

مروری بر ویژگی‌های ساختاری، عملکرد متابولیسمی و سنجش فعالیت انواع پراکسیدازها

فاطمه عرفان منش و فائزه قناتی*

گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۲۷، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۱/۰۳/۰۳)

چکیده

تولید گونه‌های فعال اکسیژن طی متابولیسم طبیعی سلول‌هایی که تنفس اکسیداتیو دارند صورت می‌گیرد. در بین گونه‌های فعال اکسیژن، هیدروژن پراکسید به دلیل داشتن نیمه عمر طولانی خطر بیشتری برای حیات سلول دارد اما در عین حال یک مولکول تنظیم‌کننده مهم در سیگنالینگ ردوکس است. پراکسیدازها، از آنزیم‌های کلیدی آنتی‌اکسیدانی هستند که به طور گسترده در طبیعت توزیع می‌شوند و اکسیداسیون سوپراکسیدها، مختلف دهنده الکترون را همزمان با تجزیه هیدروژن پراکسید پیش می‌برند و ضمن احیای پراکسید هیدروژن و سایر هیدروپراکسیدها، آب تولید می‌کنند. پراکسیدازها علاوه بر خاصیت مهار پراکسید شناخته شده خود، عملکردهای فیزیولوژیکی اکسید-کننده نیز دارند. این آنزیم‌ها بر اساس شیمی جایگاه فعال در تعامل با پراکسید به پراکسیدازهای هم دارو غیرهم دار متمایز می‌شوند. اولی حاوی یک مرکز کاتالیزوری هم است و دومی یک سلنول یا تیول واکنشی در جایگاه فعال خود دارند. پراکسیدازهای گیاهی آهن-دار به سه کلاس I، II و III تقسیم می‌شوند. پراکسیدازهای گیاهی تیول‌دار شامل گلوتاتیون پراکسیداز و پروکسی ردوکسین‌ها است. مقاله حاضر به بررسی ویژگی‌های ساختاری، متابولیسمی و نحوه اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی انواع پراکسیدازها می‌پردازد.

واژه‌های کلیدی: پراکسیداز، هیدروژن پراکسید، پراکسیدازهای هم‌دار، پراکسیدازهای تیول‌دار، پراکسی رداکسین

مقدمه

پراکسی‌زوم، آپوپلاست و غشای پلاسماست (Singh et al., 2019). اگرچه گونه‌های فعال اکسیژن به‌عنوان دستاورد متابولیسم طبیعی سلولی تشکیل می‌شوند، اما تجمع بیش از حد آنها به دلیل ماهیت بسیار فعالشان سبب بروز تنش و وقوع آسیب‌های شدید به اجزای سلولی و ماکرومولکول‌های زیستی از جمله کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، لیپیدها، DNA و غیره می‌گردد (Raja et al., 2017).

گیاهان عمدتاً مجهز به یک مکانیزم دفاعی درونی متشکل از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی (سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و انواع پراکسیدازها) و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی (آسکوربیک

در شرایط امروز جهانی به دلیل تغییرات اقلیمی تنش‌های محیطی مانند تنش شوری، خشکی، دمای بالا، فلزات / شبه فلزات سمی، شرایط غرقابی و سیلابی و غیره شدیداً افزایش یافته است (Pereira, 2016). تشدید چنین تنش‌های متنوع غیرزیستی به تهدید مهمی برای تولید پایدار محصولات زراعی تبدیل شده است. در کنار آن، اثرات مضر متعددی از طریق تجمع بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) منجر به بروز تنش اکسیداتیو می‌گردد. در سلول زنده، جایگاه‌های اصلی تولید گونه‌های فعال اکسیژن کلروپلاست، میتوکندری،

دفاعی در برابر استرس غیرزیستی و زیستی نقش دارند. (Veljovic Jovanovic *et al.*, 2018)

۱- پراکسیدازهای واجد هم Haem

۱-۲- شاخص ترین نمونه کلاس I در گیاهان، آسکوربات پراکسیداز (APX)

۱-۱-۲- ویژگی‌های فیزیولوژیک و عملکردی: این گروه از پراکسیدازها تنها در ارگانسیم‌های حاوی پلاستید مشاهده می‌شوند (Teixeira *et al.*, 2004; Passardi *et al.*, 2007; Nedelcu *et al.*, 2008). اغلب جلبک‌های یوکاریوتی دارای بیش از یک ژن APX هستند اما مطالعات توالی‌یابی ژنوم نشان داده است که هیچ یک از سیانوباکترها حاوی ژن APX نیستند (Maruta *et al.*, 2016). در گیاهان عالی‌تر، ایزوفرم‌های APX در سیتوزول، کلروپلاست، میتوکندری و پراکسی‌زوم قرار دارند (Shigeoka *et al.*, 2002).

ایزوفرم‌های سیتوزولی از طریق جلوگیری از جابجایی H_2O_2 در درون سلول نقش مرکزی را در تنظیم احیا سلولی ایفا می‌کنند. ایزوفرم‌های کلروپلاستی خود به دو دسته استرومایی (sAPX) و تیلکوئیدی (tAPX) تقسیم می‌شوند. در دودمان گیاهان سبز احتمالاً اولین APX تک عملکردی یک آنزیم کلروپلاستی (استرومایی) است. عملکرد این ایزوفرم‌های APX همراه با لایه‌های مختلف سیستم چرخه آسکوربات نظیر مونو دی‌هیدرو آسکوربات ردوکتاز و دی‌هیدرو آسکوربات ردوکتاز (به ترتیب MDAR و DHAR) و گلوکاتایون ردوکتاز (GR) است (Gallie, 2013). جفت شدن این آنزیم‌ها امکان ارتباط متقابل بین آسکوربات و گلوکاتایون در سیستم مهار کردن H_2O_2 که تحت عنوان سیکل آسکوربات-گلوکاتایون نیز شناخته می‌شود (شکل ۱).

تولید ROS در کلروپلاست با زنجیره انتقال الکترون فوتوسنتزی (Photosynthesis electron transport (PET)) در ارتباط است. الکترون‌های خارج شده از آب از طریق فتوسیستم‌های یک و دو به $NADP^+$ که پذیرنده نهایی الکترون است منتقل می‌شوند. با این حال، برخی از این

اسید، گلوکاتایون، ترکیبات فنلی و...) هستند. با این حال، در طول شرایط تنش، تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن این تعادل را به هم زده و باعث بروز آسیب سلولی، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول و همچنین کاهش بهره‌وری گیاه می‌گردد (Hasanuzzaman *et al.*, 2012).

در میان آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی، پراکسیدازها (EC.1.11.1.x) به سبب تنوع در ساختار به‌ویژه در جایگاه فعال، عملکرد، و تنوع در سوبسترا از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. پراکسیدازها پراکسید هیدروژن (H_2O_2) را تجزیه می‌کنند تا طیف گسترده‌ای از ترکیبات فنلی و همچنین ترکیبات غیرفنلی را اکسید کنند.

تاکنون انواع مختلفی از طبقه‌بندی برای پراکسیدازها معرفی شده است. یکی از رایج‌ترین طبقه‌بندی‌های پراکسیدازها در منابع براساس تحرک ایزوالکتروفورتیکی (IEF) آن‌ها است و بر این اساس آن‌ها به ایزوفرم‌های آنیونی، خنثی و کاتیونی با طیف گسترده‌ای از مقادیر pI (از ۲ تا ۱۱/۶) طبقه‌بندی می‌شوند (Quiroga *et al.*, 2000; Dicko *et al.*, 2006). ساده‌ترین شکل طبقه‌بندی پراکسیدازها گروه‌بندی آن‌ها براساس جایگاه درون سلولی و سوبسترای اختصاصی آن‌هاست. که یکی از متداول‌ترین گروه‌بندی‌ها طبقه‌بندی آن‌ها براساس داشتن گروه هم (Haem) یا داشتن تیول در جایگاه فعال خود هستند. پراکسیدازهای هم‌دار شامل سه کلاس، کلاس I شامل آسکوربات پراکسیدازها، کلاس II که به‌طور اختصاصی در قارچ‌ها دیده شده‌اند و کلاس III می‌باشند. پراکسیدازهای تیول‌دار شامل گلوکاتایون پراکسیداز و پراکسی ردوکسین‌ها هستند.

پراکسیدازهای غیرجانوری، متعلق به کلاس III پراکسیداز، آنزیم‌هایی هستند که در عملکردهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی متنوع در سلول‌های گیاهی شامل ساخت دیواره، رشد، تمایز و توسعه، کاتابولیسم هورمون‌ها، متابولیسم اکسین، پلیمریزاسیون لیگنین، رشد و رسیدن میوه، بیوستز اتیلن، سیستم‌های ردوکس غشای پلاسمایی، پیری و مکانیسم‌های

- (1) $2\text{PhOH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{PhO} + 2\text{H}_2\text{O}$
- (2) $2\text{PhO} \rightarrow \text{cross-linking}$
- (3) $\text{PhO} + \text{Asc} \rightarrow \text{PhOH} + \text{MDA}$
- (4) $\text{PhO} + \text{MDA} \rightarrow \text{PhOH} + \text{DHA}$
- (5) $2\text{MDA} \rightarrow \text{Asc} + \text{DHA}$

در غیاب آسکوربات (Asc)، رادیکال‌های فنوکسیل (PhO) تولید شده با هم واکنش می‌دهند که منجر به تشکیل پلیمرهایی مانند لیگنین، سویرین و کوئینون‌ها (Bernards *et al.*, 1999) می‌شود (واکنش دو). یکی از محصولات تولید شده، رادیکال‌های کوئین-هیدرون است که از کافئیک اسید، کلروژنیک اسید، کوئینون‌ها و هیدروکوئینون‌های آن‌ها مشتق می‌شود (Takahama and Oniki, 2000). کوئین هیدرون هم می‌تواند با اکسیداسیون خود به خود سبب تولید دیگر گونه‌های فعال اکسیژن نظیر رادیکال سوپراکسید و هیدروکسیل شود و یا با مصرف هیدروژن پراکسید سبب اکسیداسیون آسکوربیک اسید شود (Morina *et al.*, 2010). علاوه بر این، رادیکال فنوکسیل مشتق شده از منوفنول‌ها نظیر پاراکوماریک اسید و فرولیک اسید ممکن است با آسکوربات واکنش داده (واکنش سه) و منجر به تولید رادیکال منوهدیدرو آسکوربات (MDA) شده و پیش‌ماده مربوطه را به روشی غیرآزمی بازایی کند. همچنین رادیکال‌های فنوکسیل می‌توانند با MDA واکنش داده (واکنش چهار) و دهیدروآسکوربات (DHA) را تشکیل دهند. بازیافت آسکوربات از طریق واکنش دو مولکول MDA با هم امکان‌پذیر است (واکنش پنج) (Takahama and Oniki, 1992).

همچنین براساس مکانیسمی که توسط Schopfer و Chen (۱۹۹۹) ارائه شده است، پراکسیدازها علاوه بر اکسیداسیون ترکیبات فنولی در طی احیا پراکسید هیدروژن (چرخه پراکسیداتیو)، قابلیت تولید پراکسید هیدروژن (H_2O_2) از طریق احیا تک الکترونی اکسیژن مولکولی را نیز دارند (چرخه اکسیداتیو). علاوه بر آن آهن موجود در بخش هم آنزیم پراکسیداز می‌تواند به‌عنوان معرف فتون عمل کرده و در چرخه هیدروکسیلیک، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) را به هیدروکسیل (OH) احیا کند.

پراکسیدازها دارای پیش‌ماده‌های متنوعی شامل مواد فنولی،

آنتی‌اکسیدانی، در تمامی مراحل رشد گیاه از جوانه‌زنی تا پیری شامل تشکیل دیواره سلولی ثانویه (Lopez-Serrano *et al.*, Allison and (2004; Passardi *et al.*, 2006)، بهبود زخم (Schultz, 2004)، جوانه‌زنی بذر (Scialabba *et al.*, 2002)، گرده‌افشانی (McInnis *et al.*, 2006)، رسیدن میوه (Pandey *et al.*, 2012)، پیری (Abarca *et al.*, 2001) و کاتابولیسم اکسین و آنتوسیانین (Movahed *et al.*, 2016) نقش دارند. چنین تنوعی از واکنش‌های متابولیکی که با ایزوفرم‌های پراکسیداز تسریع می‌شوند و تعداد زیادی ژن با توالی‌های پروموتوری مختلف، حاکی از عملکرد تخصصی ایزوآنزیم‌ها است.

آسکوربات و گلوکاتایون متابولیت‌های اولیه هستند که همراه با آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی چرخه آسکوربات-گلوکاتایون (Asc-GSH)، تعادل واکنش‌های اکسیداسیون و احیا را در سلول‌های گیاه حفظ می‌کنند (Foyer and Noctor, 2011). از سویی دیگر، فلاونوئیدها و سایر ترکیبات فنولی که از جمله پیش‌ماده‌های متعدد پراکسیدازها هستند، می‌توانند یک سیستم آنتی‌اکسیداتی «ثانویه» تشکیل دهند که در شرایط شدید تنش فعال می‌شود (Agati *et al.*, 2012).

یافته‌های اخیر در زمینه توزیع زیرسلولی پراکسیدازها، مواد فنولی و آسکوربات و همچنین انتقال درون سلولی H_2O_2 در کنار هم منجر به نظریه‌ای می‌شود که در آن پراکسیداز به‌عنوان مصرف‌کننده مرکزی H_2O_2 تحت شرایط تنش شدید بوده و به‌عنوان بازیگر اصلی در تنظیم مسیرهای دفاعی و متابولیسم ثانویه نقش دارد.

پراکسیدازهای کلاس III، اکسیدو ردوکتازهایی هستند که اکسیداسیون تعداد زیادی از پیش‌ماده‌های مختلف (عمدتاً مواد فنولی) به رادیکال‌های مربوطه را در حضور پراکسید هیدروژن به‌عنوان پذیرنده الکترون، پیش می‌برد. در واکنش انجام شده توسط پراکسیداز، رادیکال فنوکسیل (PhO) با کاهش یک الکترون از ترکیبات فنولی (PhoH) تولید می‌شود (واکنش یک).

کوالانس به دیواره متصل شده است. مورد اول که بیشتر معرف پاسخ تنش است با استفاده از گایاکول به‌عنوان دهنده الکترون سنجیده می‌شود. پراکسیداز دیواره‌ای با استفاده از سیرینگالدازین به‌عنوان دهنده الکترون سنجیده می‌شود و بیشتر نشان‌دهنده فرایند لیگنینی‌شدن (lignification) و سوپرینی شدن (Suberization) سلول‌ها است.

برای استخراج پراکسیداز، نمونه‌ها در بافر ۵۰ میلی‌مولار تریس- مالئات (pH ۶) هموژن شده در دور ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ می‌شوند. مایع رویی مجدداً در دور ۱۸۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و از آن برای سنجش SPO استفاده می‌شود. رسوب سانتریفیوژ اول و دوم به هم اضافه می‌شوند. سپس کلسیم کلراید CaCl_2 ۰/۲ مولار به آن اضافه می‌شود و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر انکوبه شده و سپس در دور ۱۸۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ می‌شوند. از مایع رویی حاصل برای اندازه‌گیری فعالیت IPO استفاده می‌شود و رسوب حاصل به‌طور مستقیم برای سنجش CPO مورد استفاده قرار می‌گیرد. مخلوط واکنش برای سنجش فعالیت بخش محلول پراکسیداز یعنی SPO شامل بافر ۶۰ میلی‌مولار پتاسیم- فسفات (۶/۱ pH)، ۲۸ میلی‌مولار گایاکول و ۵ میلی‌مولار H_2O_2 است. افزایش جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر پس از یک دقیقه ثبت می‌شود و فعالیت SPO به‌صورت تغییر جذب به نسبت میلی‌گرم پروتئین موجود در عصاره آنزیمی بیان می‌شود. پروتئین عصاره به‌طور معمول با روش برادفورد سنجیده می‌شود.

برای سنجش IPO و CPO، رسوبی که در بخش قبل به آن کلسیم کلراید اضافه شده بود سانتریفیوژ شده و از بخش رویی آن برای سنجش فعالیت IPO استفاده می‌شود. مخلوط واکنش نهایی (۳ میلی‌لیتر) حاوی ۴۱/۶ نانومولار سیرینگالدازین (سوستر خاص برای بیوستنز لیگنین و سوپرین)، ۴۰ میلی‌مولار بافر تریس- مالئات (pH ۶) و ۱۶ میلی‌مولار H_2O_2 است. فعالیت IPO به‌صورت افزایش جذب در ۵۳۰ نانومتر در

آمین‌ها، ایندول‌ها، آلکالوئیدها و سولفونات‌ها هستند (Ferreres *et al.*, 2011C). رایج‌ترین پیش‌ماده‌ها، مواد فنولی و گلیکوزیدهای آن‌ها هستند که شامل هیدروکسی سینامیک اسیدها، هیدروکسی بنزوئیک اسیدها، هیدروکسیل الکل‌ها (مانند کونیفریل و سیناپیل)، فلاونوئیدهای مختلف (مانند آنتوسیانین‌ها و فلاونول‌ها) و کومارین‌ها است.

با این حال، فعالیت پراکسیداز اغلب با استفاده از گایاکول اندازه‌گیری می‌شود که پس از اکسیداسیون با پراکسید هیدروژن محصول رنگی تولید می‌کند. البته با در نظر گرفتن اینکه عصاره پروتئینی، ترکیبی از ایزوآنزیم‌ها است، این اندازه‌گیری را می‌توان به‌عنوان روشی برای تعیین تغییر نسبی در فعالیت پراکسیداز کل تحت شرایط خاص در نظر گرفت. بنابراین، فعالیت ایزوآنزیم‌هایی با میل ترکیبی متفاوت برای یک پیش‌ماده، ممکن است با اندازه‌گیری میانگین فعالیت کل پراکسیداز مشخص نشود.

بیش از ۹۰ درصد فعالیت گایاکول پراکسیدازی محلول در عصاره‌های گیاهی مربوط به پراکسیدازهای واکوئلی است (با پیش‌ماده‌های فلاونوئیدی، آنتوسیانینی، ایندول آلکالوئیدی) و باقیمانده این فعالیت به پراکسیدازهایی نسبت داده می‌شود که به‌صورت یونی یا کوالانی به دیواره سلولی متصل شده‌اند و پیش‌ماده‌های آنها فرولیک اسیدها و کونیفریل آلدئیدهای آپوپلاستی است (Kitamura, 2006; Zhao, 2015). این پراکسیدازها مسئول سخت‌شدن دیواره سلولی طی تنش‌های متعدد از طریق بیوستنز لیگنین، سوپرین، ایجاد پل‌های ایزودی تیروزینی در ساختمان اکستنسین و نیز افزایش اتصال‌های عرضی بین قندهای پکتین و اسیدهای فنلی هستند (Ghanati *et al.*, 2005).

۱-۲- روش سنجش پراکسیدازهای محلول و دیواره‌ای (گایاکول پراکسیداز و سیرینگالدازین پراکسیداز): پراکسیداز (PO) استخراج و در سه بخش اندازه‌گیری می‌شود. بخش اول پراکسیداز محلول (SPO)، و بخش دوم پراکسیداز دیواره‌ای شامل پراکسیدازی که با پیوندهای یونی به دیواره متصل است (IPO) و پراکسیداز کوالانی (CPO) که با پیوند

با pH ۴/۵، ۳۰۰ میکرولیتر منیزیم کلراید یک میلی مولار، ۲۰۰ میکرولیتر دی کلرو فنل یک میلی مولار، ۳۰۰ میکرولیتر IAA یک میلی مولار، ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی است. مخلوط فوق به مدت ۵/۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد اینکوبه می شود و سپس ۲ میلی لیتر از معرف سالکوفسکی به آن اضافه می شود.

معرف سالکوفسکی شامل ۳ میلی لیتر از محلول آبی فریک کلراید ۰/۵ مولار است که ۶۰ میلی لیتر سولفوریک اسید غلیظ به آن اضافه شده است.

مخلوط واکنش به مدت نیم ساعت در تاریکی اینکوبه شده و سپس جذب آن در طول موج ۵۲۵ نانومتر خوانده می شود. مقدار اکسین اکسید شده در واکنش در مقایسه با منحنی استاندارد ۰-۳۰ میکرومولار اکسین محاسبه شده و فعالیت آنزیم به صورت مقدار مصرف اکسین در مدت ۱ دقیقه نسبت به مقدار پروتئین عصاره بیان می شود (Pressey, 1990).

۳- پراکسیدازهای واجد تیول

این گروه از پراکسیدازها دارای باقیمانده سیستئین یا سلنوسیستئین در جایگاه فعال خود هستند و شامل تیوردوکسین پراکسیدازها (پراکسی ردوکسین ها) و گلوکاتایون پراکسیدازها هستند.

۳-۱- پراکسی ردوکسین ها: پراکسی ردوکسین ها (E.C. 1.11.1.15; PRX)، پروتئین هایی ساده با فعالیت پراکسیدازی بر روی انواع سوبستراهای پراکسیدی مانند آلکیل هیدروپراکسیدها (ROOH) و پراکسی نیتريت (ONOOH) هستند. این پراکسیدازها تقریباً در همه موجودات زنده وجود دارند و یک سلول معمولاً حاوی چندین ایزوفرم از این آنزیم است که به طور ویژه ای در اندامک هایی مانند سیتوسل، میتوکندری، پراکسی زوم ها، هسته و کلروپلاست ها و حتی در فضای خارج سلولی توزیع شده اند. همه پراکسی ردوکسین ها، حاوی سیستئین "پراکسیداتیک" (Peroxidatic) (CP) در جایگاه فعال خود هستند که توسط سوبسترای پراکسید به سیستئین سولفنیک اسید (CP-SOH) اکسید شده و پراکسید را

دقیقه به نسبت میلی گرم پروتئین موجود در عصاره آنزیمی بیان می شود (Ghanati et al., 2005).

نکته: به سبب قلیایی بودن عصاره در این قسمت، پروتئین به روش لوری سنجیده می شود و روش برادفورد برای سنجش پروتئین این بخش مناسب نیست.

به رسوب حاصل از قسمت قبل یک میلی لیتر بافر اضافه شده و درحالی که با به هم زدن مخلوط می شود مستقیماً به مخلوط واکنش (۴۰ میلی مولار بافر تریس- مالئات (pH ۶) و ۱۶ میلی مولار H₂O₂) اضافه می شود. رسوب خشک و وزن می شود. فعالیت CPO به صورت افزایش جذب در طول موج ۵۳۰ نانومتر به نسبت وزن خشک دیواره سلولی بیان می گردد.

نکته بسیار مهم: لازم است که محلول های استوک گایاکول و هیدروژن پراکسید در غلظت مناسبی ساخته شوند که با توجه به حجمی که از آنها در مخلوط واکنش وارد می شود غلظت نهایی آنها حفظ شود.

۲-۲- اکسین اکسیداز: برخی ایزوفرم های خاص پراکسیداز دارای فعالیت ایندول ۳- استیک اسید (IAA) اکسیدازی هستند. نشان داده شده است که تمامی ایزوزایم های پراکسیداز ترب کوهی (Horseradish peroxidase) توانایی اکسید کردن IAA را دارند. گرچه اکسین یک آنیون است اما نه تنها آنیون پراکسیدازها بلکه برخی کاتیون پراکسیدازها نیز می توانند سبب پراکسیداسیون آن شوند. بنابراین نه تنها کاتیون پراکسیدازهای سیتوزولی بلکه آنیون پراکسیدازهای واکونلی و دیواره سلولی و غشای پلاسمایی نیز می توانند فعالیت اکسیدازی IAA نشان دهند (Mika and Luthje, 2003).

۲-۲-۱- روش سنجش IAA oxidase: این روش در دهه ۶۰ میلادی ابداع و تاکنون تغییرات متنوعی پیدا کرده است اما اساس آن استفاده از اکسین به عنوان سوبسترا و فریک کلراید (در معرف سالکوفسکی) به عنوان اکسیدکننده آن است.

ابتدا نمونه ها در بافر سدیم استات ۵۰ میلی مولار با pH ۵/۶ همگن شده و پس از سانتریفوژ شدن در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه، بخش رو به عنوان عصاره آنزیمی مورد استفاده قرار می گیرد. مخلوط واکنش حاوی ۲۰۰ میکرولیتر بافر سدیم استات مولار

گاردیانی از پرکول به وسیله سانتریفیوژ کردن افتراقی و استفاده از تیوردوکسین خالص به عنوان سوبسترا است.

۳-۱-۱- سنجش پراکسی ردوکسین‌ها: در یکی از ساده‌ترین روش‌های سنجش فعالیت پراکسی ردوکسین‌ها مخلوط واکنش (حجم نهایی ۲۵۰ میکرولیتر) حاوی بافر هپس ۵۰ میلی مولار (HEPES-NaOH pH 7.0)، دی‌تیو تریتیول ۲۰۰ میکرومولار، پراکسی ردوکسین (۲۵ میکروگرم و هیدروژن پراکسید (۱۰۰ میکرومولار) است و فعالیت آنزیمی به شکل کاهش جذب در ۳۴۰ نانومتر (مصرف هیدروژن پراکسید) نسبت به میلی‌گرم پروتئین عصاره بیان می‌شود.

۳-۲- گلوکاتایون پراکسیداز (GPX): گلوکاتایون پراکسیدازهای گیاهی آنزیم‌های فراگیر هستند که در همه بافت‌های گیاهی و در مراحل مختلف نموی وجود دارند (Yang et al., 2005) و نقش آنها در سم‌زدایی لپیدهای پراکسیدشده و دیگر مولکول‌های واکنشگر در تنش‌های مختلف نشان داده شده است (Edwards and Dixon, 2009). ژن‌های GPX گیاهی همولوژی زیادی با گلوکاتایون پراکسیدازهای جانوری دارند. اما پروتئین آنها در جایگاه فعال‌شان به جای سلنوسیتین سیستمین دارند که می‌تواند دلیل فعالیت‌های کمتر آنها در مقایسه با هم‌تایان آنها در پستانداران باشد (Navrot et al., 2006). همچنین پیشنهاد شده است که گیاهان بیشتر از تیوردوکسین پراکسیدازها به جای گلوکاتایون پراکسیدازها استفاده می‌کنند (Herbette et al., 2002). GPXs با دیگر پروتئین‌ها تعامل دارند و تصور می‌شود که عملکردهای سیگنال‌دهی داشته باشند و نیز به‌عنوان سنسورهای ROS یا سنسورهای ردوکس عمل کنند (Rodriguez Milla et al., 2003).

الگوی بیان متفاوت و موقعیت‌های درون‌سلولی GPXs گیاهی نشان می‌دهد که هرایزوفرم کارکردی خاص دارد. آنها در پاسخ‌های استرسی می‌توانند چندین نقش شامل حفظ هموستازی H_2O_2 با حذف آن و هیدروپراکسیدهای آلی، مشارکت با سایر پروتئین‌های فعال در استرس مثل SOD، تغییر احیایی پروتئین‌های هسته با کارکردهای سیگنالینگ، مشارکت

به ترکیب هیدروکسیلاته مربوطه احیا می‌کند. CP-SOH می‌تواند با احیاگرهای تیول غیر فیزیولوژیکی، مانند دی‌تیول تریتیول یا بتا مرکاپتوتانول، به CP-SH احیا شود، اما از نظر فیزیولوژیکی گروه سولفینیک با سیستمین دیگری از همان پروتئین ترکیب شده و یک پیوند دی‌سولفید برقرار می‌کند (تیبیکال 2-Cys-PRX). آنگاه دی‌سولفید توسط یک سیستم آنزیمی مبتنی بر تیول مرکب از تیوردوکسین (TRX) و تیوردوکسین ردوکناز (TRR)، احیا می‌شود. به همین دلیل، پراکسی ردوکسین‌ها، تیوردوکسین پراکسیداز نیز نامیده می‌شوند. (Jeong et al., 1999, 2000).

در برخی موارد، سیستمین اکسیدشده توسط یک سیستم مرکب از گلوکاتایون، گلوکاتاردوکسین (GRX) و گلوکاتایون ردوکناز (GR)، احیا می‌شود (1-CYS-PRX). (Pedrajas et al., 2010, 2016). در تمامی موارد فوق منبع پروتون NADPH است.

پراکسی ردوکسین‌های 2-Cys، اساساً در تمام اندام‌های گیاه حضور دارند. بیان آنها در نور زیاد به شدت افزایش و در نور کم کاهش می‌یابد (Horling et al., 2003). همچنین در حضور احیاگرهایی مانند آسکوربات و GSH سرکوب می‌شوند (Horling et al., 2003). گیاهانی که بیان پراکسی ردوکسین‌های 2-Cys در آنها متوقف شده است نشانه‌هایی از آسیب اکسیداتیو را نشان می‌دهند. به نظر می‌رسد محافظت پراکسی ردوکسین‌های 2-Cys کلروپلاستی از بخش فتوسنتزی، با چرخه آب-آب، بسیار کارا تر از مسیر مشخص شده آسکوربات پراکسیداز- مهلر باشد (Kangasjarvi et al., 2008).

پراکسی ردوکسین‌های گیاهی در مقایسه با آسکوربات پراکسیدازها و کاتالازها، پراکسیدازهای نسبتاً کندی هستند. به علاوه، علیرغم فراوانی، پراکسی ردوکسین‌ها از پراکسیدازهای کم بازده هستند که در بخش‌های سلولی مجزا از جمله کلروپلاست و میتوکندری قرار دارند. به همین سبب سنجش فعالیت آنها مستلزم جداسازی کلروپلاست و میتوکندری مثلاً با

۰/۱ مولار و ۲۰۰ میکرولیتر از KNaHPO_4 ۰/۲ مولار مخلوط شد. مخلوط معرف‌های بالابدون عصاره آنزیمی به‌عنوان شاهد استفاده شد. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند، سپس ۲۰۰ میکرولیتر H_2O_2 ۱/۳ مولار به هر یک اضافه شد. پس از گذشت ۱۰ دقیقه به منظور متوقف کردن واکنش، ۱ میلی‌لیتر از تری‌کلرو استیک اسید ۱٪ افزوده شده، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفتند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۱۰۰۰ سانتریفوژ شدند. در نهایت مخلوط واکنش حاوی ۴۸۰ میکرولیتر از عصاره، ۲/۲ میلی‌لیتر از KNaHPO_4 ۰/۳۲ مولار و ۳۲۰ میکرولیتر از DTNB ۱ میلی‌مولار است و جذب در ۴۱۲ نانومتر خوانده می‌شود (Hartikainen *et al.*, 2000).

در ارتباط متقابل بین مسیرهای سیگنالینگ مختلف مثل نقش AtGPX1 و AtGPX7 در استرس فتواکسیداتیو و عفونت پاتوزنی و نقش AtGPX3 در سیگنالینگ H_2O_2 و ABA داشته باشند. به این ترتیب GPXs نه تنها می‌تواند از سلول‌ها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظ کنند بلکه به‌عنوان مؤلفه‌ای مهم در رشد و نمو گیاه با واسطه هورمون‌ها نیز نقش داشته و از این طریق در رشد ریشه‌ها و ریشه‌های جانبی، باززایی گیاه و ارگانوژنز ساقه، نمو برگ گل و دانه و جلوگیری از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول نقش ایفا کنند. (Bela *et al.*, 2015).

۳-۲-۱- سنجش GPX: ابتدا نمونه‌ها با استفاده از بافر فسفات سدیم- پتاسیم با (pH ۷) روی یخ ساییده و سپس با دور ۱۵۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. جهت سنجش فعالیت آنزیم، ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره با ۴۰۰ میکرولیتر GSH

منابع

- Abarca, D., Martin, M. and Sabater, B. (2001) Differential leaf stress responses in young and senescent plants. *Physiologia Plantarum* 113: 409-415.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S. and Tattini, M. (2012) Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science* 196: 67-76.
- Allison, S. D. and Schultz, J. C. (2004) Differential activity of peroxidase isozymes in response to wounding, gypsy moth, and plant hormones in northern red oak (*Quercus rubra* L.). *Journal of Chemical Ecology* 30: 1363-1379.
- Asada, K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 601-639.
- Bernards, M. A., Fleming, W. D., Llewellyn, D. B., Priefer, R., Yang, X., Sabatino, A. and Plourde, G. L. (1999) Biochemical characterization of suberization-associated anionic peroxidase of potato. *Plant Physiology* 121: 135-145.
- Bela, K., Horvath, E., Galle, A., Szabados, L., Tari, I. and Csiszar, J. (2015) Plant glutathione peroxidases: Emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. *Journal of Plant Physiology* 176: 192-201.
- Dicko, M. H., Gruppen, H., Hilhorst, R., Voragen, A. G. and van Berkel, W. J. (2006) Biochemical characterization of the major sorghum grain peroxidase. *The FEBS Journal* 273: 2293-2307.
- Edwards, R. and Dixon, D. P. (2009) Selective binding of glutathione conjugates of fatty acid derivatives by plant glutathione transferases. *Journal of Biological Chemistry* 284: 21249-21256.
- Ferreres, F., Figueiredo, R., Bettencourt, S., Carqueijeiro, I., Oliveira, J., Gil-Izquierdo, A. and Sottomayor, M. (2011) Identification of phenolic compounds in isolated vacuoles of the medicinal plant *Catharanthus roseus* and their interaction with vacuolar class III peroxidase: an H_2O_2 affair? *Journal of Experimental Botany* 62: 2841-2854.
- Chen, S. and Schopfer, P. (1999) Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *European Journal of Biochemistry* 260: 726-773.
- Foyer, Ch. and Noctor, G. (2011) Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub. *Plant Physiology* 155: 2-18.
- Gallie, D. R. (2013) The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. *Journal of Experimental Botany* 64: 433-443.
- Ghanati, F., Morita, A. and Yokota, H. (2005) Effects of aluminum on the growth of tea plant and activation of antioxidant system. *Plant and Soil* 276: 133-141.
- Ghanati, F., Morita, A. and Yokota, H. (2005) Deposition of suberin in roots of soybean induced by excess boron. *Plant Science* 168: 397-405.
- Gill, S. and Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.

- Hasanuzzaman, M., Hossain, M. A., Teixeira da Silva, J. A. and Fujita, M. (2012) Plant responses and tolerance to abiotic oxidative stress: Antioxidant defense is a key factor. In: *Crop Stress and its Management: Perspectives and Strategies* (eds. Bandi, V., Shanker, A. K., Shanker, C. and Mandapaka, M.) Pp. 261-316. Springer, Berlin, Germany.
- Herbette, S., Lenne, C., Leblanc, N., Julien, J. L., Drevet, J. R. and Roeckel-Drevet, P. (2002) Two GPX likeproteins from *Lycopersicon esculentum* and *Helianthus annuus* are antioxidantenzymes with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and thiore-doxin peroxidase activities. *European Journal of Biochemistry* 269: 2414-2420.
- Horling, F., Lamkemeyer, P., Konig, J., Finkemeier, I., Kandlbinder, A., Baier, M. and Dietz, K. J. (2003) Dependent regulation of expression of the peroxiredoxin gene family in Arabidopsis. *Plant Physiology* 131: 317-325.
- Jeong, J. S., Kwon, S. J., Kang, S. W., Rhee, S. G. and Kim, K. (1999) Purification and characterization of a second type thioredoxin peroxidase (Type II TPx) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 38: 776-783.
- Jeong, W., Cha, M. K. and Kim, I. H. (2000) Thioredoxin-dependent hydroperoxide peroxidase activity of bacterioferritin comigratory protein (BCP) as a new member of the thiol- specific antioxidant protein (TSA)/alkyl hydroperoxide peroxidase C (AhpC) family. *Journal of Biological Chemistry* 275: 2924-2930.
- Kelly, G. J. and Latzko, E. (1979) Soluble ascorbate peroxidase. Detection in plants and use in vitamin C estimation. *Naturwissenschaften* 66: 617-618.
- Kangasjarvi, S., Lepisto, A., Hannikainen, K., Piippo, M., Luomala, E. M., Aro, E. M. and Rintamaki, E. (2008) Diverse roles for chloroplast stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidases in plant stress responses. *Journal of Biochemical* 412: 275-285.
- Kitamura, S. (2006) Transport of flavonoids. From cytosolic synthesis to vacuolar accumulation. In: *The Science of Flavonoids* (ed. Grotewald, E.) Pp. 123-146. Springer, New York.
- Lopez-Serrano, M., Fernandez, M. D., Pomar, F., Pedreno, M. A. and Ros Barcelo, A. (2004) *Zinnia elegans* uses the same peroxidase isoenzyme complement for cell wall lignification in both single-cell treachery elements and xylem vessels. *Journal of Experimental Botany* 55: 423-431.
- Maruta, T., Sawa, Y., Shigeoka, S. and Ishikawa, T. (2016) Diversity and evolution of ascorbate peroxidase functions in chloroplasts: More than just a classical antioxidant enzyme? *Plant Cell Physiology* 57: 1377-1386.
- McInnis, S. M., Desikan, R., Hancock, J. T. and Hiscock, S. J. (2006) Production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species by angiosperm stigmas and pollen: Potential signalling crosstalk? *New Phytologist* 172: 221-228
- Mika, A. and Luthje, S. (2003) Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. *Plant Physiology* 132: 1489-1498.
- Morina, F., Jovanovic, L. J., Mojovic, M., Vidovic, M., Pankovic, D. and Veljovic-Jovanovic, S. (2010) Zinc-induced oxidative stress in *Verbascum thapsus* is caused by an accumulation of reactive oxygen species and quinhydrone in the cell wall. *Physiologia Plantarum* 140: 209-224.
- Movahed, N., Pastore, C., Cellini, A., Allegro, G., Valentini, G., Zenoni, S. and Filippetti, I. (2016) The grapevine VviPrx31 peroxidase as a candidate gene involved in anthocyanin degradation in ripening berries under high temperature. *Journal of Plant Research* 129: 513-526.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22: 867-880.
- Navrot, N., Collin, V., Gualberto, J., Gelhaye, E., Hirasawa, M., Rey, P., et al. (2006) Plant glutathioneperoxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology* 142: 1364-1379.
- Nedelcu, A. M., Miles, I. H., Fagir, A. M. and Karol, K. (2008) Adaptive eukaryote-to-eukaryote lateral gene transfer: Stress-related genes of algal origin in the closest unicellular relatives of animals. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 1852-1860.
- Pandey, V. P., Singh, S., Singh, R. and Dwivedi, U. N. (2012) Purification and characterization of peroxidase from papaya (*Carica papaya*) fruit. *Appl Biochem Biotech* 167: 367-376.
- Passardi, F., Bakalovic, N., Teixeira, F. K., Margis-Pinheiro, M., Penel, C. and Dunand, C. (2007) Prokaryotic origins of the non-animal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes. *Genomics* 89: 567-579.
- Passardi, F., Tognolli, M., De Meyer, M., Penel, C. and Dunand, C. (2006) Two cell wall associated peroxidases from Arabidopsis influence root elongation. *Planta* 223: 965-974.
- Pedrajas, J. R., Mc Donagh, B., Hernandez-Torres, F., Miranda-Vizuete, A., Gonzalez-Ojeda, R., Martinez-Galisteo, E., Padilla, C. A. and Barcena, J. A. (2016) Glutathione is the resolving thiol for thioredoxin peroxidase activity of 1-Cys peroxiredoxin without being consumed during the catalytic cycle. *Antioxid Redox Signal* 24: 115-128.
- Pedrajas, J. R., Padilla, C. A., Mc Donagh, B. and Barcena, J. A. (2010) Glutaredoxin participates in the reduction of peroxides by the mitochondrial 1-CYS peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antioxid Redox Signal* 13: 249-258

- Pereira, A. (2016) Plant abiotic stress challenges from the changing environment. *Frontiers in Plant Science* 7: 1123.
- Pressey, R. (1990) Anions activate the oxidation of indoleacetic acid by peroxidases from tomato and other sources. *Journal of Plant Physiology* 93: 798-804.
- Quiroga, M., Guerrero, C., Botella, M. A., Barcelo, A., Amaya, I., Medina, M. I. and Valpuesta, V. (2000) A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiology* 122: 1119-1128.
- Raja, V., Majeed, U., Kang, H., Andrabi, K. I. and John, R. (2017) Abiotic stress: Interplay between ROS, hormones and MAPKs. *Environmental and Experimental Botany* 137: 142-157.
- Rodriguez Milla, M. A., Maurer, A., Rodriguez Huete, A. and Gustafson, J. P. (2003) Glutathione per-oxidase genes in *Arabidopsis* are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways. *The Plant Journal* 36: 602-615.
- Sreenivasulu, N., Grimm, B., Wobus, U. and Weschke, W. (2000) Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*). *Physiologia Plantarum* 109: 435-442.
- Scialabba, N., Grandi, C. and Henatsch, C. (2002) Organic agriculture and genetic resources for food and agriculture. In: *Biodiversity and the ecosystem approach in agriculture, forestry, and fisheries: satellite event on the occasion of the ninth regular session of the Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture* 74-98.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y. and Yoshimura, K. (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* 53: 1305-1319.
- Singh, A., Kumar, A., Yadav, S. and Singh, I. K. (2019) Reactive oxygen species-mediated signaling during abiotic stress. *Plant Gene* 18: 100173.
- Takahama, U. and Oniki, T. (1992) Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics in the apoplast of spinach leaves by ascorbate. *Plant and Cell Physiology* 33: 379-387.
- Takahama, U. and Oniki, T. (2000) Flavonoids and some other phenolics as substrates of peroxidase: Physiological significance of the redox reactions. *Journal of Plant Research* 113: 301-309.
- Teixeira, F. K., Menezes-Benavente, L., Margis, R. and Margis-Pinheiro, M. (2004) Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: Inferences from the rice genome. *Journal of Molecular Evolution* 59: 761-770
- Veljovic Jovanovic, S., Kukavica, B., Vidovic, M., Morina, F. and Menckhoff, L. (2018) Class III peroxidases: functions, localization and redox regulation of isoenzymes. *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants* 269-300.
- Yang, X. D., Li, W. J. and Liu, J. Y. (2005) Isolation and characterization of a novel PHGPx gene in *Raphanus sativus*. *Biochim Biophys Acta* 1728: 199-205.
- Zhao, J. (2015) Flavonoid transport mechanisms: How to go, and with whom. *Trends in Plant Science* 20: 576-585.

A review of structural properties, metabolic function and measurement of peroxidase activity

Fatemeh Erfan Manesh and Faezeh Ghanati*

¹ Department of Plant Biology, Faculty of Biology Science, University of Tehran
(Received: 17/05/2022, Accepted: 24/05/2022)

Abstract

The production of reactive oxygen species occurs during the natural metabolism of oxidative-breathing cells. Among reactive oxygen species, hydrogen peroxide is more dangerous to cell life due to its long half-life, meanwhile it is an important regulatory molecule in redox signaling in living things. Peroxidases are one of the key antioxidant enzymes that are widely distributed in nature and promote the oxidation of various electron donor substrates simultaneously with the decomposition of hydrogen peroxide which lead to production of water during reducing hydrogen peroxide and other hydroperoxides. Meanwhile, peroxidases, in addition to their known peroxide inhibitory properties, have physiological oxidizing functions. Based on the chemistry of the active site in the interaction with the peroxide, peroxidases are classified to non-heme and heme bearing peroxidases. The former contains heme in its catalytic center, and the latter has a reactive selenol or thiol in its active site. Iron-based plant peroxidases are divided into three classes I, II and III. Thiol plant peroxidases include glutathione peroxidase and proxy reductases. The present article explains the structural and metabolic, and properties of peroxidases and provides certain practical procedures for determination of their enzymatic activities.

Keywords: Hydrogen peroxide, heme-containing peroxidase, Peroxidase, peroxiredoxins, Thiol peroxidases

Corresponding author, Email: ghangia@modares.ac.ir