

RESUMEN

Función de elementos de la región 3' no codificante del virus chikungunya sobre la replicación viral en células de mamífero y mosquito

El virus chikungunya (CHIKV) es un patógeno humano transmitido por mosquitos del género *Aedes*, que recientemente reemergió y se diseminó globalmente. Se propuso que la expansión global de CHIKV se asoció a cambios en distintas regiones del genoma viral. Precisamente, la región 3' no codificante (3'UTR) es la que más se ha modificado desde la reemergencia de CHIKV. El tamaño del 3'UTR es muy heterogéneo entre aislamientos virales porque contiene distinto número de copias de elementos de secuencia repetidos o *direct repeats* (DRs). Se propuso que las DRs cumplirían funciones diferenciales en los hospedadores naturales del virus, pero aún se desconoce la función del 3'UTR, así como sus requerimientos en secuencia y estructura para la replicación viral en células de mamífero y mosquito. Para investigarlo, usamos una combinación de análisis bioinformáticos, experimentos en cultivo celular usando virus recombinantes, e infecciones de mosquitos *Aedes*. Encontramos que las DRs cumplen funciones opuestas en los hospedadores del virus: son beneficiosas para la replicación viral en células de mosquito y prescindibles en células de mamífero. Además, identificamos una estructura de ARN estable y conservada con forma de Y (SLY) que se forma hacia el final del genoma viral. El análisis de estructura/función del SLY reveló que estimula la replicación viral en células de mosquito, de manera dependiente de la estructura y de los nucleótidos expuestos en el loop. Por otro lado, demostramos que el 3'UTR de CHIKV es propenso a perder copias de DR en cultivo celular, lo que ocurre con mayor frecuencia en células de mamífero que en células de mosquito. Demostramos que la recombinación de ARN por cambio de molde es el mecanismo molecular responsable de la emergencia de nuevas variantes virales de 3'UTR. El salto de la polimerasa entre moldes distintos de ARN ocurre durante la replicación viral tanto en células de mamífero como en células de mosquito, y genera ARN virales quiméricos. Luego, por estar sometido a presiones de selección opuestas, distintas variantes virales son seleccionadas positiva y negativamente en cada hospedador, determinando la composición del 3'UTR de las poblaciones virales. El efecto de las DRs y el comportamiento dinámico de la población viral se reproduce en mosquitos de laboratorio, donde observamos que virus conteniendo deleciones de las DRs en el 3'UTR retrasan la replicación de CHIKV y disminuyen su capacidad para diseminarse y ser transmitido. Al analizar la composición de la población viral, detectamos la emergencia de variantes virales con 3'UTR más largos que ganaron copias de DR, lo que incrementó el fitness del virus parental. Así, demostramos que la recombinación de ARN ocurre in vivo para duplicar copias de las DR en el 3'UTR viral. En conjunto, los hallazgos de esta tesis nos permitieron proponer un modelo en el que la recombinación de ARN junto con la selección natural facilitan la adaptación de CHIKV a su entorno, asegurando su transmisión durante el ciclo viral.

Palabras claves: virus chikungunya, alfavirus, ARN, replicación viral, región 3' no codificante, *direct repeats*, estructura secundaria de ARN, población viral, variantes virales

SUMMARY

Function of elements at the 3' untranslated region of chikungunya virus on viral replication in mammalian and mosquito cells

Chikungunya virus (CHIKV) is a human pathogen transmitted by *Aedes* mosquitoes, which has recently re-emerged and spread globally. It was proposed that the global expansion of CHIKV was associated with changes in different regions of the viral genome. Precisely, the 3' untranslated region (3'UTR) is the one that has changed the most since the re-emergence of CHIKV. The size of the 3'UTR is very heterogeneous among viral isolates because it contains different numbers of copies of repeated sequence elements or direct repeats (DRs). It was proposed that the DRs play differential functions in the natural hosts of the virus, but the function of the 3'UTR is still unknown, as well as its sequence and structural requirements for viral replication in mammalian and mosquito cells. To investigate this, we used a combination of bioinformatics analysis, cell culture experiments using recombinant viruses, and *Aedes* mosquitoes infections. We found that DRs play opposite functions in the viral hosts: they are beneficial for viral replication in mosquito cells and dispensable in mammalian cells. In addition, we identified a stable and conserved Y-shaped RNA structure (SLY) that folds at the end of the viral genome. Structure/function analysis of SLY revealed that it stimulates viral replication in mosquito cells. SLY function is dependent on its structure and the nucleotides exposed at the loop. On the other hand, we showed that the CHIKV 3'UTR is prone to losing DR copies in cell culture, which occurs more frequently in mammalian cells than in mosquito cells. We showed that RNA recombination by template switching is the molecular mechanism responsible for the emergence of new viral 3'UTR variants. Polymerase jumping between different RNA templates occurs during viral replication in both mammalian and mosquito cells, generating chimeric viral RNAs. Then, being subjected to opposite selection pressures, different viral variants are positively and negatively selected in each host, determining the composition of the 3'UTR of viral populations. The effect of DRs and the dynamic behavior of the viral population is reproduced in laboratory mosquitoes, where we observed that viruses containing DRs deletions in the 3'UTR delay CHIKV replication and decrease its ability to spread and be transmitted. By analyzing the composition of the viral population, we detected the emergence of viral variants with longer 3'UTRs that gained DR copies, which increased the fitness of the parental virus. Thus, we showed that RNA recombination occurs *in vivo* to duplicate copies of DRs in the viral 3'UTR. Taken together, the findings of this thesis allowed us to propose a model in which RNA recombination acts together with natural selection to facilitate CHIKV adaptation to the environment, ensuring its transmission during the viral cycle.

Keywords: chikungunya virus, alphavirus, RNA, viral replication, 3' untranslated region, direct repeats, RNA secondary structure, viral population, viral variant