

DISS. ETH NO. 29034

**Elucidating the Mechanism of Cellular
Translation Shutdown by Coronaviruses**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

KATHARINA NOEL SCHUBERT

M.Sc., Biology ETH
ETH Zurich

born on 23.02.1993
citizen of Germany and USA

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Nenad Ban (doctoral thesis supervisor)
Prof. Dr. Martin Pilhofer (co-examiner)
Prof. Dr. Martin Jinek (co-examiner)

2023

Summary

The *Betacoronavirus* SARS-CoV-2 is the causative agent of COVID-19 and uses distinct strategies to hijack the protein synthesis machinery. Nonstructural protein (Nsp1) is the key protein that shuts down host translation and causes suppression of host innate immune functions in infected cells. In this thesis, by combining structural approaches and biochemistry, I present the mechanism of translation inhibition and reveal coronaviral features that are important to evade translation shutdown resulting in selective translation of viral RNAs. I address three main areas: (1) characterizing molecular interactions of SARS-CoV-2 Nsp1-bound translation complexes, (2) studying inhibition mechanism in MERS-CoV and Bat-Hp-CoV to observe conserved strategies among the three viruses, and (3) understanding the viral Nsp1-evasion mechanism through structure-guided mutagenesis.

First, I show that SARS-CoV-2 Nsp1, as well as Nsp1 from other related *Betacoronavirus* members, bind to the human 40S subunit in ribosomal complexes by solving the structures using cryo-electron microscopy. Nsp1 inserts its C-terminal domain into the mRNA entry channel and specifically interacts with conserved ribosomal proteins and RNA. Nsp1 binding interferes with mRNA accommodation inhibiting translation initiation. Second, despite the low sequence conservation between SARS-CoV-2, MERS-CoV and Bat-Hp-CoV Nsp1s, the binding mode and mechanism of host translation shutdown are conserved across the three viruses. In all three cases, Nsp1 forms an analogous network of molecular interactions within the mRNA entry

channel. In the case of Bat-Hp-CoV, I demonstrate for the first time that the N-terminal domain of Nsp1 binds to the decoding center of the 40S subunit. Third, the results described in this thesis provide a mechanistic framework to understand how these viruses might overcome translation inhibition to produce viral proteins. Structure-guided biochemical experiments identified residues in the Nsp1 N-terminal domain that are responsible for both, contributing to ribosome binding plus inhibiting translation and for the preferential translation of their respective viral RNAs.

In conclusion, the conserved Nsp1's function in translational control makes it an attractive target for therapeutic intervention, either by developing compounds that interfere with Nsp1 function or to guide development of attenuated virus strains that could be useful for vaccination.

Zusammenfassung

Das *Betacoronavirus* SARS-CoV-2 ist der Erreger der COVID-19 Krankheit und manipuliert die Proteinsynthesemaschinerie in infizierten Zellen. Dabei stellt das Nicht-Strukturprotein (Nsp1) ein Schlüsselprotein dar, welches die Translation in der Wirtszelle hemmt und die angeborenen Immunfunktionen unterdrückt. In dieser Dissertation habe ich den Mechanismus der Translationshemmung sowie die spezifischen Merkmale in coronaviralen RNAs untersucht, die notwendig sind, um die Translationshemmung zu umgehen. Dabei habe ich einen strukturbioologischen Ansatz mit biochemischen Experimenten kombiniert. In der Dissertation behandle ich drei zentrale Fragen: (1) Was sind die molekularen Wechselwirkungen innerhalb der SARS-CoV-2 Nsp1-gebundenen Translationskomplexe? (2) Besteht eine Konservierung des Nsp1 Hemmmechanismus zwischen den drei Viren SARS-CoV-2, MERS-CoV und Fledermaus-Hp-CoV? (3) Wie schafft es das Virus in Gegenwart des Nsp1 Proteins die eigenen viralen Proteine herzustellen?

Zunächst zeige ich, dass SARS-CoV-2 Nsp1, sowie Nsp1 von anderen verwandten Coronaviren, in menschlichen ribosomalen Komplexen an die 40S-Untereinheit bindet. Durch Kryo-Elektronenmikroskopie habe ich die 3D-Strukturen mehrerer ribosomaler Komplexe berechnet und interpretiert. Nsp1 bindet mit seiner C-terminalen Domäne in den mRNA-Eintrittskanal und interagiert spezifisch mit konservierten ribosomalen Proteinen und RNA. Die Nsp1-Bindung stört die zelluläre mRNA-Akkommodation und hemmt so die Initiation der Translation. Zweitens, zeige ich, dass der Bindungsmodus und der Mechanismus

der Translationsinhibition innerhalb der drei studierten Coronaviren konserviert ist, obwohl nur eine niedrige Sequenzkonservierung innerhalb des Nsp1 Proteins vorliegt. In allen drei Fällen bildet Nsp1 ein analoges Netzwerk molekularer Interaktionen innerhalb des mRNA-Eintrittskanals. Für das Fledermaus-Hp-CoV demonstriere ich zum ersten Mal, dass die N-terminale Domäne von Nsp1 an das Entschlüsselungszentrum der ribosomalen 40S-Untereinheit bindet. Drittens beschreibe ich einen mechanistischen Rahmen, der aufzeigt, wie Coronaviren die Translationshemmung überwinden können, um ihre eigenen viralen Proteine zu produzieren. Mithilfe von strukturbasierten biochemischen Experimenten konnte ich funktionale Aminosäurereste innerhalb der N-terminalen Domäne von Nsp1 identifizieren. Diese tragen sowohl zu der Ribosomenbindung als auch zur Translationshemmung bei und beeinflussen die bevorzugte Translation der viralen mRNAs.

Zusammenfassend stellt die konservierte Funktion des Nsp1 Proteins bei der Translationskontrolle ein attraktives Ziel für therapeutische Interventionen dar, welche sich in Form von Arzneimitteln oder der Entwicklung von Impfstoffen auszeichnen können.