004>

STRAHL, Brian D.; ALLIS, C. David. The language of covalent histone modifications. **Nature**, [S. l.], v. 403, n. 6765, p. 41–45, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/47412>. Acesso em: 19 mar. 2017.

STROUD, Hume *et al.* Genome-wide analysis of histone H3.1 and H3.3 variants in Arabidopsis thaliana. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 109, n. 14, p. 5370–5375, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1203145109>

SURA, Weronika *et al.* Dual role of the histone variant H2A.Z in transcriptional regulation of stress-response genes. **Plant Cell**, [S. l.], v. 29, n. 4, p. 791–807, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00573>

TAFROVA, Juliana I.; TAFROV, Stefan T. Human histone acetyltransferase 1 (Hat1) acetylates lysine 5 of histone H2A in vivo. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [S. l.], v. 392, n. 1–2, p. 259–272, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2036-0>. Acesso em: 12 abr. 2020.

TALBERT, Paul B.; HENIKOFF, Steven. **Histone variants on the move: Substrates for chromatin dynamics**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.148>

TAO, Weiwei *et al.* SWItch/sucrose nonfermentable (SWI/SNF) complex subunit BAF60a integrates hepatic circadian clock and energy metabolism. **Hepatology**, [S. l.], v. 54, n. 4, p. 1410–1420, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/hep.24514>. Acesso em: 28 maio. 2020.

TESSARZ, Peter *et al.* Glutamine methylation in histone H2A is an RNA-polymerase-I-dedicated modification. **Nature**, [S. l.], v. 505, n. 7484, p. 564–568, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature12819>. Acesso em: 3 mar. 2020.

TONG, Meixuezi *et al.* The Evening Complex Establishes Repressive Chromatin Domains Via H2A.Z Deposition. **Plant physiology**, [S. l.], v. 182, n. 1, p. 612–625, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.19.00881>

TURNER, Bryan M. Histone acetylation and control of gene expression. **undefined**, [S. l.], 1991.

VAN ATTIKUM, Haico; GASSER, Susan M. **Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.03.001>. Acesso em: 12 abr. 2020.

VAN DILLEWIJN, C. Botany of sugarcane. **Botany of sugarcane.**, [S. l.], 1952.

WALTHER, Tobias C.; MANN, Matthias. **Mass spectrometry-based proteomics in cell biology.** [S. l.]: Rockefeller University Press, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1083/jcb.201004052>

WANG, Bin *et al.* Neurospora WC-1 Recruits SWI/SNF to Remodel frequency and Initiate a Circadian Cycle. **PLoS Genetics**, [S. l.], v. 10, n. 9, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004599>

WANG, Chuanli *et al.* Systematic Comparison of C3 and C4 Plants Based on Metabolic Network Analysis. **BMC Systems Biology**, [S. l.], v. 6, n. SUPPL.2, p. S9, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1752-0509-6-S2-S9>. Acesso em: 22 ago. 2020.

WANG, Qiannan; SHEN, Wen Hui. **Chromatin modulation and gene regulation in plants: Insight about prc1 function.** [S. l.]: Portland Press Ltd, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BST20170576>. Acesso em: 29 fev. 2020.

WANG, Tong *et al.* **Essential Role of Histone Replacement and Modifications in Male Fertility.** [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00962>

WEBB, Alex A. R. *et al.* **Continuous dynamic adjustment of the plant circadian oscillator.** [S. l.]: Nature Publishing Group, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08398-5>

WELLS, D.; BROWN, D. Histone and histone gene compilation and alignment update. **Nucleic acids research**, [S. l.], v. 19 Suppl, n. Suppl, p. 2173–2188, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/19.suppl.2173>

WILES, Elizabeth T.; SELKER, Eric U. **H3K27 methylation: a promiscuous repressive chromatin mark.** [S. l.]: Elsevier Ltd, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.11.001>. Acesso em: 29 fev. 2020.

WOLLMANN, Heike *et al.* The histone H3 variant H3.3 regulates gene body DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. **Genome Biology**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 94, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1221-3>. Acesso em: 25 fev. 2020.

WULUND, Lisa; REDDY, Akhilesh B. A brief history of circadian time: The emergence of redox oscillations as a novel component of biological rhythms. **Perspectives in Science**, [S. l.], v. 6, p. 27–37, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pisc.2015.08.002>

XIONG, Lei; WANG, Yinsheng. Mapping post-translational modifications of histones H2A, H2B and H4 in *Schizosaccharomyces pombe*. *In*: 2011, **International Journal of Mass Spectrometry**. : Elsevier, 2011. p. 159–165. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2010.08.015>

XU, L. *et al.* Di- and Tri- but Not Monomethylation on Histone H3 Lysine 36 Marks Active Transcription of Genes Involved in Flowering Time Regulation and Other Processes in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular and Cellular Biology**, [S. l.], v. 28, n. 4, p. 1348–1360, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mcb.01607-07>

YELAGANDULA, Ramesh *et al.* The histone variant H2A.W defines heterochromatin and promotes chromatin condensation in *Arabidopsis*. **Cell**, [S. l.], v. 158, n. 1, p. 98–109, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.006>

YU, Xiaoming *et al.* The Core Subunit of A Chromatin-Remodeling Complex, ZmCHB101, Plays Essential

Roles in Maize Growth and Development. **Scientific reports**, [S. l.], v. 6, p. 38504, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep38504>. Acesso em: 28 mar. 2018.

ZHANG, Chong *et al.* Crosstalk between the Circadian Clock and Innate Immunity in Arabidopsis. **PLoS Pathogens**, San Francisco, USA, v. 9, n. 6, p. e1003370, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003370>

ZHANG, Fangfei *et al.* Data-Independent Acquisition Mass Spectrometry-Based Proteomics and Software Tools: A Glimpse in 2020. **PROTEOMICS**, [S. l.], p. 1900276, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pmic.201900276>. Acesso em: 28 maio. 2020.

ZHANG, Kang *et al.* Differential deposition of H2A.Z in rice seedling tissue during the day-night cycle. **Plant Signaling and Behavior**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. e1286438, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1286438>. Acesso em: 12 abr. 2020.

ZHANG, Kangling *et al.* Distinctive core histone post-translational modification patterns in Arabidopsis thaliana. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 2, n. 11, p. e1210, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001210>. Acesso em: 29 fev. 2020.