

PAWEŁ M. STRÓŻYCKI

*Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk
Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań*

FUNKCJE I EWOLUCJA HEMOGLOBIN. HEMOGLOBINY ROŚLINNE

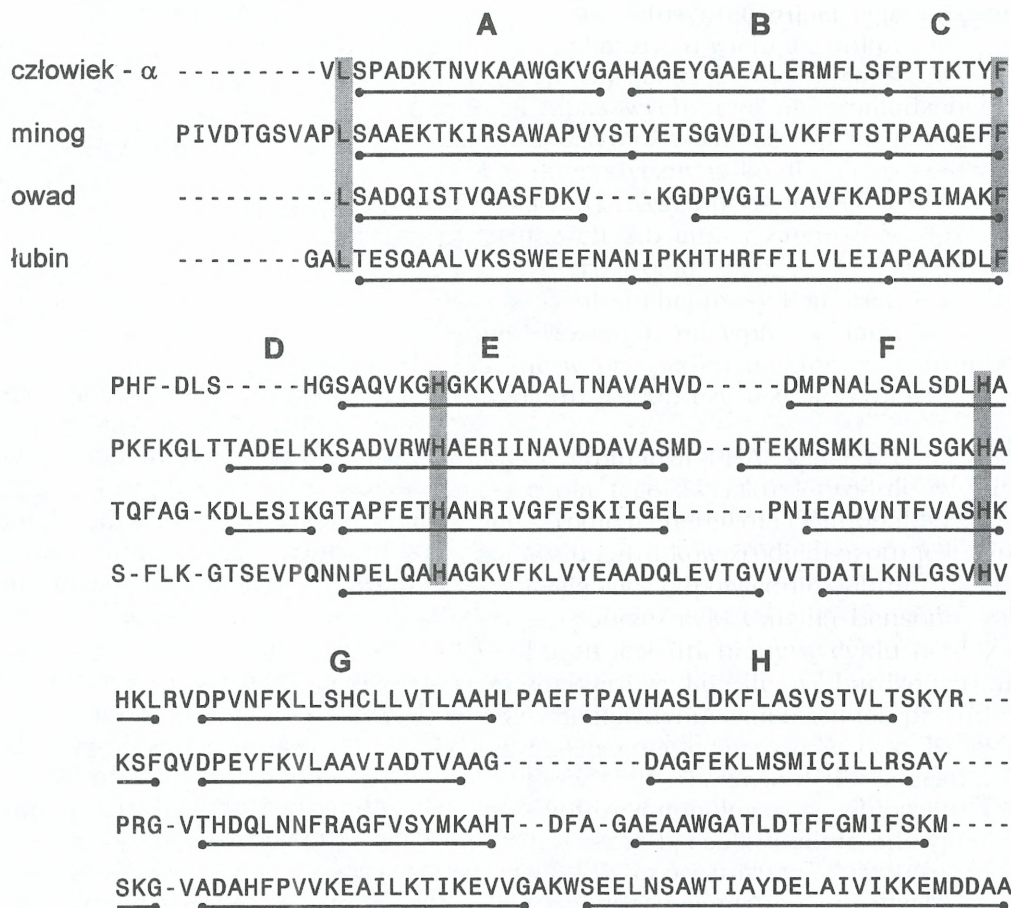
HEMOGLOBINY

Określenie modelu budowy hemoglobiny było możliwe dzięki badaniom porównawczym struktur różnych globin uzyskanych na podstawie analizy ich kryształów. Częsteczką polipeptydu globiny jest zbudowana z siedmiu odcinków spiralnych oznaczonych: A, B, C, E, F, G i H. Odcinki te, obecne w strukturach wszystkich znanych globin, są czasem uzupełnione o spiralny odcinek D, jak na przykład w przypadku łańcucha β hemoglobiny ludzkiej. Przestrzennie tworzą one rodzaj zagłębienia zawierającego grupę hemową (kompleks protoporfiryny IX związanej sześcioma wiązaniami koordynacyjnymi z jonem żelaza). Cztery miejsca koordynacyjne żelaza są obsadzone przez atomy azotu pierścienia pirolowego grupy protoporfiryny, piąte przez histydyne znajdującą się w spiralnym odcinku F białka, a szóste wiąże ligandy tlenowe. Na stopniu utlenienia (II) miejsce to ma zdolność odwracalnego wiązania tlenu (zasadnicza rola), dwutlenku węgla lub tlenku azotu. Na stopniu utlenienia (III) może ono wiązać cyjanki, azydki, tlenek azotu lub wodę. Dodatkowo żelazo na obu stopniach utlenienia może w niektórych przypadkach wiązać bardziej egzotyczne ligandy, jak na przykład kwas nikotynowy. Znajdująca się zazwyczaj blisko szóstego miejsca koordynacyjnego histydyna jest częścią spirali E. Prawdopodobnie odgrywa ona kluczową rolę w regulacji wiązania tlenu (OLSON i współaut. 1988).

Wiele globin funkcjonuje jako podjednostki większych kompleksów. I tak: α i β łańcuchy hemoglobiny ludzkiej są częścią tetrameru $\alpha_2\beta_2$; hemoglobina mięczaka jest homodimerem. Inne natomiast, jak hemoglobiny owadów, roślinne oraz minogów są monomerami.

Porównanie sekwencji aminokwasowych hemoglobiny z organizmów o różnym stopniu pokrewieństwa wykazało, że w przeciwieństwie do wysokiego podobieństwa struktur trzeciorzędowych, struktury pierwszorzędowe globin wykazują niską zachowawczość. Identyczne okazały się tylko te aminokwasy (i ich pozycje w łańcuchu polipeptydowym), które odgrywają kluczową rolę w strukturze cząsteczki hemoglobiny. Aminokwasy te są zaangażowane w „wyginanie” łańcucha peptydowego i tworzenie tak zwanej „kieszeni molekularnej”, w której jest transportowany tlen.

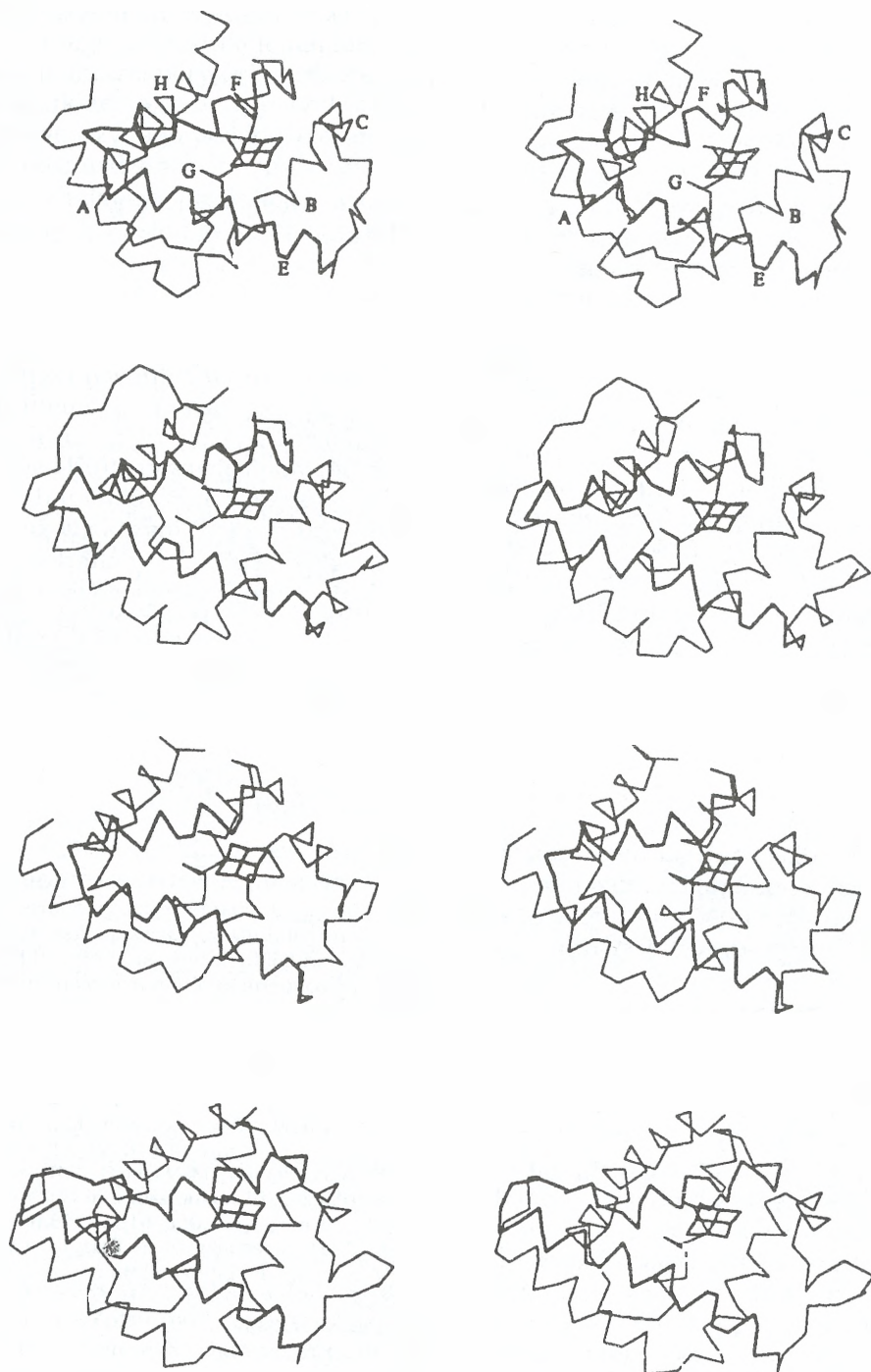
Rodzina białek globinowych była pierwszą, w której odkryto, iż struktura trzeciorzędowa, będąc wysoce konserwatywną, może być tworzona na bazie znacznie różniących się sekwencji aminokwasowych (struktur pierwszorzędowych) (rys. 1 i rys. 2). Ta zasada strukturalnej bezwładności w ewolucji molekularnej jest obecnie oczywista dla wielu innych rodzin białek.



Rys. 1. Porównanie sekwencji łańcuchów aminokwasowych globin wyizolowanych z różnych organizmów. Sekwencje zostały „nałożone” z uwzględnieniem informacji pochodzących z analizy struktur trójwymiarowych (analiza kryształów — „superpozycje”). Cztery niezmiennie reszty aminokwasowe zostały zacieniowane. Odcinki spiralne są podkreślone oraz oznaczone literami A-H (patrz tekst) (wg ARONSON i współaut. 1994).

HEMOGLOBINY ZWIERZĘCE

Większość organizmów zwierzęcych wykazuje tak wysokie zapotrzebowanie na tlen, że nie może być ono spełnione na drodze prostej dyfuzji tlenu ze środowiska do „oddychających” tkanek. W sensie ewolucyjnym zostały zmuszo-



Rys. 2. Modele stereoskopowe szkieletów węglowych (Ca) — czterech hemoglobinu (wg ARONSON i współaut. 1994). Kolejność i oznaczenia jak na rys. 1.

ne do rozwinięcia systemów transportu tlenu ze środowiska zewnętrznego do tkanek, gdzie jest wykorzystany jako końcowy akceptor w katabolizmie komórki. Systemy te są reprezentowane przez tak zwane białka oddechowe — hemoglobiny, erytrokruoriny (np. olbrzymie hemoglobiny bezkręgowców), hemocjaniny i hemerytryny — znacznie różniące się naturą grup prostetycznych, jak i częścią białkową (BRUNORI i współaut. 1980).

Najszerzej rozpowszechnionym wśród kręgowców białkiem stanowiącym chemiczną podstawę przenoszenia tlenu jest hemoglobina. Jest ona upakowana w wyspecjalizowanych komórkach (erytrocytach) wystarczająco elastycznych, aby wytrzymać tygodnie stresu mechanicznego podczas ich cyrkulacji w systemie krwionośnym organizmu. Poza podstawową funkcją, to jest przenoszeniem tlenu, hemoglobina spełnia w organizmach zwierzęcych szereg innych funkcji. Najszerzej opisane w literaturze dotyczą: funkcjonowania hemoglobiny jako przekaźnika ciepła (w cyklu utlenowania-odtlenowania) czy modulatora metabolizmu erytrocytów, udziału hemoglobiny w zapoczątkowywaniu starzenia się erytrocytów (poprzez utlenianie hemoglobiny), związku hemoglobiny z genetyczną opornością na malarię, enzymatycznych aktywności hemoglobiny, oddziaływań z szeregiem związków chemicznych (m.in. lekami), a także hemoglobiny jako źródła fizjologicznie aktywnych katabolitów (GIARDINA i współaut. 1995).

Problem hemoglobin i ich znaczenia dla funkcjonowania organizmów zwierzęcych został już szeroko opisany w literaturze. Prezentowane opracowanie ma na celu przedstawienie roli hemoglobin w świecie roślin, a także zaprezentowanie wiedzy dotyczącej ewolucji kodujących hemoglobiny genów.

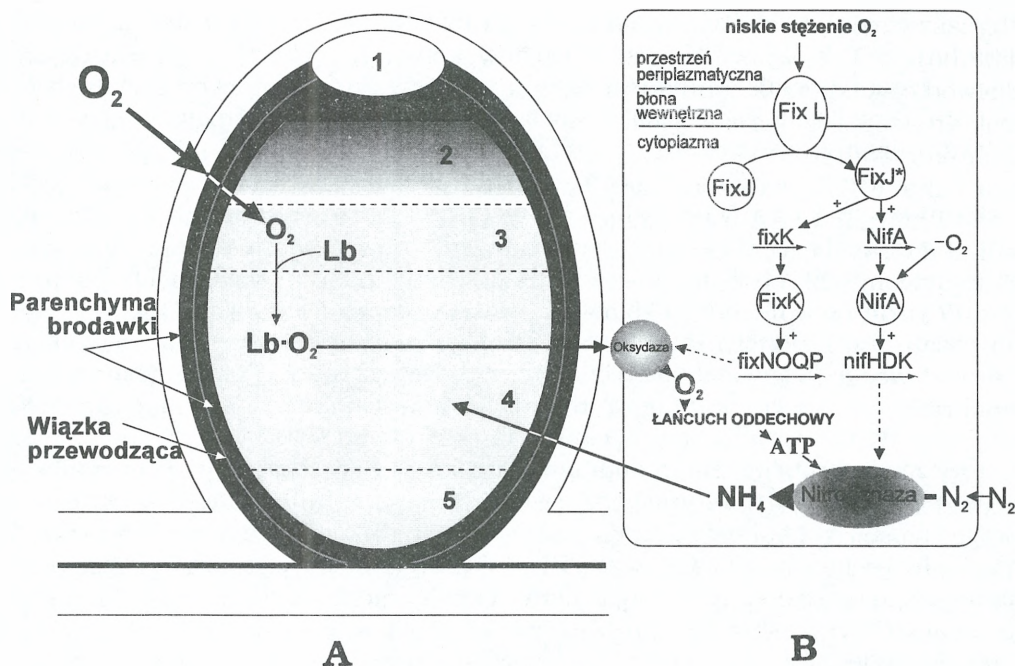
FUNKCJA HEMOGLOBIN ROŚLINNYCH

Przez dziesiątki lat uważano, iż występowanie hemoglobin w świecie roślinnym jest fenomenem związanym wyłącznie z procesem wiązania azotu atmosferycznego. Zdolność redukcji azotu atmosferycznego do form przyswajalnych — biologicznie czynnych (np. amoniak) posiadają tylko nieliczne organizmy prokariotyczne. Poprzez wytworzenie symbiotycznych oddziaływań z takimi bakteriami, jak *Rhizobium* czy *Frankia* niewielka liczba zróżnicowanych grup roślin nabyła zdolność wytwarzania własnego azotu (prace przeglądowe: HIRSCH 1992, ROLFE i GRESSHOFF 1988, GOLINOWSKI i ŁOTOCKA 1991). W systemach symbiotycznych (najefektywniejszych) część energii dla wiązania azotu, jak i zasadnicza ochrona wrażliwych na tlen elementów są zapewniane przez partnera roślinnego.

Najlepiej, jak dotąd, są poznane naturalne układy symbiotyczne roślin motylkowatych z bakteriami z rodziny *Rhizobium*. Kontakt między bakteriami a rośliną rozpoczyna się od wymiany sygnałów, która prowadzi do wzajemnego rozpoznania partnerów, a następnie zetknięcia się rizobiów z włosnikami korzeniowymi. Włosnik korzeniowy ulega deformacji, a bakterie (wewnątrz nowo uformowanej tzw. nici infekcyjnej) wnikają do niego. Nici infekcyjna (wraz z mnożącymi się wewnątrz niej bakteriami) „przerasta” włosnik korzeniowy i wnika do sąsiadujących z nimi tkanek. Jednocześnie mitotycznej aktywacji ulegają komórki kory pierwotnej korzenia, dając początek tak zwanemu primordium brodawki. Po „wrośnięciu” nici infekcyjnych do primordium, bakterie

otoczone błoną pochodzenia roślinnego są uwalniane do cytoplazmy komórek gospodarza. Tak zapoczątkowane podziały komórek roślinnych prowadzą do wykształcenia dojrzałej brodawki. Znajdujące się w cytoplazmie komórek roślinnych bakterie (bakteroidy) wraz z otaczającymi je błonami peribakteroidowymi są zwane symbiosomami. Na tym etapie bakterie syntetyzują nitrogenazę — enzym katalizujący redukcję azotu. Produkt wiązania azotu — amoniak jest następnie eksportowany do rośliny. Wszystkie etapy rozwoju brodawki są związane z ekspresją brodawkowo-specyficznych genów roślinnych, tak zwanych genów nodulinowych (van KAMMEN 1984). Geny nodulin wczesnych kodują produkty, których ekspresja zachodzi przed rozpoczęciem wiązania azotu i są zaangażowane w proces infekcji oraz rozwoju brodawki. Natomiast produkty genów nodulin późnych stanowią elementy szeregu oddziaływań gospodarza roślinnego z endosymbiontem, a także decydują o metabolicznej specjalizacji nowo powstałego organu, jakim jest brodawka korzeniowa.

Kluczowym elementem układu wiązania azotu jest bakteryjny enzym — nitrogenaza. Enzym ten funkcjonuje wewnątrz wyspecjalizowanej komórki bakteryjnej, jaką jest bakteroid i katalizuje reakcję redukcji azotu atmosferycznego (rys. 3). Nitrogenaza jest zbudowana z homodimerycznego białka żelazowego (Fe) kodowanego przez gen *nifH* oraz tetrameru białka molibdeno-żelazowego (MoFe) kodowanego przez geny *nifD* i *nifK*. Tetramer MoFe zawiera tak zwany kofaktor MoFe, który jest nieodwracalnie denaturowany przez tlen. Już niewielkie stężenia tlenu powodują całkowitą inaktywację nitrogenazy. Fakt tak wysokiej toksyczności tlenu dla funkcjonowania nitrogenazy stanowi pewnego rodzaju konflikt interesów, gdyż reakcja katalizowana przez ten enzym jest bardzo energochłonna, a konieczna energia musi pochodzić z procesów utleniania. Tak więc zachodzi jednocześnie konieczność ochrony nitrogenazy, jak i aktywnego dostarczenia tlenu dla procesów oddechowych rizobium. Podstawowym elementem umożliwiającym osiągnięcie niskiego stężenia tlenu w centralnej strefie brodawki jest bardzo wysoka aktywność oddechowa mikrosymbionta bakteryjnego, zużywającego dużą część dostępnego tlenu. W parenchymie brodawki ulegają także ekspresji geny, których produkty dzięki zmianie składu głównie ścian komórkowych biorą udział w tworzeniu fizycznej bariery dyfuzyjnej. Bariera ta powoduje obniżenie ilości tlenu docierającego do cytoplazmy komórek zawierających bakteroidy (przykładem takiego białka jest wczesna nodulina ENOD2 (van de WIEL i współaut. 1990)). Białkiem łączącym funkcję ochrony przed nadmiarem tlenu i nośnikiem tlenu jest hemoglobina — w przypadku brodawek roślin motylkowatych zwana leghemoglobiną. Jest ona najobficiej występującym w brodawce białkiem, może stanowić 15% do 25% wszystkich białek rozpuszczalnych. Dzięki swojemu bardzo wysokiemu powinowactwu do tlenu wiąże większą jego część, pozostającą w cytoplazmie komórki roślinnej, jeszcze bardziej obniżając ciśnienie parcjalne tlenu. Tworzy się w ten sposób rodzaj gradientu stężenia tlenu obniżającego się w kierunku bakteroidu. Wyższe powinowactwo do tlenu (niż leghemoglobina) tak zwanych terminalnych oksydaz bakteryjnych umożliwia im przejęcie, a następnie przeniesienie tlenu z leghemoglobiny na elementy łańcucha oddechowego.



Rys. 3. Udział leghemoglobiny w regulacji ekspresji genów bakteryjnych oraz funkcjonowania nitrogenazy.

(A) Schemat budowy brodawki korzeniowej (typu niezdeteminowanego) z wyróżnieniem powstających podczas rozwoju brodawki stref: 1 — merystem brodawki, 2 — strefa infekcji, 3 — strefa pośrednia, 4 — strefa wiązania azotu, 5 — strefa starzenia się. Fizyczna bariera ograniczająca dostęp tlenu do tkanek w centrum brodawki znajduje się w parenchymie brodawki otaczającej wiązkę przewodzącą (bariera ta jest przerwana tylko w rejonie merystemu brodawki). (B) Uproszczony model regulacji niektórych genów bakteryjnych w wyniku obniżenia stężenia tlenu w strefie infekcji. Niskie stężenie tlenu aktywuje bakteryjne białko „sensorowe” FixL, które fosforyluje, a przez to aktywuje aktywator transkrypcji FixJ. Aktywowane białko FixJ (FixJ*) indukuje transkrypcję *fixK* i *nifA*, produkty białkowe tych genów indukują następnie transkrypcję genów kodujących białka bezpośrednio zaangażowane w wiązanie azotu, to jest terminalnej oksydazy oraz nitrogenazy. Geny leghemoglobin ulegają ekspresji w strefach: infekcji, pośredniej i wiązania azotu. Leghemoglobina przenosi tlen na oksydazy bakteryjne, a te z kolei na łańcuch oddechowy umożliwiając produkcję ATP w warunkach niskiego stężenia tlenu. Duże ilości ATP są konieczne w procesie redukcji azotu atmosferycznego prowadzonym przez nitrogenazę. (wg MYŁONA i współaut. 1995, BECANA i SPRENT 1987, PREISIG i współaut. 1993).

EWOLUCJA HEMOGLOBIN — WSPÓLNY PRZODEK

Początkowo istniały dwie teorie tłumaczące pochodzenie hemoglobin roślinnych. Pierwsza z nich — „ewolucji równoległej” (zbieżnej) opisywała różnicowanie się hemoglobin zwierzęcych i roślinnych jako dwa niezależne procesy. Procesy te, choć mające różne początki, doprowadzić miały do powstania podobnego funkcjonalnie białka, umożliwiającego efektywne korzystanie z podstawowego

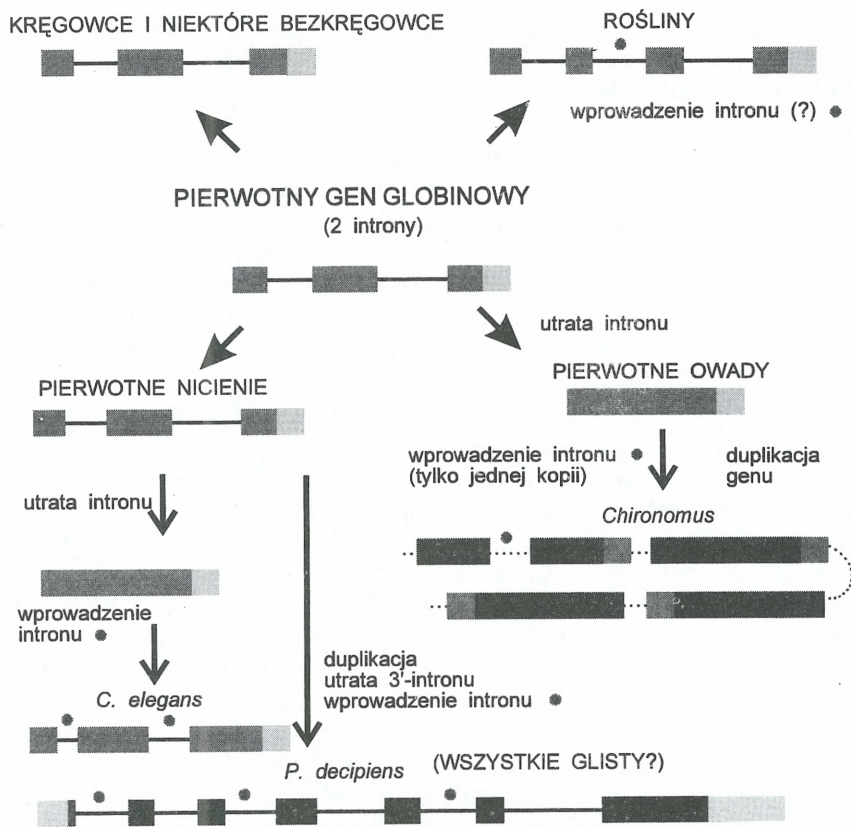
źródła energii — oddychania. Druga teoria — „poziomego przeniesienia genów” zakładała, że hemoglobiny zostały przeniesione do tkanek roślin motylkowatych dzięki ścisłym oddziaływaniom z bakteriami lub owadami. Geny te miały się przedostać do organizmu roślinnego w sposób przypadkowy i dzięki przewodze, jaką mu dawały, miały zostać utrwalone z pokolenia na pokolenie.

Roślinna hemoglobina została po raz pierwszy odkryta około 60 lat temu w brodawkach roślin motylkowatych, największej grupy roślin wiążących azot. Lata późniejsze przyniosły odkrycie hemoglobin także w brodawkach roślin niemotylkowatych, takich jak drzewiaste *Parasponia* (Nowa Gwinea, Indonezja) czy *Casuarina* (Australia). Informacje uzyskane dzięki analizie kryształów globin pochodzących z różnych organizmów, a głównie struktur kodujących je genów, doprowadziły do powstania trzeciej teorii — „pochodzenia liniowego” — pochodzenia genów globin w królestwach zwierząt i roślin od wspólnego przodka.

Dzięki poznaniu i analizie sekwencji genów szeregu globin można było stwierdzić, iż ich struktura wykazuje zadziwiającą zachowawczość. Jedynymi znanymi do 1981 roku genami kodującymi globiny były geny pochodzenia zwierzęcego. We wszystkich przypadkach trzy odcinki kodujące białko (eksony) są przedzielone dwiema sekwencjami interweniującymi (introny). Wielkości intronów różnią się w zależności od organizmu, ale pozycje w jakich dzielą sekwencję kodującą, są bardzo konserwatywne. Centralny ekson to odcinek genu kodujący część globiny wchodzącą w bezpośredni kontakt z grupą hemową (część ta jest nazywana domeną wiązania hemu lub kieszenią hemową). Badania struktur kryształów globin zwierzęcych i porównanie ich ze strukturą kodujących je genów pozwoliły przewidzieć możliwość wystąpienia dodatkowego intronu w genie hemoglobiny. Intron taki został odnaleziony w genie hemoglobiny roślinnej — leghemoglobiny soi. Ten dodatkowy intron dzieli odcinek kodujący domenę wiązania hemu na dwa mniejsze moduły. Okazuje się, że model taki obowiązuje w przypadku wszystkich poznanych dotąd genów globin roślinnych.

Początkowo szeroko był rozpowszechniony pogląd, że struktura genu hemoglobiny roślinnej odzwierciedla strukturę genu pierwotnej globiny, a gen wspólnego przodka wszystkich zwierząt utracił centralny intron krótko po ewolucyjnym rozdziale królestw zwierząt i roślin, około miliarda lat temu (LEWIN 1984). Obecne odkrycia centralnego intronu także w niektórych genach globin zwierzęcych mogą sugerować, iż model ten może być błędny. Prawdopodobna wydaje się hipoteza, iż przodek obecnych roślin uzyskał centralny intron w genie hemoglobiny już po rozdziale królestw roślin i zwierząt. Analiza sekwencji genów hemoglobin niektórych nicieni (*Caenorhabditis elegans*) wskazuje na możliwość najpierw utraty intronów, a następnie wprowadzenia nowych w inne pozycje. W innych przypadkach, poza utratą i uzyskaniem nowych intronów, nastąpiła prawdopodobnie swoista duplikacja sekwencji genów. Duplikacje te, na przykład w przypadku glisty *Pseudoterranova decipiens*, doprowadziły do powstania genu kodującego polipeptyd o podwójnej w stosunku do innych globin długości oraz dwóch „kieszeniach hemowych” (head-to-tail duplication). W przypadku owada *Chironomus thumini thumini* powstała rodzina genów zawierająca wielokrotną kopię genu hemoglobiny (rys. 4).

Należy także wspomnieć o nie omawianej powyżej grupie organizmów — bakteriach. Pierwszą poznaną hemoglobina bakteryjną była hemoglobina *Vitreo-*



Rys. 4. Model ewolucji genów globin zwierzęcych i roślinnych (wg DIXON i POHAJDAK 1992).

scilli (WAKABAYASHI i współaut. 1986). Funkcjonując w warunkach niedoboru tlenu spełnia inną niż u roślin rolę — zwiększa stężenie tlenu w okolicy oksydaz terminalnych. Odkrycie hemoglobiny bakteryjnych jest potwierdzeniem założenia, że podobieństwa I i III rzędowych struktur hemoglobiny pochodzących z różnych organizmów a także podobieństwa genów kodujących te białka wynikają ze wspólnego pochodzenia hemoglobiny roślinnych i zwierzęcych. Możliwe jest wtedy założenie, że hemoglobina była obecna w organizmach, które żyły około $1,3 \times 10^9$ – $1,5 \times 10^9$ lat temu i z których wywodzą się królestwa roślin i zwierząt. Obecność intronów w pierwotnym genie hemoglobiny — przodka roślin i zwierząt (jak na rys. 4) nie musi być w tym przypadku wynikiem „wprowadzenia” intronu; są znane przypadki występowania intronów w genach archebakterii (APPLEBY i współaut. 1990).

EWOLUCJA HEMOGLOBIN W ŚWIECIE ROŚLIN

Pogląd, iż występowanie hemoglobiny w świecie roślin jest ograniczone tylko do roślin motylkowatych czy układów symbiotycznych, został podważony dzięki odkryciu hemoglobiny u roślin niemotylkowatych, takich jak *Parasponia andre-*

sonii czy wręcz roślin nie wiążących azotu, jak *Trema tomentosa* czy jęczmień. Co więcej, sondy molekularne uzyskane na bazie sekwencji DNA hemoglobiny jęczmienia wykazują wysoką homologię do DNA genomów szeregu innych traw (TAYLOR i współaut. 1994). Badania lat ostatnich wykazują, że poza istnieniem hemoglobin związanych ze symbiotycznym wiązaniem azotu istnieje także klasa tak zwanych hemoglobin nie-symbiotycznych. Istnieją doniesienia o obecności hemoglobin nie-symbiotycznych także w tkankach roślin wiążących azot, takich jak *Casuarina* czy soja. Hemoglobiny te są wykrywane w tkankach poddanych stresowi tlenowemu lub w tkankach, w których niedobór tlenu występuje fizjologicznie, jak na przykład tkanki merystematyczne lub tkanka aleuronowa.

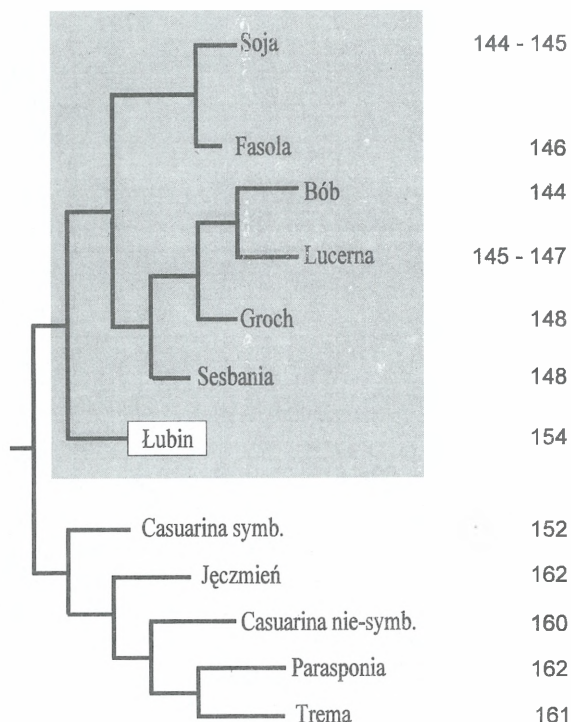
Do chwili obecnej poznano sekwencje aminokwasowe kilkudziesięciu hemoglobin roślinnych pochodzących zarówno z tkanek roślin motylkowatych, jak i niemotylkowatych. Porównawcza analiza komputerowa tych sekwencji pozwoliła na stworzenie drzewa filogenetycznego hemoglobin roślinnych (rys. 5) (STRÓŻYCKI i LEGOCKI 1995). Wyraźnie zaznacza się tutaj oddzielenie grupy roślin motylkowatych od reszty świata roślinnego. Potwierdzają się także sugestie dotyczące miejsca łubinów wśród roślin motylkowatych. Są one prawdopodobnie jednymi z najstarszych w tej grupie i mogą stanowić „ogniwo” pośrednie pomiędzy roślinami motylkowatymi i niemotylkowatymi. Do rozstrzygnięcia pozostaje wciąż kwestia funkcji klasy hemoglobin nie-symbiotycznych. Homologia ich sekwencji aminokwasowych sięgająca 70% niezależnie od organizmu, z którego pochodzą, wskazuje, iż kodujące je geny ewoluowały wolniej niż w przypadku hemoglobin symbiotycznych. Istnieje uzasadnione prawdopodobieństwo, że tak zwane hemoglobiny nie-symbiotyczne występują w tkankach wszystkich roślin niezależnie od tego, czy wchodzą one w oddziaływania symbiotyczne. Jedną z funkcji, jaką spełniają, może być podtrzymywanie podstawowych procesów oddechowych, koniecznych do przeżycia komórki (organizmu) podczas stresu tlenowego. Mogą one także stanowić element swoistego systemu reakcji na niedobór tlenu. Interesujący jest także fakt, iż ewolucja hemoglobin roślinnych jest powiązana prawdopodobnie ze skracaniem łańcucha polipeptydowego hemoglobiny. Jednakże, czy jest to wynik ewolucyjnego dążenia do zwiększania powinowactwa hemoglobin roślinnych do tlenu czy przystosowania do zmieniających się warunków środowiska, pozostaje jeszcze zagadką.

PODSUMOWANIE

Dane przedstawione w tym opracowaniu wydają się wskazywać, iż hemoglobina jest białkiem, które funkcjonuje we wszystkich organizmach żywych, spełniając różnorodne zadania związane z udziałem tlenu w procesach życiowych.

Ewolucja hemoglobin to jeden z przykładów udanej genetycznej i molekularnej strategii konserwacji systemu transportu tlenu w organizmach żywych. Geny kodujące to białko przetrwały miliardy lat i są odkrywane w najbardziej zróżnicowanych formach życia na ziemi.

Długość
w aminokwasach



Rys. 5. Proponowany schemat zależności filogenetycznych różnych gatunków roślin motylkowatych (na szarym polu) i niemotylkowatych, stworzony na podstawie komputerowej analizy sekwencji aminokwasowych znanych hemoglobiny roślinnych (wg STRÓŻYCKI i LEGOCKI 1995).

FUNCTIONS AND EVOLUTION OF HEMOGLOBINS.
PLANT HEMOGLOBINS

Summary

Hemoglobins have been found to occur in almost all animal systems and in some bacterial systems. Some data concerning plant hemoglobins are presented in this paper. Plant hemoglobin is associated with the nitrogen fixing system and is the key protein protecting nitrogenase from oxygen and, on the other hand, providing oxygen to the terminal oxidases.

It was the globin family for which it was first recognized that the tertiary structure could be highly conserved even when primary sequences diverged to an undetectably low level of similarity.

Data from the analysis of sequences and structures of different hemoglobin genes support the theory of "linear descent" regarding the evolution of the hemoglobin gene in the plant and animal kingdoms from a common ancestor.

LITERATURA

- APPLEBY C. A., DENNIS E. S., PEACOCK W. J., 1990. *A primaevial origin for plant and animal haemoglobins?* Aust. Syst. Bot. 3, 81-9.
- ARONSON H., -E. G., ROYER W. E., HENDRICKSON W. A., 1994. *Quantification of tertiary structural conservation despite primary sequence drift in the globin fold.* Protein Sci. 3, 1706-11.
- BECANA M., SPRENT J. I., 1987. *Nitrogen fixation and nitrate reduction in the root nodules of legumes.* Physiol. Plant. 70, 757-65.
- BRUNORI M., GIARDINA B., KUIPER H. A., 1980. *Oxygen transport proteins.* [W:] *Inorganic Biochemistry (Series) 3*, H. A. O. HILL (red.). Royal Society of Chemistry, Burlington House, London. 126-82.

- DIXON B., POHAJDAK B., 1992. *Did the Ancestral globin gene of plants and animals contain only 2 introns*. Trends Biochem. Sci. 17, 486-8.
- GIARDINA B., MESSANA I., SCATENA R., CASTAGNOLA M., 1995. *The multiple functions of hemoglobin*. Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol. 30(3), 165-96.
- GOLINOWSKI W., ŁOTOCKA B., 1991. *Charakterystyka układu symbiotycznego rośliny motylkowate-ryzobia*. Kosmos 40(4), 331-346.
- HIRSCH A. M., 1992. *Developmental biology of legume nodulation*. Tansley Review No. 40. New Phytol. 122, 211-37.
- LEWIN R., 1984. *Surprise finding with insect globin genes*. Science 226, 328.
- MYLONA P., PAWLOWSKI K., BISSELING T., 1995. *Symbiotic nitrogen fixation*. Plant Cell 7(7), 869-85.
- OLSON J. S., MATHEWS A. J., ROHLFS R. J., SPRINGER B. A., EGEGERG K. D., SLIGAR S. G., TAME J., RENAUD J. -P., NAGAI K., 1988. *The role of the distal histidine in myoglobin and hemoglobin*. Nature 336, 265-6.
- PREISIG O., ANTHAMATTEN D., HENNECKE H., 1993. *Genes for a microaerobically induced oxidase complex in Bradyrhizobium japonicum are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 3309-13.
- ROLFE B. G., GRESSHOFF P. M., 1988. *Genetic analysis of legume nodule initiation*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39, 297-319.
- STRÓŻYCKI P. M., LEGOCKI A. B., 1995. *Leghemoglobins from an evolutionarily old legume, Lupinus luteus*. Plant Sci. 110, 83-93.
- TAYLOR E. R., NIE X. Z., MACGREGOR A. W., HILL R. D., 1994. *A cereal haemoglobin gene is expressed in seed and root tissues under anaerobic conditions*. Plant Mol. Biol. 24, 853-62.
- van de WIEL C., SCHERES B., FRANSSSEN H., van LIEROP M. J., van LAMMEREN A., van KAMMEN A., BISSELING T., 1990. *The early nodulin transcript ENOD2 is located in the nodule parenchyma (inner cortex) of pea and soybean root nodules*. EMBO J. 9, 1-7.
- van KAMMEN A., 1984. *Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis*. Plant Molec. Biol. Reporter 2, 43-5.
- WAKABAYASHI H., MATSUBARA H., WEBSTER D. A., 1986. *Primary sequence of dimeric bacterial haemoglobin from Vitreoscilla*. Nature 322 (6078), 481-483.