



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Dipartimento di Medicina, Chirurgia ed Odontoiatria

## DOTTORATO DI RICERCA

in

**MEDICINA TRASLAZIONALE DELLO SVILUPPO E  
DELL'INVECCHIAMENTO ATTIVO**

**(XXXI CICLO)**

### CURRICULUM

**GESTIONE INTEGRATA DELLA FRAGILITÀ, DELLE CONDIZIONI  
CRONICHE E DELLE MULTIMORBIDITÀ**

### **TITOLO TESI:**

***RUOLO DEL RUXOLITINIB NEL CROSS-TALK TRA CELLULE STAMINALI  
MESENCHIMALI E MICROAMBIENTE MIDOLLARE NELLA MIELOFIBROSI***

Coordinatore Dottorato: Chiar.mo Prof. **Corrado RUBINO**

Tutor: Chiar.mo Prof. **Carmine SELLERI**

Candidato: **Luigi MARINO**

Anno Accademico 2017-2018

## RIASSUNTO

### *Introduzione*

Le cellule staminali mesenchimali (Mesenchymal Stem Cells, MSC) sono una delle popolazioni di cellule staminali adulte più studiate e meglio caratterizzate. Sono considerate delle ottime candidate nell'ambito della medicina rigenerativa, soprattutto grazie alle loro proprietà immunomodulatorie e al loro emergente ruolo nella comunicazione intercellulare. Nell'ambito della nicchia emopoietica del midollo osseo, oltre che come costituenti cellulari, esse svolgono un ruolo fondamentale nel mantenere l'equilibrio fisiologico della nicchia stessa, svolgendo attività di promozione e regolazione sulle cellule staminali emopoietiche attivando la proliferazione e il processo di "homing" a livello midollare di queste ultime.

### *Metodi*

In questo lavoro di tesi, l'attenzione è stata focalizzata sul meccanismo di internalizzazione e rilascio da MSC del Ruxolitinib, un farmaco attualmente commercializzato da NOVARTIS Pharma e inibitore di JAK1/2. Nel dettaglio, MSC primarie umane sono state isolate da midollo osseo (BMMSC) di cinque pazienti con diagnosi istologica e molecolare (mutazione del gene che codifica per il recettore Janus Kinasi 2, nello specifico la mutazione *JAK2 V617F*) di Mielofibrosi Idiopatica o Policitemia Vera, valutando poi, in un sistema *in vitro*, l'effetto anti-proliferativo dei medium di coltura condizionati con Ruxolitinib su cellule immortalizzate SET-2 carrier per la mutazione *JAK2 V617F* ed esperimenti il recettore di staminalità emopoietica CD34. Successivamente, è stato poi predisposto un sistema di co-coltura di BMMSC e cellule della linea SET-2 trattate o non con Ruxolitinib in differenti rapporti (1:20, 1:100 e 1:1000), con relativa valutazione del potenziale proliferativo della linea SET-2.

### ***Risultati***

Negli esperimenti eseguiti, è stato dimostrato che le MSC sono in grado di incorporare e rilasciare Ruxolitinib nei medium di coltura. Inoltre, è stato dimostrato che i medium di coltura condizionati hanno un'attività anti-proliferativa sulle cellule SET-2 maggiore rispetto al solo farmaco aggiunto ai mezzi di coltura. In un sistema *in vitro* di co-coltura, è stato poi dimostrato che l'attività di proliferazione delle cellule SET-2 diminuisce all'aumentare del rapporto MSC trattate con Ruxolitinib/SET-2, e che le BMMSC trattate con Ruxolitinib hanno un effetto anti-proliferativo sulle cellule della linea SET-2 maggiore rispetto alle BMMSC non tratte con il farmaco.

### ***Conclusioni***

Le cellule staminali mesenchimali del midollo osseo sono risultate essere in grado di acquisire e rilasciare Ruxolitinib, che, una volta rilasciato all'esterno, aumenta l'effetto anti-proliferativo del farmaco su cellule della linea cellulare stabilizzata SET-2 presentante la mutazione *JAK2 V617F*. Tale proprietà contribuisce ad amplificare nel tempo l'effetto farmacologico del Ruxolitinib nel trattamento di soggetti con Mielofibrosi Idiopatica e Policitemia Vera.

## SUMMARY

### *Introduction*

Mesenchymal stem cells (Mesenchymal Stem Cells, MSC) are one of the most studied and well-characterized adult stem cell populations. They are excellent candidates in regenerative medicine, mainly because of their immunomodulatory properties and their emerging role in intercellular communication. MSCs as cellular components of bone marrow hematopoietic niche play a fundamental role in maintaining the physiological balance of the niche and in promoting and regulating hematopoietic stem cell (HSCs) functions, such as proliferation and "homing" to the bone marrow.

### *Methods*

In this work, we focused on the possible internalization and release of Ruxolitinib (a JAK1/2 inhibitor by NOVARTIS Pharma) by MSC. In details, primary human MSC were isolated from bone marrow (BM) of five patients diagnosed with Idiopathic Myelofibrosis or Polycythemia Vera. Diagnosis was confirmed by histopathology and molecular biology for the detection of mutations in *Janus Kinase 2 receptor* encoding gene, specifically for *JAK2* V617F mutation. Subsequently, we evaluated the *in vitro* anti-proliferative effect of culture medium conditioned with Ruxolitinib on immortalized *JAK2*<sup>+</sup> *CD34*<sup>+</sup> SET-2 cells. Finally, a co-culture system of BM and SET-2 cells treated or not with Ruxolitinib in different ratios (1:20, 1: 100 and 1: 1000) was used for estimating the relative anti-proliferative action on SET-2 cell line.

### *Results*

Our preliminary results showed that MSCs could uptake and release Ruxolitinib in culture medium, and conditioned culture medium had more anti-proliferative

effects on SET-2 cells compared to the drug alone added to the medium. In an *in vitro* co-culture system, the proliferation of SET-2 cells decreased by increasing MSC ratio treated with Ruxolitinib / SET-2, and BMMSC treated with Ruxolitinib had a greater anti-proliferative action on SET-2 cells compared to untreated BMMSCs.

### ***Conclusions***

Mesenchymal bone marrow stem cells could uptake and release Ruxolitinib that might increase the anti-proliferative effect of the drug on SET-2 cell line carrying the *JAK2* V617F mutation. These mechanisms may contribute to amplify over time the pharmacological effects of Ruxolitinib in the bone marrow niche of Idiopathic Myelofibrosis and Polycythemia Vera patients.

