



## Araştırma Makalesi | Research Article

# KONDROİTİN SÜLFAT TAYİNİ İÇİN İMMÜNFLOROSAN BOYAMALARDA OPTİMUM FİKSASYON YÖNTEMİNİN BELİRLENMESİ

## DETERMINATION OF OPTIMAL FIXATION METHOD FOR CHONDROITIN SULFATE DETECTION VIA IMMUNOFLUORESCENCE STAINING

Duygu Yücel<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Erciyes Üniversitesi, Genom ve Kök Hücre Merkezi (GenKök), Kayseri, Türkiye.



### ÖZ

**Amaç:** Kondroitin sülfat (KS) zincirleri embriyonik hücre bölünmesi, sitokinez ve gelişimde rol oynayan, *C. elegans*'tan fareye benzer rollerde görev alan moleküllerdir. Doku ve hücrelere mekanik destek veren, nöronal plastisite ve hücre migrasyonunda görev alan KS moleküllerinin biyosentezi, *C. elegans*'ta insandakine benzer bir mekanizma ile gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmada, *C. elegans* model organizmasında kondroitin sülfat moleküllerinin immünfloresan boyama tekniği ile gözlemlenmesi için en etkin fiksasyon yönteminin belirlenmesi hedeflenmiştir.

**Yöntem:** İmmünfloresan boyamaların gerçekleştirilmesi için embriyolar, erişkin *C. elegans* 'lardan izole edilmiş ve embriyo pelletleri %4 paraformaldehid (PFA) ve metanol ile fiks edilme üzere iki farklı tüpe ayrıştırılmıştır. İnkübasyon ve yıkama aşamalarını takiben, örnekler, kondroitinase ABC (CSase ABC) enzimi ile muamele edilmiştir. Enzimin inaktive edilmesinin ardından %10 donkey serum ile bloke edilen embriyo pelletleri, primer antikor anti-kondroitin antibody ile gece boyu inkübe edilmiştir. Sekonder antikor olarak donkey anti-mouse Alexa 488 1:250 oranında kullanılmıştır. Görüntüler inverted mikroskop kullanılarak elde edilmiştir.

**Bulgular:** PFA ile yapılan boyamalarda, embriyonik katman yapılarının daha iyi korunduğu görülmüştür. Metanol ile fiksasyonun, embriyonik tabakaların yapısını bozduğu ve kondroitin boyamalarının başarısını düşürdüğü gözlemlenmiştir. Yapılan analiz ve karşılaştırmalarda, PFA ile yapılan fiksasyon aşamasının otofloresan sinyalinin artırması da KS sinyalinin ve morfolojik yapısının tespiti için metanol ile yapılan fiksasyon yöntemine göre daha iyi sonuç verdiği gözlemlenmiştir.

**Sonuç:** Bu çalışmada, KS tayini için en etkin yöntemin PFA fiksasyon yöntemi olduğu tespit edilmiştir. Böylece, PFA ile fiksasyon yöntemi kullanılarak, KS moleküllerine dair *C. elegans* model organizmasında fenotipik değişiklikler daha nitelikli ve yüksek doğrulukta analiz edilebilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** Kondroitin sülfat, fiksasyon yöntemi, *C. elegans*, immünfloresan boyama, ekstraselüler matris

### ABSTRACT

**Objective:** Chondroitin sulfate (CS) chains are involved in embryonic cell division, cytokinesis and development from nematode *C. elegans* to mice. CS chains provide mechanical support to tissues and cells and play roles in neuronal plasticity and cell migration. The biosynthesis of CS in *C. elegans* is similar to the mechanism in humans. In this study, we aimed to determine the optimal fixation method for chondroitin sulfate detection via immunofluorescence staining using *C. elegans* as a model organism.

**Methods:** In order to conduct immunofluorescence staining, embryos were isolated from adult worms and embryonic pellets were allocated into two separate tubes for fixation with 4% paraformaldehyde (PFA) and methanol. After incubation and washing steps, samples were treated with chondroitinase ABC (CSase ABC) enzyme upon which the enzyme was inactivated. %10 donkey serum was used for blocking and samples were incubated with anti-chondroitin antibody overnight. As for secondary antibody, donkey anti-mouse Alexa 488 was used in a 1:250 ratio. Image analysis was performed using an inverted fluorescent microscope.

**Results:** The embryonic layers were conserved better in the PFA fixation method compared with the methanol fixation. In methanol fixed samples, the structure of the embryonic layers was disrupted decreasing the success of the CS staining. Although PFA fixation increased the autofluorescence, it provided a better staining profile for detection of CS signal and the morphological structure as compared with the methanol fixation.

**Conclusion:** In this study, PFA fixation was determined as the optimal fixation method for CS detection. With the use of PFA fixation method, phenotypic changes related to CS molecules can be analysed with a better quality and higher accuracy in *C. elegans*.

**Keywords:** Chondroitin sulfate, fixation method, *C. elegans*, immunofluorescence staining, extracellular matrix

\*İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: Duygu Yücel; Erciyes Üniversitesi, Genom ve Kök Hücre Merkezi (GenKök), Kayseri, Türkiye.

Telefon/Phone: +90 (352) 207 66 66 (13638)

e-posta/e-mail: duyguyucel@erciyes.edu.tr

Başvuru/Submitted: 16.06.2022

Kabul/Accepted: 14.11.2022

Online Yayın/Published Online: 28.02.2023

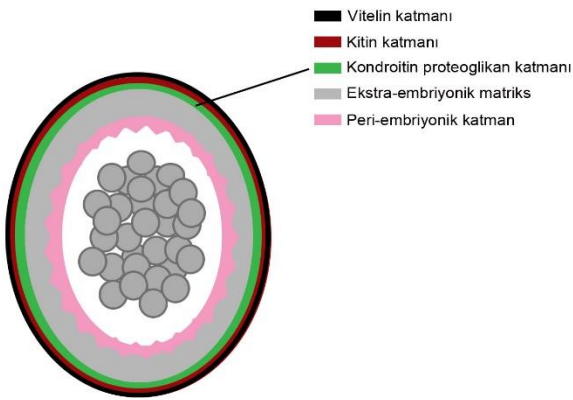


## Giriş

Kondroitin sülfat (KS) zincirleri embriyonik hücre bölünmesi, sitokinez ve gelişimde rol oynayan, *C. elegans*'tan fareye benzer rollerde görev alan moleküllerdir.<sup>1</sup> KS moleküllerinin fonksiyonları kurtçuktan memeli sistemlere kadar korunmuştur. KS'ler lineer ve tekrar eden disakkarid birimlerden oluşan polisakkarid yapılardır. Bu polisakkarid zincirler spesifik proteinlerle kovalent olarak bağlanarak, hücre yüzeyinde ve ekstraselüler matrikste yaygın olarak bulunan kondroitin proteoglikan (KPG) yapılarını oluştururlar. Doku ve hücrelere mekanik destek veren, nöronal plastisite ve hücre migrasyonunda görev alan KS moleküllerinin biyosentezi, *C. elegans*'ta insandakine benzer bir mekanizma ile gerçekleştirilmektedir.<sup>1,2</sup>

*C. elegans* basit anatomisi, her birinin akıbeti belli olan karakterize edilmiş 959 adet somatik hücresi, genetik çalışmalara yatkınlığı ve genlerinin yarısından fazlasının insan genleriyle homoloji göstermesinden dolayı oldukça rağbet gören bir model organizmadır.<sup>3,4</sup> *C. elegans* ve insan arasında birçok biyolojik işlev korunmuştur. İnsan hastalık genlerinin % 65'ine *C. elegans* genomunda bir karşılık bulunabilmektedir.<sup>3</sup> *C. elegans*'ın kolay idame ettirilen ve genetik olarak manipülasyona açık olan sistemi insanlarda görülen birçok hastalığın moleküler mekanizmasının açığa çıkarılmasına katkı sağlamıştır. 302 adet nöronu ve bütün nöronal bağlantı haritasının bilinmesi ile nörodejeneratif hastalıklara, ortalama 20 günlük ömrü ile yaşlanma ve metabolik hastalıklar üzerine, vulval farklılaşma mekanizması ile kanser biyolojisine ışık tutmuştur.

KS moleküllerinin akıbetininin hastalık modelleri, ilaç ve kimyasal ajanlar sonucu gösterdiği fenotiplerin araştırılması açısından nematod *C. elegans*, evrimsel olarak korunmuş olan KS biyogenezi ve fonksiyonlarıyla avantajlı bir model organizma platformudur. *C. elegans*'ta embriyonik zar yapısı beş farklı katmandan oluşmaktadır (Şekil 1).



**Şekil 1.** Kondroitin molekülleri embriyonik katmanlardan birini oluşturmaktadır. *C. elegans* embriyonik katmanları gösterilmektedir.

Kondroitin proteoglikan (KPG) katmanı, en dıştaki vitelin ve bir altındaki kitin katmanından sonra embriyoyu sarmalayan üçüncü katmandır. Vitelin, kitin ve KPG

katmanları dış zarı oluştururken, ekstra-embriyonik matriks KPG katmanının hemen altında asimetrik yapıdadır. Beşinci katman olan peri-embriyonik katman ise lipid moleküllerinden oluşan, embriyonun hidrasyonunu sağlayan permeabilite bariyeri olarak görev yapar. Kitin tabakası embriyoya mekanik destek sağlar ve polispermiyi engeller. KPG tabakası, plazma membranının kitin tabakasına adhezyonunu engelleyerek embriyonun gelişimi için alan açılmasını sağlar.

KS moleküllerinin immüno Floresan tayini için uygulanacak fiksasyon yöntemi önem arz etmektedir. Fiksatifler cross-linking yapanlar ve denatürasyon yapanlar olmak üzere iki ana kategoride sınıflandırılmaktadır.<sup>5</sup> Metanol dehidrasyon/denatürasyon yoluyla fiksasyon sağlarken, paraformaldehid (PFA) cross-linking yaparak fiksasyon yapılmasına neden olmaktadır.<sup>6</sup> Aldehitler ve alkol bazlı fiksatifler hücre biyolojisi alanında etkinliği en çok karşılaştırılan fiksatif ajanlar arasında yer almaktadır.<sup>7</sup> Fiksasyon antijeniteyi bozabileceği için, farklı fiksasyon yöntemlerinin test edilmesi en iyi boyama sonucu alınması açısından önemlidir. . Bu çalışmada, PFA ve metanol ile fiksasyon yöntemleri kullanılarak KS tayini için en iyi hangi yöntemin kullanılması gerektiği incelenmiştir. Yapılan analiz ve karşılaştırmalarda, PFA ile yapılan fiksasyon aşamasının oto Floresan sinyalinin artırsa da, KS sinyalinin ve morfolojik yapısının tespiti için metanol ile yapılan fiksasyon yöntemine göre daha iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir. Böylece, PFA ile fiksasyon yöntemi ile, KS moleküllerine dair *C. elegans* model organizmasında fenotipik değişiklikler daha nitelikli ve yüksek doğrulukta analiz edilebilecektir.

## Yöntem

### Kurtçukların İdame Ettirilmesi

Kurtçukların kültüre edilmesi için Nematode Growth Medium (3 g/L Sodium Chloride, 2.5 g/L Bacto peptone, 17 g/L Bacteriological agar) ve OP50 bakteri suşu kullanılmıştır. Deneyler 20 – 25 C'de soğutmalı inkübatör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan yabancı tip N2 (Bristol) *C. elegans* suşu, University of Minnesota Caenorhabditis Genetics Center'dan temin edilmiştir.

### Embriyo Eldesi

*C. elegans* kültürü, 60 mm'lik Nematode Growth Medium/ OP50 (NGM/OP50) petri kaplarında erişkin evreye gelene kadar büyütüldükten sonra, kurtçuklar dH<sub>2</sub>O kullanılarak petri kaplarından falkon tüplerine aktarılmıştır. Kurtçukların tüplerin dibine çökmesi sağlandıktan sonra supernatant uzaklaştırılmıştır. Erişkin *C. elegans* popülasyonu BS2X hipoklorür solüsyonu ile (0.5 M NaOH, 20% (v/v)) muamele edilerek erişkin hayvanların kütükülleri eritilmiş ve embriyolar elde edilmiştir. Hipoklorür solüsyonu M9 tampon çözeltisi kullanılarak (1 mM MgSO<sub>4</sub>; 22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 42 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 86 mM NaCl) ortamdan uzaklaştırılmıştır. M9 tampon çözeltisi içindeki embriyolar immüno Floresan boyamalar için kullanılmıştır.

### İmmünofloresan Boyamalar

Embriyo pelletleri %4 paraformaldehid (PFA) ve metanol ile fikse edilmek üzere iki farklı tüpe ayrıştırılmıştır. Fiksatif eklendikten sonra, embriyoların kütüküllerinde çatlak oluşturarak fiksatiflerin penetre olmasını sağlamak amacıyla tüpler sıvı azot içerisinde dört kez dondurulup çözdürülmüştür.<sup>1,8</sup> Ardından, %4 PFA ve metanol olmak üzere iki farklı tüp içerisindeki embriyolar gece boyu 4 °C’de inkübe edilmiştir. Ertesi gün, PFA ve metanol solüsyonları % 0,25 Triton-X içeren PBS çözeltisi (PBST) ile embriyolardan uzaklaştırılmıştır. Örnekler, 0,04M Tris Acetate, pH 8 içerisinde çözölmüş ve 50mU/ µl chondroitinase ABC (CSase ABC) enzimi ile muamele edilmiştir. Negatif kontrol olarak yalnızca 0,04M Tris Acetate, pH 8 solüsyonu ile muamele edilen örnekler kullanılmıştır. CSase ABC enzimi içeren ve içermeyen iki ayrı tüp 3 saat boyunca 37 °C’de inkübe edilmiştir. Enzimin inaktive edilmesi için örnekler 95 °C’de 5 dakika bekletilmiştir. Örnekler oda sıcaklığında 1 saat boyunca %10 donkey serum ile bloke edildikten sonra primer antikor anti-chondroitin antibody (anti-proteoglycan ΔDi-OS antibody 1B5, 1:20; Seikagaku) ile 4 °C’de gece boyu inkübe edilmiştir. Sekonder antikor olarak donkey anti-mouse Alexa 488 (Life Technologies) 1:250 oranında kullanılmıştır ve 49,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) içeren VectaShield mounting medium ile mikroskop preparatları hazırlanmıştır.

#### Mikroskop analizi

Görüntüler Leica DMI1 inverted mikroskop (DMI4000) kullanılarak elde edilmiştir. *C. elegans*’ların idame ettirilmesi ve embriyoların izole edildiğinin confirmasyonu için stereomikroskop (Leica M165 FC) kullanılmıştır.

### Bulgular

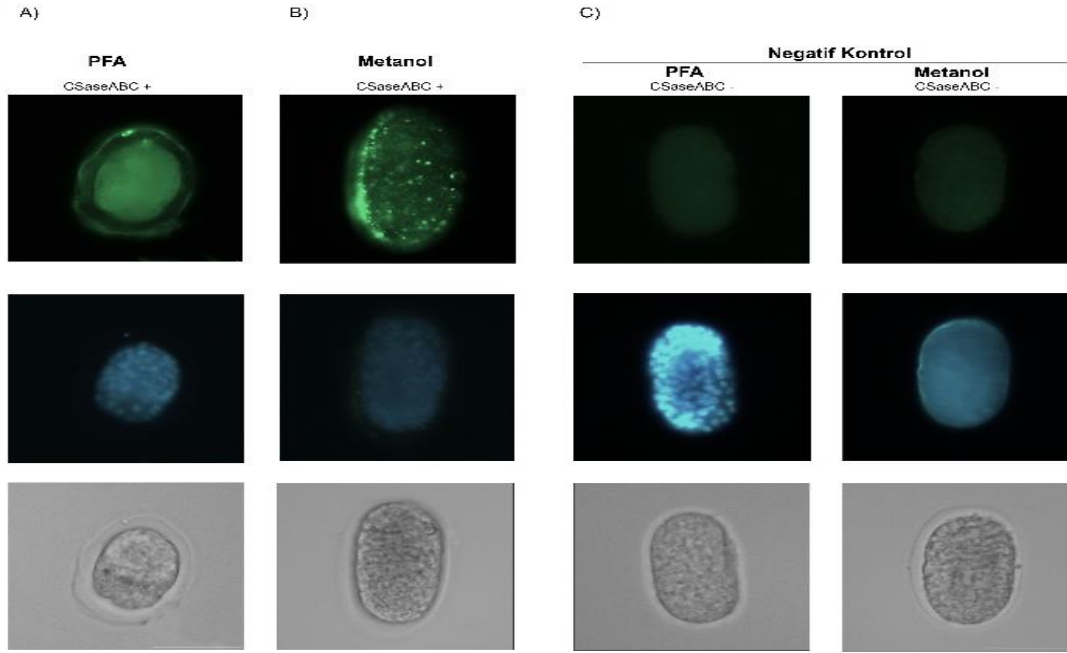
*C. elegans* embriyolarında PFA ve metanol fiksasyon yöntemlerinin etkinliğinin incelendiği ve optimum fiksasyon yönteminin belirlenmesinin hedeflendiği bu çalışmada, PFA ile yapılan boyamalarda, embriyonik

katman yapılarının daha iyi korunduğu görölmüştür (Şekil 2A). Metanol ile fiksasyon işlemi gerçekleştirildiğinde, embriyonik tabakaların yapısının bozulduğu ve kondroitin boyamalarının başarısının düştüğü gözlemlenmiştir (Şekil2B).

Şekil 2A’da PFA fiksasyonu ile yapılan boyamada, birinci panelde KS sinyali görölmektedir. Şekil 1’de embriyonik katmanların şematik gösteriminde yeşil olarak işaretlenen KPG katmanı net bir şekilde tespit edilebilmektedir. İkinci panelde, DAPI ile işaretlenmiş embriyonik hücrelerin çekirdekleri gösterilmektedir. Üçüncü panel, embriyonun ışık mikroskobu ile elde edilen görüntüsüdür. Şekil 2B’deki birinci panel ile karşılaştırıldığında, KPG katmanının metanol fiksasyonu sonucu morfolojik yapısının bozulduğu görölmektedir. KS moleküllerine ait sinyal, noktasal bir şekilde dağılmış ve ikinci paneldeki DAPI ile yapılan boyamada embriyonik çekirdek hücreleri bulanık bir şekilde görölmekte ve kaç adet çekirdek olduğu tespit edilememektedir.

Şekil 2C panelinde negatif kontrol olarak temsili görüntüleri sunulan chondroitinase ABC (CSase ABC) enzimi ile muamele edilmemiş görüntüler, KS sinyalinin spesifik olarak kondroitin moleküllerini gösterdiğini doğrulamaktadır. CSase ABC enzimi ile muamele edilerek elde edilen Şekil 2A ve 2B, enzimin KS zincirlerini degrades ederek, monoklonal antikor 1B5’in tanıyacağı kondroitin parçalarının oluşmasını sağladığı temsili görüntülerdir. Şekil 2C’de metanol fiksasyonu ile gerçekleştirilen DAPI boyamasının başarısı, Şekil 2B’dekine benzer şekilde düşüktür.

KS moleküllerinin tespit ve analizi için PFA’nın, metanol ile karşılaştırıldığında daha etkin bir fiksasyon yöntemi olduğu gözlemlenmekle birlikte PFA fiksasyonu sonucu otofloresan sinyalinin oluştuğu görölmektedir. Metanol ile yapılan fiksasyonda, otofloresan sinyali oldukça düşüktür. PFA ile fiksasyon sonucu otofloresan sinyalindeki artış, KS moleküllerine dair yapılan analizleri etkilemeyecek düzeydedir.



**Şekil 2.** PFA ve metanol ile gerçekleştirilen fiksasyon işlemlerinin karşılaştırılması. A) PFA B) Metanol fiksasyonu ile yapılan immünfloresan boyamalarda, yukarıdan aşağıya doğru birinci panelde KS sinyali görülmektedir. İkinci panelde embriyonik çekirdek hücreleri ve üçüncü panelde ise embriyonun ışık mikroskopundaki görüntüsü verilmiştir. C) Chondroitinase ABC (CSase ABC) enzimi ile muamele edilmemiş görüntüler, KS sinyalinin spesifik olarak kondroitin moleküllerini gösterdiğini doğrulamaktadır. Ölçü belirteci 25 mikronu göstermektedir.

## Tartışma

Proteinlerin selüler ve subselüler yerleşiminin tespit edilmesi için antikorların kullanımı ve immünohistokimyasal ve immünfloresan boyamalar yaygın olarak uygulanan yöntemlerdir. Ancak *C. elegans* model organizmasında moleküler genetik teknikler antikor boyama yöntemlerinin önüne geçmektedir. Bu teknikler arasında ilgili genin Green Fluorescent Protein ile işaretlenmesi (2009 Nobel Kimya Ödülü), promotör bölgesinin veya cDNA ürünlerinin GFP ile gen füzyonları oluşturarak gözlemlenmesi en temel yaklaşımken, son gelişmeler arasında MOSSCI, CRISPR/Cas9 yöntemleri bulunmaktadır. Fonksiyon kaybına uğramadan genleri işaretleme yöntemleri geliştirilmiş olsa dahi, gen ürünlerinin direkt olarak antikorlar ile gözlemlenebilir olması protein fonksiyonlarının çalışılması açısından önem arz etmektedir. Bunun en temel sebebi genellikle gen fonksiyonlarının anlaşılması için kullanılan genetik ve moleküler analizlere ek olarak, immün işaretleme yoluyla gen ürünlerinin ifade paterni ve hücresel yerleşiminin tespitine ihtiyaç duyulmasıdır. *C. elegans* model organizmasında immün boyamalara dair en büyük sorunlardan biri kurtçukların dış yüzeyini kaplayan kütikül sebebiyle antikorların dokulara ulaşmasının zor olmasıdır.<sup>9</sup> *C. elegans*'ın dış iskeletini oluşturan ve onu dış etkenlerden koruyan, morfolojik yapısını korumasını sağlayan kütikül yapısı embriyolarda beş adet katmandan oluşmaktadır. Kütikül yapısının boyamalarda yarattığı engelin önüne geçebilmek için kullanılan yöntemlerden birisi "freeze-crack" yöntemidir. Fiksasyon solüsyonunun ve antikorun dokulara ulaşması, embriyoların sıvı azot içerisinde birkaç kez dondurulup çözülmesi vasıtasıyla sağlanabilmektedir.

Çalışmamızda, *C. elegans* embriyolarında kondroitin sülfat tayini için kullanılacak en iyi fiksasyon yöntemini araştırdığımızda, PFA ile fiksasyonun metanolle karşılaştırıldığında daha iyi sonuç verdiğini gözlemlenmiştir. Metanol membrandan lipidleri uzaklaştırıp, proteinleri çöktürerek fiksasyonu sağlamaktadır. PFA, proteinler ve lipidler arasında çapraz bağlar oluşturarak fiksasyon sağladığı için, membran yapısı korunmaktadır. KS molekülleri, hücre yüzeyinde ve ekstraselüler matrikste buldukları için, metanolün membranı modifiye edici etkisinden dolayı, KS molekülleri ve KPG embriyonik tabakasının morfolojisi metanolle ile muamele sonucu hasar görmüş olabilir.<sup>10</sup> PFA fiksasyonu otofloresan etkisinden dolayı dezavantajlı olabilmektedir. Metanol ile fiksasyon yapıldığında otofloresan etkisi az olmakla birlikte, boyamanın başarısı düşüktür. PFA ile yapılan fiksasyonda otofloresan sinyali, KS sinyalinin analiz edilmesinin önüne geçmemektedir. KS moleküllerinin morfogenez, nöronal plastisite, iskelet-kas hastalıkları ve enfeksiyonlarda rol aldığına dair bulgular ve *C. elegans*'tan memeli sitemlerine kadar evrimsel olarak korunmuş rollere sahip olmaları, bu moleküllerin analizi için *C. elegans* model organizmasının kullanılabilmesine işaret etmektedir.<sup>2,11</sup> Yakın zamanda fare modelinde yapılan çalışmalar, KS moleküllerinin perinöral net (PNN) yapılarında nöroprotektif rol oynadığını ve KS degradasyonunun psikiyatrik ve nörolojik hastalıklarda etkisi olduğunu göstermiştir.<sup>12,13</sup> Kısa yaşam döngüsü, korunmuş hücresel işlevleri ve genetik manipülasyonlara açık sistemiyle *C. elegans*, bu çalışmada optimize edilmiş KS immünfloresan boyama yöntemi ile KS fonksiyonlarını etkileyen faktörlerin araştırılması için avantajlı bir platformdur.

### Etik Standartlara Uygunluk

Çalışma etik kurul iznine tabi değildir.

### Çıkar Çatışması

Yazarların çıkar çatışması bulunmamaktadır.

### Finansal Destek

Bu çalışma kısmi olarak TÜBİTAK 114Z163 numaralı proje tarafından desteklenmiştir.

### Kaynaklar

1. Izumikawa T, Dejima K, Watamoto Y, et al. Chondroitin 4-O-Sulfotransferase Is Indispensable for Sulfation of Chondroitin and Plays an Important Role in Maintaining Normal Life Span and Oxidative Stress Responses in Nematodes. *J Biol Chem.* 2016;291(44):23294-23304. doi:10.1074/jbc.M116.757328
2. Mizuguchi S, Uyama T, Kitagawa H, et al. Chondroitin proteoglycans are involved in cell division of *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2003;423(6938):443-448. doi:10.1038/nature01635
3. Sonnhammer EL, Durbin R. Analysis of protein domain families in *Caenorhabditis elegans*. *Genomics.* 1997;46(2):200-216. doi:10.1006/geno.1997.4989
4. Sulston JE, Horvitz HR. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol.* 1977;56(1):110-156. doi:10.1016/0012-1606(77)90158-0
5. Howat WJ, Wilson BA. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods.* 2014;70(1):12-19. doi:10.1016/j.ymeth.2014.01.022
6. Duerr JS. Antibody staining in *C. elegans* using "freeze-cracking." *J Vis Exp.* 2013;(80):50664. doi:10.3791/50664
7. Hobro A, Smith N. An evaluation of fixation methods: Spatial and compositional cellular changes observed by Raman imaging. *Vib Spectrosc.* 2016;91. doi:10.1016/j.vibspec.2016.10.012
8. Chew YL, Fan X, Götz J, Nicholas HR. PTL-1 regulates neuronal integrity and lifespan in *C. elegans*. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 9):2079-2091. doi:10.1242/jcs.jcs124404
9. Yücel D. Investigations into the function and regulation of the C-terminal binding protein (CTBP-1) in *C. elegans*. 2012.
10. Kim S-O, Kim J, Okajima T, Cho N-J. Mechanical properties of paraformaldehyde-treated individual cells investigated by atomic force microscopy and scanning ion conductance microscopy. *Nano Converg.* 2017;4(1):5. doi:10.1186/s40580-017-0099-9
11. Matuszko G, Curreli S, Kaushik R, Becker A, Dityatev A. Extracellular matrix alterations in the ketamine model of schizophrenia. *Neuroscience.* 2017;350:13-22. doi:10.1016/j.neuroscience.2017.03.010
12. Suttkus A, Morawski M, Arendt T. Protective Properties of Neural Extracellular Matrix. *Mol Neurobiol.* 2016;53(1):73-82. doi:10.1007/s12035-014-8990-4
13. Donegan JJ, Lodge DJ. Hippocampal Perineuronal Nets Are Required for the Sustained Antidepressant Effect of Ketamine. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2017;20(4):354-358. doi:10.1093/ijnp/pyw095