

Záró beszámoló

“A stresszel összefüggő hangulatzavarok új állatkísérleti modelljének értékelése: az adenylate cyclase-activating polypeptide génhányos egér vizsgálata” című pályázathoz

(OTKA PD 100706)

Nyertes OTKA pályázatunkban arra vállalkoztunk, hogy felállítunk egy új állatkísérleti modellt, mely a major depresszió, mint emberi megbetegedés általánosan elfogadott három találat elmélete szerint lehetővé teszi az agyban bekövetkező változások feltérképezését. A genetikai predispozíció (1. találat) modellezésére hypophysis adenilát cikláz-aktiváló polipeptid (PACAP) mutáns egereket használtunk. Az epigenetikai eltérések kiváltására (2. találat) maternális deprivációt, környezeti stressz faktorként (3. találat) a krónikus variábilis enyhe stresszt (CVMS) alkalmaztunk.

Eredményeinket számos hazai és nemzetközi kongresszuson bemutattuk. A munkacsoporthoz csatlakozott TDK hallgatók 15 előadást mutattak be kari szinten (1db III. díj, 3db II. díj 1db első díj és Németh Árpád díj), melyből 4 OTDK-n is szerepelt és ebből egy II. helyezést ért el. Egy első díjas és egy második díjas dékáni pályamunka, és két jeles államvizsga dolgozat illetve védés született eredményeink alapján. A pályázó 2014-ben az eredményeket felhasználva habilitált. Tanulmányait négy PhD hallgató kezdte meg illetve folytatta a témában. Dr. Farkas József jelenleg előbírálati anyagán dolgozik, és várhatóan 2016-ban fogja PhD értekezését benyújtani és megvédeni. Dr. Kovács László jelenleg másodéves. Dr. Kormos Viktória családi okokból tanulmányait átmenetileg halasztja, védeése 2017-ben várható. Dr. Gaszner Tamás 2015. szeptemberében csatlakozott, mint PhD hallgató a csoporthoz, korábban, mint TDK hallgató tevékenykedett. A Munkatervnek megfelelő témában két publikációnk jelent meg eddig, egy jelenleg bírálat alatt áll, egy további kerül beküldésre néhány héten belül, ezen kívül még egy további írását tervezzük egy ki nem értékelt kísérlet eredményeit közlendő, két éven belül.

Az alábbi részletes beszámolóban a pályázó a támogatott Munkaterv pontjait követve értékeli az elért eredményeket.

Beszámoló a Munkaterv 1.A és 1.B pontjának megvalósításáról:

A projekt munkatervének 1.A. és 1.B pontja szerinti terv kivitelezése megtörtént, olyan módon kibővítve, hogy PACAP WT és PACAP KO állatokat tettünk ki krónikus stressznek, de már ebben a munkában is tettünk kísérletet arra, hogy vizsgáljuk a hatás reverzibilitását egy konvencionális triciklikus antidepresszáns, imipramine kezelés segítségével. 18 agyterületen végeztük el a mind a c-Fos, mind FosB immunoreaktivitás feltérképezését. Mivel a krónikus modellben a c-Fos aktiváció két területtől eltekintve alig volt mérhető, a FosB (krónikus aktivitási marker) megjelenésére koncentrálna végeztük a kvantitálást. Elvégeztük a nucleus interstitialis striae terminalis ovális almagjának (BSTov) CRF és FosB kettős festését, a centrális projekciójú Edinger-Westphal (cpEW) mag Ucn1-FosB és az előzetes FosB eredmények alapján a nucleus raphe dorsalis (DR) szerotonin (5HT) - FosB kettős jelölését is. A modellként használt krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) testtömeg, mellékvese tömeg, corticosterone szint és viselkedési mérések alapján történt, mely alapján azt láttuk, hogy a vad típusú (WT) állatok mutatják a klasszikus jeleit a krónikus stresszhatásnak, míg a PACAP géнкиütött (KO) állatok esetében ezek a hatások gyakorlatilag elmaradtak. A vizsgált 18 agyterület fele mutatott jelentős aktivációt CVMS hatására, és ezek közül hét [nucleus centralis (CeA) és medialis amygdalae, a nucleus

dorsomedialis nucleus interstitialis striae terminalis (BSTdm), BSTov, CA1 régió a hippocampusban, nucleus ventralis nucleus septi lateralis (vLS), pars parvocellularis nucleus paraventricularis hypothalami (pPVN), DR] területen PACAP KO állatokban jelentősen csökkent aktivációt mutatott. A BSTov CRF neuronok PACAP KO állatokban nem aktiválódtak CVMS hatására, míg WT egereken jelentős aktiváció volt megfigyelhető. A DR szerotoninerg neuronjaiban magas 5HT expressziót láttunk PACAP KO állatokban, mely stressz és kezelések hatására eltűnt. Az Ucn1 neuronok működésében ebben a modellben jelentős eltérést nem találtunk. Fenti eredmények arra utalnak, hogy a CVMS-ben megfigyelt csökkent stressz reaktivitás a BSTov CRF neuronjaiban a DR 5HT neuronjaiban, illetve a fentebb felsorolt területeken PACAP hiányban bekövetkező funkcionális változásokra vezethető vissza.

Az 1.A és 1.B pontoknak megfelelő kísérleti tervből származó adatokat egy már megjelent (Gaszner et al 2012) és egy nemrégiben beküldött közleményben foglaltuk össze, mely jelenleg a Neuroscience című folyóiratnál van bíráló alatt (Kormos et al., beküldve).

Megjegyzés: Az utóbbi cikk beküldésére azért kerül sor csak a projekt végén, mert az első szerző, Dr. Kormos Viktória, PhD hallgató, családi okokból (GYES) tanulmányait korábban két évre felfüggesztette, majd további halasztást kért újabb várandóssága miatt. Eredményeink egy részét azonban idézhető absztrakt formájában már korábban közöltük: ld: Kormos et al 2012., és TDK hallgatók is előadták kari (PTE ÁOK Kari TDK Konferencia (2014) Gáspár László, Gaszner Tamás II. hely), és részben OTDK előadások formájában (Gaszner Tamás, 2015).

Beszámoló a Munkaterv 2.A és 2.B pontjának megvalósításáról

A munkaterv 2.A és 2.B kísérleti terveit technikai okokból egyesítettük: egyrészt a 2.A és 2.B kísérletekben részben azonos kezelésben részesülő kontrollcsoportok szerepelnek, másrészt, a tenyésztés időigényes volta miatt is időt és kísérleti állatot takarítottunk meg a két kísérlet összevonásával.

Itt, mint arról már az időközi beszámolóban értekeztünk, komoly problémát jelentett, hogy a kísérlet maternális deprivációt alkalmazó fázisában számos állatot elveszítettünk. Itt a későbbi genotipizálás eredményeiből következtetve megállapítottuk, hogy az elhullott állatok jó része KO volt. (Átlagosan 25% KO állatra számíthatunk az almokon belül, tekintve, hogy heterozigóta (HZ) párok almat használtuk. Ezzel szemben mindössze 8% volt azon KO állatok aránya, melyek a kísérlet végéig életben maradtak.)

Egyik stratégiánk a probléma megoldására, melyet a pályázat beadásakor már, mint lehetőséget vázoltunk, a HZ állatok bevonásán alapult.

A HZ állatok szintén alkalmasak lehetnek a genetikai predispozíció vizsgálatára, mivel öröklötten csökkent PACAP expresszió jellemző rájuk. Tekintve, hogy a született egyedek több mint fele HZ állat volt, lényegesen nagyobb elemszámú csoportokat tudunk képezni. Ha csak a HZ állatokat vizsgáltuk, már az első, a 2A és 2B pont szerint elvégzett kísérlet során elegendő volt az elemszám a kiértékeléshez. A HZ egyedeket felnőve CVMS-nek tettünk ki, majd különféle viselkedési teszteknek vetettük alá (tail suspension test (TST), forced swim test (FST), light-dark box test, marble burying test), végül elvégeztük a CRF rendszerek (CeA, BSTov) az Ucn1 neuronok, és a DR-5HT sejtek FosB aktivitásának vizsgálatát.

A három találat elméletnek megfelelő, mindhárom rizikófaktort hordozó HZ állatokon megfigyelhetők voltak a stresszhatás klasszikus jelei: testsúlycsökkenés, a mellékvese tömegének növekedése, melynél fontos kiemelni, hogy a súlyos maternális depriváción átesett, stressznek kitett, HZ állatok mellékvese tömegei voltak a legmagasabbak. Ennek ellenére, ugyanezek az állatok csökkent corticosterone szintet mutattak, mely utalhat a stresszadaptáció zavarára. FST eredményeink is alátámasztják hipotézisünket, mivel a mindhárom találatot elszenvedett egereink több időt töltöttek mozdulatlanul, mely emelkedett depresszió szintre utal. Szövetteni vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy maternális depriváción átesett (epigenetikai faktor) PACAP HZ állatokban (genetikai faktor) CVMS hatására a BSTov CRF neuronjaiban fokozott FosB immunoreaktivitás és CRF jel denzitás volt megfigyelhető. Ezzel szemben, a cpEW Ucn1 neuronjai csökkent aktivitást mutatnak, mely arra utal, hogy a két rendszer működése között egy inverz reláció jelenik meg, és ez okozhatja a megfigyelt viselkedési eltéréseket. Ezeket az eredményeket több fórumon szóbeli illetve poszter prezentáció és absztrakt formájában (Gaszner et al. 2013) bemutattuk (Magyar Anatómus Társaság kongresszusa 2013, 43rd Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, CA, Magyar Idegtudományi Társaság kongresszusa 2013, PTE-ÁOK házi TDK konferencia 2013, Gaszner Tamás (III. hely), XXXI. Országos TDK konferencia, Szeged).

Néhány esetben az az alapvetően jogos kritikai észrevétel érkezett, hogy a modell valódi kontrollja, azaz a WT és KO állatok nélkül az eredmények kevésbé meggyőzőek, ezért döntöttünk az elemszám növelése, és a kísérlet megismétlése mellett.

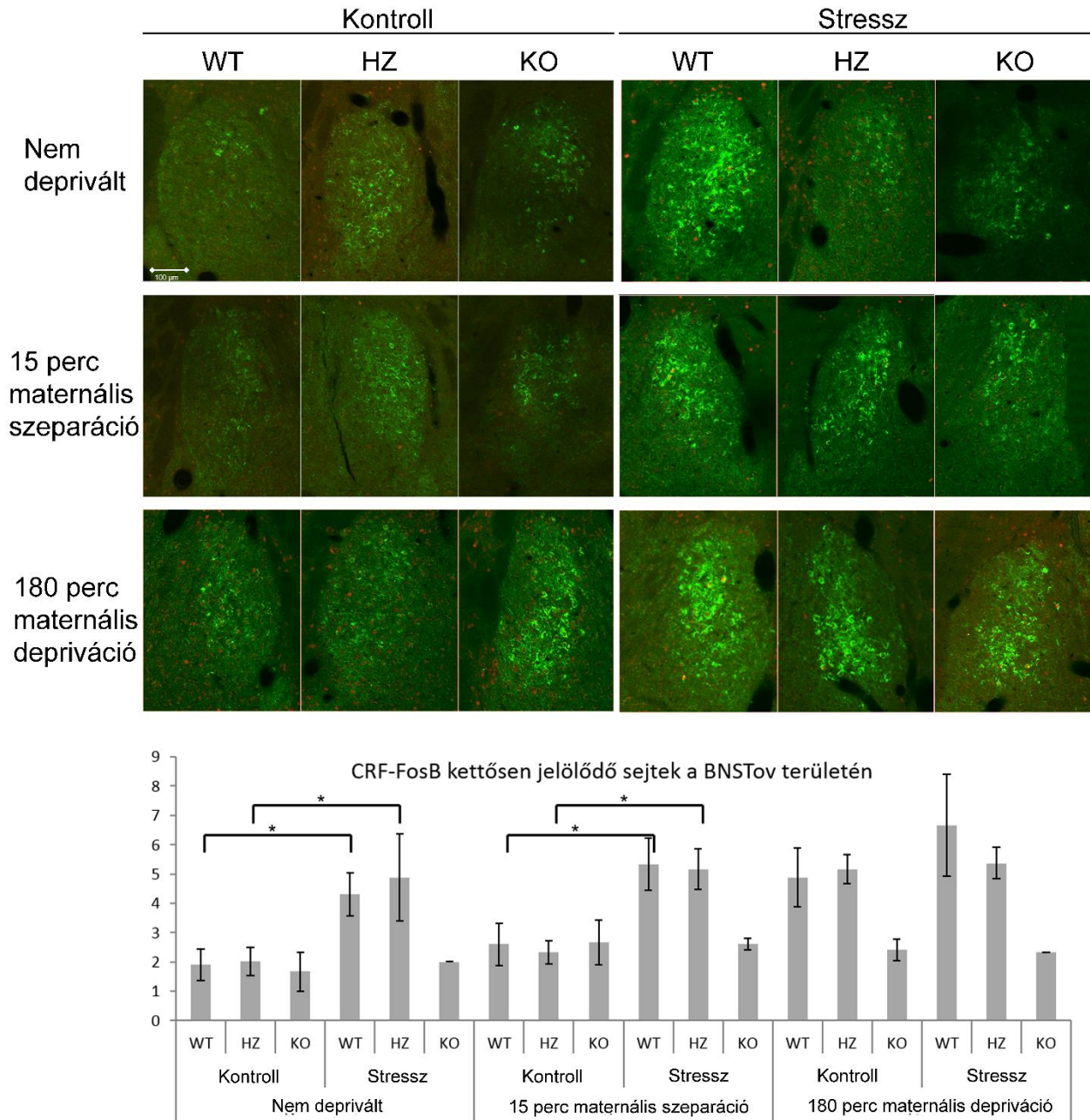
Második 2A és 2B szerinti kísérletünk eredményeképpen immáron olyan elemszámokkal dolgozhattunk, ahol a KO állatok aránya habár továbbra is alacsony (10%) volt, mégis elérte a statisztikai összehasonlításokhoz szükséges alsó határt. Viselkedési tesztjeink eredményei azt mutatják, hogy HZ állataink ebben a kísérletben is alkalmasabb modellállatnak bizonyulnak. FST-ben, azon HZ állataink, melyek a depresszió mindhárom rizikófaktorát hordozzák, magasabb immobilitási időket mutattak, mint vad típusú egereink, vagy olyan HZ állataink, melyek nem estek át maternális depriváción.

Ezekben a tesztekben validálni tudtuk korábbi eredményeinket, miszerint a PACAP KO egerek emelkedett depresszió szintet mutatnak (Gaszner et al 2012). Érdekes azonban, hogy azt tapasztaltuk, hogy amennyiben ezek az egerek további stressz faktornak (pl. maternális depriváció, vagy CVMS) vannak kitéve, paradox módon, csökkent depresszió szintet mutatnak, mind FST-ben, mind TST-ben. Ez az eltérés súlyos adaptációs zavarként értékelhető, és ellentétes azzal, amit a modellben elvárnánk (emelkedett depresszió szint, magasabb immobilitási idő). Ezek a megfigyelések is arra utalnak, hogy a PACAP HZ állatok jobb modellként használhatók, mint KO alomtstvéreik.

Szövetteni vizsgálatainkat ebben a kísérletben kiterjesztettük a BSTov mellett a CeA területére is, továbbá, megvizsgáltuk a cpEW Ucn1 sejtjeit és a DR szerotoninerg neuronjait is.

Eredményeink szerint az extrahypothalamicus CRF rendszerek közül a BSTov neuronjainak CRF tartalma a stressz faktor és maternális depriváció súlyosságával párhuzamosan emelkedik. A CRF neuronok CVMS hatására részben aktiválódnak, melyet a magjukban megjelenő FosB immunoreaktivitás bizonyít. Azon állatok esetében, melyek súlyos maternális depriváción estek át, a BSTov-CRF neuronok egy része CVMS expozíció nélkül is FosB immunoreaktivitást mutat,

melyet a CVMS már nem képes tovább növelni, utalva a rendszer adaptációs készségének elvesztésére, illetve arra, hogy a mag egyes CRF neuronjai konstitutív aktivitást mutatnak (1. ábra).



1. Ábra. A BSTov területén végzett CRF (zöld) és FosB (piros) jelölést mutató reprezentatív fotók. Kiemelendő, hogy 180 perc anyai megvonás után a kontroll csoportokban is számottevő FosB immunoreaktivitás figyelhető meg, melyet a stressz expozíció nem emel tovább. Szintén szemmel látható, hogy a stressz hatására a CRF jel erőssége megnő a WT állatokban, melynek mértéke HZ állatokban kisebb, míg KO állatokban lényegében elmarad, csakúgy, mint a FosB aktiváció. A hisztogram a kettősen jelölt sejtek átlagos számát mutatja az egyes csoportokban. Csillaggal jelöltük a fontosabb szignifikáns különbségeket ($p < 0.05$) a post hoc tesztek alapján. ($n=3-10$) Lépték 100 μ m.

Mivel a BSTov-CRF neuronjai közvetve hatást gyakorolnak többek között a hypothalamus hypophysis mellékvese tengelyre (Herman et al 2003, Conrad et al. 2011), melyre WT és HZ állatban fokozott aktivitás jellemző, felmerül, hogy a megváltozott BSTov-CRF neuronális aktivitás hozzájárul a HPA tengely máladaptációjához, melyet gyakran látunk depresszióban szenvedő betegekben (Nemeroff et al. 1984). Kiemelendő, hogy a CVMS a KO állatokban nem okoz FosB aktivitás növekedést egyik csoportban sem, ismét utalva arra, hogy a KO állatban teljes adaptációs zavar áll fenn, mely nem teszi kifogástalan modellállattá. Alátámasztja ezt az is, hogy emberben már ismertek olyan PACAP és PAC1 receptor polimorfizmusok (Ressler et al 2011, Almlí et al. 2013) (és nem géndefektusok), mely hangulatzavarokkal küzdő egyéneknél nagyobb arányban fordulnak elő, nem feltétlenül homozigóta formában. Ezek az adatok szintén a HZ állat, mint modell mellett szólnak.

A CeA területén ezzel ellentétes módon a CRF immunoreaktivitás mértéke fordítottan arányos a stressz faktorok erősségével és számával. Ez az összefüggés jórészt ellentétes előjelű azzal, melyet a BSTov-ban láttunk, utalva arra, hogy a mag más funkcionális jelentőséggel bír, mind a stresszadaptáció, mind pedig a PACAP gén defektusa szempontjából. Mivel jól ismert a CeA szerepe a vegetatív idegrendszer felsőszintű szabályozásában (Ulrich-Lai and Herman 2009), és mivel ismert, hogy PACAP KO egerekben a szimpatikus idegrendszer működése is zavart szenved (Stroth et al. 2013), felmerül, hogy a PACAP hiánya a CeA szintjén is hatást gyakorol az autonóm idegrendszer működésére.

Az Ucn1 neuronok működését tanulmányozva azt láttuk, hogy a stressz, korábbi irodalmi adatokkal egybehangzóan csökkenti az Ucn1 immunoreaktivitás mértékét (Korosi et al 2005, Kozicz et al 2008a). Azt is megállapíthatjuk, hogy a genotípus önmagában nem befolyásolja az Ucn1 immunoreaktivitás mértékét. Ha azonban állatainkat maternális deprivációnak tesszük ki, mind a HZ, mind a KO csoportban fokozott Ucn1 expressziót látunk, vad típusú egerekkel összehasonlítva. Ha az Ucn1 neuronok aktivitását FosB immunjel segítségével értékeljük, azt tapasztalhatjuk, hogy a mindhárom rizikófaktort hordozó KO állatainkban a FosB-t is expresszáló Ucn1 neuronok száma kétszer nagyobb, mint bármely másik csoportban. Ezzel egybehangzóan, fokozott Ucn1 expressziót találtak kezeletlen, depresszióban szenvedő emberek agymintáiban, akik öngyilkosság következtében hunytak el (Kozicz et al 2008b).

Adatunk arra utalnak, hogy azokban az állatokban, melyek mindhárom rizikófaktort hordozzák, az cpEW-Ucn1 rendszer aktivitása nagymértékben megnő, mely magyarázatot adhat a viselkedésben megfigyelt paradox jelenségre: a magban a máladaptációs változások lépnek fel, nő annak aktivitása, és magasabb Ucn1 aktivitás a CRF2 receptoron hatva csökkenti a szorongás és depresszió szinteket maternálisan deprivált vagy stresszelt KO állatban TST és FST tesztekben.

A három találat elmélet modelljében az első, a nucleus raphe dorsalisban (DR) végzett FosB jelölések eredményei alapján arra következtettünk, hogy a DR-5HT neuronjai szerepet játszhatnak a PACAP KO állatban talált viselkedési eltérések létrejöttében. Irodalmi adatok is alátámasztották a feltételezést, mivel Shintani és munkatársai (2003) a PACAP KO állatban csökkent 5-hidroxi-indolecetsav szintet mutatnak, mely a 5HT bomlásterméke.

Eredményeink szerint a DR területén mintegy 50%-kal magasabb immunoreaktivitást mérünk a PACAP KO állatokban WT egerekben. Az adatok alátámasztják a korábban 1A és 1B pontok szerinti kísérleteinkben látottakat, miszerint a KO állatokban több szerotoninerg sejt számolható meg a DR területén. A három találat elmélet szerinti modellben elvégeztük a FosB-5HT kettős jelöléseket is, és azt tapasztaltuk, hogy a maternális depriváción átesett állatok magas FosB

expressziót mutatnak a DR-ban, és ez az aktivitás paradox módon CVMS hatására a bazális értékre zuhan, melyet követ a 5HT jelzenítés kisebb mértékű csökkenése is. Mivel a leírt változás mindhárom genotípusban megfigyelhető volt, arra következtethetünk, hogy az epigenetikai (maternális depriváció) és környezeti hatás (CVMS) erősen befolyásolja a szerotoninerg sejtek működését, a genotípusnak azonban inkább csak a bazális szintekben jelenik meg hatása.

Összefoglalva tehát elmondhatjuk, hogy a BSTov-CRF rendszer működésében egy aktivitás csökkenést, a cpEW-Ucn1 tekintetében egy aktivitás fokozódás figyelhető meg a három rizikófaktor megléte esetén, mely jól magyarázza a humán depresszióban és a viselkedési tesztekben, egészen megfigyelt tüneteket. A DR-5HT rendszerek esetében a hatás kiváltásához két találat is elegendő, habár, a PACAP hiánya hatással bír a bazális 5HT szintre.

Ezek alapján egy olyan kép körvonalazódik, miszerint a PACAP hiány az agy számos területén funkcionális hatással bír, de ezek a hatások eltérő, régió specifikus vulnerabilitást eredményeznek. Ezek szerint a depresszió három találat elméletének modellje használható, és értelmezhető a BSTov-CRF és Ucn1-CRF rendszerre, míg a DR-5HT neuronok működése már környezeti és epigenetikai hatások révén is megváltozik, és nincs szükség genetikai predispozícióra. Végző soron a három találat elmélet validitását is igazoltuk eredményeink révén, azzal a kiegészítéssel, hogy a kórkép egyes elemei már kevesebb faktor megléte esetén is megjelenhetnek (pl. depresszió-szerű viselkedés PACAP KO állatban), illetve bizonyos agyterületek működésének megváltozásához nincsen szükség mindhárom rizikófaktor együttes fennállására sem (pl. DR-HT5).

Felvetődik ez alapján, egy olyan hipotézis, miszerint a stresszadaptációban szerepet játszó területek érzékenysége az egyes faktorok tekintetében eltérő lehet, illetve hogy egyes faktorok interakciók révén, más módon hathatnak ugyanazon a területen, mint önmagukban. A jövőben a depresszió kóroktanának mélyebb megértését elősegítendő szükséges egy átfogó, ideális esetben, valamennyi jelenleg ismert a stressz adaptációban szerepet játszó rendszer vizsgálata aszerint, hogy mely genetikai, epigenetikai és környezeti faktor egyenkénti, vagy együttes hatása borítja fel az adott agyterület normális működését. Egy ilyen „vulnerabilitás térkép” birtokában lehetőségünk lenne a major depressziót, mint jelenleg egységesen definiált betegséget (DSM 5, 2013) további, immáron a neurobiológiai hátteret is figyelembe vevő kategorizálására, mely rávilágíthatna az adott klinikai esetben valószínűsíthetően leginkább károsodott rendszer(ek)re, és ezzel a jövőben célzottabb terápiás megközelítést tenne lehetővé (Kormos és Gaszner 2013).

A 2.A és a 2.B munkatervi pontoknak megfelelő kísérleti eredmények közzlése folyamatban van (Farkas et al.), de azokat idézhető absztrakt formájában részben már bemutattuk (Gaszner et al 2013, Gaszner et al 2014). A munkacsoport TDK hallgatói kari (Gaszner Tamás, Kovács László) és OTDK szinten is (Kovács László II. hely) helyezéseket értek el a témában benyújtott előadásaikkal, illetve dékáni pályamunkájukkal (Gaszner Tamás I. díj).

Beszámoló a munkaterv 3. pontjának megvalósításáról

Mivel a PACAP KO egerek agyában nem egy, hanem számos területen is eltérő neuronális aktivációt láttunk (Gaszner et al., 2012, 2013, 2014) az agyterület specifikusan alkalmazott PACAP kezelés a három találat hatásának visszafordíthatóságára technikailag, gyakorlatilag nem volt kivitelezhető. (Ez lett volna a munkaterv 3. pontjának programja.) Ehelyett szisztémás fluoxetine kezelést alkalmaztunk modellünkben a visszafordíthatóság vizsgálatára. Itt egy újabb technikai problémával szembesültünk: a PACAP KO állatok, melyek fluoxetine kezelésben

részesültek, függetlenül a stressz expozíciótól, váratlanul, kivétel nélkül elhullottak. A WT állatok mind a kontroll, mind a CVMS csoportban jól viselték a kezelést. Az elhullás okának tisztázására újabb kísérletet is végeztünk, a pályázat 8 hónapos meghosszabbított időtartama alatt HZ állatok bevonásával és kisebb dózisu kezelést alkalmazva, de e zárójelentés beadásának időpontjában ennek eredményeiről még nem tudunk beszámolni. Ezen utóbbi kísérlet eredményeit még szeretnénk 2 éven belül publikálni, az alábbi, jelenleg közlés álló illetve előkészületben lévő kéziratunk mellett:

Az OTKA pályázat témájában illetve ahhoz kapcsolódóan benyújtott, bírálat alatt álló közleményeink:

1. Kormos V, Gáspár L: Kovács L, Farkas J., Gaszner T., Csernus V., Balogh A. Hashimoto H., Reglődi D. Helyes Z., Gaszner B. Reduced response to chronic variable mild stress in PACAP mutant mice is associated with increased dorsal raphe serotonin content and blunted FosB expression in the central amygdala, bed nucleus of the stria terminalis, hippocampus and lateral septum. *Neuroscience*, (submitted)
2. A. Aschrafi, J.M. Verheijen, P.M. Gordebeke, N.F. Olde Loohuis, K. Menting, A. Jager, M. Palkovits, B. Geenen, A. Kos, G.J.M. Martens, J.C. Glennon, B.B. Kaplan, B. Gaszner, T. Kozicz MicroRNA-326 Acts as a Molecular Switch in the Regulation of Midbrain Urocortin 1 Expression *Journal of Psychiatry and Neuroscience* (submitted)

Az OTKA pályázat témájában benyújtás előtt álló kéziratunk:

Farkas J, Kovács L, Gaszner T, Gáspár L., Hashimoto H, Reglődi.D., Szalontai B, Helyes Z. Gaszner B The three hit theory for depression in PACAP heterozygous mice. The involvement of extrahypothalamic CRF, urocortin 1 and serotonin.

Idézett irodalom:

Almli, L.M., Mercer, K.B., Kerley, K., Feng, H., Bradley, B., Conneely, K.N., Ressler, K.J., 2013. ADCYAP1R1 genotype associates with post-traumatic stress symptoms in highly traumatized African-American females. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 162B, 262–272.

DSM-5: Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 2013. American Psychiatric Association, American Psychiatric Publishing, ISBN 978-0-89042-555-8.

Conrad KL, Louderback KM, Gessner CP, Winder DG. (2011) Stress-induced alterations in anxiety-like behavior and adaptations in plasticity in the bed nucleus of the stria terminalis. *Physiol Behav.* 2011 104:248-256.

Gaszner B, Farkas J, Bodnar G, Kovacs L, Gaszner T. Gaspar L., Balogh A., Szalontai B, Kormos V. (2013) Application of the three hit theory in PACAP heterozygote mice: Maternal separation and chronic stress influence BNST CRF and cpEW Ucn1 in an inverse manner. *43rd Annual Meeting for Neuroscience San Diego*, Abstract 382.23.

Gaszner B, Kormos V, Kozicz T, Hashimoto H, Reglodi D, Helyes Z. (2012) The behavioral phenotype of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide-deficient mice in anxiety and depression tests is accompanied by blunted c-Fos expression in the bed nucleus of the stria terminalis, central projecting Edinger-Westphal nucleus, ventral lateral septum, and dorsal raphe nucleus. *Neuroscience*. 202:283-299.

Gaszner B, Kovacs L, Gaszner T, Gaspar L, Reglodi D, Lorincz K, Farkas J, Hashimoto H, Kormos V. (2014) PACAP transgenic mice in the three hit model of depression: The involvement of BNST - CRF, cpEW - Urocortin1 and DR – serotonin *44th Annual Meeting for Neuroscience*, Washington DV, Abstract 711.12

Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE 2003 Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol*. 24:151-80.

Korosi, A., Schotanus, S., Olivier, B., Roubos, E.W., Kozicz, T., 2005. Chronic ether stress-induced response of urocortin 1 neurons in the Edinger–Westphal nucleus in the mouse. *Brain Res*. 1046:172–179.

Kormos V, Reglodi D, Kozicz T, Helyes Z, Hashimoto H, Gaszner B (2012) Chronic variable mild stress model of depression in the pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide (PACAP) deficient mice (2012) *42nd Annual Meeting for Neuroscience* Abstract, New Orleans,776.23.

Kormos V. Gaszner B (2013) Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: from animals to humans. *Neuropeptides*. 2013 47:401-19.

Kozicz T, Bordewin LA, Czéh B, Fuchs E, Roubos EW. (2008a) Chronic psychosocial stress affects corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus and central extended amygdala as well as urocortin 1 in the non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus of the tree shrew. *Psychoneuroendocrinology*. 33:741-54.

Kozicz T, Tilburg-Ouwens D, Faludi G, Palkovits M, Roubos E. (2008b) Gender-related urocortin 1 and brain-derived neurotrophic factor expression in the adult human midbrain of suicide victims with major depression. *Neuroscience*. 152:1015-23.

Nemeroff, C.B., Widerlov, E., Bissette, G., Walleus, H., Karlsson, I., Eklund, K., Kilts, C.D., Loosen, P.T., Vale, W., 1984 Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 226:1342–1344.

Ulrich-Lai YM, Herman JP. 2009 Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci*. 10:397-409.

Ressler, K.J., Mercer, K.B., Bradley, B., Jovanovic, T., Mahan, A., Kerley, K., Norrholm, S.D., Kilaru, V., Smith, A.K., Myers, A.J., Ramirez, M., Engel, A., Hammack, S.E., Toufexis, D., Braas, K.M., Binder, E.B., May, V., 2011 Post-traumatic stress disorder is associated with PACAP and the PAC1 receptor. *Nature* 470:492–497.

Shintani N, Tanaka K, Hashimoto H, Baba A 2003 Altered behavioral response to centrally acting drugs in mice lacking PACAP *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 122 Suppl:1P-4P.

Stroth N, Kuri BA, Mustafa T, Chan SA, Smith CB, Eiden LE. PACAP controls adrenomedullary catecholamine secretion and expression of catecholamine biosynthetic enzymes at high splanchnic nerve firing rates characteristic of stress transduction in male mice. *Endocrinology*. 2013 154:330-339.