(2022) 24 263 275
https://doi.org/10.1007/s10126-022-10098-z

ORIGINAL ARTICLE

Heme-Peroxidase 2 Modulated by POU2F1 and SOX5 is Involved in Pigmentation in Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*)

Yue Min[1] Qi Li[1,2] Hong Yu[1]

Received: 10 November 2021 / Accepted: 30 January 2022 / 11 2022

Abstract

(CgHPX2) ... CgHPX2 ... *Crassostrea gigas* ... CgHPX2 ... CgHPX2 ... CgHPX2 ... CgHPX2 ... 2227 ... 5 ... CgHPX2 ... POU ... 2 ... 1 (*POU2F1*) ... 5 (*SOX5*) ... CgHPX2 ... *CgPOU2F1* ... *CgSOX5* RNA ... *CgHPX2* ... *CgPOU2F1* ... *CgSOX5* ... *CgHPX2* ...

Keywords *CgHPX2*

Introduction

... (2019; 2003) ... (2016; 2021; 2009) ... (2017) ... (2019) ... (2009; 2014) ...

Q L
66@

1 (266003, C

2 Q 266237, C

(F . 1992). I . F , ( ) , (N . 2016). I , (F . 2019; H . 2018; . 2021).

(H . 2020; H . 2021; N . 2020; . 2019 ,). A , . I *Pinctada margaritifera*, (L . 2015). I *Patinopecten yessoensis*, C 2+/ (S . 2015). A *Crassostrea gigas* (. 2021). *Lymnaea stagnalis*, (T 1968). F (S . 2017). I , (H J 2013; J . 2019). I , (C 2014), *peroxidase* . I *C. gigas*, *peroxidase* 26 *peroxidase* (F . 2017). I *peroxidase*

T P *C. gigas* . S F (, ,) *C. gigas* (G . 2015; H L 2020; . 2019). I RNA RNA *C. gigas* R-317 RNATCONS 00951105 RNA (F . 2020). A

2 (*CgHPX2*) P (F . 2019). H , *CgHPX2* . I *CgHPX2* *C. gigas*. E . I , *CgHPX2* *CgHPX2*. O *CgHPX2*

Materials and Methods

Sample Collection

O - P , S , C , . T 4% 24 °C (ISH). S , , , , 80 °C RNA . S (). E L , S , C , , D- , D- , U , T S1. L .

RNA Extraction and Real-Time qPCR

T RNA RNA RNA (, C) T RNA N 2000 (T , USA) 1.5% T RNA DNA H S III 1 DNA (V , C). T - PCR Q N SYBR G PCR (Q , G L 480 - PCR (R , S). T P P 5.0 (P B I , P A , CA) (T S2), PCR … E … 1- (*ef1α*) … (L … 2021). I … 1- (*ef1α*), … 1 (*arf1*), … -3 … (*gaph*) … (H … 2016). T … 2 CT … A … G … P … P … 8.0 … ANOVA … ANOVA … D … P < 0.05.

Identifying and Cloning the Coding Sequence of *CgHPX2*

T … *CgHPX2* … PCR … N … B … I … (NCBI, … ; … : LOC105324712). T … T … S2. T … PCR … P … M … F … DNA … (V … , C …) … PCR … 1.5% …

Bioinformatics Analysis of *CgHPX2*

T … (I) … (M …) … C … I/M … T … E PA … (… :// … / … /). T … *CgHPX2* … CD- … NCBI (… :// … /S … / … / …). T … P … 2 (… :// … / … 2/ … / … ? = …). T … C … (L … B … L … A … CA) … ESP … 3.0 (… P … 2014). T … MEGA 7.0 (K … 2016) … (ML) … 1000 …

RNA Location Pattern Analysis of *CgHPX2* by in Situ Hybridization

T … (TISH) … RNA … (ISH) … T … RNA … DNA … T … S2 … T7 … (GATCACTAATACGACTCACTATAGGG). T … PCR … DNA … (T … , USA). T … PCR … T7- … DIG-RNA … (R … , S …). T … TISH … 5- … A … 2% NBT/BCIP … (R … , S …) … 1 … 24 °C … 0.5% … F … ISH, … K (S … , C …) … (H … 2015). T … (L … 2021; … 2021). A … TISH … ISH … O … B … 53 … DP80 … (O … J …).

Luciferase Vector Construction and Site-Directed Mutagenesis

T … 5 … *CgHPX2* … GL3-B … (P … , USA) … C … E … II O … S … C … K (V … , C …). S … 5 … (P1: −2011 – +216, P2: −1726 – +216, P3: −1519 – +216, P4: −1221 – +216, P5: −453 – +216, P6: −351 – +216) … *CgHPX2* … *C. gigas* … DNA … I … DNA3.1 … (P … , USA) … CDS … *CgPOU2F1* … *CgSOX5* … DNA3.1 … T … M … E … M … S F … M … V2 (V … , C …). A … T … S2.

Cell Culture, Transient Transfections, and Dual-Luciferase Reporter Assays

HEK-293T … DMEM (S … , C …) … 10% … (H … , USA) … 1% … 1 … (H … , USA) … 37 °C … 5% CO_2. T … 24- … (CORNING, USA) … 70–90% … 3000 (I … , CA, USA) … T … RL-TK … (P … , USA) … F … 500 … 10 … RL-TK … 24- … F …

CgPOU2F1 *CgSOX5*, 250 DNA3.1 , 250 GL3-B - , 5 RL-TK 24- . L 48 . A , DPBS (S , C) (P , USA). F (P , USA) - S H1 (B , USA). T - (F ANOVA G P P 8.0.

Subcellular Localization of POU2F1 and SOX5

T *CgPOU2F1* *CgSOX5* EGFP-1 (. .) GFP - . T HEK-293T (L , USA) C POU2F1- EGFP-1 C SOX5- EGFP-1 A 48 , 4 ,6- -2- (DAPI) (B , C) 25 T - - TCS SP8 STED 3 A S . P - T S2.

RNA Interference Experiment

I RNA RNA (F . 2019). D , U (> 200) - / RNA- - . T RNA- - *E. coli* HT115 (DE3) (*CgPOU2F1*-L4440, *CgSOX5*-L4440, *EGFP*-L4440) -D- (IPTG). T *EGFP*-L4440 A / - 100 *Platymonas subcordiformis* 25, 000 [1]. F / - - . A IPTG, 500 *P. subcordiformis* . L

7 14, RNA PCR T S2.

Results

Bioinformatics, Homology, and Phylogenetic Analysis of *CgHPX2*

A *CgHPX2* *C. gigas* . T *CgHPX2* T S3. T DNA *CgHPX2* 11,219 12 11 T GT-AG . T DNA *CgHPX2* 3301 101 5 UTR, 566 3 UTR, 2634 ORF 877 . T *CgHPX2* 98.77 D (I) 9.49. T 44% 3% (F . 1A). T HP 2 2 A, 33% *CgHPX2* (F . 1B).

T *CgHPX2* - B (*Crassostrea virginica*, P 022291683.1; *Pecten maximus*, P 033758659.1; *Mizuhopecten yessoensis*, P 021358145.1; *Lingula anatina*, P 013419078.1; *Octopus vulgaris*, P 029656077.1; *Amphibalanus amphitrite*, KAF0313953.1; *Bemisia tabaci*, P 018902871.1; *Daphnia magna*, P 032798431.1; *Rhopalosiphum maidis*, P 026811832.1). *CgHPX2* (F . S5).

P *CgHPX2* T T S4. P *CgHPX2* (99%), (F . 1C). T - P HP 2 ,

Expression Profiles of *CgHPX2*

T *CgHPX2* , *CgHPX2*

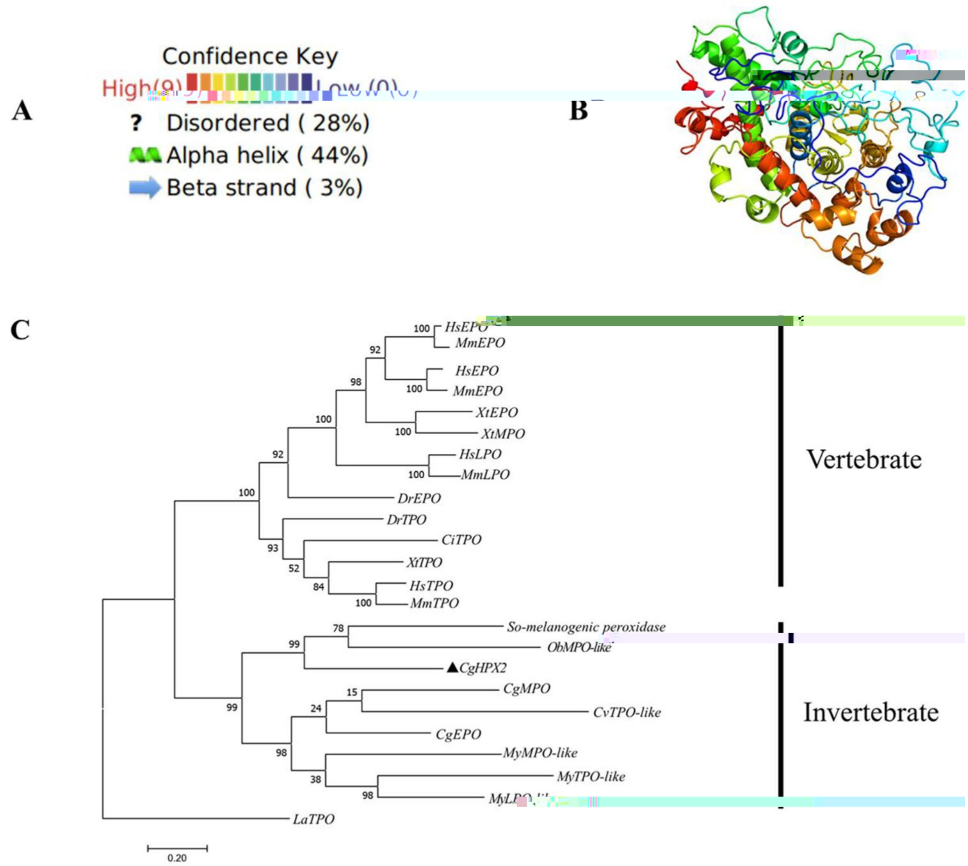

Fig. 1 T... *CgHPX2* ... *CgHPX2*. **A** T... *CgHPX2* ... C HP 2 ... 44% ... 3% ... **B** ... *CgHPX2* ; **C** ... *CgHPX2* ... (ML) ... 1000

H ... $(P < 0.05)$ (F. 2A). T... RNA ... *CgHPX2* ...

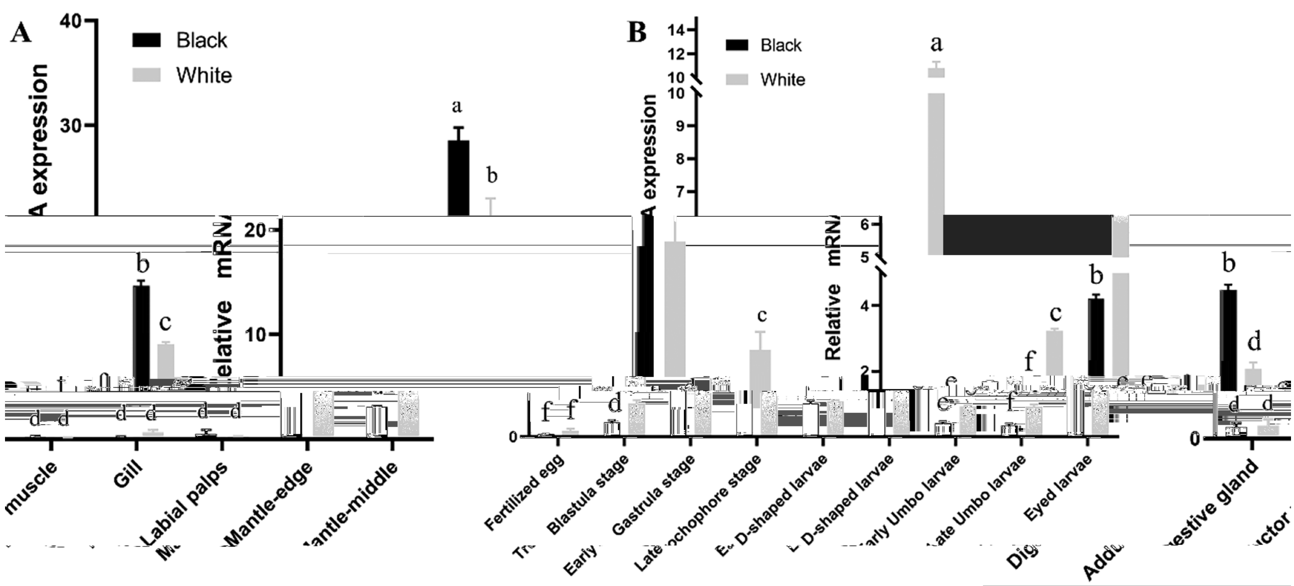

Fig. 2 T... RNA ... *CgHPX2*. **A**

M , ( ) (F . 3). I , . I - , . D - *CgHPX2* RNA) (F . 2B). T *CgHPX2* , , *CgHPX2* ($P<0.05$). A , *CgHPX2* . F - , *CgHPX2* RNA ISH (F . 4). T . I , - (F . 4-I-E). I D- , U , , (F . 4-I). C (F . 4-II), , , - PCR

The Sequence Analysis of the 5 -Upstream Regulatory Region of *CgHPX2* Gene

T 2227 5 *C. gigas* . P 216 ATG, TATA 730 . P *POU2F1*, *SOX5*, - (*MITF*), AMP - (*CREB*), *GATA-3*, (F . 5A). T *CgHPX2* .

Identification of the Core Region of the *CgHPX2* Promoter and Key Transcription Factor

T , 5 GL3- - HEK-293 T T - *CgHPX2* 5 (F . 5B). T *CgHPX2* 65.69% 1519 1221 - C P4 (1221/+214),

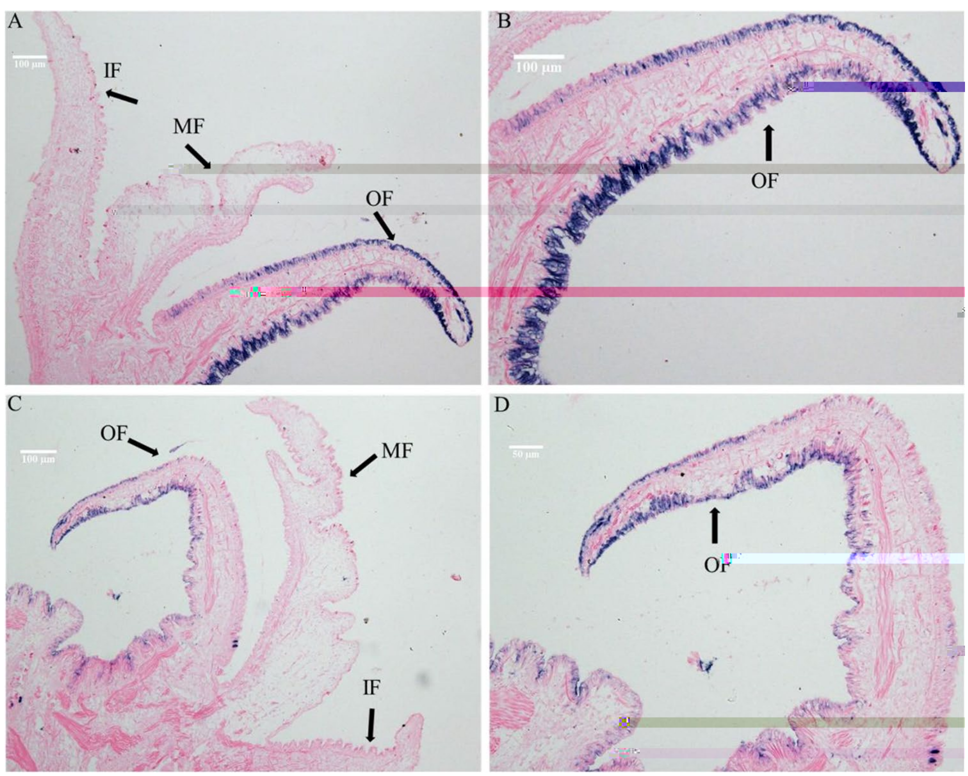

Fig. 3 T RNA *CgHPX2* **A** **B, C** **D** OF, ; MF, ; IF,

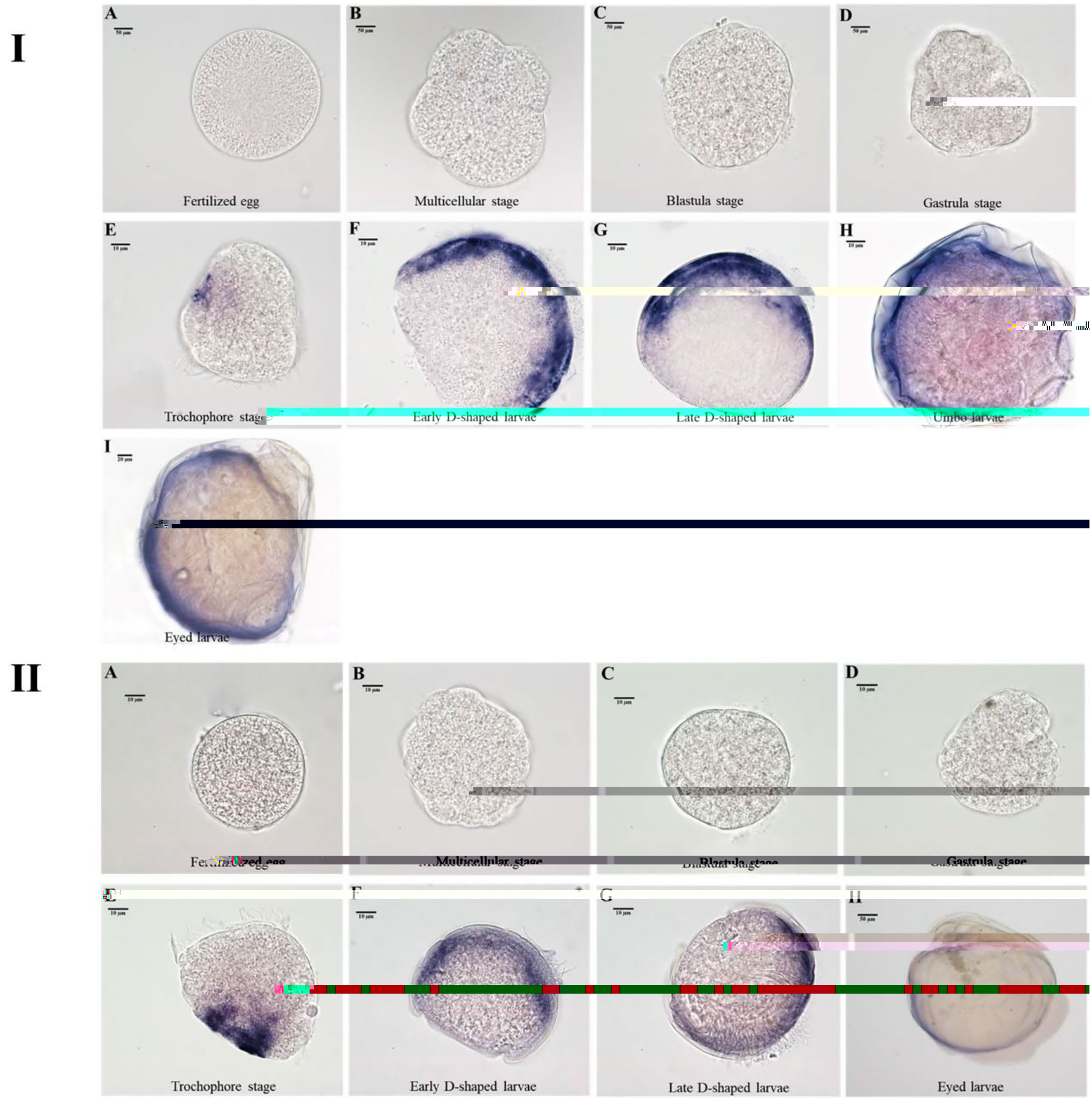

Fig. 4 T *CgHPX2* RNA I II

1519 1221 *CgHPX2*. T . T *CgPOU2F1* *CgSOX5* *CgHPX2*,

A F. 5C, D, *CgPOU2F1* *CgSOX5* POU2F1 SO 5 . T *POU2F1* *SOX5* HPX2 .

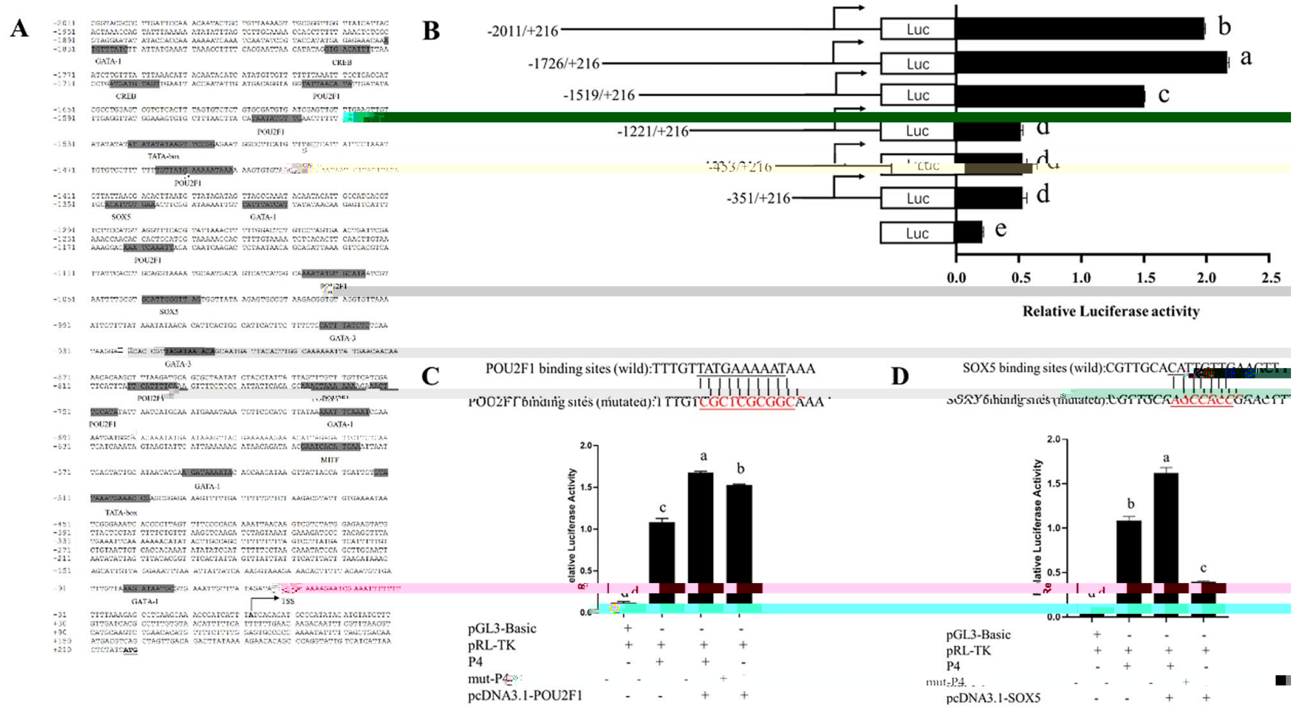

Fig. 5 … ; P4 … ; P4 … *CgHPX2* … POU2F1 … SOX5 … A … DNA3.1-POU2F1 … DNA3.1-SOX5 … B … + … 1519 … 1221. C … D E … HEK-293 T … D … POU2F1 … SOX5; GL3- … $P < 0.05$ … RL-TK …

CgPOU2F1 and CgSOX5 are Located in the Nucleus in HEK-293 T Cells

T … (GFP)- … C POU2F1 … C SOX5 … HEK-293 T … C POU2F1- EGFP- … C SOX5- EGFP- … GFP … DAPI … (Fig. 6). T … *CgPOU2F1* … *CgSOX5* … HEK-293T …

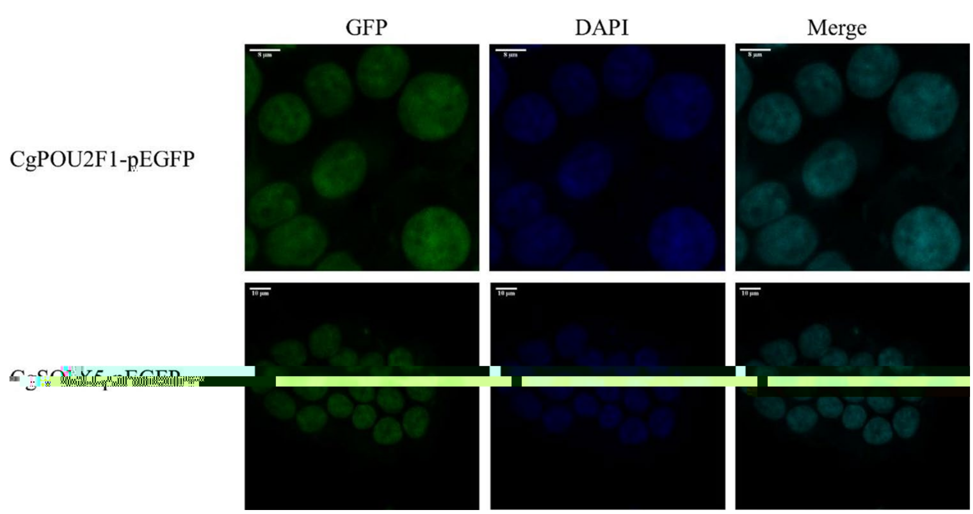

Fig. 6 S … *CgPOU2F1* … *CgSOX5* … HEK-293 T … HEK-293 T … EGFP … EGFP- … POU2F1 … SOX5, … N … DNA … DAPI …

CgPOU2F1 and *CgSOX5* Knockdown Led to a Decrease in *CgHPX2* Expression

T … *CgPOU2F1* … *CgSOX5* … *CgHPX2*, *CgPOU2F1* … *CgSOX5* … RNA … T … RNA … *E. coli* … 0.4 M IPTG … 37 °C … 4 … B … RNA … *POU2F1* … *SOX5* … T7 … IPTG- … *E. coli* (F … S6), … RNA … *E. coli*.

T … PCR … *CgPOU2F1* … *CgSOX5* RNA … 7 … 14, … (F … S7).

C … EGFP RNA- … *CgHPX2* … RNA - … (F … 7). I … POU2F1 RNA … - … , … *CgHPX2* … 69% … 88% … 7 … 14, … I … *SOX5* RNA … - … , *CgHPX2* RNA … 57% … 14.

Discussion

H … - … 2 … T … I … (S … 2017). H …

… (L … 2008). *CgHPX2* … (*MPO*), … (*LPO*), … (*EPO*), … (*TPO*) (L … 2008). P … *CgHPX2* … *CgHPX2* … (99% …), … I … *Sepia officinalis*, … (C … 2014). T … *CgHPX2* … RNA … (F … 2019).

F … (C … 2014; D … 2017; T … 1968). I … *CgHPX2* … *CgHPX2* … F … I … S … T … *CgHPX2* …

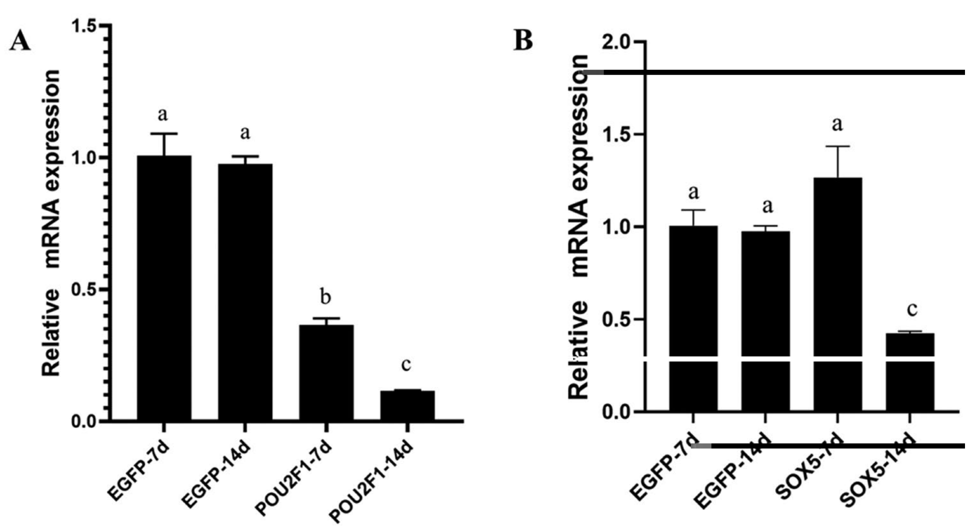

Fig. 7 RNA … *CgPOU2F1* … *CgSOX5* … **A** T … *CgHPX2* … U … POU2F1 … EGFP. **B** T … *CgHPX2* … U … EGFP … SOX5. T … SD ($n = 3$). D … $P < 0.05$

T (K . 2009). T

I

II D-

(K . 2009). T ,

CgHPX2

. F

Mercenaria mercenaria -

D-

I (T . 2014). T ,

I

F

-R LC MS

T CgHPX2

. I

-

-

, ,

(G

. 1995). M

. 2020C HP 2

1 0 6 9 9 9 9

(C . 2009). *CREB* , *Hyriopsis cumingii* (. 2021).

MITF (M . 2019; . 2018), 3 (*PAX3*) (. 2018), (*TYR*), 1 2 (*TYRP1* *TYRP2*) (. 2021). I *CgPOU2F1* *CgSOX5*, . POU2F1, OTF-1 (2014), POU II, , O-G NA , (K . 2013). POU2F1 7 11 (*Slc7a11*) (C . 2019). A *CgSOX5* SO D SO (. 2017). *SOX5* (D S 2014; N . 2018, 2014). M , R-21 -5 *MITF* *SOX5* (. 2016). I *CgPOU2F1* *CgSOX5* *CgHPX2*, *CgHPX2* *CgHPX2*. *CgPOU2F1* *CgSOX5* T , *CgPOU2F1* *CgSOX5* I , *CgPOU2F1* *CgSOX5* *CgHPX2* , *CgPOU2F1* *CgSOX5* *CgHPX2* . A *CgHPX2* RNA .

Conclusions

I *CgHPX2* *C. gigas*. *CgHPX2* . A *CgHPX2* 1519 1221 . T *CgPOU2F1* *CgSOX5* *CgHPX2* . M , *CgPOU2F1* *CgSOX5* *CgHPX2*. T *CgHPX2* . T *CgHPX2* *C. gigas*.

Supplementary Information T /10.1007/ 10126-022-10098- .

Funding T N N S F C (31972789), E F A I P S P (2020L GC016), C A S P (CARS-49), S C (2018NS01), I Q C (20 3-4 16-).

Declarations

Conflict of Interest T

References

A S, K, F H, J DJ (2019) E : F 16:47

A JA, M JEAR, A, L SGBC (2015) M *Nodipecten nodosus* (M : B): BMC B 15:22

R, C (2014) POU . E J B 93:55 60

B A, E B, O G (2009) T P N A S U S A 106:6837 6842

B A, M D C, G K, BM (2014) C . F 11:62

C D (2014) I : P , C F A M D 12:2700 2730

C H S, M L, B, M, N, B G, C, (2019) S 7 11 POU2F1 I J M S 20:2493

C K, R D , L JA (2009) F 3 M . B 332:408 417

J, S L (2014) S 5 P M 27:1004 1013

D B, M AB, S N, N B, S T, D A (2017) T D . BMC B 17:1

D J, C J, C H, , L G, C (2019) C O (*Cyprinus carpio var. color*) F P B 45:177 185

D, L Q, H, K L, D S (2017) I *Crassostrea gigas*: . S 7:45754

F[illegible] D, L Q, 8[illegible] H (2019) RNA I [illegible] y [illegible] RNA-

P, & F R, C T, D C (2016) M RNA-21 -5 S 5 I J M S 17:959

ST (2017) M . B R 92:1039 1058

PJ, B P (2009) D : G . G D B 20:65 71

R, P G (2014) D END . N A R 42: 320 324

C, L Q, & H, L S, K L, C J (2019) I P *Crassostrea gigas*. A 512:734249

M, H J, S & H, H M (2019) C P F M BMC G 20:469

& F, Q B, L D, D & H R, (2018) P 3 - *Pteria penguin*. I J M S 19

& J, L, L & L R, M, L , S, H , B (2017) G -

SO *Patinopecten yessoensis*. G 627:530 537

& C, L Q, & H (2021) V - C D , C BHMG1 C F 2 P *Crassostrea gigas* . G 790:145692

M, C , J, L J, B (2021) C *HcCreb* *Hyriopsis cumingii*. PL S O 16 0251452

S, H, & J, J F, & , L B (2018) I - *Meretrix petechialis*. C . B P . P : B M B 225:75 83

& J, L Q, & H, L SK, K LF (2021) S - P (*Crassostrea gigas*) M B

Publisher's Note S N