

Aus dem Neurobiologischen Labor der Klinik für Psychiatrie und
Psychotherapie (Campus Benjamin Franklin)
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Funktionelle Untersuchung zur Makrophagenpolarisierung in
der Pathogenese depressiver Störungen**

“Dynamics of Innate Immunity in Major Depressive Disorder”

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nicoleta-Carmen Cosma

aus Simleu Silvaniei, Rumänien

Datum der Promotion
25. November 2022

INHALTSVERZEICHNIS

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	3
2. ABSTRACT (Deutsch).....	4
3. ABSTRACT (English).....	5
4. MANTELTEXT.....	6
4.1. <i>Darstellung des Forschungsstandes</i>	6
4.1.1. Depression und Inflammation.....	6
4.1.2. Makrophagenpolarisierung.....	7
4.1.3. Zielstellung.....	8
4.2. <i>Methodik</i>	8
4.2.1. Studienkohorte.....	8
4.2.2. Studiendesign.....	9
4.2.3. Individualisierter Polarisierungsassay.....	9
4.2.4. Quantifizierung der Polarisierung.....	11
4.2.5. RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und Real-Time-PCR.....	11
4.2.6. Zytokinanalyse.....	12
4.2.7. Statistische Analysen.....	12
4.2.8. Kumulativer Summenscore.....	12
4.3. <i>Ergebnisse und Diskussion</i>	13
4.3.1. Beschreibung der Studienkohorte.....	14
4.3.2. Erhöhte M1-Polarisierung in Patienten mit Depression im Vergleich zu gesunden Kontrollen.....	15
4.3.3. Erhöhte M2-Polarisierung in Patienten mit Depression unter Kultur in autologem Serum.....	17
4.3.4. Effekt von Antidepressiva auf Makrophagenpolarisierung.....	19
4.3.5. Geschlechtsspezifische Effekte der Makrophagenpolarisierung.....	20
4.4. <i>Limitationen</i>	22
4.5. <i>Schlussfolgerungen und weiterführende wissenschaftliche Fragestellungen</i>	22
4.6. <i>Literaturverzeichnis</i>	24
5. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	28
6. ANTEILSERKLÄRUNG AN DER ERFOLGTEN PUBLIKATION.....	29
7. AUSZUG AUS DER JOURNAL SUMMARY LIST.....	30
8. DRUCKEXEMPLAR DER ORIGINALPUBLIKATION.....	31
9. LEBENS LAUF.....	43
10. KOMPLETTE PUBLIKATIONS LISTE.....	45
11. DANKSAGUNG.....	47

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AS	autologen Seren
Mo-MΦs	Monozyten-abgeleitete Makrophagen Polarisierung
MDD	aus dem Englischen: major depressive disorder – Depressive Störung
GKO	gesunde Kontrollen
FCS	fötales Kälberserum
LPS	Lipopolysaccharide
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium
MADRS	Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale
HAM-D	17-Item-Hamilton Depression Rating Scale
BDI	Beck-Depressions-Inventar
ICD-10	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten 10. Revision
DSM-V	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
<i>CCR7</i>	<i>Chemokine receptor type 7 (Gen)</i>
<i>CD86</i>	<i>Cluster of Differentiation 86 (Gen)</i>
<i>CXCL10</i>	<i>C-X-C motif chemokine 10 (Gen)</i>
<i>CD206</i>	<i>Cluster of Differentiation 206 (mannose receptor) (Gen)</i>
IL-12p70, IL-12p40	Interleukin-12 subunit p70, Interleukin-12 subunit p40 (beta)
IL-6, IL-23, IL-10, IL-1β	Interleukin 6, Interleukin 10, Interleukin 23, Interleukin-1β
TNFα	Tumor necrosis factor α
IP-10	Interferon (IFN)-γ inducible protein
TARC	Thymus and activation regulated chemokine (Chemokine ligand 17)
IL-1RA	Interleukin-1 receptor antagonist
M1	Typ I, pro-inflammatorischen Makrophagen
M2	Typ II, anti-inflammatorischen Makrophagen
M0	undifferenzierten Makrophagen
Mo-MΦs	Monozyten-abgeleitete Makrophagen-Polarisierung

2. ABSTRACT (Deutsch)

Die depressive Störung (MDD) ist eine komplexe Erkrankung, welche neben genetischen Komponenten externe Umweltfaktoren als Risikofaktoren aufweist. Zahlreiche Studien deuten auf eine Beteiligung der angeborenen Immunität bei Entstehung und Erhalt einer Depression hin. Die Mehrheit der aktuellen Daten bietet jedoch keinen umfassenden Überblick über den Beitrag des angeborenen Immunsystems an der Pathogenese der Depression, vor allem was die Anpassungsfähigkeit dieses Systems im Kontakt mit externen Faktoren betrifft. Um diesen Aspekt besser zu verstehen, haben wir einen individualisierten Assay entwickelt, mit dem wir die Anpassungsfähigkeit des angeborenen Immunsystems untersuchen. Dabei haben wir sowohl die pro-inflammatorische als auch die anti-inflammatorische Makrophagen-Polarisierungskapazität bei depressiven Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen untersucht. Um die Beteiligung der externen Umweltfaktoren zu charakterisieren, haben wir zudem den Einfluss von patienteneigenen autologen Seren (AS) auf die patienteneigenen Monozyten-abgeleitete Makrophagen-Polarisierung (Mo-MΦs) *in vitro* untersucht.

Die Mo-MΦs wurden von 28 Patienten mit mittelschwerer bis schwerer depressiver Episode sowie von 28 eins-zu-eins selektierten, passenden gesunden Kontrollen („matched controls“, GKO) generiert. Die Zellen wurden 5 Tage lang in einem mit AS oder fötalen Kälberserum (FCS) angereicherten Medium kultiviert und 24 Stunden mit LPS (M1), IL-10/IL-4/TGF-β (M2) oder Vehikel (M0) stimuliert. Die Kapazität zur Polarisierung wurde durch Quantifizierung spezifischer M1- und M2-Marker gemessen.

In Gegenwart von herkömmlichem FCS zeigte sich bei MDD eine erhöhte M1 Polarisierung, während in der Bedingung mit patientenspezifischen Seren der gegenteilige Effekt, nämlich eine erhöhte M2 Polarisierung, zu beobachten war. Darüber hinaus sahen wir eine erhöhte M1- und eine verringerte M2-Polarisierung bei weiblichen Patienten mit MDD im Vergleich zu MDD-Männern, insbesondere wenn die Zellen in AS-Medium kultiviert wurden.

Unsere Studie zeigt eine differenzierte Mo-MΦ Polarisierung bei MDD-Patienten im Vergleich zu GKO in einem patientenspezifischen individualisierten Assay. Darüber hinaus legt der hohe interindividuelle und signifikante Beitrag des Geschlechts zur Polarisierung nahe, dass individualisierte entzündungshemmende Behandlungsstrategien in Betracht gezogen werden können.

3. ABSTRACT (English)

Inflammatory processes have long been suggested to play a significant role in the pathology of major depressive disorder (MDD). So far, current data investigating these aspects of MDD have been determined either using mouse models or crossover studies based on blood or cerebrospinal fluid cytokine characterization in patients. This does not offer a comprehensive view of the innate immune system contribution in MDD. To better understand innate immune-mediated mechanisms in MDD pathogenesis, we designed an individualized macrophage polarization assay by assessing the impact of patient-derived autologous sera (AS) on patient-specific monocyte-derived macrophage (Mo-MΦs) polarization *in vitro*. Moreover, we assessed both the pro-inflammatory polarization (M1-macrophages) and the anti-inflammatory polarization (M2)-capacity for both groups.

The Mo-MΦs were obtained from 28 patients with moderate to severe MDD and 28 one-to-one matched healthy controls (HC). The cells were cultured in media enriched with AS or fetal calf serum (FCS) for 5 days and polarized for 24 hours into M1 (LPS), M2 (IL-10, IL-4, TGF-β) or M0 (unstimulated) macrophages. The polarization efficacy was assessed by quantifying specific M1 markers and M2 markers.

We report increased M1-polarization in MDD patients compared to HC when cells were cultured in FCS. When cells were cultured in AS, however, we saw increased M2-polarization in MDD patients compared to HC. Furthermore, we observed an increased M1- and decreased M2-polarization in MDD female patients compared to MDD males especially in the costimulatory presence of AS.

Our study shows for the first-time a differentiated monocyte-derived macrophage polarization in MDD compared to HC in a patient-specific individualized assay. The high interindividual differences as well as the significant contribution of sex in the polarization suggests that personalized treatment strategies for depression are needed. Our patient-specific cell model-based approach may translationally guide future individualized treatment and predictive biomarker strategies.

4. MANTELTEXT

4.1. Darstellung des Forschungsstandes

4.1.1. Depression und Inflammation

Die depressive Störung gehört zu der häufigsten psychischen Erkrankung mit einer Lebenszeitprävalenz von bis zu 20 % (1-4). Depressionen tragen zu der hohen Krankheitslast in westlichen Ländern bei und betreffen zweimal häufiger Frauen als Männer (3). Die daraus resultierende subjektive sowie gesellschaftliche Belastung drängen sowohl Kliniker als auch Grundlagenforscher dazu, Depressionen besser zu verstehen und zu behandeln. Es wird angenommen, dass die Entwicklung der Depression multifaktoriell ist und sowohl genetische als auch Umweltfaktoren, wie z.B. chronischen Stress, umfasst (4-6). Das komplexe Zusammenspiel dieser Faktoren erfordert individualisierte Ansätze sowohl bei der Untersuchung der Pathologie als auch bei der Suche nach zukünftigen therapeutischen Strategien.

Sowohl Tierstudien als auch klinische Studien weisen auf die Beteiligung des angeborenen Immunsystems in der Pathogenese der Depression hin (7-12). In Tierversuchen wurde die Aktivierung hirnresidenter Makrophagen (Mikroglia), sowie erhöhte Expression von IL-1 β , IL-6 und TNF α nach wiederholtem Stress-Paradigma vielfach gezeigt (8, 9, 13). Zudem wurde bei Patienten mit Depression ein hohes Aktivierungssignal der Mikroglia mittels PET-Untersuchung sowie in postmortem Studien gezeigt (12, 14-16). Daneben wurde durch mehrere Metaanalysen höheres peripheres IL-6, IL-18, TNF α und CRP bei depressiven Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen wiederholt gezeigt (10, 12, 17-21). Vor allem die Subgruppe der therapierefraktären depressiven Patienten zeigt in übermäßiger Anzahl eine erhöhte periphere Inflammation (19, 22, 23).

Bereits 1991 formulierte RS Smith die Theorie, dass Monozyten und geweberesidente Makrophagen an der Entstehung von Depressionen ursächlich sein könnten (24). Aktuelle Studien haben Monozyten aus Blut von Patienten mit Depression phänotypisiert und weisen auf einen pro-inflammatorischen Monozyten-Phänotyp mit nicht-klassischer Aktivierung bei depressiven Patienten hin (11-13). Während Veränderungen der Monozytenfunktion bei Depression gut dokumentiert sind, bleibt die Richtung und Art der Veränderungen, die diese Zellen vornehmen, wenn sie aus dem Blutstrom in das betroffene Gewebe wandern, und dort zu Makrophagen polarisieren, umstritten. Die meisten klinischen Studien zu

diesem Thema wurden an nicht kultivierten Zellen, direkt nach Isolierung aus Vollblut oder aus kryokonservierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes durchgeführt (25-27). Dieser Ansatz bewertet nur die Funktion der Monozyten, und nicht deren Aktivierung, sobald sie auf Organebene zu Makrophagen polarisiert werden. Angesichts der Tatsache, dass zirkulierende Monozyten u.a. in das Gehirn eindringen können, und in der Lage sind, zu Mikroglia-ähnlichen Makrophagen zu polarisieren, bleibt die Frage nach der Funktionalität der Makrophagen auf der Organebene offen. Des Weiteren sind Makrophagen eine der wichtigsten Quellen pro-inflammatorischer Zytokine (IL-6, TNF α), welche in peripherem Blut von Patienten mit Depression erhöht sind (17, 28, 29). Daher stellt sich die Frage ob und unter welchen Umständen sich die differenzierten Makrophagen in der Funktion bei depressiven Patienten von gesunden Probanden unterscheiden.

4.1.2. Makrophagenpolarisierung

Die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen auf Organebene kann zu unterschiedlichen Phänotypen führen (30). Diese Phänotypen werden durch epigenetische Veränderungen induziert, die sich in Abhängigkeit der Umgebung ergeben und eine funktionelle Differenzierung der Zellen nach sich ziehen (31). Die Fähigkeit der Makrophagen, in pro- oder anti-inflammatorische Phänotypen zu polarisieren, hängt von exogenen Umweltreizen ab (30). Wenn sie durch Lipopolysaccharid (LPS) oder Typ1-T-Helferzellen (Th1) sekretierte Zytokine stimuliert werden, zeigen Makrophagen das „klassische“ oder M1-Profil. M1-Makrophagen sind durch die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies gekennzeichnet (32, 33). Umgekehrt führen Typ2-T-Helferzellen (Th2) sekretierte Zytokine wie IL-10, IL-4, IL-13 und Glukokortikoide zu einem entzündungshemmenden, „alternativen“ oder M2-Profil. M2-Makrophagen sind durch die Produktion entzündungshemmender Zytokine gekennzeichnet und weisen eine erhöhte Phagozytose sowie positive Auswirkung auf Gewebereparatur und Wundheilung auf (32-34). Es wurde gezeigt, dass u.a. Sexual- und Stresshormone, Antidepressiva und Neuropeptide die Makrophagenfunktion unterschiedlich modulieren können und insbesondere die M1- und M2-Polarisierung beeinflussen (35-37). In diesem Kontext erscheint die Notwendigkeit eines hohen Individualisierungsgrads für in vitro-Assays basierend auf patientenspezifischen Zellen als geboten.

4.1.3. Zielstellung

Obwohl die den Makrophagen als mögliche Vorläufer verwandten Monozyten bei depressiven Patienten gut untersucht sind, bleibt die Charakterisierung der in Organen differenzierten Makrophagen, inklusive der gehirnresidenten Mikroglia, jedoch unvollständig. Aufgrund des fehlenden direkten Zugangs zu Mikroglia oder Makrophagen aus dem ZNS wurde die Verwendung von *in vitro* Monozyten zu Makrophagen-Polarisierung (Mo-MΦs) als Instrument zur Charakterisierung von Aspekten der Mikroglia- und Makrophagenfunktionen bei anderen psychiatrischen Erkrankungen vorgeschlagen (38-40). Um die Polarisierungskapazität von Mo-MΦs bei depressiven Patienten genauer zu untersuchen, haben wir einen individualisierten in-vitro-Assay entwickelt. Wir untersuchten die Plastizität der Mo-MΦs zur M1-, M2- oder M0-Makrophagenpolarisierung bei Patienten mit mittelschwerer bis schwerer Depression im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (GKO), die auf Alter, BMI (Body-Mass-Index), Raucherstatus und Geschlecht abgestimmt sind. Um zwischen der Rolle der genetisch determinierten Faktoren („trait“) und Umweltfaktoren („individuelles Milieu“, „state“) auf die Polarisierung zu unterscheiden, haben wir zudem die herkömmlichen Zellkulturbedingungen unter Einsatz fötalen Kälberserums (FCS) mit dem Einfluss von autologem Serum (AS) auf die Mo-MΦs verglichen (31, 34). Mit diesem Ansatz wollen wir die Interaktion zwischen genetischen und Umweltfaktoren („state“ und „trait“) in der Entstehung der Depression in einem individualisierten Assay besser verstehen.

4.2. Methodik

Die vorliegende Studie inklusive detaillierter Darstellung der Methodik wurde unter Cosma NC et al 2021 im Journal *Brain, Behaviour and Immunity* veröffentlicht (41).

4.2.1. Studienkohorte

Die im Rahmen einer Beobachtungsstudie am Campus Benjamin Franklin der Charité - Universitätsmedizin Berlin rekrutierte Patientenkohorte bestand aus männlichen und weiblichen Erwachsenen, die aufgrund einer mittelschweren bis schweren depressiven Episode stationär behandelt wurden. Die gesunden Kontrollpersonen wurden nach Alter, Geschlecht, Raucherstatus und BMI

paarweise für jeweils einen Patienten rekrutiert. Alle Probanden erhielten eine Anamnese, eine körperliche Untersuchung und unterschrieben eine Einwilligungserklärung (EA4/002/13). Die Patienten hatten eine fachärztlich bestätigte Diagnose, die den ICD-10 / DSM-5-Kriterien einer mittelschweren bis schweren depressiven Episode entsprach. Alle Patienten mussten zudem auf der Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale (MADRS) mehr als 24 Punkte (42) sowie auf der 17-Item-Hamilton Depression Rating Scale (HAM-D) mehr als 17 Punkte erreichen (43). Ausschlusskriterien für die Patientengruppe waren alle anderen psychiatrischen Komorbiditäten außer einer erfolgreich behandelten posttraumatischen Belastungsstörung oder Angststörung in der Anamnese. Ausschlusskriterien für alle Teilnehmer waren klinische Anzeichen einer akuten Entzündung, antibiotikpflichtige Infektion, Impfung (< 3 Monate), chronisch entzündliche Erkrankung, Einnahme von NSAR oder Kortikoide, Asthma, Allergien, Malignome und Schlaganfall in der Vorgeschichte. Weitere Ausschlussgründe waren bestehende Schwangerschaft und Stillzeit sowie instabile internistische Erkrankungen. Venöses Blut wurde zwischen 8 und 12 Uhr abgenommen.

4.2.2. Studiendesign

Abbildung 1 zeigt eine graphische Übersicht des Studienprotokolls. Zusammengefasst wurden die Mo-MΦs von 28 Patienten mit mittelschwerer bis schwerer depressiver Episode sowie von 28 eins-zu-eins selektierten gesunden Kontrollen (GKO) generiert. Die Zellen wurden 5 Tage lang in einem mit AS oder FCS angereicherten Medium kultiviert und 24 Stunden mit LPS (M1), IL-10/IL-4/TGF- β (M2) oder Vehikel (M0) stimuliert. Die Polarisierungswirksamkeit wurde durch Quantifizierung spezifischer M1- und M2-Marker gemessen (41).

4.2.3. Individualisierter Polarisierungsassay

Das Blut wurde innerhalb von 1,5 Stunden nach der Blutentnahme aufgearbeitet. Aus heparinisierten Vakuumextraktionsröhrchen wurden mononukleäre Zellen aus Blut (PBMC) durch FICOLL™ Dichtegradientenzentrifugation extrahiert (44).

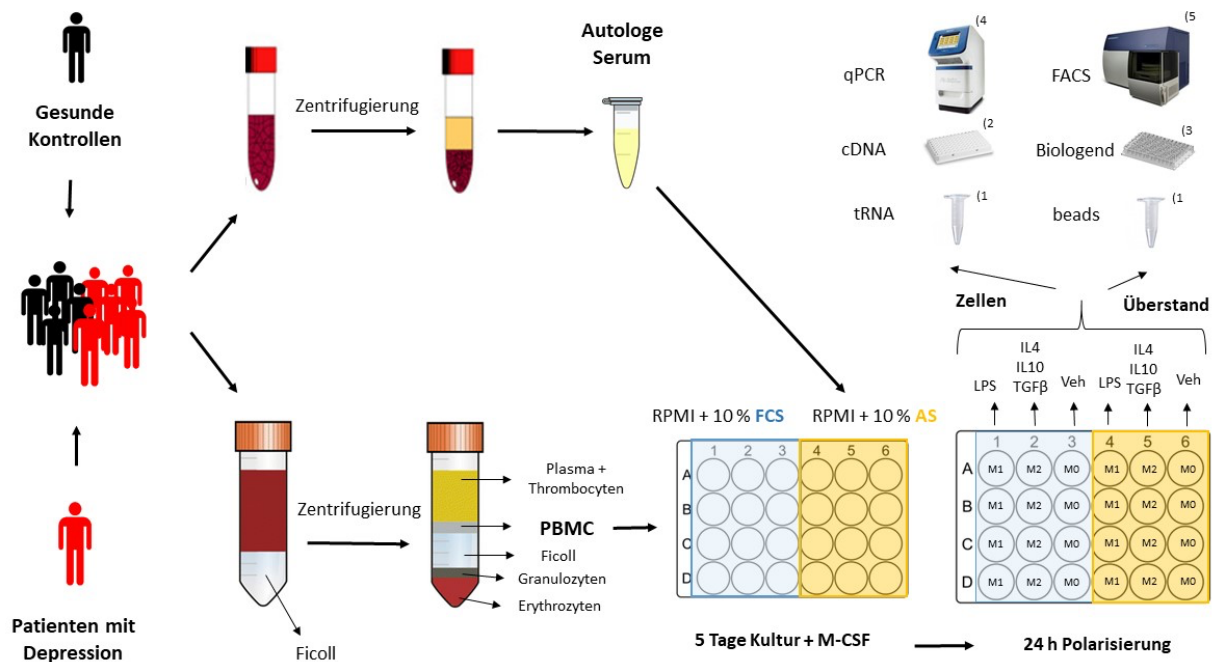


Abbildung 1. Darstellung des Studienprotokolls. Peripheres Blut wurde von gesunden Kontrollprobanden und Patienten mit Depression gesammelt. Autologes Serum wurde aus Überstand nach Zentrifugation gewonnen. Mononukleäre Zellen (PBMC) wurden mittels Ficoll-Dichtezentrifugation isoliert und unter Stimulation mit M-CSF 5 Tage lang in Anwesenheit von Standard FCS oder autologem Serum kultiviert. Nach 24-stündiger Polarisation in M0-, M1-, oder M2-Makrophagen erfolgte die Analyse mittels qPCR (tRNA) oder einen M1/M2 Macrophage Panel (Zytokine). (1) Eppendorf Tubes®, (2) Eppendorf qPCR Platte®, (3) LEGENDplex Platte®, (4) StepOne™ Real-Time PCR System Thermo Fisher, (5) BD FACSCanto™ II.

Das Serumvakuumextraktionsröhrchen wurde bei Raumtemperatur für 30-90 Minuten gerinnen gelassen und anschließend bei 1500 x g RT für 5 Minuten zentrifugiert. Frisches Serum wurde verwendet, um ein individualisiertes Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-Medium, Gibco™) herzustellen, das 10 % AS enthielt (31). Die PBMC wurden in 24-Well-Platten ($4,5 \times 10^5$ pro Well) in RPMI-Medium unmittelbar nach der Ficoll-Extraktion ausplattiert. Die Zellen wurden für die Hälfte der Platte in einem RPMI-Medium angereicht mit 10 % FCS (Biochrom) kultiviert und die andere Hälfte der Zellen wurde in einem RPMI-Medium mit 10% AS kultiviert (jeweils 12 Wells). Sowohl die FCS- als auch die AS-Bedingung erhielten beim Ausplattieren eine Stimulation mit 10 ng/ml humanem M-CSF (Miltenyi Biotec) sowie 1 % Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Deutschland). Alle Zellen wurden unter der gleichen Bedingung (AS oder FCS) bis zum Ende des Experiments kultiviert. Adhärente Monozyten wurden 24 h nach Ausplattierung durch Plastikaggregation und Mediumwechsel selektiert. Nach 4 Tagen Zellkultur wurden die Makrophagen mit LPS (50 ng/ml, Sigma) zu M1 polarisiert, mit IL-10, IL-4, TGF- β (jeweils 20 ng/ml, Peprotech) zu M2 polarisiert oder mit Vehikel unstimuliert (M0-Makrophagen)

belassen (18, 21). Die Zellen und der Überstand wurden 24 h nach Polarisierung wie unten beschrieben gewonnen und bis zur Messung bei -80°C gelagert.

4.2.4. Quantifizierung der Polarisierung

Wir quantifizierten die Polarisierungskapazität durch Messung der charakteristischen M1- und M2-spezifischen Marker auf Ebene von mRNA-Synthese spezifischer Rezeptoren und Messung von Zytokinsekretion auf Proteinebene (33-35). Konkret haben wir die Expression der jeweiligen M1-spezifischen Marker (*CXCL10*, *CD86*, *CCR7*, IL-12p70, TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12p40, IL-23, IP-10) und M2-spezifischen Marker (*CD206*, IL-10, TARC, IL-1RA) gemessen. Die Expression der oben genannten kursiv dargestellten Marker erfolgte mittels Real-Time-PCR. Die Synthese der Zytokine wurde auf Proteinebene mittels eines immunologischen Bead-basierten Multiplex-Ansatzes in der Durchflusszytometrie bestimmt (LEGENDplex Human M1/M2 Macrophage Panel, BioLegend, SanDiego, USA) (41).

4.2.5. RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und Real-Time-PCR

RNA wurde aus den 24 h polarisierten Makrophagen mithilfe des *RNeasy Mini Extraktionskits* (Quiagen) isoliert und bei -80°C gelagert. Gesamt-RNA wurde mit dem *Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit*TM (Thermo Fisher Scientific Inc.) in cDNA transkribiert und bis zur weiteren Messung bei -20°C aufbewahrt. Zur Quantifizierung der Expressionsniveaus wurde eine qPCR mit *LightCycler*TM 480 SYBR Green (Roche) im Applied Biosystems StepOneTM Real-Time PCR System durchgeführt (500 nM Standard-Primerkonzentrationen). Die Schmelzkurvenanalyse wurde durchgeführt, um spezifische Produkte mit einem $1,2^{\circ}\text{C}$ -Inkrement von 65 bis 95°C zu identifizieren. Die Analyse der relativen Menge (ΔCt) und der Schmelzkurve wurde unter Verwendung der StepOneTM Real-Time PCR System Software durchgeführt(41). Die folgenden Primer ($5' > 3'$) wurden verwendet: *CXCL10*F: GCTTCCAAGGATGGACCACA, R: GCAGGGTCAGAACATCCACT; *CD86*F: ACACGGATGAGTGGGGTCATTTTC, R: CTCAGAGGAGCAGCACCAGA; *CCR7*F: CGTCATGGACCTGGGGAAACC, R: GGCCCACGAAACAAATGATGG; *CD206* F:TGCAGAAGCAAACCAAACCTGTAA, R: CAGGCCTTAAGCCAACGAAACT. *B2M*F: TAGAGGTGGGGAGCAGAGAA, R: ATCACTGAGGCCCTTTACACT (41). Beta2-mikroglobulin

(B2M) wurde als interne Kontrolle zur Datennormalisierung verwendet (ΔCt) (45). Die ΔCt -Werte für jede Stimulation wurden dann auf den Kontrollzustand (unstimuliert) normalisiert, was zu dem individuellen $\Delta\Delta Ct$ -Wert führte. Die Expressionsänderung wurde als $2^{-\Delta\Delta Ct}$ berechnet und weiter zur Analyse verwendet (46).

4.2.6. Zytokinanalyse

Der Überstand wurde 24 Stunden nach Polarisierung asserviert und bis zur weiteren Untersuchung bei -80°C gelagert. Die Spiegel von IL-12p70, TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12p40, IL-23, IP-10, IL-10, IL-6, TARC und IL-1RA wurden im Überstand und Serum in Duplikaten unter Verwendung des LEGENDplex Human M1/M2 Macrophage Panel (10-plex) (BioLegend, SanDiego, USA) gemessen. Die Datenerfassung erfolgte mit BD FACSCanto™ II (Biosciences) und die Analyse mit der LEGENDplex Data Analysis Software v8.0 (BioLegend, SanDiego, USA) gemäß den Herstelleranweisungen (41).

4.2.7. Statistische Analysen

Die Stichprobengröße wurde mit der G*Power Software Version 3.1 (G*Power Version 3.1.9.2, Deutschland) bestimmt. Eine Power-Berechnung wurde mit einem α von 0,05 und einer Power von 0,8 durchgeführt, was zu mindestens 26 Teilnehmern pro Gruppe führte. Weitere numerische Analysen wurden unter Verwendung der statistischen Software GraphPad Version 8.0.2 (GraphPad Software, La Jolla, USA) durchgeführt. Da die Daten nicht normal verteilt waren, führten wir Mann-Whitney-U-Tests für Unterschiede zwischen den Gruppen und Friedmans ANOVA-Tests mit Dunns post-hoc-Mehrfachvergleichstests oder Wilcoxon-Test durch, um die Stimulationseffekte innerhalb der Gruppe zu analysieren. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Um für die im autologen Serum enthaltenen Zytokinen zu kontrollieren, wurde in der AS-Bedingung 10% des gemessenen Serumzytokinspiegels von den im Überstand gemessenen Zytokinspiegeln vor der Analyse abgezogen.

4.2.8. Kumulativer Summenscore

Da die Gesamtfunktionalität sowie die pro- oder anti-inflammatorischen Antworten einer Immunzelle mittels einzelner Marker nur bedingt charakterisiert werden kann, haben wir einen kumulativen Summenscore auf individueller Ebene berechnet, um die M1- und M2-Polarisierung mittels aller

gemessener Marker zusammenzufassen. Dieser Summenscore beinhaltet die Summe der individuellen Z-Scores von den jeweiligen M1- oder M2-Markern als Folge der M1- beziehungsweise M2-Polarisierung (Formel Nr. 1). Dadurch konnten wir den Polarisierungsphänotyp mittels aller gemessener Marker charakterisieren. Hierfür wurden für jeden Probanden die Z-Werte der M1- beziehungsweise M2-spezifischen Marker in einer M1- und M2- individuellen Punktzahl (Score, Z_i) wie folgt addiert (47):

$$(1) \quad Z_i = \sum_{k=1}^i Z_k^i, \text{ wo } i = \text{Proband und } k = \text{Z-Wert der jeweiligen Marker.}$$

Für den individuellen Z_i der M1-Polarisierung sind die Z-Werte aller M1-spezifischen Marker (*CXCL10*, *CD86*, *CCR7*, *IL-12p70*, *TNF- α* , *IL-6*, *IL-1 β* , *IL-12p40*, *IL-23*, *IP-10*; $k = 10$) aufsummiert und für die M2-Polarisierung jeweils die Z-Werte der M2-spezifischen Marker (*IL-10*, *TARC*, *IL-1RA*, *CD206*; $k = 4$) eingeschlossen (47). Um den Unterschied in der Effizienz der Polarisierung in pro- oder anti-inflammatorischer Richtung zu charakterisieren, haben wir zusätzlich Verhältnisse zwischen der Marker Produktion unter der M1 und M2 Bedingung berechnet. Somit konnten wir die Fähigkeit der Zellen pro-inflammatorische Marker zu produzieren in der M1-Stimulation und die Unterdrückung dieser Produktion in der M2- Stimulation messen. Für jeden Teilnehmer wurde ein Mittelwert der Verhältnisse berechnet, um die Zunahme der Markerepression aufgrund einer Stimulation im Vergleich zu der Gegenstimulation zu beurteilen (z.B. M1 vs. M2). Für die Einschätzung der Stärke der pro-inflammatorischen Polarisierung wurden alle M1-spezifischen Marker ($k = 10$) und für die anti-inflammatorische Polarisierung alle M2-spezifischen Marker ($k = 4$) benutzt.

$$(2) \quad V_i = \bar{X} \frac{Z_{M1}}{Z_{M2}}, \text{ wo } i = \text{Proband, } k = \text{jeweiligen Marker, } Z_{M1} = \text{Z-Wert für den Marker } (k) \text{ nach M1-Stimulation, } Z_{M2} = \text{Z-Wert für den gleichen Marker } (k) \text{ nach M2 Stimulation.}$$

4.3. Ergebnisse und Diskussion

Unsere Studie versucht zum ersten Mal die Frage zu beantworten, ob die Ursache der erhöhten peripheren und zentralen Entzündung in der Depression an der Aktivierung der organ-residenten Makrophagen liegt (24, 48, 49). Wir präsentieren hier die Ergebnisse eines individualisierten Assays der Makrophagenpolarisierung, mit dem wir sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Polarisierung

untersuchen. Zusätzlich setzen wir uns mit der Frage der genetischen („state“) und Umweltbeteiligung („trait“) in der Makrophagenpolarisierung depressiver Patienten auseinander, indem wir neben der Standard FCS-Polarisierung, eine Polarisierung in eigenem Millieu – AS – durchführen. Unser Experiment wurde konzipiert, um folgende offene Fragen zu beantworten: 1. Welche Unterschiede im Phänotyp der Makrophagenpolarisierung existieren zwischen depressiven Patienten und gesunden Kontrollen? 2. Ist der Phänotyp der Makrophagenpolarisierung von externen Umweltreizen, wie z.B. der Einfluss von autologem Serum, veränderbar? 3. Wird die Makrophagenpolarisierung bei mit Psychopharmaka behandelten Patienten unterschiedlich moduliert? 4. Gibt es geschlechtsspezifische Effekte der Makrophagenpolarisierung?

4.3.1. Beschreibung der Studienkohorte

Im Zeitraum von Januar 2018 bis Dezember 2019 wurden die 56 Probanden rekrutiert. Die aus Cosma NC et al., 2021 entnommene und modifizierte Tabelle 1 zeigt die Charakteristika der Studienpopulation (41). Da die Rekrutierung eins-zu-eins erfolgte, das heißt für jeden eingeschlossenen MDD Patient eine für BMI, Alter, Raucherstatus und Geschlecht passende Kontrollperson eingeschlossen wurde, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Probandengruppen ($p > 0.54$). Die Cosma NC et al., 2021 entnommene und modifizierte Tabelle 2 zeigt die klinischen Merkmale der Patientenkohorte (41).

Tabelle 1. Demographie von Studienteilnehmern*

	MDD (n=28)	GKO (n=28)	p-Wert
Alter in Jahren	48,5 (12)	46,7 (11,1)	0,91
Anzahl Frauen (%)	19 (67,8)	19 (67,8)	0,99
BMI	26 (4)	24,1 (4)	0,6
Anzahl Raucher (%)	10 (35,7)	9 (32,1)	0,99
Bildungsjahre	14,2 (1,7)	14.5 (2,1)	0,54

*Tabelle aus Cosma NC et al. 2021 entnommen und modifiziert (41). Darstellung als Mittelwert (Standarddeviation), außer wenn spezifiziert. BMI: Body-Mass-Index; GKO: gesunden Kontrollpersonen; MDD: Depressive Störung; Statistischen Tests: t-test.

Tabelle 2. Beschreibung der MDD- Patientenkohorte (n = 28)*

Psychiatrische Komorbiditäten	3 (10,7)
HAM-D -17	25.5 (5.1)
MADRS	28 (5)
BDI-II	34.8 (9.1)
Dauer der ggw. Episode, Monaten	10.1 (6.8)
Anzahl depressiven Episoden	4.2 (2.5)
≥ 2 Behandlungsversuche in der ggw. Episode (%)	18 (64.2)
Einnahme von SSRI und SNRI, Nr. (%)	16 (57.1)

*Tabelle aus Cosma NC et al. 2021 entnommen und modifiziert (41). Darstellung als Mittelwert (Standarddeviation), außer wenn spezifiziert. GKO: gesunden Kontrollpersonen; MDD: Depressive Störung; SSRI: Serotonin-Wiederaufnahmehemmer; SNRI: Serotonin- und Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer; HAMD: 17-item Hamilton Depression Rating Scale; MADRS: Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale BDI: Beck-Depressions-Inventar.

4.3.2. Erhöhte M1-Polarisierung in Patienten mit Depression im Vergleich zu gesunden Kontrollen

Um die Makrophagenpolarisierung in die pro-inflammatorische M1-Richtung bei MDD-Patienten im Vergleich zu GKO zu charakterisieren, stimulierten wir die mit M-CSF differenzierten Makrophagen für 24 Stunden mit LPS. Die M1-Polarisierung mittels LPS erfolgte parallel sowohl in Standard FCS-Medium als auch in einem individualisierten AS-Medium.

In der FCS-Kultur zeigten sich *CXCL10*, CD86 und IP-10 signifikant erhöht (Mann-Whitney-U-Tests, jeweils $p < 0,02$) in den MDD polarisierten Zellen verglichen mit GKO. In der AS-Kultur zeigten sich IP-10 und *CCR7* bei MDD Patienten signifikant erhöht (Mann-Whitney-U-Tests, jeweils $p < 0,04$). Die weiteren gemessenen Marker bis auf IL-1 β zeigten eine Tendenz zu einer erhöhten M1-Polarisierung in den MDD Patienten im Vergleich zu den Kontrollen, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen. In der M1-Bedingung zeigten sich höhere individuelle kumulative Z-Scores bei MDD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen sowohl unter FCS- als auch AS-Bedingungen. Die MDD-Gruppe zeigte im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikant erhöhte Produktion von pro-inflammatorischen Markern, was sich in den individualisierten M1/M2-Verhältnissen widerspiegelt (Mann-Whitney-U-Tests, $p < 0,05$). AS erhöhte signifikant die pro-inflammatorische Markersynthese sowohl bei Kontrollen als auch bei MDD (Wilcoxon-Test, jeweils $p < 0,02$). Die aus Cosma NC et al. 2021 entnommene und modifizierte Abbildung 2 stellt diese Ergebnisse dar (41).

Die Mo-MΦs von MDD Patienten in unserer Kohorte zeigten eine höhere M1-Polarisierung im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Dies steht im Einklang mit der Literatur, die auf eine Erhöhung peripherer Zytokinspiegel bei MDD hindeutet (12, 16, 17, 29, 50). Unsere Studie hat diese bereits gut bewiesene Hypothese nicht nur bestätigt, sondern bietet erste Hinweise auf die Herkunft der erhöhten peripheren Zytokine in Patienten mit Depression. Sowohl erhöhte periphere Zytokinexpression als auch höhere Monozytenkonzentration wurde in MDD wiederholt gezeigt (17, 27-29, 51). Unsere Studie bestätigt die

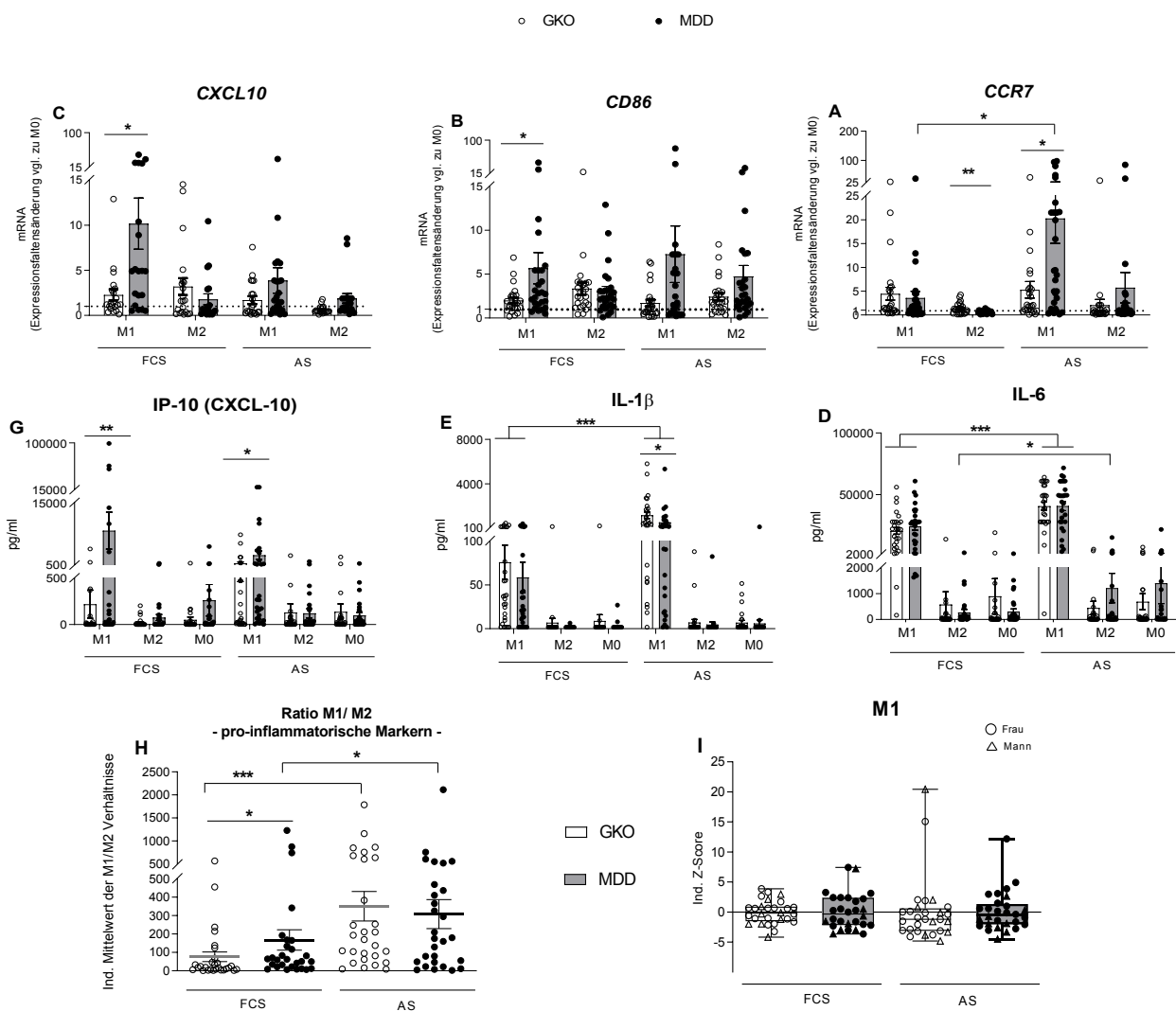


Abbildung 2. M1-Polarisierung in Patienten mit Depression im Vergleich zu gesunden Kontrollen Abbildung aus Cosma NC et al. 2021 entnommen und modifiziert (41). Gezeigt sind die individuellen Werte (jeder Punkt repräsentiert die Werte eines Probanden) in Folge der M1 (LPS) Polarisierung. **A-C** Quantifizierung von *CCR7*, *CD86* und *CXCL10* mittels qPCR. **D-G** Quantifizierung von IL-6, IL-1 β und IP-10 (CXCL-10) mittels Biologend Panel. **H** Verhältnis von M1- und M2-Markern. **I** Individuelle Z-Scores unter FCS- und AS-Bedingungen dargestellt für männliche und weibliche Probanden. GKO: gesunden Kontrollpersonen; MDD: Depressive Störung. Mann-Whitney-U-Tests (Unterschiede zwischen den Gruppen), Friedmans ANOVA-Tests mit Dunns post-hoc und Wilcoxon-Test (innerhalb der Gruppe) wurden als statistischen Tests benutzt. Die Werte sind als Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Beobachtung des erhöhten pro-inflammatorischen Zustands in MDD und legt erstmals nahe, dass die Ursache dieses Entzündungszustands auf ein deutlich erhöhtes Aktivierungsniveau von M1-Makrophagen in depressiven Patienten zurückzuführen sein könnte. Die ersten Hinweise auf erhöhte Aktivierung von Mikroglia wurde post-mortem sowie durch TSPO-PET-CT bei Patienten mit Depression gezeigt (12, 15). Unser Experiment führt diese Beobachtungen weiter, indem die funktionelle Antwort der Makrophagen in einem personalisierten *in vitro* Assay bestätigt wurde. Interessanterweise reduzierte AS den Unterschied zwischen MDD und Kontrollen bezüglich der M1-Polarisierung. Dies stimmt mit Untersuchungen überein, die sich mit der Wirkung der autologen Seren auf die Zytokin-Sekretion aus stimulierten Monozyten bei MDD beschäftigten (25, 28, 52). Unsere Ergebnisse legen nahe, dass individualisierte Zellmodelle einen wichtigen, ergänzenden Beitrag in der individualisierten Diagnostik und ggf. Therapiefindung leisten könnten.

4.3.3. Erhöhte M2-Polarisierung in Patienten mit Depression unter Kultur in autologem Serum

Für die M2-Makrophagenpolarisierung stimulierten wir die mit M-CSF differenzierten Makrophagen für 24 Stunden mit IL-10/IL-4/TGF- β . Die M2-Polarisierung erfolgte parallel sowohl in Standard FCS-Medium als auch in einem individualisierten AS-Medium.

Von den insgesamt vier gemessene M2-spezifische Marker waren IL1-RA, TARC und *CD206* bei MDD unter AS-Kultur signifikant erhöht (Mann-Whitney-U-Tests, jeweils $p < 0,04$). IL10-Sekretion war bei MDD polarisierten Zellen in beiden Zuständen (AS und FCS) signifikant höher verglichen mit GKO (Mann-Whitney-U-Tests, jeweils $p < 0,09$). Die kumulativen Z-Scores zeigten einen höheren M2-Polarisierungstyp bei MDD insbesondere dann, wenn die Zellen in AS kultiviert wurden. Ebenfalls zeigte sich das individuelle M2/M1-Verhältnis der entzündungshemmenden Marker bei Patienten signifikant höher, jedoch nur bei Kultur mit AS (Mann-Whitney-U, $p = 0.007$). Darüber hinaus zeigte das M2/M1-Verhältnis einen signifikanten Anstieg der entzündungshemmenden Markerproduktion bei MDD, wenn die Makrophagen in AS im Vergleich zu FCS kultiviert werden (Wilcoxon-Test, $p = 0,013$). Die aus Cosma NC et al. 2021 entnommene und modifizierte Abbildung 2 stellt diese Ergebnisse dar (41). Vor unserer Studie wurde die M2-Polarisierungsfähigkeit bei depressiven Patienten nicht ausführlich

untersucht. Da die Erhöhung pro-inflammatorischer Marker in der Vergangenheit gezeigt wurde, konzentrierten sich experimentelle Untersuchungen vor allem auf die pro-inflammatorische Aktivierung (12, 17, 27-29). In unserer Beobachtungsstudie zeigten von MDD Patienten gewonnene Zellkulturen eine höhere M2-Polarisierung in Gegenwart des AS verglichen zu den GKO.

Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass die M1-Polarisierung in Anwesenheit von AS in unserer MDD-Gruppe insgesamt niedriger war als unter Kultur mit FCS. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die von MDD Patienten differenzierten Makrophagen bei entsprechender Stimulation die Fähigkeit besitzen, in den M2-Phänotyp zu polarisieren. Es wurde gezeigt, dass einige Antidepressiva (z.B. Fluoxetin, Venlafaxin, Ketamin) ebenfalls anti-entzündliche Eigenschaften aufweisen (22, 52). Dies deutet auf einen möglichen Einsatz unseres *in vitro* personalisierten Assay als prädiktiven funktionellen Biomarker zur zielgerichteten und evidenzbasierten Therapie.

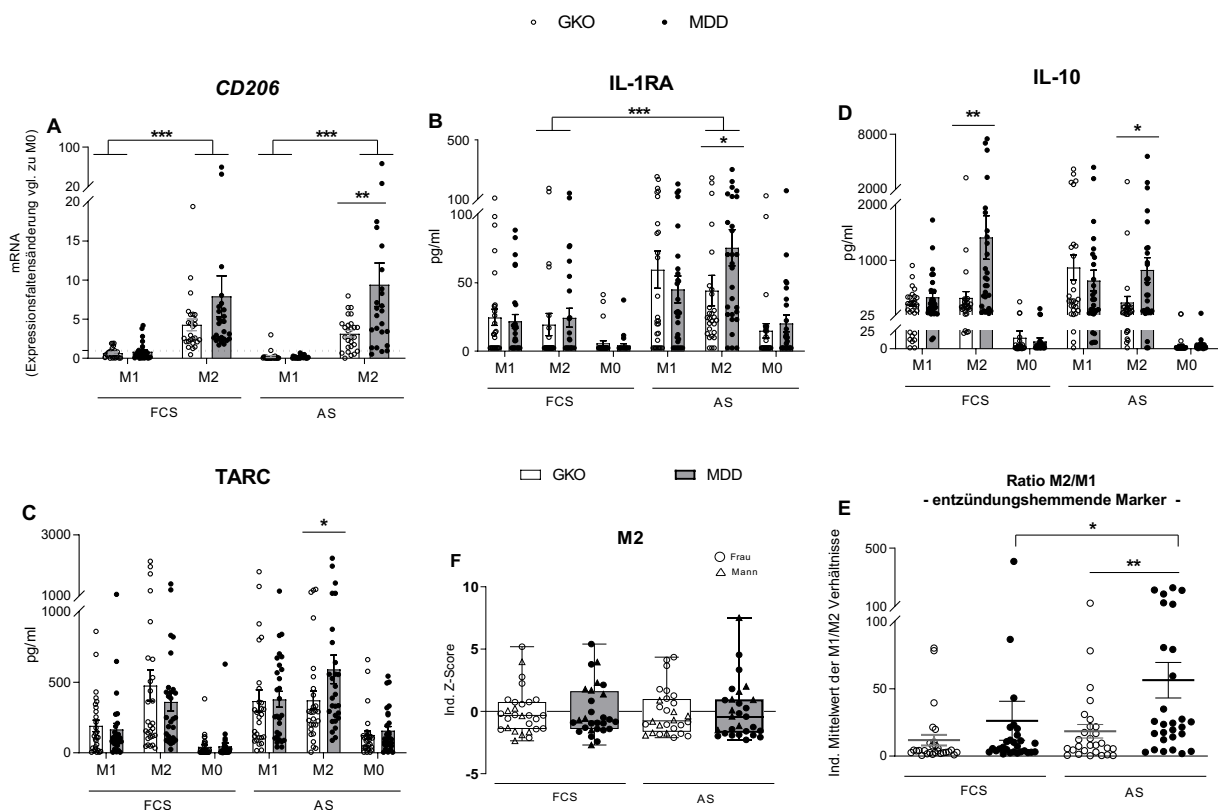


Abbildung 3. M2- Polarisierung in Patienten mit Depression unter Kultur in autologem Serum. Die Abbildung wurde aus Cosma NC et al. 2021 entnommen und modifiziert. Sie zeigt die individuellen Werte (jeder Punkt repräsentiert die Werte eines Probanden) in Folge der M2 (IL-10/IL-4/TGF- β) Polarisierung (41). **A** Quantifizierung von *CD206* mittels qPCR. **B-D** Quantifizierung von IL-1RA, TARC und IL-10 mittels Biolegend Panel. **E** Verhältnis von M2- und M1-Marker. **F** Individuelle Z-Scores unter FCS- und AS-Bedingungen dargestellt für männliche und weibliche Probanden. GKO: gesunden Kontrollpersonen; MDD: Depressive Störung. Mann-Whitney-U-Tests (Unterschiede zwischen den Gruppen), Friedmans ANOVA-Tests mit Dunns post-hoc und Wilcoxon-Test (innerhalb der Gruppe) wurden als statistischen Tests benutzt. Die Werte sind als Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.3.4. Effekt von Antidepressiva auf Makrophagenpolarisierung

Es ist gut bewiesen, dass Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRIs) sowie Serotonin- und Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (SNRIs) sowohl in vitro als auch in vivo entzündungshemmende Eigenschaften aufweisen (53-56). Derzeit wird die anti-entzündliche Wirkung von Antidepressiva in klinischen Studien zur Verbesserung der klinischen Symptome bei Autoimmunerkrankungen, kardiovaskulären Erkrankungen, SARS-CoV-2 Infektion und Diabetes mellitus untersucht (53, 57, 58). Um zu beurteilen, ob es Unterschiede in Makrophagenpolarisierung unter Berücksichtigung der Medikation in unserer Kohorte gab, verglichen wir die Zellen der Patienten, die SSRIs oder SNRIs (n = 16) einnahmen, mit denen, die Antidepressiva anderer Klassen einnahmen (n = 12) (Tabelle 3).

Tabelle 3. Beschreibung der Medikamenteneinnahme in der MDD- Patientenkohorte (n = 28)*

SSRI /SNRIs (Nr.)	Venlafaxin (9), Escitalopram (1), Duloxetin (2), Fluoxetin (1), Sertralin (1), Milnacipran (2)
Andere Antidepressiva (Nr.)	Mirtazapin (3), Bupropion (3), Agomelatin (1), Trimipramin (3)
Andere Psychopharmaka (Nr.)	Pregabalin (3), Aripiprazol (4), Quetiapin (2), Lamotrigin (2), Lorazepam (3)

*Tabelle aus Cosma NC et al. 2021 entnommen und modifiziert (41).

Wir beobachten, dass die Zellen der Patienten, welche SSRI/SNRIs einnehmen, erniedrigtes IL-6 und TARC in den M2-AS Messungen aufwiesen (Mann-Whitney-U-Tests, jeweils $p < 0,04$). Bei der Betrachtung der kumulativen Z-Scores zeigten die Zellen der mit SSRI/SNRIs behandelten Patienten niedrigere M1-Marker unter individualisierten Kulturbedingungen in Gegenwart von AS als in FCS (41), ohne einen ähnlichen Einfluss auf die M2-Polarisierung. Das deutet auf eine geringere pro-entzündliche Aktivierbarkeit unter Exposition mit autologen Seren SSRI/SNRI-behandelter Patienten. Unsere Ergebnisse, die ein niedrigeres IL-6 in Gegenwart der autologen Seren von Patienten zeigen, die SSRIs oder SNRIs erhielten, passen in diese oben erwähnte Literatur. Die Tatsache, dass bei Patienten, die SSRI/SNRIs erhalten, auch TARC (CCL17 - ein chemotaktisches Mittel, das insbesondere die Th2-Zellen stimuliert) Spiegel senkt, steht im Einklang mit der Evidenz für einen niedrigeren IL-10-Wert (ebenfalls anti-entzündliches Zytokin) nach einer antidepressiven Behandlung (18, 56).

Insgesamt weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass pro-inflammatorische Aktivierung durch die Gabe von SSRI/SNRIs erniedrigt wird, ohne dabei die entzündungshemmende Zytokinsekretion zu stimulieren. Somit konnten wir durch unserer individualisierten Assays die bekannten anti-inflammatorischen Effekte einer SSRI/SNRI Behandlung auch in einer personalisierten Zellkultur abbilden.

4.3.5. Geschlechtsspezifische Effekte der Makrophagenpolarisierung

Obwohl Frauen zweimal häufiger als Männer von Depression betroffen sind, gibt es bisher nur wenige Hypothesen zu den biologischen Grundlagen dieser epidemiologischen Erkenntnisse (4, 59). Insbesondere fehlen derzeit Erkenntnisse zu den möglichen geschlechtsspezifischen Unterschieden bezüglich der Beteiligung des Immunsystems in der Pathogenese der Depression. Einige Studien zeigten höhere IL-6-, TNF- α -, IL-8- oder CRP-Werte bei depressiven Frauen und höhere IL-12-Werte bei depressiven Männern im Vergleich mit gleichaltrigen gesunden Kontrollen (59-62). Bei MDD-Patienten wurde unabhängig vom Geschlecht eine erhöhte Anzahl von Leukozyten festgestellt, während periphere Monozytenzahlen nur bei Männern höher waren (63). Die bisherigen Studien zur Makrophagenpolarisierung bei MDD berichteten nur von männlichen Teilnehmern oder Zelllinien (52, 64), sodass hier ein Geschlechtsbias vorliegen kann. Die Makrophagenpolarisierung im Kontext von MDD wurde bei Frauen bisher vor allem in der Schwangerschaft untersucht (65). Dabei zeigte sich, dass bei schwangeren an Depression erkrankten Frauen Makrophagen im Vergleich zu gesunden schwangeren Frauen ein höheres pro-inflammatorisches Profil aufweisen (65). Die meisten Studien haben bisher jedoch keine geschlechtsspezifische Analyse durchgeführt, was ein unvollständiges Bild zu geschlechtsspezifischen Unterschieden in der Entzündungsaktivierung bei depressiven Patienten liefert (60, 61).

Bei der Untersuchung geschlechtsspezifischer Effekte in unserer MDD-Kohorte fanden wir TARC bei depressiven Männern im Vergleich zu Frauen signifikant höher exprimiert, wenn die M2-Polarisierung in AS stattfand (Mann-Whitney-U, $p = 0,013$). Die kumulativen Z-Scores zeigten eine höhere pro-inflammatorische M1-Aktivierung bei depressiven Frauen, aber nicht bei Männern. Die M2-Stimulation führte zu einem gegenteiligen Effekt mit einer reduzierten M2-Marker-Synthese bei depressiven Frauen, aber nicht bei männlichen Teilnehmern. Darüber hinaus beobachteten wir nur bei den weiblichen

Teilnehmern eine Korrelation von der subjektiven Schwereinschätzung der Depressionsskala (BDI) mit der Zunahme der M1-Polarisierung (Abbildung 4). Unsere Ergebnisse, die eine höhere M1-Polarisierung bei Frauen mit MDD im Vergleich zu Männern zeigen, stimmen mit den wenigen veröffentlichten Studien überein, die höhere Zytokinspiegel im peripheren Blut bei Frauen zeigen (62, 66, 67).

Der Einfluss der Sexualhormone auf Immunzellendifferenzierung ist seit einiger Zeit bekannt. Androgene zeigen eine anti-entzündliche Wirkung (60, 61), während hohe Östrogenspiegel eine Neigung zu entzündungshemmenden und niedrige Östrogenspiegel zu entzündungsfördernden Profilen induzieren (36) (68-70). Daher ist der differentielle Makrophagen-Polarisierungseffekt beider Geschlechter, der in unserer depressiven Stichprobe beobachtet wurde, konsistent mit diesen Beobachtungen (61).

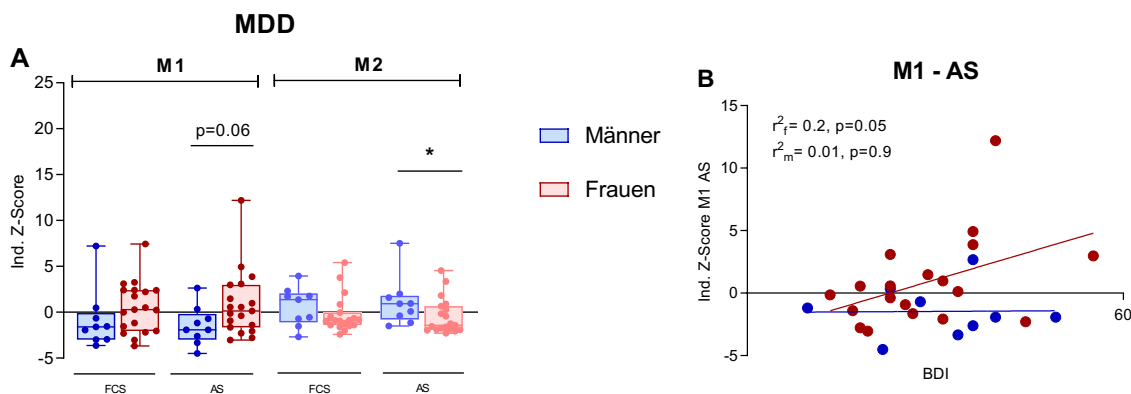


Abbildung 4. Geschlechtsspezifische Effekte der Makrophagenpolarisierung bei Patienten mit Depression. Aus Cosma NC et al. 2021 entnommen und modifiziert. Die Abbildung zeigt die individuellen Werte (jeder Punkt repräsentiert die Werte eines Probanden) in Folge der M1 (LPS) und M2 (IL-10/IL-4/TGF- β) Polarisierung (41). **A** Individuelle Z-Scores unter FCS- und AS-Bedingungen dargestellt für männliche und weibliche Patienten mit Depression. **B** Korrelation zwischen individuellen Z-Werten nach M1-Polarisierung in AS und Depressionsskala BDI. MDD: Depressive Störung. Die Werte sind als Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Mann-Whitney-U-Tests (Unterschiede zwischen den Gruppen) und lineare Regression wurden als statistischen Tests benutzt. * $p < 0.05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Die Tatsache, dass autologes Serum die Geschlechtsunterschiede verstärkte, lässt eine kostimulierende Wirkung der eigenen Serumhormone vermuten. Die Messung des Serumspiegels von Sexualhormonen ist daher ein Aspekt, der Gegenstand nachfolgender Studien sein sollte. Generell sollten sich zukünftige Studien, die sich mit dem angeborenen Immunsystem und seiner Rolle in der Pathogenese der MDD befassen, auf Geschlechtsunterschiede bei der Makrophagen-Polarisierung konzentrieren. Dies eröffnet den Weg zu Ansätzen für personalisierte Medizin, wie zum Beispiel differenzierte und neue

pharmakotherapeutische Konzepte auf Basis der Makrophagenpolarisierung bei weiblichen MDD-Patienten.

4.4. Limitationen

Folgende Limitationen unserer Studie sind zu diskutieren. Der Einschluss von ausschließlich mittelschwer bis schwer erkrankten Patienten stellt zwar eine realistische klinische Stichprobe der stationären MDD-Population dar, schließt jedoch leichte depressive Episoden aus. Zudem spiegelt der Ausschluss einer Vielzahl psychiatrischer Komorbiditäten nicht die gesamte Population depressiver Patienten wider. Des Weiteren wurden sowohl Patienten und Kontrollpersonen mit geringen medizinischen Komorbiditäten rekrutiert, die nur einen Teil des MDD-Spektrums abdecken. Eine Vielzahl von Studien hat gezeigt, dass depressive Patienten mit Komorbiditäten wie dem metabolischen Syndrom, kardiovaskuläre oder Autoimmunerkrankungen übermäßig häufig ebenfalls eine erhöhte subklinische Entzündung aufweisen (3, 71). Unsere Entscheidung, nur hospitalisierte mittelschwere bis schwere MDD-Patienten einzubeziehen, zielte auch darauf ab, die Variabilität der Kohorte zu begrenzen und den Schweregrad zu fokussieren. Auch wurden bewusst bestimmte internistische Komorbiditäten ausgeschlossen um einen möglichen verfälschenden Einfluss („confounding“) dieser Erkrankung auszuschließen und Effekte hauptsächlich auf MDD zurückführen zu können. In einem aktuellen Review zu Markern für Therapieausfälle wurde gezeigt, dass die Rekrutierung stationärer Teilnehmer die Variabilität reduziert (29).

4.5. Schlussfolgerungen und weiterführende wissenschaftliche Fragestellungen

Die hohe Vielfalt der Faktoren, die mit dem Auftreten von MDD assoziiert sind, bedingen ein komplexes Pathogenesemodell (1, 4). Die Beteiligung des angeborenen Immunsystems an der Pathogenese der Depression ist lange postuliert und untersucht worden (10, 17, 27, 29, 72). In unserer Studie haben wir zum ersten Mal die Polarisierungskapazität von Makrophagen bei Patienten mit mittelschwerer bis schwerer Depression im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen untersucht und gleichzeitig die Rolle des individuellen endokrinen/inflammatorischen Milieus erforscht. In Übereinstimmung mit der Literatur, die auf einen höheren pro-inflammatorischen Zustand bei MDD hinweist, (12, 15, 17, 19, 23, 29, 72),

fanden wir bei unseren Patienten einen höheren M1-Polarisierungstyp. Die Anwesenheit von autologen Seren in den Kulturmedien verstärkte den M1-Polarisierungsunterschied zwischen den Gruppen nicht. Zu unserer Überraschung fanden wir bei MDD-Patienten eine höhere M2-Polarisierung, wenn die Zellen mit autologen Seren kostimuliert wurden. Unsere Ergebnisse zeigen, dass Mo-MΦs bei MDD-Patienten plastisch sind und in der Lage sind, sowohl in M1 als auch in M2 mit vergleichbarer oder höherer Plastizität zu polarisieren, als dies bei Kontrollprobanden beobachtet wurde. Unseres Wissens ist dies die erste Studie, die die Polarisierungskapazität von Mo-MΦs zu M1 oder M2 bei mittelschwerer bis schwerer MDD in einem eins-zu-eins-Designvergleich mit gesunden Kontrollen untersucht.

Unsere Daten legen nahe, dass die Mo-MΦ von MDD Patienten eine Bereitschaft zur M1-Polarisierung besitzen, aber auch plastisch sind und bei Kultivierung in autologen Seren zu einer M2-Polarisierung auf ähnlichem oder sogar höherem Niveau als gesunde Probanden fähig sind. Zudem könnte der Unterschied der Makrophagen-Polarisierung zwischen männlichen und weiblichen MDD eine Grundlage für zukünftige personalisierte Therapieoptionen darstellen.

Unser individualisiertes Zellkulturmodell bietet eine einfache, ressourcenarme Plattform für eine schnelle patientenspezifische Analyse verschiedener Aspekte des angeborenen Immunsystems, welches vor allem zu dem Zweck von zukünftigen Screenings von individualisierten Therapiestrategien benutzt werden kann. Weitere Studien in unserem Labor sind in Bearbeitung, um dieses Modell bei weiteren psychischen Erkrankungen, wie Bipolarer Störung sowie der Alzheimer Erkrankung zu untersuchen.

4.6. Literaturverzeichnis

1. Kessler RC, Bromet EJ. The epidemiology of depression across cultures. *Annu Rev Public Health*. 2013;34:119-38.
2. Jacobi F, Höfler M, Siegert J, Mack S, Gerschler A, Scholl L, Busch MA, Hapke U, Maske U, Seiffert I, Gaebel W, Maier W, Wagner M, Zielasek J, Wittchen HU. Twelve-month prevalence, comorbidity and correlates of mental disorders in Germany: the Mental Health Module of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1-MH). *Int J Methods Psychiatr Res*. 2014;23(3):304-19.
3. Collaborators GDaIaP. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2017;390(10100):1211-59.
4. Lim GY, Tam WW, Lu Y, Ho CS, Zhang MW, Ho RC. Prevalence of Depression in the Community from 30 Countries between 1994 and 2014. *Sci Rep*. 2018;8(1):2861.
5. Leonard BE. Inflammation and depression: a causal or coincidental link to the pathophysiology? *Acta Neuropsychiatr*. 2018;30(1):1-16.
6. Otte C, Gold SM, Penninx BW, Pariante CM, Etkin A, Fava M, Mohr DC, Schatzberg AF. Major depressive disorder. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16065.
7. Wohleb ES, Franklin T, Iwata M, Duman RS. Integrating neuroimmune systems in the neurobiology of depression. *Nat Rev Neurosci*. 2016;17(8):497-511.
8. Reader BF, Jarrett BL, McKim DB, Wohleb ES, Godbout JP, Sheridan JF. Peripheral and central effects of repeated social defeat stress: monocyte trafficking, microglial activation, and anxiety. *Neuroscience*. 2015;289:429-42.
9. Wohleb ES, Delpech JC. Dynamic cross-talk between microglia and peripheral monocytes underlies stress-induced neuroinflammation and behavioral consequences. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2017;79(Pt A):40-8.
10. Osimo EF, Pillinger T, Rodriguez IM, Khandaker GM, Pariante CM, Howes OD. Inflammatory markers in depression: A meta-analysis of mean differences and variability in 5,166 patients and 5,083 controls. *Brain Behav Immun*. 2020;87:901-9.
11. Pitharouli MC, Hagenaaars SP, Glanville KP, Coleman JRI, Hotopf M, Lewis CM, Pariante CM. Elevated C-Reactive Protein in Patients With Depression, Independent of Genetic, Health, and Psychosocial Factors: Results From the UK Biobank. *Am J Psychiatry*. 2021;178(6):522-9.
12. Enache D, Pariante CM, Mondelli V. Markers of central inflammation in major depressive disorder: A systematic review and meta-analysis of studies examining cerebrospinal fluid, positron emission tomography and post-mortem brain tissue. *Brain Behav Immun*. 2019;81:24-40.
13. Du Preez A, Eum J, Eiben I, Eiben P, Zunszain PA, Pariante CM, Thuret S, Fernandes C. Do different types of stress differentially alter behavioural and neurobiological outcomes associated with depression in rodent models? A systematic review. *Front Neuroendocrinol*. 2021;61:100896.
14. Setiawan E, Wilson AA, Mizrahi R, Rusjan PM, Miler L, Rajkowska G, Suridjan I, Kennedy JL, Rekkas PV, Houle S, Meyer JH. Role of translocator protein density, a marker of neuroinflammation, in the brain during major depressive episodes. *JAMA Psychiatry*. 2015;72(3):268-75.
15. Setiawan E, Attwells S, Wilson AA, Mizrahi R, Rusjan PM, Miler L, Xu C, Sharma S, Kish S, Houle S, Meyer JH. Association of translocator protein total distribution volume with duration of untreated major depressive disorder: a cross-sectional study. *Lancet Psychiatry*. 2018;5(4):339-47.
16. Yirmiya R, Rimmerman N, Reshef R. Depression as a microglial disease. *Trends Neurosci*. 2015;38(10):637-58.
17. Köhler CA, Freitas TH, Maes M, de Andrade NQ, Liu CS, Fernandes BS, Stubbs B, Solmi M, Veronese N, Herrmann N, Raison CL, Miller BJ, Lanctôt KL, Carvalho AF. Peripheral cytokine and chemokine alterations in depression: a meta-analysis of 82 studies. *Acta Psychiatr Scand*. 2017;135(5):373-87.
18. Köhler CA, Freitas TH, Stubbs B, Maes M, Solmi M, Veronese N, de Andrade NQ, Morris G, Fernandes BS, Brunoni AR, Herrmann N, Raison CL, Miller BJ, Lanctôt KL, Carvalho AF. Peripheral

- Alterations in Cytokine and Chemokine Levels After Antidepressant Drug Treatment for Major Depressive Disorder: Systematic Review and Meta-Analysis. *Mol Neurobiol.* 2018;55(5):4195-206.
19. Haroon E, Daguanno AW, Woolwine BJ, Goldsmith DR, Baer WM, Wommack EC, Felger JC, Miller AH. Antidepressant treatment resistance is associated with increased inflammatory markers in patients with major depressive disorder. *Psychoneuroendocrinology.* 2018;95:43-9.
 20. Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, Lanctôt KL. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry.* 2010;67(5):446-57.
 21. Goldsmith DR, Rapaport MH, Miller BJ. A meta-analysis of blood cytokine network alterations in psychiatric patients: comparisons between schizophrenia, bipolar disorder and depression. *Mol Psychiatry.* 2016;21(12):1696-709.
 22. Kiraly DD, Horn SR, Van Dam NT, Costi S, Schwartz J, Kim-Schulze S, Patel M, Hodes GE, Russo SJ, Merad M, Iosifescu DV, Charney DS, Murrough JW. Altered peripheral immune profiles in treatment-resistant depression: response to ketamine and prediction of treatment outcome. *Transl Psychiatry.* 2017;7(3):e1065.
 23. Chamberlain SR, Cavanagh J, de Boer P, Mondelli V, Jones DNC, Drevets WC, Cowen PJ, Harrison NA, Pointon L, Pariante CM, Bullmore ET. Treatment-resistant depression and peripheral C-reactive protein. *Br J Psychiatry.* 2019;214(1):11-9.
 24. Smith RS. The macrophage theory of depression. *Med Hypotheses.* 1991;35(4):298-306.
 25. Syed SA, Beurel E, Loewenstein DA, Lowell JA, Craighead WE, Dunlop BW, Mayberg HS, Dhabhar F, Dietrich WD, Keane RW, de Rivero Vaccari JP, Nemeroff CB. Defective Inflammatory Pathways in Never-Treated Depressed Patients Are Associated with Poor Treatment Response. *Neuron.* 2018;99(5):914-24.e3.
 26. Alvarez-Mon MA, Gómez AM, Orozco A, Lahera G, Sosa MD, Diaz D, Auba E, Albillos A, Monserrat J, Alvarez-Mon M. Abnormal Distribution and Function of Circulating Monocytes and Enhanced Bacterial Translocation in Major Depressive Disorder. *Front Psychiatry.* 2019;10:812.
 27. Hasselmann H, Gamradt S, Taenzer A, Nowacki J, Zain R, Patas K, Ramien C, Paul F, Wingenfeld K, Piber D, Gold SM, Otte C. Pro-inflammatory Monocyte Phenotype and Cell-Specific Steroid Signaling Alterations in Unmedicated Patients With Major Depressive Disorder. *Front Immunol.* 2018;9:2693.
 28. Zhang HX, Xu YQ, Li YY, Lu MF, Shi SX, Ji JL, Wang LW. Difference in proinflammatory cytokines produced by monocytes between patients with major depressive disorder and healthy controls. *J Affect Disord.* 2018;234:305-10.
 29. Liu JJ, Wei YB, Strawbridge R, Bao Y, Chang S, Shi L, Que J, Gadad BS, Trivedi MH, Kelsoe JR, Lu L. Peripheral cytokine levels and response to antidepressant treatment in depression: a systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry.* 2019.
 30. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaceli SA, Mardani F, Seifi B, Mohammadi A, Afshari JT, Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol.* 2018;233(9):6425-40.
 31. Saeed S, Quintin J, Kerstens HH, Rao NA, Aghajani-refah A, Matarese F, Cheng SC, Ratter J, Berentsen K, van der Ent MA, Sharifi N, Janssen-Megens EM, Ter Huurne M, Mandoli A, van Schaik T, Ng A, Burden F, Downes K, Frontini M, Kumar V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Ouwehand WH, van der Meer JW, Joosten LA, Wijmenga C, Martens JH, Xavier RJ, Logie C, Netea MG, Stunnenberg HG. Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science.* 2014;345(6204):1251086.
 32. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014;6:13.
 33. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, van Ginderachter JA, Vogel SN, Wynn TA. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity.* 2014;41(1):14-20.
 34. Mia S, Warnecke A, Zhang XM, Malmström V, Harris RA. An optimized protocol for human M2 macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF- β yields a dominant immunosuppressive phenotype. *Scand J Immunol.* 2014;79(5):305-14.
 35. Murray PJ. Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol.* 2017;79:541-66.

36. Keselman A, Fang X, White PB, Heller NM. Estrogen Signaling Contributes to Sex Differences in Macrophage Polarization during Asthma. *J Immunol.* 2017;199(5):1573-83.
37. Kalkman HO, Feuerbach D. Antidepressant therapies inhibit inflammation and microglial M1-polarization. *Pharmacol Ther.* 2016;163:82-93.
38. Ormel PR, van Mierlo HC, Litjens M, Strien MEV, Hol EM, Kahn RS, de Witte LD. Characterization of macrophages from schizophrenia patients. *NPJ Schizophr.* 2017;3(1):41.
39. Prinz M, Priller J. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci.* 2014;15(5):300-12.
40. Sevenich L. Brain-Resident Microglia and Blood-Borne Macrophages Orchestrate Central Nervous System Inflammation in Neurodegenerative Disorders and Brain Cancer. *Front Immunol.* 2018;9:697.
41. Cosma NC, Usekes B, Otto LR, Gerike S, Heuser I, Regen F, Hellmann-Regen J. M1/M2 polarization in major depressive disorder: Disentangling state from trait effects in an individualized cell-culture-based approach. *Brain Behav Immun.* 2021;94:185-95.
42. Montgomery SA, Asberg M. A new depression scale designed to be sensitive to change. *Br J Psychiatry.* 1979;134:382-9.
43. HAMILTON M. A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1960;23:56-62.
44. Regen F, Herzog I, Hahn E, Ruehl C, Le Bret N, Dettling M, Heuser I, Hellmann-Regen J. Clozapine-induced agranulocytosis: Evidence for an immune-mediated mechanism from a patient-specific in-vitro approach. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2017;316:10-6.
45. Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;313(4):856-62.
46. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
47. Song MK, Lin FC, Ward SE, Fine JP. Composite variables: when and how. *Nurs Res.* 2013;62(1):45-9.
48. Milenkovic VM, Sarubin N, Hilbert S, Baghai TC, Stöffler F, Lima-Ojeda JM, Manook A, Almeqbaali K, Wetzel CH, Rupprecht R, Nothdurfter C. Macrophage-Derived Chemokine: A Putative Marker of Pharmacological Therapy Response in Major Depression? *Neuroimmunomodulation.* 2017;24(2):106-12.
49. Zhu S, Li L, Li Y, Cao W. Macrophage related cytokine expressions in depression mouse model induced by chronic unpredictable mild stress. *Pak J Pharm Sci.* 2017;30(5(Supplementary)):1951-5.
50. Yroni A, Aouizerate B, El-Hage W, Moliere F, Thalamas C, Delcourt N, Sporer M, Taib S, Schmitt L, Arlicot N, Meline D, Sommet A, Salabert AS, Guillaume S, Courtet P, Galtier F, Mariano-Goulart D, Champfleury NM, Bars EL, Desmidt T, Lemaire M, Camus V, Santiago-Ribeiro MJ, Cottier JP, Fernandez P, Meyer M, Dousset V, Doumy O, Delhaye D, Capuron L, Leboyer M, Haffen E, Péran P, Payoux P, Arbus C. Assessment of Translocator Protein Density, as Marker of Neuroinflammation, in Major Depressive Disorder: A Pilot, Multicenter, Comparative, Controlled, Brain PET Study (INFLADEP Study). *Front Psychiatry.* 2018;9:326.
51. Bekhbat M, Chu K, Le NA, Woolwine BJ, Haroon E, Miller AH, Felger JC. Glucose and lipid-related biomarkers and the antidepressant response to infliximab in patients with treatment-resistant depression. *Psychoneuroendocrinology.* 2018;98:222-9.
52. Nowak W, Grendas LN, Sanmarco LM, Estecho IG, Arena Á, Eberhardt N, Rodante DE, Aoki MP, Daray FM, Carrera Silva EA, Errasti AE. Pro-inflammatory monocyte profile in patients with major depressive disorder and suicide behaviour and how ketamine induces anti-inflammatory M2 macrophages by NMDAR and mTOR. *EBioMedicine.* 2019;50:290-305.
53. Lekakis J, Ikonomidis I, Papoutsis Z, Moutsatsou P, Nikolaou M, Parissis J, Kremastinos DT. Selective serotonin re-uptake inhibitors decrease the cytokine-induced endothelial adhesion molecule expression, the endothelial adhesiveness to monocytes and the circulating levels of vascular adhesion molecules. *Int J Cardiol.* 2010;139(2):150-8.
54. Tynan RJ, Weidenhofer J, Hinwood M, Cairns MJ, Day TA, Walker FR. A comparative examination of the anti-inflammatory effects of SSRI and SNRI antidepressants on LPS stimulated microglia. *Brain Behav Immun.* 2012;26(3):469-79.

55. Walker FR. A critical review of the mechanism of action for the selective serotonin reuptake inhibitors: do these drugs possess anti-inflammatory properties and how relevant is this in the treatment of depression? *Neuropharmacology*. 2013;67:304-17.
56. Wang L, Wang R, Liu L, Qiao D, Baldwin DS, Hou R. Effects of SSRIs on peripheral inflammatory markers in patients with major depressive disorder: A systematic review and meta-analysis. *Brain Behav Immun*. 2019;79:24-38.
57. Baharav E, Bar M, Taler M, Gil-Ad I, Karp L, Weinberger A, Weizman A. Immunomodulatory effect of sertraline in a rat model of rheumatoid arthritis. *Neuroimmunomodulation*. 2012;19(5):309-18.
58. Habib M, Shaker S, El-Gayar N, Aboul-Fotouh S. The effects of antidepressants "fluoxetine and imipramine" on vascular abnormalities and Toll like receptor-4 expression in diabetic and non-diabetic rats exposed to chronic stress. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120559.
59. Birur B, Amrock EM, Shelton RC, Li L. Sex Differences in the Peripheral Immune System in Patients with Depression. *Front Psychiatry*. 2017;8:108.
60. Rainville JR, Hodes GE. Inflaming sex differences in mood disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2019;44(1):184-99.
61. Rainville JR, Tsyglakova M, Hodes GE. Deciphering sex differences in the immune system and depression. *Front Neuroendocrinol*. 2018;50:67-90.
62. Pallavi P, Sagar R, Mehta M, Sharma S, Subramaniam A, Shamshi F, Sengupta U, Pandey RM, Mukhopadhyay AK. Serum cytokines and anxiety in adolescent depression patients: Gender effect. *Psychiatry Res*. 2015;229(1-2):374-80.
63. Maes M, Lambrechts J, Suy E, Vandervorst C, Bosmans E. Absolute number and percentage of circulating natural killer, non-MHC-restricted T cytotoxic, and phagocytic cells in unipolar depression. *Neuropsychobiology*. 1994;29(4):157-63.
64. Ferrari P, Parisi MM, Colombo R, Becker M, Fries G, Ascoli BM, Géa LP, Anna MK, Kapczinski F, Klamt F, Guma FT, Rosa AR, Barbé-Tuana FM. Depression and Mania Induce Pro-inflammatory Activation of Macrophages Following Application of Serum from Individuals with Bipolar Disorder. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2018;16(1):103-8.
65. Edvinsson Å, Bränn E, Hellgren C, Freyhult E, White R, Kamali-Moghaddam M, Olivier J, Bergquist J, Boström AE, Schiöth HB, Skalkidou A, Cunningham JL, Sundström-Poromaa I. Lower inflammatory markers in women with antenatal depression brings the M1/M2 balance into focus from a new direction. *Psychoneuroendocrinology*. 2017;80:15-25.
66. Ossenkopppele R, Lyoo CH, Jester-Broms J, Sudre CH, Cho H, Ryu YH, Choi JY, Smith R, Strandberg O, Palmqvist S, Kramer J, Boxer AL, Gorno-Tempini ML, Miller BL, La Joie R, Rabinovici GD, Hansson O. Assessment of Demographic, Genetic, and Imaging Variables Associated With Brain Resilience and Cognitive Resilience to Pathological Tau in Patients With Alzheimer Disease. *JAMA Neurol*. 2020.
67. Gilman SE, Cherkerzian S, Buka SL, Hahn J, Hornig M, Goldstein JM. Prenatal immune programming of the sex-dependent risk for major depression. *Transl Psychiatry*. 2016;6(5):e822.
68. Luster MI, Hayes HT, Korach K, Tucker AN, Dean JH, Greenlee WF, Boorman GA. Estrogen immunosuppression is regulated through estrogenic responses in the thymus. *J Immunol*. 1984;133(1):110-6.
69. Pelekanou V, Kampa M, Kiagiadaki F, Deli A, Theodoropoulos P, Agrogiannis G, Patsouris E, Tsapis A, Castanas E, Notas G. Estrogen anti-inflammatory activity on human monocytes is mediated through cross-talk between estrogen receptor ER α 36 and GPR30/GPER1. *J Leukoc Biol*. 2016;99(2):333-47.
70. Pfeifer RW, Patterson RM. Modulation of lymphokine-induced macrophage activation by estrogen metabolites. *J Immunopharmacol*. 1985;7(2):247-63.
71. Wong BC, Chau CK, Ao FK, Mo CH, Wong SY, Wong YH, So HC. Differential associations of depression-related phenotypes with cardiometabolic risks: Polygenic analyses and exploring shared genetic variants and pathways. *Depress Anxiety*. 2019;36(4):330-44.
72. Furtado M, Katzman MA. Examining the role of neuroinflammation in major depression. *Psychiatry Res*. 2015;229(1-2):27-36.

5. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Nicoleta-Carmen Cosma, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Funktionelle Untersuchung zur Makrophagenpolarisierung in der Pathogenese depressiver Störungen“, “Dynamics of Innate Immunity in Major Depressive Disorder” selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

6. ANTEILSERKLÄRUNG AN DER ERFOLGTEN PUBLIKATION

Publikation:

Cosma NC, Usekes B, Otto LR, Gerike S, Heuser I, Regen F, Hellmann-Regen J

M1/M2 polarization in major depressive disorder: Disentangling state from trait effects in an individualized cell-culture-based approach

Brain Behav Immun. 2021 May; 94:185-195. Epub 2021 Feb 17.

Beitrag im Einzelnen:

Literaturrecherche und Konzeption: Nach umfangreicher individueller Literaturrecherche zum aktuellen Stand der Forschung habe ich zusammen mit PD Dr. med. Julian Hellmann-Regen die Studie konzipiert, inklusive Ein- und Ausschlusskriterien sowie aller Studienprotokolle.

Studienkoordination und Planung: Als approbierte Ärztin war ich allein verantwortlich für die Studienkoordination und Planung, und habe alle depressiven Patienten der Studie sowie 70% der gesunden Probanden rekrutiert. Die restlichen 30% der gesunden Probanden wurden durch Otto L. rekrutiert.

Durchführung der Experimente: Alle *in vitro* Experimente (jeweils 5-tägige individualisierte Zellkultur für die 56 Probanden) anschließend die Messungen der gesamten Proben (PCR, Durchflusszytometrie) wurden durch mich selbständig durchgeführt. Herr Berk Usekes, M. Sc., hat mich bei der Etablierung des qPCR-Protokolls sowie beim Design der qPCR Primer unterstützt.

Datenauswertung: Die gesamte Datenaufbereitung, Datenauswertung sowie die Erstellung aller Tabellen und Abbildungen des Papers wurden selbständig durch mich durchgeführt. Als Vorbereitung habe ich einen SPSS-Intensivkurs besucht.

Schreiben des Artikels: Unter Anleitung durch PD Dr. med. Hellmann-Regen war ich Alleinverantwortliche für das Verfassen des Manuskripts der Publikation.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

7. AUSZUG AUS DER JOURNAL SUMMARY LIST

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2019** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"PSYCHIATRY"** Selected Category
 Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 216 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1.	World Psychiatry	6,486	40.595	0.017130
2.	JAMA Psychiatry	13,433	17.471	0.056110
3.	Lancet Psychiatry	6,405	16.209	0.028290
4.	PSYCHOTHERAPY AND PSYCHOSOMATICS	4,275	14.864	0.006480
5.	AMERICAN JOURNAL OF PSYCHIATRY	41,967	14.119	0.034380
6.	MOLECULAR PSYCHIATRY	22,227	12.384	0.054730
7.	BIOLOGICAL PSYCHIATRY	44,016	12.095	0.053910
8.	JOURNAL OF NEUROLOGY NEUROSURGERY AND PSYCHIATRY	30,621	8.234	0.028510
9.	SCHIZOPHRENIA BULLETIN	17,703	7.958	0.027070
10.	BRITISH JOURNAL OF PSYCHIATRY	24,380	7.850	0.020520
11.	JOURNAL OF CHILD PSYCHOLOGY AND PSYCHIATRY	19,837	7.035	0.021080
12.	JOURNAL OF CHILD PSYCHOLOGY AND PSYCHIATRY	19,837	7.035	0.021080
13.	JOURNAL OF THE AMERICAN ACADEMY OF CHILD AND ADOLESCENT PSYCHIATRY	19,831	6.936	0.017840
14.	NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY	26,281	6.751	0.040680
*	15. BRAIN BEHAVIOR AND IMMUNITY	16,285	6.633	0.028560
16.	JOURNAL OF ABNORMAL PSYCHOLOGY	16,003	6.484	0.014170
17.	ADDICTION	19,861	6.343	0.030820
18.	Epidemiology and Psychiatric Sciences	1,584	5.876	0.004770
19.	PSYCHOLOGICAL MEDICINE	26,702	5.813	0.039350
20.	Clinical Psychological Science	2,599	5.415	0.011100

* BRAIN BEHAVIOR AND IMMUNITY ist der 15. aus 216 Journale in Bereich Psychiatrie, bedeutend genau 6,9 % der Journale, somit befindet sich in der Esten 25% der Journale als Top Journal (Q1).

8. DRUCKEXEMPLAR DER ORIGINALPUBLIKATION

Cosma NC, Usekes B, Otto LR, Gerike S, Heuser I, Regen F, Hellmann-Regen J
M1/M2 polarization in major depressive disorder: Disentangling state from trait effects in an individualized cell-culture-based approach

Brain Behav Immun. 2021 May; 94:185-195. Epub 2021 Feb 17.

IF: 6,633

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159121000519?via%3Dihub>
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.02.009>



Contents lists available at ScienceDirect

Brain Behavior and Immunity

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybrbi

M1/M2 polarization in major depressive disorder: Disentangling state from trait effects in an individualized cell-culture-based approach

Nicoleta Carmen Cosma^{*}, Berk Üsekes, Lisa Rebecca Otto, Susanna Gerike, Isabella Heuser, Francesca Regen¹, Julian Hellmann-Regen¹

Charité – Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Section Clinical Neurobiology, Department of Psychiatry and Psychotherapy, Campus Benjamin Franklin, Berlin, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Major depressive disorder
Macrophage polarization
Inflammation
Cytokine
SSRI
SNRI
Gender differences

ABSTRACT

Accumulating evidence indicates the specific involvement of inflammatory processes in major depressive disorder (MDD), particularly affecting innate immunity. Most immune alterations have so far been determined based on plasma or cerebrospinal fluid cytokine levels. To precisely characterize putative innate immune-mediated mechanisms in MDD pathogenesis, we sought to disentangle “state” from “trait” effects in a patient-specific cell model by quantifying the impact of patient-derived autologous sera (AS) on patient-specific monocyte-derived macrophages (Mo-MΦs) polarization *in vitro*.

Mo-MΦs were generated from 28 patients with moderate to severe MDD and 28 age-, sex-, smoking status- and BMI-matched healthy controls (HC). Cells were treated either with AS or fetal calf serum (FCS) and polarized into M1 (LPS), M2 (IL-10, IL-4, TGF-β) or M0 (unstimulated) macrophages. Polarization capacity was quantified by means of specific M1 (*CCR7*, *CD86*, *CXCL10*, IL-12p70, TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-12p40, IL-23, IP-10) and M2 (*CD206*, IL-10, TARG, IL-1RA) markers.

Compared to HC, significantly increased M1-polarization was observed for MDD patients in the presence of FCS, however, polarization in AS enriched media determined an increased M2-polarization in patients. Moreover, female MDD patients exhibited increased M1- and decreased M2-polarization in both conditions compared to male MDD patients.

Our data suggests that Mo-MΦs derived from patients with MDD exhibit facilitated M1-polarization under traditional cell culture conditions and an increased potential for M2-polarization when cultured in AS. Striking inter-individual variation and pronounced gender effects highlight the potential utility of our personalized cell model-based approach to aid diagnostic and therapeutic decisions.

1. Introduction

Major depressive disorder (MDD) is one of the most prevalent psychiatric disorders, resulting in a high economic burden with numbers on the rise (Collaborators GDAIaP, 2017). The etiology of MDD is complex, encompassing psychosocial, biological, and environmental factors. However, the exact pathology remains incomplete (Leonard, 2018; Wohleb et al., 2016; Enache et al., 2019). An emerging body of research suggests that chronic inflammatory processes, including pro-inflammatory activation of microglial cells and elevated peripheral cytokine levels, play a pathogenic role in MDD (Wohleb et al., 2016; Yirmiya et al., 2015; Köhler et al., 2017; Liu et al., 2019). Monocytes and

tissue-resident macrophages have long been hypothesized to be involved in the development of depression (Smith, 1991). While alterations in monocyte function in MDD are well documented (Hasselmann et al., 2018; Alvarez-Mon et al., 2019; Nowak et al., 2019), the direction and nature of the changes these cells undertake when they migrate into the affected tissue and polarize into macrophages remain subject to debate.

Microglia and macrophages present in perivascular spaces, meninges, and choroid plexus are the most important immune cells in the brain (Prinz and Priller, 2014). The ability of blood-resident monocytes to traffic into the brain and differentiate into macrophages during pathological states, like psychosocial stress, has been demonstrated in mouse models (Wohleb et al., 2014), as well as in humans

^{*} Corresponding author.

E-mail address: nicoleta-carmen.cosma@charite.de (N.C. Cosma).

¹ Equal contribution.

<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.02.009>

Received 7 August 2020; Received in revised form 6 February 2021; Accepted 9 February 2021

Available online 17 February 2021

0889-1591/© 2021 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

(Enache et al., 2019). At a tissue level, monocytes can polarize into macrophages and are capable of secreting 32 times more excitotoxic quinolinic acid than resident microglia (Espey et al., 1997). This raises the question whether monocyte-derived macrophages, together with resident microglia, might play a role in MDD pathology. Due to the lack of direct access to central nervous system-derived microglia or macrophages, the use of monocyte-derived macrophages (Mo-MΦs) has been previously suggested as a tool to characterize aspects of the innate immune system in psychiatric conditions (Nowak et al., 2019; Ormel et al., 2017). While microglia are distinct from other tissue-resident macrophages in terms of their (onto) genetic landscape, it was shown that macrophage and microglial populations exposed to similar environmental cues converge to similar expression patterns (Gosselin et al., 2014; Sevenich, 2018). We therefore sought to characterize the dynamics of Mo-MΦs in MDD compared to healthy controls (HC) *ex vivo*, as a proxy for the cells of the innate immune system in the brain.

In response to environmental stimuli, both macrophages and microglia possess the ability to polarize towards pro- or anti-inflammatory phenotypes, by inducing epigenetic and functional changes of the cells (Saeed et al., 2014; Shapouri-Moghaddam et al., 2018). When stimulated by lipopolysaccharide (LPS) or Th1-secreted cytokines like interferon gamma, macrophages display the so-called “classical” or “M1” profile characterized by secretion of pro-inflammatory cytokines and generation of reactive oxygen species (M1 macrophages). Conversely, Th2-secreted cytokines such as IL-10, IL-4, IL-13 and glucocorticoids (GC) result in an anti-inflammatory, “alternative” or “M2” profile. This is characterized by the production of anti-inflammatory cytokines, increased phagocytosis and positive impact on tissue repair and wound healing (M2 macrophages) (Martinez and Gordon, 2014; Mia et al., 2014).

Studying these pivotal mechanisms of innate immunity in the context of a psychiatric disorder is challenging, since direct access to these cells is limited and profound phenotype changes take place during macrophage differentiation *in vitro* (Saeed et al., 2014). Sexual and stress hormones, antidepressant drugs and neuropeptides (amongst many other stimuli) have been shown to differentially modulate macrophage function, particularly affecting M1- and M2-polarization (Murray, 2017; Keselman et al., 2017; Kalkman and Feuerbach, 2016; Murray et al., 2014). Several lines of evidence indicate that selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) and selective serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors (SNRIs) display anti-inflammatory properties *in vitro* (Kalkman and Feuerbach, 2016; Tynan et al., 2012; Koh et al., 2011; Lekakis et al., 2010). This mechanism is suggested to contribute to the anti-depressive and metabolic effect of these drugs (Wang et al., 2019; Baharav et al., 2012; Nazimek et al., 2017; Wong et al., 2019). Therefore, there is a need for a high degree of individualization, even for *in vitro* assays based on patient-specific cells, particularly when studying aspects of MDD-related pathology. This prompted us to include patient-derived autologous sera (AS) in our *in vitro* studies on patient-specific Mo-MΦs polarization to control for the “state” of each individual participant, compared to the “trait” of the cells when cultured in traditional fetal calf sera (FCS).

Here we assess the potential and dynamics of Mo-MΦs polarization to M1 or M2 macrophages in patients suffering from moderate to severe MDD compared to HC matched for age, body-mass-index (BMI), smoking status and sex. To investigate whether the individual milieu (medication, gender, hormones, nutrients) influences the polarization, we directly compared the effects of FCS and participant-AS on the M1/M2 differentiation capacity of participant-derived primary Mo-MΦs cell cultures (Saeed et al., 2014; Mia et al., 2014). By quantifying the impact of patient-derived AS on patient-specific Mo-MΦs polarization *in vitro*, we sought to differentiate the “state” from “trait” effects in a patient-specific cell model system.

2. Materials and methods

2.1. Participants

Male and female adults hospitalized due to moderate to severe major depressive episodes and healthy controls pairwise matched for age, sex, smoking status, and BMI were enrolled between January 2018 and December 2019. All participants signed an informed consent form, and the local ethics committee approved the study (EA4/002/13). Individuals meeting the MDD criteria were also enrolled in a concurrent study (RAHND; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02439099). Healthy controls ($M_{age} = 46.7 \pm 11.1$; 67.8% female) were recruited through local and social media advertising. All participants underwent a clinical interview, physical examination and their medical history was obtained. All procedures complied with the ethical standards of national and institutional committees on human experimentation and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2008. Patients ($M_{age} = 48.5 \pm 12$; 67.8% female) were recruited from inpatient wards up to one week after hospitalization. They had a specialist-confirmed diagnosis that met the ICD-10/DSM-V criteria of major depressive episode (major depressive disorder or bipolar disorder-depressed phase), as well as a score of 24 or higher on the Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale (MADRS) (Montgomery and Åsberg, 1979), 17 or higher on the 17-Item Hamilton Depression Rating Scale (HAM-D) (Hamilton, 1960) and 21 or higher on the (Beck Depression Inventory-II; BDI-II) questionnaire (Beck et al., 1996). Exclusion criteria for the patient group were all other psychiatric comorbidities except a history of successfully treated post-traumatic stress disorder or anxiety disorder (ex. schizophrenia, active psychotic symptoms, eating disorders, substance use disorders, etc.). Exclusion criteria for all participants were any clinical signs of acute inflammation, recent infection requiring antibiotics (<one month), recent vaccination (<3 months), chronic inflammatory disease, chronic use of NSAIDs or corticoids, heart failure, clinically manifest asthma or allergies, history of cancer and stroke, pregnancy and lactation as well as poorly controlled diabetes, cardiovascular, renal, hepatic, hematologic, endocrine and neurologic disease. Fasting blood samples were taken between 8 and 12 a.m.

2.2. Experimental design

Blood was tapped from each individual subject providing matched serum for subsequent experiments with the same individual's monocytes. Depending on the availability of eligible patients and controls, up to 4 participants (MDD and HC) were recruited on the same day and cells generated on an individual subject basis. Monocytes were isolated and plated in FCS- and in AS- enriched media on the day of blood tap. Cells were plated for a total period of 5 days, of which the last 24 h were under M1-, M2-, or vehicle (M0) stimulation. After the 24 h stimulation, cells and supernatant were collected and stored at -80°C until further analysis. The RNA extraction, cDNA synthesis, qPCR and cytokine analyses were run all at one time after recruitment stop, and all of the respective experiments had MDD and HC samples counterbalanced on each respective plate.

2.3. Monocyte isolation and polarization

Blood was collected from heparinized vacuum-extraction tubes (BD Biosciences, Germany) and PBMCs extracted by FICOLL™ density gradient centrifugation within 1.5 h after blood draw, following previously published protocols (Regen et al., 2017). Serum was collected in vacuum-extraction tubes (BD Biosciences, Germany), allowed to clot at room temperature (RT) for 30 min (maximum 1.5 h) and subsequently centrifuged at $1500 \times g$ at RT. Fresh serum was used to produce an RPMI based culture medium containing 10% AS and 1% Penicillin/Streptomycin (Saeed et al., 2014). Remaining serum was stored at -80°C until use. Monocytes were selected via adherence to plastic surfaces for 24 h,

cultured in standard conditions (37 °C, 5% CO₂) in 24-well plates (4.5 × 10⁵/500 μl per well) in RPMI medium enriched with 1% Penicillin/Streptomycin (10000 U/10 mg per ml; Biochrom, Germany), and with either 10% FCS (Sigma-Aldrich®, Darmstadt, Germany, Product F7524, lot BCBT0730) or 10% AS. Cells plated in RPMI medium enriched with FCS (12 wells) or AS (12 wells) condition were kept in the same condition throughout the experiment. Both FCS and AS conditions received 10 ng/ml human M-CSF (Miltenyi Biotec) stimulation upon plating. After further 72 h plating, macrophages were polarized to M1 with LPS (50 ng/ml) (Sigma, USA, Product Number L6529), to M2 with IL-10, IL-4, TGF-β (each 20 ng/ml) (Peprotech, USA, Lot 110621, 091514, and 0506S354 respectively) according to previously published macrophage polarization protocols (Saeed et al., 2014; Mia et al., 2014) or left unstimulated (M0). Cells and supernatant (two wells per condition) were harvested 24 h after polarization and stored at -80 °C until use. Cell culture performance and polarization characteristics were assessed by quantifying established specific M1 (*CCR7*, *CD86*, *CXCL10*, IL-12p70, TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-12p40, IL-23, IP-10) and M2 (*CD206*, IL-10, TARC, IL-1RA) markers (Martinez and Gordon, 2014; Murray et al., 2014).

2.4. RNA isolation, cDNA synthesis and Real-Time PCR

RNA was isolated from 24 h-polarized macrophages using RNeasy Mini extraction kit (Qiagen) as per the manufacturer's instructions and stored at -80 °C until use. Total RNA was reverse-transcribed into cDNA using Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit™ (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) and stored at -20 °C until further measurement. To quantify the expression levels, qPCR was performed with LightCycler™ 480 SYBR Green I Master (Roche, Mannheim, Germany) using 75 ng template cDNA and 500 nM standard primer concentrations, following the manufacturer's instructions in an Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System (CA, USA). Melting curve analysis was performed to identify specific products with 1.2 °C increment from 65 to 95 °C. Relative quantification (ΔCt) and melting curve analysis were both carried out using the StepOne™ Real-Time PCR System software. All primers were designed and checked for their quality using the Primer-BLAST software (Ye et al., 2012). Sequences of primers are shown in supplemental Table 1. *B2M* was used for data normalization (ΔCt) (Radonić et al., 2004). The ΔCt values for each individual's stimulation were then normalized to the same participant's control condition (unstimulated) resulting in the individual ΔΔCt. The expression fold change was calculated as 2^{-ΔΔCt} and further used for analysis.

2.5. Cytokine analysis

Macrophages were polarized for 2 h (as previously indicated) or left unstimulated (M0), followed by a change of supplemented RPMI media (to wash out the polarization-inducers), and a further incubation period of 24 h. Supernatant was collected 24 h after stimulation and stored at -80 °C until use. Levels of IL-12p70, TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-12p40, IL-23, IP-10, IL-10, IL-6, TARC, and IL-1RA in supernatant and serum were measured in duplicates using LEGENDplex Human M1/M2 Macrophage Panel (10-plex) (BioLegend, San Diego, USA) as per the manufacturer's instructions. Data was acquired using the BD FACS Canto™ II (Biosciences) and analysis performed using LEGENDplex Data Analysis Software v8.0 (BioLegend, San Diego, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. Average intra-assay CV was 10.1% and average inter-assay CV for the total of 5 plates used was 6.4%. Cytokine detection limit range for our data is found in supplemental Table 2.

2.6. Data analysis

Sample size was determined using G*Power software version 3.1 (G*Power Version 3.1.9.2, Germany). A power calculation was performed on the mRNA expression data of polarized macrophages from a pilot study using α of 0.05 and power of 0.8, resulting in at least 26

participants per group. Numerical analyses were performed using GraphPad statistical software version 8.0.2.263 (GraphPad Software, La Jolla, USA). As the data were not normally distributed, Mann-Whitney U tests were performed for between group differences and Friedman's ANOVA tests with Dunn's post hoc multiple comparison tests or Wilcoxon test were performed to analyze the within group stimulation effects. The significance level was set at p < 0.05. Cytokine levels below the detectable limit of the assay were included as half of the lower limit of detection (Park et al., 2017; Kiraly et al., 2017). In the AS condition, 10% of the measured serum cytokine level was subtracted from the final cytokine levels prior analysis. Three of the measured cytokines (IL-12p70, IL-12p40 and IL-23) had >50% of the values in the stimulated condition and in serum below the detection limit. In the control condition (M0) 10 participants from the MDD group and 7 from the HC showed no expression of *CXCL10*, 3 participants in the MDD and 2 HC group lacked expression of *CD86* and also 3 HC showed no expression of *CD206*, thus being excluded from the comparison of the fold change expression (2^{-ΔΔCt}) between MDD and HC.

To assess the difference in macrophage polarization capacity between the MDD and HC groups, we used composite scores as follows. Similar to previous published studies (Lim et al., 2016; Schindler et al., 2017; Song et al., 2013), a composite Z-score for each participant was calculated by summing the Z-scores of pro- or anti-inflammatory markers resulted from the LPS or IL-4/IL-10/TGF-β stimulation into an M1- or M2-individual Z-score respectively: $Z_i = \sum_{k=1}^i Z_k$, where i = subject and k = marker (Song et al., 2013). In each individual Z_i -score for M1-polarization, the Z-scores of all the M1-specific markers (*CXCL10*, *CD86*, *CCR7*, IL-12p70, TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-12p40, IL-23, IP-10; $k = 10$) were summed. For M2-polarization, the M2 specific markers (IL-10, TARC, IL-1RA, *CD206*; $k = 4$) were included. Cumulative Z-scores showing M1- or M2-polarization at a group level were created by summing the individual Z-scores of all the participants in each respective group into one score $C_{stimulation/group} = \sum_{i=1}^{28} Z_i$, Where i = subject (Song et al., 2013). Furthermore, for each marker, a ratio was calculated between the levels produced during pro- (LPS) or anti- (IL-10, IL-4, TGF-β) inflammatory stimulation. A mean of the ratios was calculated for each participant to assess the fold increase in marker production due to the pro- related to anti-inflammatory stimulation and vice-versa. Likewise, to quantify the impact of AS on M0, a ratio was calculated between the levels of each marker produced during the AS to FCS stimulation. A mean of the ratios was calculated for each participant to assess the fold increase in marker production due to AS stimulation at an individual level.

3. Results

3.1. Patient-specific cell culture

Twenty-eight patients meeting the MDD criteria and 28 pairwise matched HC were included in the study. The clinical and socio-demographic characteristics of the participants are shown in Table 1. Except for IL-12p40 ($U = 271$, $p = 0.043$) there was no difference in serum cytokine levels between the two groups (Supplemental Table 3, serum cytokine levels MDD vs. HC). However, since >50% of the IL-12p40 samples were below the detection sensitivity for this cytokine, these results are to be interpreted with caution. The participant-derived Mo-MΦ cultures exhibited characteristic macrophage morphology (Supplemental Fig. 1). LPS and IL-10/IL-4/TGF-β stimulation induced the expression of M1- and M2-specific mRNA receptors respectively (*CXCL10*, *CD86*, *CCR7* for the pro-inflammatory M1- and *CD206* for homeostatic M2-phenotype), as well the secretion of specific cytokines (IL-12p70, TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-12p40, IL-23, IP-10 for M1 and IL-10, TARC, IL-1RA for M2). Friedman's ANOVA tests revealed a significant main effect of M1- and M2-stimulation in all the measured markers, both in the MDD and HC group ($p < 0.02$), except for *CD86* in the MDD group

Table 1
Demographic characteristic of study participants ^a

	MDD (n = 28)	HC (n = 28)	p-Value
Age, years	48.5 (12)	46.7 (11.1)	0.91
Female, No. (%)	19 (67.8)	19 (67.8)	0.99
BMI	26 (4)	24.1 (4)	0.6
Current smokers, No. (%)	10 (35.7)	9 (32.1)	0.99
Education, years	14.2 (1.7)	14.5 (2.1)	0.54
Non-Caucasian, No. (%)	5 (17.8)	3 (10.7)	1
MDD history			
Psychiatric comorbidity, No. (%)	3		
HAM-D-17	25.5 (5.1)		
MADRS	28 (5)		
BDI-II	34.8 (9.1)		
Length of current Episode, months	10.1 (6.8)		
Lifetime MDE	4.2 (2.5)		
Current (<2 Sessions) ECT treatment, No. (%)	3 (10.7)		
≥2 failed treatments in current episode (%)	18 (64.2)		
Current SSRI or SNRI intake, No. (%)	16 (57.1)		
SSRI /SNRIs (No.)	Venlafaxine (9), Escitalopram (1), Duloxetine (2), Fluoxetine (1), Sertraline (1), Milnacipran (2)		
Other antidepressants (No.)	Mirtazapine (3), Bupropion (3), Agomelatine (1), Trimipramine (3)		
Other add-on drugs (No.)	Pregabalin (3), Aripiprazole (4), Quetiapine (2), Lamotrigine (2), Lorazepam (3)		

^a Values are expressed as mean (SD) except when indicated; BMI: body mass index; ECT: electroconvulsive therapy; MDD: major depressive disorder; MDE: major depressive episode, SSRI: selective serotonin reuptake inhibitor; SNRI: serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor; HAM-D: 17-item Hamilton Depression Rating Scale; BDI: Beck Depression Inventory; NA, not applicable. Categorical variables were compared with χ^2 analysis and continuous variables with *t*-test.

(*p* = 0.69) (Table 2).

3.2. M1-polarization and effects of autologous serum stimulation

M1 polarization was increased in MDD patients compared to controls, particularly in the presence of FCS. Patient-derived cells showed significantly higher *CXCL10* (*U* = 95, *p* = 0.008), *CD86* (*U* = 197, *P* = 0.02) and *IP-10* (*U* = 248, *p* = 0.01) when polarized to M1 in the FCS culture (Fig. 1A–G). Table 3 shows the levels of all the measured markers in the polarized M1 condition in MDD- vs. HC-derived cells when compared with Mann-Whitney *U* tests. The cumulative Z-score (sum of all the participants Z-scores measured using all the pro-inflammatory markers) showed higher M1 polarization in MDD compared to HC in both FCS and AS conditions: $C_{HC/FCS} = -1.437571$; $C_{MDD/FCS} = 2.357482$; $C_{HC/AS} = 0.274021$; $C_{MDD/AS} = 2.881125$. However, no significant difference was noted between the individual Z-scores of MDD vs. HC (Fig. 1I). Supplemental Table 4 indicates the statistics of the individual Z-scores. MDD group showed significantly increased pro-inflammatory marker production compared to HC only in the FCS condition (*U* = 244, *p* = 0.015), as reflected by the individualized M1/M2 ratios (Fig. 1H).

In the presence of AS, *CCR7* (*U* = 212, *P* = 0.01) and *IP-10* (*U* = 269, *p* = 0.04) were increased in the MDD group (Fig. 1A, G). Intriguingly, while *IL-1 β* secretion in the M1-FCS condition was similar between

Table 2
Stimulation effects as measured with Friedman’s ANOVA tests.

Gene/protein ^a	MDD		HC	
	Friedman statistic (df)	p-value	Friedman statistic (df)	p-value
<i>CCR7</i>	24 (3)	<0.0001	17 (3)	0.0005
<i>CD86</i>	1.89 (3)	0.59	14 (3)	0.003
<i>CXCL10</i>	9.2 (3)	0.02	9.7 (3)	0.02
<i>IL-12p70</i>	55 (5)	<0.0001	63 (5)	<0.0001
<i>TNFα</i>	111.5 (5)	<0.0001	114.6 (5)	<0.0001
<i>IL-6</i>	97.5 (5)	<0.0001	100.8 (5)	<0.0001
<i>IL-1β</i>	99 (5)	<0.0001	104.7 (5)	<0.0001
<i>IL-12p40</i>	51.9 (5)	<0.0001	66.4 (5)	<0.0001
<i>IL-23</i>	27 (5)	0.0002	29.5 (5)	<0.0001
<i>IP-10</i>	57 (5)	<0.0001	60.7 (5)	<0.0001
<i>CD206</i>	68 (3)	<0.0001	61 (3)	<0.0001
<i>IL-10</i>	98 (5)	<0.0001	92 (5)	<0.0001
<i>TARC</i>	94.2 (5)	<0.0001	74.9 (5)	<0.0001
<i>IL-1RA</i>	62.7 (5)	<0.0001	50.8 (5)	<0.0001

^aqPCR products in italic, Friedman’s ANOVA calculated with all 2^{- $\Delta\Delta C_t$} values (M1, M2 in FCS and AS condition). ^bProtein, Friedman’s ANOVA calculated from all measured cytokines (M1, M2, M0 in FCS and AS condition) *CCR7* – chemokine receptor type 7; *CD86* – Cluster of Differentiation 86; *CXCL10* – C-X-C motif chemokine 10; *IL-12p70* – Interleukin-12, p70; *TNF α* – tumour necrosis factor α ; *IL-6* – Interleukin 6; *IL-12p40* – Interleukin-12 subunit p40 (beta); *IL-1 β* – Interleukin-1 β ; *IL-23* – Interleukin 23; *IP-10* – Interferon (IFN)- γ inducible protein; *CD206* – Cluster of Differentiation 206 (mannose receptor); *IL-10* – Interleukin 10; *TARC* (CCL17) – thymus and activation regulated chemokine (Chemokine ligand 17); *IL-1RA* – interleukin-1 receptor antagonist.

groups, when cultivated in AS, the patient-derived cells produced significantly less *IL-1 β* (*U* = 252, *p* = 0.02) (Fig. 1E; Table 2). Incubation with AS showed a significant fold increase in pro-inflammatory marker synthesis as reflected by the individualized M1/M2 ratios in both groups (Fig. 1H). However, this AS-induced increase was higher in HC (*W* = -378, *p* < 0.0001) than in MDD (*W* = -198, *p* = 0.02). This effect is also mirrored by the cumulative Z-scores. The presence of AS determined higher, albeit non-significant, pro-inflammatory cytokine production in M0 macrophages derived from MDD compared to HC (*U* = 380, *p* = 0.8) (Fig. 1J). Supplemental Table 5 shows the statistics of gene expression and cytokine secretion of M0 macrophages in MDD vs. HC in FCS and AS.

3.3. M2-polarization and effects of autologous serum stimulation

IL-1RA (*U* = 246, *p* = 0.01), *TARC* (*U* = 268, *p* = 0.04), and *CD206* (*U* = 198, *p* = 0.006) were significantly increased in MDD after M2-polarization only when cultured in AS. *IL-10* secretion was significantly higher in MDD group compared to HC in both conditions (*U* = 196, *p* = 0.001 in FCS culture, *U* = 234, *p* = 0.009 in AS culture) (Fig. 2A–D). Table 3 shows the levels of all the measured markers in the polarized M2 condition in MDD vs. HC compared using Mann-Whitney *U* tests. Cumulative Z-scores show higher M2 polarization phenotype in MDD, particularly when cultured in AS: $C_{HC/FCS} = -0.3602174$; $C_{MDD/FCS} = 0.3602201$; $C_{HC/AS} = -1.605736$; $C_{MDD/AS} = 1.415689$. However, there was no significant difference between the individual Z-scores (Fig. 2F, supplemental Table 4). In addition, the individual M2/M1 ratio of anti-inflammatory markers was significantly higher in patient-derived cells in AS condition alone (*U* = 227, *p* = 0.007). Furthermore, the M2/M1 ratio revealed a significant increase in anti-inflammatory marker production in MDD when cells were cultured in AS compared to FCS (*W* = -218, *p* = 0.013) (Fig. 2E). Similarly, in the unstimulated M0 condition, the presence of AS elicited increased expression of anti-inflammatory markers in the MDD group compared to HC group (*U* = 309, *p* = 0.176) (Fig. 2G).

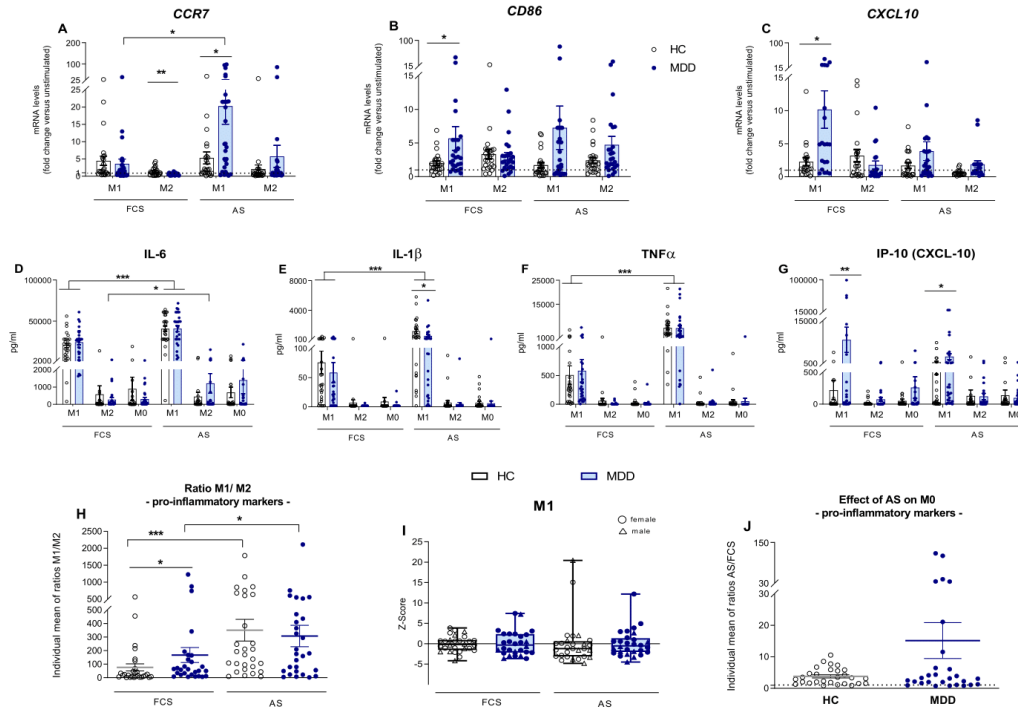


Fig. 1. MDD patients show higher M1 polarization compared to controls. *CCR7* (A), *CD86* (B), *CXCL10* (C) mRNA expression of Mo-M Φ s polarized for 24 h to M1 (LPS) or M2 (IL-4/IL-10/TGF- β) in fetal calf serum (FCS) or autologous sera (AS) culture quantified by qPCR. Dots represent individual participant values. The fold change values are represented as $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (normalization to B2M and M0, dotted line represents individual M0 values as 1). (D-G) Cytokine levels in Mo-M Φ s cultures 24 h after M1 and M2 or M0 (unstimulated) polarization in FCS or AS enriched media. Dots represent individual participant values. (H) Fold increase in pro-inflammatory marker production due to M1-compared to M2-polarization; depicted as the individual mean of M1/M2 ratios of all the pro-inflammatory markers, dots represent each participant mean of ratios. (I) Individual Z-scores after M1 (LPS stimulation), symbols depicting individual participant values, min to max; dots represent women, triangles represent men. (J) Effect of AS on the pro-inflammatory marker production in unstimulated M0 macrophages. Dots depict each participant's individual mean of ratios AS/FCS in M0, calculated using all the measured pro-inflammatory markers. All error bars, except I, depict mean + SEM. Open bars and symbols represent healthy controls (HC), blue bars and symbols MDD. Mann-Whitney U tests were used to compare MDD vs. HC groups. Friedman's ANOVA tests were used to compare in group differences with Dunn's post hoc multiple comparison tests (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.4. Effect of SSRI and SNRI medication on Mo-M Φ s polarization

To assess whether SSRIs or SNRIs elicit an anti-inflammatory effect in our sample, we compared patients taking SSRIs or SNRIs ($n = 16$) with those currently taking other classes of antidepressants or undergoing electroconvulsive therapy ($n = 12$). There was no difference between male and female MDD patients with regards to SSRI/SNRI treatment ($\chi^2(1, N = 16) = 0.66, p = 0.41$). The treatment characteristics of the participants are shown in Table 1. Mo-M Φ s derived from patients currently on SSRI/SNRI treatment produced lower IL-6 ($U = 57, p = 0.04$) and TARC ($U = 64, p = 0.04$) after M1 respectively M2 polarization (Fig. 3A, B). We found no difference in the synthesis or secretion of any of the other markers investigated (supplemental Table 6). When looking at the individual Z-scores, the SSRI/SNRI group was associated with lower M1-markers (Fig. 3C) for cells cultivated in AS compared to FCS. However, lower levels of M2-markers were found for the SSRI/SNRI group regardless of culture condition (Fig. 3D).

3.5. Main effect of gender on Mo-M Φ s polarization

All the included participants were classified as women or men in

accordance to their self-identified biological female or male sex. When checking for confounding effects of gender we found two markers that were differently expressed in the stimulated conditions. There was significantly higher expression of TARC in depressed male-derived cells (Mdn = 875.3) compared to female-derived cells (Mdn = 281) when the Mo-M Φ s were stimulated to M2 and cultured in AS ($U = 35, p = 0.013$; Fig. 4C). In the M1-FCS stimulation, we found a higher IL-12p40 secretion in depressed female- compared to male-derived cells ($U = 135, p = 0.03$). As >50% of the IL-12p40 samples were below the detection sensitivity for this cytokine, these results are to be interpreted with caution. In the MDD group, the individual Z-scores showed higher pro-inflammatory M1-activation in female- but not in male-derived cells, particularly in AS condition ($U = 47, p = 0.06$). The anti-inflammatory stimulation resulted in the opposite effect, with significantly reduced M2-marker synthesis in depressed female – but not depressed male-derived cells ($U = 42, p = 0.03$). Fig. 4A shows the individual Z-scores found in the MDD sample and supplemental Table 4 indicates the statistics of the Z-scores. In HC group, no gender-related pattern of polarization was observed (Fig. 4B, supplemental Table 4). Moreover, we detected a correlation with the subjective assessment of severity of the depression scale (BDI-II) and an increase in the M1-

Table 3
Overview of gene expression and cytokine secretion of monocyte derived M1 and M2 macrophages.

Gene/ Protein*	M1 (LPS stimulation)				AS			
	FCS		Man-Whitney U	p- value	AS		Man-Whitney U	p- value
	MDDMedian (25–75%)	HCMedian (25–75%)			MDDMedian (25–75%)	HCMedian (25–75%)		
<i>CCR7</i>	1.42 (0.4–3.2)	1.47 (0.6–5.4)	287	0.26	8.87 (1.6–21.6)	1.89 (0.9–5.5)	212	0.01
<i>CD86</i>	2.8 (1.4–5.4)	1.5 (1.0–2.5)	197	0.02	1.65 (0.5–7.2)	0.96 (0.5–2.0)	230	0.11
<i>CXCL10</i>	4.9 (1.9–13.7)	1.2 (0.6–2.8)	–	0.008	1.6 (0.6–3.8)	0.38 (0.2–3.1)	173	0.11
<i>IL-12p70</i>	1.5 (1.5–1.5)	1.5 (1.5–1.5)	379	0.67	1.5 (1.5–4.78)	1.5 (1.5–6.94)	341	0.36
<i>TNFα</i>	248.4 (83.1–590.0)	247.5 (46.5–448.9)	369	0.71	2475 (1112–6361)	3493 (2432–7136)	319	0.23
<i>IL-6</i>	26,360 (9823–34980)	19,810 (7546–27910)	327	0.29	46,540 (27910–59140)	41,650 (27910–57470)	383	0.89
<i>IL-1β</i>	20.9 (1.7–73.7)	37.2 (10.1–110.4)	321	0.24	132.2 (18.6–602)	463.3 (61.5–1729)	252	0.02
<i>IL-12p40</i>	1.79 (1.7–12.4)	1.79 (1.7–12.9)	388	0.94	2.29 (1.7–68.4)	14.1 (2.3–48.9)	331	0.30
<i>IL-23</i>	2.9 (2.9–2.9)	2.9 (2.9–2.9)	–	–	2.9 (2.9–17.6)	2.9 (2.9–7.5)	389	0.96
<i>IP-10</i>	19.5 (1.3–313.9)	1.3 (1.3–18.9)	248	0.01	267.9 (60.8–2765)	46.33 (7.9–777.1)	269	0.04

	M2 (IL-4, IL-10, TGF- β stimulation)				AS			
	FCS		Man-Whitney U	p- value	AS		Man-Whitney U	p- value
	MDDMedian (25–75%)	HCMedian (25–75%)			MDDMedian (25–75%)	HCMedian (25–75%)		
<i>CD206</i>	4.58 (2.4–6.9)	2.93 (2.1–5.2)	262	0.11	6.24 (3.3–8.7)	2.72 (1.1–5.0)	198	0.006
<i>IL-10</i>	605 (145–1506)	162 (89–280)	196	0.001	377 (86–1199)	69 (25–161)	234	0.009
<i>TARC</i>	244 (101–444)	200 (112–631)	390	0.98	401 (251–746)	288 (175–444)	268	0.04
<i>IL-1RA</i>	2.35 (2.35–39.1)	2.35 (2.35–8.1)	317	0.15	62 (26–109)	24 (13–44)	246	0.01

CCR7 - chemokine receptor type 7; *CD86* - Cluster of Differentiation 86; *CXCL10* - C-X-C motif chemokine 10; *IL-12p70* - Interleukin-12, p70; *TNF α* - tumor necrosis factor α ; *IL-6* - Interleukin 6; *IL-12p40* - Interleukin-12 subunit p40 (beta); *IL-1 β* - Interleukin-1 β ; *IL-23* - Interleukin 23; *IP-10* - Interferon (IFN)- γ inducible protein; *CD206* - Cluster of Differentiation 206 (mannose receptor); *IL-10* - Interleukin 10; *TARC* (CCL17) - thymus and activation regulated chemokine (Chemokine ligand 17); *IL-1RA* - interleukin-1 receptor antagonist. FCS - fetal calf serum, AS - autologous sera. *qPCR products in *italic*.

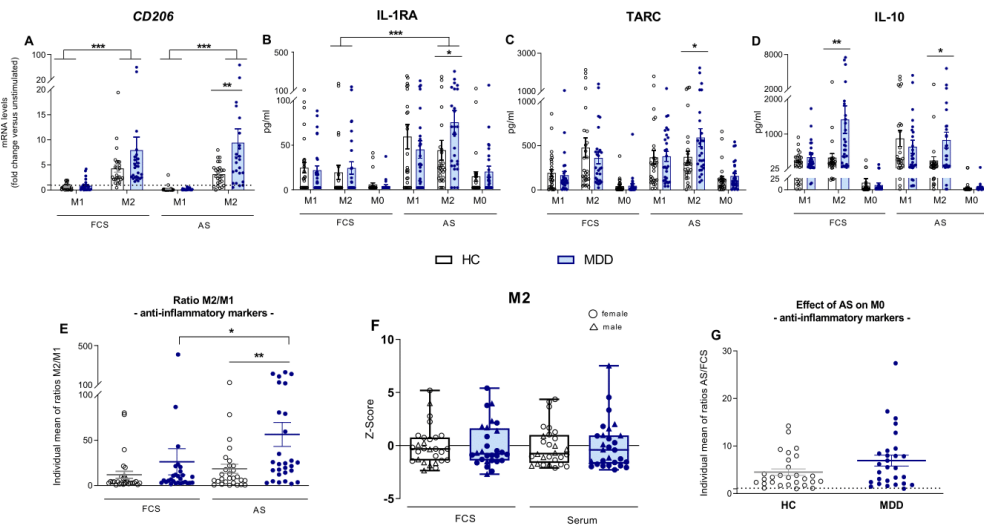


Fig. 2. MDD patients show higher M2 polarization in the presence of autologous sera (AS). (A) *CD206* mRNA expression of Mo-MΦs polarized for 24 h to M1 (LPS) or M2 (IL-4/IL-10/TGF- β) in fetal calf serum (FCS) or autologous sera (AS) quantified by qPCR. Dots represent individual participant values. The fold change values are represented as $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (normalization to B2M and M0, dotted line represents individual M0 values as 1). (B–D) Cytokine levels in Mo-MΦs cultures 24 h after M1 and M2 or M0 (unstimulated) polarization in FCS or AS enriched media. Dots represent individual participant values. (E) Fold increase in anti-inflammatory marker production due to M2- compared to M1-polarization; depicted as the individual mean of M2/M1 ratios of all the anti-inflammatory markers, dots represent each participant mean of ratios. (F) Individual Z-scores after M2 (IL-4/IL-10/TGF- β) stimulation), symbols depicting individual participant values, min to max; dots represent women, triangles represent men. (G) Effect of AS on the anti-inflammatory marker production in unstimulated M0 macrophages; dots depict each participant's individual mean of ratios AS/FCS in M0, calculated using all the measured anti-inflammatory markers. All error bars, except F, depict mean + SEM. Open bars and symbols represent healthy controls (HC), blue bars and symbols MDD. Mann–Whitney U tests were used to compare MDD vs. HC groups. Friedman's ANOVA tests were used to compare in group differences with Dunn's post hoc multiple comparison tests (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

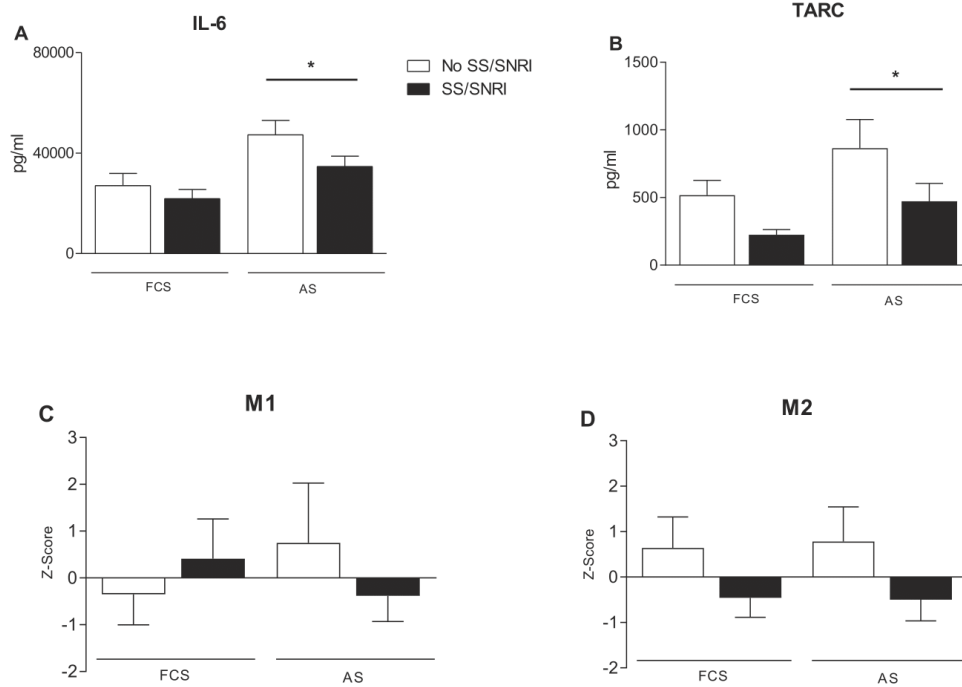


Fig. 3. Effect of SSRI/SNRI intake on macrophage polarization. (A) IL-6 secretion of Mo-MΦs from patients on SSRI/SNRI (n = 16) or other treatment (n = 12) after M1 polarization (LPS) (B) TARC secretion Mo-MΦs from patients on SSRI/SNRI (n = 16) or other treatment (n = 12) after M2 polarization (IL-4/IL-10/TGF-β) (C) Z-scores after M1 polarization. (D) Z-scores after M2 (IL-4/IL-10/TGF-β-stimulation). All error bars depict mean + SEM. Closed bars depict SSRI/SNRI treatment, open bars depict other treatment. Mann-Whitney U tests were used to compare the groups (*p < 0.05).

polarization in AS condition only in the female participants (Fig. 4D).

4. Discussion

This study constitutes the first investigation into the impact of autologous sera on the polarization capacity of patient-specific monocyte-derived macrophages in patients suffering from moderate to severe depression compared to healthy controls. While previous studies delineate an association between altered functions of (innate) immunity and depressed state (Enache et al., 2019; Liu et al., 2019; Haroon et al., 2018; Yrondi et al., 2018; Syed et al., 2018; Köhler et al., 2018; Setiawan et al., 2015), they largely fail to disentangle “state” from “trait” effects at a patient-level. Elucidating the contributing factors to immune alterations in MDD may, however, help to identify a causal chain of events that might eventually exacerbate the course of the disease or provide as a suitable target for interventions. While immune alterations are seen in some, but certainly not all MDD patients, it remains extremely important to characterize such alterations most precisely, ideally at a patient-specific level in a personalized “theragnostics” approach. Our strategy was to first generate a patient-specific cell culture free of any potentially confounding circulating factors (mainly small molecules such as hormones, medication, metabolites, nutritional factors and other homeostatic events) –“trait”- and to simultaneously address the effect of autologous sera on the patient-specific culture –“state”. To our knowledge, this is the first study to investigate the Mo-MΦs polarization capacity to M1- or M2-macrophages in moderate to severe MDD compared to pairwise matched HC. We demonstrated that all participant-derived macrophages cultures displayed excellent, quantifiable polarization

capacity in both directions (M1 and M2).

In accordance with the current literature that points to a higher pro-inflammatory state in MDD (Enache et al., 2019; Köhler et al., 2017, 2018; Liu et al., 2019; Setiawan et al., 2015), we found a higher M1-polarization phenotype in our patients particularly when polarization occurred under standard culture conditions. The presence of AS in the culture media did not enhance, but on the contrary, attenuated the difference between MDD and HC regarding the M1 polarization. The mirrored pattern of *CXCL10* synthesis and secretion of its transcriptional product IP-10 acts here as an internal positive control for higher M1 polarization capacity in MDD group. This is in line with several studies, which looked at serum effect on monocyte cytokine secretion in MDD (Nowak et al., 2019; Syed et al., 2018; Zhang et al., 2018). Syed et al. showed that the plasma of MDD patients was immunosuppressive on healthy donor PBMCs while reducing the activation of monocytes and B-cells as well as T-cell memory (Syed et al., 2018). Moreover, Zhang et al. showed that increased *in vivo* plasma levels of IL-6 and IL-1β in MDD patients were not present after *in vitro* LPS stimulation of patient monocytes (Zhang et al., 2018).

To our surprise, higher M2-polarization was detected in MDD in the presence of the co-stimulatory effect of the AS. A recent investigation of macrophage polarization in the context of MDD showed that ketamine determines an M2 phenotype of polarization (Nowak et al., 2019). However, in this study, the donor source of the mentioned monocytes was not clearly specified and a comparison to healthy controls was not investigated. We detected a considerable co-stimulatory effect of AS in the MDD group after M2 stimulation, while after M1 stimulation both patients and controls showed increased M1 polarization. This was

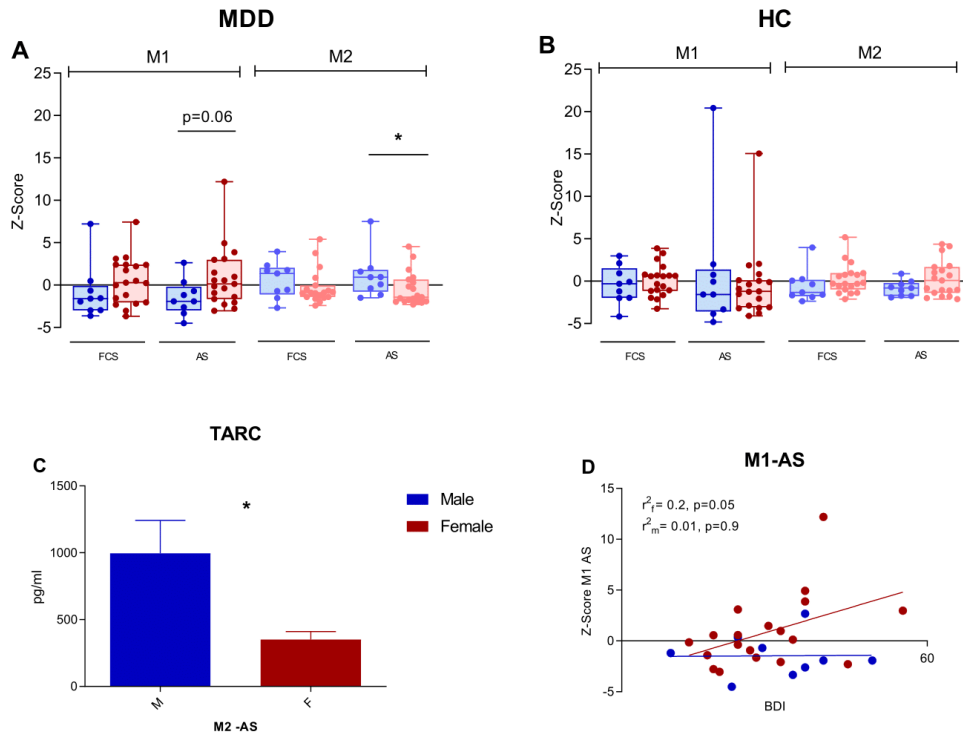


Fig. 4. Sex has a modulator effect on Mo-MΦs polarization in MDD. (A, B) Individual Z-scores in MDD and HC after M1- and M2-polarization in FCS and AS, dots show individual participant values. Z-scores of MDD patients show higher M1-polarization and lower M2-polarization in females compared to males in AS condition (A) while an undefined pattern is seen in HC (B). (C) TARC levels measured after M2 polarization (IL-4/IL-10/TGF- β) in AS. (D) Significant correlation between individual AS-M1-polarization Z-scores of female MDD and depression severity as measured by BDI-II. Red bars and symbols represent female, blue bars and symbols represent male. Mann–Whitney U tests were used to compare the groups (* $p < 0.05$). Linear regression was used for D. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

paralleled by higher anti-inflammatory marker production of M0 macrophages in MDD when cultured in AS. Thus, the question arises whether patient monocytes display higher plasticity in response to environmental or homeostatic factors (AS) when polarized to macrophages. To this regard, Hasselmann *et al.*, found higher levels of immature circulating monocytes in MDD compared to controls (Hasselmann *et al.*, 2018). Other studies describe a “transcriptional fingerprint” characterized by higher pro-inflammatory monocytes in the periphery, activated NF- κ b transcriptional control pathway and GC resistance in response to chronic psychological stress (Powell *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2014, 2002; Haroon *et al.*, 2012). Our work furthers these studies by showing that patients display higher monocyte to M1-polarization phenotype compared to HC in the absence of AS, but higher M2-polarization in the presence of AS. On the same line of evidence, in our sample, IL-1 β was significantly lower in MDD compared to HC after M1 polarization in the presence of AS. In the context of the previously suggested GC-resistance of circulating monocytes in MDD (Haroon *et al.*, 2018; Miller *et al.*, 2014, 2002), our results would suggest that if the monocytes are simulated adequately, they possess the ability to polarize into the “wound-healing” M2 phenotype. The chosen IL-10/IL-4/TGF- β stimulation was shown in previous research to induce a robust, clear, M2-phenotype; it does not however, recapitulate the entire M2 plasticity repertoire (Martinez and Gordon, 2014; Murray *et al.*, 2014). Further research should investigate all the M2 phenotype subgroups, especially after GC

co-stimulation.

Since females are twice more likely as males to develop depression, the question of how inflammation contributes to a higher prevalence of depression in females arises. While most prior research looking at cytokine levels in MDD patients did not differentiate between sexes, some studies report higher IL-6, TNF- α , IL-8 or CRP in females and higher IL-12 in males (Rainville and Hodes, 2019; Pallavi *et al.*, 2015; Birur *et al.*, 2017). Increased white blood cell count was found in MDD patients regardless of gender but monocytes levels were found higher in males only (Maes *et al.*, 1994). This delivers an unclear picture about the differences in inflammatory activation and the contribution of sexual hormones. Our results, showing higher M1 polarization in females compared to males MDD are in line with the few published studies showing higher cytokine levels in females (Rainville and Hodes, 2019; Rainville *et al.*, 2018; Gilman *et al.*, 2016). Sexual hormones influence bone marrow-derived cell proliferation and maturation in divergent ways. Androgens promote M2 polarization (Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018; Keselman *et al.*, 2017; Rainville *et al.*, 2018), high levels of estrogens determine a Th2 anti-inflammatory proliferation and low levels of estrogens a Th1 pro-inflammatory profile (Pelekanou *et al.*, 2016; Luster *et al.*, 1984; Pfeifer and Patterson, 1985). In this context, the differential macrophage polarization effect of both sexes seen in our depressed sample did not come as a surprise. The presence of AS further accentuated these differences, implying a co-stimulatory effect of the

existing serum hormones. One limitation of our secondary analyses of gender differences is certainly that our study was not *a priori* powered to particularly address this research question. However, the gender distribution in our MDD sample (19 female and 9 male) matches the gender distribution of MDD in the general population, which is estimated to be the roughly 2:1 (Rainville and Hodes, 2019; Birur et al., 2017). Since the current NIH and European Medicines Agency criteria of participant recruitment were thus met, we chose to report the observed gender differences. Future studies looking at the innate immune system and its role in MDD pathology should thus focus on the sexual differences in macrophage polarization and consider these differences in their power calculation. Previous studies looking at macrophage polarization in MDD reported on male participants donors or cell-lines (Nowak et al., 2019; Ferrari et al., 2018), which could have so far given a skewed view of the process (Nowak et al., 2019; Ferrari et al., 2018). Macrophages are also differently modulated in pregnant women with MDD, showing a higher pro-inflammatory profile compared to healthy pregnant women (Edvinsson et al., 2017). This stresses the importance of personalized medicine approaches, including macrophage polarization in female MDD patients, which might lead to future therapeutic targets.

Converging lines of evidence from human, mice and *in vitro* studies attribute anti-inflammatory properties to the therapeutic effect of antidepressant drugs, especially to the SSRIs and SNRIs (Tynan et al., 2012; Koh et al., 2011; Wang et al., 2019; Nazimek et al., 2017; Walker, 2013; Himmerich et al., 2010). The anti-inflammatory effect of antidepressants was proven to ameliorate clinical symptoms in autoimmune disease, cardiovascular disease, chronic renal disease, and diabetes mellitus (Lekakis et al., 2010; Baharav et al., 2012; Habib et al., 2015). Our findings, demonstrating lower IL-6 in the presence of the sera of patients receiving SSRIs or SNRIs, fit into the above-mentioned literature. The fact that AS of patients receiving SS-SNRIs also lowered TARC (CCL17) levels, a chemotactic agent especially targeting Th2 cells, is in line with evidence showing lower IL-10 after antidepressant treatment (Köhler et al., 2018). Altogether, our results point at a higher inhibition of pro-inflammatory activation due to the presence of SS-SNRIs in AS, without directly stimulating the anti-inflammatory cytokine secretion. Confounding factors like reduced number of participants and the possible immunomodulatory effect of ECT (Mindt et al., 2019) in our study should be considered when interpreting the results. However, the patients receiving ECT ($n = 3$) were included after having received less than two sessions. The fact that the secondary analysis of medication effect does not meet the initial power requirements needs to be mentioned as a further limitation of our study. Our choice to report on these differences is also a call for future studies looking at individualized *in vitro* approach to account for medication.

A small number of participants is a limitation of our study. Nonetheless, the sample was well characterized, and a parallel recruiting of HC allowed a one-to-one match of patients and controls. Using freshly isolated monocytes and AS for all the experiments avoided the influence of heat-shock. Moreover, including moderate to severely ill patients with a high degree of treatment-resistance ($N = 18$; 64.2%) defined by the MGH-ATRQ (Chandler et al., 2010), represents a realistic clinical sample and mirrors the MDD distribution in the inpatient population. However, our sample characterized by relatively few psychiatric and somatic comorbidities only covers part of the MDD spectrum. Our choice of including only hospitalized moderate to severe MDD patients was aimed at limiting variability and focus on severity. In a recent review regarding markers of treatment non-response, the recruiting of inpatient participants was shown to reduce variability (Liu et al., 2019). Furthermore, our choice of beads-based methods of cytokine measurements was shown to yield significantly reduced variability compared to ELISA-based methods (Liu et al., 2019). In our experiments, we did not account for the effect of the sympathetic nervous system (SNS), which plays a role in Mo-M Φ s polarization in several tissues (Reader et al., 2015). Further studies could consider integrating modulators of SNS (ex. pharmacologic) when looking at macrophage function in MDD.

By introducing an AS condition, we looked to define the changes occurring due to the adaptation to the *in vitro* environment (Saeed et al., 2014) and provided a personalized approach for investigating the role of individual milieu in macrophage polarization. Our model used monocytes isolated from the periphery, we therefore assume that our Mo-M Φ are likely similar to the non-parenchymal macrophages found in the perivascular space, subdural meninges and choroid plexus. However, because macrophages are prototype cells of the innate immune system that have similar functional properties to microglia (Gossein et al., 2014; Sevenich, 2018), aspects of our results could be partially translated to induced microglia. Nevertheless, as our *in vitro* model did not assess for microglial-specific markers, any translation of our results to microglia remains hypothetical and was not the aim of our study. Our data suggest that the Mo-M Φ of MDD possess an innate tendency to M1-polarization, but that they are also plastic and, when cultivated with AS, are capable of M2-polarization at higher level than matched HC. Moreover, we found higher M1- and lower M2 macrophage polarization in female MDD. The difference between male and female patients with MDD might constitute a basis for future personalized therapy options.

In conclusion, we demonstrate striking alterations of innate immunity with pronounced gender- and medication effects in MDD patients using a novel functional, patient-specific cell culture approach. Our findings suggest pleiotropic anti-inflammatory effects for some SSRI/SNRI drugs and gender-specific alterations in macrophage polarization. Our findings highlight the importance of disentangling state from trait effects and our cell culture strategy provides a simple-to-implement precision- and personalized-medicine approach to assess immune dysregulation more precisely in psychiatric disorders. Future longitudinal studies are planned to evolve a personalized theragnostic model system to target innate inflammation more precisely in psychiatric disorders and particularly MDD.

Funding

This study was supported by the German Research Foundation (DFG, Grant no. HE 6939/3-1) and the Berlin Institute of Health Clinician Scientist Program to J. H.-R.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.02.009>.

References

- Collaborators GDaIaP, 2017. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* 390 (10100), 1211–1259.
- Leonard, B.E., 2018. Inflammation and depression: a causal or coincidental link to the pathophysiology? *Acta Neuropsychiatr.* 30 (1), 1–16.
- Wohleb, E.S., Franklin, T., Iwata, M., Duman, R.S., 2016. Integrating neuroimmune systems in the neurobiology of depression. *Nat. Rev. Neurosci.* 17 (8), 497–511.
- Enache, D., Pariante, C.M., Mondelli, V., 2019. Markers of central inflammation in major depressive disorder: A systematic review and meta-analysis of studies examining cerebrospinal fluid, positron emission tomography and post-mortem brain tissue. *Brain Behav. Immun.* 81, 24–40.
- Yirmiya, R., Rimmerman, N., Reshef, R., 2015. Depression as a microglial disease. *Trends Neurosci.* 38 (10), 637–658.
- Köhler, C.A., Freitas, T.H., Maes, M., de Andrade, N.Q., Liu, C.S., Fernandes, B.S., et al., 2017. Peripheral cytokine and chemokine alterations in depression: a meta-analysis of 82 studies. *Acta Psychiatr. Scand.* 135 (5), 373–387.

- Liu, J.J., Wei, Y.B., Strawbridge, R., Bao, Y., Chang, S., Shi, L., et al., 2019. Peripheral cytokine levels and response to antidepressant treatment in depression: a systematic review and meta-analysis. *Mol. Psychiatry*.
- Smith, R.S., 1991. The macrophage theory of depression. *Med. Hypotheses* 35 (4), 298–306.
- Hasselmann, H., Gamradt, S., Taenzer, A., Nowacki, J., Zain, R., Patas, K., et al., 2018. Pro-inflammatory monocyte phenotype and cell-specific steroid signaling alterations in unmedicated patients with major depressive disorder. *Front. Immunol.* 9, 2693.
- Alvarez-Mon, M.A., Gómez, A.M., Orozco, A., Lahera, G., Sosa, M.D., Diaz, D., et al., 2019. Abnormal distribution and function of circulating monocytes and enhanced bacterial translocation in major depressive disorder. *Front. Psychiatry* 10, 812.
- Nowak, W., Grendas, L.N., Sanmarco, L.M., Estecho, I.G., Arena, A., Eberhardt, N., et al., 2019. Pro-inflammatory monocyte profile in patients with major depressive disorder and suicide behaviour and how ketamine induces anti-inflammatory M2 macrophages by NMDAR and mTOR. *EBioMedicine* 50, 290–305.
- Prinz, M., Priller, J., 2014. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 15 (5), 300–312.
- Wohleb, E.S., McKim, D.B., Sheridan, J.F., Godbout, J.P., 2014. Monocyte trafficking to the brain with stress and inflammation: a novel axis of immune-to-brain communication that influences mood and behavior. *Front. Neurosci.* 8, 447.
- Espey, M.G., Chernyshev, O.N., Reinhard, J.F., Nambodiri, M.A., Colton, C.A., 1997. Activated human microglia produce the excitotoxin quinolinic acid. *Neuroreport* 8 (2), 431–434.
- Ormel, P.R., van Mierlo, H.C., Litjens, M., Strien, M.E.V., Hol, E.M., Kahn, R.S., et al., 2017. Characterization of macrophages from schizophrenia patients. *NPJ Schizophr.* 3 (1), 41.
- Gosselin, D., Link, V.M., Romanoski, C.E., Fonseca, G.J., Eichenfield, D.Z., Spann, N.J., et al., 2014. Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. *Cell* 159 (6), 1327–1340.
- Sevenich, L., 2018. Brain-resident microglia and blood-borne macrophages orchestrate central nervous system inflammation in neurodegenerative disorders and brain cancer. *Front. Immunol.* 9, 697.
- Saeed, S., Quintin, J., Kerstens, H.H., Rao, N.A., Aghajani-Nezhad, A., Matarese, F., et al., 2014. Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science* 345 (6204), 1251086.
- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaili, S.A., Mardani, F., et al., 2018. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell Physiol.* 233 (9), 6425–6440.
- Martinez, F.O., Gordon, S., 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 6, 13.
- Mia, S., Warnecke, A., Zhang, X.M., Malmström, V., Harris, R.A., 2014. An optimized protocol for human M2 macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF- β yields a dominant immunosuppressive phenotype. *Scand. J. Immunol.* 79 (5), 305–314.
- Murray, P.J., 2017. Macrophage polarization. *Annu. Rev. Physiol.* 79, 541–566.
- Keselman, A., Fang, X., White, P.B., Heller, N.M., 2017. Estrogen signaling contributes to sex differences in macrophage polarization during asthma. *J. Immunol.* 199 (5), 1573–1583.
- Kalkman, H.O., Feuerbach, D., 2016. Antidepressant therapies inhibit inflammation and microglial M1-polarization. *Pharmacol. Ther.* 163, 82–93.
- Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdt, S., et al., 2014. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 41 (1), 14–20.
- Tynan, R.J., Weidenhofer, J., Hinwood, M., Cairns, M.J., Day, T.A., Walker, F.R., 2012. A comparative examination of the anti-inflammatory effects of SSRI and SNRI antidepressants on LPS stimulated microglia. *Brain Behav. Immun.* 26 (3), 469–479.
- Koh, S.J., Kim, J.M., Kim, I.K., Kim, N., Jung, H.C., Song, I.S., et al., 2011. Fluoxetine inhibits NF- κ B signaling in intestinal epithelial cells and ameliorates experimental colitis and colitis-associated colon cancer in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 301 (1), G9–G19.
- Lekakis, J., Ikonomidis, I., Papoutsis, Z., Moutsatsou, P., Nikolaou, M., Parissis, J., et al., 2010. Selective serotonin re-uptake inhibitors decrease the cytokine-induced endothelial adhesion molecule expression, the endothelial adhesiveness to monocytes and the circulating levels of vascular adhesion molecules. *Int. J. Cardiol.* 139 (2), 150–158.
- Wang, L., Wang, R., Liu, L., Qiao, D., Baldwin, D.S., Hou, R., 2019. Effects of SSRIs on peripheral inflammatory markers in patients with major depressive disorder: a systematic review and meta-analysis. *Brain Behav. Immun.* 79, 24–38.
- Baharav, E., Bar, M., Taler, M., Gil-Ad, I., Karp, L., Weinberger, A., et al., 2012. Immunomodulatory effect of sertraline in a rat model of rheumatoid arthritis. *Neuroimmunomodulation* 19 (5), 309–318.
- Nazimek, K., Strobel, S., Bryniarski, P., Kozłowski, M., Filipczak-Bryniarska, I., Bryniarski, K., 2017. The role of macrophages in anti-inflammatory activity of antidepressant drugs. *Immunobiology* 222 (6), 823–830.
- Wong, B.C., Chau, C.K., Ao, F.K., Mo, C.H., Wong, S.Y., Wong, Y.H., et al., 2019. Differential associations of depression-related phenotypes with cardiometabolic risks: polygenic analyses and exploring shared genetic variants and pathways. *Depress Anxiety* 36 (4), 330–344.
- Montgomery, S.A., Åsberg, M., 1979. A new depression scale designed to be sensitive to change. *Br. J. Psychiatry* 134, 382–389.
- Hamilton, M., 1960. A rating scale for depression. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 23, 56–62.
- Beck, A.T., Steer, R.A., Ball, R., Ranieri, W., 1996. Comparison of beck depression inventories -IA and -II in psychiatric outpatients. *J. Pers. Assess.* 67 (3), 588–597.
- Regen, F., Herzog, I., Hahn, E., Ruehl, C., Le Bret, N., Dettling, M., et al., 2017. Clozapine-induced agranulocytosis: evidence for an immune-mediated mechanism from a patient-specific in-vitro approach. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 316, 10–16.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T.L., 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinf.* 13, 134.
- Radonić, A., Thulke, S., Mackay, I.M., Landt, O., Siebert, W., Nitsche, A., 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313 (4), 856–862.
- Park, M., Newman, L.E., Gold, P.W., Luckenbaugh, D.A., Yuan, P., Machado-Vieira, R., et al., 2017. Change in cytokine levels is not associated with rapid antidepressant response to ketamine in treatment-resistant depression. *J. Psychiatr. Res.* 84, 113–118.
- Kiraly, D.D., Horn, S.R., Van Dam, N.T., Costi, S., Schwartz, J., Kim-Schulze, S., et al., 2017. Altered peripheral immune profiles in treatment-resistant depression: response to ketamine and prediction of treatment outcome. *Transl. Psychiatry* 7 (3), e1065.
- Lim, Y.Y., Snyder, P.J., Pietrzak, R.H., Ukiqji, A., Villemagne, V.L., Ames, D., et al., 2016. Sensitivity of composite scores to amyloid burden in preclinical Alzheimer's disease: introducing the Z-scores of Attention, Verbal fluency, and Episodic memory for Nondemented older adults composite score. *Alzheimers Dement. (Amst)* 2, 19–26.
- Schindler, S.E., Jasieliec, M.S., Weng, H., Hassenstab, J.J., Grober, E., McCue, L.M., et al., 2017. Neuropsychological measures that detect early impairment and decline in preclinical Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging* 56, 25–32.
- Song, M.K., Lin, F.C., Ward, S.E., Fine, J.P., 2013. Composite variables: when and how. *Nurs. Res.* 62 (1), 45–49.
- Haroon, E., Daguanno, A.W., Woolwine, B.J., Goldsmith, D.R., Baer, W.M., Wommack, E. C., et al., 2018. Antidepressant treatment resistance is associated with increased inflammatory markers in patients with major depressive disorder. *Psychoneuroendocrinology* 95, 43–49.
- Yrondi, A., Aouizerate, B., El-Hage, W., Moliere, F., Thalams, C., Delcourt, N., et al., 2018. Assessment of translocator protein density, as marker of neuroinflammation, in major depressive disorder: a pilot, multicenter, comparative, controlled, brain PET Study (INFLADEP Study). *Front. Psychiatry* 9, 326.
- Syed, S.A., Beurel, E., Loewenstein, D.A., Lowell, J.A., Craighead, W.E., Dunlop, B.W., et al., 2018. Defective inflammatory pathways in never-treated depressed patients are associated with poor treatment response. *Neuron* 99 (5), 914–24.e3.
- Köhler, C.A., Freitas, T.H., Stubbs, B., Maes, M., Solmi, M., Veronese, N., et al., 2018. Peripheral alterations in cytokine and chemokine levels after antidepressant drug treatment for major depressive disorder: systematic review and meta-analysis. *Mol. Neurobiol.* 55 (5), 4195–4206.
- Setiawan, E., Wilson, A.A., Mizrahi, R., Rusjan, P.M., Miler, L., Rajkowska, G., et al., 2015. Role of translocator protein density, a marker of neuroinflammation, in the brain during major depressive episodes. *JAMA Psychiatry* 72 (3), 268–275.
- Zhang, H.X., Xu, Y.Q., Li, Y.Y., Lu, M.F., Shi, S.X., Ji, J.L., et al., 2018. Difference in proinflammatory cytokines produced by monocytes between patients with major depressive disorder and healthy controls. *J. Affect. Disord.* 234, 305–310.
- Powell, N.D., Sloan, E.K., Bailey, M.T., Arevalo, J.M., Miller, G.E., Chen, E., et al., 2013. Social stress up-regulates inflammatory gene expression in the leukocyte transcriptome via β -adrenergic induction of myelopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110 (41), 16574–16579.
- Miller, G.E., Murphy, M.L., Cashman, R., Ma, R., Ma, J., Arevalo, J.M., et al., 2014. Greater inflammatory activity and blunted glucocorticoid signaling in monocytes of chronically stressed caregivers. *Brain Behav. Immun.* 41, 191–199.
- Haroon, E., Raison, C.L., Miller, A.H., 2012. Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacology* 37 (1), 137–162.
- Miller, G.E., Cohen, S., Ritchey, A.K., 2002. Chronic psychological stress and the regulation of pro-inflammatory cytokines: a glucocorticoid-resistance model. *Health Psychol.* 21 (6), 531–541.
- Rainville, J.R., Hodes, G.E., 2019. Inflaming sex differences in mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 44 (1), 184–199.
- Pallavi, P., Sagar, R., Mehta, M., Sharma, S., Subramaniam, A., Shamshi, F., et al., 2015. Serum cytokines and anxiety in adolescent depression patients: gender effect. *Psychiatry Res.* 229 (1–2), 374–380.
- Birur, B., Amrock, E.M., Shelton, R.C., Li, L., 2017. Sex differences in the peripheral immune system in patients with depression. *Front. Psychiatry* 8, 108.
- Maes, M., Lambrechts, J., Suy, E., Vandervorst, C., Bosmans, E., 1994. Absolute number and percentage of circulating natural killer, non-MHC-restricted T cytotoxic, and phagocytic cells in unipolar depression. *Neuropsychobiology* 29 (4), 157–163.
- Rainville, J.R., Tsyglakova, M., Hodes, G.E., 2018. Deciphering sex differences in the immune system and depression. *Front. Neuroendocrinol.* 50, 67–90.
- Gilman, S.E., Cherkertzian, S., Buka, S.L., Hahn, J., Hornig, M., Goldstein, J.M., 2016. Prenatal immune programming of the sex-dependent risk for major depression. *Transl. Psychiatry* 6 (5), e822.
- Pelekanou, V., Kampa, M., Kiagiadaki, F., Deli, A., Theodoropoulos, P., Agrogiannis, G., et al., 2016. Estrogen anti-inflammatory activity on human monocytes is mediated through cross-talk between estrogen receptor ER α 36 and GPR30/GPER1. *J. Leukoc. Biol.* 99 (2), 333–347.
- Luster, M.I., Hayes, H.T., Korach, K., Tucker, A.N., Dean, J.H., Greenlee, W.F., et al., 1984. Estrogen immunosuppression is regulated through estrogenic responses in the thymus. *J. Immunol.* 133 (1), 110–116.
- Pfeifer, R.W., Patterson, R.M., 1985. Modulation of lymphokine-induced macrophage activation by estrogen metabolites. *J. Immunopharmacol.* 7 (2), 247–263.
- Ferrari, P., Parisi, M.M., Colombo, R., Becker, M., Fries, G., Ascoli, B.M., et al., 2018. Depression and mania induce pro-inflammatory activation of macrophages following application of serum from individuals with bipolar disorder. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* 16 (1), 103–108.

- Edvinsson, Å., Bränn, E., Hellgren, C., Freyhult, E., White, R., Kamali-Moghaddam, M., et al., 2017. Lower inflammatory markers in women with antenatal depression brings the M1/M2 balance into focus from a new direction. *Psychoneuroendocrinology* 80, 15–25.
- Walker, F.R., 2013. A critical review of the mechanism of action for the selective serotonin reuptake inhibitors: do these drugs possess anti-inflammatory properties and how relevant is this in the treatment of depression? *Neuropharmacology* 67, 304–317.
- Himmerich, H., Milenović, S., Fulda, S., Plümäkers, B., Sheldrick, A.J., Michel, T.M., et al., 2010. Regulatory T cells increased while IL-1 β decreased during antidepressant therapy. *J. Psychiatr. Res.* 44 (15), 1052–1057.
- Habib, M., Shaker, S., El-Gayar, N., Aboul-Fotouh, S., 2015. The effects of antidepressants “fluoxetine and imipramine” on vascular abnormalities and Toll like receptor-4 expression in diabetic and non-diabetic rats exposed to chronic stress. *PLoS One* 10 (3), e0120559.
- Mindt, S., Neumaier, M., Hoyer, C., Sartorius, A., Kranaster, L., 2019. Cytokine-mediated cellular immune activation in electroconvulsive therapy: A CSF study in patients with treatment-resistant depression. *World J. Biol. Psychiatry* 1–9.
- Chandler, G.M., Iosifescu, D.V., Pollack, M.H., Targum, S.D., Fava, M., 2010. RESEARCH: validation of the massachusetts general hospital antidepressant treatment history questionnaire (ATRQ). *CNS Neurosci. Ther.* 16 (5), 322–325.
- Reader, B.F., Jarrett, B.L., McKim, D.B., Wohleb, E.S., Godbout, J.P., Sheridan, J.F., 2015. Peripheral and central effects of repeated social defeat stress: monocyte trafficking, microglial activation, and anxiety. *Neuroscience* 289, 429–442.

9. LEBENSLAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

10.KOMPLETTE PUBLIKATIONSLISTE

Veröffentlichungen (peer-review)

M1/M2 polarization in major depressive disorder: Disentangling state from trait effects in an individualized cell-culture-based approach.

Cosma NC, Üsekes B, Otto LR, Gerike S, Heuser I, Regen F, Hellmann-Regen J. *Brain Behav Immun.* 2021 May; 94:185-195. doi: 10.1016/j.bbi.2021.02.009. Epub 2021 Feb 17. PMID: 33607231. **IF 6.633**

Clozapine modulates retinoid homeostasis in human brain and normalizes serum retinoic acid deficit in patients with schizophrenia.

Regen F, Cosma NC, Otto LR, Clemens V, Saksone L, Gellrich J, Uesekes B, Ta TMT, Hahn E, Dettling M, Heuser I, Hellmann-Regen. *J. Mol Psychiatry.* 2020 Jun 2. doi: 10.1038/s41380-020-0791-8. PMID: 32488128. **IF 12.384**

A microRNA-signature that correlates with cognition and is a target against cognitive decline.

Islam R, Kaurani L, Berulava T, Heilbronner U, Budde M, Centeno PT, Elerdashvili V, Zafieriou MP, Benito E, Sertel SM, Goldberg G, Senner F, Kalman JL, Burkhardt S, Oepen AS, Sakib MS, Kerimoglu C, Wirths O, Bickeboeller H, Bartels C, Brosseron F, Buerger K, Cosma NC, ..., Schulze TG, Peter Falkai P, Sananbenesi F, Fischer A. *EMBO Mol Med.* 2021 Nov 8;13(11):e13659. doi: 10.15252/emmm.202013659. PMID: 34633146. **IF 8.821**

Soluble TAM receptors sAXL and sTyro3 predict structural and functional protection in Alzheimer's disease.

Brosseron F, Maass A, Kleineidam L, Ravichandran KA, González PG, McManus RM, Ising C, Santarelli F, Kolbe CC, Häsler LM, Wolfsgruber S, Marquié M, Boada M, Orellana A, de Rojas I, Röske S, Peters O, Cosma NC, Cetindag A, Wang X, Priller J, Spruth EJ, Altenstein S, Schneider A, Fliessbach K, Wiltfang J, Schott BH, Bürger K, Janowitz D, Dichgans M, Perneczky R, Rauchmann BS, Teipel S, Kilimann I, Göerß D, Laske C, Munk MH, Düzel E, Yakupov R, Dobisch L, Metzger CD, Glanz W, Ewers M, Dechent P, Haynes JD, Scheffler K, Roy N, Rostamzadeh A, Teunissen CE, Marchant NL, Spottke A, Jucker M, Latz E, Wagner M, Mengel D, Synofzik M, Jessen F, Ramirez A, Ruiz A, Heneka MT; DELCODE study group. *Neuron.* 2022 Mar 16;110(6):1009-1022.e4. doi: 10.1016/j.neuron.2021.12.016. Epub 2022 Jan 6. PMID: 34995486. **IF: 17.173**

Association of Cholinergic Basal Forebrain Volume and Functional Connectivity with Markers of Inflammatory Response in the Alzheimer's Disease Spectrum.

Teipel SJ, Dyrba M, Ballarini T, Brosseron F, Bruno D, Buerger K, Cosma NC, Dechent P, Dobisch L, Düzel E, Ewers M, Fliessbach K, Haynes JD, Janowitz D, Kilimann I, Laske C, Maier F, Metzger CD, Munk MH, Peters O, Pomara N, Preis L, Priller J, Ramírez A, Roy N, Scheffler K, Schneider A, Schott BH, Spottke A, Spruth EJ, Wagner M, Wiltfang J, Jessen F, Heneka MT. *J Alzheimers Dis.* 2022;85(3):1267-1282. doi: 10.3233/JAD-215196. PMID: 34924387. **IF: 4.472**

Neuropsychiatric symptoms in at-risk groups for AD dementia and their association with worry and AD biomarkers-results from the DELCODE study.

Sannemann L, Schild AK, Altenstein S, Bartels C, Brosseron F, Buerger K, Cosma NC, ..., Fliessbach K, Jessen F; DELCODE Study Group. *Alzheimers Res Ther.* 2020 Oct 16;12(1):131. doi: 10.1186/s13195-020-00701-7. PMID: 33066827. **IF 6.116**

Anxiety during ketamine infusions is associated with negative treatment responses in major depressive disorder.

Aust S, Gärtner M, Basso L, Otte C, Wingenfeld K, Chae WR, Heuser-Collier I, Regen F, Cosma NC, van Hall F, Grimm S, Bajbouj M. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2019 Apr;29(4):529-538. Epub 2019 Feb 13. PMID: 30772118. **IF 4.600**

Anti LRP4 autoantibodies in AchR- and MuSK- antibody-negative myasthenia gravis.
Pevzner A, Schoser B, Peters K, **Cosma NC**, Karakastani A, Shalke B, Melms A, Kroger S. Journal of Neurology. Volume 259, Issue 3 (2012), Page 427-435. PMID: 21814823. **IF 3.956**

The role of adenylyl cyclase 8 in stress response.
NC. Cosma, O. Almeida, A. Patchev. European Psychiatry. Volume 28, Supplement 1, 2013, Pages 1. (Abstract). **IF 5.361**

Klinische Veröffentlichungen

Post-Stroke-Depression und Post-Stroke-Fatigue.
Cosma NC, Peters O, Regen F. NeuroTransmitter. 2021 32(3):49-49. doi: 10.1007/s15016-021-9091-z

Spätschizophrenie bei einer 58-Jährigen.
Zain R, Hahn R, Martesen LM, **Cosma NC**. NeuroTransmitter. 2018. 29(4). doi: 10.1007/s15016-018-6358-0

Therapieresistente Katatonie.
Cosma NC, Schmidt IM, Ta TMT, Hahn E. NeuroTransmitter. 2017. 28(10):46-50. doi: 10.1007/s15016-017-6158-y

Hyponatriämie und depressives Syndrom.
Kaczmarczyk M, **Cosma NC**, Ludolph P, Regen R. NeuroTransmitter. 2017. 28(3):41-45. doi: 10.1007/s15016-017-5902-7

Attacken mit Lähmungen, Bauchschmerz und Panik.
Burger M, **Cosma NC**, Regen F. NeuroTransmitter. 2015. 26(11):35-39. doi: 10.1007/s15016-015-0873-z

Study of External Morphology of Human Embryos.
Cosma NC, Ciobanu P, Journal of Clinical Anatomy and Embryology no. 2, May 2008.

11. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Bearbeitung meiner Dissertation unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich PD Dr. med. Julian Hellman-Regen für die ausgezeichnete und zuverlässige Betreuung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Isabella Heuser für die enorme Unterstützung während meines gesamten beruflichen Werdegangs. Durch ihr Beispiel, Förderung und ihre Anregungen durfte ich sowohl klinisch als Fachärztin als auch wissenschaftlich täglich lernen und wachsen.

Außerdem möchte ich meinen Arbeitskollegen Berk Üsekes, Lisa Otto, Susanna Gerike, Neriman Eren und Meike Teborg meinen herzlichen Dank aussprechen. Gerne denke ich an die gemeinsame Zeit im Labor zurück und bedanke mich sehr für die hilfreichen Anregungen, produktiven Gesprächen und die wiederholte Unterstützung bei der Etablierung der Laborprotokolle.

Bei dieser Gelegenheit möchte ich alle unseren Studienteilnehmer*Innen danken, ohne die solche Dissertationsarbeiten nicht möglich wären.

Nicht zuletzt bedanke ich mich ganz besonders bei meiner Familie und meinem Mann Livius, welche mich durchgehend mit ihrer bedingungslosen Unterstützung begleitet haben.