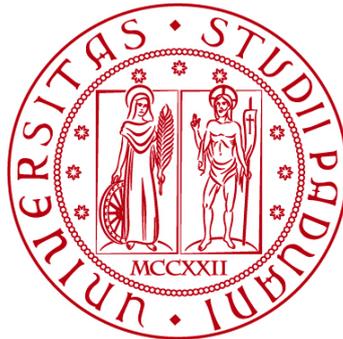


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**L'INFEZIONE DI MONKEYPOX VIRUS DEGLI ASTROCITI UMANI
CAUSA IL TAGLIO PROTEOLITICO DI GASDERMIN B E PIROPTOSI**

Tutor: Prof.ssa Ilaria Frasson
Dipartimento di Medicina Molecolare

Laureanda: Noemi Risoli

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

1. ABSTRACT	5
2. INTRODUZIONE	7
2.1 Monkeypox virus: scoperta, virologia, e sintomi	7
2.1.1 Virologia.....	7
2.1.2 Trasmissione.....	7
2.1.3 Sintomi.....	8
2.2 Strategie di evasione dei <i>Poxvirus</i> dal sistema immunitario.....	8
2.3 La piroptosi e la famiglia genica di Gasdermin	9
2.3.1 La piroptosi.....	9
2.3.2 La famiglia genica di Gasdermin.....	9
3. MATERIALI E METODI.....	11
3.1 Linee cellulari, metodi di coltura e trasfezione cellulare	11
3.2 Infezione virale.....	11
3.3 Saggio delle placche.....	12
3.4 Saggio della lattato deidrogenasi (LDH).....	12
3.5 Saggio di proliferazione cellulare e citotossicità.....	12
3.6 Droplet Digital PCR (ddPCR).....	13
3.7 Real Time PCR.....	13
3.8 Immunofluorescenza	14
3.9 Inattivazione termica (HI).....	14
3.11 Knock-Down mediato da siRNA	15
3.12 Spettrometria di massa	15
4. APPROCCIO SPERIMENTALE E RISULTATI.....	16
4.1 Mpox e VACV replicano preferenzialmente in astrociti umani	16
4.2 L'infezione da Mpox induce la risposta immunitaria innata e la morte cellulare litica degli astrociti umani	17
4.3 L'infezione da Mpox attiva le caspasi 1 e 3 negli astrociti.....	18
4.4 L'infezione da Mpox induce il taglio proteolitico di GSDMB	19
4.5 Il dimetil fumarato (DMF) riduce il taglio proteolitico indotto da Mpox di GSDMB e la morte cellulare	22
5. DISCUSSIONE.....	24
6. BIBLIOGRAFIA.....	27

1. ABSTRACT

Il virus Monkeypox (Mpox), del genere *Orthopoxvirus*, è in grado di infettare cellule del cervello umane e animali provocando alcuni disordini neurologici. Qui, è stato studiato il tropismo di Mpox in cellule neuronali umane in comparazione con altri virus dello stesso genere, in questo caso quello vaccino (VACV), oltre a osservazioni sugli effetti sulla risposta immunologica e morte cellulare programmata legata all'infiammazione (piroptosi). È stato dimostrato, in base al saggio delle placche di infezione, che gli astrociti sono i più permissivi all'infezione seguiti in ordine da oligodendrociti, microglia e neuroni. Inoltre, è stato osservato un aumento della trascrizione dei geni coinvolti nell'immunità (IL12, IRF3, IL1b, TNF α , CASP1 e in particolare gasdermin B). Particolare importanza viene assunta dal taglio proteolitico della proteina citotossica gasdermin B (GSDMB) direttamente legata al rilascio di lattato deidrogenasi e a un aumento dello staining degli acidi nucleici, indice di rottura della membrana plasmatica (PMR) provocata dalla piroptosi degli astrociti infettati da Mpox. Proprio tramite dei trattamenti con dimetil fumarato è stata dimostrata una riduzione del taglio proteolitico di GSDMB e, come conseguenza, anche un diminuzione di eventi di piroptosi. Queste scoperte hanno offerto delle potenziali opzioni terapeutiche grazie al chiarimento degli effetti neuropatogenici che tale virus può provocare.

2. INTRODUZIONE

2.1 Monkeypox virus: scoperta, virologia, e sintomi

Il *Monkeypox virus* (Mpox) è stato scoperto per la prima volta nel 1958 nelle scimmie presso il State Serum Institute di Copenaghen. Proprio dalla sua scoperta nei primati ne deriva il nome anche se, successivamente, si è scoperto che i principali serbatoi del virus sono animali selvatici quali ratti giganti e scoiattoli. Il primo caso di infezione da Mpox negli umani è stato riportato nel 1970 dove l'infezione aveva colpito un bambino di 9 anni proveniente dalla Repubblica Democratica del Congo. La prima diffusione del virus al di fuori dell'Africa è stata rilevata nel 2003 negli Stati Uniti d'America, più precisamente nel Midwest. L'incidenza delle infezioni da Mpox sono nettamente aumentate nel maggio del 2022 in tutto il mondo tanto che la World Health Organization (WHO) ha dichiarato l'emergenza globale sanitaria ^{1,2}. La stessa WHO ha anche modificato il nome del virus stesso da MPXV, come veniva nominato in passato, a Mpox.

2.1.1 Virologia

Il Mpox è un virus a DNA a doppio filamento, abbastanza grande (200-250 nm) e a forma ovoidale o "a forma di mattone" appartenente alla famiglia *Poxviridae* e al genere *Orthopoxvirus*. La famiglia cui appartiene è molto antica tanto che è stata ritrovata in insetti, rettili, uccelli e mammiferi. Il genoma del Mpox contiene tutte le informazioni per la sintesi delle proteine necessarie per la replicazione, trascrizione e assemblamento del virione stesso anche se necessita dei ribosomi dell'individuo che infetta per la traduzione dell'mRNA che produce. L'infezione dell'ospite si verifica a causa dell'interazione che avviene tra le proteine virali con i glicosamminoglicani dell'ospite dando di conseguenza inizio al processo di endocitosi cellulare e infine l'ingresso del virus stesso. Inoltre, solitamente nelle infezioni da Poxvirus si possono identificare due morfologie distinte del virione: virus maturo intracellulare e virus con envelope extracellulare. Oltre al *Monkeypox virus*, ci sono anche altri tre componenti del genere *Orthopoxvirus* che possono infettare anch'essi l'essere umano: *Variola virus* (virus del vaiolo), *Cowpox virus* e il *Vaccinia virus*. Per quanto riguarda il Mpox si possono distinguere due sottogruppi: quello dell'Africa dell'est e quello del Centro Africa, che risulta essere quello più infettivo ^{1,2}.

2.1.2 Trasmissione

Le vie di trasmissione identificate possono coinvolgere sia contatto tra animali infetti, sia tra animale infetto e l'uomo (trasmissione zoonotica) che tra uomo e uomo. Importante è la trasmissione zoonotica che può avvenire tramite contatto diretto con fluidi corporei, il morso, il graffio ma anche dal cibarsi con tali animali infetti. Tuttavia, la trasmissione per via aerea è stata dimostrata come la più frequente, dove il contatto con le goccioline respiratorie di un infetto con un

individuo non infetto ha portato alla diffusione di tale virus ^{1,2}. Grazie a degli studi condotti su animali è stato possibile identificare che il Mpox è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica (BBB, “*blood-brain barrier*”), penetrare di conseguenza nel tessuto cerebrale e mostrare quindi capacità neuroinvasiva, poiché le autopsie condotte su tessuti cerebrali di tali animali hanno evidenziato alti titoli di Mpox. Per quanto riguarda l’uomo attualmente non è ancora chiaro come avvenga la neuroinvasione e il neurotropismo di Mpox e le vie di trasmissione preferenziali identificate fino ad oggi sono: attraverso l’epitelio olfattivo oppure tramite monociti/macrofagi infetti ².

2.1.3 Sintomi

Tale virus ha un periodo di incubazione dai cinque giorni alle tre settimane e i sintomi possono anche durare dalle due alle cinque settimane. I sintomi più comuni delle infezioni da Mpox sono: febbre, linfonodi ingrossati, spossatezza, brividi, mal di schiena e rash cutaneo (di solito osservabile prevalentemente su viso, tronco e palmo di mani e piedi). Inoltre, è possibile osservare anche lo sviluppo di disordini neurologici quali mal di testa, malessere, mialgia, anoressia e alterazione della coscienza. Queste manifestazioni neuronali possono essere direttamente collegate al potenziale invasivo del virus stesso nei confronti dei tessuti che compongono il cervello ². Tra tutti questi sintomi una caratteristica fondamentale del Mpox è l’ingrossamento dei linfonodi, segno non comune nell’infezione da Variola (vaiolo) e quindi utilizzabile per la distinzione tra infezione da Mpox e Variola virus. Anche se i sintomi sono meno invasivi e rischiosi rispetto a quelli che caratterizzano la malattia del vaiolo da Variola virus, è comunque possibile considerare il Mpox un virus ad alta patogenicità (media di un 10% di morti causate da Mpox), soprattutto se colpisce individui immunodepressi ¹.

2.2 Strategie di evasione dei *Poxvirus* dal sistema immunitario

I virus in generale hanno spesso la capacità di inibire l’attivazione di pathway di morte cellulare utilizzati dalle cellule bersaglio dell’infezione per l’eliminazione del patogeno. In questo modo i virus possono favorire la loro replicazione virale all’interno dell’ospite grazie alla codifica di molte proteine in grado di evadere dalla risposta immunitaria e di interrompere i pathway apoptotici sia intrinseci che estrinseci. L’apoptosi, infatti, è una forma di morte cellulare programmata che può essere attivata sia da segnali extracellulari (estrinseca) che intracellulari (intrinseca). In particolare, l’apoptosi intrinseca è regolata da una famiglia genica denominata Bcl2, la quale è stata assimilata anche dai membri della famiglia virale *Poxviridae* (in particolare da quelli appartenenti alla sottofamiglia *chordopoxviridae* di cui fa parte anche il Mpox). Le proteine virali che sono codificate dai geni virali Bcl2 sono strutturalmente simili a livello tridimensionale alla loro controparte cellulare anche se a livello di sequenza hanno bassa identità; sono dei veri e propri fattori di virulenza che aiutano il virus stesso ad evadere dalle

difese immunitarie dell'ospite grazie all'inibizione della cascata delle caspasi e la disattivazione delle molecole recettore della morte. Esistono anche altre forme di inibizione apoptotica, come quella indiretta, la quale coinvolge l'utilizzo di un dsRNA e l'imitazione di una proteina anti-apoptotica del Golgi. Inoltre, esistono anche una serie di modulatori poxvirali che interferiscono con un altro sistema di difesa dell'ospite basato sugli interferoni IFN³.

Tutte queste caratteristiche hanno permesso di stabilire che i Poxvirus sono molto efficienti nel mirare l'apoptosi delle cellule che infettano anche se non è ancora ben chiaro come queste molecole si leghino alle proteine di segnalazione cruciali dell'ospite³.

2.3 La piroptosi e la famiglia genica di Gasdermin

Esistono almeno 12 tipologie di morte cellulare programmata di cui una in particolare è la piroptosi: morte cellulare programmata di tipo pro-infiammatorio. Un avvenimento importante di questo tipo di morte cellulare è il taglio proteolitico di gasdermin e nello specifico di gasdermin B, uno dei membri della famiglia genica direttamente responsabile della piroptosi.

2.3.1 La piroptosi

La piroptosi è un programma di morte cellulare regolato e legato all'infiammazione; avviene in seguito alla formazione di grandi complessi proteici citosolici denominati inflammasomi che fungono da piattaforme in grado di attivare le caspasi pro-infiammatorie che a loro volta sono in grado di attivare altri substrati proteici. Le proteine che vengono attivate dalle caspasi sono in particolare quelle codificate dalla famiglia genica gasdermin, di cui una componente importante è gasdermin D (GSDMD), la quale, una volta attivata, oligomerizza e genera dei pori nella membrana plasmatica portando alla sua stessa rottura (PMR). La rottura della membrana plasmatica è uno step importante della piroptosi poiché permette l'attivazione e il rilascio di citochine pro-infiammatorie e DAMPs (damage-associated molecular patterns). L'attivazione dell'inflammasoma e quindi della piroptosi sono innescate di solito da delle perturbazioni dell'omeostasi oppure da segnali di pericolo nell'ambiente quali ad esempio ATP extracellulare, aggregati proteici aberranti, dsDNA e molecole microbiche presenti nel sistema nervoso centrale di un organismo malato. La conseguenza ultima di questi avvenimenti è la neuroinfiammazione e la neurodegenerazione, sintomi caratteristici dell'infezione da Mpox⁴.

2.3.2 La famiglia genica di Gasdermin

Le proteine codificate dalla famiglia genica di gasdermin (GSDMs) sono proteine in grado di legare i lipidi, le quali si trovano all'interno del citoplasma delle cellule eucariotiche bloccate in una conformazione ripiegata con un'estremità C-terminale che autoinibisce l'estremità N-terminale in grado di legare i lipidi. Le diverse

isoforme di tali proteine sono coinvolte sia nel processo di morte cellulare programmata sia nella secrezione di IL1 β e IL18. Nell'uomo esistono 6 geni GSDM (GSDMA, GSDMB, GSDMC, GSDMD, GSDME/DFNA5 e PJVK/DFNB59) che codificano per proteine chiave nell'infiammazione tissutale e nella tumorigenesi. Al giorno d'oggi GSDMD è quella maggiormente caratterizzata tra tutte e quello che si conosce a proposito delle altre deriva direttamente da ciò che già si conosce della GSDMD. L'attivazione di queste proteine prevede il taglio proteolitico della sequenza di collegamento tra i domini C-terminali e quelli N-terminali che ne costituiva l'autoinibizione, l'oligomerizzazione della porzione N-terminale tagliata all'interno del doppio strato fosfolipidico della membrana che comporta la formazione dei pori con conseguente rottura della membrana stessa e piroptosi, oltre che al possibile rilascio non litico di allarmine e citochine. Per quanto riguarda la GSDMB attualmente è nota la sua unicità nei confronti della sua regolazione e delle sue funzioni cellulari dovute alla sua struttura e alle proprietà di legame con i lipidi: presenza di una struttura tronca delle α eliche del dominio C-terminale che porta a un indebolimento dell'autoinibizione. Tuttavia, la proteina GSDMB a lunghezza intera (FL) può legarsi ai fosfolipidi di membrana a prova del fatto che le interazioni del dominio N-terminale con quello C-terminale non inibiscono la capacità del primo di legare i lipidi. Le poche informazioni che si hanno su GSDMB sono a causa soprattutto alla mancanza di un corrispettivo murino di GSDMB che quindi ne riduce la possibilità di studio, tramite sperimentazioni meccanicistiche *in vivo*, delle sue funzioni come quella legata alla piroptosi. Infatti, nella piroptosi, è ormai chiaro il coinvolgimento della GSDMD, attivata in seguito al taglio proteolitico della sequenza linker da parte delle caspasi infiammatorie (1-4-5-11), ma è anche noto che il taglio della regione linker della GSDMB porta a piroptosi. Nello specifico però la GSDMB non presenta gli stessi siti di taglio nella sequenza linker riconosciuti dalle caspasi infiammatorie (ad eccezione alle caspasi 1 e 4) ma il taglio avviene grazie al coinvolgimento di granzimi A e cellule effettrici secondarie come Natural Killer e linfociti T citotossici, fonte principale di granzimi A e perforine che generano i pori nella membrana della cellula bersaglio importanti per permettere l'entrata dei GzmA. Perché possa avvenire la piroptosi quindi è chiaro che debba essere anche innescato un processo infiammatorio anche se è ancora sconosciuto se il ruolo della perforina dipenda esclusivamente dal taglio proteolitico di GSDMB da parte di GzmA. È stato poi scoperto che la parte N-terminale di GSDMB ha azione battericida nei confronti di batteri gram negativi poiché riesce a legarsi in modo specifico ai fosfolipidi di membrana senza però causare la lisi della cellula ospite⁵.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Linee cellulari, metodi di coltura e trasfezione cellulare

Per ottenere le cellule necessarie per svolgere i vari studi sono stati isolati tessuti di cervello fetale ottenuti da feti di gravidanze interrotte a 15/20 settimane (con consenso poiché lo studio è stato approvato dal comitato Etico per la Ricerca su Esseri Umani dell'Università di Alberta). Su questi cervelli fetali è stato fatto un lavoro di sezionamento e eliminazione delle meningi, seguito da digestione dei tessuti ottenuti con 0.25% di tripsina e 0.2 mg/mL di DNasi I (1 ora a 37 °C) che ha permesso di generare una sospensione cellulare contenente astrociti, microglia e neuroni. La soluzione è stata in seguito filtrata attraverso un setaccio per cellule da 70 micron per preparare una sospensione di cellule singole, che è stata poi lavata due volte con un terreno di coltura fresco e seminata in flaconi T-75 (con $6/8 \times 10^6$ cellule/flacone). Quindi, le colture sono state mantenute in un terreno minimo (*Minimum Essential Medium, MEM*) integrato con 10% di FBS (*Fetal Bovine Serum*), 2mM di L-glutamina, 1 mM di piruvato di sodio, 1X aminoacidi non essenziali per il MEM, 0.1% di destrosio, 100 U/mL di penicillina, 0.5 µg/mL di anfotericina B e 20 µg/mL di gentamicina. Poi, queste colture miste sono state mantenute per due settimane, durante le quali, i neuroni e gli astrociti hanno formato uno strato di cellule aderenti mentre le cellule della microglia hanno formato uno strato cellulare debolmente aderente insieme ad alcune di esse che si trovavano già direttamente galleggianti nel terreno. Proprio le cellule della microglia sono state recuperate grazie all'agitazione debole a cui sono state sottoposte per 20 minuti seguita poi da lavaggio e semina⁶. Per quanto riguarda invece i neuroni, questi sono stati seminati all'interno di contenitori di plastica rivestiti da Poly-L-ornitina (facilita l'adesione dei neuroni) e contenenti un terreno basale neurale con arabinoside di citosina 25.0 µM, per prevenire la crescita di astrociti, e B-27, per prevenire la crescita della glia. Infine, le colture di neuroni maturi sono state utilizzate entro due settimane dalla coltura iniziale. Le colture di astrociti puri, invece, sono state ottenute passando le colture di astrociti non puri una volta alla settimana per un periodo di 4-6 settimane. Dopodiché, le cellule ottenute sono state seminate in piastre a 6 pozzetti con 1×10^6 cellule/pozzetto allo scopo di eseguire una trasfezione. Questa è stata effettuata sia utilizzando un plasmide con la sequenza codificante per il granzima A umano (GZMA) sia un plasmide vuoto di controllo, il tutto in un reagente TurboFectin 8.0. Dopo 48 ore dalla trasfezione è stata eseguita la lisi delle cellule e l'analisi dell'espressione di GZMA mediante western blotting. Infine, riguardo le cellule umane MO3.13 (linea cellulare di oligodendrociti), sono state coltivate in un particolare terreno DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) ad alto contenuto di glucosio, integrato da FBS (10%) e penicillina (100 U/mL). Le cellule sono state quindi sottoposte a differenziazione per 5 giorni tramite DMEM integrato con phorbol 12-meristato (composto che induce specializzazione delle cellule).

3.2 Infezione virale

Secondo le linee guida dettate dal Comitato Istituzionale per la Biosicurezza, tutte le infezioni da Mpox sono state condotte in condizioni di biosicurezza di livello 3 presso l'Università di Alberta mentre quella da VACV sono state eseguite in condizioni di biosicurezza di livello 2. Nello specifico il Mpox utilizzato appartiene al Clade IIb, lineage B1.4 e è stato isolato da un paziente durante l'epidemia

scoppiata in Canada nel 2022. L'isolamento di questo virus è stato fatto tramite cellule BSC-40 e la sequenza virale ottenuta è stata poi depositata in GenBank. Per l'infezione, è stata utilizzata una molteplicità di infezione variabile da 0.01 a 10 (*MOI, multiplicity of infection*, rapporto tra particelle infettive e cellule infettate) a seconda dell'analisi effettuata. Sono stati utilizzati come virus Mpox o VACV e come terreno di coltura il DMEM senza FBS per un'ora a 37 °C. In seguito il terreno è stato cambiato e le cellule sono state incubate per la durata dell'esperimento. Questo porta alla generazione di monostrati di cellule infette che, per la realizzazione dei vari esperimenti, sono stati raschiati ai tempi indicati. Infine, le cellule così ottenute sono state sottoposte a 3 cicli di congelamento e scongelamento per il rilascio dei virus.

3.3 Saggio delle placche

Attraverso tale saggio è possibile identificare i titoli virali di una soluzione di cellule infettate da Mpox o VACV, a seconda dell'esperimento, come numero di unità formanti placca (*PFU, Plaque Forming Unit*) per mL di soluzione. Le cellule utilizzate per fare l'infezione, e di conseguenza tale saggio, sono le cellule BSC-40. Le BSC-40 sono state coltivate in terreno minimo essenziale completo integrato con antibiotici, L-glutammina, aminoacidi non essenziali, piruvato di sodio e 5% di FBS. Le cellule sono state poi seminate in piastre da 12 pozzetti un giorno prima dell'esecuzione della titolazione e sono state infettate con Mpox o VACV, diluito in modo seriale, in triplicato per un'ora in MEM senza siero a 37 °C in agitazione. Successivamente, l'inoculo virale è stato sostituito con MEM completo contenente 1% di carbossimetilcellulosa. Solamente due giorni dopo dall'infezione, le cellule sono state fissate e colorate con una soluzione contenente 0.13% (m/v) di violetto di cristallo, 11% (v/v) di formaldeide e 5% (v/v) di etanolo per visualizzare la formazione delle placche.

3.4 Saggio della lattato deidrogenasi (LDH)

Attraverso l'utilizzo del saggio della lattato deidrogenasi (LDH) è stato possibile verificare le condizioni di vitalità cellulare e quelle di morte cellulare. Per fare ciò è stato impiegato un kit specifico (LDH-Assay Kit) che ha permesso di dosare i livelli di LDH nel surnatante dopo la lisi cellulare al fine di determinarne la citotossicità. Il surnatante, infatti, è stato prelevato in seguito alla sua separazione dalle cellule presenti nella soluzione tramite centrifugazione (400g per 5 minuti) delle piastre a 96 pozzetti. I vari surnatanti prelevati dalle differenti condizioni sperimentali (mock, infezione di astrociti da Mpox, infezione di astrociti da VACV) sono stati poi analizzati a 24 hpi e le misurazioni dell'assorbanza sono state effettuate alla lunghezza d'onda di 450 nm e 650 nm su lettore di piastre Tecan.

3.5 Saggio di proliferazione cellulare e citotossicità

La citotossicità indotta negli astrociti dalle infezioni da Mpox e VACV è stata determinata anche tramite misurazione della fluorescenza emessa da un colorante rosso specifico per marcare gli acidi nucleici e impermeabile alle cellule, il SYNTAX™ della Thermo Fisher Scientific. In particolare, tale colorante è in grado di legare il gene *Guanine Nucleotide Binding Protein, Alpha Stimulating (GNAS)*. Gli astrociti sono stati seminati su piastre a 96 pozzetti neri con sfondo trasparente per poi essere trattati con Mpox o VACV a seconda dell'esperimento con un MOI di 10. Solamente a 24 hpi, è stato rimosso il mezzo contenuto nei pozzetti, le cellule

sono state fissate con la paraformaldeide al 4% e poi trattate con il colorante nucleare rosso impermeabile alle cellule in grado di legare GNAS per 10/15 minuti a 15/25 °C. Oltre a tale colorazione le cellule sono state sottoposte anche a colorazione con il DAPI, un colorante blu per evidenziare i nuclei cellulari, utilizzato come confronto. Quindi, la fluorescenza emessa da tali coloranti con cui sono state trattate le cellule sono state analizzate con un sistema di analisi MetaXpress XLS e le cellule mostranti fluorescenza rossa (marcatore per GNAS) sono state classificate come morte. Infine, è stato possibile tramite tale analisi calcolare l'efficienza di penetrazione del virus dividendo il numero di cellule che mostravano fluorescenza rossa (etichettatura di GNAS) per il numero di cellule totali presenti evidenziate dalla fluorescenza emessa dal DAPI.

3.6 Droplet Digital PCR (ddPCR)

Il Droplet Digital PCR è un sistema di PCR digitale che è stato utilizzato per la quantificazione virale unita all'analisi dei dati svolta con il software Quantasoft. Innanzitutto per fare tale misurazione è stato isolato del DNA utilizzando il PureLink™ viral RNA/DNA Mini Kit da 400 µL di medium composto da astrociti infettati con Mpox o VACV (MOI 10 e a 24 hpi) o astrociti non infettati (mock). Poi, una parte del DNA isolato è stato utilizzato per la ddPCR allo scopo di calcolare il numero di copie di genoma virale per µg di DNA. Tale tecnica prevede la generazione di gocce che possono contenere o meno il template target a seconda del caso. Una volta generate le gocce, si procede con la reazione di amplificazione allo scopo di amplificare la sequenza target che sarà, nel momento dell'analisi, identificata dall'emissione della fluorescenza ad alta intensità (goccia positiva)⁷. Tuttavia, nella ddPCR viene caricato un quantitativo molto piccolo di campione dalla soluzione di preparazione (es. vengono caricati solamente 5µL su 30 µL di preparato), di conseguenza, la fluorescenza rilevata fa riferimento solamente al quantitativo caricato che deve essere rapportato alla quantità di preparato per la ddPCR prodotto. Successivamente, per ottenere l'informazione di interesse è necessario rapportare il quantitativo di DNA virale presente nel preparato per ddPCR con i µL di medium originali (400 µL). In questo modo, il numero ottenuto è utilizzato per calcolare il numero di copie di genoma virale per µg di DNA e per arrivare alla concentrazione finale di copie di Mpox e VACV per mL di surnatante. In questo caso, in ogni reazione di ddPCR è stato utilizzato un quantitativo di 100 ng di DNA, due primer OPG071 (primer specifici per una regione genica codificante per la polimerasi del DNA E9 con sequenze 5' CTCTGCT CCATTTAGTACCGATTC 3' e 5' TACTCATACGCTTCGGCTAAGA 3') insieme a una sonda double-quenched acquistata da Integrated DNA Technologies (IDT).

3.7 Real Time PCR

L'espressione genica di determinati geni dell'ospite è stata misurata mediante l'impiego della *real time PCR* (*qPCR*, *quantitative PCR*) in tempo reale utilizzando per ogni gene una coppia di primer specifica. Innanzitutto, per fare tale analisi è stato isolato l'RNA totale dalle cellule seminate utilizzando il reagente TRIzol con il Kit di purificazione RNeasy. Solamente da 1 µg di RNA cellulare totale è stato sintetizzato il cDNA necessario per la reazione di qPCR successiva utilizzando primer oligonucleotidici casuali e la trascrittasi inversa Superscript III a 50 °C per 90 minuti. In seguito, tutti i campioni di cDNA sono stati diluiti 1:3 aggiungendo

100 μ L di acqua ultra pura a 50 μ L di cDNA e poi analizzati con il sistema CFX 96 in tempo reale. Per quanto riguarda i valori del ciclo soglia di ogni gene, questi sono stati normalizzati in relazione al valore soglia raggiunto dal gene codificante la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) per verificare l'assenza o presenza di variazioni nella quantità del materiale di partenza o differenze di efficienza della reazione. Infine, questi valori normalizzati sono stati rappresentati come variazione media relativa dell'espressione di ciascun gene rispetto ai controlli non infettati. Inoltre, 10 μ L dei prodotti di PCR del gene GSDMB (gasdermin B) relativi alle regioni dall'esone 4/5 all'esone 6/7 sono stati corsi su gel di agarosio al 1.5% trattato con etidio bromuro per circa un'ora a 100 V in TBE (*Tris-Borate-EDTA*) per poi essere visualizzati utilizzando un ImageQuant300 Gel Dock.

3.8 Immunofluorescenza

La tecnica di immunofluorescenza è stata utilizzata per la rilevazione di alcune proteine cellulari differenti a seconda dell'analisi. Per fare questo, le cellule sono state seminate su piastre a 8 pozzetti e successivamente fissate con paraformaldeide al 4% in PBS per 30 minuti. Poi, le cellule sono state rese permeabili utilizzando 0.2% X-100 in PBS per 10 minuti, bloccate con siero di capra al 10% in PBS per 2 ore e infine incubate con anticorpo primario durante la notte a 4 °C. Dopo l'incubazione durata tutta la notte, le cellule sono state lavate con PBS/0.1 Tween 20 e, solamente a questo punto, il legame dell'anticorpo primario è stato rilevato utilizzando anticorpi secondari specifici per specie. Attraverso queste analisi di immunofluorescenza è stato possibile anche visualizzare i nuclei cellulari tramite la colorazione con colorante blu *4,6-diamidino-2-fenildolo (DAPI)*, specifico per evidenziare i nuclei cellulari, per 15 minuti. Tutte le immagini sono state successivamente catturate utilizzando un microscopio confocale LSH700.

3.9 Inattivazione termica (HI)

Trattamento a cui sono state sottoposte alcune cellule allo scopo di provare che il taglio proteolitico di GSDMB viene inibito dal calore. I lisati virali sono stati aliquotati in tubi e incubati in termoblocco a 75 °C per 30 minuti in condizioni di biosicurezza di livello 3 per inattivarli. In seguito, le cellule seminate sono state in un primo momento trattate con i lisati virali inattivati dal calore per un'ora a 37 °C con MOI 10 e poi incubate nuovamente per 24 ore, solamente dopo aver cambiato il terreno di coltura. I monostrati di cellule trattate sono stati poi raschiati nel buffer RIPA per ricavare le proteine da sottoporre a immunoblotting. Per confermare l'inattivazione termica delle particelle utilizzate in tale tecnica è stato utilizzato il saggio di placca con cellule BSC-40.

3.10 Immunoblot

I campioni proteici estratti tramite l'uso del buffer RIPA sono stati quantificati utilizzando un kit DC per il dosaggio delle proteine seguito da un trattamento con buffer Laemmli e incubazione a 95 °C per 15 minuti. I campioni sono stati poi caricati in SDS-page al 4-20% e corsi per 75 minuti a 100/120 V. Dopo questa elettroforesi, i gel sono stati trasferiti su membrane di nitrocellulosa da 0.2 μ m con sistema di trasferimento wet per un'ora a 0.14 A. Trascorsa l'ora, le membrane sono state bloccate con albumina di siero bovino al 5% m/v per un'altra ora con successiva incubazione notturna a temperatura ambiente con anticorpo primario. Trascorsa la notte, le membrane sono state lavate 3 volte per 5 minuti ciascuna con

il TBS-T (1X TBS, *Tris-buffered saline*, – 0.05% Tween 20) e incubate con anticorpo secondario coniugato con HRP (*horseradish peroxidase*) per un'ora seguita da altri 3 lavaggi di 15 minuti. Infine, le membrane sono state sviluppate con il reagente ECL e visualizzate: l'intensità delle bande è stata poi quantificata utilizzando il software ImageJ e normalizzate secondo i valori della β -actina.

3.11 Knock-Down mediato da siRNA

Gli astrociti sono stati seminati in piastre a 6 pozzetti (1×10^6 cellule/pozzetto) per 24 ore prima della trasfezione con un cocktail di 3 siRNA pre-progettati mirati al trascritto di interesse (10.0 nM per ciascun siRNA) in combinazione con il reagente di trasfezione TranIT-X2. Successivamente le cellule, prima di proseguire con l'infezione con Mpox, sono state lasciate a riposare per 48 ore.

3.12 Spettrometria di massa

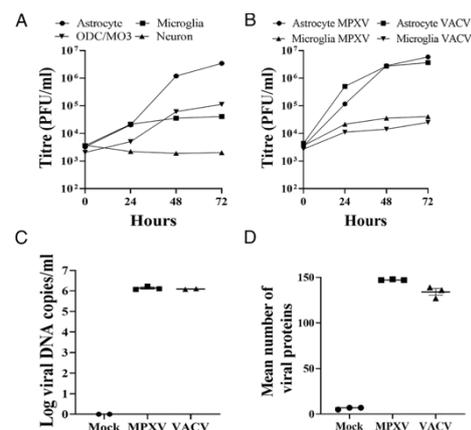
I campioni sono stati preparati seguendo degli step iniziando dalla rimozione dell'SDS (*sodio dodecil solfato*) e dalla digestione delle proteine con la tripsina. I lisati cellulari, provenienti dall'infezione con Mpox o VACV e quelli di controllo (mock), di circa 20 μ g per ciascuno, sono stati caricati su una cartuccia di filtrazione contenente 400 μ L di acetone, miscelati e incubati per 30 minuti in modo da permettere l'aggregazione delle proteine. Le colonne sono state centrifugate a 2500g per 2 minuti in modo da permettere la sedimentazione degli aggregati seguita da un'altra centrifugazione a 400g per 5 minuti per eliminare il surnatante. I pellet ottenuti sono stati lavati con 400 μ L di acetone e centrifugati nuovamente allo scopo di eliminare il solvente di lavaggio. Le proteine sono quindi state solubilizzate in urea 8 M, vortexate, sonicate e lasciate a temperatura ambiente per 30 minuti con aggiunta finale di 100 mM di Tris (pH = 8). La riduzione eseguita in seguito è stata condotta con 10 mM di DTT (*dithiothreitol*) a 37 °C per 30 minuti con successiva alchilazione con 20 mM di iodio acetamide per un'ora e mezza al buio. Successivamente, è stata aggiunta la tripsina in rapporto 50:1 e incubata per tutta la notte seguita dal recupero dei peptidi il giorno successivo mediante centrifugazione (2500g per 5 minuti), interruzione della reazione stessa con acido trifluoroacetico (TFA) a una concentrazione finale dell'1 % e incubazione per 10 minuti. La miscela di peptidi è stata centrifugata a 13000g per 10 minuti, il surnatante contenente le proteine raccolto, pulito, desalato e liofilizzato overnight. Il giorno seguente, i campioni sono stati poi risospesi in acido formico allo 0.1% per l'analisi spettrometrica (LC-MS/MS, *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*). I peptidi sono stati separati su colonna analitica reverse-phase, eluiti in gradiente lineare di acetonitrile per 120 minuti da 0% a 36.8% in acido formico allo 0.1%.

4. APPROCCIO SPERIMENTALE E RISULTATI

4.1 Mpxv e VACV replicano preferenzialmente in astrociti umani

In questo studio sono state infettate con Mpxv diverse tipologie di cellule che fanno parte del sistema nervoso umano: astrociti, microglia, oligodendrociti (più nello specifico una linea cellulare immortalizzata di ODC, MO3.13) e neuroni, ad una molteplicità di infezione (*multiplicity of infection (MOI)* pari a 0.01). L'analisi è stata fatta a diversi tempi, quali 0 *hour post infection (hpi)*, 24 hpi, 48 hpi e 72 hpi e quello che ne è risultato è un aumento maggiore del titolo virale (in termini di *unità formanti placca per mL, PFU/mL*, delle varie colture cellulari infettate) a 24 hpi e a 48 hpi negli astrociti rispetto a ODC MO3.13 e microglia, aumento invece assente nei neuroni infettati (Fig. 1A). Oltre all'infezione con Mpxv, è stata realizzata anche un'infezione con un altro virus, appartenente anch'esso al genere *Orthopoxvirus* chiamato *Vaccinia virus (VACV)*, nello specifico in astrociti e microglia. Dalla comparazione tra astrociti e microglia infettati con Mpxv e astrociti e microglia infettati con VACV si evince che i due virus replicano a titoli simili sia a 24 hpi sia a 48 hpi che a 72 hpi e mostrano ancora una volta un aumento maggiore del titolo virale negli astrociti rispetto alle cellule della microglia (Fig. 1B). Da questo appare quindi evidente una preferenzialità di infezione da parte di entrambi i virus per gli astrociti umani. Successivamente è stata eseguita la quantificazione con ddPCR del DNA presente nel surnatante proveniente da colture di astrociti infettati da Mpxv e VACV e da questa è stata rilevata la presenza di DNA codificato da entrambi i virus dopo le 24 hpi; nello specifico, sono stati rilevati oltre le 10^6 copie di genoma/mL (Fig. 1C). Poi, è stato prelevato del lisato cellulare proveniente da astrociti infettati a 6 hpi e processato per la spettrometria di massa (LC-MS/MS, *Liquid Chromatography – mass spectrometry*); da questo è stato possibile rilevare che oltre 125 proteine virali codificate sia da Mpxv che da VACV erano espresse nelle cellule infettate ma assenti nel mock (fig. 1D) con, in aggiunta, anche la rilevazione della presenza di molte proteine codificate in comune da tutti i Poxvirus.

Fig. 1. Analisi che mostrano la preferenzialità di Mpxv e VACV di infettare gli astrociti. A) determinazione tramite saggio di placca in BSC-40 cells dei titoli virali a 0 hpi, 24 hpi, 48 hpi e 72 hpi in diverse cellule neurali. B) confronto dei titoli virali di Mpxv e VACV a 0 hpi, 24 hpi, 48 hpi e 72 hpi in astrociti e microglia. C) rilevazione con ddPCR della presenza di DNA codificato da Mpxv e VACV nel surnatante di colture cellulari di astrociti dopo 24 hpi (esperimento condotto in duplicato per il mock e triplicato per infezione da Mpxv e VACV). D) spettrometria di massa del lisato prelevato a 6 hpi proveniente da astrociti infettati da Mpxv e VACV e dal mock; nel lisato sono state rilevate 143 su 174 potenziali proteine codificate da Mpxv e 121 su 199 potenziali proteine codificate da VACV.



Tramite un'analisi di immunofluorescenza è stato possibile comparare astrociti non infettati (mock) e astrociti infettati da Mpxv (Fig. 2Evi) o VACV (Fig. 2Ex); quello che ne è risultato è stata l'identificazione di una distorsione di una particolare proteina fibrillare acida della glia, marker per gli astrociti, denominata *Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)* insieme anche all'immunoreattività associata all'OPG079 (I3) codificato dai Poxvirus, non presente nel mock (Fig. 2Eiii).

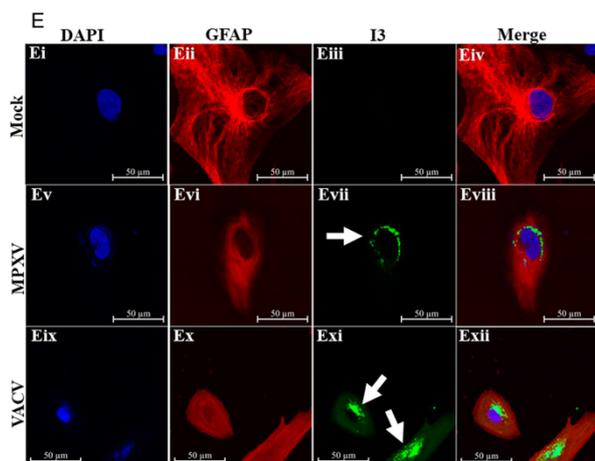


Fig. 2. Astroцити fissati a 48 hpi e immunocolorate con I3 (Mpoх/VACV single-strand DNA binding protein) di colore verde, poi con un marker per astroцити (GFAP) in rosso e infine con un marker nucleare (DAPI) di colore blu.

4.2 L'infezione da Mpoх induce la risposta immunitaria innata e la morte cellulare litica degli astroцити umani

Avendo quindi stabilito che sia Mpoх che VACV infettano preferenzialmente gli astroцити, sono stati analizzati nel dettaglio i profili immunitari innati dell'ospite tramite lo studio degli astroцити infettati. Per fare queste analisi sono stati utilizzati astroцити infettati con Mpoх, astroцити infettati con VACV e astroцити non infettati (mock). Da questo esperimento è stato rilevato che sia Mpoх che VACV sono in grado di indurre la trascrizione di geni pro-infiammatori come TNF α , IL12, IL8 e IL6 (Fig. 3A-D) ma anche geni antivirali associati all'interferone di tipo I come IRF3 e MX3 (Fig. 3E-F). Dal momento che l'attivazione di una risposta infiammatoria porta anche all'attivazione dell'inflammasoma, sono stati analizzati i livelli di trascritti negli astroцити di IL1 β , CASP1 e GSDMB, i quali sono risultati allo stesso modo in aumento in seguito all'infezione (Fig. 3G-I). Per quanto riguarda il campione mock, è stato possibile osservare il mantenimento in tali cellule di un basso livello di trascrizione di tutti i geni presi in considerazione, valore utilizzato anche come confronto con il quantitativo di trascritto rilevato negli astroцити infettati. Da questi valori ottenuti è stato quindi possibile stabilire che l'infezione di entrambi i virus ha come conseguenza l'attivazione della via infiammatoria e della via antivirale.

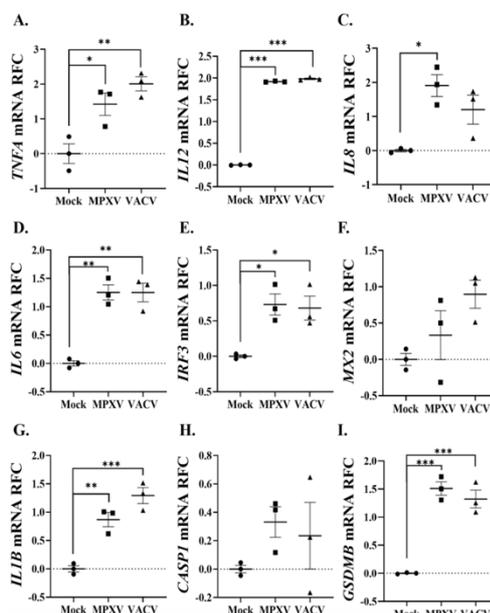


Fig. 3. Rappresentazione grafica dei valori relativi alla quantità di trascritto di vari geni legati alla risposta immunitaria innata degli astroцити dell'ospite infetto. Presenza dei valori relativi al mock, astroцити infettati da Mpoх e astroцити infettati da VACV. Il lisato cellulare dal quale è stato ricavato l'RNA per l'analisi è stato prelevato a 24 hpi. La quantità di trascritto relativo a TNFA (A), IL12 (B), IL8 (C), IL6 (D), IRF3 (E), MX2 (F), IL1B (G), CASP1 (H), GSDMB (I) è stata ottenuta tramite una qPCR; i valori sono stati quantificati in RFC (relative fold change) e analizzati statisticamente utilizzando il test one-way ANOVA (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Successivamente all'attivazione della risposta infiammatoria, è stata osservata anche morte cellulare sia nelle cellule con infezione da Mpx che in quelle con infezione da VACV. Sia gli astrociti non infettati, sia quelli infettati da Mpx che quelli infettati da VACV sono stati trattati con un colorante rosso specifico per marcare gli acidi nucleici (in questo caso lega GNAS, *Guanine Nucleotide Binding Protein, Alpha Stimulating*) e impermeabile alle cellule, e con il DAPI, un colorante blu per evidenziare i nuclei cellulari (Fig. 4A). Da questa colorazione è stato possibile osservare che gli astrociti infettati da Mpx rispetto a quelli infettati da VACV o quelli non infettati mostrano un aumento dell'intensità sia di GNAS che di DAPI portando quindi alla conclusione che Mpx è sicuramente più citotossico di VACV (Fig. 4B). L'aumento dell'espressione rilevata dei due marcatori è associato alla lisi cellulare. Tuttavia, per confermare che il motivo dell'aumento della colorazione GNAS/DAPI fosse questo, sono stati misurati i livelli di lattato deidrogenasi (LDH) nel surnatante di ogni condizione sperimentale: il livello di LDH è nettamente maggiore nel surnatante proveniente dalle cellule infettate da Mpx rispetto a quelle infettate da VACV (Fig. 4C).

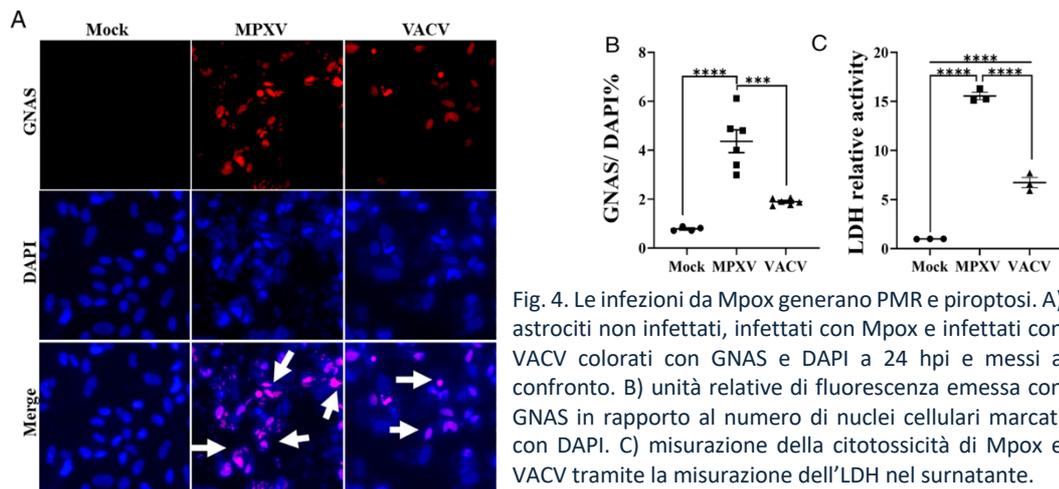


Fig. 4. Le infezioni da Mpx generano PMR e piroptosi. A) astrociti non infettati, infettati con Mpx e infettati con VACV colorati con GNAS e DAPI a 24 hpi e messi a confronto. B) unità relative di fluorescenza emessa con GNAS in rapporto al numero di nuclei cellulari marcati con DAPI. C) misurazione della citotossicità di Mpx e VACV tramite la misurazione dell'LDH nel surnatante.

4.3 L'infezione da Mpx attiva le caspasi 1 e 3 negli astrociti

L'attivazione del sistema immunitario innato porta all'attivazione, nello specifico, dell'inflammasoma. Questo aspetto è fondamentale perché ha permesso l'analisi dei livelli di espressione di specifiche proteine che sono direttamente coinvolte nell'attivazione dell'inflammasoma stesso. A questo proposito, sono stati analizzati i lisati cellulari provenienti da cellule non infettate, infettate con Mpx e con VACV tramite immunoblotting, più precisamente tramite Western Blotting (Fig. 5A). Le proteine analizzate e ricavate dal lisato sono: AIM2 (*Absent-in-melanoma-2*, 37 kDa), la pro-caspasi 1 (45 kDa), la pro-caspasi 3 (35 kDa) e GFAP (50 kDa). Tutti i valori ricavati sono stati normalizzati utilizzando come loading control la β -actina (42 kDa). Le bande immunoreattive di AIM2 sono risultate di un'intensità molto ridotta negli astrociti infettati con Mpx e VACV rispetto all'intensità osservabile delle bande di β -actina e rispetto all'intensità della stessa AIM2 nel mock. Ugualmente, anche le bande relative alla pro-caspasi 1 e alla pro-caspasi 3 mostrano un'intensità minore rispetto alla β -actina e al mock. Infine, è stato esaminato anche GFAP, un substrato conosciuto per la caspasi 3 e usato anche come marcatore per gli astrociti, il quale risulta anch'esso in quantità ridotte nei lisati cellulari delle cellule infettate sia da Mpx che da VACV (Fig. 5A). L'intensità delle bande è stata

poi quantificata e normalizzata utilizzando i valori della β -actina. I valori relativi e medi di ogni proteina sono stati quindi analizzati statisticamente e rappresentati graficamente (Fig. 5B, C, D, E). Concludendo, i dati suggeriscono che la caspasi 1 e 3 vanno incontro a taglio proteolitico all'interno degli astrociti infettati da Mpx, taglio che ne permette la loro stessa attivazione; una volta attivate sono in grado di degradare GSDMB e GFAP, la proteina strutturale essenziale e specifica degli astrociti che è risultata infatti in minor quantità.

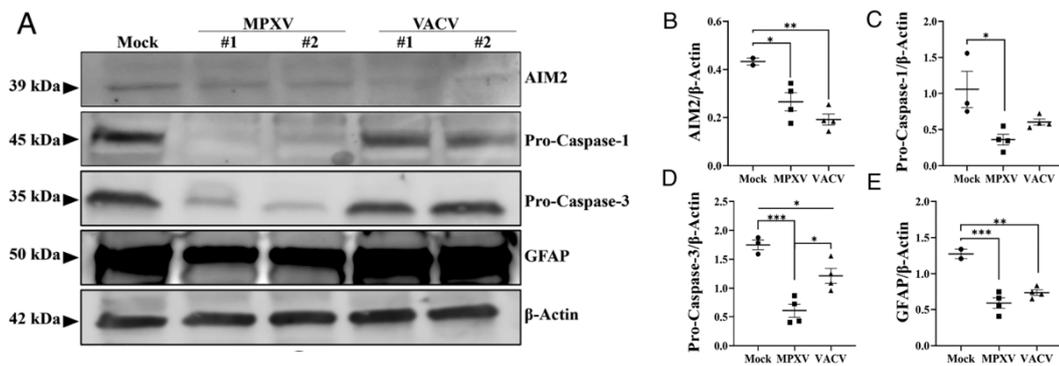
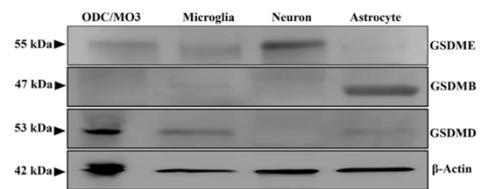


Fig. 5. L'infezione da Mpx attiva le caspasi 1 e 3 negli astrociti. A) astrociti non infettati (mock), infettati da Mpx e VACV per 24 h; western blotting per identificare il livello di espressione delle proteine: AIM2, pro-caspasi 1, pro-caspasi 3, GFAP e β -actina (usata come loading control). B-E) l'intensità delle bande relative a ogni proteina analizzata sono state quantificate e normalizzate utilizzando la β -actina; i valori ottenuti di ogni singola proteina analizzata sono stati poi inseriti in un grafico che ne permette il confronto. I dati sono stati analizzati statisticamente tramite test one-way ANOVA (means \pm SEM) (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.0001)

4.4 L'infezione da Mpx induce il taglio proteolitico di GSDMB

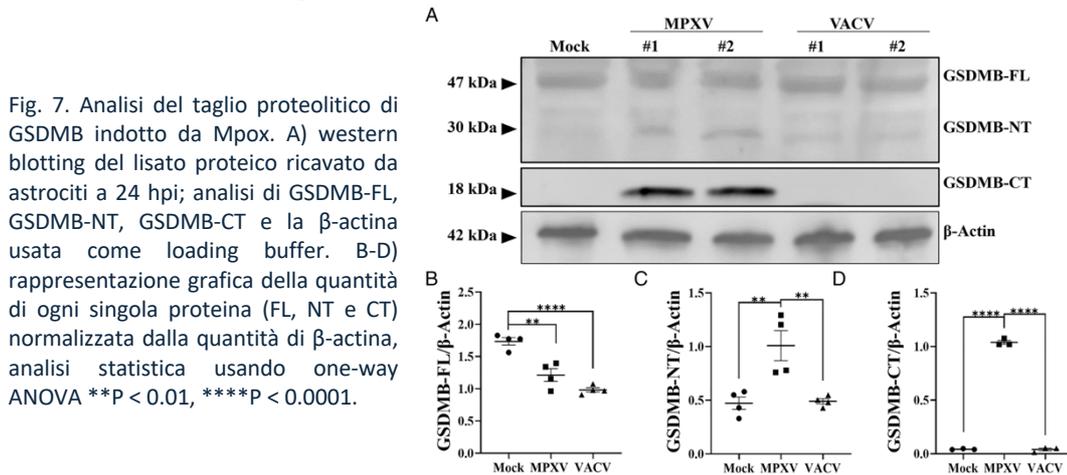
Come detto anche in precedenza, la famiglia delle gasdermin è composta da una serie di proteine che hanno diverse funzioni, tra cui quella principale di mediazione della formazione di pori nella membrana plasmatica, pori che portano alla rottura della membrana stessa (PMR), all'extravasazione del contenuto cellulare e alla morte cellulare infiammatoria (piroptosi). Nello specifico degli astrociti, sono state studiate GSDMD (*gasdermin D*), GSDME (*gasdermin E*) e GSDMB (*gasdermin B*): le prime due mostrano una limitata espressione in questo tipo cellulare mentre, al contrario, GSDMB ha generato un'abbondante immunoreattività indirizzando, quindi, gli studi verso GSDMB (Fig.6).

Fig. 6. Espressione comparativa di diverse proteine gasdermin in diverse cellule neuronali. In questo gel sono stati carica 40 μ g di lisato proteico proveniente da ogni tipo cellulare (ODC, microglia, neuroni e astrociti), analisi tramite western blotting utilizzando sempre come loading buffer la β -actina.



Nello specifico di GSDMB, è noto che il taglio proteolitico può avvenire grazie all'azione svolta dalle caspasi 1 e 4 ma anche dal granzima A (GZMA) derivante dai leucociti. Successivamente, è stato fatto un immunoblotting relativo a GSDMB-FL (*full length*, 47 kDa), GSDMB-NT (*N-terminale*, 30 kDa) e GSDMB-CT (*C-terminale*, 18 kDa) in cellule non infettate (mock), cellule infettate da Mpx e cellule infettate da VACV; quello che ne è risultato è che il livello di intensità delle bande relativo a GSDMB-FL era simile tra astrociti infettati da Mpx e VACV mentre il livello di intensità delle bande relativo a GSDMB-NT e GSDMB-CT era aumentato nelle cellule infettate da Mpx rispetto al livello osservabile negli

astrociti mock e infettati da VACV (Fig. 7A). Da questo, quindi, è stato possibile definire che i prodotti del taglio proteolitico di GSDMB non erano rilevabili in astrociti infettati da VACV oppure in astrociti mock. Dalla successiva quantificazione eseguita a partire all'intensità delle bande, normalizzata secondo i livelli di intensità della β -actina, è stato quindi definitivamente chiaro che i lisati cellulari provenienti dalle cellule infettate da Mpxv contenevano una quantità nettamente maggiore di GSDMB-NT e GSDMB-CT rispetto al mock e agli astrociti infettati da VACV (Fig. 7C, D).



In seguito, grazie ad un'analisi di immunofluorescenza, sono stati messi in comparazione gli astrociti mock con quelli infettati da Mpxv usando come coloranti fluorescenti il DAPI (blu per i nuclei cellulari), I3 (di colore verde per Mpxv/VACV single-strand DNA binding protein) e un immunocolorante specifico per evidenziare GSDMB (di colore rosso). Quello che è stato qui osservato è che l'immunofluorescenza di GSDMB era particolarmente evidente in tutti gli astrociti anche se maggiormente evidenziata nella membrana plasmatica delle cellule dismorfiche infettate da Mpxv (Fig. 8)

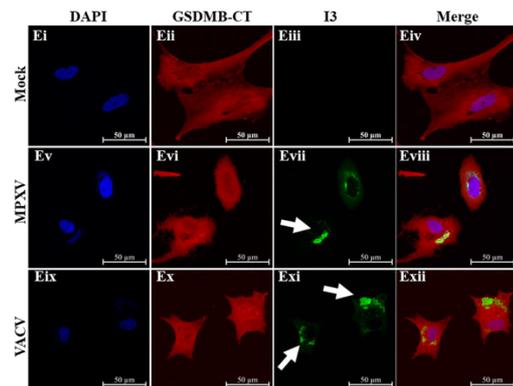


Fig. 8. Astrociti umani fissati a 48 hpi e colorati con diversi coloranti per successiva analisi di immunofluorescenza; i coloranti sono: rosso per evidenziare GSDMB-CT, verde per I3 (Mpxv/VACV single-strand DNA binding protein) e blu DAPI per evidenziare nello specifico i nuclei cellulari. Immagine ottenuta con microscopia confocale.

È stato anche provato che l'esposizione al calore di Mpxv è in grado di inibire la sua infettività nei confronti degli astrociti andando a intaccare anche la replicazione virale e, come conseguenza, portare all'assenza di taglio proteolitico di GSDMB insieme all'assenza di sviluppo di immunoreattività per I3. Questo è stato scoperto tramite immunoblotting di GSDMB-FL, GSDMB-NT e GSDMB-CT ricavato da astrociti infettati da Mpxv inattivato dal calore (HI) e delle stesse proteine ricavate però da astrociti infettati da Mpxv non inattivato dal calore: è possibile osservare la marcata diminuzione di espressione di GSDMB-CT e GSDMB-NT negli astrociti

infettati da Mpx HI a prova del fatto che il taglio proteolitico di GSDMB viene inibito dal calore, insieme anche a una spiccata diminuzione (quasi del tutto assenza) di immunoreattività di I3 negli stessi astrociti infettati da Mpx HI (Fig. 9A). Il saggio di placca ha mostrato allo stesso modo una mancanza della formazione delle placche in astrociti infettati da Mpx HI (Fig. 9B).

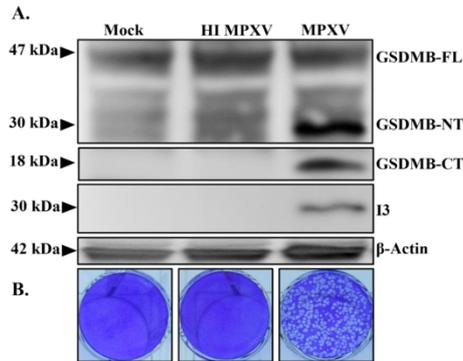


Fig. 9. Effetto dell'inattivazione con il calore di Mpx sull'infettività di Mpx. A) infezione di astrociti umani con Mpx e Mpx HI (MOI 10) per 24 hr; il lisato cellulare è stato utilizzato per eseguire immunoblotting. B) saggio di placca in BSC-40 cells, mostra la quantità di placche che si formano in astrociti infettati con Mpx e in astrociti infettati da Mpx HI. La diluizione eseguita per il mock e HIMpx è 1:10 mentre quella per Mpx è 1:10E06

Oltre all'analisi dell'infettività di Mpx nei confronti degli astrociti sono state condotte anche delle analisi relative all'infettività nei confronti della microglia. Sono state evidenziate quantità comparabili di bande immunoreattive di GSDMB-FL nella microglia sia dopo l'infezione da Mpx che da VACV. Nello specifico è maggiore l'intensità della banda relativa a GSDMB-CT rispetto a quella di GSDMB-NT nelle cellule infettate da Mpx in comparazione con il mock e l'infezione da VACV. Questo è spiegabile da una probabile espressione costitutiva minore di GSDMB-FL nella microglia. Presenza di bande relative a I3 sia nella microglia infettata da Mpx che in quella infettata da VACV (Fig. 10).

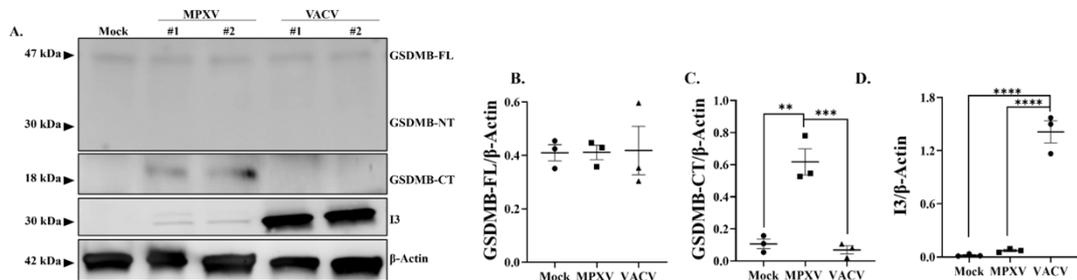


Fig. 10. Infezione di Mpx in cellule della microglia umana. A) immunoblotting del lisato cellulare ricavato da un'infezione dopo 24 hr prendendo in considerazione GSDMB-FL, GSDMB-NT, GSDMB-CT, I3 e la β -actina come loading buffer. B-D) L'intensità delle bande è stata poi convertita in quantità numerica che è stata inserita all'interno di grafici, valori normalizzati dalla β -actina e analisi statistica svolta con one-way ANOVA (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$)

Dal momento che l'infezione da Mpx aveva mostrato sia l'attivazione della caspasi 1 che di GSDMB, è stata analizzata quale fosse la conseguenza della soppressione di queste due proteine sul taglio proteolitico di GSDMB eseguendo un knock-down con siRNA: sono stati trasfettati degli astrociti con siRNA di controllo, anti-GSDMB e anti-caspasi 1 con successiva infezione di questi astrociti con Mpx. Quello che ne è risultato è stato che l'espressione di GSDMB-CT era ridotta nel caso in cui era presente il siRNA indirizzato verso la caspasi 1 e GSDMB (Fig. 11A). Quanto osservato dall'immunoblotting è stato anche confermato dalla quantificazione dell'intensità delle bande di GSDMB-CT normalizzate rispetto alla β -actina e riportate in un grafico (Fig. 11B). A tal proposito è stata quantificata anche la quantità di LDH presente nel surnatante, la quale risulta essere minore nel

caso di cellule infettate da Mpx trasfettate con siRNA rispetto a quelle trasfettate con non-coding siRNA di controllo (Fig. 11C).

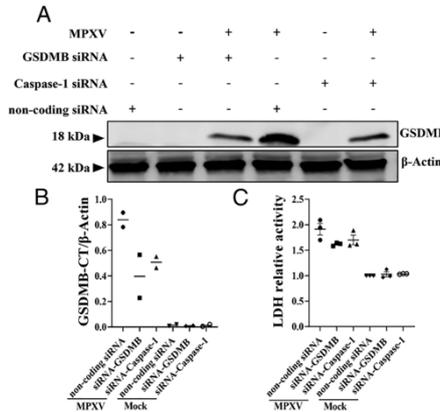


Fig. 11. Taglio proteolitico di GSDMB negli astrociti è ridotto da siRNA indirizzati a caspasi 1 e GSDMB. A) astrociti trasfettati con non-coding siRNA, con siRNA anti-GSDMB e con siRNA anti-caspasi 1 sono stati infettati con Mpx per 24 hr. Dal lisato cellulare è stato ricavato GSDMB-CT e β-actina (loading buffer) usati per fare immunoblotting. B) quantificazione dell'intensità della banda relativa al GSDMB-CT normalizzata con la β-actina e inserita in un grafico comparativo di tutte le condizioni sperimentali. C) analisi della citotossicità tramite la quantificazione della LDH presente nel surnatante cellulare. Tutti i dati sono stati analizzati tramite test statistico one-way ANOVA (*P < 0.05).

Quindi, la scissione di GSDMB e la lisi cellulare, che avviene di conseguenza, sono causate dall'infezione di Mpx; in particolare il taglio proteolitico di GSDMB è mediato dalla caspasi 1.

4.5 Il dimetil fumarato (DMF) riduce il taglio proteolitico indotto da Mpx di GSDMB e la morte cellulare

Il dimetil fumarato (DMF) è un noto inibitore del taglio proteolitico di GSDMB e GSDME e, proprio per questa sua peculiarità, è spesso utilizzato come terapia contro diverse malattie autoimmuni. Nel caso specifico di GSDMB, l'inibizione della sua stessa attivazione permette di prevenire la formazione di pori nella membrana plasmatica e quindi impedisce anche la piroptosi. Per studiarne il funzionamento e le conseguenze che può generare nei confronti degli astrociti sono state fatte una serie di analisi. Innanzitutto, alcuni astrociti sono stati trattati con diverse concentrazioni micromolari di DMF mentre altri sono stati invece trattati con un suo omologo monomero, il monometil fumarato (MMF), il tutto per un'ora prima di procedere con l'infezione con Mpx. Successivamente a tale trattamento, è stato cambiato il mezzo di coltura delle cellule e sono state incubate per 24 ore dopo l'infezione. È stato eseguito un assay di morte cellulare in cui le cellule sono state fissate e trattate con GNAS, un colorante specifico che è impermeabile alla membrana plasmatica di cellule vive, e DAPI, colorante generico per gli acidi nucleici; quello che ne è risultato è una riduzione significativa della fluorescenza rilevata di GNAS negli astrociti infettati da Mpx e trattati con DMF a differenza, invece, delle cellule infettate da Mpx ma trattate con MMF dove al contrario è stato rilevato un aumento della fluorescenza di GNAS alla concentrazione massima di 50 μM (Fig. 12A). Da questa riduzione della fluorescenza relativa a GNAS nel trattamento con DMF, quindi, è stato possibile stabilire che proprio il DMF è in grado di inibire il taglio proteolitico di GSDMB, portando quindi a una diminuzione dell'infezione da Mpx e della conseguente piroptosi. A tal proposito, il DMF è quindi responsabile anche della diminuzione delle bande relative a GSDMB-CT poiché la scissione è inibita e anche della diminuzione dell'intensità della banda relativa a I3 (Fig. 12B). Per concludere, l'intensità delle bande rilevate sono state di conseguenza convertite a un valore numerico, normalizzato con la β-actina e inserite in un grafico che permette di visualizzare chiaramente la riduzione di immunoreattività sia di GSDMB-CT sia di I3 negli astrociti trattati con DMF

rispetto al livello di immunoreattività relativo agli astrociti infettati ma non trattati o a quelli trattati con MMF (Fig. 12C, D).

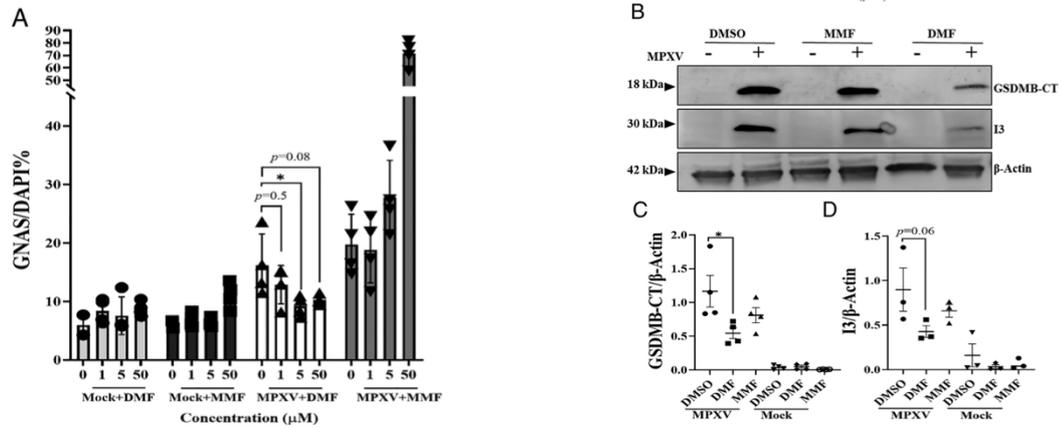


Fig. 12. Il trattamento con DMF riduce il taglio proteolitico di GSDMB, il PMR e l'espressione di I3. A) quantificazione fluorimetrica (con GNAS) della morte cellulare di astrociti trattati rispettivamente con DMF e MMF dopo le 24 hpi in rapporto con la fluorescenza emessa con DAPI. B) western blotting del lisato cellulare dopo un pre-trattamento degli astrociti con DMSO, DMF e MMF per un'ora seguito da un'infezione di 24 ore con Mpxv. C-D) i valori relativi ai livelli di espressione rilevati dalle bande sono stati quantificati, normalizzati con i valore relativi alla β -actina e inseriti in un grafico; valori analizzati statisticamente con test statistico one-way ANOVA.

5. DISCUSSIONE

Attraverso questo studio sono stati osservati due virus appartenenti al genere *Orthopoxvirus*, Mpox e VACV. È stato provato che entrambi possono infettare e replicarsi all'interno degli astrociti umani attivando di conseguenza la risposta immunitaria innata negli stessi potendo causare disturbi neurologici tra le persone infettate. Quindi, è stato verificato che entrambe le infezioni da Mpox e da VACV hanno come conseguenza l'induzione della risposta pro-infiammatoria con aumento della trascrizione dei geni associati all'inflammasoma e generazione di una condizione di malattia. Nello specifico, Mpox causa PMR associata a morte cellulare degli astrociti infettati ma provoca anche l'attivazione della caspasi 1, la scissione di GSDMB di cui sono stati rilevati i frammenti N- e C-terminali e l'attivazione della caspasi-3. Infatti, l'attivazione di quest'ultima è stata osservata grazie a una riduzione delle bande immunoreattive rilevate tramite immunoblotting per GFAP, noto substrato della caspasi-3 e proteina strutturale negli astrociti, mentre il coinvolgimento di GSDMB nella piroptosi è stata provata tramite un trattamento con DMF che ha mostrato una riduzione sia della scissione di GSDMB sia della piroptosi associata. Tuttavia, l'attivazione e la scissione delle proteine gasdermin stesse (in particolare di GSDMB) può avere l'effetto di limitare la diffusione dell'infezione proprio causando PMR, morte cellulare e seguente rilascio di DAMP e citochine infiammatorie che allertano le cellule vicine dell'infezione. Dai dati relativi ai pesi molecolari dei prodotti di scissione e dall'effetto inibitorio del siRNA sulla scissione di GSDMB, è stato possibile stabilire che la caspasi-1 è direttamente responsabile della scissione dell'isoforma 3 di GSDMB. Questo è vero anche se successivamente è stato osservato che anche GZMA è in grado di scindere GSDMB. Un particolare importante è il fatto che GZMA non è espresso in modo costitutivo negli astrociti umani ma può operare solamente dopo la trasfezione degli astrociti con un plasmide in grado di codificarlo. Nella ricerca di nuove terapie e trattamenti dell'infezione da Mpox è risultato che il DMF è in grado di prevenire la scissione di GSDMB riducendo quindi l'espressione delle proteine I3 di Mpox negli astrociti provocando una riduzione della morte cellulare misurata con immunofluorescenza. Anche se l'azione del DMF verso GSDMB è ancora incerta è approvata la sua azione nei confronti di GSDMD e GSDME poiché il suo legame provoca la succinazione di specifici residui di cisteina e impedisce la scissione da parte delle caspasi, quindi anche la conseguente formazione di pori nella membrana plasmatica; al contrario invece il MMF non ha azione inibitoria della scissione⁸. In questo studio è risultato che a una concentrazione non tossica (50 µM) il DMF ha esercitato effetti inibitori sulla scissione di GSDMB riducendo sia la trasmissione da cellula a cellula che l'immunoreattività della proteina I3 di Mpox nell'immunoblot. Il DMF è ben tollerato e è in grado di attraversare la barriera emato-encefalica rappresentando quindi una possibile opzione terapeutica per le infezioni cerebrali da Mpox; tuttavia, è noto che il DMF influisce su vari percorsi cellulari andando, per esempio, a generare degli effetti avversi nei confronti del tratto gastrointestinale oppure portando a disordini ematologici come la diminuzione del numero di leucociti e linfociti o ancora rossore⁹. Inoltre, è stato messo in evidenza anche un aumento significativo dell'espressione di diversi fattori di restrizione (come ISGI5, IFITM1, OAS1, BST2, GBP2, MX2 e TRIM5A) nella microglia rispetto agli astrociti andando a costituire una possibile ragione della diversa inclinazione delle diverse cellule neurali verso l'infezione da Mpox e VACV. A questo proposito, è stato riportato da studi eseguiti in cellule murine e

umane immortalizzate, che VACV infetta preferenzialmente ODC, microglia e neuroni contrariamente alle osservazioni svolte su Mpox dove il target preferenziale sono gli astrociti e proprio questi, in seguito a infezione, mostrano un aspetto dismorfico associato alla degradazione di GFAP.

Per concludere, l'assenza di un modello *in vivo*, oltre le cellule primarie umane *in vitro*, costituisce un limite per le osservazioni relative al neurotropismo, all'effetto sull'attivazione dell'inflammasoma e alla virulenza di Mpox limitando anche lo sviluppo di terapie specifiche in base al tipo di cellula infettata. L'uso di un primate non umano sarebbe ottimale rispetto all'utilizzo dei roditori che non possiedono la proteina GSDMB. Altra limitazione, che potrebbe essere parzialmente superata con l'uso di un modello animale adeguato o da esperimenti *ex vivo*, è costituita dalla mancanza di tessuti del sistema nervoso umano derivanti da persone infettate da Mpox e con malattia neurologica.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Hraib M, Jouni S, Albitar MM, Alaidi S, Alshehabi Z. The outbreak of monkeypox 2022: An overview. *Ann Med Surg (Lond)*. 2022 Jun 24;79:104069. doi: 10.1016/j.amsu.2022.104069. PMID: 35860140; PMCID: PMC9289401.
2. Sepehrinezhad A, Ashayeri Ahmadabad R, Sahab-Negah S. Monkeypox virus from neurological complications to neuroinvasive properties: current status and future perspectives. *J Neurol*. 2023 Jan;270(1):101-108. doi: 10.1007/s00415-022-11339-w. Epub 2022 Aug 21. PMID: 35989372; PMCID: PMC9393054.
3. Suraweera CD, Hinds MG, Kvensakul M. Poxviral Strategies to Overcome Host Cell Apoptosis. *Pathogens*. 2020 Dec 23;10(1):6. doi: 10.3390/pathogens10010006. PMID: 33374867; PMCID: PMC7823800.
4. McKenzie BA, Dixit VM, Power C. Fiery Cell Death: Pyroptosis in the Central Nervous System. *Trends Neurosci*. 2020 Jan;43(1):55-73. doi: 10.1016/j.tins.2019.11.005. Epub 2019 Dec 13. PMID: 31843293.
5. Andrei I, Ivanov, Nitish Rana, Giuseppe Privitera, Theresa T. Pizarro. The enigmatic roles of epithelial gasdermin B: Recent discoveries and controversies, *Trends in Cell Biology*, Volume 33, Issue 1, 2023, Pages 48-59, ISSN 0962-8924, <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2022.06.006>.
6. Roczkowsky A, Doan MAL, Hlavay BA, Mamik MK, Branton WG, McKenzie BA, Saito LB, Schmitt L, Eitzen G, Di Cara F, Wuest M, Wuest F, Rachubinski R, Power C. Peroxisome Injury in Multiple Sclerosis: Protective Effects of 4-Phenylbutyrate in CNS-Associated Macrophages. *J Neurosci*. 2022 Sep 14;42(37):7152-7165. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0312-22.2022. PMID: 35940876; PMCID: PMC9480879.
7. Kojabad AA, Farzanehpour M, Galeh HEG, Dorostkar R, Jafarpour A, Bolandian M, Nodooshan MM. Droplet digital PCR of viral DNA/RNA, current progress, challenges, and future perspectives. *J Med Virol*. 2021 Jul;93(7):4182-4197. doi: 10.1002/jmv.26846. Epub 2021 Mar 11. Erratum in: *J Med Virol*. 2024 May;96(5):e29632. doi: 10.1002/jmv.29632. PMID: 33538349; PMCID: PMC8013307.
8. Humphries F, Shmuel-Galia L, Ketelut-Carneiro N, Li S, Wang B, Nemmara VV, Wilson R, Jiang Z, Khalighinejad F, Muneeruddin K, Shaffer SA, Dutta R, Ionete C, Pesiridis S, Yang S, Thompson PR, Fitzgerald KA. Succination inactivates gasdermin D and blocks pyroptosis. *Science*. 2020 Sep 25;369(6511):1633-1637. doi: 10.1126/science.abb9818. Epub 2020 Aug 20. PMID: 32820063; PMCID: PMC8744141.
9. Matteo P, Federico D, Emanuela M, Giulia R, Tommaso B, Alfredo G, Anna C, Annamaria O. New and Old Horizons for an Ancient Drug: Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Clinical Perspectives of Dimethyl Fumarate. *Pharmaceutics*. 2022 Dec 6;14(12):2732. doi: 10.3390/pharmaceutics14122732. PMID: 36559226; PMCID: PMC9788528.



Monkeypox virus infection of human astrocytes causes gasdermin B cleavage and pyroptosis

Hajar Miranzadeh Mahabadi^a, Y. C. James Lin^b, Natacha S. Ogando^a, Eman W. Moussa^c, Nazanin Mohammadzadeh^b, Oliver Julien^c, Neal M. Alto^d, Ryan S. Noyce^{b,e}, David H. Evans^{b,e}, and Christopher Power^{a,b,1}

Edited by Bernard Moss, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, MD; received September 8, 2023; accepted January 3, 2024

Monkeypox virus (MPXV) infections in humans cause neurological disorders while studies of MPXV-infected animals indicate that the virus penetrates the brain. Pyroptosis is an inflammatory type of regulated cell death, resulting from plasma membrane rupture (PMR) due to oligomerization of cleaved gasdermins to cause membrane pore formation. Herein, we investigated the human neural cell tropism of MPXV compared to another orthopoxvirus, vaccinia virus (VACV), as well as its effects on immune responses and cell death. Astrocytes were most permissive to MPXV (and VACV) infections, followed by microglia and oligodendrocytes, with minimal infection of neurons based on plaque assays. Aberrant morphological changes were evident in MPXV-infected astrocytes that were accompanied with viral protein (I3) immunolabelling and detection of over 125 MPXV-encoded proteins in cell lysates by mass spectrometry. MPXV- and VACV-infected astrocytes showed increased expression of immune gene transcripts (*IL12*, *IRF3*, *IL1B*, *TNFA*, *CASP1*, and *GSDMB*). However, MPXV infection of astrocytes specifically induced proteolytic cleavage of gasdermin B (GSDMB) (50 kDa), evident by the appearance of cleaved N-terminal-GSDMB (30 kDa) and C-terminal-GSDMB (18 kDa) fragments. GSDMB cleavage was associated with release of lactate dehydrogenase and increased cellular nucleic acid staining, indicative of PMR. Pre-treatment with dimethyl fumarate reduced cleavage of GSDMB and associated PMR in MPXV-infected astrocytes. Human astrocytes support productive MPXV infection, resulting in inflammatory gene induction with accompanying GSDMB-mediated pyroptosis. These findings clarify the recently recognized neuropathogenic effects of MPXV in humans while also offering potential therapeutic options.

Monkeypox virus | neurovirulence | neurotropism | gasdermin B | dimethyl fumarate

Monkeypox virus (MPXV), an orthopoxvirus, is a zoonotic infection transmitted via droplet exposure and direct contact or by contagious materials (1, 2). MPXV is closely related to camelpox, cowpox, variola, and vaccinia (VACV) viruses. Sporadic cases of MPXV infection in humans were first identified in the 1970s in the rural rainforests of Central and West Africa (3). MPXV-infection incidence in humans has sharply increased since May 2022, prompting the World Health Organization to declare the Mpox outbreak a global health emergency. In addition to typical symptoms such as fever, swollen lymph nodes, malaise, and skin lesions, MPXV-infected individuals also develop neurological disorders such as headaches, myalgias, seizures, altered consciousness, and encephalitis (4–9). Moreover, MRI of the brains of MPXV-infected persons displayed hyperintensities consistent with mixed cytotoxic and vasogenic brain edema in the thalamus, brainstem, and parietal cortex (10, 11). Pleocytosis has also been reported in the cerebrospinal fluid from persons with MPXV infections, suggesting active infection and inflammation of the central nervous system (CNS) (4, 8). In recently published studies, adult rodents were more resistant to MPXV infection while newborn animals, or rodents with severe combined immune deficiency, were found to be susceptible to MPXV infection (12, 13). Furthermore, data from animal studies revealed that MPXV can cross the blood–brain barrier (BBB) (14–19). To understand the pathogenesis of MPXV-associated CNS disease, it is essential to understand the neurotropic and neurovirulent properties of MPXV. Previous *in vitro* experiments identified that induced pluripotent stem cell-derived neural cells were permissive to MPXV infection, which caused cytopathic effects (20). Additionally, a recent non-peer-reviewed paper reported MPXV infection of *ex vivo* human brain tissue (21).

It is critical for viruses to avoid induction of cell death pathways to enable ongoing viral replication. Poxviruses' genomes encode multiple proteins that permit immune evasion, some of which prevent activation of regulated (or programmed) cell death pathways, such as apoptosis (22). Indeed, poxvirus proteins can interact with multiple host proteins to interrupt the extrinsic and intrinsic apoptotic pathways (23). There are at least twelve

Significance

MPXV (monkeypox virus) infections in humans increased dramatically in 2022, causing a global health emergency. Brain disorders are now recognized among MPXV-infected persons. However, the processes causing these MPXV-associated brain disorders remain unknown. Herein, we show that MPXV preferentially infects astrocytes, the most abundant cell in the human brain and it activates genes that contribute to inflammation. In the inflammatory process, MPXV selectively caused astrocyte cell membrane rupture and cell death, termed pyroptosis, by activating a cytotoxic protein, gasdermin B. Treatment of MPXV-infected astrocytes with dimethyl fumarate reduced cell death. These results show that MPXV infects human astrocytes and causes pyroptosis, likely contributing to brain disorders observed in humans with MPXV infection, that could be targeted with specific therapies.

Author contributions: H.M.M., N.S.O., N.M.A., D.H.E., and C.P. designed research; H.M.M., Y.C.J.L., N.S.O., E.W.M., N.M., and R.S.N. performed research; H.M.M. contributed new reagents/analytic tools; H.M.M., E.W.M., and O.J. analyzed data; O.J. edit manuscript; N.M.A., R.S.N., D.H.E., and C.P. manuscript editing; and H.M.M. wrote the paper.

The authors declare no competing interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Copyright © 2024 the Author(s). Published by PNAS. This article is distributed under Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 (CC BY-NC-ND).

¹To whom correspondence may be addressed. Email: chris.power@ualberta.ca.

This article contains supporting information online at <https://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.2315653121/-/DCSupplemental>.

Published February 12, 2024.

types of regulated cell death including those which are pro-inflammatory (unlike apoptosis) (24). Pyroptosis is an inflammatory type of regulated/programmed cell death that occurs downstream of inflammasome activation, resulting from plasma membrane rupture (PMR), and the activation and release of pro-inflammatory cytokines and damage-associated molecular patterns (DAMPs) (25). A critical step in pyroptosis is gasdermin cleavage. Gasdermin B (GSDMB) is a primate-specific member of the pyroptosis-causing gasdermin gene family (26). Gasdermin proteins can be cleaved into N- and C-terminal domains by caspases. The N-terminal domain of a gasdermin functions as the pore-forming fragment by inserting itself into the lipid bilayer of the cytoplasm and oligomerizing to form pores in the cell membrane, enabling extravasation of cellular content and eventual cell death (27).

Given the above clinical and experimental observations, we hypothesized that MPXV could infect neural cells and contribute to cellular injury and death through inflammatory mechanisms. We investigated the comparative MPXV and VACV infectivity in different human neural cell types together with their capacity to cause cell death. Herein, we observed that MPXV as well as VACV preferentially infected primary human astrocytes, resulting in inflammatory gene expression although only MPXV infection caused ensuing cell death.

Results

MPXV and VACV Preferentially Infect and Replicate in Primary Human Astrocytes. Infection of primary human astrocytes, neurons, microglia, and a human oligodendrocyte (ODC) immortalized cell line (MO3.13) with MPXV (multiplicity of infection (MOI) 0.01) revealed an increase in viral titer at 24- and 48-hours post-infection (hpi) that was most apparent in astrocytes, and less so in oligodendroglial (MO3.13) cells and microglia, but not in neurons (Fig. 1A). In astrocytes and microglia, VACV replicated to similar titers as MPXV throughout a 72-h time course infection (Fig. 1B). Quantification of viral DNA in supernatants from MPXV- and VACV-infected astrocyte cultures showed that both viruses were detected over 10^6 genome copies/mL at 24 h post-infection (Fig. 1C). Mass spectrometry (liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)/MS) of infected astrocyte lysates showed that over 125 individual viral proteins encoded by MPXV or VACV were expressed but absent in mock-infected cells (Fig. 1D). Multiple common poxvirus-encoded proteins were observed in the mass spectrometry analyses (SI Appendix, Fig. S1) encompassing the entire genomes of both viruses. Immunofluorescence analyses of mock- and MPXV-infected astrocytes showed dysmorphic GFAP (glial fibrillary acidic protein, astrocyte marker) immunolabelling in MPXV (Fig. 1E, *Evi*) and VACV (Fig. 1E, *E x*)-infected cells with associated poxvirus-encoded OPG079 (I3) immunoreactivity, which was not evident in the mock-infected cells (Fig. 1E, *Eiii*). These studies demonstrated that MPXV and VACV productively infected human astrocytes.

MPXV and VACV Infections in Human Astrocytes Induce Innate Immune Responses. Given the capacity for MPXV and VACV to infect astrocytes, the innate host immune response profiles were examined following astrocyte infection. Both MPXV- and VACV- infections induced pro-inflammatory gene transcripts, including *TNFA*, *IL12*, *IL8*, and *IL6* (SI Appendix, Fig. S2A–D, respectively). Among antiviral type I interferon-associated genes, both *IRF3* and *MX2* mean transcript levels (SI Appendix, Fig. S2E and F) were induced by each virus. To explore the activation of

inflammasome pathways, analyses of *IL1B*, *CASP1*, and *GSDMB* (SI Appendix, Fig. S2G–I) showed increased mean transcript levels in astrocytes following infections with MPXV and VACV. Thus, both viral infections induced innate host immune responses in astrocytes that involved inflammatory and antiviral pathways.

MPXV Infection Induces Lytic Cell Death in Human Astrocytes.

As poxvirus-infected astrocytes displayed evidence of immune activation compared to mock-infected cells, the extent of cell death was assessed in both MPXV- and VACV-infected astrocytes. Following mock, MPXV, and VACV infections, astrocytes were labeled with the cell-impermeable green nucleic acid stain (GNAS) and DAPI (Fig. 2A). Interestingly, MPXV-infected astrocytes displayed markedly increased GNAS/DAPI dual expression (Fig. 2A, white arrows) compared to mock- and VACV-infected cells (Fig. 2B), suggesting that this virus induces more cytotoxicity than VACV. To confirm whether the increased GNAS/DAPI expression was associated with cell lysis, supernatant lactate dehydrogenase (LDH) levels were measured for each experimental condition. LDH levels were significantly higher in the supernatants from MPXV-infected cells compared to VACV-infected cells, indicating that MPXV infection results in lytic cell death associated with PMR and release of intracellular LDH (Fig. 2C).

MPXV Infection Activates Caspases-1 and -3 in Astrocytes.

Since innate immune activation with associated lytic cell death is hallmarks of inflammasome induction (28), the expression levels of proteins known to underpin inflammasome activation were assessed in cell lysates from mock-, MPXV-, and VACV-infected astrocytes by immunoblotting (Fig. 3). Absent-in-melanoma-2 (AIM2) immunoreactive bands (37 kDa) were reduced in MPXV- and VACV-infected astrocytes (Fig. 3A), evident when analyzed as a mean ratio to corresponding β -actin (42 kDa) immunoreactive bands (Fig. 3B). In addition, both pro-caspases-1 (45 kDa) and -3 (35 kDa) immunoreactive bands were decreased in both MPXV and VACV-infected astrocytes, suggestive of (Fig. 3C and D, respectively). Since pro-caspase-3 immunoreactivity was reduced by MPXV infection, a known substrate for caspase-3 and marker for astrocytes, GFAP, was also assessed; GFAP immunoreactivity (50 kDa) was reduced in lysates following MPXV and VACV infection of astrocytes (Fig. 3E). These data suggested that pro-caspases-1 and -3 undergo proteolytic cleavage following MPXV infection to yield active caspases that can potentially degrade GSDMB and an essential astrocyte structural protein, GFAP, respectively.

MPXV Infection Induces Proteolytic Cleavage of GSDMB. The gasdermins represent a group of highly conserved proteins whose chief recognized function is to mediate plasma membrane pore formation following their proteolytic cleavage, enabling extravasation of cellular contents that culminate in inflammatory cell death, termed in pyroptosis (27). In human astrocytes, the prototype gasdermins, including gasdermin D and E, display limited expression (SI Appendix, Fig. S3) while GSDMB showed abundant immunoreactivity prompting further investigation of this gasdermin during viral infection of astrocytes. Of note, caspases-1 and -4 represent key enzymes implicated in the cleavage of gasdermins, including GSDMB (29) although granzyme A (GZMA), likely derived from leucocytes, also cleaves GSDMB (30). Similar levels of immunoreactive full-length (GSDMB-FL) bands (47 kDa) were observed following both MPXV and VACV infections of astrocytes (Fig. 4A and B). Interestingly, immunoreactive bands corresponding to the N-terminal proteolytic product (GSDMB-NT) (30 kDa) and the C-terminal proteolytic

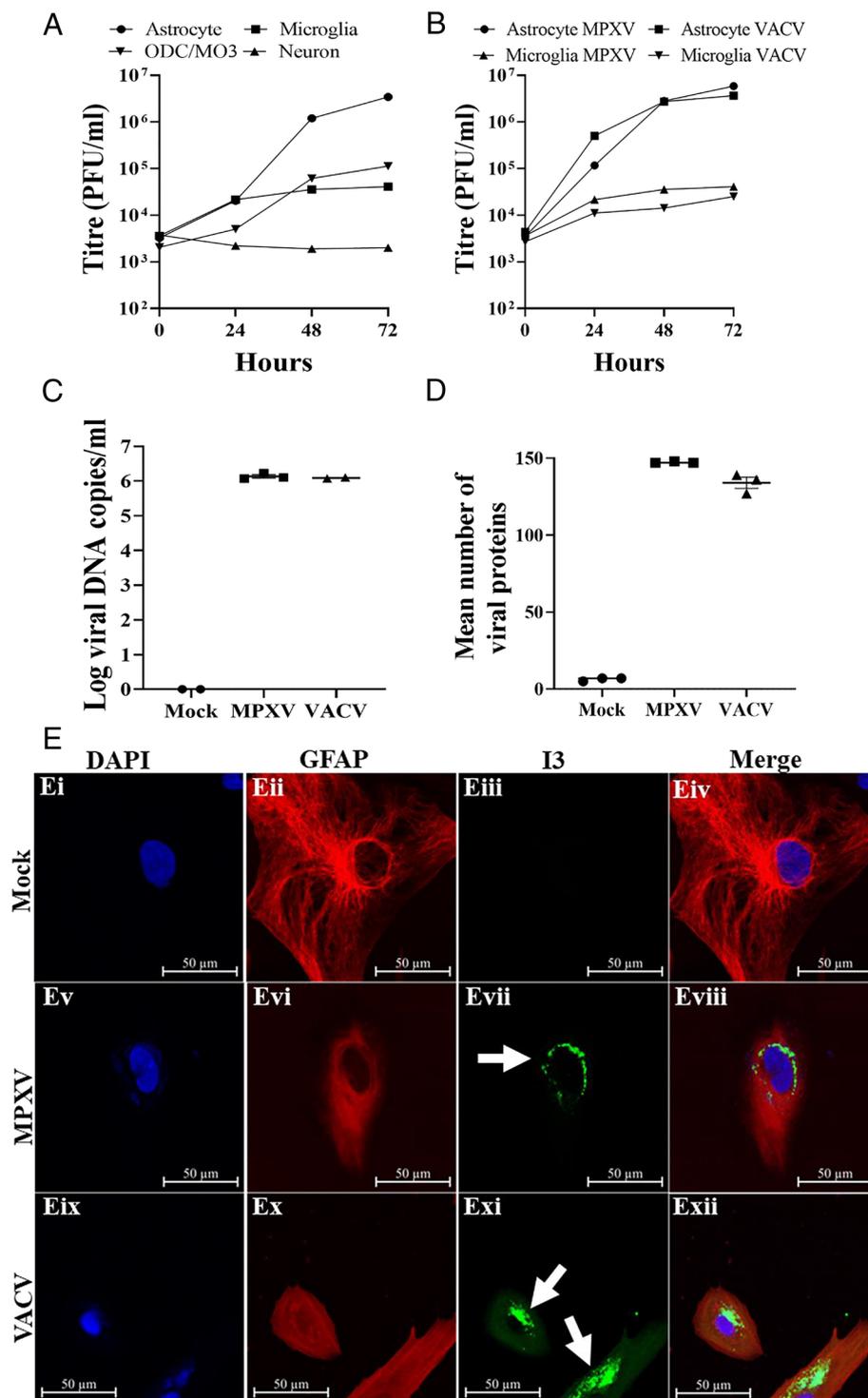


Fig. 1. Astrocytes were more permissive to MPXV infections than other neural cells. (A) Human neural cells were infected with MPXV (MOI 0.01), and virus titers were determined at 0, 24, 48, and 72 hpi by plaque assay in BSC-40 cells (n=3). (B) Comparison of MPXV and VACV growth curves in infected astrocytes and microglia. (C) ddPCR revealed the presence of both MPXV- and VACV-encoded DNA in supernatants from astrocytes after 24 h. Data shown are representative of experiments performed in duplicate for mock and triplicate for MPXV and VACV infections. The data are presented as mean \pm SEM. (D) Cell lysates from MPXV- and VACV-infected astrocytes were harvested at 6 hpi and processed for mass spectrometry. A total of 143 out of 174 potential MPXV proteins and 121 out of 199 potential VACV proteins were identified in astrocyte lysates (mean \pm SEM, performed in triplicate). (E) MPXV-infected astrocytes were fixed at 48 hpi and immunolabeled for MPXV/VACV single-strand DNA binding protein (I3, green, white arrows), astrocyte marker (GFAP, red) and nuclear marker (DAPI, blue). All images were captured at the same magnification, 40 \times . (Scale bar 50 μ m).

product (GSDMB-CT) (18 kDa) were increased in MPXV-infected cells, compared to the mock- and VACV-infected cells (Fig. 4A). Established GSDMB cleavage products were not detected in VACV-infected astrocyte lysates. Quantitation of mean ratios of GSDMB immunoreactive bands relative to β -actin

showed that MPXV-infected cell lysates had significantly more cleaved GSDMB products including both GSDMB-NT (Fig. 4C) and -CT (Fig. 4D), compared to mock- or VACV-infected astrocytes. To validate these observations, mock- and MPXV-infected cells were compared (Fig. 4E, Eii, Evi, and Ex) revealing

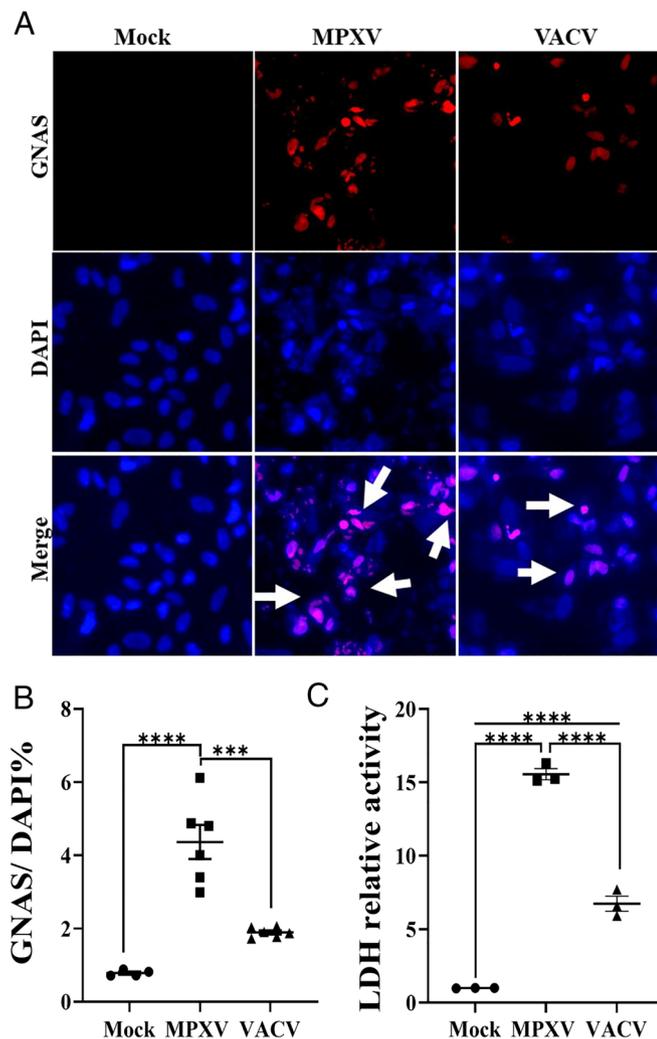


Fig. 2. MPXV infection causes PMR with cell death (pyroptosis). (A) Astrocytes uninfected or infected with MPXV and VACV were labeled at 24 hpi with GNAS and DAPI. Magnification: 10 \times . (B) Relative fluorescence units of GNAS were calculated relative to number of cell nuclei, labeled by DAPI ($n = 2$, triplicate). (C) Cytotoxicity of MPXV and VACV infections was measured by LDH (performed in triplicate). The results are presented as means \pm SEM. The data were analyzed by one-way ANOVA. (**** $p < 0.001$, ***** $p < 0.0001$).

that GSDMB immunofluorescence was apparent in astrocytes, albeit more concentrated at the plasma membrane of MPXV-infected dysmorphic cells, which was accompanied by detection of the poxvirus protein I3 (Fig. 4 E, *Evii* and *Exi*). To examine the impact of heat-inactivated (HI) MPXV on astrocyte infection and GSDMB cleavage, astrocytes were infected with HI MPXV and non-inactivated MPXV (MOI 10), followed by immunoblotting of infected cells. GSDMB cleavage and I3 expression were not detected after HI MPXV infection, compared to non-inactivated MPXV stocks (SI Appendix, Fig. S4A). Plaque assays performed on inactivated virus resulted in zero countable plaques after HI MPXV infection (SI Appendix, Fig. S4B). These data showed that heat exposure of MPXV inhibited viral infectivity and replication, resulting in absent GSDMB cleavage and I3 immunoreactivity.

Comparable amounts of immunoreactive GSDMB-FL band were observed after infection of microglia with both MPXV and VACV (SI Appendix, Fig. S5 A and B). Notably, there was an increase in immunoreactive band density associated with the GSDMB-CT in MPXV-infected cells compared to both mock- and VACV-infected cells while the GSDMB-NT band was not observed (SI Appendix, Fig. S5A) that might be because of comparatively lower constitutive

expression of GSDMB-FL in this neural cell type. Moreover, I3 immunoreactive bands were observed in both MPXV- and VACV-infected microglia (SI Appendix, Fig. S5D).

Given that MPXV appeared to activate both caspase-1 and GSDMB, we next investigated the impact of suppressing these proteins had on GSDMB cleavage using siRNA knockdown. Transfection of astrocytes with control, anti-GSDMB or anti-caspase-1 siRNAs followed by infection with MPXV showed that the expression of GSDMB-CT (18 kDa) was diminished in the presence of siRNAs targeting GSDMB or caspase-1 (Fig. 5A). Quantitation of the mean ratios of the GSDMB-CT to β -actin bands showed that siRNAs targeting GSDMB, and caspase-1 resulted in lower GSDMB-CT abundance (Fig. 5B) with concurrent reduced LDH supernatant levels, compared to the control siRNA applied to MPXV-infected cells (Fig. 5C). These data suggested that GSDMB cleavage and associated cell lysis resulted from MPXV infection of astrocytes. Additionally, caspase-1 could mediate GSDMB cleavage during MPXV infection, which was aligned with the predicted molecular weights of the GSDMB proteolytic products generated by caspase-1.

Dimethyl Fumarate (DMF) Reduces MPXV-Induced GSDMB Cleavage and Cell Death. DMF is an established therapy for several autoimmune diseases (27, 31) that is known to interrupt the proteolytic cleavage of gasdermins D and E, thereby preventing their translocation to the plasma membrane and ensuing cytotoxic pore formation (32).

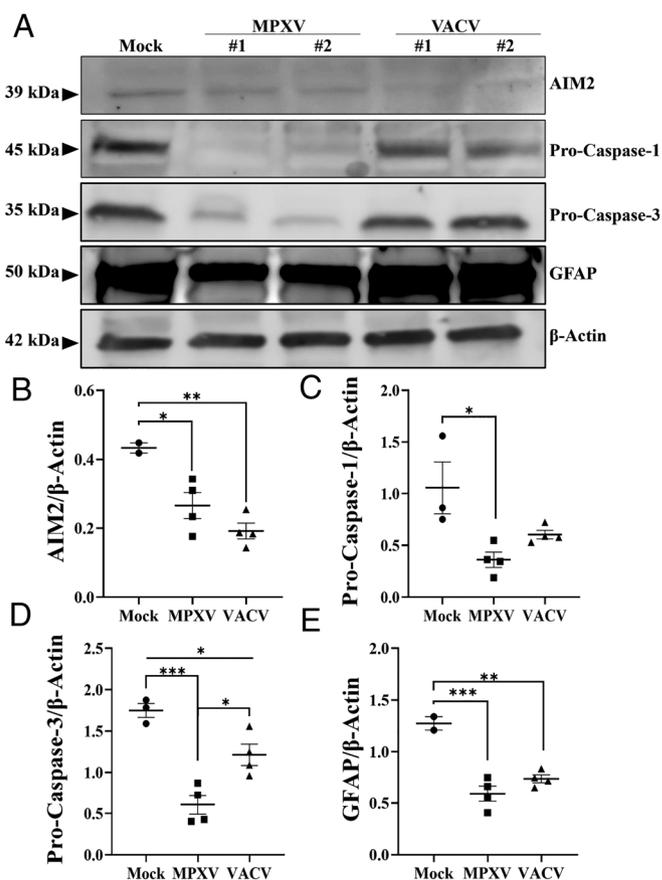


Fig. 3. MPXV infection activates caspases-1 and -3 in astrocytes. (A) Astrocytes were infected with MPXV or VACV for 24 h. Protein lysates were harvested, and western blotting was performed to detect expression of AIM2, caspases-1/-3, GFAP, and β -actin (β -actin levels were used as loading controls). (B-E) Band intensities were quantified by ImageJ and normalized using β -actin levels. The relative levels of protein were averaged and plotted. Data were statistically analyzed using one-way ANOVA (means \pm SEM) (2 different experiments in duplicate). (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ***** $P < 0.0001$).

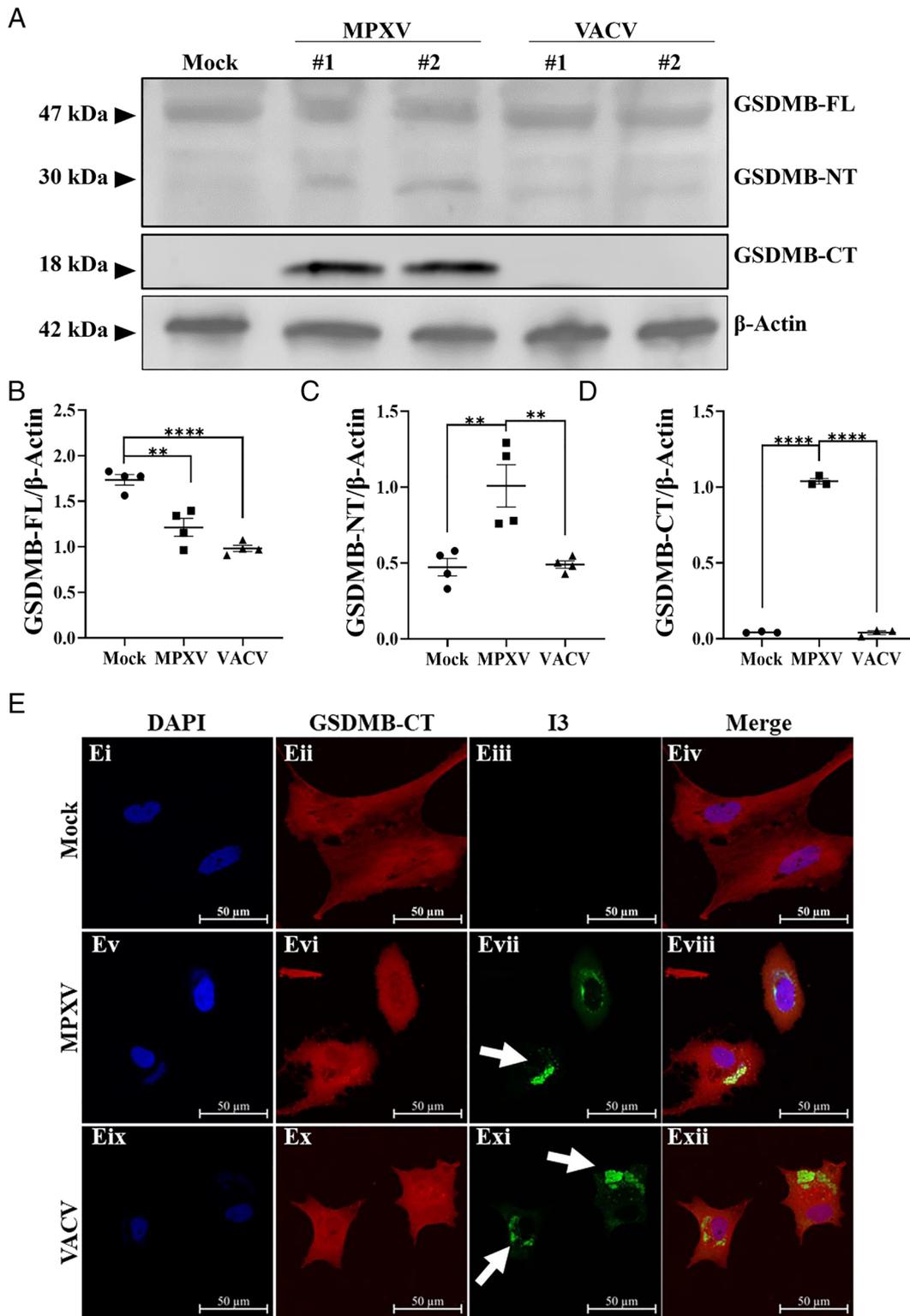


Fig. 4. MPXV infection induced GSDMB proteolytic cleavage. (A) Cell lysates were harvested 24 hpi and immunoblotted for detection of FL (47 kDa), N-terminal (30 kDa), and C-terminal GSDMB (18 kDa) protein as well as β -actin. GSDMB-FL (B), GSDMB-NT (C), and GSDMB-CT (D) band intensity were quantified by ImageJ and normalized to β -actin. Data were statistically analyzed using one-way ANOVA (means \pm SEM) (GSDMB-FL and GSDMB-NT $n = 4$; GSDMB-CT $n = 3$). (** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$). (E) MPXV-infected astrocytes were fixed at 48 hpi and immunolabeled for GSDMB (red), I3 (green, white arrows), and nuclear marker (DAPI, blue) and imaged using confocal microscopy with the same magnification, 40 \times . (Scale bar 50 μ m).

Although its effects on GSDMB cleavage are unknown, it was investigated in the current model system. Astrocytes were pre-treated with different micromolar concentrations of DMF or its monomeric homolog, monomethyl fumarate (MMF), for 1 h prior to MPXV infection. Following treatment, the medium was changed, and cells were incubated for 24 hpi. Cells were either fixed

for cell death assay (Fig. 6A) or lysates collected in RIPA buffer for western blot analyses using antibodies binding GSDMB-CT and I3 (Fig. 6B). GNAS fluorescence was significantly suppressed in DMF-treated MPXV-infected astrocytes (Fig. 6A), unlike MMF-treated MPXV-infected cells, which displayed increased GNAS at the maximum concentration (50 μ M). Comparison of

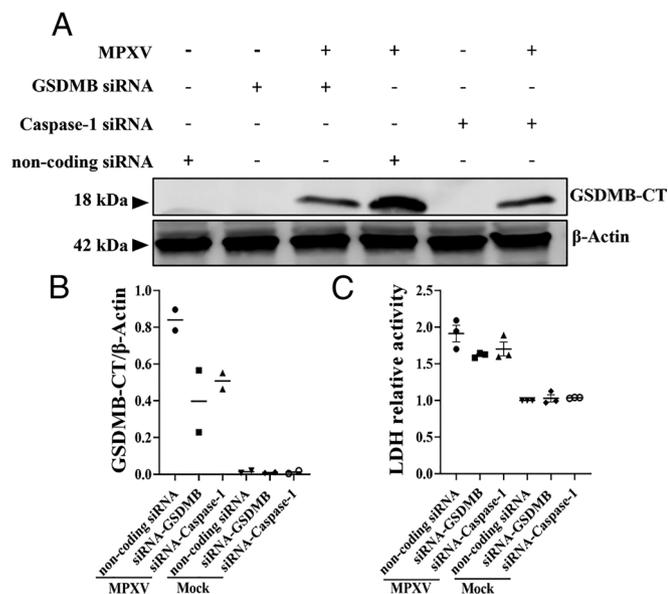


Fig. 5. MPXV-associated GSDMB cleavage in astrocytes was reduced by siRNAs targeting caspase-1 and GSDMB. (A) Anti-GSDMB, anti-caspase-1, or non-coding siRNAs transfected astrocytes were infected with MPXV for 24 h. Cell lysates were harvested and immunoblotted for the GSDMB-CT as well as β -actin. (B) The relative levels of protein to β -actin were averaged and plotted for two different independent experiments. (C) The cytotoxicity in cell supernatants was assessed by LDH assay. LDH assays are representative examples of experimental results independently replicated using multiple donors. Data were analyzed using one-way ANOVA (means \pm SEM) (* $P < 0.05$).

results obtained with mock- and MPXV-infected cells suggested that cytotoxicity observed can be attributed to levels of MPXV replication. These data implied that DMF inhibited GSDMB cleavage, resulting in decreased MPXV infection and diminished cell death, evident as reduced GNAS detection. DMF treatment (50 μ M) reduced both GSDMB-CT and I3 immunoreactive band densities. Quantitation of the mean ratios of GSDMB-CT (Fig. 6C) and I3 (Fig. 6D) to β -actin revealed that DMF treatment significantly reduced the immunoreactivity of both proteins compared to MMF or untreated MPXV-infected astrocytes.

Discussion

This study reports MPXV cell tropism in primary human neural cells, revealing that both MPXV and VACV, two orthopoxviruses, can productively infect and replicate in human astrocytes. Of note, both viruses were able to infect and induce innate immune responses in astrocytes. MPXV infection selectively caused PMR resulting in cell death that was associated with activation of caspase-1 and the cleavage of GSDMB for which both the corresponding N- and C-GSDMB fragments were detected. Moreover, caspase-3 was also activated by MPXV infection that was accompanied by reduced immunoreactive bands by immunoblotting for GFAP, an established substrate for caspase-3 and an essential structural protein in astrocytes (as summarized in Fig. 7). DMF treatment reduced GSDMB cleavage and associated pyroptosis in MPXV-infected astrocytes. These studies highlight the ability of MPXV to cause inflammatory regulated cell death in human astrocytes, which could contribute to the development of neurological disorders among persons with MPXV infection.

MPXV's capacity to infect astrocytes productively complemented both earlier (33) and current results in which VACV was also found to infect astrocytes. Host restriction factors were measured in astrocytes and microglia including *ISG15*, *IFITM1*, *OAS1*, *BST2*, *GBP2*, *MX2*, and *TRIM5A* (SI Appendix, Fig. S7). Significantly increased

expression of several restriction factors in microglia, compared to astrocytes, might have influenced the differential susceptibility of each neural cell type to MPXV and VACV infections. In contrast to the present MPXV observations, VACV has been reported to infect ODCs (34), microglia (33), and neurons (35), although these latter studies were performed in murine and immortalized human cells. Nonetheless, direct infection of the CNS by MPXV has also been shown in several clinical studies (8, 36). Importantly, MPXV infection resulted in a dysmorphic appearance of infected astrocytes that was associated with the degradation of GFAP (Fig. 3). Given that astrocytes represent the most abundant cell type in the CNS, their infection by MPXV is likely to cause disease, possibly by an inflammatory mechanism, since both MPXV and VACV infections

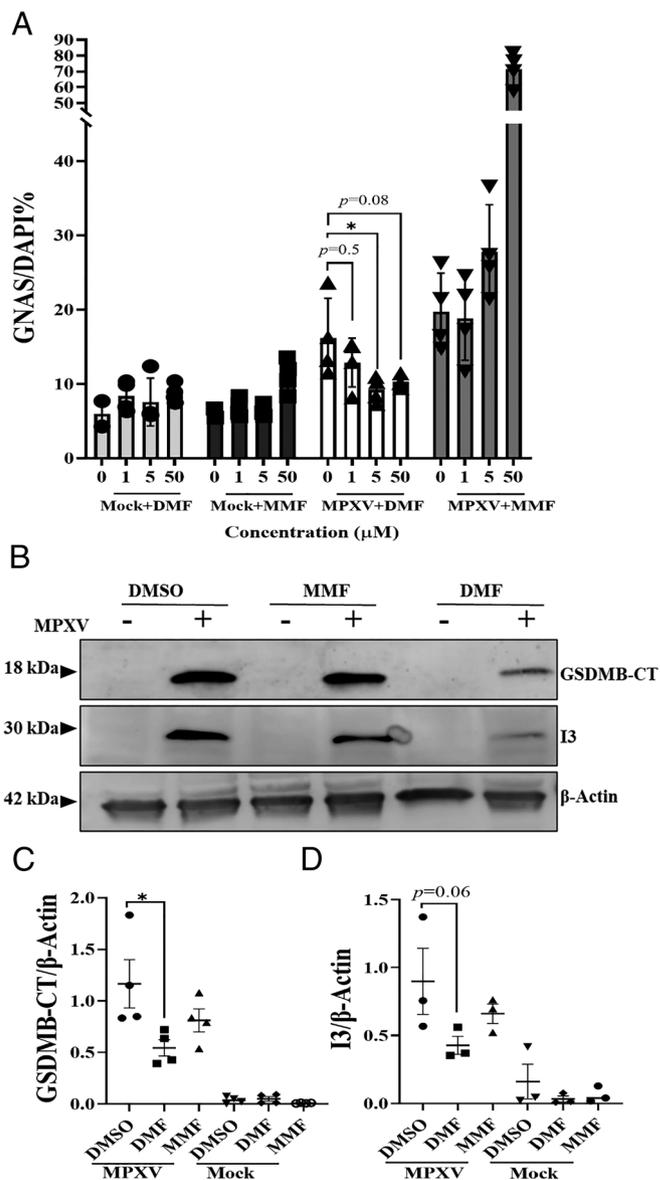


Fig. 6. DMF treatment reduces MPXV-induced PMR, GSDMB cleavage, and I3 expression. (A) Cell death was quantified fluorometrically for DMF, MMF, and DMSO-treated astrocytes after 24 hpi by GNAS detection ($n = 4$). Data were statistically analyzed using one-way ANOVA (means \pm SEM) (* $P < 0.05$). (B) Human astrocytes were pre-treated with or without DMF (50 μ M), MMF (50 μ M), or dimethyl sulfoxide (DMSO) for 1 h, followed by MPXV infection for 24 hpi. Cell lysates were harvested and immunoblotted for the GSDMB-CT, I3 as well as β -actin. (C and D) The relative levels of GSDMB-CT ($n = 4$) and I3 ($n = 3$) compared to β -actin from different experiments were plotted and analyzed by one-way ANOVA (means \pm SEM).

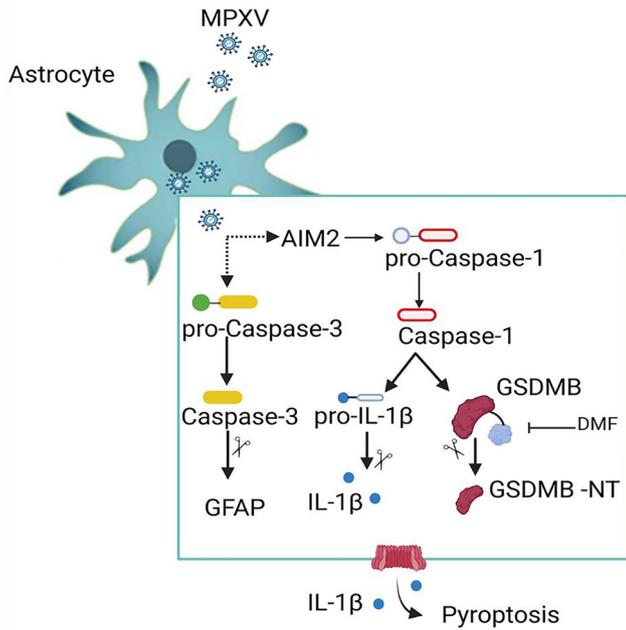


Fig. 7. MPXV infection of astrocytes and subsequent activation of the inflammasome/pyroptosis cascade. MPXV productively infects human astrocytes causing changes in cell morphology and eventual cell death. MPXV infections activated robust immune responses in human astrocytes including pro-caspase-1 cleavage. Active caspase-1 cleaves GSDMB protein at Lys²³⁶ liberating the cytotoxic NT to form pores in the plasma membrane, permitting extravasation of cell contents including mature IL-1 β and eventual cell lysis. Of note, while GZMA is known to cleave GSDMB, its presence was not detected in astrocytes. MPXV infection also induces caspase-3 activation that is followed by GFAP degradation and ensuing astrocyte morphological changes (created with BioRender.com).

can induce pro-inflammatory responses including increase of inflammasome-associated gene transcripts (*SI Appendix, Fig. S2*). The gasdermins represent a host evolutionary strategy to limit viral infections since they directly contribute to cell death upon activation and cleavage. Thus, the cytotoxic pore formation by cleaved gasdermins causes PMR, resulting in cell death, which eliminates the reservoir of productive infection. Indeed, plasma cell membrane pore formation facilitates the release of DAMPs (e.g., HMGB1, ATP, LDH) as well as inflammatory cytokines.

GSDMB is unique among the gasdermins because it is not found in rodents although it is well described in the setting of (human) cancer as a potential executor of cell death (37). Interestingly, unlike MPXV, VACV encodes a FL gasdermin-like homolog (OPG177/A47) while at the same time has the capacity to induce inflammasome activity (38). Of note, VACV replication and spread in keratinocytes is limited by rapid programmed cell death involving STAT3 (39) and possibly its expression of a type I interferon decoy receptor (40). Other gasdermins appear to facilitate viral infection; for example, Japanese Encephalitis virus infection is promoted by gasdermin D via a pathway involving BCL2 antagonist/killer (BAK)-mediated pyroptosis (41). The present data indicate that caspase-1 was responsible for cleaving the isoform 3 of GSDMB (*SI Appendix, Fig. S6A*), based on the molecular weights of the immunoreactive cleaved products (Fig. 4) as well as the inhibitory effect of the caspase-1 siRNA on GSDMB cleavage (Fig. 5). Nonetheless, GZMA also cleaves GSDMB (42); while constitutive GZMA expression was not detected in human astrocytes by western blot (*SI Appendix, Fig. S6B*), following transfection of astrocytes by a *GZMA*-encoding plasmid, GSDMB cleavage products were evident on western blot. Nonetheless, the present proteomics data did not suggest that MPXV encodes a

protease that cleaves GSDMB despite the recent report indicating that poxviruses can encode proteins that influence inflammasome activity (38).

Despite the availability of several compounds for the treatment of MPXV infection, including tecovirimat, and brincidofovir (43), there is an ongoing need to develop new therapies. In the present study, DMF was found to prevent GSDMB cleavage as well as reduce MPXV I3 protein expression in astrocytes, which was accompanied by reduced cell death, as measured by GNAS (Fig. 6A). While the mechanism by which DMF inhibited GSDMB cleavage is uncertain, its established activity against both gasdermin D and E has been described, by binding to specific residues on each protein precluding caspase cleavage and ensuing plasma membrane pore formation (32). Herein, at a nontoxic concentration (50 μ M), it exerted inhibitory effects on GSDMB cleavage while also reducing MPXV I3 immunoreactivity on immunoblot. We speculate that DMF might reduce cell-to-cell transmission resulting in diminished I3 immunoreactivity on western blots of cell lysates (Fig. 6B). Given that DMF is well tolerated and crosses the BBB (44), it might represent an additional therapeutic option for MPXV brain infections although it is also known to affect diverse cellular pathways (45).

The present study faced several challenges, including the absence of an in vivo model to extend the present observations beyond in vitro human primary cells; the use of a nonhuman primate would be optimal for such studies, given that rodents lack GSDMB. Another issue was the properties of different VACV or MPXV strains in terms of both neurotropism and effects on inflammasome activation. This issue requires further analysis as it may be a key determinant of both tropism and virulence, as already proposed for VACV (46). Finally, the lack of clinically derived human nervous system (biopsied or autopsied) tissues from MPXV-infected persons with neurological disease is a limitation that could be partially mitigated by a suitable animal model (12) or, to some extent, ex vivo experiments. Confirming the specific in vivo neural cell-type tropism of MPXV and determining the effect on uninfected bystander cells would advance the field in terms of understanding the underlying neuropathogenesis of MPXV while directing the development of specific therapies that might be affected by the infected cell type. Nonetheless, the present study highlights the potential neural cell tropism (47) and neurovirulent mechanisms of MPXV and set the stage for further studies of its pathogenesis, replication mechanisms, and treatment of MPXV nervous system infections.

Materials and Methods

Cell Lines and Cultures. Primary fetal human astrocytes, microglia, and neurons were isolated from 15- to 20-wk-old electively terminated pregnancies with written informed consent. The study was approved by the University of Alberta Human Research Ethics Board (Biomedical). The cells were prepared as previously reported (48, 49) (*SI Appendix, Supplementary Materials and Methods*). Human MO3.13 cells (ODC cell line) were cultured in high glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), supplemented with fetal bovine serum (FBS) (10%) and penicillin (100 U/mL). Cells were differentiated for 5 d using DMEM supplemented with phorbol 12-myristate 13-acetate (100 nM) and penicillin (100 U/mL).

Viral Infections. All studies with MPXV infection were conducted in biosafety level 3 conditions at the University of Alberta while VACV infections were performed in a biosafety level 2 laboratory, according to the guidelines approved by the Institutional Biosafety Committee. The MPXV (Clade IIb, lineage B.1.4) was isolated from a patient in Canada during the 2022 MPXV outbreak. The initial isolation of MPXV was done with BSC-40 cells and both stocks of MPXV and ACAM (Acambis 2000) were prepared with BSC-40 cells. The sequence has been

deposited in GenBank (access# OP586622.1). For all experiments using primary human neural cells (1×10^6 cells/well), cultured cells were infected at MOIs ranging from 0.01 to 10 (as indicated) with MPXV or VACV in DMEM media with no FBS for 1 h at 37 °C, following which media was changed and incubated for the duration of the experiment. Infected cell monolayers were scraped into the media at indicated times, followed by 3 × freeze-thaws to release viruses.

Plaque Assay. The MPXV and VACV infectious progeny released from neural cells were determined by plaque assay in BSC-40 (ATCC #CRL-2761). Cells were cultured in complete minimal essential media supplemented with antibiotics, L-glutamine, non-essential amino acids, sodium pyruvate, and 5% FBS (Gibco). BSC-40 cells were seeded into 12-well plates 1 d prior to titration. Serial dilutions of each virus were plated in triplicate on BSC-40 cells for 1 h in serum-free MEM at 37 °C with rocking. Virus inoculum was replaced with complete MEM containing 1% carboxymethylcellulose (Sigma). At 2 d post-infection, the cultured cells were fixed and stained with a solution containing 0.13% (w/v) crystal violet, 11% formaldehyde (v/v), and 5% ethanol (v/v) to visualize plaque formation. Virus titers were determined as the number of plaque-forming units per mL.

LDH Assay. Cell death and cell viability were determined using the LDH-Cytotoxicity Assay Kit II (Cat # ab65393, Abcam) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cell culture supernatants were cleared of cells by spinning 96-well plates at 400 × g for 5 min. Supernatants were assayed for LDH release 24 hpi. Measurements for absorbance readings were performed on a Tecan plate reader at wavelengths of 450 nm and 650 nm as the reference wavelength.

GNAS. The cytotoxicity induced by MPXV or VACV infections in cultured astrocytes was determined by measuring GNAS fluorescence (SYTOX™, Cat. # S7020; Thermo Fisher Scientific). Astrocytes were seeded on 96-well plates with black wells and a clear bottom and then treated with MPXV or VACV (MOI = 10). At 24 hpi, the medium was removed from the wells and cells were fixed with 4% paraformaldehyde. Cells were treated with the 100 μL cell-impermeable nuclear stain GNAS (167 nM) for 10 to 15 min at 15 to 25 °C. In parallel, cells DAPI staining was used for nuclear staining. Cells were imaged using a high-content analysis system (MetaXpress XLS, Molecular Devices). Cells labeled by GNAS were considered dead. Penetration efficiency was

calculated by dividing the number of cells that show GNAS labeling by the total number of cells present (DAPI-stained cells, ×20 images).

Immunoblot Analysis. Immunoblot analysis of cell lysates was performed as described previously (48) (*SI Appendix, Supplementary Materials and Methods*). All antibodies for immunoblotting are listed in *SI Appendix, Table S2*.

Droplet Digital PCR (ddPCR). Viral quantitation by ddPCR was performed on a digital PCR system (BioRad) and analyzed with Quantasoft (1863024, 1864035, 1864001; BioRad). DNA was isolated from 400 μL of medium collected from MPXV, VACV, and mock-infected astrocytes (MOI = 10, 24 hpi) using PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Cat. # 12280050, Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. To calculate the number of virus genome copies per microgram of DNA, droplet numbers were first converted to the corresponding amount of DNA (5 μL used out of 30 μL prepared) and then to the amount of DNA generated from 400 μL of medium. This number was then used in future calculations to arrive at the final concentration of MPXV and VACV copies/mL of supernatant. Each PCR used 100 ng of DNA and two OPG071 (E9 DNA polymerase) primers (5' CTCTGCTCCATTAGTACCGAATC 3' and 5' TACTCATACGCTCGCTAAGA 3') plus a double-quenched probe purchased from Integrated DNA Technologies (IDT) (5' /56-FAM/AGATCATTC/ZEN/TACGCTCTATGGATGTGCAAC/ 3IABkFQ/ 3').

Data, Materials, and Software Availability. All data are included in the manuscript and/or *SI Appendix*.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank the members of BrainPowerLab for helpful discussions and suggestions. H.M.M. is supported by a CIHR-CTN fellowship. N.M.A. is supported by the NIH (AI083359) and the Welch Foundation (I-1704). The Canadian Institutes of Health Research (R.S.N., D.H.E., and C.P.) and the Henri M. Toupin Chair in Neurocognitive Disorders (C.P.) supported these studies.

Author affiliations: ^aDepartment of Medicine, University of Alberta, Edmonton, AB T5N 2S2, Canada; ^bDepartment of Medical Microbiology & Immunology, University of Alberta, Edmonton, AB T5N 2S2, Canada; ^cDepartment of Biochemistry, University of Alberta, Edmonton, AB T5N 2S2, Canada; ^dDepartment of Microbiology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX 75390-8816; and ^eLi Ka Shing Institute of Virology, University of Alberta, Edmonton, AB T5N 2S2, Canada

1. M. Hraib, S. Jouni, M. M. Albitar, S. Alaidi, Z. Alshehabi, The outbreak of monkeypox 2022: An overview. *Ann. Med. Surg. (Lond.)* **79**, 104069 (2022).
2. J. Guarner *et al.*, Monkeypox transmission and pathogenesis in prairie dogs. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 426–431 (2004).
3. J. G. Breman *et al.*, Human monkeypox, 1970–79. *Bull. World Health Organ* **58**, 165–182 (1980).
4. A. Sephehrinezhad, R. Ashayeri Ahmadasad, S. Sahab-Negah, Monkeypox virus from neurological complications to neuroinvasive properties: Current status and future perspectives. *J. Neurol.* **270**, 101–108 (2023).
5. Z. Jezek, M. Szczeniowski, K. M. Paluku, M. Mutombo, Human monkeypox: Clinical features of 282 patients. *J. Infect. Dis.* **156**, 293–298 (1987).
6. D. Ogoina *et al.*, Clinical course and outcome of human monkeypox in Nigeria. *Clin. Infect. Dis.* **71**, e210–e214 (2020).
7. G. D. Huhn *et al.*, Clinical characteristics of human monkeypox, and risk factors for severe disease. *Clin. Infect. Dis.* **41**, 1742–1751 (2005).
8. J. J. Sejvar *et al.*, Human monkeypox infection: A family cluster in the midwestern United States. *J. Infect. Dis.* **190**, 1833–1840 (2004).
9. D. M. Pastula *et al.*, Two cases of monkeypox-associated encephalomyelitis—Colorado and the District of Columbia, July–August 2022. *MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.* **71**, 1212–1215 (2022).
10. E. Bozzola *et al.*, Acute cerebellitis in varicella: A ten year case series and systematic review of the literature. *Ital. J. Pediatr.* **40**, 57 (2014).
11. K. M. Money *et al.*, Monkeypox-associated central nervous system disease: A case series and review. *Ann. Neurol.* **93**, 893–905 (2023).
12. E. A. Falendysz, J. G. Lopera, T. E. Roche, J. E. Osorio, Monkeypox virus in animals: Current knowledge of viral transmission and pathogenesis in wild animal reservoirs and captive animal models. *Viruses* **15**, 905 (2023).
13. J. L. Chapman, D. K. Nichols, M. J. Martinez, J. W. Raymond, Animal models of orthopoxvirus infection. *Vet. Pathol.* **47**, 852–870 (2010).
14. D. A. Kulesh *et al.*, Monkeypox virus detection in rodents using real-time 3'-minor groove binder TaqMan assays on the Roche LightCycler. *Lab Invest.* **84**, 1200–1208 (2004).
15. C. L. Hutson *et al.*, Monkeypox zoonotic associations: Insights from laboratory evaluation of animals associated with the multi-state US outbreak. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **76**, 757–768 (2007).
16. D. M. Pastula, K. L. Tyler, An overview of monkeypox virus and its neuroinvasive potential. *Ann. Neurol.* **92**, 527–531 (2022).
17. P. L. Earl, J. L. Americo, C. A. Cotter, B. Moss, Comparative live bioluminescence imaging of monkeypox virus dissemination in a wild-derived inbred mouse (*Mus musculus castaneus*) and outbred African dormouse (*Graphiurus kelleni*). *Virology* **475**, 150–158 (2015).
18. E. A. Falendysz *et al.*, Characterization of Monkeypox virus infection in African rope squirrels (*Funisciurus* sp.). *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, e0005809 (2017).
19. S. Y. Xiao *et al.*, Experimental infection of prairie dogs with monkeypox virus. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 539–545 (2005).
20. T. Chailangkarn *et al.*, Monkeypox virus productively infects human induced pluripotent stem cell-derived astrocytes and neural progenitor cells. *J. Infect.* **85**, 702–769 (2022).
21. L. Bauer *et al.*, Dissecting the neurotropism and neurovirulence of MPXV using human stem cell-based models. *bioRxiv* [Preprint] (2023). <https://doi.org/10.1101/2023.08.25.554849> (Accessed 29 August 2023).
22. D. B. Nichols, W. De Martini, J. Cottrell, Poxviruses utilize multiple strategies to inhibit apoptosis. *Viruses* **9**, 215 (2017).
23. C. D. Suraweera, M. G. Hinds, M. Kvasakul, Poxviral strategies to overcome host cell apoptosis. *Pathogens* **10**, 6 (2020).
24. G. Yan, M. Elbadawi, T. Efferth, Multiple cell death modalities and their key features (Review). *World Acad. Sci. J.* **2**, 39–48 (2020).
25. B. A. McKenzie, V. M. Dixit, C. Power, Fierly cell death: Pyroptosis in the central nervous system. *Trends Neurosci.* **43**, 55–73 (2020).
26. M. Tamura *et al.*, Members of a novel gene family, Gsdm, are expressed exclusively in the epithelium of the skin and gastrointestinal tract in a highly tissue-specific manner. *Genomics* **89**, 618–629 (2007).
27. K. Zamiri *et al.*, Therapy of autoimmune inflammation in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: Dimethyl fumarate and H-151 downregulate inflammatory cytokines in the cGAS-STING pathway. *FASEB J.* **37**, e23068 (2023).
28. B. K. Davis, H. Wen, J. P. Ting, The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 707–735 (2011).
29. R. Heilig *et al.*, Caspase-1 cleaves Bid to release mitochondrial SMAC and drive secondary necrosis in the absence of GSDMD. *Life Sci. Alliance* **3**, e202000735 (2020).
30. Z. Zhou *et al.*, Granzyme A from cytotoxic lymphocytes cleaves GSDMB to trigger pyroptosis in target cells. *Science* **368**, eaaz7548 (2020).
31. K. E. Carlstrom *et al.*, Therapeutic efficacy of dimethyl fumarate in relapsing-remitting multiple sclerosis associates with ROS pathway in monocytes. *Nat. Commun.* **10**, 3081 (2019).
32. F. Humphries *et al.*, Succination inactivates gasdermin D and blocks pyroptosis. *Science* **369**, 1633–1637 (2020).
33. C. Kober *et al.*, Microglia and astrocytes attenuate the replication of the oncolytic vaccinia virus LVP 1.1.1 in murine GL261 gliomas by acting as vaccinia virus traps. *J. Transl. Med.* **13**, 216 (2015).
34. C. F. Beranek, N. Herschkowitz, Metabolic studies on vaccinia-virus-infected oligodendrocytes in brain cell cultures. *Med. Microbiol. Immunol.* **173**, 95–103 (1984).
35. G. A. Allen, B. Denes, I. Fodor, M. De Leon, Vaccinia virus infection and gene transduction in cultured neurons. *Microbes Infect.* **7**, 1087–1096 (2005).

36. J. Cole *et al.*, Monkeypox encephalitis with transverse myelitis in a female patient. *Lancet Infect. Dis.* **23**, e115–e120 (2023).
37. X. Liu, S. Xia, Z. Zhang, H. Wu, J. Lieberman, Channelling inflammation: Gasdermins in physiology and disease. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **20**, 384–405 (2021).
38. I. N. Boys, A. G. Johnson, M. Quinlan, P. J. Kranzusch, N. C. Elde, Structural homology screens reveal poxvirus-encoded proteins impacting inflammasome-mediated defenses. *Cell Rep.* **42**, 112878 (2023).
39. Y. He *et al.*, Vaccinia virus induces rapid necrosis in keratinocytes by a STAT3-dependent mechanism. *PLoS One* **9**, e113690 (2014).
40. R. Liu *et al.*, Interferon alpha/beta decoy receptor encoded by a variant in the Dryvax Smallpox vaccine contributes to virulence and correlates with severe vaccine side effects. *mBio* **13**, e0010222 (2022).
41. W. Xu *et al.*, BAK-mediated pyroptosis promotes Japanese Encephalitis Virus proliferation in porcine kidney 15 cells. *Viruses* **15**, 974 (2023).
42. J. M. Hansen *et al.*, Pathogenic ubiquitination of GSDMB inhibits NK cell bactericidal functions. *Cell* **184**, 3178–3191.e18 (2021).
43. N. Ghosh *et al.*, Clinical strategies and therapeutics for human monkeypox virus: A revised perspective on recent outbreaks. *Viruses* **15**, 1533 (2023).
44. M. S. Brennan *et al.*, Pharmacodynamics of dimethyl fumarate are tissue specific and involve NRF2-dependent and -independent mechanisms. *Antioxid. Redox. Signal* **24**, 1058–1071 (2016).
45. P. Matteo *et al.*, New and old horizons for an ancient drug: Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical perspectives of dimethyl fumarate. *Pharmaceutics* **14**, 2732 (2022).
46. J. D. Osborne *et al.*, Genomic differences of Vaccinia virus clones from Dryvax smallpox vaccine: The Dryvax-like ACAM2000 and the mouse neurovirulent Clone-3. *Vaccine* **25**, 8807–8832 (2007).
47. C. F. Beranek, R. Schafer, L. Bologa, N. Herschkowitz, Viral tropisms in mouse brain cell cultures. *Med. Microbiol. Immunol.* **170**, 201–208 (1982).
48. A. Roczakowski *et al.*, Peroxisome injury in multiple sclerosis: Protective effects of 4-phenylbutyrate in CNS-associated macrophages. *J. Neurosci.* **42**, 7152–7165 (2022).
49. J. G. Walsh *et al.*, Rapid inflammasome activation in microglia contributes to brain disease in HIV/AIDS. *Retrovirology* **11**, 35 (2014).

Supporting Information for

Monkeypox virus infection of human astrocytes causes gasdermin B cleavage and pyroptosis

Hajar Miranzadeh Mahabadi¹, Y.C. James Lin², Natacha S. Ogando¹, Eman W. Moussa³, Nazanin Mohammadzadeh², Oliver Julien³, Neal M. Alto⁵, Ryan S. Noyce^{2,4}, David H. Evans^{2,4}, Christopher Power^{1,2*}

* Christopher Power

Email: chris.power@ualberta.ca

This PDF file includes:

Supporting text

Figures S1 to S7

Tables S1 to S3

SI References

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND FIGURE LEGENDS

Cell culture and transfection. As previously reported (1), the meninges were removed, and tissues were digested with 0.25% trypsin and 0.2 mg/mL DNase I (1 hr, 37°C) and passed through a 70 micron cell strainer to prepare a single cell suspension. Cells were washed twice with fresh medium and plated in T-75 flasks $6-8 \times 10^7$ cells/flask in MEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 1X MEM nonessential amino acids, 0.1% dextrose, 100 U/mL Penicillin, 0.5 µg/mL amphotericin B and 20 µg/mL gentamicin. Mixed cultures were maintained for 2 weeks at which neurons and astrocytes formed an adherent cell layer with microglia floating in the medium. Weakly adhering microglia were recovered by gently rocking the mixed cultures for 20 min, followed by cell decanting, washing and plating. Human fetal neurons were plated in plasticware coated with Poly-L-ornithine (Sigma) and cultured in neural basal medium containing 25.0 µM cytosine arabinoside (Gibco) and B-27 (Gibco, 2x) to prevent astrocytes and glia growth, respectively. Mature neurons were used within 2 weeks of culture. Astrocyte cultures were passaged at least once a week for 4-6 weeks to get pure mature astrocytes. The purity of these primary astrocyte cultures has been previously characterized (1, 2). The obtained cells were then plated in 6-well plates at 1×10^6 cells/well.

To express GZMA in human astrocytes, cells were seeded in 6-well plates (1×10^6 /well) and transfected with human GZMA plasmid (Cat # RC204852L4, Origene) or empty vectors using TurboFectin 8.0 (Cat # TF81001, Origene) reagent according to the manufacturer's instructions. After 48 hr of transfection, cells were lysed and GZMA expression analyzed by western blotting.

Heat inactivation (HI) of MPXV. Stock virus lysates were aliquoted into 1.5 ml screw cap tubes and incubated in a 75°C heat block for 30 min in biosafety level 3 conditions lab and culture cells were treated for one hour at MOI 10 at 37°C, following which media was changed and incubated for 24 hr. The treated cell monolayers were scraped in RIPA buffer (Cat. # 89900; Thermo Scientific) and subjected to immunoblotting. Heat inactivation of infectious viral particles was confirmed by plaque assay in BSC-40 cells.

Cell culture immunofluorescence. Detection of cellular proteins was performed using immunofluorescence assay as described previously (1). Cells were cultured on 8 well-chamber µ-slides (ibidi, Germany) and fixed with 4% formaldehyde in PBS for 30 min. Cells were permeabilized using 0.2% X-100 in PBS for 10 min, blocked using goat serum 10% in PBS for 2 hr, and incubated with primary antibody overnight at 4°C (see Table S2). After overnight incubation, cells were washed with PBS/0.1 Tween 20 and primary antibody binding was detected using species-matched secondary antibodies. Nuclei were stained with 49,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 15 min. Images were captured using a LSM700 confocal microscope (Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY, USA).

Real-time PCR. Host gene expression was measured by real-time qPCR (Table S1). Total RNA from cultured cells were isolated using TRIzol reagent (Cat. # 15596018; Invitrogen) and the RNeasy purification kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 1 µg of total cellular RNA using random oligonucleotide primers with Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) at 50°C for 90 min according to the manufacturer's instructions. All cDNA samples were diluted 1:3 (adding 100 µl of ultrapure water to 50 µl of cDNA) and analyzed by using the CFX 96 real-time system (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). Threshold cycle values for each gene were normalized to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and are represented as average relative fold change compared with uninfected controls. 10 µl of PCR products of GSDMB with exon 4/5 and 6/7 were run on a 1.5% agarose gel impregnated with 4 µg/ml ethidium bromide for approximately 1 hr at 100V in TBE and visualized using an image quant 300 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) gel dock.

Immunoblot. Following protein extraction using RIPA buffer samples were quantified using a DC protein assay kit (Cat. # 5000112; Bio-Rad) and then treated with Laemmli buffer (Cat.# 161-0747; Bio-Rad) and incubated at 95°C for 15 min. Samples were loaded onto 4 to 20% pre-cast SDS-PAGE gels (Cat.# 456-1094; Bio-Rad) and run for 75 min at 100 to 120 V. Following electrophoresis, gels were transferred onto 0.2-µm nitrocellulose (Cat.# 1620112; Bio-Rad) membranes using a Bio-Rad Mini Trans-Blot wet transfer system for 1 hr at 0.14 A. Membranes were blocked for 1 hr with 5% (w/v) bovine serum albumin (BSA) followed by overnight incubation at room temperature with primary antibody (Table S2). Membranes were then washed 3 times for 5 min each time with Tris-buffered saline (TBS) TBS-T (1X TBS-0.05% Tween 20) and incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody for 1 hr, followed by 3 × 15-min washes. Membranes were developed with ECL reagent (Cat.# 32132;

Thermo Scientific) and imaged using an ImageQuant LAS4000 Biomolecular Imager (GE Life Sciences). Band intensity was quantified using ImageJ software and normalized to β -actin.

siRNA knockdown. Astrocytes were plated at 6-well plates at 1×10^6 cells/well for 24 hr prior to transfection. Cells were transfected with a cocktail of three pre-designed commercially available Dicer-Substrate siRNAs (TriFECTa siRNA Kit, IDT) (Table S3) targeting the transcript of interest (10.0 nM for each siRNA) in combination with TransIT-X2 transfection reagent (Cat.# MIR 5500, Mirus Bio) according to the manufacturer's instructions. Cells were permitted to recover for 48 hr prior to MPXV infection.

Mass spectrometry sample preparation and analysis. Samples were prepared using the ProTrapXG column (Proteoform Scientific Inc.) for sodium dodecyl sulphate (SDS) clean-up and trypsin digestion. Cell lysates (~20 μ g) for each of MPXV, VACV and mock (n=3) were loaded onto a filtration cartridge containing 400 μ l of acetone, gently mixed and incubated for 30 minutes to allow the proteins to aggregate. The columns were centrifuged at 2500g for 2 minutes to pellet the protein aggregates and then centrifuged at 400g for 5 minutes to discard the supernatant. The pellets were washed with 400 μ l of acetone and centrifuged again to discard the wash solvent. The proteins were then resolubilized in 8 M urea, vortexed, sonicated, left at room temperature for 30 minutes, followed by addition of 100 mM Tris (pH=8). The reduction was conducted with 10 mM dithiothreitol (DTT) at 37°C for 30 minutes followed by alkylation with 20 mM iodoacetamide for 1.5 hours in the dark. Trypsin (#V113, Promega) was added in a 50:1 ratio (protein:trypsin) and incubated overnight with rotation. The peptides were recovered by centrifugation at 2500g for 5 minutes and the reaction was stopped by the addition of trifluoroacetic acid (TFA) to a final concentration of 1% and incubated for 10 minutes. The peptide mixture was centrifuged at 13000g for 10 minutes and the supernatant was collected. Peptide clean-up and desalting was conducted on the ProTrap XG SPE cartridge as per manufacturer's recommendation. The peptide mixture was lyophilized overnight. The samples were resuspended in 0.1% formic acid for LC-MS/MS analysis. Peptide separation was conducted using a nanoflow-HPLC (Thermo Scientific EASY-nLC 1200 System) coupled to Orbitrap Fusion Lumos Tribrid Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc.). The peptide mixture underwent reverse phase separation on an analytical column (Aurora Ultimate nanoflow UHPLC column 25 cm x 75 μ m ID, 1.7 μ m C18, 120 Å; IonOpticks Inc.). Peptides were eluted over a 120 min linear gradient from 0% to 36.8% acetonitrile in 0.1% formic acid. Data analysis was conducted using ProteomeDiscoverer (v2.4.1.15) software against a homo sapiens proteome reference (Proteome ID UP000005640, download date: 2020/02/18). The search parameter included a maximum of three missed trypsin cleavages, a precursor mass tolerance of 15 ppm, a fragment mass tolerance of 0.8 Da, carbamidomethylation of Cys (static modification), and oxidation of Met and deamidation of Asn and Gln (dynamic modifications). A decoy database search was conducted to evaluate the false-positive rates. The strict target false discovery rate was set at 0.01 and the relaxed false discovery rate was set at 0.05. Results reported include only the proteins identified at medium and high confidence, were identified by two or more peptides, were identified in two or more biological replicates, and were identified as master proteins (the top-ranking protein of a group). Proteins with a p-value less than 0.05 and a fold change threshold of two were identified as increased or decreased. Additionally, the data AY313 were compared against an MPXV (USA 2022 MA001) (ON563414) and VACV (ACAM2000) (AY313847) proteome of reference (Genbank, obtained 2023/04/04) as described previously (3, 4). MS data is available through MassIVE (MSV000092229).

Figures

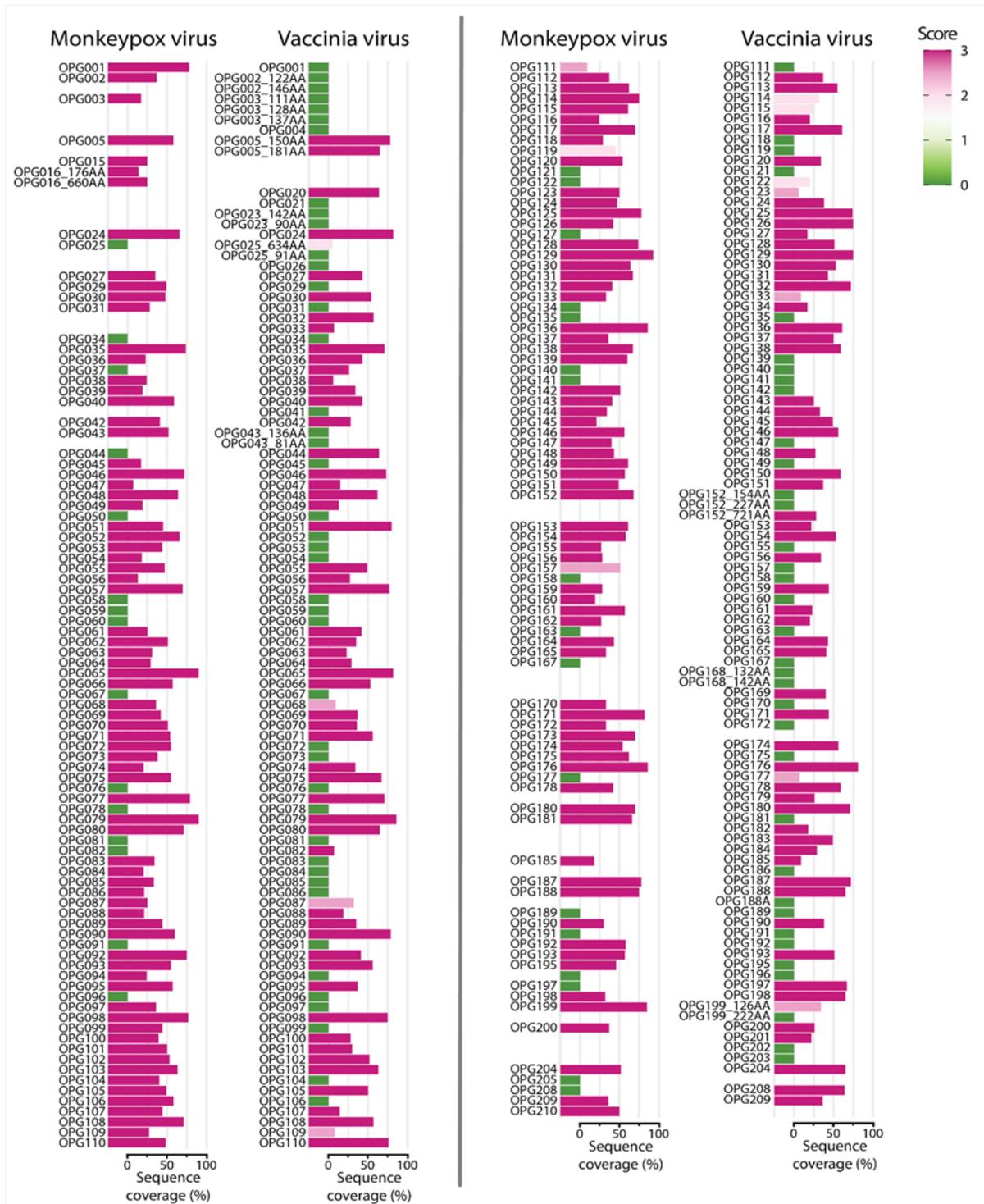


Figure S1. Identification of viral proteins by LC-MS/MS. Protein lysates were harvested at 6 hpi from infected astrocytes and processed for mass spectrometry. The results represent the average of triplicates. A diverse array of proteins encoded by poxviruses were detected in the mass spectrometry analyses. Length of columns represents the coverage of the amino acid sequence detected by percentage.

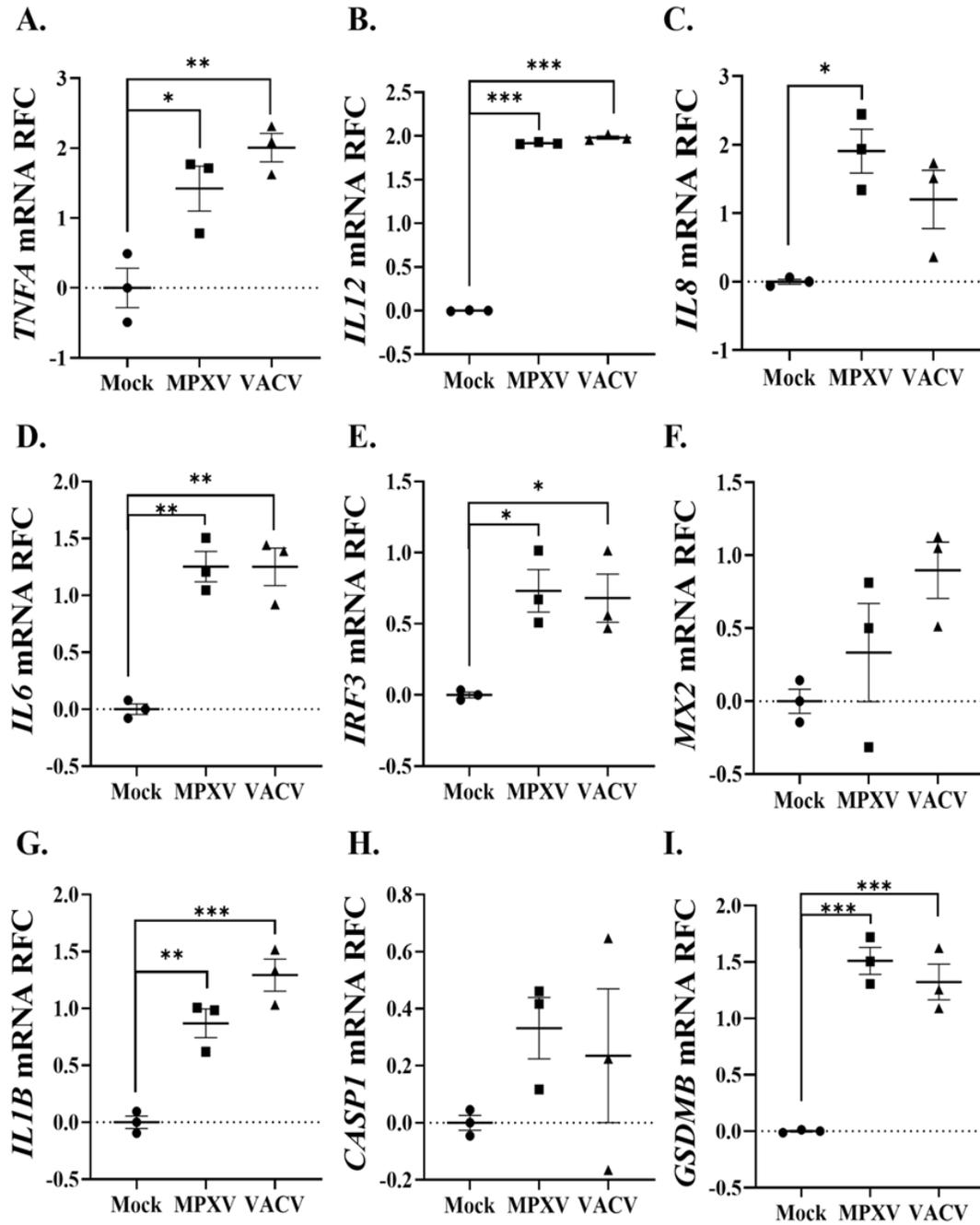


Figure S2. Altered transcription of innate host immune response genes are observed following MPXV and VACV infection of human astrocytes. Astrocytes were infected with MPXV and VACV (MOI 10) or left uninfected, and cell lysate were harvested for RNA isolation after 24 hpi (n=3). Selected antiviral type 1 interferon-related transcripts and inflammasome activated pathways, including *IL12* (A), *IL8* (B), *TNFA* (C), *IL6* (D), *IRF3* (E), *MX2* (F), *IL1B* (G), *CASP1* (H) and *GSDMB* (I), were detected by qPCR and quantified in relative fold change (RFC). Data were statistically analyzed using one-way ANOVA (means \pm SEM). (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

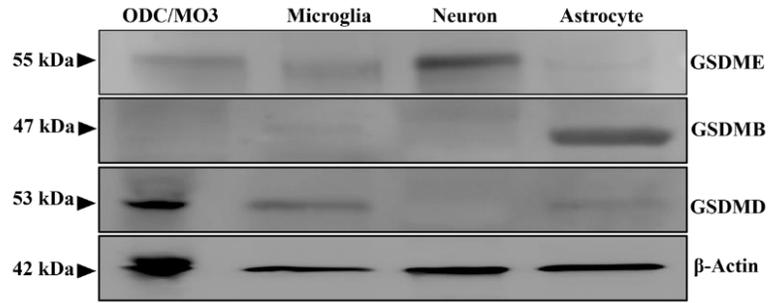


Figure S3. Comparative expression of different gasdermins in human neural cells. 40 μ g of protein lysate from human astrocytes, neurons, microglia and oligodendrocytes (MO3.13) were loaded in a gel and analyzed by western blotting to show the level of GSDME, GSDMB and GSDMD protein abundance.

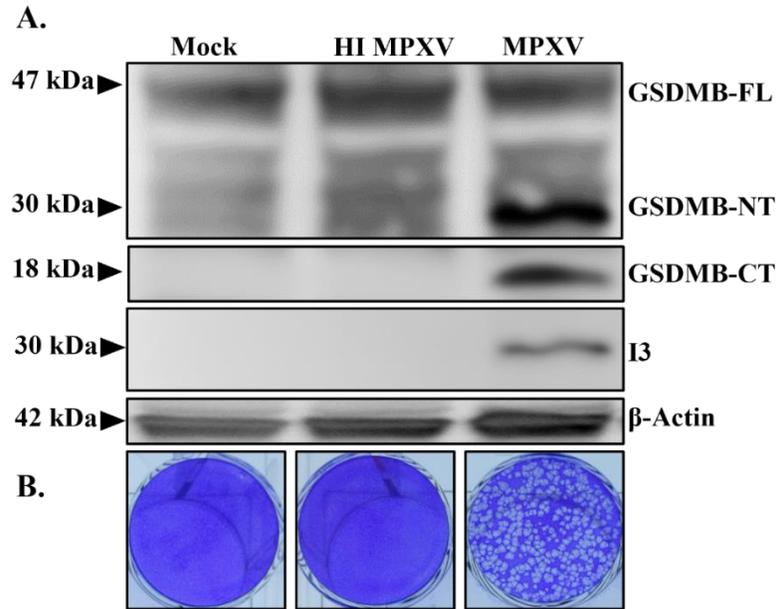


Figure S4. Effect of heat inactivation (HI) on the infectivity of MPXV. A) Human astrocytes were infected with HI or non-inactivated MPXV at an MOI 10 for 24 hr. Cell lysates were harvested for immunoblotting for GSDMB-FL, GSDMB-NT, GSDMB-CT, I3 and β -actin. B) Number of infectious particles in Mock, HI MPXV and MPXV was determined by plaque assay in BSC-40 cells. The images presented correspond to 1:10 dilution for Mock and HIMPXV, and 1:10E06 dilution of MPXV supernatants.

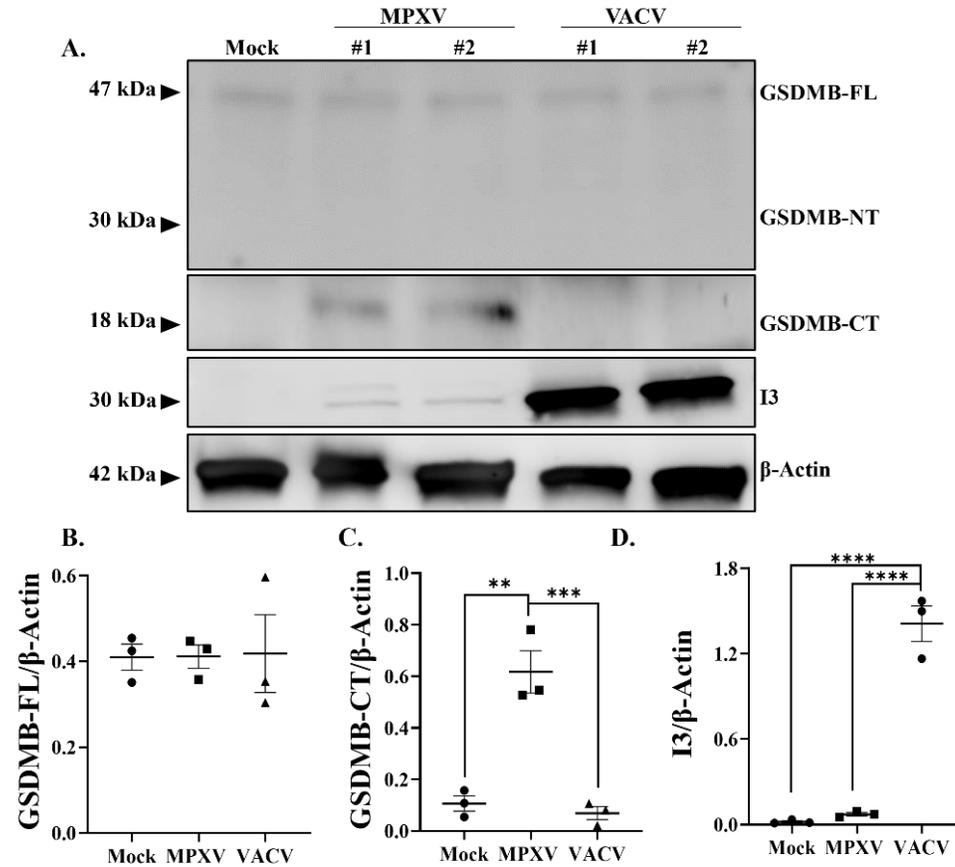


Figure S5. MPXV infection of primary human microglia. Cell lysates were harvested 24 hpi and immunoblotted for GSDMB-FL, GSDMB-NT, GSDMB-CT, I3 as well as β -actin. GSDMB-FL (B), GSDMB-CT (C) and I3 (D) band intensity was quantified by ImageJ and normalized to β -actin. Data were statistically analyzed using one-way ANOVA (means \pm SEM) (n=3 different experiments). (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$).

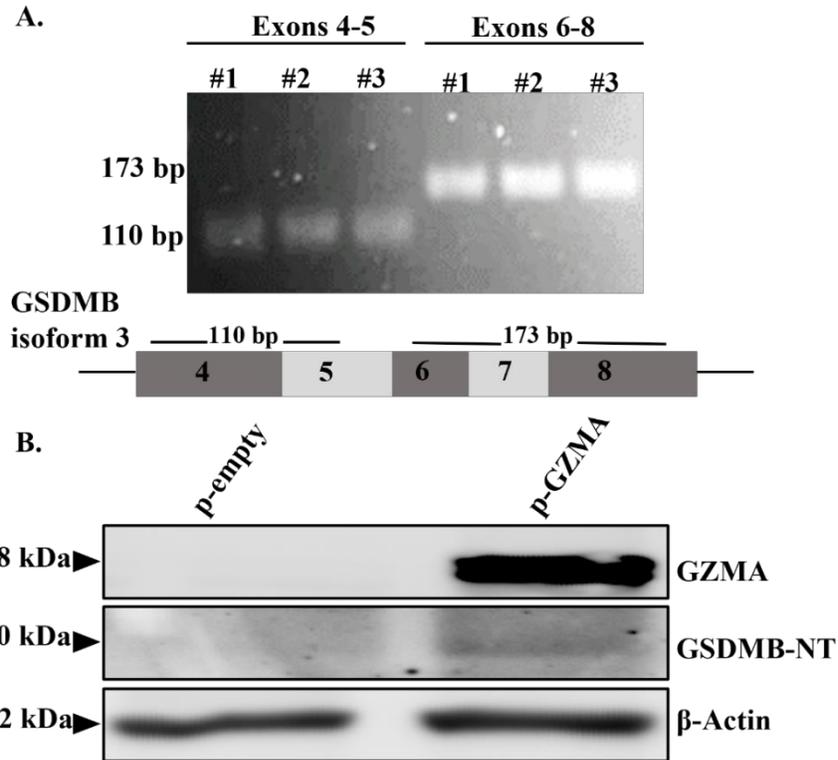


Figure S6. Human astrocytes express the GSDMB isoform 3, enabling cleavage by caspase-1. A) Agarose gel (2%) shows the amplification products of RT-PCR using primers encompassing exons 6-8 (173 bp) and exons 4-5 (110 bp) (n=3 different experiment). GSDMB variants encode five isoforms: isoform 3 of GSDMB contains exons 6 and 7, whereas isoform 2 lacks both exons 6 and 7; isoform 4 and isoform 1 have only exon-6- and exon-7-derived sequences, respectively (5). Astrocytes express Isoform 3 of GSDMB containing the exons 6 and 7. (B) Human astrocytes express GZMA after transfection with a GZMA-encoding plasmid (p-GZMA), but not constitutively. Western blotting analysis of the protein expression levels in astrocytes transfected with GZMA or empty plasmids after 48 hr of transfection probed for GZMA, GSDMB-NT and β -actin.

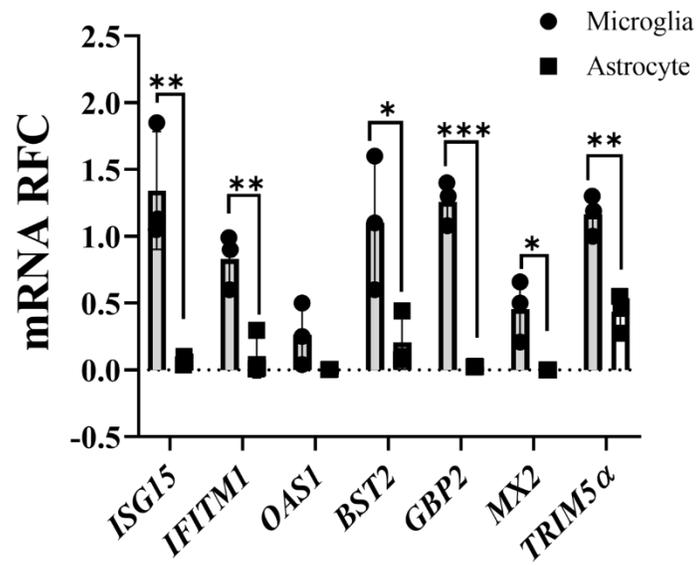


Figure S7. Differential host restriction factor mRNA expression in primary human microglia compared to primary human astrocytes. Expression levels of seven interferon-stimulated host restriction factor genes were measured in microglia compared to astrocytes in three age-matched donors. The mRNA expression levels are normalized to GAPDH and are reported as fold change in human microglia relative to astrocytes. The results are presented as means \pm SEM (n=3). The data were analyzed by t test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Tables

Table S1: Oligonucleotide primers used for qPCR of human cells

Primers targeted gene	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')
<i>GAPDH</i>	5'-AGC CTT CTC CAT GGT GAA GAC-3'	5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG -3'
<i>GSDMB-exon 4/5</i>	5'-AAA GCG ACC GGC AAT ATA AA-3'	5'-CAA ATC GGG TCC TGA GCT AT-3'
<i>CASP1</i>	5'-TCC AAT AAT GGA CAA GTC AAG CC-3'	5'-GCT GTA CCC CAG ATT TTG TAG CA-3'
<i>TNFA</i>	5'-CCC AGG GAC CTC TCT CTA ATC-3'	5'-GCT ACA GGC TTG TCA CTC GG-3'
<i>IL12</i>	5'-GAG AAA TGG TGG TCC TCA CCT GTG-3'	5'-GAG TGT AGC AGC TCC GCA CGT C-3'
<i>IL8</i>	5'-CAC CGG AAG GAA CCA TCT CAC-3'	5'-TGG TCC ACT CTC AAT CAC TCT CAG-3'
<i>IL6</i>	5'-AGT GAG GAA CAA GCC AGA GC-3'	5'-ATT TGT GGT TGG GTC AGG GC-3'
<i>IRF-3</i>	5'-ACC AGC CGT GGA CCA AGA G-3'	5'-TAC CAA GGC CCT GAG GCA C-3'
<i>IL-1β</i>	5'-CCA AAG AAG AAG ATG GAA AAG C-3'	5'-GGT GCT GAT GTA CCA GTT GGG-3'
<i>MX2</i>	5'-AGC AGG AGA TCA CAA ACA GG-3'	5'-GGT AAG TCT TTC TGC CAG TCG-3'
<i>GSDMB-exon 6/8</i>	5'-CAG GGG CAA AAC AAA ATC C-3'	5'-AGC GAG GGA GTT TAG CAC ATC-3'
<i>TRIM5α</i>	5'-CTG GAG ATG CTG AGG CAG AAG C-3'	5'-GTCCAGGATGTCTCTCAGTTGC-3'
<i>OAS1</i>	5'-ATG ATG GAT CTC AGA AAT ACC C-3'	5'-TCA GGA ACC CAC AGA TGA-3'
<i>GBP2</i>	5'-ATG GCT CCA GAG ATC AAC TTG C-3'	5'-GGC TGC GTA ATT GCA GAT AGG A-3'
<i>IFITM1</i>	5'-TCA ACA TCC ACA GCG AGA CC-3'	5'-TGT CAC AGA GCC GAA TAC CAG-3'
<i>MX2</i>	5'-CCA GAG GCA GCG GAA TCG TAA CC-3'	5'-GAG CCT TGA TCT GCA GTC CGA TG-3'
<i>BST2</i>	5'-AGA AGG GCT TTC AGG ATG TG-3'	5'-CCT GCT CGG CTT TTC GCT TGA ACA T-3'
<i>ISG15</i>	5'-CAC AGC CAT GGG CTG GGA CCT G-3'	5'-CCGGGGCCCAGGCCCTGGCTGGC-3'

Table S2: Antibodies used in the present study

Antibody	Supplier	Catalog number
β -actin	Santa Cruz	Sc47778
GFAP	Abcam	ab134436
I3	D. Evans (6)	-
Caspase-1	Abcam	ab207802
Caspase-3	R&D Systems	AF835
GSDMB	Abcam	Ab215729
GSDMB-Ct	N.M. Alto (7)	-
AIM2	Cell signaling Technologies	12948S
GZMA	Abcam	ab209205

Table S3: siRNA sequences

siRNA	Sequence
GSDMB siRNA	5'-rGArUrUrUrCrArUrArCrArUrGrGrArCrUrUrCrUrGrArUTA-3'
Caspase-1 siRNA 1	5'- rGrGrArArGrArCrUrCrArUrUrGrArArCrArUrArUrGrCrAAG-3'
Caspase-1 siRNA 2	5'- rArCrCrUrCrUrUrCrCrCrArGrGrArCrArUrUrArArArUAA-3'
Caspase-1 siRNA 3	5'- rGrCrArArUrCrUrUrUrArArCrArUrGrUrUrGrArArUrArCCA-3'

References

1. A. Roczkowsky *et al.*, Peroxisome injury in multiple sclerosis: protective effects of 4-phenylbutyrate in CNS-associated macrophages. *J Neurosci* **42**, 7152-7165 (2022).
2. J. G. Walsh *et al.*, Rapid inflammasome activation in microglia contributes to brain disease in HIV/AIDS. *Retrovirology* **11**, 35 (2014).
3. N. V. G. Cruz *et al.*, Genomic Characterization of the Historical Smallpox Vaccine Strain Wyeth Isolated from a 1971 Seed Vial. *Viruses* **15** (2022).
4. M. Howard, J. J. Maki, S. Connelly, D. J. Hardy, A. Cameron, Whole-Genome Sequences of Human Monkeypox Virus Strains from Two 2022 Global Outbreak Cases in Western New York State. *Microbiol Resour Announc* **11**, e0084622 (2022).
5. C. Wang *et al.*, Structural basis for GSDMB pore formation and its targeting by IpaH7.8. *Nature* **616**, 590-597 (2023).
6. Y. C. Lin *et al.*, Vaccinia virus DNA ligase recruits cellular topoisomerase II to sites of viral replication and assembly. *J Virol* **82**, 5922-5932 (2008).
7. J. M. Hansen *et al.*, Pathogenic ubiquitination of GSDMB inhibits NK cell bactericidal functions. *Cell* **184**, 3178-3191.e3118 (2021).