

Abstract

Long-lived plasma cells are terminally differentiated effector cells of the B-cell lineage that primarily reside in specialised microenvironmental niches of the bone marrow (BM). They are the primary source of secreted antibodies, providing protective immune memory over months, years or a lifetime and playing a key role in vaccine efficacy, but can also contribute to antibody-related diseases, such as autoimmune disorders. Their survival depends on extrinsic signals from the BM microenvironment, as their removal from this niche results in short survival times. Hence, due to their fragility, niche dependence, and low abundance among BM cells (0.25%), there is a lack of human *in vitro* models based on primary BM-derived PCs to study and understand their survival requirements and functions in homeostasis and pathologies.

In this thesis, a 2D and 3D human BM model was developed that enables the long-term survival of human BM-derived PCs *in vitro*. First, a robust protocol was established to isolate PCs based on their CD38⁺CD138⁺ expression in sufficient numbers and purity from human femoral heads. Co-culture with primary human BM-derived mesenchymal stromal cells (MSCs) in a 2D monolayer and 3D ceramic scaffold promoted the survival and functionality of isolated PCs, secreting immunoglobulins (Ig) IgG1, IgA, and IgM, for up to 28 days. Transcriptomic analysis of the 2D and 3D BM microenvironment generated by MSCs showed the presence of several PC niche-associated markers. Moreover, contrary to findings in mice, neither the addition of exogenous cytokines (APRIL and BAFF) nor the inclusion of CD11b⁺ myeloid cells as potential accessory niche cells further enhanced PC survival *in vitro*. This highlights the MSCs as the central niche partner cells and suggests that either the low levels of APRIL and BAFF expressed by the MSCs, as shown at the transcriptomic level, are sufficient or that human BM PC survival is independent of these factors. Mechanistically, human BM PC survival and function *in vitro* were shown to rely on direct cell-cell contact with MSCs and on PI3K- and NF- κ B signalling pathways, as demonstrated using chemical inhibitors, aligning with mechanisms previously shown in mouse studies. Furthermore, PCs cultured in the 3D scaffold-based BM model were integrated into a microfluidic on-chip device and could be maintained in serum-free medium for 28 days, opening new opportunities for on-chip co-cultures with other organ models.

Altogether, the *in vitro* system developed here provides a valuable tool to advance our understanding of human PC biology that may contribute to the development of effective vaccines and targeted therapies for PC-related diseases in the future.

Zusammenfassung

Langlebige Plasmazellen sind terminal differenzierte Effektorzellen der B-Zell-Linie, die sich überwiegend in spezialisierten Mikroumgebungen (Nischen) des Knochenmarks befinden. Sie sind die primäre Quelle für sekretierte Antikörper, bieten über Monate, Jahre oder lebenslang ein schützendes Immungedächtnis und spielen eine Schlüsselrolle für die Wirksamkeit von Impfstoffen, können aber auch zu Antikörper-assoziierten Erkrankungen wie Autoimmunerkrankungen beitragen. Ihr Überleben hängt von extrinsischen Signalen aus der Knochenmark-Mikroumgebung ab und ihre Entfernung aus dieser Nische verkürzt die Überlebenszeit drastisch. Aufgrund ihrer Fragilität, ihrer Nischenabhängigkeit und ihres geringen Anteils unter den Knochenmarkszellen (0,25 %) mangelt es an menschlichen *in vitro* Modellen auf Basis von primären Zellen, um ihre Überlebensbedingungen und Rolle in der Homöostase und bei Pathologien untersuchen und verstehen zu können.

In dieser Arbeit wurden 2D- und 3D-Modelle des menschlichen Knochenmarks entwickelt, welche das langfristige Überleben der Plasmazellen *in vitro* ermöglicht. Zunächst wurde ein robustes Protokoll zur Isolierung von Plasmazellen auf Basis ihrer CD38⁺CD138⁺-Expression in ausreichender Anzahl und Reinheit aus menschlichen Hüftköpfen etabliert. Die Co-Kultur mit primären, ebenfalls aus dem menschlichen Knochenmark stammenden, mesenchymalen Stromazellen (MSCs) in 2D- oder 3D-Kultur förderte das Überleben und die Funktionalität der isolierten Plasmazellen. Die Sekretion der Immunglobuline (Ig) IgG1, IgA und IgM konnte für bis zu 28 Tage gezeigt werden. Die Transkriptomanalyse der 2D- und 3D-Mikroumgebung zeigte die Präsenz mehrerer relevanter Nischenmarker.

Im Gegensatz zu publizierten *in vivo* und *in vitro* Ergebnissen aus Mausmodellen konnte das Überleben humaner Plasmazellen *in vitro* durch die Zugabe exogener Zytokine wie APRIL und BAFF oder die Einbeziehung von potenziellen Helferzellen wie CD11b⁺ myeloiden Zellen, nicht weiter verbessert werden. Dies unterstreicht die Bedeutung der MSCs als zentrale Nischenpartnerzellen, und legt nahe, dass entweder die von den MSCs exprimierten geringen Mengen an APRIL und BAFF ausreichen, oder dass das Überleben von menschlichen Plasmazellen unabhängig von diesen Faktoren ist. Des Weiteren konnte hier gezeigt werden, dass das Überleben und die Funktion von Plasmazellen *in vitro* vom direkten Zell-Zell-Kontakt mit MSCs und von den Signalwegen PI3K und NF-κB abhängt, und mit den zuvor in Mausstudien nachgewiesenen Mechanismen übereinstimmt. Darüber hinaus wurde das 3D Scaffold-basierte Modell in ein mikrofluidisches On-Chip-System integriert, in dem die Plasmazellen ebenfalls bis zu 28 Tage lang, sogar in serumfreiem Medium, erhalten werden konnten. Dies eröffnet neue Möglichkeiten für On-Chip-Co-Kulturen mit anderen Organmodellen.

Insgesamt stellt das hier entwickelte *in vitro* System eine wertvolle Plattform dar, um unser Verständnis der Biologie der menschlichen Plasmazellen zu verbessern und in Zukunft zur Entwicklung wirksamer Impfstoffe und gezielter Therapien für Plasmazell-bedingte Erkrankungen beitragen zu können.