

Zusammenfassung

Die NR ist das erste Enzym des Stickstoffmetabolismus der Pflanzen, Algen und Pilze. Sie katalysiert die Reduktion von Nitrat zu Nitrit unter Oxidation eines NAD(P)H Moleküls. Nitrit wird von der Nitritreduktase zu Ammonium reduziert, das in der Biosynthese von Aminosäuren, Nukleotiden und anderen Stickstoffmetaboliten Verwendung findet.

Die dimere NR ist modular aufgebaut. Den N-terminalen Teil bildet die Mo-Domäne, welche den Molybdän-Kofaktor (Moco) bindet. Verbunden durch den Linker1 folgt die Häm b₅ enthaltende Häm-Domäne. Diese wird über den Linker2 mit der FAD-Domäne, die die NAD(P)H-Bindestelle und den FAD-Kofaktor beinhaltet, verknüpft. Die Elektronenübertragung erfolgt von NAD(P)H über FAD zum Häm. Nach Übertragung auf den Moco findet die Reduktion des Nitrats zu Nitrit statt.

Aufgrund der Toxizität des Nitrits unterliegt die NR einer strengen Regulation:

Das Enzym wird durch Phosphorylierung in Linker1 markiert und durch die anschließende Bindung eines 14-3-3-Proteins inhibiert. Ein Beitrag zur Regulation durch den N-Terminus des Enzyms wird vermutet, jedoch ist der genaue Einfluss dieses Bereiches bisher nicht geklärt. Der genaue Mechanismus der Inhibition durch die Bindung eines 14-3-3-Proteins an die phosphorylierte NR ist bis heute nicht bekannt und bildet den Fokus der vorliegenden Arbeit.

Die NR, verschiedene Domänenfragmente und CDPK17 aus *Arabidopsis thaliana* wurden heterolog exprimiert und gereinigt. Des Weiteren erfolgte die Klonierung, heterologe Expression und Reinigung von acht der zwölf in *A. thaliana* exprimierten 14-3-3 Protein-Isoformen. Ein Phosphorylierungs- und Inhibitions-Assay wurden etabliert und so die Inhibitionseffizienzen der 14-3-3-Proteine ermittelt. Mithilfe verschiedener Aktivitäts-Assays konnten mittels *steady-state* und *pre-steady-state* die einzelnen Schritte des Elektronentransfers der inhibierten und nicht-inhibierten NR untersucht und so der betroffene Elektronentransfer-Schritt, der Häm-Moco-Übergang, identifiziert werden. Durch kinetische Studien in viskosem Milieu konnte eine intramolekulare Bewegung der Häm- relativ zur Mo-Domäne während des Elektronentransfers postuliert werden. Interaktionsanalysen mittels SPR zeigten eine Wechselwirkung der phosphorylierten N-Terminus- und Linker1-Fragmente mit 14-3-3-Proteinen und bestätigten so die Involvierung des N-Terminus in die Regulation der NR.

Aus den gewonnenen Ergebnissen konnte ein neues Model des NR Aufbaus, einschließlich einer zur Katalyse notwendigen intramolekularen Domänen-Bewegung entwickelt werden. Diese Bewegung bewirkt demnach eine Annäherung des Häm zum Moco und eine Veränderung des Reduktionspotenzials, in dessen Folge der Elektronentransfer vereinfacht wird. Durch Bindung der 14-3-3-Proteine an den phosphorylierten Linker1 und den N-Terminus wird diese intramolekulare Bewegung erschwert und so eine Inhibition vermittelt.