

## Abstract

Eukaryotic nitrate reductase (NR) is a homodimeric molybdo-heme-flavo protein, which catalyzes the first and rate-limiting step in the nitrogen assimilation of plants, algae and fungi. Nitrate reduction takes place at the N-terminal molybdenum cofactor-containing domain, for which the required electrons are derived from NADH and transferred via FAD and heme to the molybdenum cofactor. In plants, nitrate reduction is post-translationally regulated by phosphorylation of a highly conserved serine residue (Ser534 in *Arabidopsis* NR2) in hinge-1 and subsequent binding of a 14-3-3 protein. All plant NRs possess a long and non-conserved N-terminus (NT) sharing a highly acidic motif with yet unknown function. Early studies suggest a function of the NT in 14-3-3 mediated regulation of NR activity.

In the first part of this work, the molecular mechanism of 14-3-3-mediated inhibition of *Arabidopsis thaliana* NR2 was investigated by different *in vitro* steady-state kinetics analyses using phosphorylated recombinant NR or a NR fragment lacking the FAD domain (Mo-heme). Kinetic studies demonstrated that 14-3-3 $\omega$  inhibits the activity of NR by interfering with the electron transfer between the heme and the molybdenum cofactor.

In the second part of the work, the role of the NT in NR function and regulation was analyzed. N-terminal truncation variants showed that variants lacking up to 70 residues were as active as the wild-type Mo-heme, whereas residues 70-99 are essential for Mo-heme activity. It was further found that 14-3-3-mediated inhibition depends on the presence of the acidic motif (comprising residues 56-68 in AtNR2) and does not require N-terminal phosphorylation. Furthermore, replacement of two to five negatively charged residues from the acidic motif between positions 58 and 68 for alanines led to up to 50 % less inhibition by 14-3-3 $\omega$  compared to wild-type Mo-heme. Co-sedimentation, crosslinking and surface plasmon resonance studies using peptides of the NT and the phosphorylated hinge-1 confirmed that 14-3-3 $\omega$  recognizes two sites of NR with binding affinities of  $K_D = 1.5 \mu\text{M}$  for p-hinge-1 and  $K_D = 79 \mu\text{M}$  for the NT. Subsequently, analytic equilibrium size exclusion chromatography studies identified that two 14-3-3 dimers bind to one Mo-heme dimer yielding a binding stoichiometry of 2:1, which has not been reported so far for 14-3-3s in literature. These findings can be concluded that 14-3-3 inhibits nitrate reductase by inducing a conformational change that significantly increases the distance between the two redox-active sites via binding to the NT and p-hinge-1 of NR.

## Zusammenfassung

Eukaryotische Nitrat Reduktase (NR) ist ein homodimeres Molybdo-Häm-Flavoenzym, welches den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Stickstoffassimilation von Pflanzen, Algen und Pilzen katalysiert. Die Nitrat-Reduktion findet in der N-terminalen Molybdän-Kofaktor enthaltenden Domäne statt, wobei die benötigten Elektronen von NADH ausgehend über FAD und Häm zum Molybdän-Kofaktor geleitet werden. In Pflanzen wird die Reduktion des Nitrats post-translational über die Phosphorylierung eines hoch konservierten Serin Restes (Ser534 in *Arabidopsis* NR2) in der Hinge-1 Region und der folgenden Bindung eines 14-3-3 Proteins reguliert. Alle pflanzlichen NRs besitzen einen langen und nicht-konservierten N-Terminus (NT), der ein stark saures Motiv bisher unbekannter Funktion enthält. Frühere Studien suggerierten eine Funktion des NT in 14-3-3 vermittelter Regulation der NR Aktivität.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Mechanismus der 14-3-3 vermittelten Inhibition von *Arabidopsis thaliana* NR2 über verschiedene *in vitro* steady-state Kinetiken mit phosphorylierter rekombinanter NR bzw. eines NR Fragments ohne die FAD-Domäne (Mo-Häm) untersucht. Die kinetischen Studien demonstrierten, dass 14-3-3 $\omega$  den Elektronentransfer zwischen Häm und Molybdän-Kofaktor unterbindet und dadurch die Aktivität der NR inhibiert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Rolle des NT für die Funktion und Regulation der NR analysiert. N-terminal verkürzte Varianten, denen bis zu 70 Reste fehlten, waren genauso aktiv wie Wildtyp Mo-Häm, während die Reste 70-99 essentiell für die Mo-Häm Aktivität waren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die 14-3-3 vermittelte Inhibition von dem sauren Motiv (Reste 56-68 in AtNR2) abhängt aber keine N-terminale Phosphorylierung benötigt. Darüber hinaus führte der Austausch von zwei bis fünf negativ geladenen Resten zu Alanin zwischen den Resten 58-68 des sauren Motivs zu einer bis zu 50% verringerten Inhibition durch 14-3-3 $\omega$  verglichen zu Wildtyp Mo-Häm. Ko-Sedimentation, Quervernetzung und Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie mittels Peptiden des NT und der phosphorylierten Hinge-1 bestätigten, dass 14-3-3 $\omega$  zwei Stellen der NR mit Affinitäten von  $K_D = 1.5 \mu\text{M}$  für p-Hinge-1 and  $K_D = 79 \mu\text{M}$  für den NT bindet. Im Folgenden konnte über analytische Gleichgewichts-Größenausschlusschromatographie gezeigt werden, dass zwei 14-3-3 Dimere einen Mo-Häm Dimer mit einer Bindestöchiometrie von 2:1 binden, was in der Literatur bisher nicht für 14-3-3 Proteine beschrieben wurde. Diese Erkenntnisse lassen den Schluss zu, dass 14-3-3 die NR durch Induzierung einer Konformationsänderung inhibiert, welche die Distanz zwischen den redox-aktiven Zentren durch die Bindung an den NT und p-Hinge-1 der NR signifikant erhöht.