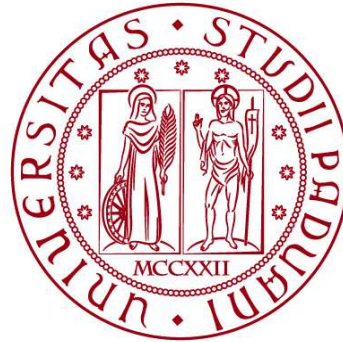


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biologia Molecolare**



**ELABORATO DI LAUREA**

**LA MOLECOLA Cu(II)-ATSM COME INIBITORE  
DELLA FERROPTOSI: IMPLICAZIONI  
TERAPEUTICHE NEI PROCESSI  
NEURODEGENERATIVI.**

**Tutor:** Prof. Bisaglia Marco  
Dipartimento di Biologia

**Laureanda** Tressoldi Ilaria

**ANNO ACCADEMICO 2021/2022**



# Sommario

<i>Abstract</i> .....	1
<i>Introduzione</i> .....	2
LA PEROSSIDAZIONE LIPIDICA .....	2
LA FERROPTOSI NELLE MALATTIE NEURODEGENERATIVE .....	5
La malattia di Parkinson .....	5
Sclerosi amiotrofica laterale.....	6
LA MOLECOLA Cu(II)-ATSM .....	7
<i>Metodo sperimentale</i> .....	8
SINTESI DEI COMPOSTI BIS(THIOSEMICARBAZONE) .....	8
COLTURE CELLULARI .....	8
VITALITA' CELLULARE .....	9
PEROSSIDAZIONE LIPIDICA.....	10
<i>Risultati</i> .....	10
<i>Conclusioni</i> .....	16
<i>Bibliografia</i> .....	18
<i>Articolo</i> .....	19



## **Abstract**

Recenti studi hanno identificato la ferroptosi come un evento chiave nei processi patologici legati a malattie neurodegenerative caratterizzate dalla morte cellulare neuronale, quali la malattia di Parkinson e la sclerosi amiotrofica laterale.

La ferroptosi è una forma di morte cellulare regolata non apoptotica caratterizzata da perossidazione lipidica degli acidi grassi poli-insaturi delle membrane cellulari indotta dal ferro. Il processo ferroptotico inizia nel momento in cui la difesa antiossidante mediata dall'enzima GPx4 GSH-dipendente viene meno, comportando il rapido accumulo di specie radicaliche lipidiche, che a sua volta porta alla rottura della membrana plasmatica e a morte cellulare simil-necrotica.

L'articolo preso in considerazione si propone di valutare l'attività della molecola Cu(II)-ATSM come potenziale inibitore ferroptotico, comparandola all'attività anti-ferroptotica, già nota, di Liproxstatina-1 in cellule neuronali in cui la ferroptosi viene indotta mediante trattamento con RLS3, erastina o ferro. Gli autori dimostrano la capacità della molecola di limitare il danno ferroptotico analizzando quindi i gruppi funzionali responsabili di tale protezione. In conclusione, la molecola Cu(II)-ATSM grazie alle caratteristiche anti-ferroptotiche osservate negli esperimenti descritti ed alle proprietà di biodisponibilità orale, sicurezza preclinica e capacità di attraversare la barriera ematoencefalica, già dimostrate in precedenti lavori, rappresenta un interessante composto per future sperimentazioni cliniche su malattie associate alla presenza di ferroptosi.

# Introduzione

I sistemi biologici sono caratterizzati da un efficiente bilanciamento tra reazioni ossidative e riducenti per il mantenimento di condizioni idonee alla vita. Le **interruzioni dell'omeostasi** tra reazioni redox comportano danni ossidativi cellulari a livello di DNA, proteine e lipidi alterandone struttura, attività e proprietà fisiche. Data la potenziale gravità di un danno ossidativo così diffuso, la perturbazione dell'equilibrio redox può potenzialmente provocare morte cellulare [1].

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) vengono prodotte dalla riduzione parziale dell'ossigeno molecolare ad anione superossido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), perossido di idrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), perossidi lipidici (LOOH) ed ai corrispondenti radicali idrossile ( $\bullet\text{HO}$ ) e perossile ( $\bullet\text{ROO}$ ). Recenti studi si sono concentrati sullo studio dei **perossidi lipidici** come mediatori chiave di molti stati patologici, tra cui infiammazione, cancro, malattie neurodegenerative, e la loro formazione è stata identificata come l'evento principale a valle della ferroptosi, un tipo di morte cellulare programmata, che verrà descritta in seguito [1].

## LA PEROSSIDAZIONE LIPIDICA

I perossidi lipidici esercitano i loro effetti tossici alterando l'integrità delle membrane cellulari, modificandone l'assemblaggio, la composizione, la struttura, la permeabilità, la fluidità e la diffusione laterale. Evidenze sperimentali hanno mostrato che i fosfolipidi perossidati si riorientano nel doppio strato lipidico in modo che la catena ossidata sia esposta alla fase acquosa, diminuendo lo spessore della membrana e consentendone il riconoscimento da parte dei macrofagi [1].

In quanto composti altamente reattivi, i perossidi lipidici sono anche in grado di promuovere un'ulteriore generazione di ROS che possono danneggiare, oltre alle membrane, il DNA e le proteine [3].

La perossidazione lipidica ossida preferenzialmente gli **acidi grassi polinsaturi (PUFA)**, ossia acidi grassi a catena lunga con più di un doppio legame, come gli acidi linoleico, arachidonico e docosaesaenoico. Può avvenire per via enzimatica attraverso gli enzimi lipossigenasi (LOX), ciclossigenasi (COX), dal citocromo p450 (CYP) oppure per via non enzimatica [1].

La **via non enzimatica** di perossidazione dei lipidi è un processo che può essere suddiviso in tre fasi distinte: inizio, propagazione e conclusione [3]. La fase di inizio è data dalla generazione di composti radicalici. Nelle cellule, ciò avviene generalmente attraverso reazioni catalizzate da ioni ferro o, meno frequentemente, rame [1].

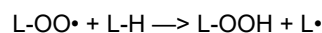
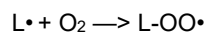
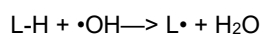
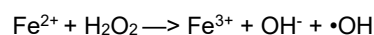
Il **ferro cellulare** è coinvolto in diversi processi fisiologici, fra cui il trasporto dell'ossigeno, la sintesi del DNA, l'attività enzimatica antiossidante, la respirazione mitocondriale, la sintesi mielinica e la sintesi e il metabolismo di neurotrasmettitori. Tuttavia, un eccessivo accumulo di ferro all'interno della cellula può aumentare la probabilità di insorgenza della **ferroptosi**. Per tale motivo il ferro cellulare deve essere sotto stretto controllo

omeostatico. L'assorbimento del ferro è mediato da transferrina, la sua esportazione da ferroportina, mentre la sua concentrazione all'interno della cellula è per la maggior parte legata dall'eme in cluster FeS, oppure è immagazzinata legata alla ferritina. Tuttavia, esiste una piccola quantità di ferro che costituisce quello che viene chiamato il pool di ferro labile, in grado di partecipare alle reazioni redox [3].

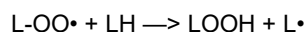
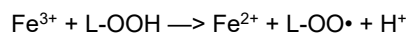
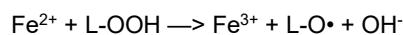
Queste reazioni redox sono denominate collettivamente **reazioni di Fenton** [3].

La perossidazione lipidica provocata dalle reazioni di Fenton prevede la decomposizione del perossido di idrogeno  $H_2O_2$  in  $OH^-$  e  $\bullet OH$  catalizzata dagli ioni  $Fe^{2+}$  in ambiente acido. Successivamente, il radicale  $\bullet OH$  può reagire con i lipidici L-H, formando un radicale alchilico lipidico  $L\bullet$  e  $H_2O$ . Il radicale  $L\bullet$ , quindi, reagisce con ossigeno molecolare  $O_2$  disciolto in soluzione, per formare un radicale alchil-perossido  $L-OO\bullet$ . Questo a sua volta reagisce con un altro ione organico lipidico L-H formando idroperossido  $L-OOH$  che può reagire sia con lo ione  $Fe^{2+}$  che con lo ione  $Fe^{3+}$  dando luogo ad ulteriori specie radicaliche [2].

Fase iniziale:



Fase di propagazione:



**Figura 1:** Reazioni del ciclo redox che coinvolgono lo ione Fe e possono portare alla propagazione di perossidi lipidici e radicali [2].

Successivamente alla fase di inizio, la perossidazione lipidica è in grado di auto-propagarsi. I radicali idrossile e perossidico sono in grado di estrarre un idrogeno dai PUFA di membrana, producendo un radicale in grado di reagire con l'ossigeno molecolare in soluzione per formare un radicale perossidico  $L-OO\bullet$  in una reazione a catena [3].

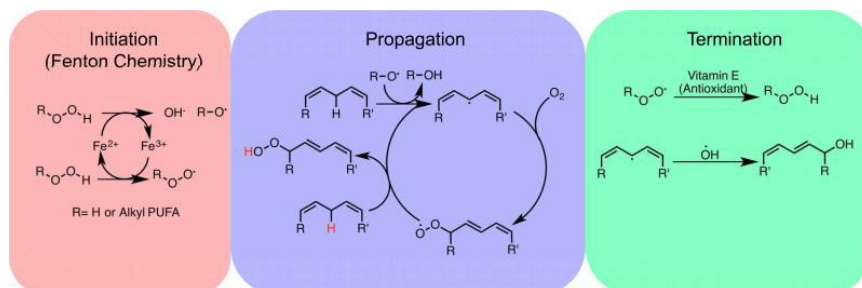
Le molecole in grado di donare elettroni ai composti radicalici senza diventare esse stesse radicali possono terminare la propagazione della perossidazione lipidica. Queste molecole, chiamate **antiossidanti**, sono il meccanismo primario di difesa contro la perossidazione lipidica incontrollata e gli altri danni ossidativi. Antiossidanti lipofili noti sono la vitamina E, Ferrostatina-1 (Fer-1), Liproxstatina-1 (Lip-1) e polifenoli bioattivi [2].

Ferrostatina-1 e Liproxstatina-1 sono potenti inibitori della ferroptosi. Agiscono come antiossidanti (RTAs)<sup>1</sup> rallentando l'accumulo di lipidi

<sup>1</sup> RTAs = radical-trapping antioxidants

idroperossidati,  $\text{LOO}\cdot$ , implicati nella morte e disfunzione cellulare, e sono efficienti inibitori della lipoxigenasi. Liproxstatina-1, in particolare, inibisce la perossidazione lipidica, ripristina l'attività di GPX4, aumenta l'espressione GSH per potenziare il sistema di anti-ferroptosi e ridurre il danno ossidativo nelle cellule [10].

I composti della vitamina E sono un gruppo di composti in grado di mitigare la tossicità derivante dai perossidi lipidici. Infatti, durante la propagazione dei perossidi lipidici, la vitamina E può donare un singolo elettrone al radicale perossidico intermedio, interrompendo la propagazione della reazione a catena dei perossidi. L'intermedio radicale della vitamina E può essere successivamente ridotto dalla vitamina C [2].



**Figura 2:** Le tre fasi della perossidazione lipidica non enzimatica. Nella fase di iniziazione i primi radicali sono generati per mezzo del ferro labile attraverso la reazione di Fenton. Nella fase di propagazione i radicali sono in grado di reagire con nuovi substrati, creando nuovi radicali. La fase di propagazione si ripete fino alla fase di terminazione, in cui i radicali vengono "spenti" dagli antiossidanti o reagiscono con un altro radicale [1].

I sistemi biologici hanno sviluppato molteplici meccanismi endogeni per eliminare i perossidi lipidici nocivi. In particolare, la classe di enzimi glutazione perossidasi (GPx) ha dimostrato di essere un regolatore chiave responsabile della riduzione dei perossidi lipidici nelle cellule [3]. Esistono otto isoforme GPx nell'uomo, tutte con differenti specificità di substrato e distribuzioni tissutali [1]. **L'enzima GPx4** è il principale riducente dei perossidi lipidici e la sua inattivazione provoca stress ossidativo con il conseguente accumulo di perossidi lipidici [9].

La reazione antiossidante catalizzata da GPx4 avviene nel centro catalitico dell'enzima costituito da una selenocisteina, ed utilizza gli elettroni ottenuti dalla riduzione del co-substrato GSH per trasformare il perossido lipidico nel corrispondente alcol lipidico [1]. Essendo il GSH un cofattore essenziale per GPx4, esso deve essere mantenuto ad una concentrazione adeguata. A tale processo partecipa lo scambiatore XcT che trasporta in antiporto il glutammato verso l'esterno e la cistina<sup>2</sup> verso l'interno della cellula [2]. Un malfunzionamento del sistema XcT comporta la deplezione del pool di cisteina, che incide sulla biosintesi di GSH, comportando di conseguenza l'inattivazione dell'enzima GPx4 e la promozione di morte cellulare per ferroptosi [8].

<sup>2</sup> Cistina è la forma ossidata della cisteina che costituisce la molecola limitante la sintesi del GSH

## LA FERROPTOSI NELLE MALATTIE NEURODEGENERATIVE

La **ferroptosi** è una forma di morte cellulare regolata non apoptotica e indotta da ferro, caratterizzata dalla perossidazione lipidica delle membrane [3]. Essa inizia nel momento in cui la difesa antiossidante di GPx4 fallisce comportando il rapido accumulo di ROS lipidiche, con la conseguente rottura della membrana plasmatica e morte cellulare simil-necrotica [8]. La ferroptosi è caratterizzata da eventi intracellulari come l'accumulo di ferro, l'elevato stress ossidativo, il danno da perossidazione lipidica, livelli ridotti di GSH e la disregolazione del sistema XcT [3].

Recenti studi hanno enfatizzato un possibile legame tra la patogenesi di **malattie neurodegenerative** e la **ferroptosi** coinvolta nella progressiva morte cellulare dei neuroni [5]. Data la vulnerabilità agli eventi ferroptotici e l'incapacità di sostituzione di neuroni, la loro morte causa un danno irreparabile al sistema nervoso.

In particolare, la vulnerabilità del cervello agli eventi ferroptotici è data da un alto livello di consumo di ossigeno, un'elevata concentrazione di ferro, una grande concentrazione di PUFA e il ridotto livello di difese antiossidanti [9].

Sebbene la **malattia di Parkinson** e la **Sclerosi Laterale Amiotrofica** siano disturbi con caratteristiche fisiopatologiche differenti, entrambe condividono la presenza delle tipiche caratteristiche ferroptotiche e la presenza di un accumulo di proteine aggregate nel citoplasma dei neuroni.

### La malattia di Parkinson

La **malattia di Parkinson (MP)** è una malattia neurodegenerativa progressiva complessa, causata da fattori ambientali e genetici che comportano, tra l'altro, disfunzione mitocondriale, stress ossidativo, aggregazione proteica e neuroinfiammazione [7].

Le caratteristiche cliniche della MP sono la perdita dei neuroni dopaminergici nella substantia nigra pars compacta (SN) e la presenza all'interno dei neuroni dopaminergici di corpi di Lewy, inclusioni citoplasmatiche insolubili di alfa-sinucleina mal ripiegata aggregata associata a ubiquitina [3]. La perdita preferenziale di neuroni dopaminergici provoca una marcata compromissione del controllo motorio [7].

In presenza di fattori predisponenti, quali possono essere l'invecchiamento, la predisposizione genetica e l'infiammazione periferica, gli aggregati di alfa-sinucleina mal ripiegata possono bypassare la normale "clearance" venendo trasportati per via assonale retrograda ai nuclei e promuovendo la morte neuronale. È stato infatti dimostrato che sia il sistema ubiquitina-proteasoma che quello lisosomiale-autofagico risultano alterati nella MP. Aggregati di alfa-sinucleina possono inoltre venire secreti dai neuroni ed essere assorbiti dai neuroni vicini mostrando proprietà simili ai prioni patogeni [7].

I **fattori di suscettibilità genetica** sono molteplici e possono interagire con fattori ambientali aumentando il rischio di insorgenza della malattia. Circa il 10% dei casi di MP sono caratterizzati da forme familiari causate da

mutazioni in un singolo gene. Tra queste, mutazioni autosomiche dominanti sul gene codificante l'alfa-sinucleina, SNCA, nonché duplicazioni o triplicazioni del gene SNCA sono state le prime ad essere identificate. Altre mutazioni nei geni codificanti per le proteine Parkin e PINK1 sono invece cause di MP familiare a trasmissione autosomica recessiva ed esordio precoce. Entrambe queste proteine partecipano al processo cellulare che promuove la degradazione lisosomiale dei mitocondri disfunzionali, chiamato mitofagia. Inoltre, Parkin regola, indirettamente, i livelli di un importante regolatore trascrizionale, PGC-1alpha, che promuove in modo coordinato l'espressione dei geni necessari per la biogenesi mitocondriale e le molteplici difese antiossidanti [7].

Associato alla MP sembra esserci anche un l'accumulo di ferro nella glia e nei neuroni dopaminergici. Questo aumento di ferro in combinazione con alti livelli di PUFA tipici delle membrane neuronali dei neuroni dopaminergici crea un ambiente particolarmente sensibile alla perossidazione lipidica. Ciò significa che un leggero squilibrio nell'omeostasi del ferro, della dopamina o dei lipidi potrebbe indurre la ferroptosi [3].

### **Sclerosi amiotrofica laterale**

La **sclerosi laterale amiotrofica (SLA)** è una malattia neuromuscolare progressiva e fatale, caratterizzata dalla degenerazione dei motoneuroni superiori (UMN) e inferiori (LMN) nella corteccia motoria primaria, nel tronco cerebrale e nel midollo spinale, con conseguente disfunzione e una progressiva atrofia dei muscoli scheletrici che progrediscono verso la paralisi, portando l'individuo alla morte per insufficienza respiratoria entro 3-5 anni dall'insorgenza della malattia. Solitamente la perdita di motoneuroni è anche accompagnata dalla presenza di segni di infiammazione derivanti dall'attivazione degli astrociti e proliferazione della microglia nei pazienti affetti [4].

Sebbene ancora non del tutto chiara, l'eziopatogenesi della SLA è verosimilmente multifattoriale, data da una complessa interazione tra geni ed ambiente.

La SLA può essere classificata in due categorie fenotipicamente indistinguibili tra loro: **SLA sporadica (sSLA)** quando si manifesta in individui senza storia familiare e **SLA familiare (fSLA)** quando sono affette almeno due persone della stessa famiglia [4].

Tra le cause determinanti della fSLA sono stati identificati un insieme diversificato di mutazioni geniche su diversi geni, tra cui *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* e *C9orf72* [6].

Il **gene SOD1** codifica la Cu/Zn superossido dismutasi, un enzima con funzione antiossidante in grado di rimuovere gli anioni superossido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) prodotti principalmente durante la respirazione cellulare [4]. Alcuni studi hanno ipotizzato che l'accumulo di radicali liberi possa risultare da un funzionamento difettoso di SOD1 dovuto alle mutazioni patologiche. Inoltre, le mutazioni di SOD1 possono esercitare il loro effetto dannoso attraverso meccanismi post-traduzionali aberranti come la demetallazione e

l'eccessiva ossidazione ed inducendo cambiamenti nella conformazione proteica che favoriscono la formazione di aggregati proteici tossici. Questi aggregati si possono accumulare nelle cellule, alterando così diversi processi cellulari, tra cui la rimozione dei radicali liberi, il controllo della qualità delle proteine e dei mitocondri e la loro degradazione controllata, la funzione mitocondriale, il trasporto assonale, e lo splicing di mRNA. Diversi studi hanno dimostrato come l'aggregazione e la diffusione di proteine SOD1 mal ripiegate sia una caratteristica chiave della SLA: dati recenti sembrano indicare che gli aggregati di SOD1 possono indurre la diffusione della malattia all'interno del SNC attraverso un meccanismo di trasmissione prionico [6].

La **proteina TAR DNA-binding-43 (TDP-43)**, codificata dal gene TARDBP, è una proteina di legame RNA/DNA prevalentemente nucleare che esercita funzioni vitali in vari stadi del metabolismo dell'RNA, facendo la spola tra il nucleo e il citoplasma. Per rendere possibile ciò, anche i livelli fisiologici di TDP-43 e la corretta localizzazione devono essere strettamente controllati attraverso l'autoregolazione. L'errata localizzazione citoplasmatica di TDP-43 e l'aggregazione delle sue forme iperfosforilate, ubiquitinate e frammentate sono segni distintivi istopatologici comuni della SLA [6].

Recentemente, alcuni studi hanno suggerito come la degenerazione e la morte dei motoneuroni nella SLA possano essere associate all'aumento di morte per ferroptosi, in conseguenza alla diminuzione di antiossidanti liposolubili e l'inibizione di enzimi di difesa antiossidanti [4].

## LA MOLECOLA Cu(II)-ATSM

Recenti studi hanno evidenziato il ruolo di una piccola molecola nota come **diacetyl-bis-(4-methyl-3-thiosemicarbazonato)-copper II (Cu(II)-ATSM)** nel rallentare i processi neurodegenerativi e nel ritardare la progressione della malattia in modelli di animali transgenici SOD1 di sclerosi laterale amiotrofica ed in modelli di malattia di Parkinson [4].

Cu(II)-ATSM è un composto sintetico stabile contenente rame ( $K_a=10^{18}$ ) a basso peso molecolare<sup>3</sup> e carica neutra, in grado di attraversare la barriera ematoencefalica, che si ipotizza possa bloccare la ferroptosi prevenendo la propagazione dei radicali lipidici agendo da *scavenger*<sup>4</sup> similmente a Ferrostatina-1 e Liproxstatina-1 [4].

Nel prossimo capitolo verrà descritto il metodo sperimentale con cui sono stati condotti gli esperimenti finalizzati a valutare l'ipotesi secondo cui Cu(II)-ATSM possa agire da molecola antiferroptotica, con un potenziale utilizzo nel trattamento di malattie neurodegenerative come SLA e MP.

---

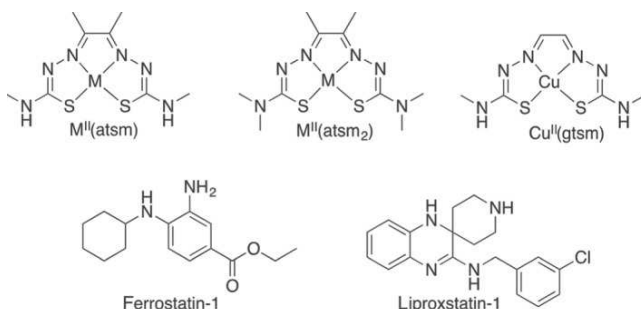
<sup>3</sup> Massa molecolare Cu(II)-ATSM = 322 u

<sup>4</sup> Scavenger = sostanza chimica in grado di ridurre la presenza di radicali in soluzione.

# Metodo sperimentale

## SINTESI DEI COMPOSTI BIS(THIOSEMICARBAZONE)

La struttura dei composti H<sub>2</sub>-ATSM, Cu(II)-ATSM, Cu(II)-ATSM<sub>2</sub> e Ni(II)-ATSM sintetizzati è stata analizzata registrando spettri <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} mediante uno spettrometro Varian FT-NMR 400. Successivamente i composti sono stati purificati attraverso cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) attraverso un sistema HPLC Agilent serie 1200 dotato di una colonna Alltech Hypersil BDS-C18, utilizzando una fase mobile a gradiente costituita da Solvente A (0,1% TFA in H<sub>2</sub>O) e Solvente B (0,1% TFA in CH<sub>3</sub>CN) da 0% a 100% in associazione al rilevamento UV a λ: 220, 254, 275 e 350 nm dell'eluato.



**Figura 3:** Le strutture chimiche di M(II)-ATSM e M(II)-(ATSM)<sub>2</sub> (dove M = Cu<sup>II</sup> o Ni<sup>II</sup>), Cu(II)-GTSM, Ferrostatina-1 e Liproxstatina-1

## COLTURE CELLULARI

La ferroptosi è stata valutata in linee cellulari neuronali immortalizzate N27 e SN4741, ed in neuroni corticali derivati dalla linea di topi C57BL/6J.

**N27** è una linea cellulare di neuroni dopaminergici di ratto, originariamente isolata dai neuroni dopaminergici di un mesencefalo di ratto E12. **SN4741**, invece, è una linea di cellule neuronali embrionali murine derivate dalla sostanza nigra di topo E13.5. Entrambe le linee cellulari sono state fatte crescere a 37 °C con 5% di CO<sub>2</sub> in terreno RPMI 1640 con aggiunta di siero bovino fetale al 10%, penicillina e streptomina.

I **neuroni corticali primari** sono stati isolati a partire da topi E14 C57BL/6J e mantenuti inizialmente a 37°C con 5% di CO<sub>2</sub> in terreno neurobasale integrato con B27, GlutaMAX, penicillina e streptomina. Alla DIV3 le cellule sono state trasferite in terreno RPMI 1640 addizionato con siero bovino fetale al 10%, penicillina, streptomina e citosina arabinoside per ridurre al minimo la crescita di astrociti. Infine, le cellule sono state utilizzate nell'analisi tra la DIV9 e la DIV11, in seguito alla rimozione di B27 attraverso lavaggi con PBS. La qualità del campione è stata verificata valutando la presenza di astrociti attraverso analisi immunocitochimiche. A questo proposito le colture corticali neuronali primarie sono state fatte crescere su vetrini copri-oggetto da 12 mm rivestiti di poli-D lisina, per poi essere trattate con i seguenti anticorpi: uno specifico per la proteina neuronale NeuN ed un secondario anti-topo coniugato con Alexa 488 per identificare i neuroni; uno specifico per la proteina astrocitaria GFAP ed uno secondario anti-cavia coniugato con Alexa 647 per identificare gli astrociti. Infine, il trattamento con DAPI ha permesso di identificare i nuclei. Le immagini sono state

registrate con un ingrandimento 20X utilizzando un microscopio confocale SP8 con il software Leica Application Suite X. Le immagini a ciascuna lunghezza d'onda sono state catturate in sequenza.

## VITALITA' CELLULARE

Le cellule coltivate sono state esposte a RSL3, erastina e ferro, in modo da indurre ferroptosi. **RSL3** induce ferroptosi inibendo l'enzima GPx4; mentre l'**erastina** agisce inibendo il sistema XcT e causando la deplezione dell'assorbimento di cistina.

Successivamente, la vitalità cellulare è stata determinata utilizzando il saggio MTT.

Il **saggio MTT** è un saggio colorimetrico indiretto che si basa sull'efficienza dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi, attivo solo nelle cellule vitali, nel tagliare l'anello di tetrazolio riducendo il sale MTT<sup>5</sup> di colore giallo a cristalli di formazano di colore viola-blu. I cristalli di formazano vengono successivamente solubilizzati e la colorazione è quantificata misurando l'assorbanza attraverso uno spettrofotometro per micropiastre PowerWAVE XS. I risultati sono espressi in termini percentuali facendo il rapporto tra l'assorbanza del campione in esame e l'assorbanza di cellule di controllo non trattate.

Il saggio MTT è stato utilizzato per misurare la vitalità e la crescita cellulare, e, indirettamente, la citotossicità cellulare di molecole inducenti la ferroptosi: RSL3, erastina o ferro. I dati ottenuti sono stati messi a confronto con i dati risultanti dall'analisi colorimetrica su campioni trattati con la molecola antiferroptotica Liproxstatina-1 e la molecola in esame Cu(II)-ATSM.

Metodi alternativi usati per valutare il recupero della vitalità cellulare promosso da Cu(II)-ATSM sono stati il saggio PrestoBlue ed il saggio LDH.

Il **saggio PrestoBlue** permette di quantificare la vitalità cellulare basandosi sulla capacità delle cellule vitali di mantenere un ambiente riducente nel citosol. La resazurina principio attivo del reagente PrestoBlue, è un composto non tossico e non fluorescente di colore blu, che è in grado di permeare la membrana cellulare. All'interno della cellula la **resazurina** viene ridotta in **resorufina**, un composto dal colore rosso altamente fluorescente. Quindi, la vitalità, quantificata tramite la rilevazione della fluorescenza o dell'assorbanza tramite spettrofotometro, risulterà essere proporzionale al numero di cellule viventi poiché le cellule danneggiate, avendo una attività metabolica inferiore, generano un segnale di intensità proporzionalmente inferiore rispetto alle cellule sane.

Il **saggio LDH**, invece, è un saggio colorimetrico che quantifica la vitalità cellulare misurando l'azione combinata dell'enzima citosolico lattato deidrogenasi (LDH), rilasciato in presenza di danno cellulare. La LDH catalizza la reazione di ossidazione del lattato e di riduzione del NAD a NADH. NADH successivamente comporta la riduzione di INT<sup>6</sup>, composto di

---

<sup>5</sup> MTT = 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio-bromuro

<sup>6</sup> INT = iodionitrotetrazolium

colore giallo, in un formazano dal colore rosso, e il cambiamento di colore viene quantificato misurando l'assorbanza attraverso uno spettrofotometro. In questo caso, la vitalità cellulare è calcolata come il valore inversamente proporzionale al valore di assorbanza ottenuto.

## PEROSSIDAZIONE LIPIDICA.

La perossidazione lipidica è stata valutata con il saggio C11-BODIPY<sup>7</sup>(581/591). Attraverso un lettore di micropiastre multimodale FlexStation3, è stata rilevata la percentuale di perossidazione lipidica valutando il rapporto tra la fluorescenza rossa emessa e quella verde.

Il **C11-BODIPY(581/591)** è un fluoroforo intrinsecamente lipofilo, che incorporato a sonde ha maggiore probabilità di imitare le proprietà dei lipidi naturali. Per questo motivo, C11-BODIPY(581/591) è spesso utilizzato per rilevare le specie reattive dell'ossigeno (ROS) nelle membrane cellulari, in quanto l'ossidazione della porzione polinsatura del butadienile presente nel fluoroforo determina lo spostamento del picco di emissione di fluorescenza da ~590<sup>8</sup>nm a ~510<sup>9</sup>nm.

Le cellule sono state coltivate in piastre da 96 pozzetti in terreni di crescita, e incubate con RSL3 addizionato a Liproxstatina-1 o a Cu(II)-ATSM per 4 ore. Successivamente le cellule sono state lavate in PBS e incubate in terreni di crescita con C11-BODIPY(581/591) per 1 ora<sup>10</sup>.

Le cellule coltivate e incubate con C11-BODIPY(581/591), dopo essere state raccolte con tripsina e lavate con PBS, sono state risospese in una soluzione contenente PBS, EDTA, HEPES, siero fetale di vitello 1%, penicillina e streptomina. Successivamente la fluorescenza è stata calcolata utilizzando il citofluorimetro CytoFLEX S.

La perossidazione lipidica in assenza di cellule è stata analizzata con C11-BODIPY(581/591), utilizzando l'acido arachidonico<sup>11</sup> nel tampone di Locke<sup>12</sup>. L'acido arachidonico viene incubato con Cu(II)-ATSM e Fe<sup>II</sup> o Fe<sup>III</sup>.

Infine, i livelli di Fe sono stati valutati colorimetricamente con Ferene-S, un reagente cromogeno che lega il ferro e forma un complesso stabile, la cui intensità di colore è proporzionale alla quantità di ferro presente nel campione. L'assorbanza della soluzione contenente ferro è stata misurata a ~590 nm con spettrofotometro per micropiastre PowerWave XS.

## Risultati

Nella sperimentazione sono state indagate alcune caratteristiche a cui si imputa l'azione antiferroptotica della molecola Cu(II)-ATSM.

<sup>7</sup> C11-BODIPY = 4,4-difluoro-3a,4a-diza-s-indacene.

<sup>8</sup> Gamma di fluorescenza rossa: eccitazione a~ 581nm emissione a ~600 nm.

<sup>9</sup> Gamma di fluorescenza verde: eccitazione a ~484nm emissione a ~530 nm.

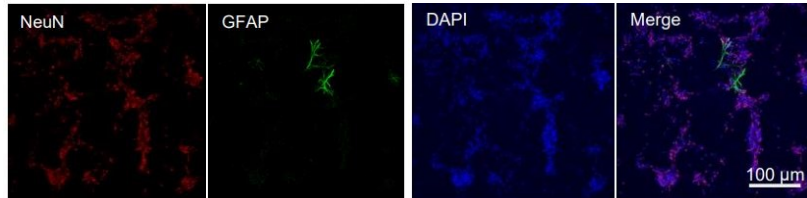
<sup>10</sup> L'esperimento è stato ripetuto per tutte le linee cellulari inducendo ferroptosi, oltre che con RSL3, anche con erastina e Fe, valutando l'efficienza di Cu(II)-ATSM a confronto con il controllo positivo dato da Liproxstatina-1 e con il controllo negativo.

<sup>11</sup> L'acido arachidonico è un acido grasso poli-insaturo (PUFA)

<sup>12</sup> Il tampone di Locke è una soluzione costituita da NaCl (154 mM), KCl (5,6 mM), HEPES (5 mM), glucosio (5 mM), MgCl<sub>2</sub> (1 mM) CaCl<sub>2</sub> (2,3 mM), NaHCO<sub>3</sub> (3,6 mM) a pH=7,4.

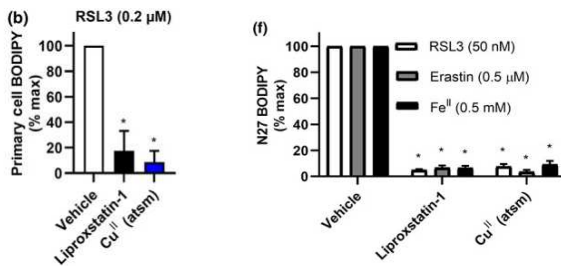
Inizialmente è stata valutata la **capacità di Cu(II)-ATSM di inibire la perossidazione lipidica** indotta da RSL3, erastina o Fe, in cellule neuronali N27, SN4741 e colture corticali primarie neuronali C57BL/6J.

Per i neuroni corticali C57BL/6J, è stata valutata la qualità del campione osservando la presenza di astrociti attraverso analisi immunohistochimiche. Dall'analisi si osserva una predominanza di neuroni, che riflette un'efficace inibizione della crescita di astrociti e una buona qualità del campione.

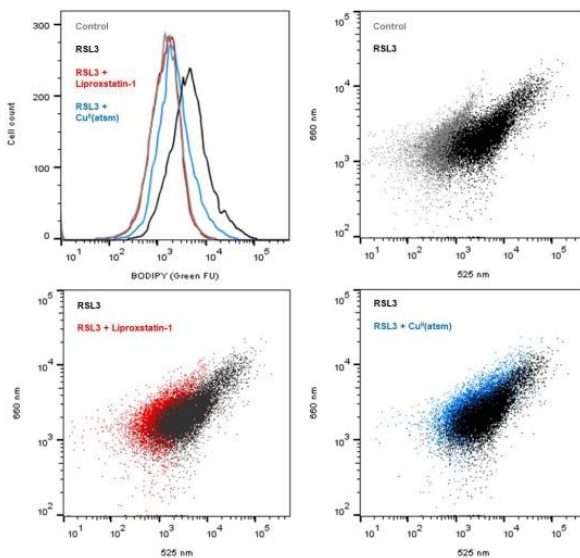


**Figura 4:** Le colture corticali primarie neuronali analizzate mediante immunohistochimica. L'anticorpo primario diretto contro la proteina nucleare NeuN (1:200) e il secondario anti-topo coniugato con Alexa 488 (1:400, ThermoFisher Scientific, Scoresby, Australia) sono stati utilizzati per identificare i neuroni (rosso). L'anticorpo primario diretto contro la proteina GFAP (1:400) ed il secondario anti-cavia coniugato con Alexa 647 (1:400, ThermoFisher Scientific) sono stati utilizzati per identificare gli astrociti (verdi). DAPI (300 nM, ThermoFisher Scientific) è stato utilizzato per rilevare i nuclei (blu).

Utilizzando C11-BODIPY(581/591) è stata osservata l'inibizione della perossidazione lipidica in seguito al trattamento dei campioni con Cu(II)-ATSM e Liproxstatina-1 e la fluorescenza è stata calcolata utilizzando il citofluorimetro CytoFLEX S.



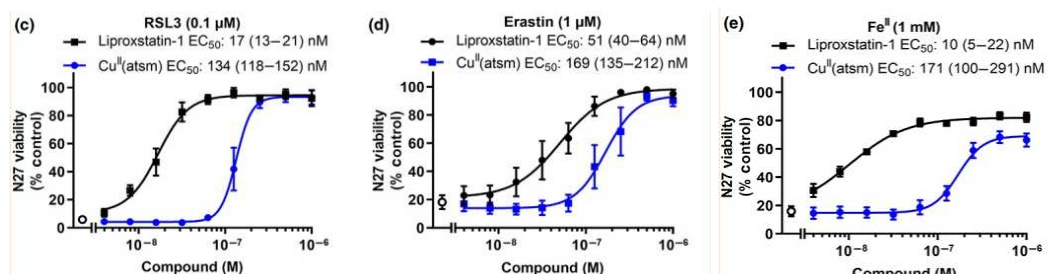
**Figura 5:** Cu(II)-ATSM salva la ferroptosi e la perossidazione lipidica nei neuroni coltivati. (b) Perossidazione lipidica misurata da C11-BODIPY(581/591) in cellule trattate con RSL3 e Liproxstatina-1 o Cu(II)-ATSM. (f) Perossidazione lipidica misurata da C11-BODIPY(581/591) in cellule trattate con RSL3, erastina o Fe(II) e con Liproxstatina-1 o Cu(II)-ATSM.



**Figura 6:** Cu(II)-ATSM previene la perossidazione lipidica nelle cellule N27 coltivate in terreni di crescita con RSL3, Liproxstatina-1 o Cu(II)-ATSM. La fluorescenza è stata osservata utilizzando il citofluorimetro CytoFLEX S. L'esperimento citofluorimetrico è stato ripetuto per tutte le linee cellulari in esame utilizzando alternativamente erastina o Fe per indurre ferroptosi.

Mediante il saggio MTT<sup>13</sup> sono stati condotti esperimenti dose-risposta, al fine di tracciare il grafico EC50<sup>14</sup> [mol/L] in cui la vitalità delle cellule è stata descritta in funzione della dose del composto utilizzato.

I risultati ottenuti sono stati confrontati con il grafico dose-risposta tracciato sull'azione antiferroptotica provocata da Liproxstatina-1.

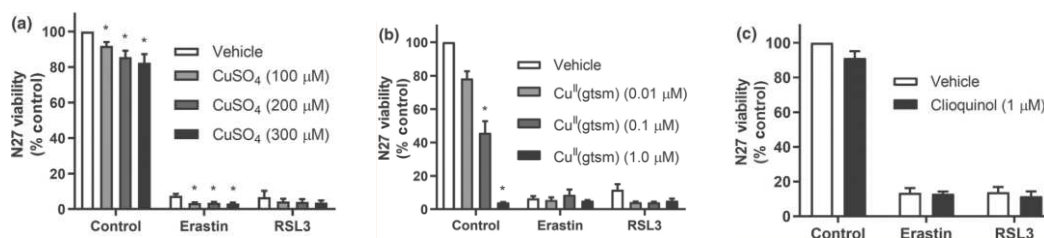


**Figura 7:** Cu(II)-ATSM inibisce la ferroptosi e la perossidazione lipidica nelle cellule neuronali N27. Le cellule sono state trattate con RSL3 (c), erastina (d) o Fe<sup>II</sup> (e) e addizionate a Liproxstatina-1 o Cu(II)ATSM, in esperimenti indipendenti. La vitalità è stata misurata attraverso il saggio MTT ed espressa come percentuale relativamente a cellule di controllo non trattate. L'EC50 è stata determinata mediante regressione non lineare.

Da ciò è stato osservato che Cu(II)-ATSM, a dosi maggiori di  $\approx 2 \cdot 10^{-7}$  M, permette un recupero della vitalità dose-dipendente nelle cellule N27<sup>15</sup> in cui la ferroptosi è indotta tramite RSL3, erastina o Fe<sup>II</sup>, con valori che rientrano nell'ordine di grandezza della Liproxstatina-1.

In secondo luogo, è stato valutato il **ruolo dello ione metallico rame** nell'attività anti-ferroptotica di Cu(II)-ATSM. Inizialmente sono stati valutati il sale rameico CuSO<sub>4</sub>, il Cu(II)-GTSM<sup>16</sup> e il cliochinolo, composti che promuovono l'assorbimento cellulare di rame.

Trattando le cellule N27 con i composti in esame si è osservato che non risultavano in grado di prevenire la ferroptosi né in seguito a trattamento con RSL3 né in presenza di erastina. Ciò ha suggerito che è improbabile che gli effetti anti-ferroptotici di Cu(II)-ATSM siano mediati semplicemente dall'aumento della concentrazione intracellulare del rame.



**Figura 8:** Lo ione metallico Cu(II) non previene la ferroptosi nelle cellule N27. La vitalità delle cellule trattate con RSL3 o erastina e addizionate con diverse concentrazioni di CuSO<sub>4</sub> (a), Cu(II)-GTSM (b) o cliochinolo (c) per 24 ore, non sembra essere recuperata osservando a confronto il campione di controllo non trattato con RSL3/erastina.

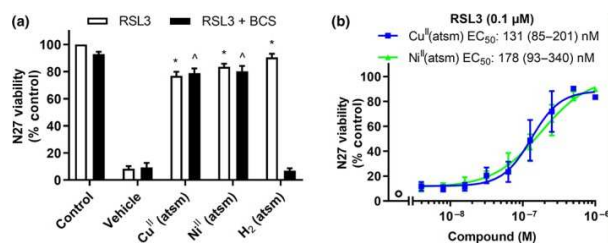
<sup>13</sup> Risultati simili sono stati ottenuti utilizzando il saggio PrestoBlue e il saggio LDH.

<sup>14</sup> EC50 = Half maximal effective concentration, rappresenta la concentrazione che un dato composto deve avere per produrre il 50% dell'effetto massimale.

<sup>15</sup> Gli esperimenti descritti sono stati condotti anche in cellule neuronali SN4741. I risultati che sono stati ottenuti sono simili a quelli ottenuti per cellule neuronali N27.

<sup>16</sup> Cu(II)-GTSM è un analogo di Cu(II)-ATSM che presenta un potenziale di riduzione del rame maggiore, risulta quindi più suscettibile alla riduzione intracellulare e al rilascio di rame dal ligando.

Successivamente, al fine di valutare l'effettiva **dipendenza dell'attività anti-ferroptotica di Cu(II)-ATSM dal rame**, è stata valutata l'azione dell'analogo Ni(II)-ATSM e dell'analogo non legato a ione metallico H<sub>2</sub>-ATSM. È stato osservato che, in assenza di BCS<sup>17</sup> entrambe le molecole sono in grado di impedire ferroptosi.

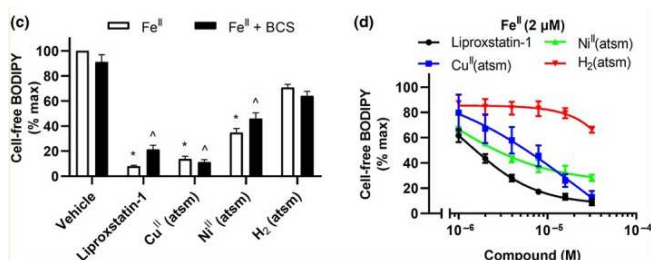


**Figura 9:** analoghi di Cu(II)-ATSM prevengono la ferroptosi indotta da RSL3 nelle cellule N27. (a) La vitalità nelle cellule trattate con RSL3 addizionate a Cu(II)-ATSM, Ni(II)-ATSM o H<sub>2</sub>-ATSM, in presenza o assenza del chelante di Cu(II) BCS. (b) Grafico EC<sub>50</sub> dose-risposta della vitalità delle cellule N27 trattate con RSL3 e addizionate a Cu(II)-ATSM e Ni(II)-ATSM.

Ni(II)-ATSM è stato capace di impedire la ferroptosi anche in presenza di BCS in modo simile all'azione di Cu(II)-ATSM, al contrario di H<sub>2</sub>-ATSM, che in presenza di BCS perde la sua efficacia. Pertanto, l'azione anti-ferroptotica di H<sub>2</sub>-ATSM osservata in assenza di BCS è stata ipotizzata essere la conseguenza della formazione del complesso Cu(II)-ATSM in seguito al legame di H<sub>2</sub>-ATSM con ioni metallici intracellulari.

Tale ipotesi è avvalorata anche dall'analisi condotta tramite il saggio C11-BODIPY(581/591) dell'azione antiferroptotica di Cu(II)-ATSM, Ni(II)-ATSM e H<sub>2</sub>-ATSM a confronto con l'azione di Liproxstatina-1 in un sistema in cui perossidazione lipidica è stata indotta in seguito all'incubazione con acido arachidonico e Fe<sup>II</sup>.

A differenza di Cu(II)-ATSM e Ni(II)-ATSM, H<sub>2</sub>-ATSM ha parzialmente inibito la perossidazione solo ad alti dosaggi, suggerendo che la parte organica della molecola, non legata a ioni metallici, possiede blanda attività di rimozione di specie radicaliche.

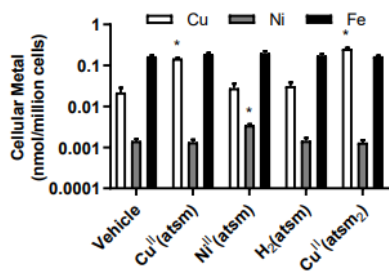


**Figura 10:** Cu(II)-ATSM, Ni(II)-ATSM inibiscono la perossidazione lipidica indotta dall'incubazione con acido arachidonico e Fe<sup>II</sup> similmente a Liproxstatina-1, mentre H<sub>2</sub>-ATSM inibiscono parzialmente la perossidazione a dosi elevate. Il trattamento con BCS non altera l'attività delle molecole.

Successivamente, la misura della **concentrazione intracellulare di metalli**, misurata attraverso ICP-MS<sup>18</sup> nei campioni trattati con Cu(II)-ATSM e Ni(II)-ATSM, ha permesso di osservare come questi composti innalzino le concentrazioni intracellulari di Cu(II) e Ni(II), rispettivamente, senza però alterare la concentrazione di ferro.

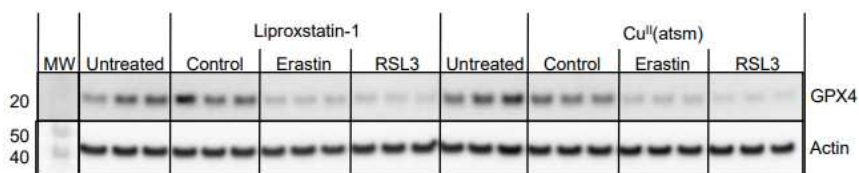
<sup>17</sup> BCS è un agente chelante del rame

<sup>18</sup> ICP-MS = spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente, è una tecnica analitica molto sensibile in grado di determinare la concentrazione di diverse sostanze inorganiche metalliche e non metalliche presenti in soluzione. Questa tecnica sfrutta l'utilizzo di uno spettrometro di massa per la separazione e rivelazione degli ioni prodotti da una torcia al plasma ICP ionizzante.



**Figura 11:** Ni(II)-ATSM e Cu(II)-ATSM promuovono l'accumulo intracellulare di Ni(II) e Cu(II) nelle cellule N27 senza alterare la concentrazione di ferro. I livelli di metallo cellulare sono stati misurati mediante spettrometria di massa al plasma accoppiato utilizzando un Agilent 7700x (Agilent Technologies, Santa Clara, Stati Uniti).

Per questo motivo, e poiché anche il **livello di GPx4**, misurato tramite western blot, non viene alterato in seguito al trattamento delle cellule con il composto in esame, è stato ipotizzato che Cu(II)-ATSM agisca da *scavenger* di specie radicaliche analogamente alla Liproxstatina-1.



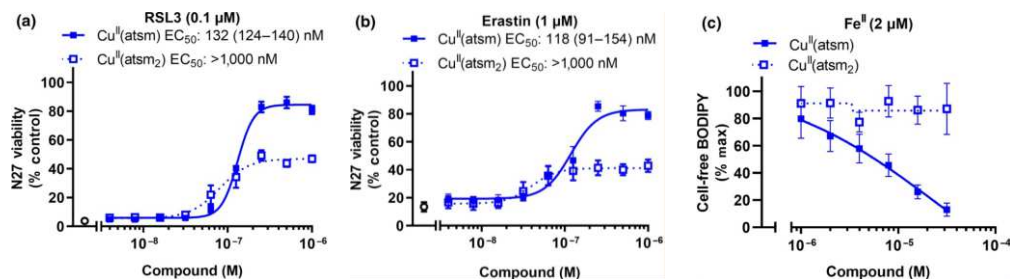
**Figura 12:** Cu(II)-ATSM non aumenta i livelli di GPx4. Le cellule N27 trattate con erastina o RSL3 sono state addizionate con Liproxstatina-1 o Cu(II)-ATSM. I campioni sono stati lisati e successivamente separati su gel denaturante e trasferiti su membrane PVDF. Le membrane sono state incubate con anticorpi primari anti-GPx4 di coniglio (1:5000) anticorpi primari anti-actina di topo (1:10000), e anticorpi secondari di capra anti-coniglio accoppiati alla perossidasi di rafano (1:7000). La chemiluminescenza è stata rilevata attraverso ECL.

In seguito, sono stati analizzati i **componenti strutturali di Cu(II)-ATSM** che conferiscono le proprietà anti-ferroptotiche osservate. È stato ipotizzato che, come Liproxstatina-1 e Ferrostatina-1, Cu(II)-ATSM potesse avere le stesse caratteristiche strutturali che ne favoriscono l'azione anti-ferroptotica.

La Liproxstatina-1 e la Ferrostatina-1 contengono ciascuna un'ammina aromatica che è coinvolta nel rapido trasferimento di un atomo di idrogeno ai radicali lipidici e conferisce loro la capacità di inibire la perossidazione lipidica interrompendo la catena di autossidazione radicalica. I gruppi funzionali -NH-CH<sub>3</sub> presenti sia in Cu(II)-ATSM che in Ni(II)-ATSM sono potenziali donatori di atomi di idrogeno. Questi gruppi funzionali in associazione alla coordinazione dei ligandi bivalenti Cu<sup>II</sup> e Ni<sup>II</sup> con H<sub>2</sub>-ATSM permettono una doppia deprotonazione, formando un composto dianionico delocalizzato stabile, analogo alle ammine aromatiche presenti nella Liproxstatina-1 e nella Ferrostatina-1. Per validare tale ipotesi sono stati valutati composti analoghi in cui gruppi funzionali -NH-CH<sub>3</sub> sono stati sostituiti con il gruppo funzionale -N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>: Cu(II)-(ATSM)<sub>2</sub> e Ni(II)-(ATSM)<sub>2</sub>.

Utilizzando il composto analogo Cu(II)-(ATSM)<sub>2</sub> è stato quindi riprodotto l'esperimento per valutare la vitalità cellulare in seguito a trattamento con RSL3, erastina o Fe<sup>II</sup> ed in presenza della molecola in esame.

È stata osservata una notevole attenuazione dell'inibizione della perossidazione lipidica da parte Cu(II)-(ATSM)<sub>2</sub> rispetto a Cu(II)-ATSM, convalidando quindi l'importanza del gruppo funzionale -NH-CH<sub>3</sub> nell'azione dei composti.



**Figura 13** : *Cu(II)-(ATSM)<sub>2</sub> ha una ridotta capacità nel prevenire la ferroptosi. La vitalità nelle cellule N27 trattate con RSL3 (a) o erastina (b) Cu(II)-(ATSM)<sub>2</sub> ha promosso un recupero molto inferiore a Cu(II)-ATSM; la vitalità è stata rappresentata da un grafico dose-risposta EC<sub>50</sub> determinato mediante regressione non lineare, che presenta un IC al 95% per Cu(II)-ATSM, mentre per Cu(II)-(ATSM)<sub>2</sub> non è stato possibile determinare un EC<sub>50</sub> certo poiché la redditività non superava il 50%. (c) La perossidazione lipidica misurata da C11-BODIPY(581/591) nel tampone di Locke usando acido arachidonico trattato con Fe<sup>II</sup> viene inibita da Cu(II)-ATSM ma non da Cu(II)-(ATSM)<sub>2</sub>.*

Infine, supponendo che la perossidazione lipidica associata alla ferroptosi sia indotta dall'ossidazione del Fe<sup>II</sup> cellulare, è stato valutato se Cu(II)-ATSM potesse agire stabilizzando lo stato ossidativo del ferro come **meccanismo anti-ferroptotico**.

Innanzitutto, sono stati analizzati i livelli di perossidazione lipidica indotti alternativamente dal trattamento con Fe<sup>II</sup> o Fe<sup>III</sup> e acido arachidonico di un sistema privo di cellule, monitorando i livelli di perossidazione lipidica tramite C11-BODIPY(581/591) e i livelli di ferro tramite Ferene-S all'inizio e al termine del trattamento.

Da tale esperimento è emerso che in presenza di entrambi gli stati ossidativi (Fe<sup>II</sup> ed Fe<sup>III</sup>) la quantità di perossidazione aumenta. L'aumento di perossidazione in presenza di Fe<sup>II</sup> è maggiore e più rapido rispetto che in presenza di Fe<sup>III</sup>, ma senza una corrisposta diminuzione della quantità di Fe<sup>II</sup> rilevata da Ferene-S. Questo ha suggerito che l'aumento dei livelli di perossidazione lipidica è determinato da una variazione di concentrazione di Fe<sup>II</sup> non percepibile dal test di Ferene-S oppure che il ciclo di riduzione del Fe<sup>II</sup> induce la perossidazione lipidica senza che avvenga l'ossidazione netta del Fe<sup>II</sup>.

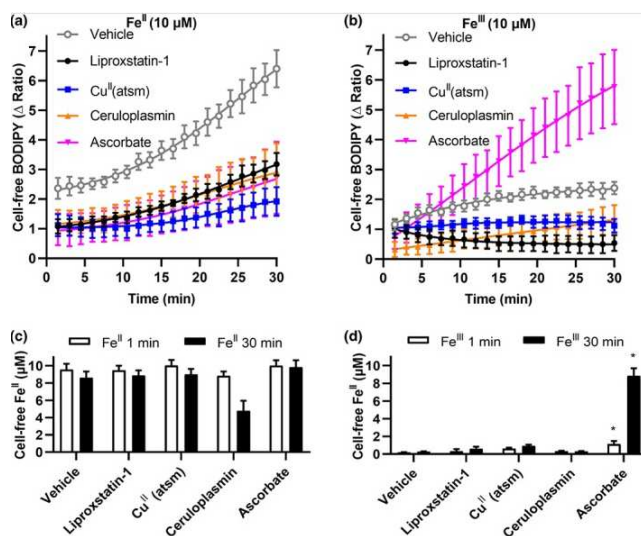
In ultima fase, è stata analizzata l'inibizione della ferroptosi da parte di Liproxstatina-1 e Cu(II)-ATSM, in presenza alternativamente di Fe<sup>II</sup> e Fe<sup>III</sup>, manipolando lo stato di ossidazione del ferro con l'introduzione di ceruloplasmina<sup>19</sup> o ascorbato<sup>20</sup>. Ossidando Fe<sup>II</sup> a Fe<sup>III</sup>, la **ceruloplasmina** ha provocato una riduzione dei livelli di Fe<sup>II</sup> e la conseguente riduzione del livello di perossidazione lipidica indotta sia in ambiente ricco di Fe<sup>II</sup> che di Fe<sup>III</sup>. Al contrario **l'ascorbato**, riducendo Fe<sup>III</sup> a Fe<sup>II</sup>, ha provocato un aumento dei livelli di Fe<sup>II</sup> e un aumento dei livelli di perossidazione lipidica indotta in ambiente ricco di Fe<sup>III</sup>, diminuendo, però, la perossidazione lipidica indotta in ambiente ricco di Fe<sup>II</sup>.

In entrambi i casi sia Liproxstatina-1 che Cu(II)-ATSM hanno limitato la perossidazione lipidica senza alterare i livelli di Fe<sup>II</sup>, suggerendo che

<sup>19</sup> La ceruloplasmina è una proteina con attività enzimatica ferrossidasica che ha un ruolo chiave nel metabolismo del ferro poiché ossida il Fe<sup>II</sup> in Fe<sup>III</sup> per poter essere recuperato attraverso il ciclo della ferritina.

<sup>20</sup> L'ascorbato (o acido ascorbico) è un forte agente riducente che promuove l'assorbimento di ferro riducendo Fe<sup>III</sup> in Fe<sup>II</sup>.

l'attività anti-ferroptotica di questi composti non avviene attraverso la modulazione dello stato di ossidazione e riduzione del ferro.



**Figura 14:** Cu(II)-ATSM non altera i livelli di Fe<sup>II</sup> nella sua azione anti-ferroptotica. L'acido arachidonico addizionato al tampone di Locke è stato trattato con Fe<sup>II</sup> (a, c) o Fe<sup>III</sup> (b, d), ceruloplasmina o ascorbato, e Lipoxstatina-1 o Cu(II)-ATSM per 30 minuti. (a, b) La perossidazione lipidica è stata misurata attraverso il saggio C11-BODIPY(581/591) ogni 90 s e con i dati ottenuti da esperimenti indipendenti è stato tracciato un grafico per mezzo di una regressione non lineare. (c, d) i livelli di Fe<sup>II</sup> sono stati misurati con il test di Ferene-S dopo 1 min e 30 min nelle diverse condizioni. I grafici (a) e (c) sono riferiti ad un ambiente iniziale ricco di Fe<sup>II</sup> mentre i grafici (b) e (d) sono riferiti ad un ambiente iniziale ricco di Fe<sup>III</sup>.

## Conclusioni

Recenti studi hanno identificato la ferroptosi come un evento chiave nei processi patologici legati a malattie neurodegenerative caratterizzate dalla morte cellulare neuronale, quali la MP e SLA.

La ferroptosi è una forma di morte cellulare regolata non apoptotica caratterizzata da perossidazione lipidica degli acidi grassi poli-insaturi delle membrane cellulari indotta dal ferro.

I risultati ottenuti dalla sperimentazione presa in esame suggeriscono che **Cu(II)-ATSM previene la perossidazione lipidica** (cfr Figura 5, Figura 7), senza alterare lo stato di ossidazione del Fe<sup>II</sup> (cfr Figura 14), con una potenza paragonabile a composti anti-ferroptotici, quali Lipoxstatina-1 e Ferrostatina-1.

Questa attività anti-ferroptotica è imputabile alla presenza nella molecola di **gruppi funzionali -NH-CH<sub>3</sub>**, che sono potenziali donatori di atomi di idrogeno con un meccanismo analogo all'azione delle ammine aromatiche presenti in Lipoxstatina-1 e Ferrostatina-1.

Infatti, l'attività del gruppo funzionale -NH-CH<sub>3</sub> come donatore di atomi di idrogeno è stata studiata analizzando il composto analogo Cu(II)-(ATSM)<sub>2</sub>, nel cui gruppo funzionale l'atomo d'idrogeno è stato sostituito da un secondo gruppo metile -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Il complesso Cu(II)-(ATSM)<sub>2</sub>, che manca dell'atomo di idrogeno da donare, non è stato in grado di prevenire la perossidazione lipidica indotta da Fe<sup>II</sup> ed è stato molto meno efficace di Cu(II)-ATSM nel mitigare il danno da ferroptosi indotto da RSL3 ed erastina in cellule neuronali N27 (cfr Figura 13).

Allo stesso tempo, le osservazioni sull'attività dell'analogo Ni(II)-ATSM, il quale ha mostrato un'attività citoprotettiva paragonabile a Cu(II)-ATSM (cfr Figura 9, Figura 10), hanno suggerito che **il ruolo degli ioni metallici**, legati alla molecola, fosse quello di permettere la delocalizzazione elettronica nel

bis(thiosemicarbazone) permettendo la formazione di un composto stabilizzato in seguito a deprotonazione (cfr Figura 8).

Pertanto, si ipotizza che se Cu(II)-ATSM dovesse dimostrare l'efficacia clinica per i disturbi neurodegenerativi presi in esame nel testo, il meccanismo d'azione del farmaco potrebbe essere quello di un **inibitore della ferroptosi**. L'inibizione della ferroptosi da parte di Cu(II)-ATSM è quindi il meccanismo plausibile mediante il quale può fornire neuroprotezione.

Tuttavia, al fine di confermare l'ipotesi appena formulata, si renderanno necessari ulteriori studi relativi alle suddette condizioni neurologiche anche in modelli animali.

In relazione all'aumento osservato dei livelli di rame nel cervello grazie a Cu(II)-ATSM (cfr Figura 11), l'articolo [4] evidenzia che la somministrazione della molecola a modelli animali comporta una riduzione dell'attivazione della microglia e degli astrociti in casi di infiammazione. Ciò permette un miglioramento della funzione motoria, della neuroprotezione ed un aumento della sopravvivenza degli animali stessi. Invece, un'interruzione del trattamento evidenzia la recrudescenza dello stato patologico.

Pertanto, grazie alla sua capacità di attraversare la barriera ematoencefalica, le sue proprietà di biodisponibilità orale e di sicurezza preclinica, è possibile considerare la molecola Cu(II)-ATSM in futuri studi clinici per lo sviluppo di inibitori selettivi della ferroptosi, al fine di individuare nuovi trattamenti terapeutici per malattie come la MP e SLA.




## **Bibliografía**

- [1] Gaschler, M., & Stockwell, B. (2017). *Lipid peroxidation in cell death* (Vol. 482).
- [2] Kajarabille, N., & Latunde-Dada, G. (2019). *Programmed cell-death by ferroptosis: Antioxidants as mitigators* (Vol. 20).
- [3] Mahoney-Sánchez, L., Bouchaoui, H., Ayton, S., Devos, D., Duce, J., & Devedjian, J. (2021). *Ferroptosis and its potential role in the physiopathology of Parkinson's Disease* (Vol. 196).
- [4] Nikseresht, S., Hilton, J., Kysenius, K., Liddell, J., & Crouch, P. (2020). *Copper-ATSM as a treatment for ALS: Support from mutant SOD1 models and beyond* (Vol. 10).
- [5] Peña-Bautista, C., Vento, M., Baquero, M., & Cháfer-Pericás, C. (2019). *Lipid peroxidation in neurodegeneration* (Vol. 497).
- [6] Saberi, S., Stauffer, J., Schulte, D., & Ravits, J. (2015). *Neuropathology of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Its Variants* (Vol. 33).
- [7] Simon, D., Tanner, C., & Brundin, P. (2020). *Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology* (Vol. 36).
- [8] Yang, W., & Stockwell, B. (2016). *Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation* (Vol. 26).
- [9] Yao, M., Liu, T., Zhang, L., Wang, M., Yang, Y., & Gao, J. (2021). *Role of ferroptosis in neurological diseases* (Vol. 747).
- [10] Zilka, O., Shah, R., Li, B., Friedmann Angeli, J., Griesser, M., Conrad, M., & Pratt, D. (2017). *On the Mechanism of Cytoprotection by Ferrostatin-1 and Liproxstatin-1 and the Role of Lipid Peroxidation in Ferroptotic Cell Death* (Vol. 3).

## *Articolo*

## RESEARCH PAPER

# Cu<sup>II</sup>(atsm) inhibits ferroptosis: Implications for treatment of neurodegenerative disease

Adam Southon<sup>1</sup> | Kathryn Szostak<sup>2</sup>  | Karla M. Acevedo<sup>1</sup> | Krista A. Dent<sup>1</sup> | Irene Volitakis<sup>1</sup> | Abdel A. Belaidi<sup>1</sup> | Kevin J. Barnham<sup>1</sup> | Peter J. Crouch<sup>3</sup> | Scott Ayton<sup>1</sup>  | Paul S. Donnelly<sup>2</sup> | Ashley I. Bush<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Melbourne Dementia Research Centre, Florey Institute of Neuroscience and Mental Health, The University of Melbourne, Victoria, Australia

<sup>2</sup>School of Chemistry and Bio21 Molecular Science and Biotechnology Institute, The University of Melbourne, Victoria, Australia

<sup>3</sup>Department of Pharmacology and Therapeutics, The University of Melbourne, Victoria, Australia

## Correspondence

Ashley I. Bush, Melbourne Dementia Research Centre, Florey Institute of Neuroscience and Mental Health, The University of Melbourne, Victoria 3010, Australia.  
Email: ashley.bush@florey.edu.au

## Funding information

FightMND; Motor Neurone Disease Research Institute of Australia; National Health and Medical Research Council, Grant/Award Number: 1103703

**Background and Purpose:** Diacetyl-bis(4-methyl-3-thiosemicarbazonato)copper<sup>II</sup> (Cu<sup>II</sup>(atsm)) ameliorates neurodegeneration and delays disease progression in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and Parkinson's disease (PD), yet the mechanism of action remains uncertain. Promising results were recently reported for separate Phase 1 studies in ALS patients and PD patients. Affected tissue in these disorders shares features of elevated Fe, low glutathione and increased lipid peroxidation consistent with ferroptosis, a novel form of regulated cell death. We therefore evaluated the ability of Cu<sup>II</sup>(atsm) to inhibit ferroptosis.

**Experimental Approach:** Ferroptosis was induced in neuronal cell models by inhibition of glutathione peroxidase-4 activity with RSL3 or by blocking cystine uptake with erastin. Cell viability and lipid peroxidation were assessed and the efficacy of Cu<sup>II</sup>(atsm) was compared to the known ferroptotic compound liproxstatin-1.

**Key Results:** Cu<sup>II</sup>(atsm) protected against lipid peroxidation and ferroptotic lethality in primary and immortalised neuronal cell models (EC<sub>50</sub>: ≈130 nM, within an order of magnitude of liproxstatin-1). Ni<sup>II</sup>(atsm) also prevented ferroptosis with similar potency, whereas ionic Cu<sup>II</sup> did not. In cell-free systems, Cu<sup>II</sup>(atsm) and Ni<sup>II</sup>(atsm) inhibited Fe<sup>II</sup>-induced lipid peroxidation, consistent with these compounds quenching lipid radicals.

**Conclusions and Implications:** The ferroptotic activity of Cu<sup>II</sup>(atsm) could therefore be the disease-modifying mechanism being tested in ALS and PD trials. With potency *in vitro* approaching that of liproxstatin-1, Cu<sup>II</sup>(atsm) possesses favourable properties such as oral bioavailability and entry into the brain that make it an attractive investigational product for clinical trials of ferroptosis-related diseases.

## 1 | INTRODUCTION

Cu<sup>II</sup>(atsm) is a bis(thiosemicarbazone)copper<sup>II</sup> compound (Figure 1) that was recently reported to show promising preliminary results in

both a Phase 1 trial of patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS; NCT02870634; Rowe et al., 2018) and a Phase 1 trial of patients with Parkinson's disease (PD; NCT03204929; Evans, Rowe, Lee, Noel, & Rosenfeld, 2019). In two Phase 0 clinical trials, Cu<sup>II</sup>(atsm) crossed into the brain and concentrated in areas associated with disease activity (Ikawa et al., 2011; Ikawa et al., 2015). Furthermore, in preclinical studies Cu<sup>II</sup>(atsm) ameliorated neurodegeneration in mutant SOD1 transgenic mouse models of ALS (Hilton et al., 2017;

**Abbreviations:** AD, Alzheimer's disease; ALS, amyotrophic lateral sclerosis; BCS, bathocuproinedisulfonic acid; Cu<sup>II</sup>(atsm), diacetyl-bis(4-methyl-3-thiosemicarbazonato)copper<sup>II</sup>; PD, Parkinson's disease; RTA, radical trapping antioxidant.

McAllum et al., 2013; Roberts et al., 2014; Soon et al., 2011; Vieira et al., 2017), transgenic and toxin-induced mouse models of PD (Hung et al., 2012) and transient and permanent mouse models of ischaemic stroke (Huuskonen et al., 2017). However, the mechanism of neuroprotection of this molecule is uncertain. Proposed mechanisms of action have included controlled delivery of Cu ions (Hilton et al., 2017; Roberts et al., 2014). However, the affinity of Cu<sup>II</sup> for the atsm scaffold is extremely high (Donnelly et al., 2008) and would not be released in physiological environments.

Recent work has implicated ferroptosis, a regulated cell death pathway characterised by Fe-dependent lipid peroxidation in ALS, PD, Alzheimer's disease (AD) and stroke (Guiney, Adlard, Bush, Finkelstein, & Ayton, 2017; Masaldan, Bush, Devos, Rolland, & Moreau, 2018; Stockwell et al., 2017). Iron levels are elevated in affected brain regions in these neurological disorders (Ayton et al., 2015; Ayton et al., 2017; Ding et al., 2011; Grolez et al., 2016; Park et al., 2011; Pyatigorskaya et al., 2015; Raven, Lu, Tishler, Heydari, & Bartzokis, 2013; Tao, Wang, Rogers, & Wang, 2014; Tuo et al., 2017), as are lipid peroxidation products characteristic of ferroptosis (Cherubini, Ruggiero, Polidori, & Mecocci, 2005; Choi et al., 2015; Dexter et al., 1989; Jenner, Dexter, Sian, Schapira, & Marsden, 1992; Mandal, Saharan, Tripathi, & Murari, 2015; Reed, Pierce, Markesbery, & Butterfield, 2009; Sian et al., 1994; Simpson, Henry, Henkel, Smith, & Appel, 2004; Tohgi et al., 1999; Yu et al., 2016). The most potent known inhibitors of ferroptosis are the radical trapping antioxidants (RTAs), liproxstatin-1 and ferrostatin-1 (Dixon et al., 2012; Friedmann Angeli et al., 2014), which inhibit ferroptosis with nanomolar efficacy (Sheng et al., 2017; Zilka et al., 2017). Ferrostatin-1 and liproxstatin-1 have been reported to rescue ischaemia reperfusion injury and stroke models (Friedmann Angeli et al., 2014; Tuo et al., 2017) and PD (Do Van et al., 2016). Edaravone, an RTA approved for the treatment of acute ischaemic stroke and ALS, was recently reported to have anti-ferroptotic properties (Homma, Kobayashi, Sato, & Fujii, 2019).

Given the recent activity of Cu<sup>II</sup>(atsm) in its first ALS and PD clinical trials, and that ferroptosis may play a role in neurodegenerative disorders, we hypothesised that Cu<sup>II</sup>(atsm) has anti-ferroptosis properties. Utilising cellular and cell-free systems, we found that Cu<sup>II</sup>(atsm) possesses significant anti-ferroptotic activity by acting as a lipid RTA like ferrostatin-1 and liproxstatin-1.

### What is already known

- Cu<sup>II</sup>(atsm) benefits neurodegenerative diseases and their animal models through an uncertain mechanism of action.
- Ferroptosis is a form of regulated cell death implicated in neurodegenerative diseases.

### What this study adds

- Cu<sup>II</sup>(atsm) blocks ferroptotic neuronal death and lipid peroxidation *in vitro* by a radical trapping activity.
- The anti-ferroptotic potency of Cu<sup>II</sup>(atsm) approaches that of liproxstatin-1, a potent anti-ferroptotic reference compound.

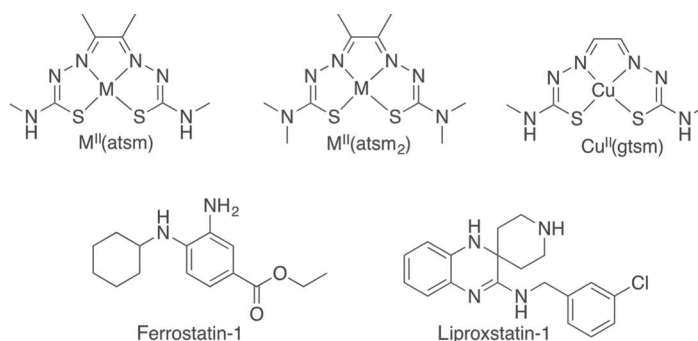
### What is the clinical significance

- Blocking ferroptosis may be the mechanism being tested in current efficacy trials of Cu<sup>II</sup>(atsm).
- Clinical testing of similarly potent anti-ferroptotic agents for neurodegenerative disease warrants further consideration.

## 2 | METHODS

### 2.1 | Bis(thiosemicarbazone) synthesis

H<sub>2</sub>(atsm), Cu<sup>II</sup>(atsm) (Dearling, Lewis, Mullen, Welch, & Blower, 2002; Gingras, Suprunchuk, & Bayley, 1962), Cu<sup>II</sup>(gtsm) (Beraldo, Boyd, & West, 1998) and Cu<sup>II</sup>(atsm<sub>2</sub>) (Gingras et al., 1962; West et al., 1997) were synthesised as reported previously. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} spectra were recorded using a Varian FT-NMR 400 spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). All <sup>1</sup>H NMR spectra were acquired at 400 MHz, and <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} spectra were acquired at 101 MHz. The reported peaks were all referenced to solvent peaks in the order of p.p.m. at 25°C. Microanalysis measurements were carried out by The Campbell Microanalytical Laboratory in the Department of Chemistry, University of Otago, Union Place, Dunedin, New Zealand. Analytical



**FIGURE 1** The chemical structures of M<sup>II</sup>(atsm) and M<sup>II</sup>(atsm<sub>2</sub>) (where M = either Cu<sup>II</sup> or Ni<sup>II</sup>), Cu<sup>II</sup>(gtsm), ferrostatin-1, and liproxstatin-1

HPLC was performed on Agilent 1200 series HPLC system (Agilent Technologies) fitted with an Alltech Hypersil BDS-C18 column ( $4.6 \times 150$  nm,  $5 \mu\text{m}$ ). The mobile phase was a gradient consisting of Solvent A (0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ ) and Solvent B (0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ ) from 0% to 100% B over 25 min and UV detection at  $\lambda$  220, 254, 275 and 350 nm. ESI-QTOF MS was collected on an Exactive Plus Orbitrap Infusion mass spectrometer (Exactive Series, 2.8 Build 268801, ThermoFisher Scientific, Scoresby, Australia). Analysis was performed using Xcalibur 4.0.27.10 (ThermoFisher Scientific, RRID: SCR\_014593).

$\text{Ni}^{\text{II}}$ (atm) synthesis was adapted from a reported procedure (McCleverty & Jones, 1970). To a suspension of diacetyl-bis(4-methyl-3-thiosemicarbazone) (0.50 g, 1.9 mM) in ethanol (25 ml) was added  $\text{Ni}(\text{OCOCH}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0.48 g, 1.9 mM). The reaction mixture was heated at reflux for 5 hr and then allowed to cool to room temperature. The precipitate that formed was collected by filtration and washed with ethanol, water, followed by diethyl ether, to give a dark green powder (0.48 g, 1.5 mM, 79%).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta_{\text{H}}$ /ppm 7.68 (br s, 2H, NH), 2.78 (d,  $J = 3.8$  Hz, 6H, NH- $\text{CH}_3$ ), 1.94 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (101 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta_{\text{C}}$ /ppm 176.08, 155.56, 32.15, 13.82. Analysis calculated for  $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_6\text{NiS}_2$ , C, 30.31; H, 4.45; N, 26.51; found: C, 30.49, H, 4.51, N, 26.85. MS (ESI/O-TOF) ( $m/z$ ): calculated for  $[\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_6\text{NiS}_2 + \text{H}]^+$ , 317.0148; found, 317.0148. RP-HPLC:  $R_t = 10.20$  min.

## 2.2 | Cell culture

The Immuno-related procedures used comply with the recommendations made by the *British Journal of Pharmacology*. Cell culture reagents were purchased from ThermoFisher Scientific unless otherwise specified, and all cells were cultured at  $37^\circ\text{C}$  with 5%  $\text{CO}_2$ . N27 cells, derived from E12 rat mesencephalic tissue (Merck, Bayswater, Australia), were cultured in RPMI 1640 media supplemented with 10% fetal calf serum (Bovogen, Keilor East, Australia), penicillin, and streptomycin. Primary cortical neurons were isolated from E14 C57BL/6J mice (RRID:IMSR\_JAX:000664) as previously described (Xu et al., 2016). Primary cells were maintained in neurobasal media supplemented with 2% B27, GlutaMAX, penicillin and streptomycin. RSL3 could not induce ferroptosis in these cells in the presence of B27, so after 3 days *in vitro* (DIV) the cells were transferred to RPMI 1640 media supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin and streptomycin, with cytosine arabinoside ( $2 \mu\text{M}$ ) to minimise astrocyte growth. Cells were used between DIV9 and DIV11. All cell-based assays were conducted in RPMI 1640 media supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin and streptomycin.

## 2.3 | Cell viability

Cells in 96-well plates were treated with candidate antiferroptotic compounds together with RSL3, erastin or Fe, for 24 hr as described in figure legends. C11-BODIPY(581/591) was not present, and cell

viability was determined colourimetrically using MTT as previously described (Xu et al., 2016). Absorbance was measured at 570 nm using a PowerWave XS microplate spectrophotometer (BioTek Instruments, Winooski, USA) and cell viability was expressed as a percentage of control cells.

## 2.4 | Lipid peroxidation and $\text{Fe}^{\text{II}}$ measurements

Lipid peroxidation was assessed with C11-BODIPY(581/591), a ratiometric fluorophore that responds to lipid peroxidation with an increase in fluorescence emitted in the green range (excitation 484 nm; emission 530 nm) and a corresponding decrease in fluorescence emitted in the red range (excitation 581 nm; emission 600 nm; Pap et al., 1999). Fluorescence was measured with a FlexStation 3 multimode microplate reader (Molecular Devices, San Jose, USA). Lipid peroxidation was expressed as the ratio of green to red C11-BODIPY(581/591) fluorescence.

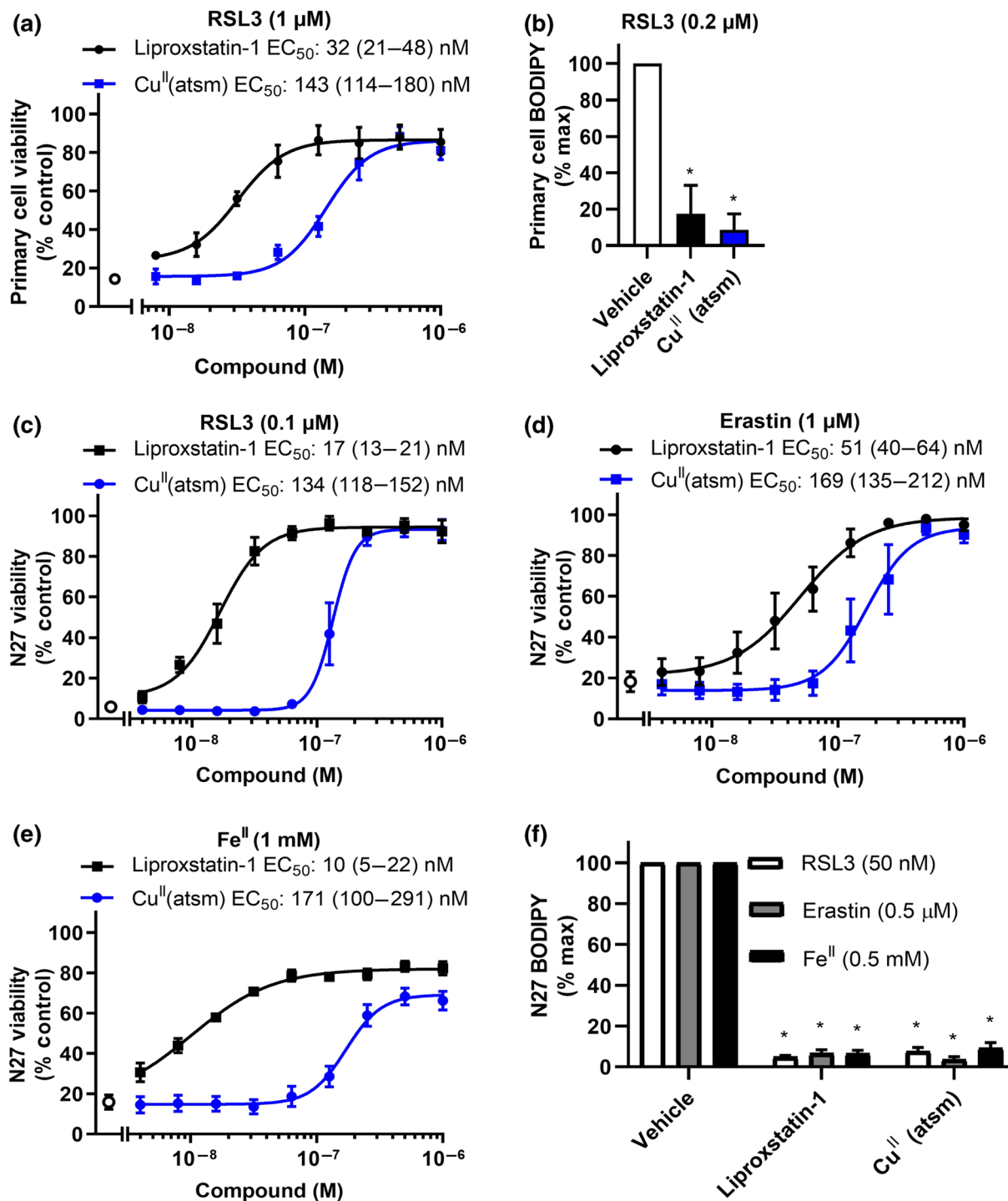
Cells in 96-well plates were incubated with candidate antiferroptotic compounds together with RSL3, erastin or Fe, as described in figure legends. C11-BODIPY(581/591) ( $2.5 \mu\text{M}$ ) was added immediately prior to the addition of the RSL3, erastin or Fe and was present for the duration of the treatment (24 hr). Media was then replaced with PBS for fluorescence measurements. Lipid peroxidation reported by C11-BODIPY(581/591) was normalised to the maximum C11-BODIPY(581/591) signal induced by RSL3, erastin or Fe, therefore adjusting for any potential antiferroptotic effect of the C11-BODIPY(581/591) itself.

Cell-free lipid peroxidation was examined using arachidonic acid in Locke's buffer (NaCl 154 mM; KCl 5.6 mM; HEPES 5 mM; glucose 5 mM;  $\text{MgCl}_2$  1 mM;  $\text{CaCl}_2$  2.3 mM;  $\text{NaHCO}_3$  3.6 mM; pH 7.4). Arachidonic acid was incubated with candidate antiferroptotic compounds together with  $\text{Fe}^{\text{II}}$  ( $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) or  $\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $(\text{NH}_4)_5(\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7)_2$ ) as described in figure legends. C11-BODIPY(581/591) ( $2.5 \mu\text{M}$ ) was added immediately prior to the addition of the Fe and present for the duration of the treatment (30 min).

$\text{Fe}^{\text{II}}$  levels were determined colourimetrically using Ferene-S as previously described (Wong et al., 2014). Absorbance was measured at 590 nm using a PowerWave XS microplate spectrophotometer.  $\text{Fe}^{\text{II}}$  levels were calculated using an extinction coefficient of  $36.6 \text{ mM}^{-1} \text{ Fe}^{\text{II}} \text{ cm}^{-1}$ .

## 2.5 | Data and statistical analyses

The data and statistical analysis comply with the recommendations of the *British Journal of Pharmacology* on experimental design and analysis in pharmacology (Curtis et al., 2018). All quantitative data were analysed using Prism 8.1 (GraphPad Software, San Diego, USA, RRID: SCR\_002798). As test compounds were coloured, the operator and data analysis were not blinded and samples were not randomised. Between two and four technical replicates were used to ensure the reliability of single values within each independent experiment.



**FIGURE 2**  $Cu^{II}(\text{atism})$  rescues ferroptosis and lipid peroxidation in cultured neurons. (a) Viability of cells treated with RSL3 (1  $\mu$ M)  $\pm$  liproxstatin-1 or  $Cu^{II}(\text{atism})$  for 24 hr. Data are means  $\pm$  SEM,  $n = 6$  independent experiments.  $EC_{50}$  was determined by non-linear regression, with 95% CI shown in parenthesis. (b) Lipid peroxidation measured by C11-BODIPY(581/591) in cells treated with RSL3 (0.2  $\mu$ M)  $\pm$  liproxstatin-1 or  $Cu^{II}(\text{atism})$  (1  $\mu$ M) for 24 hr. Data are means  $\pm$  SEM,  $n = 6$  independent experiments.  $P$  values were calculated using the Kruskal–Wallis test corrected for multiple comparisons by controlling the false discovery rate with the Benjamini, Krieger, and Yekutieli test. \* $P < .05$  compared to vehicle treated cells. (c–e) Viability of cells treated with RSL3 (0.1  $\mu$ M, c), erastin (1  $\mu$ M, d) or  $Fe^{II}$  (1 mM, e)  $\pm$  liproxstatin-1 or  $Cu^{II}(\text{atism})$  for 24 hr. Data are means  $\pm$  SEM,  $n = 5$  independent experiments.  $EC_{50}$  was determined by non-linear regression, with 95% CI shown in parenthesis. (f) Lipid peroxidation measured by C11-BODIPY(581/591) in cells treated with RSL3 (50 nM), erastin (0.5  $\mu$ M), or  $Fe^{II}$  (0.5 mM)  $\pm$  liproxstatin-1 or  $Cu^{II}(\text{atism})$  (1  $\mu$ M) for 24 hr. Data are means  $\pm$  SEM,  $n = 5$  independent experiments.  $P$  values were calculated using the Kruskal–Wallis test corrected for multiple comparisons by controlling the false discovery rate with the Benjamini, Krieger, and Yekutieli test. \* $P < .05$  compared to vehicle treated cells

Results are expressed as means  $\pm$  SEM from independent experiments. Cell viability and lipid peroxidation data were normalised to control samples to account for unwanted sources of variation between independent experiments. Comparisons between groups utilised nonparametric statistics and *P* values were calculated using either the Mann-Whitney test or the Kruskal-Wallis test corrected for multiple comparisons by controlling the false discovery rate with the Benjamini, Krieger and Yekutieli test, as described in the figure legends. The post hoc tests were conducted only if *F* achieved *P* < .05 and there was no significant variance inhomogeneity. *P* < .05 was deemed statistically significant. Non-linear regression analysis with a variable slope model was used to fit a four-parameter logistic curve to dose-response data to calculate EC<sub>50</sub> with 95% CI.

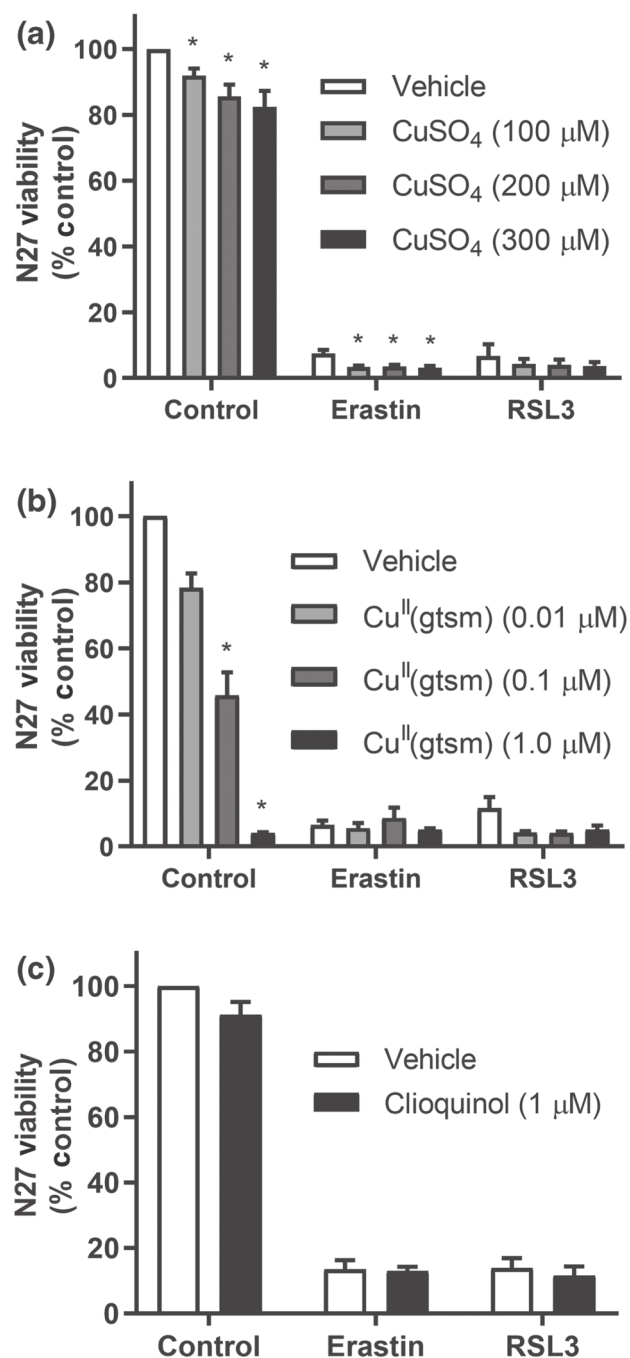
## 2.6 | Materials

Analytical reagents were purchased from Merck (Bayswater, Australia) unless otherwise specified. Erastin, RSL3 (Jomar Bioscience, Scoresby, Australia), liproxstatin-1, clioquinol, C11-BODIPY(581/591) (ThermoFisher Scientific), and bis(thiosemicarbazone) compounds were dissolved in DMSO. 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was dissolved in PBS. CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, (NH<sub>4</sub>)<sub>5</sub>Fe(C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O<sub>7</sub>)<sub>2</sub>, Ferene-S, and bathocuproinidissulfonic acid (BCS) were dissolved in highly purified water. Arachidonic acid was dissolved in ethanol.

## 3 | RESULTS

The impact of Cu<sup>II</sup>(atsm) on ferroptosis was evaluated in primary and immortalised neuronal models, with liproxstatin-1 used as an anti-ferroptotic positive control (Figure 1). Primary cortical neurons were cultured with cytosine arabinoside to suppress astrocyte growth, rendering the culture predominantly neuronal (Figure S1). RSL3 was used to induce lipid peroxidation and ferroptotic cell death. Dose-response experiments revealed that Cu<sup>II</sup>(atsm) (EC<sub>50</sub>:143 nM) could rescue RSL3-induced death in primary neuronal cells with potency within an order of magnitude of liproxstatin-1 (EC<sub>50</sub>: 32 nM; Figure 2a). Both Cu<sup>II</sup>(atsm) and liproxstatin-1 abolished RSL3-induced lipid peroxidation detected by C11-BODIPY(581/591) (Figure 2b), consistent with anti-ferroptotic activity. Inhibition of ferroptosis was next evaluated in immortalised neuronal cell lines, N27 (Figure 2c-f) and SN4741 (-Figure S2), which, unlike primary neurons, were sensitive to ferroptosis induced by both RSL3 and erastin. Cu<sup>II</sup>(atsm) exhibited a dose-dependent rescue of cell death (measured by MTT assay) induced by RSL3 (Figure 2c) and erastin (Figure 2d) with EC<sub>50</sub> values that were within an order of magnitude of those for liproxstatin-1. Similar results were obtained when cell viability was measured by either PrestoBlue or LDH release (Figure S3). Fe<sup>II</sup>-induced cell death was  $\approx$ 80% maximally rescued by Cu<sup>II</sup>(atsm) and liproxstatin-1 (Figure 2e), indicating that Fe<sup>II</sup> induces some nonferroptotic toxicity. Both Cu<sup>II</sup>(atsm) and liproxstatin-1 suppressed lipid peroxidation in N27 cells induced by RSL3, erastin or Fe (Figure 2f). Similar results

were seen when C11-BODIPY(581/591) was added after the RSL3 treatment and detected by flow cytometry (Figure S4). Cu<sup>II</sup>(atsm) and liproxstatin-1 also prevented SN4741 cell death induced by RSL3 and erastin with EC<sub>50</sub> values that were also within an order of magnitude of liproxstatin-1 (Figure S2).

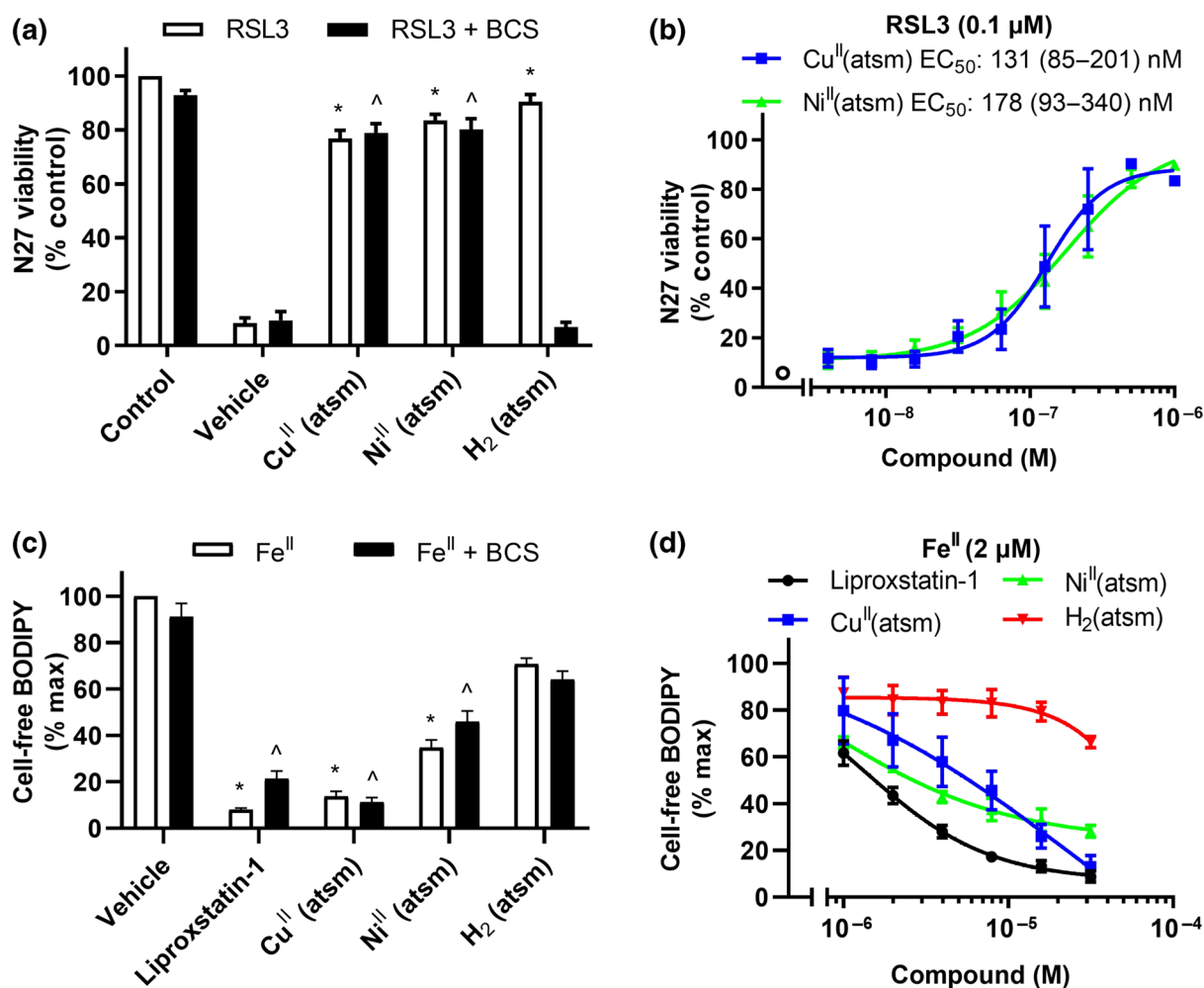


**FIGURE 3** Cu does not prevent ferroptosis in N27 cells. (a-c) Viability of cells treated with RSL3 (0.1 μM) or erastin (1 μM)  $\pm$  CuSO<sub>4</sub> (a), Cu<sup>II</sup>(gtsm) (b), or clioquinol (c) for 24 hr. Data are means  $\pm$  SEM, *n* = 5 independent experiments. (a, b) *P* values were calculated using the Kruskal-Wallis test corrected for multiple comparisons by controlling the false discovery rate with the Benjamini, Krieger, and Yekutieli test. (c) *P* values were calculated using the Mann-Whitney test. \**P* < .05 compared to vehicle

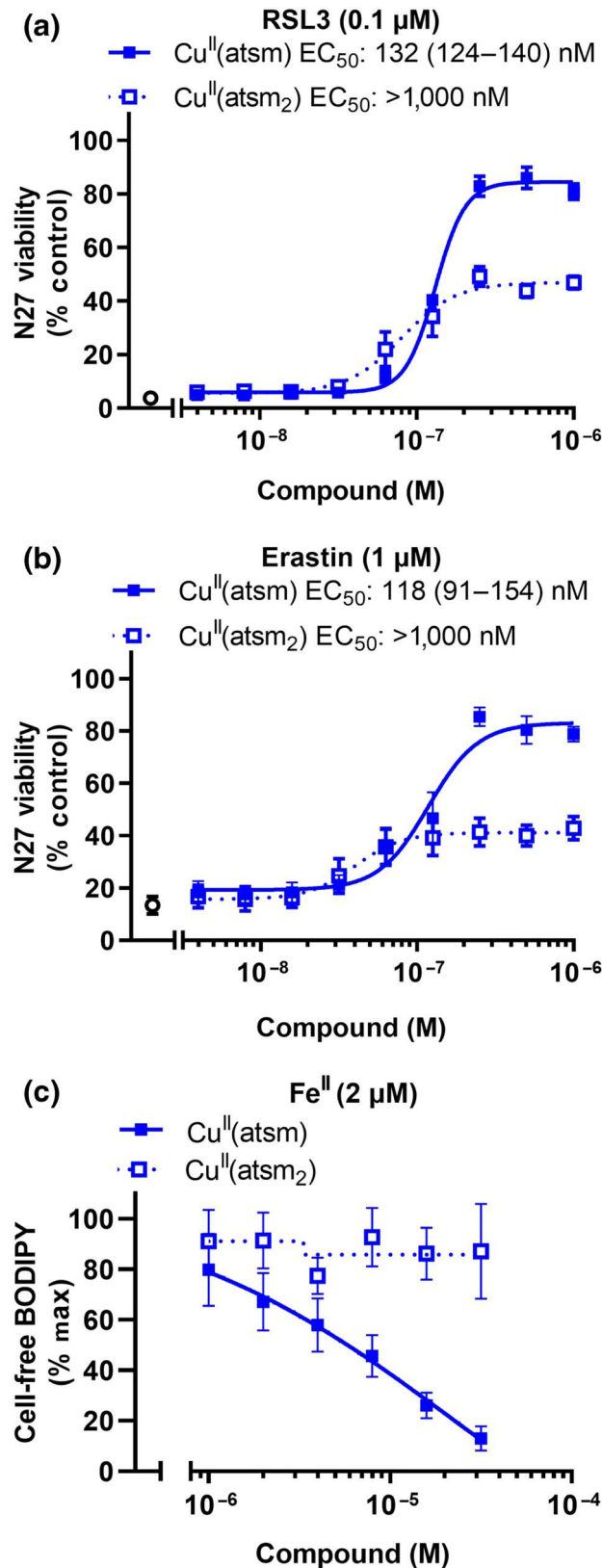
We evaluated whether a simple  $\text{Cu}^{\text{II}}$  salt could prevent ferroptosis in N27 cells (Figure 3). Neither RSL3- nor erastin-induced cell death were prevented by addition of  $\text{CuSO}_4$  supplied at concentrations up to  $300 \mu\text{M}$  (Figure 3a).  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (gtsm) (Figure 3b) and clioquinol (Figure 3c), two compounds that promote cellular Cu uptake (Adlard et al., 2008; Crouch et al., 2009), were also unable to prevent ferroptosis.  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (gtsm) is an analogous bis(thiosemicarbazone) $\text{Cu}^{\text{II}}$  complex that has a higher  $\text{Cu}^{\text{II/I}}$  reduction potential than  $\text{Cu}^{\text{II}}$ (atms) and is therefore more susceptible to intracellular reduction and release of the Cu ion from the ligand (Donnelly et al., 2008). Treatment with

$\geq 100 \text{ nM}$  of  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (gtsm) resulted in significant reductions in cell viability suggesting the anti-ferroptotic effects of  $\text{Cu}^{\text{II}}$ (atms) are unlikely to be mediated by merely increasing intracellular Cu concentrations.

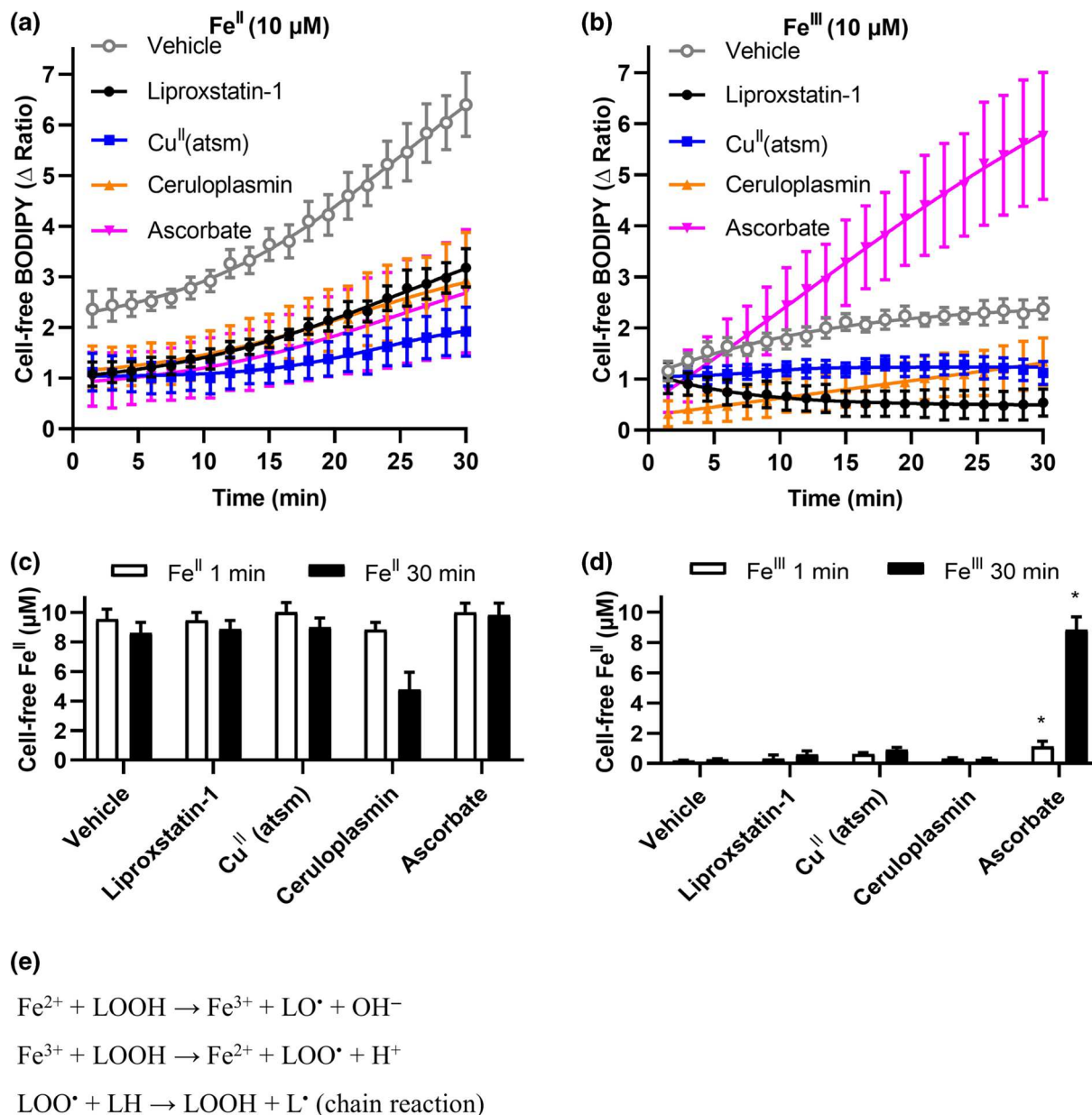
To probe the role of the Cu ion in the anti-ferroptotic activity of  $\text{Cu}^{\text{II}}$ (atms) we investigated the activity of the analogous  $\text{Ni}^{\text{II}}$  complex,  $\text{Ni}^{\text{II}}$ (atms), and the metal-free ligand  $\text{H}_2$ (atms) (Figure 1).  $\text{H}_2$ (atms) and  $\text{Ni}^{\text{II}}$ (atms) both prevented ferroptosis in N27 cells (Figure 4a). It is likely that the activity of  $\text{H}_2$ (atms) is a consequence of the ligand forming  $\text{Cu}^{\text{II}}$ (atms) by complexing Cu ions present in the cell media. BCS, a selective copper chelator (Xiao et al., 2011), abolished the



**FIGURE 4**  $\text{Ni}^{\text{II}}$ (atms) prevents ferroptosis in N27 cells and lipid peroxidation induced by  $\text{Fe}^{\text{II}}$ . (a, b) Viability in cells treated with RSL3 (0.1  $\mu\text{M}$ ) for 24 hr. (a) Cells treated with RSL3  $\pm$   $\text{Cu}^{\text{II}}$ (atms),  $\text{Ni}^{\text{II}}$ (atms) or  $\text{H}_2$ (atms) (1  $\mu\text{M}$ ) for 24 hr in the presence or absence of the Cu chelator BCS (100  $\mu\text{M}$ ). Data are means  $\pm$  SEM,  $n = 6$  independent experiments.  $P$  values were calculated using the Kruskal–Wallis test corrected for multiple comparisons by controlling the false discovery rate with the Benjamini, Krieger, and Yekutieli test. \* $P < .05$  compared to vehicle with RSL3,  $^{\wedge}P < .05$  compared to vehicle with RSL3 and BCS. (b) Cells treated with RSL3  $\pm$   $\text{Cu}^{\text{II}}$ (atms) or  $\text{Ni}^{\text{II}}$ (atms) for 24 hr. Data are means  $\pm$  SEM,  $n = 5$  independent experiments. EC<sub>50</sub> was determined by non-linear regression, with 95% CI shown in parenthesis. (c, d) Lipid peroxidation measured by C11-BODIPY(581/591) in Locke's buffer with arachidonic acid (50  $\mu\text{M}$ ) treated with  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (2  $\mu\text{M}$ ) for 30 min. (c) Arachidonic acid treated with  $\text{Fe}^{\text{II}}$   $\pm$  liproxstatin-1,  $\text{Cu}^{\text{II}}$ (atms),  $\text{Ni}^{\text{II}}$ (atms) or  $\text{H}_2$ (atms) (1  $\mu\text{M}$ ) in the presence or absence of the Cu chelator BCS (12.5  $\mu\text{M}$ ). Data are means  $\pm$  SEM,  $n = 6$  independent experiments.  $P$  values were calculated using the Kruskal–Wallis test corrected for multiple comparisons by controlling the false discovery rate with the Benjamini, Krieger and Yekutieli test. \* $P < .05$  compared to vehicle with Fe,  $^{\wedge}P < .05$  compared to vehicle with  $\text{Fe}^{\text{II}}$  and BCS. (d) Arachidonic acid treated with  $\text{Fe}^{\text{II}}$   $\pm$  liproxstatin-1,  $\text{Cu}^{\text{II}}$ (atms),  $\text{Ni}^{\text{II}}$ (atms), or  $\text{H}_2$ (atms). Data are means  $\pm$  SEM,  $n = 5$  independent experiments



**FIGURE 5**  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atm}_2)$  is impaired in preventing ferroptosis in N27 cells or lipid peroxidation induced by  $\text{Fe}^{\text{II}}$ . (a, b) Viability in cells treated with RSL3 (a, 0.1  $\mu\text{M}$ ) or erastin (b, 1  $\mu\text{M}$ )  $\pm$   $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atm})$  or  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atm}_2)$  for 24 hr. Data are means  $\pm$  SEM,  $n = 5$  independent experiments.  $\text{EC}_{50}$  was determined by non-linear regression, with 95% CI shown in parenthesis.  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atm}_2)$   $\text{EC}_{50}$  could not be determined as viability did not exceed 50%. (c) Lipid peroxidation measured by C11-BODIPY(581/591) in Locke's buffer using arachidonic acid (50  $\mu\text{M}$ ) treated with  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (2  $\mu\text{M}$ )  $\pm$   $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atm})$  or  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atm}_2)$  for 30 min. Data are means  $\pm$  SEM,  $n = 5$  independent experiments



**FIGURE 6**  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atsm})$  does not react with  $\text{Fe}^{\text{II}}$  or  $\text{Fe}^{\text{III}}$  to suppress lipid peroxidation. Arachidonic acid (10 μM) was treated with either  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (10 μM, a, c) or  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (10 μM, b, d) ± ceruloplasmin (200 μg·mL<sup>-1</sup>), ascorbate (1 mM), liproxstatin-1 (10 μM) or  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atsm})$  (10 μM) in Locke's buffer for 30 min. (a, b) Lipid peroxidation was measured by C11-BODIPY(581/591) every 90 sec. Data are means ± SEM,  $n = 5$  independent experiments. Non-linear regression was conducted. (c, d)  $\text{Fe}^{\text{II}}$  measured by Ferene-S after 1 min and 30 min.  $P$  values were calculated using the Kruskal-Wallis test corrected for multiple comparisons by controlling the false discovery rate with the Benjamini, Krieger, and Yekutieli test. \* $P < .05$ , compared to vehicle treated cells. (e) Redox cycling reactions of Fe species that can lead to the propagation of lipid peroxides and radicals

antiferroptotic activity of  $\text{H}_2(\text{atsm})$ , consistent with the premise that the activity of  $\text{H}_2(\text{atsm})$  is due to the ligand coordinating to  $\text{Cu}^{\text{II}}$  in the culture media to form  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atsm})$ .  $\text{Ni}^{\text{II}}(\text{atsm})$  ( $\text{EC}_{50} = 178$  nM) prevented RSL3-induced ferroptosis in N27 cells similarly to  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atsm})$  ( $\text{EC}_{50} = 131$  nM; Figure 4b). Analysis of cellular metal concentrations by inductively coupled plasma MS indicated that  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atsm})$  and  $\text{Ni}^{\text{II}}(\text{atsm})$  increased Cu and Ni levels, respectively (Figure S5). As expected, cellular Fe levels were not altered by addition of any atsm

compounds. Cellular levels of GPX4, a lipid peroxide scavenging peroxidase, were unaffected by treatment with either liproxstatin-1 or  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atsm})$  (Figure S6).

We hypothesised that  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atsm})$  acts as a RTA to prevent the propagation of lipid peroxy radicals, as reported for liproxstatin-1 (Shah, Margison, & Pratt, 2017). Utilising a cell-free system, we assayed the amount of lipid peroxidation with C11-BODIPY(581/591) fluorescence after incubation of arachidonic acid with  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (2 μM). Like

liproxstatin-1, Cu<sup>II</sup>(atsm) and Ni<sup>II</sup>(atsm) inhibited net lipid peroxidation (Figure 4c,d), consistent with RTA activity. H<sub>2</sub>(atsm) partially prevented lipid peroxidation at the highest doses, indicating that the ligand alone possesses some RTA properties. BCS did not change the inhibition of cell-free lipid peroxidation (Figure 4c). Malondialdehyde accumulation, another marker of lipid peroxidation, was also prevented by liproxstatin-1, Cu<sup>II</sup>(atsm), and Ni<sup>II</sup>(atsm) (Figure S7). Whereas liproxstatin-1, Cu<sup>II</sup>(atsm) and Ni<sup>II</sup>(atsm) prevented ferroptosis at nanomolar concentrations (Figure 4b), micromolar concentrations were required to prevent lipid peroxidation induced by Fe<sup>II</sup> in cell-free conditions (Figure 4d). Cu<sup>II</sup>(atsm) also prevents Fe<sup>II</sup>-induced peroxidation of cellular-derived lipids (Figure S8).

We next analysed which structural components of Cu<sup>II</sup>(atsm) were responsible for its anti-ferroptotic and radical quenching properties. Liproxstatin-1 and ferrostatin-1 each contain an aromatic amine that is involved in rapid H-atom transfer to autoxidation chain-carrying lipid peroxy radicals (Figure 1) important for their radical quenching activity (Skouta et al., 2014). Coordination of either Cu<sup>II</sup> or Ni<sup>II</sup> to H<sub>2</sub>(atsm) involves a double deprotonation of the ligand to form a dianionic delocalised ligand. The —NH—CH<sub>3</sub> functional groups present in both Cu<sup>II</sup>(atsm) and Ni<sup>II</sup>(atsm) are a potential H-atom donor to give a delocalised stabilised radical analogous to the aromatic amines present in liproxstatin-1 and ferrostatin-1 (Figure 1). To investigate this possibility, an analogue where these —NH—CH<sub>3</sub> functional groups were replaced with a —N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> functional group, Cu<sup>II</sup>(atsm<sub>2</sub>), was evaluated (Figure 1). The ability of Cu<sup>II</sup>(atsm<sub>2</sub>) to rescue ferroptosis induced by RSL3 or erastin in N27 cells was markedly attenuated when compared to Cu<sup>II</sup>(atsm), although ≈40% survival occurred with doses of Cu<sup>II</sup>(atsm<sub>2</sub>) ≥ 125 nM (Figure 5a,b). In contrast to Cu<sup>II</sup>(atsm), Cu<sup>II</sup>(atsm<sub>2</sub>) was unable to prevent lipid peroxidation induced by Fe<sup>II</sup> in cell-free arachidonic acid (Figure 5c) or in cellular-derived lipids (Figure S8), consistent with —NH—CH<sub>3</sub> functional groups present in both Cu<sup>II</sup>(atsm) and Ni<sup>II</sup>(atsm) contributing to their radical quenching activity.

Lipid peroxidation associated with ferroptosis is thought to be initiated by the oxidation of cellular Fe<sup>II</sup> (Gaschler et al., 2018). To assess whether Cu<sup>II</sup>(atsm) might stabilise Fe<sup>II</sup> as the mechanism of its anti-ferroptotic activity, we assayed the change of Fe redox state in the cell-free lipid peroxidation assay with arachidonic acid. We monitored lipid peroxidation (Figure 6a,b) induced by Fe<sup>II</sup> (Figure 6a,c) and Fe<sup>III</sup> (Figure 6b,d) solutions over 30 min, and Ferene-S was used to measure Fe<sup>II</sup> at the beginning and end of this period (Figure 6c,d). Fe<sup>II</sup> induced a large increase in lipid peroxidation, which had a rapid phase that was largely completed by the time the first measurement could be taken (1 min), followed by a slower continual parabolic accumulation (Figure 6a). Fe<sup>III</sup> induced far less lipid peroxidation, but this slightly accumulated over the 30-min incubation (Figure 6b), consistent with a small amount of redox cycling in the aerobic buffer. The amount of lipid peroxidation detected by C11-BODIPY(581/591) over 30 min was not matched by a decrease in Fe<sup>II</sup> detected by Ferene-S added at the end of the experiment (Figure 6c,d). This indicates that either the C11-BODIPY(581/591) change is being driven by smaller concentrations of Fe<sup>II</sup> than the Ferene-S assay can discriminate or that redox

cycling of Fe<sup>II</sup> drives the lipid peroxidation with no net oxidation of Fe<sup>II</sup> (Figure 6e). Both liproxstatin-1 and Cu<sup>II</sup>(atsm) suppressed lipid peroxidation in the presence of either Fe<sup>II</sup> or Fe<sup>III</sup> (Figure 6a,b). We manipulated the oxidation state of the Fe forms in the experimental system by introducing ceruloplasmin (a ferroxidase that rapidly converts Fe<sup>II</sup> to Fe<sup>III</sup>) or the strong reducing agent, ascorbate (that rapidly converts Fe<sup>III</sup> to Fe<sup>II</sup>). Ceruloplasmin decreased Fe<sup>II</sup> levels (Figure 6c), and limited lipid peroxidation induced by either Fe<sup>II</sup> or Fe<sup>III</sup> (Figure 6a, b). Conversely, ascorbate markedly increased Fe<sup>II</sup> levels when the starting solution contained Fe<sup>III</sup> (Figure 6d), but not when the starting solution contained Fe<sup>II</sup> (Figure 6c). Ascorbate enhanced Fe<sup>III</sup>-induced lipid peroxidation (Figure 6b) but limited Fe<sup>II</sup>-induced lipid peroxidation (Figure 6a). These findings indicate that hampering the redox cycling of the Fe<sup>II</sup>/Fe<sup>III</sup> species, by biasing the environment towards one redox state or the other, limits the peroxidation propagated by the Fe species. Liproxstatin-1 and Cu<sup>II</sup>(atsm) limited lipid peroxidation induced by both Fe<sup>II</sup> and Fe<sup>III</sup> (Figure 6a,b) without altering Fe<sup>II</sup> levels (Figure 6c,d), indicating that these compounds do not quench lipid peroxidation by modulating Fe oxidation or reduction.

## 4 | DISCUSSION

Growing evidence implicates ferroptosis in various neurological disorders. Hence, there is interest in developing high potency and selective ferroptosis inhibitors with favourable pharmacokinetic properties and capable of crossing the blood–brain barrier. When ferroptosis was first described in 2012 (Dixon et al., 2012), Cu<sup>II</sup>(atsm) had already commenced development for neurological disorders after showing efficacy in mouse models of ALS (Hilton et al., 2017; McAllum et al., 2013; Roberts et al., 2014; Soon et al., 2011; Vieira et al., 2017), PD (Hung et al., 2012) and stroke (Huuskonen et al., 2017). Phase 1 trial results of Cu<sup>II</sup>(atsm) for ALS (NCT02870634) recently reported promising benefits on ALSFRS-r score, Edinburgh Cognitive Assessment Scale (ECAS) and forced vital capacity (Rowe et al., 2018). A separate Phase 1 trial of Cu<sup>II</sup>(atsm) for PD (NCT03204929) has more recently reported benefits in disease severity by UPDRS and quality of life by PDQ-39 (Evans et al., 2019). Further testing will be needed to confirm these results, but our current findings indicate that should Cu<sup>II</sup>(atsm) demonstrate clinical efficacy for these disorders, the drug's mechanism of action could be as a ferroptosis inhibitor with potency approaching that of liproxstatin-1.

Cu<sup>II</sup>(atsm) prevents lipid peroxidation without altering the oxidation state of Fe, consistent with Cu<sup>II</sup>(atsm) acting like ferrostatin-1 and liproxstatin-1 to prevent propagation of the lipid radicals rather than to prevent Fe<sup>II</sup> oxidation. The anti-ferroptotic activity of ferrostatin-1 and liproxstatin-1 is due to their ability to inhibit lipid peroxidation by rapid transfer of a H atom from their aryl amine moieties to lipid radicals, thereby quenching the lipid radical (Shah et al., 2017). Coordination of divalent Cu<sup>II</sup> and Ni<sup>II</sup> to bis(thiosemicarbazone) ligands involves a double deprotonation of the ligand to give a resonance stabilised conjugated conformation of the ligand where the NH-4-methyl

substituent could be a possible H atom donor that could be considered comparable to the aryl amine present in both ferrostatin-1 and liproxstatin-1. The redox activity of bis(thiosemicarbazone) $\text{Cu}^{\text{II}}$  complexes is not confined to the metal ion. Conjugated thiosemicarbazone ligands are redox noninnocent (Haddad, Cronin, Mashuta, Buchanan, & Grapperhaus, 2017; Holland, Green, & Dilworth, 2006; Kowol et al., 2008). The cyclic voltammogram of  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atsm})$  reveals not only a reversible  $\text{Cu}^{\text{III/I}}$  process at  $E^0 = -1.20$  V versus ferricenium/ferrocene ( $\text{Fc}^+/\text{Fc}$ ) in dimethylformamide but also a reversible oxidation at higher potentials,  $E^0 = 0.24$  V versus  $\text{Fc}^+/\text{Fc}$  in DMF (Dearling et al., 2002). This reversible process has been attributed to  $\text{Cu}^{\text{III/II}}$ , but density functional theory calculations suggest that the highest occupied molecular orbital is ligand based with  $\pi$ -character taking a small contribution from the metal  $d_{xy}$  orbital (Holland et al., 2006).

Either of the two NH-methyl substituents present in  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atsm})$  could serve as H atom donor where the radical generated could be stabilised by delocalisation over the conjugated ligand backbone. This possibility was investigated in two ways. Firstly, the importance of the conjugated ligand backbone was demonstrated by the observation that the analogous  $\text{Ni}^{\text{II}}(\text{atsm})$  displayed comparable cytoprotective activity to  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atsm})$ . This important observation suggests that the role of the metal ions, in this instance, is to promote the deprotonation of the ligand to provide the delocalised conjugated conformation of the bis(thiosemicarbazone) ligand. Secondly, the importance of the potential H atom donor of the  $-\text{N}-\text{CH}_3$  substituent was demonstrated by investigating an analogue where this H atom is replaced with a second methyl substituent,  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ , to give  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atsm}_2)$ . The  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atsm}_2)$  complex, which lacks a potential H donor, was unable to prevent lipid peroxidation induced by  $\text{Fe}^{\text{II}}$  in a cell-free system and was far less efficacious than  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atsm})$  in rescuing ferroptosis in N27 cells and cell-free lipid peroxidation induced by  $\text{Fe}^{\text{II}}$ .

In summary,  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atsm})$  possesses unexpected RTA properties similar to the anti-ferroptosis agents, liproxstatin-1 and ferrostatin-1. This may explain how  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atsm})$  suppressed lipid peroxidation in a myocardial ischaemia/reperfusion model (Wada, Fujibayashi, Tajima, & Yokoyama, 1994), just as liproxstatin-1 and ferrostatin-1 rescue models of ischaemia/reperfusion (Friedmann Angeli et al., 2014; Tuo et al., 2017). The potency of  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atsm})$  is within an order of magnitude of the canonical ferroptosis inhibitor, liproxstatin-1, while its oral bioavailability, preclinical safety, and brain penetrant properties make it an attractive investigational product for clinical trials of ferroptosis-related diseases. The anti-ferroptotic properties of  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atsm})$  could be the prospective disease-modifying mechanism being explored in current ALS and PD clinical trials.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This project was funded by grants from the National Health and Medical Research Council, Motor Neurone Disease Research Institute of Australia (Betty Laidlaw MND Grant), and Fight MND.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.S., A.A.B., K.J.B., P.J.C., S.A., P.S.D., and A.I.B. participated in research design; A.S., K.S., K.M.A., K.A.D., and I.V. conducted the

research; K.S. and P.D. contributed new reagents; A.S., K.J.B., P.S.D., and A.I.B. performed data analysis; A.S., K.J.B., P.S.D., and A.I.B. contributed to the writing of the manuscript.

## CONFLICT OF INTEREST

A.I.B. is a shareholder in Prana Biotechnology Ltd, Cogstate Ltd, Brighton Biotech LLC, Grunbiotics Pty Ltd, Eucalyptus Pty Ltd, and Mesoblast Ltd. He is a paid consultant for, and has a profit share interest in, Collaborative Medicinal Development Pty Ltd. P.S.D. has served as a consultant to Collaborative Medicinal Development LLC. Collaborative Medicinal Development LLC has licensed intellectual property related to this subject from The University of Melbourne, where the inventors include P.S.D. and K.J.B.

## DECLARATION OF TRANSPARENCY AND SCIENTIFIC RIGOUR

This Declaration acknowledges that this paper adheres to the principles for transparent reporting and scientific rigour of preclinical research as stated in the BJP guidelines for [Design & Analysis](#), and [Immunoblotting and Immunochemistry](#), and as recommended by funding agencies, publishers and other organisations engaged with supporting research.

## ORCID

Kathryn Szostak  <https://orcid.org/0000-0002-7473-5283>

Scott Ayton  <https://orcid.org/0000-0002-3479-2427>

Ashley I. Bush  <https://orcid.org/0000-0001-8259-9069>

## REFERENCES

- Adlard, P. A., Cherny, R. A., Finkelstein, D. I., Gautier, E., Robb, E., Cortes, M., ... Bush, A. I. (2008). Rapid restoration of cognition in Alzheimer's transgenic mice with 8-hydroxy quinoline analogs is associated with decreased interstitial  $\text{A}\beta$ . *Neuron*, 59, 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.06.018>
- Ayton, S., Fazlollahi, A., Bourgeat, P., Raniga, P., Ng, A., Lim, Y. Y., ... Bush, A. I. (2017). Cerebral quantitative susceptibility mapping predicts amyloid- $\beta$ -related cognitive decline. *Brain*, 140, 2112–2119. <https://doi.org/10.1093/brain/awx137>
- Ayton, S., Lei, P., Hare, D. J., Duce, J. A., George, J. L., Adlard, P. A., ... Bush, A. I. (2015). Parkinson's disease iron deposition caused by nitric oxide-induced loss of  $\beta$ -amyloid precursor protein. *The Journal of Neuroscience*, 35, 3591–3597. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3439-14.2015>
- Beraldo, H., Boyd, L. P., & West, D. X. (1998). Copper(II) and nickel(II) complexes of glyoxaldehyde bis(N(3)-substituted thiosemicarbazones). *Transition Metal Chemistry*, 23, 67–71.
- Cherubini, A., Ruggiero, C., Polidori, M. C., & Mecocci, P. (2005). Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology & Medicine*, 39, 841–852.
- Choi, I. Y., Lee, P., Statland, J., McVey, A., Dimachkie, M., Brooks, W., & Barohn, R. (2015). Reduction in cerebral antioxidant, glutathione (GSH), in patients with ALS: A preliminary study. *Neurology*, 84(14 Supplement), P6.105.
- Crouch, P. J., Hung, L. W., Adlard, P. A., Cortes, M., Lal, V., Filiz, G., ... Barnham, K. J. (2009). Increasing Cu bioavailability inhibits  $\text{A}\beta$  oligomers and  $\tau$  phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 381–386. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809057106>

- Curtis, M. J., Alexander, S., Cirino, G., Docherty, J. R., George, C. H., Giembycz, M. A., ... Ahluwalia, A. (2018). Experimental design and analysis and their reporting II: Updated and simplified guidance for authors and peer reviewers. *British Journal of Pharmacology*, *175*, 987–993. <https://doi.org/10.1111/bph.14153>
- Dearling, J. L., Lewis, J. S., Mullen, G. E., Welch, M. J., & Blower, P. J. (2002). Copper bis(thiosemicarbazone) complexes as hypoxia imaging agents: Structure–activity relationships. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *7*, 249–259.
- Dexter, D. T., Carter, C. J., Wells, F. R., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Lees, A., ... Marsden, C. D. (1989). Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, *52*, 381–389. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1989.tb09133.x>
- Ding, H., Yan, C. Z., Shi, H., Zhao, Y. S., Chang, S. Y., Yu, P., ... Duan, X. L. (2011). Hepcidin is involved in iron regulation in the ischemic brain. *PLoS ONE*, *6*, e25324–25333. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025324>
- Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., ... Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, *149*, 1060–1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>
- Do Van, B., Gouel, F., Jonneaux, A., Timmerman, K., Gele, P., Petrault, M., ... Devedjian, J. C. (2016). Ferroptosis, a newly characterized form of cell death in Parkinson's disease that is regulated by PKC. *Neurobiology of Disease*, *94*, 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.05.011>
- Donnelly, P. S., Caragounis, A., Du, T., Laughton, K. M., Volitakis, I., Cherny, R. A., ... White, A. R. (2008). Selective intracellular release of copper and zinc ions from bis(thiosemicarbazone) complexes reduces levels of Alzheimer disease amyloid- $\beta$  peptide. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*, 4568–4577. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705957200>
- Evans, A., Rowe, D., Lee, W., Noel, K., & Rosenfeld, C. (2019). Preliminary evidence of CuATSM treatment benefit in Parkinson's disease. In XXIV World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders. Montreal, Canada, pp 119–120.
- Friedmann Angeli, J. P., Schneider, M., Proneth, B., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Hammond, V. J., ... Conrad, M. (2014). Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nature Cell Biology*, *16*, 1180–1191. <https://doi.org/10.1038/ncb3064>
- Gaschler, M. M., Andia, A. A., Liu, H., Csuka, J. M., Hurlocker, B., Vaiana, C. A., ... Stockwell, B. R. (2018). FINO2 initiates ferroptosis through GPX4 inactivation and iron oxidation. *Nature Chemical Biology*, *14*, 507–515. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0031-6>
- Gingras, B. A., Suprunchuk, T., & Bayley, C. H. (1962). The preparation of some thiosemicarbazones and their copper complexes. *Canadian Journal of Chemistry*, *40*, 1053–1059.
- Grolez, G., Moreau, C., Danel-Brunaud, V., Delmaire, C., Lopes, R., Pradat, P. F., ... Devos, D. (2016). The value of magnetic resonance imaging as a biomarker for amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review. *BMC Neurology*, *16*, 155–171. <https://doi.org/10.1186/s12883-016-0672-6>
- Guiney, S. J., Adlard, P. A., Bush, A. I., Finkelstein, D. I., & Ayton, S. (2017). Ferroptosis and cell death mechanisms in Parkinson's disease. *Neurochemistry International*, *104*, 34–48.
- Haddad, A. Z., Cronin, S. P., Mashuta, M. S., Buchanan, R. M., & Grapperhaus, C. A. (2017). Metal-assisted ligand-centered electrocatalytic hydrogen evolution upon reduction of a bis(thiosemicarbazone)Cu(II) complex. *Inorganic Chemistry*, *56*, 11254–11265.
- Hilton, J. B., Mercer, S. W., Lim, N. K., Faux, N. G., Buncic, G., Beckman, J. S., ... Crouch, P. J. (2017). Cu<sup>II</sup>(atsm) improves the neurological phenotype and survival of SOD1<sup>G93A</sup> mice and selectively increases enzymatically active SOD1 in the spinal cord. *Scientific Reports*, *7*, 42292–42302. <https://doi.org/10.1038/srep42292>
- Holland, J. P., Green, J. C., & Dilworth, J. R. (2006). Probing the mechanism of hypoxia selectivity of copper bis(thiosemicarbazone) complexes: DFT calculation of redox potentials and absolute acidities in solution. *Dalton Transactions*, 783–794.
- Homma, T., Kobayashi, S., Sato, H., & Fujii, J. (2019). Edaravone, a free radical scavenger, protects against ferroptotic cell death in vitro. *Experimental Cell Research*, *384*, 111592–111600. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.111592>
- Hung, L. W., Villemagne, V. L., Cheng, L., Sherratt, N. A., Ayton, S., White, A. R., ... Barnham, K. J. (2012). The hypoxia imaging agent Cu<sup>II</sup>(atsm) is neuroprotective and improves motor and cognitive functions in multiple animal models of Parkinson's disease. *The Journal of Experimental Medicine*, *209*, 837–854. <https://doi.org/10.1084/jem.20112285>
- Huuskonen, M. T., Tuo, Q. Z., Loppi, S., Dhungana, H., Korhonen, P., McInnes, L. E., ... Kanninen, K. M. (2017). The copper bis(thiosemicarbazone) complex Cu<sup>II</sup>(atsm) is protective against cerebral ischemia through modulation of the inflammatory milieu. *Neurotherapeutics*, *14*, 519–532. <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0504-9>
- Ikawa, M., Okazawa, H., Kudo, T., Kuriyama, M., Fujibayashi, Y., & Yoneda, M. (2011). Evaluation of striatal oxidative stress in patients with Parkinson's disease using [<sup>62</sup>Cu]ATSM PET. *Nuclear Medicine and Biology*, *38*, 945–951.
- Ikawa, M., Okazawa, H., Tsujikawa, T., Matsunaga, A., Yamamura, O., Mori, T., ... Yoneda, M. (2015). Increased oxidative stress is related to disease severity in the ALS motor cortex: A PET study. *Neurology*, *84*, 2033–2039. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001588>
- Jenner, P., Dexter, D. T., Sian, J., Schapira, A. H., & Marsden, C. D. (1992). Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease. The Royal Kings and Queens Parkinson's Disease Research Group. *Annals of Neurology*, *32*(Suppl), S82–S87. <https://doi.org/10.1002/ana.410320714>
- Kowol, C. R., Reisner, E., Chiorescu, I., Arion, V. B., Galanski, M., Deubel, D. V., & Keppler, B. K. (2008). An electrochemical study of antineoplastic gallium, iron and ruthenium complexes with redox non-innocent  $\alpha$ -N-heterocyclic chalcogensemicarbazones. *Inorganic Chemistry*, *47*, 11032–11047.
- Mandal, P. K., Saharan, S., Tripathi, M., & Murari, G. (2015). Brain glutathione levels—A novel biomarker for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Biological Psychiatry*, *78*, 702–710.
- Masaldan, S., Bush, A. I., Devos, D., Rolland, A. S., & Moreau, C. (2018). Striking while the iron is hot: Iron metabolism and ferroptosis in neurodegeneration. *Free Radical Biology & Medicine*, *133*, 221–233.
- McAllum, E. J., Lim, N. K., Hickey, J. L., Paterson, B. M., Donnelly, P. S., Li, Q. X., ... Crouch, P. J. (2013). Therapeutic effects of Cu<sup>II</sup>(atsm) in the SOD1-G37R mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis & Frontotemporal Degeneration*, *14*, 586–590. <https://doi.org/10.3109/21678421.2013.824000>
- McCleverty, J. A., & Jones, C. J. (1970). Complexes of transition metals with Schiff bases and the factors influencing their redox properties. I. Nickel and copper complexes of some diketone bis-thiosemicarbazones. *Journal of the Chemical Society [Section] a: Inorganic, Physical, Theoretical*, 2829–2836.
- Pap, E. H., Drummen, G. P., Winter, V. J., Kooij, T. W., Rijken, P., Wirtz, K. W., ... Post, J. A. (1999). Ratio-fluorescence microscopy of lipid oxidation in living cells using C11-BODIPY<sup>581/591</sup>. *FEBS Letters*, *453*, 278–282. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00696-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00696-1)
- Park, U. J., Lee, Y. A., Won, S. M., Lee, J. H., Kang, S. H., Springer, J. E., ... Gwag, B. J. (2011). Blood-derived iron mediates free radical production and neuronal death in the hippocampal CA1 area following transient forebrain ischemia in rat. *Acta Neuropathologica*, *121*, 459–473. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0785-8>
- Pyatigorskaya, N., Sharman, M., Corvol, J. C., Valabregue, R., Yahia-Cherif, L., Poupon, F., ... Lehericy, S. (2015). High nigral iron deposition

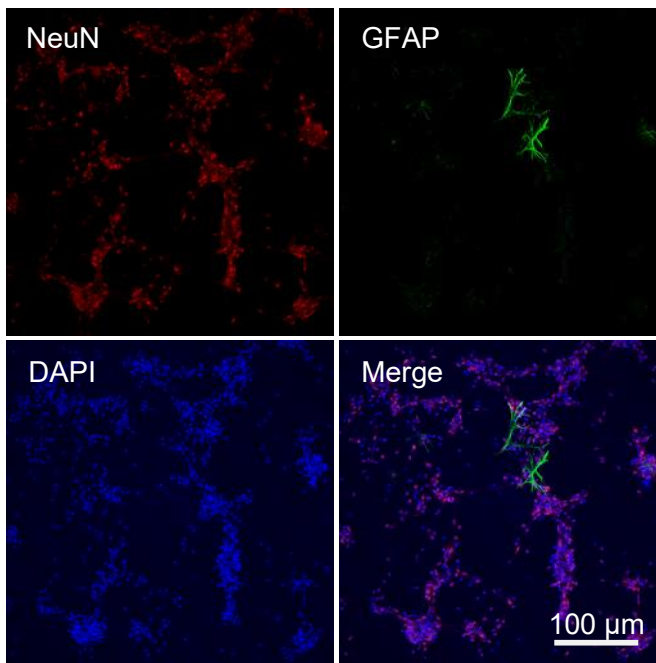
- in LRRK2 and Parkin mutation carriers using R2\* relaxometry. *Movement Disorders*, 30, 1077–1084. <https://doi.org/10.1002/mds.26218>
- Raven, E. P., Lu, P. H., Tishler, T. A., Heydari, P., & Bartzokis, G. (2013). Increased iron levels and decreased tissue integrity in hippocampus of Alzheimer's disease detected in vivo with magnetic resonance imaging. *Journal of Alzheimer's Disease*, 37, 127–136.
- Reed, T. T., Pierce, W. M., Markesbery, W. R., & Butterfield, D. A. (2009). Proteomic identification of HNE-bound proteins in early Alzheimer disease: Insights into the role of lipid peroxidation in the progression of AD. *Brain Research*, 1274, 66–76.
- Roberts, B. R., Lim, N. K., McAllum, E. J., Donnelly, P. S., Hare, D. J., Doble, P. A., ... Crouch, P. J. (2014). Oral treatment with Cu<sup>II</sup>(atms) increases mutant SOD1 in vivo but protects motor neurons and improves the phenotype of a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Neuroscience*, 34, 8021–8031.
- Rowe, D., Mathers, S., Smith, G., Windebank, E., Rogers, M., Noel, K., & Rosenfeld, C. (2018). Modification of ALS disease progression in a phase 1 trial of CuATSM. *Amyotrophic Lateral Sclerosis & Frontotemporal Degeneration*, 19(Suppl. S1), 280–281.
- Shah, R., Margison, K., & Pratt, D. A. (2017). The potency of diarylamine radical-trapping antioxidants as inhibitors of ferroptosis underscores the role of autoxidation in the mechanism of cell death. *ACS Chemical Biology*, 12, 2538–2545.
- Sheng, X., Shan, C., Liu, J., Yang, J., Sun, B., & Chen, D. (2017). Theoretical insights into the mechanism of ferroptosis suppression via inactivation of a lipid peroxide radical by liproxstatin-1. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19, 13153–13159.
- Sian, J., Dexter, D. T., Lees, A. J., Daniel, S., Agid, Y., Javoy-Agid, F., ... Marsden, C. D. (1994). Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Annals of Neurology*, 36, 348–355.
- Simpson, E. P., Henry, Y. K., Henkel, J. S., Smith, R. G., & Appel, S. H. (2004). Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: A potential biomarker of disease burden. *Neurology*, 62, 1758–1765.
- Skouta, R., Dixon, S. J., Wang, J., Dunn, D. E., Orman, M., Shimada, K., ... Stockwell, B. R. (2014). Ferrostatins inhibit oxidative lipid damage and cell death in diverse disease models. *Journal of the American Chemical Society*, 136, 4551–4556.
- Soon, C. P., Donnelly, P. S., Turner, B. J., Hung, L. W., Crouch, P. J., Sherratt, N. A., ... Li, Q. X. (2011). Diacetyl-bis(N(4)-methylthiosemicarbazone) copper (II) (Cu<sup>II</sup>(atms)) protects against peroxynitrite-induced nitrosative damage and prolongs survival in amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 44035–44044.
- Stockwell, B. R., Friedmann Angeli, J. P., Bayir, H., Bush, A. I., Conrad, M., Dixon, S. J., ... Zhang, D. D. (2017). Ferroptosis: A regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease. *Cell*, 171, 273–285.
- Tao, Y., Wang, Y., Rogers, J. T., & Wang, F. (2014). Perturbed iron distribution in Alzheimer's disease serum, cerebrospinal fluid, and selected brain regions: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Alzheimer's Disease*, 42, 679–690.
- Tohgi, H., Abe, T., Yamazaki, K., Murata, T., Ishizaki, E., & Isobe, C. (1999). Increase in oxidized NO products and reduction in oxidized glutathione in cerebrospinal fluid from patients with sporadic form of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*, 260, 204–206.
- Tuo, Q. Z., Lei, P., Jackman, K. A., Li, X. L., Xiong, H., Li, X. L., ... Bush, A. I. (2017).  $\tau$ -mediated iron export prevents ferroptotic damage after ischemic stroke. *Molecular Psychiatry*, 22, 1520–1530.
- Vieira, F. G., Hatzipetros, T., Thompson, K., Moreno, A. J., Kidd, J. D., Tassinari, V. R., ... Gill, A. (2017). CuATSM efficacy is independently replicated in a SOD1 mouse model of ALS while unmetallated ATSM therapy fails to reveal benefits. *IBRO Rep*, 2, 47–53.
- Wada, K., Fujibayashi, Y., Tajima, N., & Yokoyama, A. (1994). Cu-ATSM, an intracellular-accessible superoxide dismutase (SOD)-like copper complex: Evaluation in an ischemia-reperfusion injury model. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 17, 701–704.
- West, D. X., Ives, J. S., Bain, G. A., Liberta, A. E., Valdes-Martinez, J., Ebert, K. H., & Hernandez-Ortega, S. (1997). Copper(II) and nickel(II) complexes of 2,3-butanedione bis(N(3)-substituted thiosemicarbazones). *Polyhedron*, 16, 1895–1905.
- Wong, B. X., Ayton, S., Lam, L. Q., Lei, P., Adlard, P. A., Bush, A. I., & Duce, J. A. (2014). A comparison of ceruloplasmin to biological polyanions in promoting the oxidation of Fe<sup>2+</sup> under physiologically relevant conditions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840, 3299–3310.
- Xiao, Z., Brose, J., Schimo, S., Ackland, S. M., La Fontaine, S., & Wedd, A. G. (2011). Unification of the copper(I) binding affinities of the metallo-chaperones Atx1, Atox1, and related proteins: Detection probes and affinity standards. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 11047–11055.
- Xu, H., Perreau, V. M., Dent, K. A., Bush, A. I., Finkelstein, D. I., & Adlard, P. A. (2016). Iron regulates apolipoprotein E expression and secretion in neurons and astrocytes. *Journal of Alzheimer's Disease*, 51, 471–487.
- Yu, G., Liang, Y., Huang, Z., Jones, D. W., Pritchard, K. A. Jr., & Zhang, H. (2016). Inhibition of myeloperoxidase oxidant production by N-acetyl lysyltyrosylcysteine amide reduces brain damage in a murine model of stroke. *Journal of Neuroinflammation*, 13, 119–131.
- Zilka, O., Shah, R., Li, B., Friedmann Angeli, J. P., Griesser, M., Conrad, M., & Pratt, D. A. (2017). On the mechanism of cytoprotection by ferrostatin-1 and liproxstatin-1 and the role of lipid peroxidation in ferroptotic cell death. *ACS Central Science*, 3, 232–243.

## SUPPORTING INFORMATION

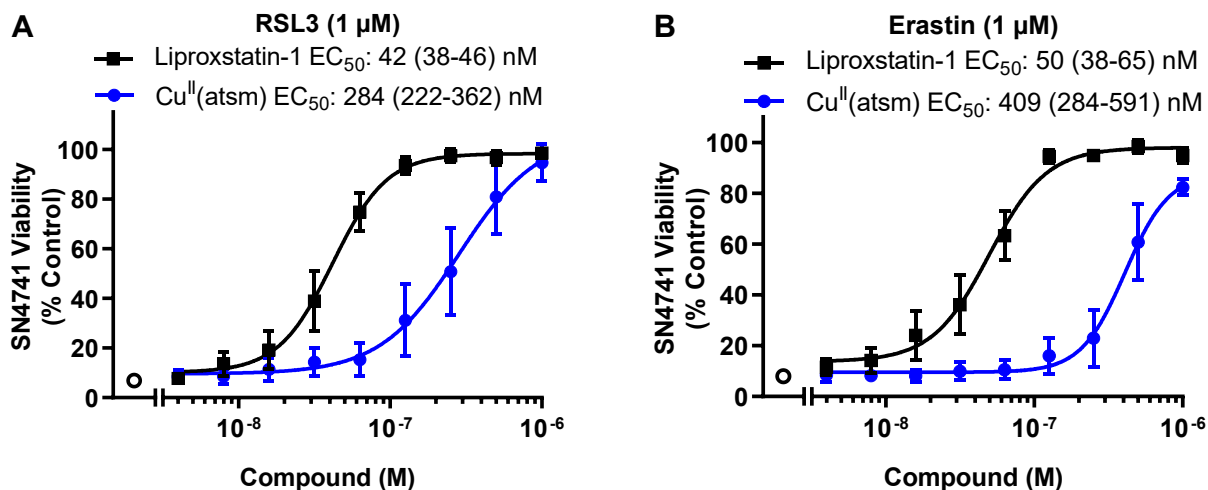
Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**How to cite this article:** Southon A, Szostak K, Acevedo KM, et al. Cu<sup>II</sup>(atms) inhibits ferroptosis: Implications for treatment of neurodegenerative disease. *Br J Pharmacol*. 2020;177: 656–667. <https://doi.org/10.1111/bph.14881>

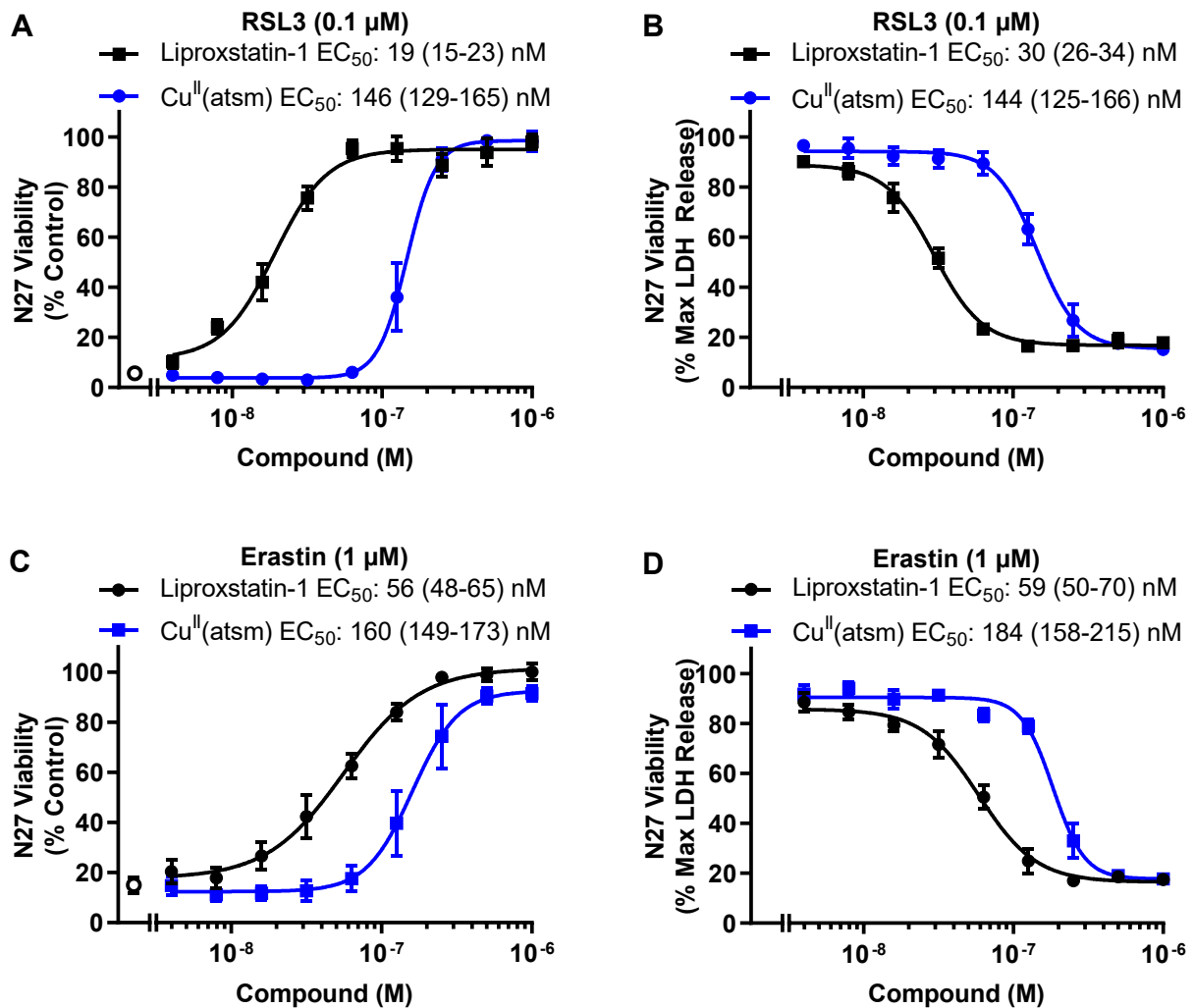
## Supporting Information



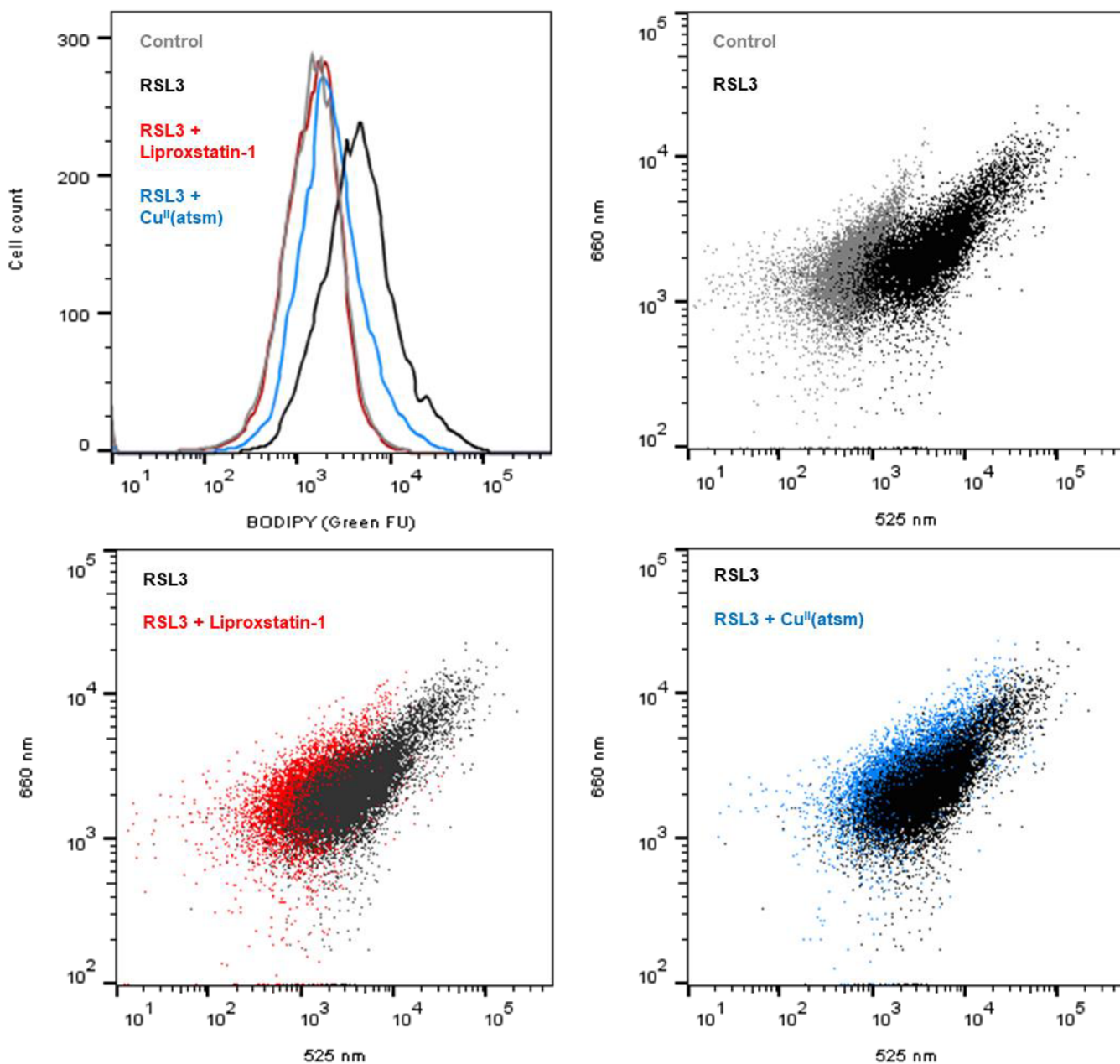
**Figure S1** Primary cortical cultures were predominantly neuronal. Primary cortical cells were grown on poly-D lysine coated 12 mm glass coverslips until DIV9 and prepared for immunocytochemistry as previously described (Xu, Perreau et al., 2016). Anti-neuron-specific nuclear protein (1:200) and anti-mouse Alexa 488 (1:400, ThermoFisher Scientific, Scoresby, Australia) were used to identify neurons (red). Anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1:400) and anti-guinea pig Alexa 647 (1:400, ThermoFisher Scientific) were used to identify astrocytes (green). DAPI (300 nM, ThermoFisher Scientific) was used to detect nuclei (blue). Images were recorded at 20X magnification using an SP8 confocal microscope with Leica Application Suite X software (Leica Microsystems, Macquarie Park, Australia). Images at each wavelength were captured sequentially and multi-colour XY images were prepared using Image J (Schneider, Rasband et al., 2012). XY images are shown as maximum brightness stacked images. Representative images are shown.



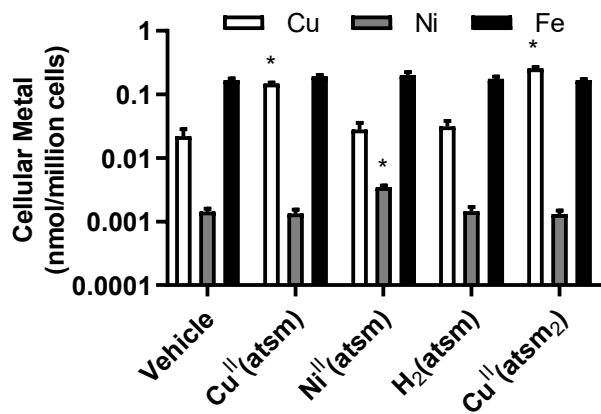
**Figure S2**  $\text{Cu}^{\text{II}}$ (atism) prevents ferroptosis in SN4741 cells. Cells were derived from E13.5 mouse substantia nigra tissue (Son, Chun et al., 1999) and cultured as per N27 cells. Viability of cells treated with RSL3 (1  $\mu\text{M}$ , A) or erastin (1  $\mu\text{M}$ , B)  $\pm$  liproxstatin-1 or  $\text{Cu}^{\text{II}}$ (atism) for 24 hr. Viability was measured with MTT and expressed as a percentage of control cells. Data are means  $\pm$  SEM,  $n=5$  independent experiments.  $\text{EC}_{50}$  was determined by nonlinear regression, with 95% CI shown in parenthesis.



**Figure S3**  $Cu^{II}(atSm)$  prevents ferroptosis in N27 cells. Viability of cells treated with RSL3 (0.1  $\mu$ M, A-B) or erastin (1  $\mu$ M, C-D)  $\pm$  liproxstatin-1 or  $Cu^{II}(atSm)$  for 24 hr. (A and C) Viability was measured with PrestoBlue according to the manufacturer's instructions (ThermoFisher Scientific) and expressed as a percentage of control cells. (B and D) Viability measured with the Cytotoxicity Detection Kit (LDH) according to the manufacturer's instructions (Merck, Bayswater, Australia) and expressed as a percentage of maximum lactate dehydrogenase (LDH) release. Data are means  $\pm$  SEM,  $n=5$  independent experiments.  $EC_{50}$  was determined by nonlinear regression, with 95% CI shown in parenthesis.



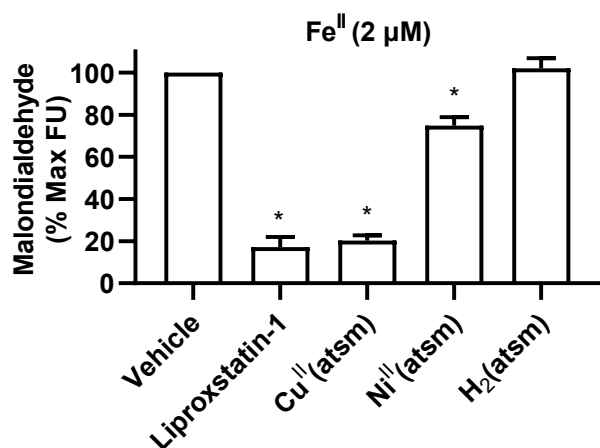
**Figure S4**  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atm})$  prevents lipid peroxidation in N27 cells. Cells were cultured in 6 well plates and treated in growth media with RSL3 (50 nM)  $\pm$  liproxstatin-1 or  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atm})$  (1  $\mu\text{M}$ ) for 4 hr. Cells were washed in PBS and incubated in growth media with C11-BODIPY(581/591) (125 nM) for 1 hr. Cells were harvested with trypsin and resuspended in PBS containing: EDTA 1 mM, HEPES 25 mM, foetal calf serum 1%, penicillin and streptomycin. Cells were strained through a 35  $\mu\text{m}$  cell strainer (Corning, Mulgrave, Australia) and green fluorescence (excitation 488 nm, emission 525 nm) and red fluorescence (excitation 633 nm, emission 660 nm) were detected using a CytoFLEX S flow cytometer (Beckman Coulter, Mount Waverly, Australia). A minimum of 10000 cells were analysed per condition. Representative data from one of three experiments is shown.



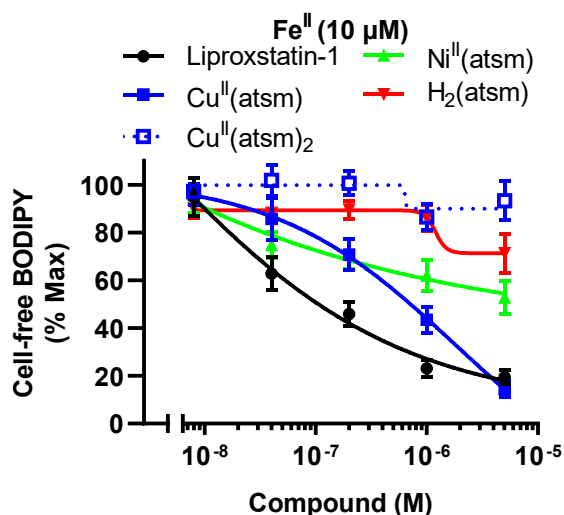
**Figure S5** Ni<sup>II</sup>(at<sub>sm</sub>) does not promote Cu uptake in N27 cells. Cells were treated with Cu<sup>II</sup>(at<sub>sm</sub>), Cu<sup>II</sup>(at<sub>sm</sub>)<sub>2</sub> or Ni<sup>II</sup>(at<sub>sm</sub>) (1 μM) for 24 h. Cellular metal levels were measured with inductively coupled plasma mass spectrometry analysis using an Agilent 7700x (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) as reported previously (Bica, Liddell et al., 2014). Data are means ± SEM, *n*=5 independent experiments. *P* values were calculated using one-way ANOVA corrected for multiple comparisons with Dunnett's post-hoc test. A Brown-Forsythe test confirmed variance was not significantly different between groups and a Kolmogorov-Smirnov test confirmed residuals were normally distributed. \**P*<0.05 compared to vehicle treated cells.



**Figure S6** Cu<sup>II</sup>(atm) does not elevate GPX4 levels in N27 cells. Cells treated with erastin (1  $\mu$ M) or RSL3 (0.1  $\mu$ M)  $\pm$  liproxstatin-1 or Cu<sup>II</sup>(atm) (1  $\mu$ M) for 24 hr. Samples were lysed in RIPA buffer (Merck) and proteins (15  $\mu$ g) were resolved on NuPAGE 4-12% Bis-Tris gels and transferred to PVDF membranes with an iBlot2 for western immuno-blotting (ThermoFisher Scientific). Primary antibodies used were rabbit anti-GPX4 (1:5000, Abcam, Cambridge, USA) and mouse anti-actin (1:10000, Merck). Horseradish peroxidase coupled secondary antibodies were rabbit anti-mouse and goat anti-rabbit (1:7000, Agilent Technologies). Chemiluminescence was detected using ECL (GE Healthcare, Parramatta, Australia) and images were captured with a Fujifilm LAS-3000 (Fujifilm, Campbellfield, Australia).



**Figure S7** Cu<sup>II</sup>(at5m) prevents lipid peroxidation induced by Fe<sup>II</sup>. Locke's buffer with arachidonic acid (50 µM) treated with Fe<sup>II</sup> (2 µM) ± liproxstatin-1, Cu<sup>II</sup>(at5m), Ni<sup>II</sup>(at5m) or H<sub>2</sub>(at5m) (10 µM) for 30 min. Thiobarbituric Acid was used to detect malondialdehyde accumulation with the Lipid Peroxidation (MDA) Assay kit (Abcam) according to the manufacturer's instructions. Fluorescence (excitation 532 nm, emission 553 nm) was measured with a FlexStation 3 multi-mode microplate reader (Molecular Devices). Lipid peroxidation reported by malondialdehyde was normalised to the maximum signal induced by Fe. Data are means ± SEM, *n*=6 independent experiments. *P* values were calculated using the Kruskal-Wallis test corrected for multiple comparisons by controlling the false discovery rate with the Benjamini, Krieger, and Yekutieli test. \**P*<0.05 compared to vehicle treated cells.



**Figure S8.** Cu<sup>II</sup>(atm) prevents Fe<sup>II</sup>-induced peroxidation of cellular-derived lipids. Cellular-derived lipids were prepared from 10 million N27 cells snap frozen, resuspended in 10 ml Locke's buffer, and sonicated in a water bath for 30 min. C11-BODIPY(581/591) (2.5 μM) was added to the homogenate (100 μl) which was treated with Fe<sup>II</sup> (10 μM) ± liproxstatin-1, Cu<sup>II</sup>(atm), Ni<sup>II</sup>(atm), H<sub>2</sub>(atm) or Cu<sup>II</sup>(atm<sub>2</sub>) for 30 min. C11-BODIPY(581/591) fluorescence was measured with a FlexStation 3 multi-mode microplate reader and expressed as the ratio of green to red fluorescence. Lipid peroxidation reported by C11-BODIPY(581/591) was normalised to the maximum signal induced by Fe. Data are means ± SEM, *n*=6 independent experiments.

## References

- Bica L, Liddell JR, Donnelly PS, Duncan C, Caragounis A, Volitakis I, . . . White AR (2014). Neuroprotective copper bis(thiosemicarbazonato) complexes promote neurite elongation. *PLoS One* 9: e90070.
- Schneider CA, Rasband WS, & Eliceiri KW (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9: 671-675.
- Son JH, Chun HS, Joh TH, Cho S, Conti B, & Lee JW (1999). Neuroprotection and neuronal differentiation studies using substantia nigra dopaminergic cells derived from transgenic mouse embryos. *J Neurosci* 19: 10-20.
- Xu H, Perreau VM, Dent KA, Bush AI, Finkelstein DI, & Adlard PA (2016). Iron Regulates Apolipoprotein E Expression and Secretion in Neurons and Astrocytes. *J Alzheimers Dis* 51: 471-487.