

بررسی تاثیر برخی از ترکیبات آمین دار بر روی ساختار و فعالیت آنزیم

ریبونوکلئاز A

فرشید کفیل زاده^{۱*}

Kafilzadeh@jia.ac.ir

سحر جانفشان^۲

حمید محمدی^۳

تاریخ پذیرش: ۸۸/۶/۲۵

تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۲۵

افزایش آلودگی های زیست محیطی به دلیل حضور انواع ترکیبات کلر دار و برم دار در جو، مصرف بی رویه انواع حشره کش ها و علف کش ها که دارای مواد شیمیایی سرطان زا هستند، مصرف صنعتی مواد شیمیایی سرطان زا و بسیاری از عوامل آلوده کننده دیگر به طور مستقیم و یا از طریق از بین بردن لایه اوزون می توانند اثر سرطان زایی داشته باشند. ابتلا به بیماری سرطان همراه با تغییرات درون سلولی بسیار مهم مانند افزایش غلظت ترکیبات آمین دار طبیعی است. بدین منظور در این تحقیق تاثیر افزایش غلظت برخی از آمین های طبیعی بر روی ساختار و عملکرد یکی از مهم ترین آنزیم های پستانداران به نام ریبونوکلئاز A بررسی شده است. در ابتدا فعالیت آنزیم مورد نظر در حضور ترکیبات آمین دار طبیعی (پوترسین، اسپرمیدین، اسپرمین، کاداورین) و همچنین در عدم حضور آن ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری و در طول موج 284 nm اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که تنها ترکیب پوترسین منجر به کاهش فعالیت آنزیم می شود و بدین منظور تاثیر پوترسین بر روی ساختار آنزیم ریبونوکلئاز A با استفاده از تکنیک دو رنگ نمایی دورانی بررسی شد. نتایج کلی نشان می دهد که ترکیب پوترسین هم منجر به کاهش فعالیت آنزیم ریبونوکلئاز A و هم منجر به بهم ریختگی ساختار دوم آن می شود.

واژه های کلیدی: ریبونوکلئاز A، آمین های طبیعی، فعالیت آنزیم، پوترسین، دو رنگ نمایی دورانی

۱- استادیار، گروه بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، جهرم، ایران* (مسئول مکاتبات)

۲- کارشناس ارشد، گروه بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، جهرم، ایران

۳- استادیار، گروه بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، جهرم، ایران

مقدمه

افزایش آلودگی های زیست محیطی منجر به بروز و تشدید انواع سرطان ها در انسان شده است. به طور مثال کاهش غلظت اوزون استراتوسفر که به علت مصرف صنعتی و غیر صنعتی انواع ترکیبات کلر دار و برم دار پیش آمده است، سبب می شود که نور UV-B بیشتری به سطح زمین نفوذ کند. اکثر اثرات زیان آور زیستی از آنجا ناشی می شود که UV-B می تواند به وسیله مولکول های DNA جذب شود و منجر به فرایند موتاسیون در آن ها گردد. تقریباً تمام سرطان های پوست به علت ایجاد موتاسیون در ژن های کلیدی در تماس زیاد با UV-B در نور خورشید ایجاد می شود. بنابراین، هر کاهشی در اوزون انتظار می رود که نهایتاً به افزایش شیوع سرطان پوست منتهی شود. همچنین مصرف بی رویه انواع علف کش ها و حشره کش هایی که دارای مواد شیمیایی سرطان زا مانند دیوکسین هستند، منجر به افزایش شیوع انواع مختلف سرطان در انسان شده است.

ترکیباتی که مصرف صنعتی دارند نظیر آرسنیک، آزبستوز، بنزن، بنزیدین، نفتالامین، دی اکسید توریم، وینیل کلراید، آکریلو نیتریل، آئیزیدین هیدروکلراید و بسیاری از مواد دیگر به طور مستقیم و یا از طریق از بین بردن لایه اوزون می توانند اثر سرطان زایی داشته باشند (۱). پس از مبتلا شدن انسان به بیماری سرطان یک رشته تغییرات درون سلولی در بخش آسیب دیده رخ می دهد. از جمله مهم ترین این تغییرات می توان به افزایش غلظت ترکیبات آمین دار طبیعی که در سلول تولید می شوند اشاره کرد. این ترکیبات شامل اسپرمین، اسپرمیدین، پوترسین، و کاداورین است که در واقع این ترکیبات پلی کاتیون های آلیفاتیک ارگانیک هستند که در همه سلول های یوکاریوتی و پروکاریوتی که تا کنون مطالعه شده اند، از قبیل سلول های پستانداران، مخمر و باکتری ها یافت می شوند. ساختار این ترکیبات از دو بخش عمده، زنجیره هیدروکربنی و گروه آمین تشکیل شده است. گروه آمین این ترکیبات در pH فیزیولوژیک بار مثبت پیدا می کند و این

بارهای مثبت در عملکردهای فیزیولوژیک آمین ها نقش کلیدی دارند.

با توجه به نوع ساختاری که این ترکیبات دارند به عنوان لیگاند به بخش هایی از مولکول های DNA، RNA، نوکلئوتید تری فسفات ها، پروتئین ها، فسفولیپیدهای اسیدی غشا، آنزیم های متصل به غشا مانند آدنیلات سیکلاز و ترانس گلوتامیناز بافتی و برخی از کانال های یونی متصل می شوند. تا کنون حضور فعال این ترکیبات در فرایندهایی نظیر رشد سلولی، تنظیم چرخه سلولی مورد بررسی قرار گرفته است.

در صورتی که میزان آمین های طبیعی درون سلولی تنظیم نشود، عوارضی را به دنبال دارد. کاهش سطح آن ها در سلول های پستانداران منجر به کاهش رشد سلول ها شده و تجمع این ترکیبات در سلول، اثر سمی به جای گذاشته و منجر به افزایش بیش از حد تکثیر سلول ها و پیشرفت بیماری هایی نظیر سرطان می شود (۹-۲).

با توجه به این که افزایش غلظت آمین های طبیعی در سلول های سرطانی اثبات شده است، به نظر می رسد به علت وجود بار مثبت در این ترکیبات افزایش غلظت آن ها در سلول های سرطانی منجر به ایجاد تغییرات عملکردی و ساختاری در ماکرومولکول های زیستی از جمله مولکول DNA و پروتئین های ساختاری و آنزیمی شود. یکی از آنزیم های مهمی که در این زمینه مورد توجه است آنزیم ریونوکلئاز A می باشد. نقش این آنزیم شکستن پیوندهای شیمیایی فسفو دی استر در ساختمان RNA تک رشته ای طی یک واکنش دو مرحله ای و در محل ۵' استر می باشد.

مرحله اول این واکنش آنزیمی یک واکنش ترانس فسفریلاسیون (ترانس استریفیکاسیون) است که منجر به تشکیل حد واسط ۳' و ۳' فسفات حلقوی (حد واسط فسفو دی استر حلقوی) در یک سمت از پیوند شکسته شده و گروه آزاد ۵' - هیدروکسیل در سمت مخالف آن می گردد. مرحله دوم این واکنش آنزیمی، یک واکنش هیدرولازی (آبکافت) است که منجر به تجزیه شیمیایی حد واسط فسفو دی استر حلقوی و

۲- بررسی اثر آمین های طبیعی بر فعالیت آنزیم ریبونوکلئاز A بررسی اثر آمین های طبیعی شامل پوترسین، کاداورین، اسپرمین و اسپرمیدین بر فعالیت آنزیم ریبونوکلئاز A در محدوده غلظتی ۰-۲ mM و ۰-۵۰ mM و در غلظت ۰/۸ سوبسترا انجام شد. در این مرحله آنزیم به همراه غلظت مورد نظر آمین دو دقیقه آنکوبه شد و سپس به محفظه نمونه مجموع آنزیم و آمین مورد نظر افزوده گردید. پس از آن در حضور آمین اختلاف جذب دو محفظه در ۲۸۴ nm صفر شد و ثبت سرعت آنزیم در غلظت ۰/۸ mM سوبسترا و در هر غلظت آمین با دو بار تکرار انجام گرفت. در پایان نیز نمودار غلظت های مختلف آمین ها در مقابل سرعت باقی مانده رسم گردید (۱۸).

۳- بررسی اثر لیگاند پوترسین بر سینتیک آنزیم ریبونوکلئاز A بررسی اثر پوترسین بر منحنی اشباع آنزیمی در غلظت های ۰/۴، ۰/۸ و ۱۰ mM انجام شده است. برای مطالعه سینتیکی در حضور پوترسین ابتدا آنزیم به همراه غلظت مورد نظر پوترسین دو دقیقه آنکوبه شد و سپس به محفظه نمونه مجموع آنزیم و پوترسین افزوده گردید. ثبت سرعت آنزیم در محدوده غلظتی ۰-۲ mM سوبسترا و در هر غلظت از لیگاند پوترسین با سه بار تکرار انجام گرفت. منحنی اشباع آنزیم نیز برای هر غلظت پوترسین به طور جداگانه پس از ثبت داده ها رسم شد.

۴- بررسی ساختار دوم آنزیم ریبونوکلئاز A با استفاده از تکنیک دورنگ نمایی دورانی یا Circular Dichorism (CD) طیف های CD در ناحیه ماورای بنفش دور (Far-UV CD spectra) با استفاده از دستگاه طیف نور سنج Jasco J-7.5 در غلظت ۱/۴ μM آنزیم و غلظت های ۰، ۲۰، ۵۰، ۷۰، ۸۰ و ۱۳۰ mM پوترسین پس از ۵ دقیقه آنکوباسیون در دمای ۲۷°C ثبت شد و نتایج حاصل براساس واحد بیضی واری مولی (molar ellipticity) یا $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ گزارش شده است. در این رابطه از معادله
$$[\theta]_{\lambda} = (\theta_{obs} \times 100MRW) / C.L$$
 آن C نشان دهنده غلظت پروتئین برحسب $\frac{mg}{ml}$ ، L نمایانگر طول مسیر عبوری نور برحسب cm، MRW متوسط وزن

تشکیل انتهای مونو استری ۳' فسفات (۳' فسفو لیگو نوکلئوتید) می شود (۱۱-۱۰).

تا کنون تاثیر ترکیبات آمین دار بر آنزیم های مختلفی بررسی شده است که از آن جمله می توان به نیتریک اکسید سنتاز، ارنی تین دکربوکسیلاز، استافیلوکوکال نوکلئاز، آریل هیدروکربن رسپتورها، F-ATpase میتوکندریایی، پرولین اندوپپتیداز، پروتئین کیناز C، DNA لیگاز پستانداران، کانال های وابسته به کلسیم، کازئین کیناز II، توبولینیل تیروزین کربوکسی پپتیداز، گلیکوژن سنتاز فسفاتاز ماهیچه ای، فسفولیپاز C، گلوکز ۶ فسفاتاز، سیتروباکتر نوکلئاز و اشاره کرد (۱۲).

بدین ترتیب با توجه به اهمیت حضور این ترکیبات در سلول محققان مختلف درصدد بررسی اثرات این ترکیبات در غلظت های فیزیولوژیک و غیر فیزیولوژیک، بر روی ساختارهای مختلف سلولی (به طور عمده پروتئین ها و آنزیم ها) برآمده اند. با توجه به اهمیت ترکیبات آمین دار و همچنین نقش مهم آنزیم ریبونوکلئاز A، در این تحقیق تاثیر افزایش غلظت آمین های طبیعی بر روی ساختار و عملکرد یکی از مهم ترین آنزیم های پستانداران به نام ریبونوکلئاز A بررسی شده است.

مواد و روش ها

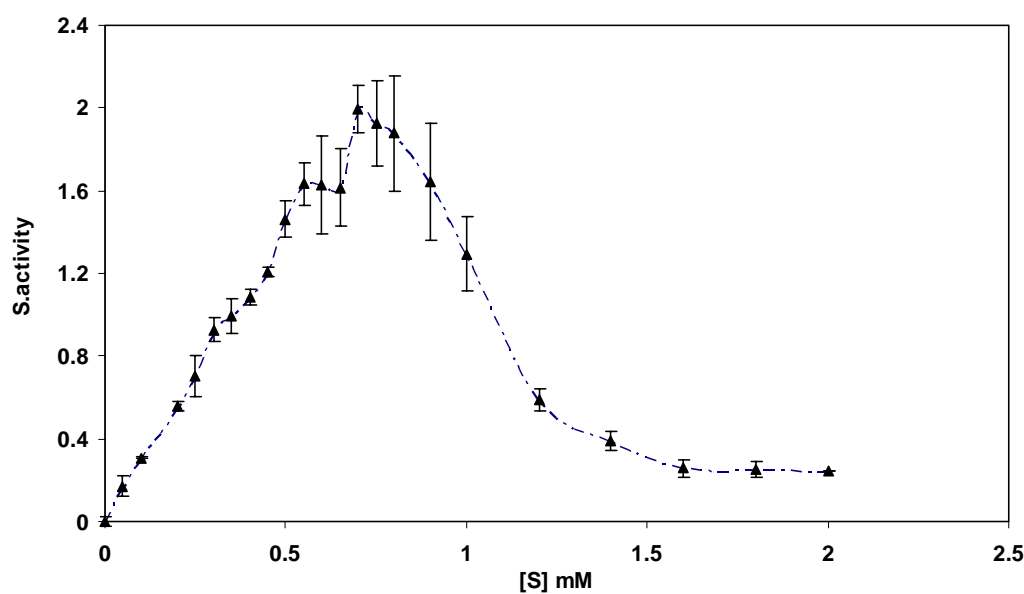
۱- سنجش فعالیت آنزیمی ریبونوکلئاز A در این پروژه مطالعات سینتیکی با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر ماوراء بنفش - مرئی مدل CECIL 9000 در طول موج ۲۸۴ nm (۱۳) و در دمای ۲۷°C انجام شده است. بافر مورد استفاده Tris-EDTA شامل EDTA:2mM، Tris:100mM، با pH:7.5 بوده است. در بررسی های سینتیکی از غلظت ۵ μM آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گاوی در حضور سوبسترای cCMP در محدوده غلظتی ۰-۲ mM استفاده شده است. ثبت سرعت آنزیم در هر غلظتی از سوبسترا با سه بار تکرار انجام گرفت و با استفاده از میانگین سرعت های ثبت شده منحنی اشباع آنزیمی ترسیم شد (۱۷-۱۴).

۱- سنجش فعالیت آنزیم ریبونوکلئاز A در حضور سوبسترای cCMP

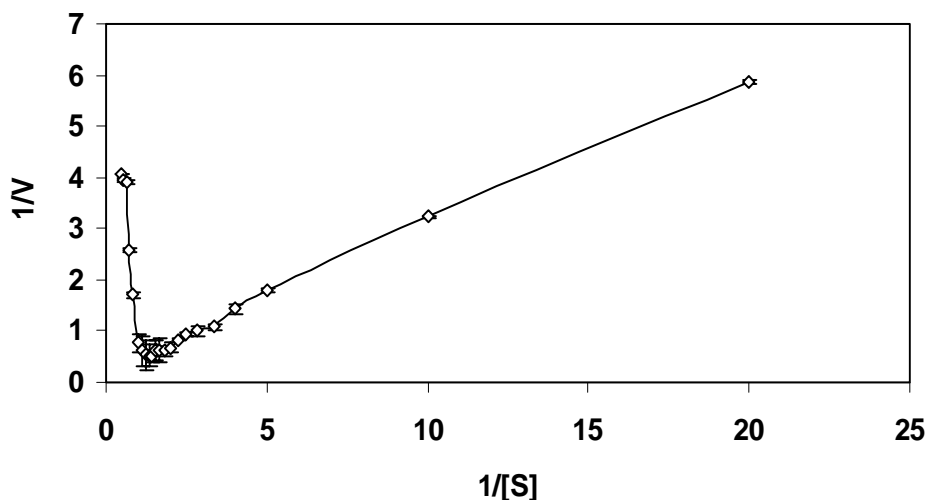
منحنی اشباع آنزیمی در محدوده غلظتی ۰-۲mM سوبسترای cCMP و در غلظت ۵ μM آنزیم در هر سنجش، رسم شده است. شکل کلی منحنی به صورت غیر هایپربولیک است که به نظر می رسد علت آن ظهور پدیده ای همانند پدیده مهار سوبسترای می باشد. این پدیده تقریباً از غلظت ۰/۸ mM سوبسترا آغاز می شود و کاهش فعالیت آنزیم را در غلظت های بالاتر سوبسترا به دنبال دارد تا جایی که در غلظت ۲ mM سوبسترا فعالیت آنزیم نزدیک صفر است (نمودار ۱، ۲).

مولکولی یک اسید آمینه و θ مقدار اندازه گیری شده از بیضی واری برحسب درجه در یک طول موج خاص می باشد. دستگاه توسط ماده (+)-1- کافوراسیدسولفونیک و با توجه به مقدار گزارش شده $[\theta]_{291} = 7820 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ کالیبره شده است. حذف اغتشاشات موجود در منحنی های ثبت شده نیز با استفاده از نرم افزار Aviv بدون تغییر در شکل اصلی منحنی ها صورت گرفته و برای آنالیز طیف ها جهت تعیین میزان ساختارهای دوم از نرم افزار CDNN استفاده شده است (۱۹).

نتایج و بحث



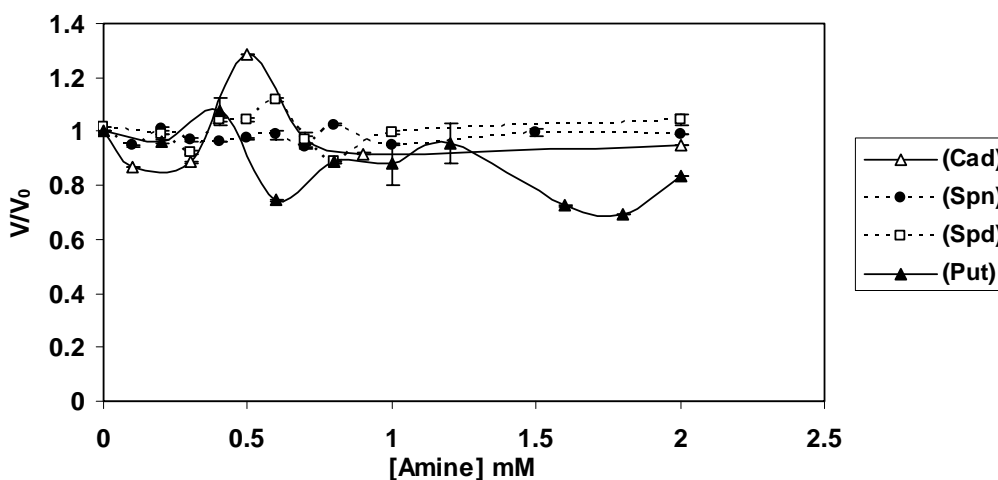
نمودار ۱- منحنی اشباع آنزیم در محدوده غلظتی ۰-۲ mM سوبسترای cCMP



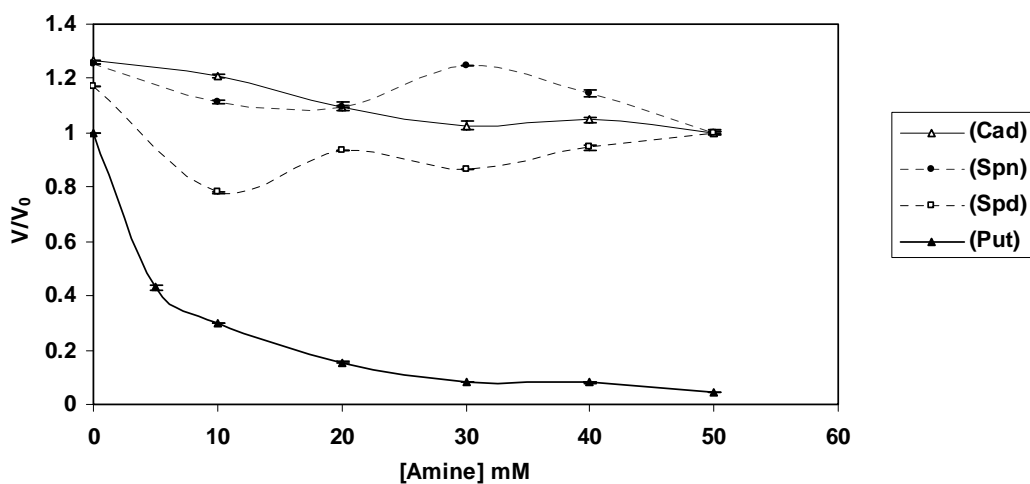
نمودار ۲- منحنی لینویر- برک. بخشی از منحنی که از حالت خطی خارج و به سمت بالا منحرف شده است پدیده مهار سوبسترای را نشان می دهد.

کاداورین، اسپرمین و اسپرمیدین تا ۵۰ mM همچنان باعث ایجاد نوسانات اندکی در سرعت آنزیم شده است، در حالی که افزایش تدریجی غلظت پوترسین تا ۵۰ mM منجر به کاهش سرعت آنزیم می شود تا جایی که در این غلظت سرعت آنزیم تقریباً صفر است. این آزمایش اثر غیرفعال کنندگی پوترسین را بر روی سرعت آنزیم ریبونوکلئاز A نشان می دهد که برای اطمینان از این نتیجه لازم است در چند غلظت از پوترسین منحنی اشباع آنزیمی رسم گردد (نمودار ۳ و ۴).

۲- تاثیر آمین های طبیعی شامل پوترسین، کاداورین، اسپرمین و اسپرمیدین بر فعالیت آنزیم ریبونوکلئاز A
تاثیر این ترکیبات آمین دار بر سرعت آنزیمی در محدوده غلظتی ۰-۲ mM و ۰-۵۰ mM آن ها بررسی شده است. نتایج نشان می دهند که در محدوده غلظتی ۰-۲ mM از آمین های فوق، سرعت آنزیم تغییری نمی کند و صرفاً نوساناتی در آن دیده می شود که از لحاظ آماری و با توجه به تعدد تکرار صورت گرفته قابل چشم پوشی است. افزایش تدریجی غلظت



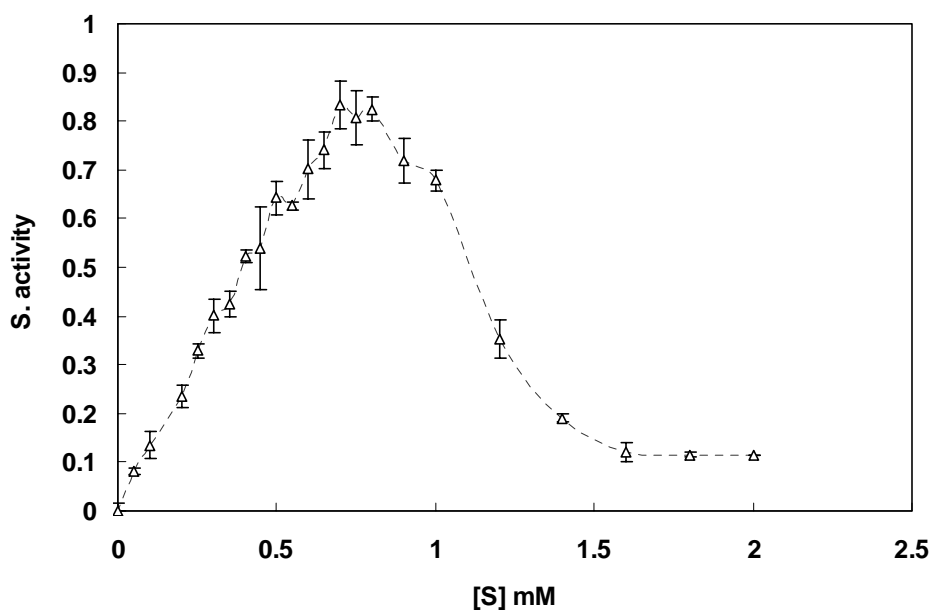
نمودار ۳- تاثیر ترکیبات آمین دار در محدوده غلظتی ۰-۲ mM بر روی سرعت آنزیم ریبونوکلئاز A



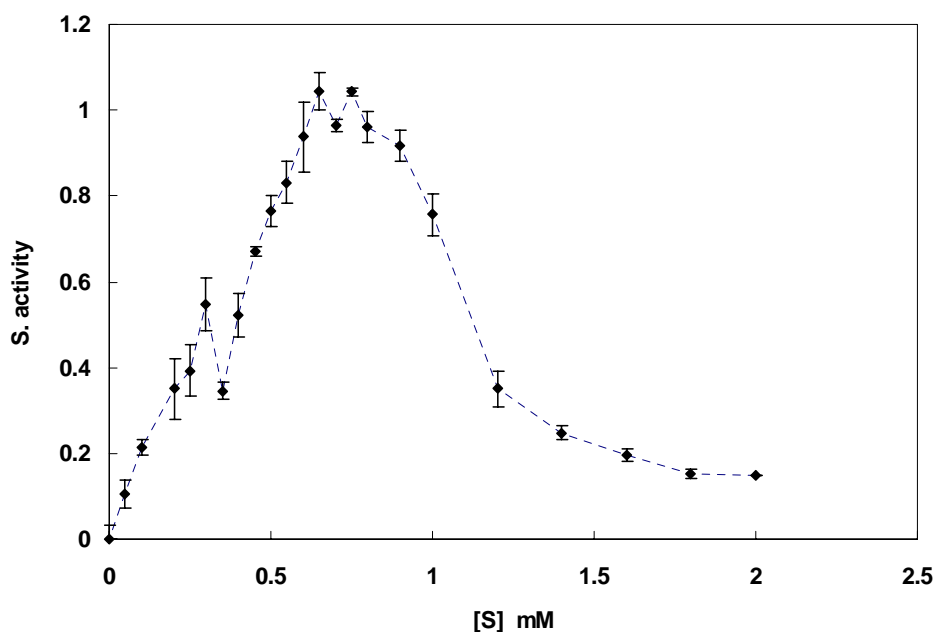
نمودار ۴- تاثیر ترکیبات آمین دار در محدوده غلظتی ۰-۵۰ mM بر روی سرعت آنزیم ریبونوکلئاز A

مختلف لیگاند پوترسین نیز تکرار پذیر است. علاوه بر این پوترسین به طور قابل توجهی باعث کاهش فعالیت آنزیم می شود که این موضوع تاییدی بر اثر غیر فعال کنندگی آن می باشد (نمودار ۵، ۶ و ۷).

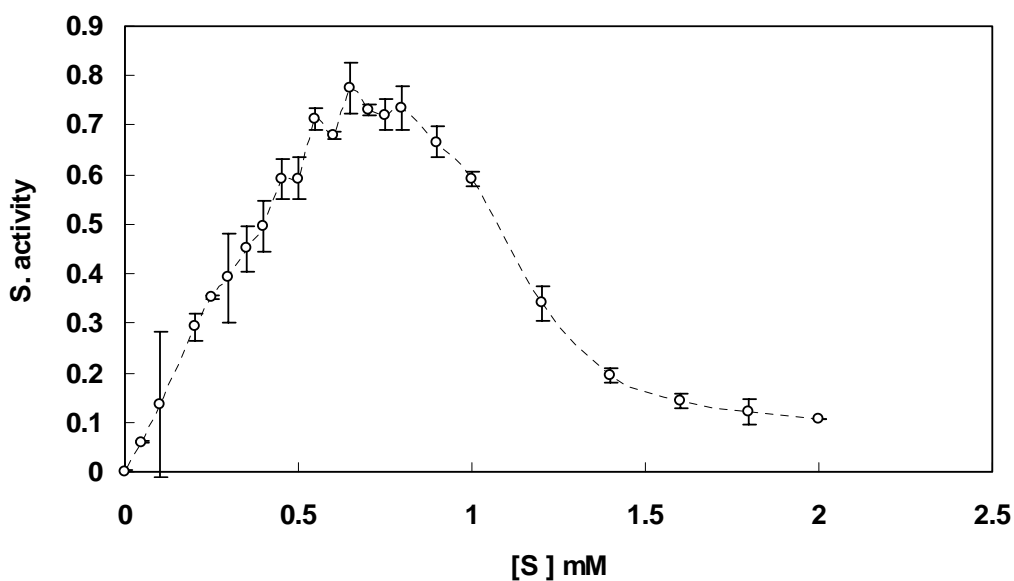
۳- بررسی اثر پوترسین بر سینتیک آنزیم ریبونوکلئاز A منحنی های اشباع آنزیمی، در محدوده غلظتی mM ۰-۲ سوپسترا و در حضور چهار غلظت لیگاند پوترسین شامل ۴، ۶/۸ و ۱۰ mM رسم شده اند. نتایج نشان می دهند که فرم غیر هایپربولیک منحنی اشباع آنزیمی، در حضور غلظت های



نمودار ۵- منحنی اشباع آنزیمی در حضور سوبسترا و در غلظت ۴ mM لیگاند پوترسین



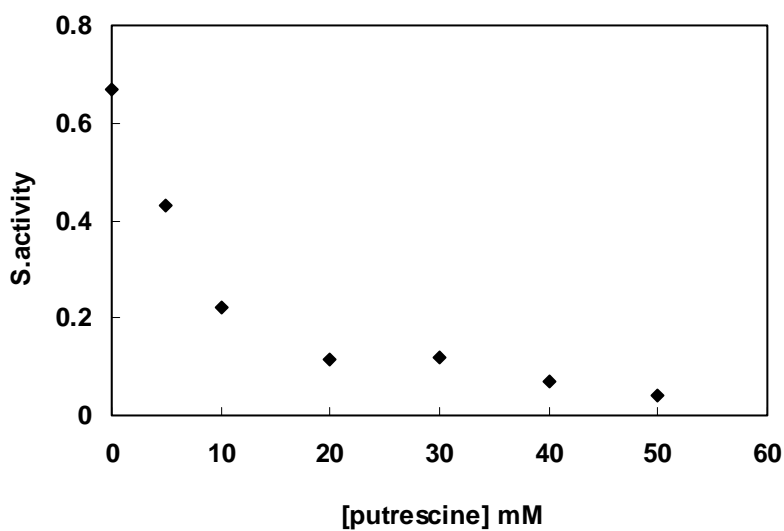
نمودار ۶- منحنی اشباع آنزیمی در حضور سوبسترا و در غلظت ۶/۸ mM لیگاند پوترسین



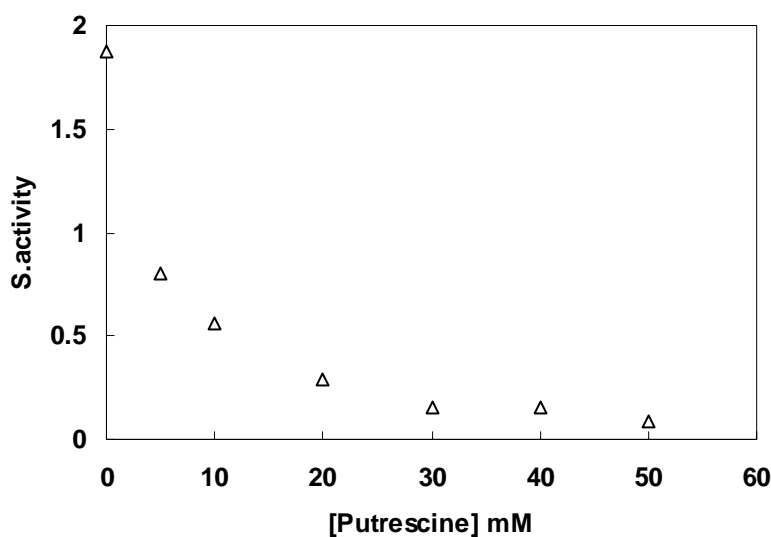
نمودار ۷- منحنی اشباع آنزیمی در حضور سوبسترا و در غلظت ۱۰ mM لیگاند پوترسین

فعالیت آنزیم با افزایش غلظت پوترسین کاهش پیدا کرده تا جایی که در غلظت ۵۰ mM پوترسین فعالیت آنزیم در هر سه غلظت سوبسترا نزدیک به صفر می رسد (نمودار ۸، ۹ و ۱۰).

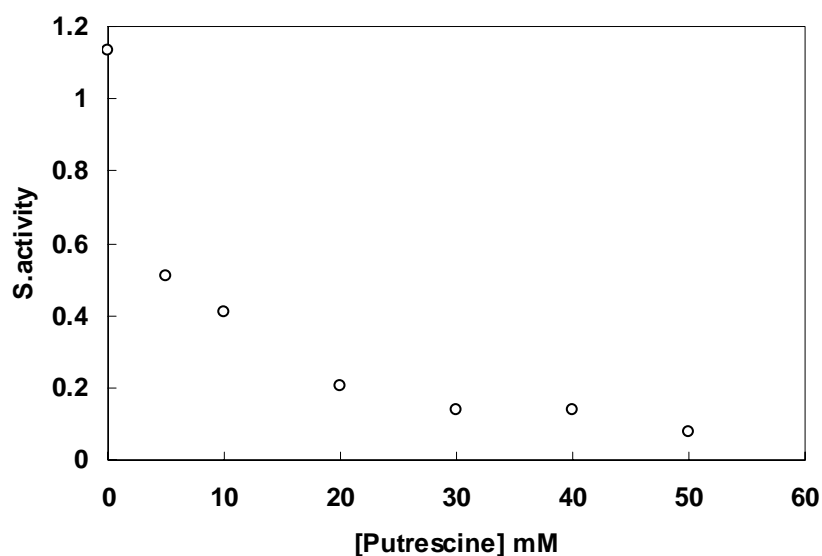
در ادامه مطالعات سینتیکی منحنی پوترسین در محدوده غلظتی ۰-۵۰ mM علیه فعالیت آنزیمی در سه غلظت ۰/۴، ۰/۸، و ۱/۲ mM از سوبسترا رسم شده است. منحنی ها نشان می دهند که در هر سه غلظت سوبسترا



نمودار ۸- منحنی غلظت های مختلف پوترسین در مقابل فعالیت ویژه آنزیم در غلظت ۱/۲ mM سوبسترا



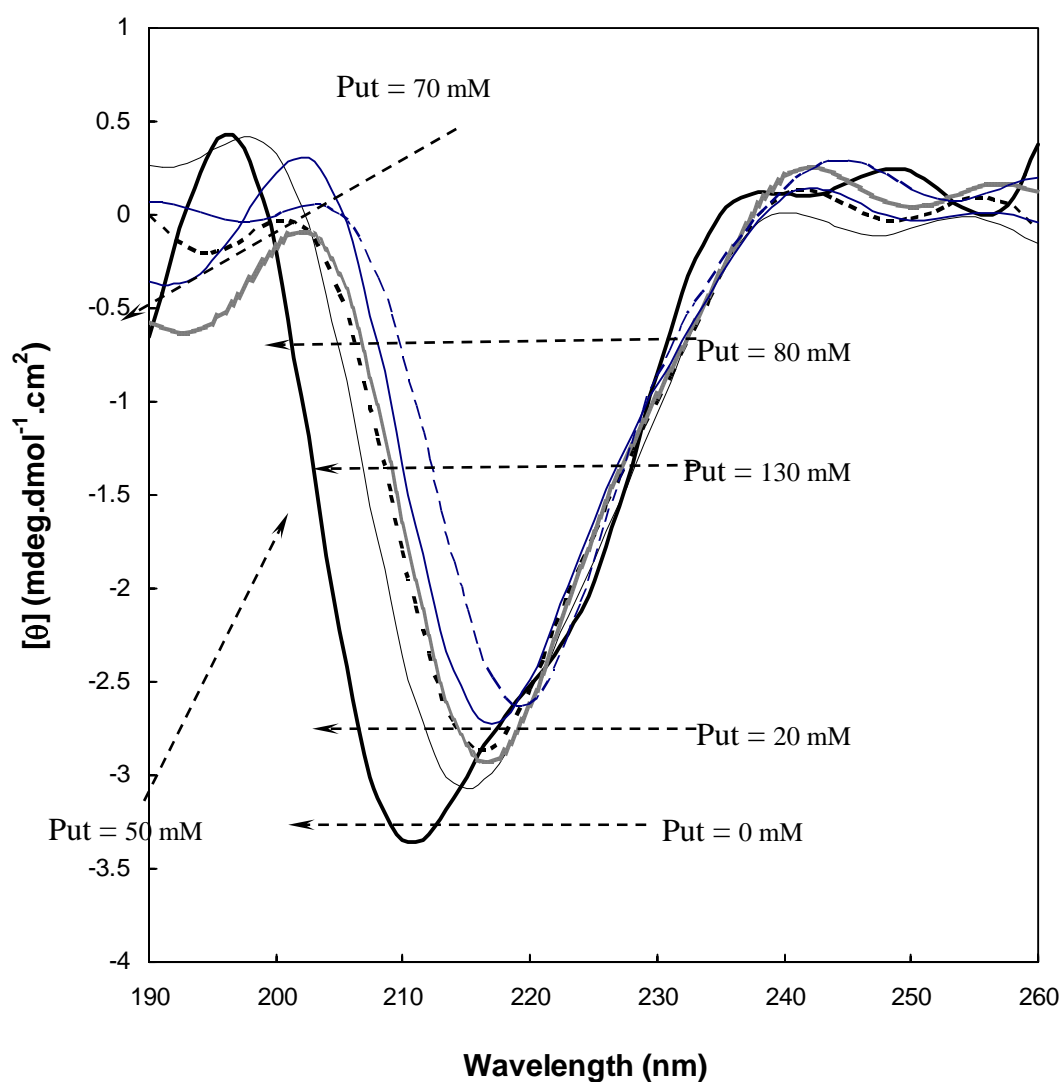
نمودار ۹- منحنی غلظت های مختلف پوترسین در مقابل فعالیت ویژه آنزیم در غلظت ۰/۸mM سوپسترا



نمودار ۱۰- منحنی غلظت های مختلف پوترسین در مقابل فعالیت ویژه آنزیم در غلظت ۰/۴ mM سوپسترا

است، نشان می دهد. در این شکل افزایش غلظت پوترسین تغییرات منظمی را در ساختار دوم آنزیم ایجاد می کند. در راستای افزایش غلظت پوترسین کاهش درصد β Parallel, β -Turn و α -Helix به همراه افزایش درصد Random coil و β Anti parallel مشاهده شده است. به این ترتیب می توان از پوترسین در غلظت های ذکر شده به عنوان عاملی در جهت به هم ریختگی ساختار دوم آنزیم ریبونوکلئاز A نام برد.

۴- مطالعه تغییرات ساختار دوم آنزیم ریبونوکلئاز A در حضور لیگاند پوترسین
به دنبال انجام مطالعات پیوندی بررسی تغییرات ساختار دوم آنزیم در غلظت های ۰، ۲۰، ۵۰، ۷۰، ۸۰ و ۱۳۰ mM لیگاند پوترسین با استفاده از روش دو رنگ نمایی دورانی (Circular Dichorism) و در ناحیه ۱۹۰-۲۴۰ nm انجام شد (نمودار ۱۱). مقایسه طیف ساختار دوم آنزیم طبیعی و آنزیمی که در حضور غلظت های مختلف پوترسین آنکوبه شده



نمودار ۱۱- بررسی تغییرات ساختار دوم آنزیم در حضور غلظت های ۰، ۲۰، ۵۰، ۷۰، ۸۰ و ۱۳۰ mM پوترسین با استفاده از

تکنیک دو رنگ نمایی دورانی (Circular Dichroism) در ناحیه ۱۹۰-۲۴۰ nm.

نتیجه گیری

هایی نزدیک به غلظت طبیعی اثر چندانی بر روی فعالیت آنزیم ریبونوکلئاز A ندارند، اما با افزایش غلظت تا ۵۰ mM (نمودار ۴) لیگاند پوترسین توانست فعالیت آنزیم ریبونوکلئاز A را کاهش دهد. به دنبال بررسی های بعدی مشخص شد که در سه غلظت انتخابی ۴، ۸/۶ و ۱۰ mM پوترسین، منحنی اشباع آنزیمی تغییرات محسوسی را نشان می دهد که ناشی از اثر پوترسین می باشد. بررسی ساختار دوم آنزیم ریبونوکلئاز A با

با توجه به بررسی های انجام شده می توان به این نتیجه رسید که وجود عوامل سرطان زا در محیط زیست و به دنبال آن بیماری سرطان نتایج گسترده ای را به دنبال دارد. همان طور که از نتایج این تحقیق پیداست افزایش غلظت ترکیبات آمین دار به ویژه پوترسین می تواند منجر به تغییرات عملکردی و ساختاری آنزیم ریبونوکلئاز A شود. همان طور که در نمودار ۳ نشان داده شده است ترکیبات آمین دار در غلظت

- ornithine decarboxylase overproducing mouse myeloma cells, *Exp. Cell. Res.* 1 (2002), 148-156.
9. M. Farriol, T. Segovia-Silvestre, J.M. Castellanos, Y. Venereo, X. Orta, Role of putrescine in cell proliferation in a colon carcinoma cell line, *Nutrition* 17 (2001), 934-938.
 10. T.R. Raines, Ribonuclease A, *Chem. Rev.* 98 (1998), 1045-1065.
 11. F.M. Richard, Bovine pancreatic ribonuclease, *Chem. Rev.* 99 (1971), 1145-1149.
 12. <http://www.pubmed.org>
 13. Gharanfoli, M., Moosavi-Movahedi, A.A., Safarian, S., Chamani, J., Saboury, A. A., **Calorimetric evidence for conformational transitions of RNase A in the presence of citidine 2', 3'-cyclic phosphate**, *Thermochemica Acta* 411, 2004, 37-42
 14. M.V. Neguse, M. Vilanova, C.M. Cuchillo, Bovine pancreatic ribonuclease A as a model of an enzyme with multiple substrate binding sites, *Biochem. Biophys. Acta* 1253 (1995), 16-24.
 15. H. Katoh, M. Yashinaga, T. Youagita, K.M. Ohgi, J. Irie Beirtma, D. Neirsma, Kinetic studies on turtle pancreatic ribonuclease: a comparative study of the base specificities of the B₂ and P₀ sites of bovine pancreatic ribonuclease A and turtle pancreatic ribonucleas, *Biochem. Biophys. Acta.* 873 (1986), 367-71.
 16. J.R. Li, G.F. Walz, A steady state kinetic study of the ribonuclease A catalyzed hydrolysis of uridine 2',3' cyclic 5'-diphosphate, *Arch. Biochem. Biophys* 161 (1974), 227-233.
 17. N. Imura, N. Irie, C. Ukita, Enzymatic depolymerization of polyadenylic acid
- استفاده از تکنیک دو رنگ نمایی دورانی نیز نشان می دهد که لیگاند پوترسین توانایی تغییر ساختار دوم آنزیم را داشته است. بدین ترتیب می توان گفت که یکی از نتایج بیماری سرطان تغییر ساختار و فعالیت آنزیم ریبونوکلئاز A می تواند باشد.
- منابع**
1. Environmental chemistry, Colin Baird, W.H. Freeman and Company, 1995.
 2. J. Janne, L. Alhonen, M. Pietila, T.A. Keinanen, Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004), 877-894.
 3. U. Bachrach, Y.C. Wang, A. Tabib, Polyamines: New cues in cellular signal transduction, *News Physiol. Sci.* 16 (2001), 106-109.
 4. H.M. Wallace, J. Duthie, D.M. Evans, S. Lamond, K.M. Nicoll, S.D. Heys, Alteration in polyamine catabolic enzymes in human breast cancer tissue, *Clinical Cancer Research* 6 (2000), 3657-3661.
 5. M.E. Tome, E.V. Gerner, Cellular eukaryotic initiation factor 5A content as a mediator of polyamine effects on growth and apoptosis, *Biological Signals* 6 (1997), 150-156.
 6. N.E. Davidson, H.A. Hahm, D.E. McCloskey, P.M. Woster, R.A. Casero Jr, Clinical aspects of cell death in breast cancer: the polyamine pathway as a new target for treatment, *Endocrine-Related Cancer* 6 (1999), 69-73.
 7. N.E. Ioannidis, L. Sfichi, K. Kotzabasis, Putrescine stimulates chemiosmotic ATP synthesis, *Biochim. Biophys. Acta.* 7 (2006), 821-8.
 8. O. Erez, D. Goldstaub, J. Friedman, C. Kahana, Putrescine activates oxidative stress dependent apoptotic death in

- acid residues, *The journal of biological chemistry* 21 (1974), 6762-6769.
19. S.B. Del cardayre, R.T. Raines, Structural determinants of enzymatic processivity, *Biochemistry* 33 (1994), 6031-6037.
18. C.C. Levy, P.A. Hieter, S.M. Legendre, Evidence for the direct binding of polyamines to a ribonuclease that hydrolyzes ribonucleic acid at uridylic by bovine pancreatic ribonuclease, *J. Biochem* 58 (1965), 264-272.