



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Principios moleculares de maduración e integración neuronal
en el hipocampo adulto**

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de
Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Lic. Natalí Belén Rasetto

Director de tesis: Dr. Alejandro F. Schinder

Directora adjunta de tesis: Dra. Damiana Giacomini

Consejera de estudios: Dra. Lidia Szczupak

Fundación Instituto Leloir
Buenos Aires, 2024.

Principios moleculares de maduración e integración neuronal en el hipocampo

El hipocampo adulto genera nuevas células granulares (aCGs) con capacidades funcionales únicas que confieren a los circuitos preexistentes formas excepcionales de plasticidad neuronal. En el giro dentado del hipocampo de ratón, estructura donde ocurre la neurogénesis, la maduración de las aCGs requiere aproximadamente 8 semanas. Durante este tiempo, la identidad molecular, la morfología, las propiedades intrínsecas y las conexiones sinápticas emergen secuencialmente hacia un fenotipo neuronal maduro. El desarrollo de las aCGs puede dividirse en 4 fases discretas: Fase I (~1 semana): migración activa, entradas GABAérgicas despolarizantes. Fase II (~2 semanas): inicio de aferencias glutamatérgicas, fin de la migración, GABA despolarizante. Fase III (~4 semanas): alto balance excitación/inhibición, plasticidad sináptica aumentada, GABA hiperpolarizante, inhibición perisomática débil. Fase IV (6-8 semanas): maduración completa, plasticidad sináptica reducida, fuerte inhibición perisomática. En esta tesis proponemos que la neurogénesis adulta está controlada por reguladores y efectores transcripcionales específicos que modulan las propiedades morfológicas y funcionales de cada fase durante la maduración neuronal. Para estudiar esta hipótesis, empleamos una técnica precisa para aislar aCGs de diferentes edades (1,2,3,4,5,8 semanas), que nos permitió secuenciar ARN de núcleos individuales (snRNA-seq) pertenecientes a distintas cohortes neuronales. El estudio y la clusterización de los perfiles transcripcionales de 2 datasets diferentes, coincidieron en revelar una trayectoria continua desde células madres neuronales (RGL) hasta aCGs maduras, con múltiples estadios intermedios. El análisis de expresión diferencial de genes, la trayectoria de pseudotiempo, y la activación y desactivación de factores de transcripción (FTs) revelaron transiciones críticas que definen cuatro estados celulares: RGLs quiescentes, progenitores proliferativos, aCGs inmaduras y aCGs maduras. La transición a aCG madura implica un cambio transcripcional que desactiva las vías que promueven el crecimiento celular, como los FTs SoxC, y activa programas que podrían estar relacionados con el control de la homeostasis neuronal. Nuestros resultados develan los mecanismos moleculares precisos que conducen a las RGL adultas a través de la vía de la diferenciación neuronal.

Palabras clave: Neurogénesis adulta – Hipocampo - Plasticidad neuronal – Secuenciación de ARN de núcleo único – SoxC

Molecular principles of neuronal maturation and integration in the adult hippocampus

The adult hippocampus generates new granule cells (aGCs) with functional capabilities that convey unique forms of plasticity to the preexisting circuits. In the dentate gyrus of the mouse hippocampus, the site of neurogenesis, the maturation of aGCs lasts up to 8 weeks. Over this time, molecular identity, morphology, intrinsic electrical properties and synaptic connections emerge sequentially towards a mature neuronal phenotype. aGC development can be divided into 4 discrete phases: *Phase I* (~1 week): active migration, depolarizing GABA inputs. *Phase II* (~2 weeks): onset of glutamatergic inputs (glut), end of migration, depolarizing GABA. *Phase III* (~4 weeks): high excitation/inhibition balance, enhanced synaptic plasticity, inhibitory GABA but weak perisomatic inhibition. *Phase IV* (6-8 weeks): full maturation, reduced synaptic plasticity, strong perisomatic inhibition. In this thesis, we propose that adult neurogenesis is controlled by specific transcriptional regulators and effectors that modulate the morphological and functional properties of each phase. To study this hypothesis, we set up a precise technique to isolate aGCs of different ages (1,2,3,4,5,8 weeks), which allowed us to sequence RNA from individual nuclei (snRNA-seq). Transcriptional profiling from two distinct datasets revealed a continuous trajectory from neuronal stem cell (RGL) to mature aGC, with multiple immature stages bearing increasing levels of effector genes supporting growth, excitability and synaptogenesis. Analysis of differential gene expression, pseudotime trajectory, and transcription factors (TFs) revealed critical transitions defining four cellular states: quiescent RGLs, proliferative progenitors, immature aGCs, and mature aGCs. Becoming mature aGCs involved a transcriptional switch that shutdown pathways promoting cell growth, such SoxC TFs, to activate programs that likely control neuronal homeostasis. Our results unveil precise molecular mechanisms driving adult RGLs through the pathway of neuronal differentiation.

Key words: Adult neurogenesis - Hippocampus - Neuronal plasticity - single-nuclei RNA sequencing – SoxC

Agradecimientos

A mi director de tesis, **Ale Schinder**, por abrirme las puertas de su laboratorio y por guiarme en el camino de las neurociencias; por ser un gran jefe, pero especialmente por ser una gran persona. Fue un honor y una experiencia extremadamente enriquecedora haber realizado el doctorado bajo su dirección. Gracias también por haberme dado la oportunidad de formarme fuera del país; por enseñarme a escribir, pensar y hablar en ciencia, y por darme fuerzas cuando el camino se volvía difícil.

A mi co-directora, **Dami Giacomini**, por su invaluable guía, acompañamiento y paciencia. Gracias por ser más que una co-directora, por ser una verdadera compañera de trabajo, y una excelente *roommie*; por sus consejos y por alentarme cuando todo se ponía cuesta abajo.

A los integrantes del laboratorio de **Biología de Sistemas Integrativa**, **Ari Chernomoretz**, **Ari Berardino**, **Maxi** y **Tomi**, que se sumaron a este proyecto colaborando en la realización del análisis transcriptómico, y especialmente por las enriquecedoras discusiones. Trabajar con ellos fue un gran desafío y también un placer.

A la **Dra Paola Arlota** por su colaboración y predisposición para participar en este proyecto; por aceptarnos en su laboratorio para llevar adelante parte de los experimentos. Un agradecimiento especial a **Dani Di Bella**, que fue una mentora increíble, y además supo ser una guía excepcional a la distancia.

A mis compas del laboratorio, a quienes puedo llamar amigues. Es un placer ir a trabajar sabiendo que van a estar ahí para discutir un experimento, para tomar un mate, para dar un abrazo, para hacer terapia. Realmente fueron una pieza clave en esta etapa: **Viole, Andre, Soldi, Marie, Meli, Magui, Odri, Juanchi, Sato, Pau, Vero, Aye, Lu, Cris.**

Al laboratorio de **Emi**, por enriquecer esta tesis y estar siempre dispuestos a discutir los resultados. También me llevo muchos amigues de este labo: **Yanni, Facu, Mati, Sabri, Kari**

Al laboratorio de **Guille**, por sus aportes conceptuales, morales y técnicos: **Jose, Car, Cate, Abel, Lucho.**

A los miembros de mi **CST**, quienes aceptaron acompañarme estos años y cuyos aportes fueron muy valiosos: **Fer Ledda, Daiana Capdevilla y Flavio de Souza**

A la **Universidad Pública Argentina** por brindar educación gratuita y de calidad.

A los amigos que aparecieron para hacerme compañía en esta ciudad enorme; son incondicionales, indispensables y es un lujo compartir la vida con ustedes: **Guada, Anto, Hori, Cecy, Cami, Berni, Pablo, Sole, Juli, Dolo, Nel, Luqui, Valen**

A los amigos increíbles que me dejó la UNR: **Car, Dami, Delfi, Fer, Geor, Gonza, Lucia, Flor, Colo y Tuty**. A mis amigas de Salto **Vale, Eli, Caro, Jose**.

A mis abuelos, **Merchu, Ana y Oscar**. Por estar siempre, especialmente por todo su amor en forma de comida.

A mis hermanos, **Male y Genaro**. Porque todo es mejor con ustedes

A mi **Mamá** y a mi **Papá** por confiar en mí y escucharme siempre; por animarme en los momentos más difíciles. Son mi sostén y guía.

Índice

INTRODUCCIÓN	1
Estructura del hipocampo.....	2
Funciones del giro dentado	5
Neurogénesis adulta	7
Rol funcional de la neurogénesis.....	11
Estudios de transcriptómica en neurogénesis adulta.....	12
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	14
RESULTADOS	15
Capítulo 1: Perfilado transcripcional de la neurogénesis hipocampal adulta	15
Obtención de perfiles transcripcionales de la neurogénesis adulta con alta resolución temporal	15
Caracterización de los grupos celulares y análisis de su progresión temporal	19
Reproducibilidad biológica de la neurogénesis adulta en datasets independientes	25
Capítulo 2: Mecanismos moleculares que determinan la función neuronal.....	29
Distintos estados celulares en la trayectoria de célula madre a neurona madura	29
Dinámica de expresión de las moléculas efectoras que determinan la función neuronal de una célula granular del giro dentado adulto.....	34
Perfil molecular de neurotransmisión y actividad	42
Validación de marcadores transcripcionales involucrados en la diferenciación de aCGs mediante hibridación <i>in situ</i>	49
Capítulo 3: Cambios de la regulación transcripcional subyacente a la maduración neuronal	52
Reguladores transcripcionales en las transiciones de estados celulares	52
Sox4 y Sox11 en la regulación de la maduración neuronal	53
DISCUSIÓN.....	59
Caracterización transcripcional de la neurogénesis adulta: diferenciación y maduración funcional de las aCGs en el hipocampo	59

Redefiniendo la neurogénesis adulta: transiciones moleculares y heterogeneidad celular revelada por transcriptómica de célula única	61
Dinámicas moleculares de la neurogénesis adulta: estados celulares, regulones clave y homeostasis como estado final de maduración neuronal	64
Perfilado transcripcional de la neurogénesis hipocampal adulta en humanos: Desafíos metodológicos, variabilidad biológica y perspectivas clínicas	67
MATERIALES Y MÉTODOS	69
Animales	69
Disecciones de giro dentado	70
Aislamiento de núcleos y clasificación por FACS	71
10x Chromium.....	71
Procesamiento de snRNASeq	72
Determinación del pseudotiempo	74
Cascadas de expresión de FTs	74
Análisis de ontología génica	74
Visualización de gráficos	75
Regulones	75
Hibridación <i>in situ</i> de ARN	75
Producción de vectores virales.....	76
Cirugía estereotáctica	76
Perfusión y corte coronales	77
Inmunofluorescencia	77
Microscopía.....	78
Electrofisiología.....	79
Análisis estadístico.....	79
Tabla suplementaria 1	81
Anexo: edición génica de células granulares nacidas en el hipocampo adulto mediante CRISPR	82
REFERENCIAS	101

INTRODUCCIÓN

El hipocampo es crucial para procesar representaciones espaciales y desempeña diversas funciones relacionadas con adquisición, almacenamiento y evocación de memorias (Hainmueller & Bartos, 2020; Johnston & Amaral, 2004). El giro dentado del hipocampo es la compuerta de entrada principal de la información que proviene de la corteza entorinal. La estructura del hipocampo presenta una dinámica particular gracias a la existencia de células madre neurales del tipo glia radial (RGLs) en la zona subgranular del giro dentado, las cuales constantemente producen nuevas neuronas capaces de incorporarse al circuito neuronal ya establecido (Gonçalves et al., 2016; Olpe & Jessberger, 2023; Schinder et al., 2020). Las células granulares nacidas en el cerebro adulto (aCG) proporcionan un sustrato único para la plasticidad sináptica entre la vía perforante y las células granulares (CGs), así como para las conexiones entre las CGs y las células piramidales de CA3 (salida) (Adlaf et al., 2017; Sailor et al., 2017; Toni et al., 2007, 2008). En ratones adultos, las aCGs en desarrollo exhiben características funcionales distintivas hasta alcanzar la madurez, un período que puede extenderse por poco más de 8 semanas y abarca distintas etapas (Kohler et al., 2011; Schinder et al., 2020). La maduración funcional implica la disminución de la resistencia de membrana, la expresión de canales activados por voltaje, la formación de sinapsis tanto aferentes como eferentes, y el cambio de la transmisión GABAérgica de despolarizante a hiperpolarizante. A las 4 semanas de edad, las aCGs transitan un período de mayor excitabilidad y susceptibilidad a la plasticidad sináptica dependiente de actividad, el cual es crucial para el remodelado del circuito y el procesamiento de información en el giro dentado (Adlaf et al., 2017; Bergami et al., 2015; S. Ge et al., 2007; Gu et al., 2012; Jungenitz et al., 2018; Marín-Burgin et al., 2012; McHugh et al., 2022; Mugnaini et al., 2023; Restivo et al., 2015; Schmidt-Hieber et al., 2004; Toni et al., 2007, 2008). Una vez maduras, las aCGs son funcionalmente indistinguibles de las CGs nacidas durante el desarrollo perinatal (Laplagne et al., 2006, 2007). Cada etapa de la diferenciación neuronal está moldeada con precisión por la actividad y las condiciones fisiológicas de las redes neuronales locales. Los comportamientos que aumentan la actividad del giro dentado, como el ejercicio físico, la exposición a un ambiente enriquecido, el aprendizaje espacial, ejercen efectos moduladores positivos sobre el nicho neurogénico, mientras que otras condiciones como el envejecimiento, la inflamación o la neurodegeneración, suelen ser perjudiciales para la neurogénesis (Gonçalves et al., 2016).

Estructura del hipocampo

La formación hipocampal está compuesta por cuatro estructuras corticales principales: el giro dentado, el hipocampo en sí mismo dividido en las subregiones CA1, CA2 y CA3 (cornu ammonis), el complejo subicular que incluye el subículo, parasubículo y presubículo, y finalmente la corteza entorinal, la cual se divide (en roedores) en las regiones lateral y medial. La forma tridimensional del hipocampo es compleja, con un eje longitudinal que se curva formando una estructura en "C", extendiéndose desde el septum en la parte dorso-rostral hasta la región temporal ventro-caudal del cerebro, conocido como eje "septo-temporal" en roedores (Amaral & Witter, 1989) (Figura 1). En primates, este eje rota 90° rostro caudalmente debido al mayor desarrollo de los lóbulos frontal y temporal.

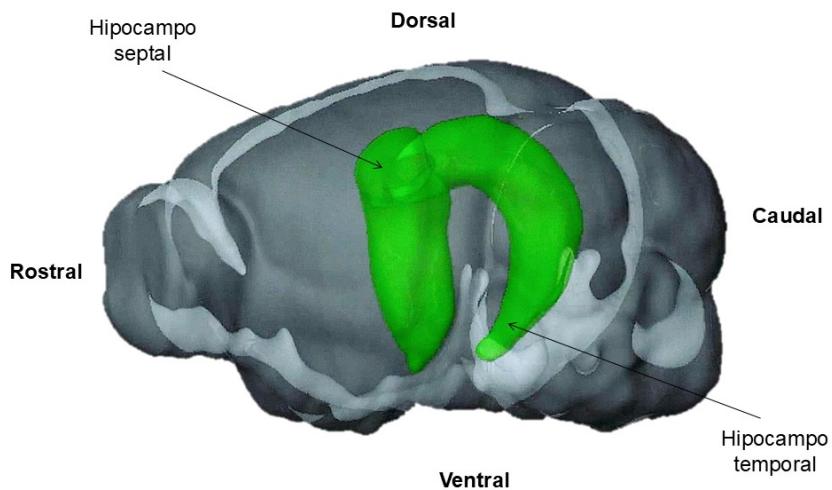


Figura 1. Anatomía 3D del hipocampo El eje longitudinal se extiende desde el septum (dorso-rostral) hacia la región temporal (ventro-caudal) del cerebro. Esta figura se ha creado utilizando el programa Allen Brain Explorer [<https://mouse.brainmap.org/static/brainexplorer>].

En un corte transversal, el giro dentado murino forma una estructura con forma de "V" que se encuentra envolviendo la región proximal de CA3 (Figura 2). Esta estructura puede ser subdividida en 3 regiones: capa granular, capa molecular y hilus. La capa granular corresponde al estrato medio, que en roedores está formada por 6 a 8 hileras de somas de CGs densamente empaquetadas. Cada porción de la "V" se denomina capa suprapyramidal o infrapyramidal, dependiendo de su posición respecto a CA3, y su extremo se llama cresta o vértice. Las CGs muestran un árbol dendrítico con forma de cono, cuyas dendritas proyectan hacia la capa molecular, la zona más superficial del giro dentado. Esta capa contiene principalmente axones de la vía

perforante que se originan en la corteza entorinal y forman sinapsis con las dendritas de las CGs. También contiene interneuronas GABAérgicas y fibras aferentes de los contactos externos al giro dentado. El hilus es la región interna delimitada por la capa granular, que contiene los axones de las CGs, diversos tipos de interneuronas GABAérgica, y células mossy que son interneuronas glutamatérgicas.

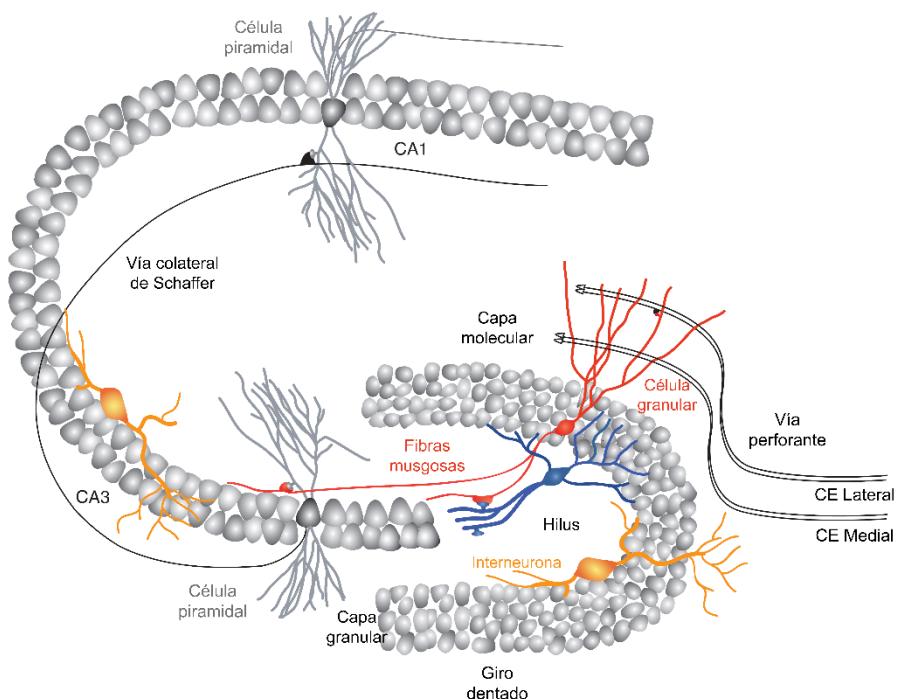


Figura 2. Sección transversal de hipocampo mostrando las conexiones circuitales entre el giro dentado y las regiones CA3 y CA1. En gris se muestran las células que componen la capa granular del giro dentado, CA3 y CA1. Los tipos celulares de cada región y las conexiones entre ellas se especifican en cada caso. Tomado y modificado de Toni & Schinder 2015.

El principal input glutamatérgico hacia el giro dentado llega a través de la vía perforante desde la corteza entorinal. Distintas áreas de la corteza entorinal proyectan e inervan diferentes porciones de las CGs. La corteza entorinal medial (capa II, con alguna contribución de las capas III, V y VI) contactan el tercio medio del árbol dendrítico de las CGs, mientras que las proyecciones de la corteza entorinal lateral contactan el tercio externo de esas dendritas (Toni & Schinder, 2015; van Strien et al., 2009). Las dendritas del tercio interno de la capa molecular son inervadas principalmente por las fibras comisurales y de asociación provenientes de las células mossy glutamatérgicas del hilus ipsilateral y contralateral (Buckmaster et al., 1992; Frotscher et al., 1991). Las CGs maduras exhiben ~2 espinas por μm^2 (evaluado por microscopía confocal), y cada

una recibe unos 4000 a 6000 contactos glutamatérgicos (Claiborne et al., 1990; Desmond & Levy, 1985; Toni & Schinder, 2015).

Las CGs también reciben contactos provenientes de varios tipos de interneuronas GABAérgicas (Freund & Buzsáki, 1996; Han et al., 1993; Hosp et al., 2014; Houser, 2007). Entre éstas se incluyen las células “basket” que se localizan en la zona subgranular y contactan principalmente el segmento inicial del axón de las CGs y sus dendritas proximales en la capa molecular. Además de liberar GABA, estas interneuronas expresan la proteína de unión a Ca⁺⁺ parvalbúmina, y se las llama así debido al patrón con forma de canasta (basket) que forman alrededor de los somas de las CGs. Las principales interneuronas del hipocampo expresan parvalbúmina o somatostatina (Hosp et al., 2014; Kepcs & Fishell, 2014). Las interneuronas parvalbúmina representan casi el ~30% de esta población y sus axones se dirigen a compartimentos perisomáticos de neuronas postsinápticas (Freund & Buzsáki, 1996). Además, son las que muestran el mayor grado de conectividad en el giro dentado (Espinoza et al., 2018). Por su parte, las interneuronas somatostatina representan ~50% de las interneuronas GABAérgicas y se dirigen principalmente a compartimentos dendríticos de células postsinápticas.

Las CGs proyectan sus axones (fibras musgosas, por “mossy fibers”) a través del hilus hasta la región CA3, contactando las células piramidales con su característico terminal grande e irregular. Las sinapsis de las fibras musgosas son escasas; cada célula piramidal de CA3 es contactada por menos de 50 CGs (Amaral et al., 1990). Sin embargo, los terminales de las fibras musgosas son muy efectivos activando sus blancos piramidales (Henze et al., 2002). Las fibras musgosas también tienen colaterales (~6-7 por fibra) que inervan a las células “mossy” y a las interneuronas GABAérgicas a través de terminales pequeños denominados filopodios (Acsády et al., 1998). Cada CG posee unas 160 a 200 varicosidades axonales a través de sus colaterales y ~20 terminales de fibras musgosas, formando un circuito disináptico consistente en fibra musgosa - Interneurona GABAérgica - célula piramidal, que subyace la potente inhibición de “feed-forward” que regula la excitabilidad del área (McBain et al., 2008).

Las neuronas piramidales de CA3 establecen conexiones recurrentes esenciales para formar una red autoasociativa crucial en el almacenamiento de las representaciones sensoriales (Marr et al., 1971; Rolls et al., 1998). La mayoría de las sinapsis en estas neuronas provienen de las fibras colaterales de otras neuronas piramidales de CA3. La información aferente llega principalmente desde la corteza

entorrinal, que proyecta directamente hacia CA3 e indirectamente a través del giro dentado (Andersen PO et al., 2007). Finalmente, las neuronas de CA1 integran la información proveniente de CA3 y de la capa III de la corteza entorrinal, y proyectan sus axones nuevamente hacia la corteza entorrinal a través del subículo.

Funciones del giro dentado

El hipocampo de los mamíferos se ha descripto como una región de la corteza cerebral involucrada en aprendizaje y memoria; sin embargo, se ha especulado mucho sobre la función del giro dentado. Las principales teorías se basan en la generación de distintos patrones de actividad por parte de las neuronas del giro dentado y se dividen según las funciones que le atribuyen a este durante el aprendizaje y la formación de memoria (Tabla 1) (Borzello et al., 2023).

Teoría	Función	Mecanismos
Separación de patrones	Crea un código distinto a nivel de población neuronal para entradas similares	Ortogonalización de las conexiones de entrada
Asociación	Une la información sensorial entrante	Convergencia de las entradas de corteza entorrinal lateral y medial
Detección de novedad	Crea poblaciones neuronales con distinto nivel de actividad ante nuevas experiencias	Conexiones Neuromodulatorias
Engrama	Selecciona una población que se reactiva ante determinada experiencia	Modificaciones sinápticas de larga duración
Indexación	Proporciona índices únicos (por ejemplo, engramas) para los recuerdos almacenados en la corteza	Integración a largo plazo de aCGs
Etiquetado temporal	Proporciona una población neuronal selectiva a experiencias temporalmente próximas	Maduración e integración a largo plazo de aCGs

Tabla 1: Principales teorías sobre las funciones del giro dentado (modificado de Borzello et al, 2023)

Debido a la elevada divergencia en la conectividad entre neuronas de la corteza entorrinal y las CGs, se hipotetizó que el giro dentado estaría encargado de llevar a cabo una ortogonalización de la información proveniente desde la corteza entorrinal. De esta forma se generarían representaciones disímiles a partir de estímulos altamente

correlacionados (pero sutilmente distintos), en un proceso denominado *separación de patrones* (Treves et al., 2008). En concordancia con esta hipótesis, registros electrofisiológicos de actividad en neuronas únicas de la capa granular de animales en comportamiento muestran que las CGs presentan una activación muy escasa y dispersa en condiciones fisiológicas (Piatti et al., 2013).

El giro dentado también se ha considerado un área del cerebro donde convergen flujos información, lo que sugiere que desempeña un papel en la *asociación* de la información sensorial. Las entradas entorriales al giro dentado pueden dividirse en las de la corteza entorinal medial (información de contenido) y lateral (información de contexto). La actividad diferencial de la corteza entorinal medial y lateral en animales en movimiento libre sugiere que estas regiones pueden procesar diferente tipo de información, proponiendo al giro dentado como un lugar de asociación (Doan et al., 2019; Knierim et al., 2006, 2014; Lee & Jung, 2017; Neunuebel et al., 2013; Nilssen et al., 2019).

La teoría de *detección de novedades*, postula que el giro dentado ejerce gran influencia en las redes rio abajo cuando hay exposición a nuevas experiencias o se necesita incorporar nueva información a experiencias previas (Sokolov & Vinogradova, 1975). Se ha demostrado que neuromoduladores, como la norepinefrina y la acetilcolina influyen en las CGs y células mossy durante nuevas experiencias, a través de mecanismos que regulan su balance excitación/inhibición (Harley et al., 2007; Hofmann & Frazier, 2010; Ogando et al., 2021; Prince et al., 2016; Straube et al., 2003).

La teoría del *engrama* propone que el giro dentado genera cambios físicos duraderos en el cerebro que favorecen el recuerdo. Estas modificaciones de sinapsis de largo plazo suceden a través de procesos bioquímicos y fisiológicos locales durante el aprendizaje (Josselyn et al., 2015). Varios estudios han demostrado que la reactivación de subpoblaciones de CGs, que se activaron durante una experiencia inicial, es suficiente para reactivar redes neuronales rio abajo e impulsar expresiones conductuales de la memoria (por ejemplo, “Freezing” en respuesta al miedo aprendido a un entorno) (Denny et al., 2017; Hainmueller & Bartos, 2020; Lacagnina et al., 2019; Sun et al., 2020).

La teoría de la *indexación* propone un papel único para el giro dentado gracias a la neurogénesis adulta (Miller & Sahay, 2019). Dado que las neuronas inmaduras nacidas en la edad adulta atraviesan un período de mayor excitabilidad intrínseca y plasticidad sináptica, las aCGs potenciarían las conexiones generadas durante su desarrollo y tendrían una actividad selectiva a instancias de estas experiencias (Gu et

al., 2012; Marín-Burgin et al., 2012; Mongiat et al., 2009; Schmidt-Hieber et al., 2004; Tashiro et al., 2007). También se postula que el giro dentado incorpora información temporal debido a la continua generación de cohortes de aCGs (Aimone et al., 2006, 2009). Nuevamente, la hiperexcitabilidad transitoria de las aCGs resultaría en una población de células inmaduras que se activa ante acontecimientos temporalmente próximos. El recambio constante y el desarrollo fisiológico de las aCGs mejoraría la capacidad de involucrar a distintas poblaciones de neuronas en experiencias que ocurren distantes en el tiempo.

Neurogénesis adulta

La neurogénesis adulta ocurre en la zona subgranular, región ubicada entre el hilus y la capa granular y donde se localizan las células madres neuronales del tipo de la glía radial (RGLs). Estas células expresan los marcadores nestina y Sox2 y proyectan un solo proceso apical que cruza toda la capa granular y se ramifica en la primera porción de la capa molecular (Bonaguidi et al., 2011; Encinas et al., 2011). Las RGLs dan origen a las células progenitoras neuronales (CPNs) que poseen capacidad proliferativa, y morfológicamente presentan procesos apicales cortos. Las CPNs comienzan a expresar marcadores neuronales inmaduros como doublecortin (proteína asociada a microtúbulos, DCX) y la molécula de adhesión celular neural polisialilada PSA-NCAM. Las CPNs dan lugar a los neuroblastos, los cuales finalmente dan origen a neuronas (Amaral et al., 2007; Bonaguidi et al., 2012; Izquierdo et al., 1991; Toni & Schinder, 2015).

El desarrollo neuronal en el hipocampo adulto recapitula el desarrollo perinatal, aunque a un ritmo más lento. En el modelo murino de ratón, las aCGs necesitan más de 8 semanas para madurar. Durante este tiempo, la identidad molecular, la morfología, las propiedades eléctricas intrínsecas y las conexiones sinápticas emergen secuencialmente hasta alcanzar un fenotipo neuronal maduro que es indistinguible de las CGs generadas en el desarrollo (Espósito et al., 2005; Laplagne et al., 2006; Marín-Burgin et al., 2012; Mongiat et al., 2009; Piatti et al., 2011). Las neuronas nuevas se integran a los circuitos locales preexistentes. En este lento proceso de desarrollo, se generan distintos estadios neuronales que permiten distinguir funcionalmente las aCGs de las CGs maduras. Las características morfológicas y electrofisiológicas que surgen a lo largo de las 8 semanas de maduración permitieron postular un desarrollo que comprende 4 etapas definidas (Figura 3):

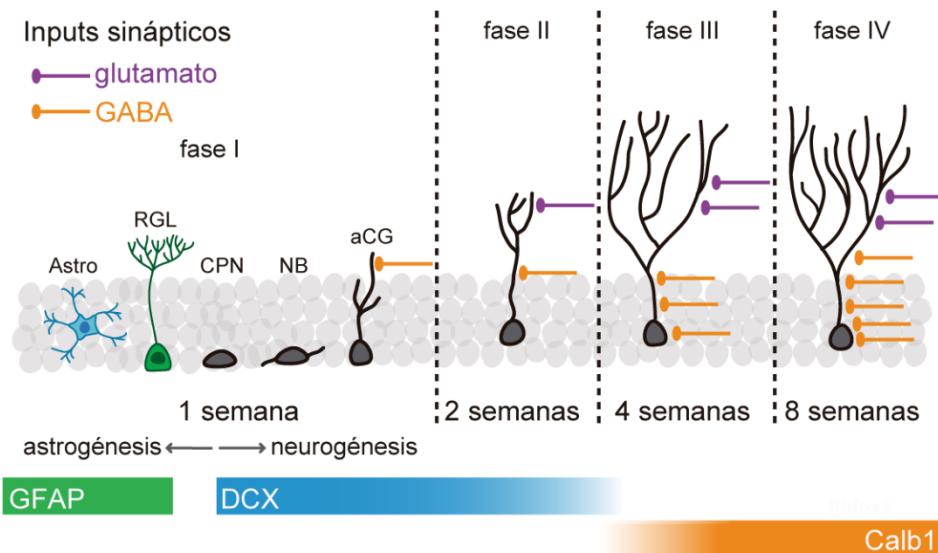


Figura 3. Desarrollo de neuronas nacidas en el giro dentado adulto. Diagrama de las fases del desarrollo neuronal desde células madre neuronales de tipo glía radial (RGL) hasta célula granular madura (aCG), pasando por neuroblasto (NB) y progenitor neuronal (CPN). Los esquemas de axones denotan la inhibición dendrítica o somática de aferentes GABAérgicos (naranja) y la excitación glutamatérgica (violeta). Las barras de color denotan la expresión de GFAP (linaje astrocítico), DCX y Calb1 (linaje neuronal).

La sinaptogénesis GABAérgica dendrítica aferente se produce durante la primera semana, conectando las aCGs con el circuito (**Fase I**). Durante esta fase las neuronas nuevas adquieren fenotipo neuronal, migran una corta distancia en la capa granular, reciben aferencia GABAérgica tónica (mediada por el GABA libre del ambiente extracelular) y de contacto directo (Song et al., 2013). También comienzan a generar las primeras proyecciones dendríticas y axonales. El marcador neuronal que expresan es DCX, una proteína asociada a microtúbulos que se expresa durante la migración neuronal y se utiliza como marcador molecular de inmadurez neuronal. En esta etapa del desarrollo, el cloro (Cl^-) juega un papel muy importante ya que su concentración intracelular es alta debido a la expresión del co-transportador de $\text{Cl}^-/\text{Na}^+/\text{K}^+$ NKCC1. NKCC1 cataliza la entrada de Cl^- y K^+ a favor del gradiente de Na^+ . Cuando se activan los receptores GABA se genera una despolarización de la membrana, por lo que GABA es excitatorio en las aCGs nuevas de 1-2 semanas de edad. La alta resistencia de la membrana combinada con GABA despolarizante promueven el crecimiento celular y la sinaptogénesis glutamatérgica (**Fase II**) (Chancey et al., 2013; S. Ge et al., 2006). Luego de la segunda semana comienza a expresarse el cotransportador de Cl^-/K^+ KCC2, el cual extruye Cl^- hacia el medio extracelular. Este proceso disminuye la concentración intracelular de Cl^- y, de esta manera, GABA pasa a ser hiperpolarizante (S. Ge et al., 2006). Además, en esta etapa las dendritas comienzan a crecer a lo largo de la capa molecular, alcanzando las aferencias de los axones que provienen de la corteza

entorrinal, generando un aumento en las conexiones excitatorias glutamatérgicas y se observan las primeras espinas dendríticas (Espósito et al., 2005; S. Ge et al., 2006). También extienden sus axones hacia el hilus donde se conectan con sus targets, principalmente las interneuronas GABAérgicas, las células mossy y las células piramidales de CA3 (Zhao et al., 2006). Las CGs liberan glutamato sobre sus células target (Toni et al., 2008). En resumen, durante la **Fase III** el número de aferencias glutamatérgicas aumenta y el efecto de GABA cambia de excitatorio a inhibitorio, pero las sinapsis permanecen inmaduras y la resistencia de membrana alta. Especialmente en la **Fase III**, la inhibición perisomática presenta una cinética de activación lenta, lo cual se traduce en alta excitabilidad de las aCGs. Es por este motivo que las aCGs nuevas e inmaduras presentan un balance excitación/inhibición aumentada, son más fácilmente reclutables, pero más inespecíficas frente a estímulos aferentes (Groisman et al., 2023; Marín-Burgin et al., 2012; Schinder et al., 2020). A su vez, presentan una combinación de alta resistencia de membrana, madurez de la excitabilidad y un alto grado de plasticidad sináptica dependiente de actividad (LTP) (Espósito et al., 2005; S. Ge et al., 2007; Gu et al., 2012; Mongiat et al., 2009; Schmidt-Hieber et al., 2004). Una posible consecuencia fisiológica de la marcada plasticidad sináptica es que podría otorgar a las neuronas nuevas ventajas para competir con las neuronas maduras por la formación y estabilización de sinapsis aferentes (competencia por los axones que provienen de la vía perforante) y eferentes (Tashiro et al., 2006; Toni et al., 2007, 2008). Estas propiedades permiten que las neuronas nuevas jóvenes integradas contribuyan de una manera única al procesamiento de la información del circuito (Marín-Burgin et al., 2012; Mugnaini et al., 2023). En este lapso las aCGs dejan de expresar DCX y comienzan a expresar Calbindin (Calb1), una proteína que participa del buffer de calcio intracelular, y que se utiliza como marcador de madurez neuronal. El paso final en la integración sináptica es alcanzado con la maduración de sinapsis perisomáticas GABAérgicas, que son inhibitorias y de cinética rápida, controlando de manera eficaz la tasa de disparo de potenciales de acción de las aCGs (**Fase IV**) (Espósito et al., 2005). Al llegar a un fenotipo neuronal maduro, las aCGs nuevas poseen propiedades eléctricas y morfológicas similares a las generadas durante el desarrollo perinatal (Laplagne et al., 2006).

El tiempo de desarrollo descrito corresponde al hipocampo septal en ratones adultos jóvenes. En el giro dentado temporal, las aCGs se desarrollan más lentamente. Sin embargo, su maduración puede acelerarse mediante estímulos que aumentan la actividad eléctrica local (Alvarez et al., 2016; Piatti et al., 2011; Snyder et al., 2012). Se demostró que las aCGs nuevas se desarrollan más rápidamente cuando los ratones

realizan ejercicio voluntario (correr en una rueda) o exposición un ambiente enriquecido. La exploración de un ambiente enriquecido activa el circuito local del giro dentado, promoviendo el crecimiento dendrítico y la sinaptogénesis de las aCGs inmaduras a través un loop disináptico depolarizante mediado por de las interneuronas que expresan parvalbúmina. El silenciamiento de estas interneuronas suprime por completo los efectos de integración acelerada por la exposición a un ambiente enriquecido en las aCGs en desarrollo (Alvarez et al., 2016).

Así como existen estímulos que aumentan la tasa neurogénica o aceleran el desarrollo de las aCGs, se demostró que ciertas condiciones pueden impactar de manera negativa estos procesos. El envejecimiento afecta a la integridad fisiológica de células, tejidos y órganos, y constituye un principal factor de riesgo de trastornos neurodegenerativos como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson (Guarente et al., 2014; Irwin et al., 2013; Mattson et al., 2012). Incluso en el cerebro sano, el envejecimiento suele afectar las capacidades cognitivas, la velocidad de procesamiento de la información y la formación y retención de la memoria. En el hipocampo envejecido, el número de sinapsis excitatorias disminuye y las conexiones pierden la capacidad de experimentar plasticidad dependiente de la actividad (Burke & Barnes, 2010; Fan et al., 2017). La neurogénesis hipocampal también disminuye con la edad, debido a una reducción de la capacidad de autorrenovación de las RGLs, así como a una menor supervivencia de las aCGs (Beckervordersandforth et al., 2017; Corenblum et al., 2016; Encinas et al., 2011; Kempermann et al., 1998; Knobloch et al., 2013; Kuhn et al., 1996; Kuipers et al., 2015; Moore et al., 2015; Morgenstern et al., 2008). Recientemente se ha demostrado que el desarrollo y la integración funcional de las aCGs se produce a un ritmo mucho más lento en el cerebro de ratones envejecidos en comparación a lo descripto en adultos jóvenes. Así, las aCGs de tres semanas de edad en ratones de mediana edad (8 a 12 meses) muestran propiedades que son típicas de la fase I, en lugar de la fase III (Trinchero et al., 2017). Sin embargo, el ejercicio voluntario reveló un notable potencial de plasticidad en las aCGs. Las aCGs de ratones envejecidos que corrieron de manera crónica reestablecieron la longitud dendrítica, la densidad de espinas y las propiedades eléctricas típicas de las aCGs en animales adultos jóvenes (Trinchero et al., 2017).

La persistencia de la neurogénesis hipocampal adulta en el cerebro humano es un tema de amplio debate (Duque et al., 2022; Kempermann et al., 2018; Liu, 2022; Lucassen et al., 2020; Moreno-Jiménez et al., 2021; Paredes et al., 2018; Terreros-Roncal et al., 2023). Los primeros estudios que mostraron evidencia de células en división en el giro dentado humano adulto, empleaban 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU)

o datación neuronal con carbono-14 (14C). Estas marcas indelebles se detectaron en tejido postmortem y sugirieron la existencia de poblaciones neuronales nuevas en el hipocampo adulto (Eriksson et al., 1998; Spalding et al., 2013). Los estudios inmunohistoquímicos que buscan detectar marcadores específicos para progenitores neuronales, neuroblastos y neuronas inmaduras han reportado resultados contrapuestos (Cipriani et al., 2018; Dennis et al., 2016; Moreno-Jiménez et al., 2019; Sorrells et al., 2018; Tobin et al., 2019). Se ha demostrado que varios factores metodológicos y de tratamiento de tejido pueden explicar estos resultados opuestos (Kempermann et al., 2018; Lucassen et al., 2020). Por lo tanto, identificar poblaciones neurogénicas y su alcance funcional en el cerebro humano adulto sano, durante el envejecimiento, y ante enfermedades neurodegenerativas sigue siendo un desafío. Los resultados presentados en esta tesis aportarán evidencia fundamental para resolver esta controversia.

Rol funcional de la neurogénesis

La evidencia más convincente del rol que cumplen las aCGs en procesos asociados con aprendizaje y memoria, proviene de experimentos en los cuales se ha eliminado o reducido la neurogénesis, o bien se ha silenciado eléctricamente a las aCGs (Gu et al., 2012; Lods et al., 2021). Para este fin se utilizaron métodos tales como irradiación, agentes antimitóticos e inducción de genes proapoptóticos (Aimone et al., 2011; Ming & Song, 2011; Sahay et al., 2011).

La eliminación de la neurogénesis por agentes antimitóticos reveló impedimentos en estrategias de aprendizaje para ratones evaluados en un Morris Water Maze (test de aprendizaje espacial (Garthe et al., 2009). En experimentos donde se eliminó aproximadamente el 50 % de la neurogénesis mediante la infección de las aCGs con un lentivirus que expresa una versión dominante negativo del gen Wnt (gen proneural), se encontró que los ratones no podían distinguir entre dos ambientes similares (Clelland et al., 2009; Lie et al., 2005). Este resultado resalta el rol de la neurogénesis adulta en la discriminación espacial o separación de patrones.

En otro trabajo, se generó un ratón transgénico en el que se induce selectivamente la muerte de precursores neurales mediante la sobreexpresión de la proteína pro-apoptótica Bax. Estos ratones fueron evaluados en el Morris Water Maze, y se observó que, solo podían resolver una tarea de baja demanda cognitiva (lugar de inicio del test fijo todos los días). Estos ratones no lograban cumplir la tarea cuando la

demandas cognitivas aumentaba (lugar de inicio del test variable) (Dupret et al., 2008). De este modo, quedó demostrado que la neurogénesis adulta es necesaria para resolver paradigmas de aprendizaje espacial que exigen una cierta demanda cognitiva.

En 2011, Sahay y colaboradores desarrollaron un modelo murino con la capacidad de expandir la población de neuronas generadas en la adultez mediante el incremento de su supervivencia. Este enfoque resultó en una mejora significativa en el rendimiento de los animales durante una tarea cognitiva que implicaba la diferenciación entre contextos similares. Dichos resultados sugieren una optimización en la capacidad de separación de patrones, destacando la influencia de la neurogénesis adulta en procesos de discriminación contextual (Sahay, Scobie, et al., 2011).

Queda demostrado entonces que la neurogénesis adulta cumple un rol fundamental en la formación y consolidación de memorias espaciales dependientes de hipocampo.

Estudios de transcriptómica en neurogénesis adulta

Hasta la llegada de la transcriptómica de célula única, la herramienta por excelencia para estudiar diversas características moleculares de las RGL adultas y su progenie fue la identificación y el análisis de expresión de proteínas mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Aunque este enfoque tradicional ha sido extremadamente constructivo e informativo, su principal limitación reside en que la detección tiende a ser todo o nada y además se limita a analizar la presencia de proteínas para las cuales existen anticuerpos.

Por el contrario, la elaboración de perfiles transcripcionales mediante la secuenciación de ARN unicelular (scRNA-seq) permite revelar poblaciones celulares distintas, rastrear las trayectorias de linajes celulares durante el desarrollo, descubrir nuevos genes que impulsan la maduración, y las relaciones o interacciones regulatorias entre genes (Armand et al., 2021; Cardona-Alberich et al., 2021; Zeisel et al., 2015). La secuenciación de ARN de aCGs representa un desafío experimental a nivel del aislamiento celular, ya que estas neuronas constituyen una población minoritaria en el giro dentado. Por lo tanto, es necesario utilizar un método confiable de marcado y purificación para evitar la contaminación con CGs maduras que se han desarrollado en el periodo embrionario o perinatal.

En los últimos años, varios trabajos han intentado abordar el proceso neurogénico desde una perspectiva transcripcional. Sin embargo, los diseños

experimentales empleados no permitieron capturar todas las fases de la neurogénesis adulta (Kalinina & Lagace, 2022). En 2015, J. Shin y colaboradores, se valieron de ratones transgénicos Nestin-CFPnuc para marcar específicamente los núcleos de las RGLs y su progenie temprana y así obtener, transcriptomas de células únicas. En este trabajo lograron describir las cascadas moleculares que subyacen al grupo de RGLs inactivas o quiescentes, que inician su activación celular y el comienzo de la neurogénesis adulta (Shin et al., 2015). Habib y colaboradores extendieron el lapso de tiempo experimental estudiado neuronas de hasta 2 semanas de edad (Habib et al., 2016). Ambos trabajos sugieren que durante los primeros 14 días, el proceso de neurogénesis adulta sigue una trayectoria de progresión molecular continua. Esto significa que las células proyectadas en un espacio de expresión transcripcional se distribuyen siguiendo un recorrido que refleja las distintas fases del desarrollo. Finalmente, Hochgerner y colaboradores., realizaron un estudio a mayor escala en ratones perinatales, juveniles y adultos (Hochgerner et al., 2018). Su enfoque experimental no implicaba el aislamiento de aCGs nuevas, sino que se secuenció un gran número de células del giro dentado de ratones de distintas edades. Esto dio como resultado un perfil molecular de pocas aCGs. Su principal hallazgo demuestra una transformación durante la neurogénesis perinatal del giro dentado, donde durante la segunda semana posnatal, las RGL cambian su configuración bruscamente pasando de un estado progenitor embrionario activo hacia un estado de célula madre adulto más quiescente.

Los trabajos descriptos anteriormente muestran esfuerzos llevados a cabo para caracterizar los mecanismos moleculares involucrados en las distintas etapas de la neurogénesis adulta. Sin embargo, ninguno logró abarcar el proceso de manera aislada y en su totalidad. Por ello, para comprender en profundidad los mecanismos moleculares que guían a las aCGs a lo largo de las distintas etapas de su desarrollo, resulta crucial realizar un estudio con un nivel de resolución temporal y de especificidad del tipo celular que permita investigar en profundidad el recorrido detallado que realiza una RGL hasta convertirse en aCG madura en el hipocampo adulto.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En base a la evidencia experimental anteriormente expuesta esta tesis propone la siguiente hipótesis: “*las transiciones del desarrollo responden a programas moleculares distintivos que se activan secuencialmente en las aCGs. Por lo tanto, el proceso de neurogénesis adulta está controlado por reguladores y efectores transcripcionales que modulan las principales propiedades morfológicas y funcionales de cada estadio durante la maduración neuronal*”.

El **objetivo general** del proyecto es dilucidar los programas genéticos del desarrollo de las neuronas nuevas nacidas en el hipocampo adulto mediante estudios de transcriptoma de células individuales. Además, estudiar la relevancia biológica de moléculas candidatas involucradas en su maduración e integración mediante sobreexpresión y edición génica.

Los **objetivos específicos** son:

1. Obtener el perfil transcripcional completo del proceso neurogénico, desde su inicio como célula madre neuronal (RGL) hasta la maduración funcional, secuenciando neuronas de distintas edades nacidas en el giro dentado adulto
2. Validar la expresión de moléculas identificadas como marcadores moleculares de los distintos estadios del desarrollo mediante hibridación *in situ*
3. Realizar un análisis funcional de moléculas identificadas por análisis bioinformáticos, que sugieren un papel clave en alguna etapa del desarrollo neuronal, mediante sobreexpresión o edición génica.

RESULTADOS

Capítulo 1: Perfilado transcripcional de la neurogénesis hipocampal adulta

Obtención de perfiles transcripcionales de la neurogénesis adulta con alta resolución temporal

Con el objetivo de obtener el perfil transcripcional del proceso neurogénico en el hipocampo de ratón adulto, utilizamos una estrategia para identificar neuronas en desarrollo derivadas de RGLs, que expresan el gen proneural Achaete-scute homolog 1 (*Ascl1*) (Bottes et al., 2021; Kim et al., 2007; Yang et al., 2015). Se utilizaron ratones jóvenes adultos dobles transgénicos, *Ascl1*^{CreERT2};CAG^{floxStopSun1sfGFP}, para inducir la expresión de Sun1-sfGFP en la membrana nuclear de las RGLs tras la administración de tamoxifeno (Figura 4) (Mo et al., 2015). La etiqueta fluorescente permanece indeleble en la progenie de RGLs. Esta marcación nos permitió aislar aCGs nuevas en distintos estadios de desarrollo, desde la diferenciación temprana hasta la maduración funcional a las 8 semanas, y así analizar el proceso neurogénico en su totalidad.

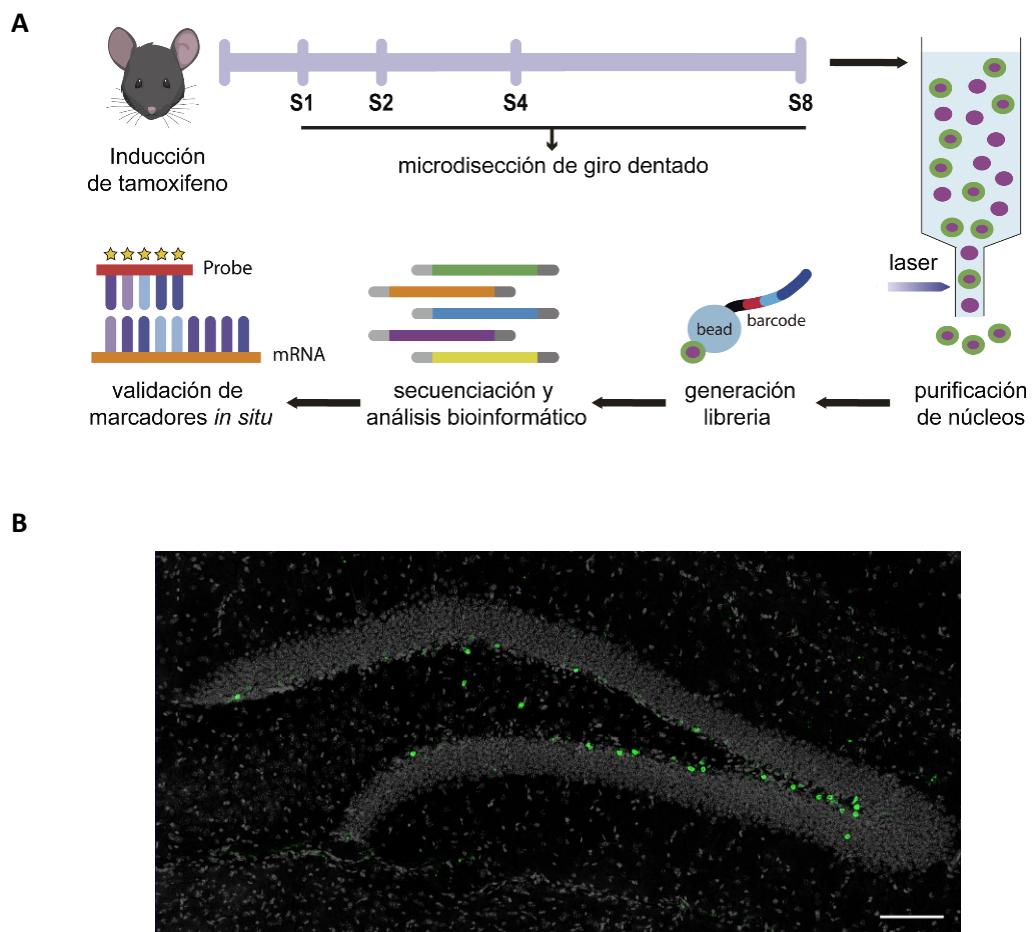


Figura 4. (A) Diseño experimental. Los ratones *Ascl1CreERT2;CAG^{floxStop-Sun1/sfGFP}* recibieron inyecciones de tamoxifeno (TAM) para marcar fluorescente e indeleblemente núcleos de la progenie de RGLs y CPNs. Los giros dentados se microdisectaron en los momentos indicados (cohortes). Cada cohorte de núcleos GFP+ se purificó mediante FACS (sorter de células activado por fluorescencia) y se procesaron en 10x Chromium para la preparación de bibliotecas de ADNc y su secuenciación. Los marcadores identificados por el análisis bioinformático se validaron mediante hibridación fluorescente *in situ*. **(B)** Núcleos de neuronas nuevas que expresan GFP. La imagen confocal muestra un giro dentado con núcleos marcados con Sun1/sfGFP de 2 semanas de edad. Barra de escala: 100 μm.

El primer conjunto de datos (dataset 1) se obtuvo microdisectando giros dentados de ratones, luego de la inducción con tamoxifeno, a las semanas 1, 2, 4 y 8 (cohortes S1 a S8, 4 ratones/cohorte). Los núcleos de las neuronas nuevas se aislaron mediante la técnica de FACS (fluorescent activated cell sorting), seleccionando aquella población de núcleos que presentaba fluorescencia GFP+ y RUBY+ (molécula fluorescente de unión a ADN) (Figura 5). Para la secuenciación de ARN de núcleo único (snRNA-seq) de alto rendimiento se utilizó la tecnología de expresión génica de extremo 3' para célula única Chromium 10X Genomics. Esto permitió obtener el perfil transcripcional de 14.367 núcleos con una media de 2.994 genes/núcleo, pertenecientes a las cuatro cohortes (S1, S2, S4 y S8; Figura 6).

Con el fin de representar de manera eficiente la gran cantidad de datos obtenidos, se hace imprescindible el uso de algoritmos de reducción de dimensionalidad. Un ejemplo de ello es la técnica de incrustación de vecinos estocásticos distribuidos en t (t -SNE), la cual permite ordenar los núcleos, representados como puntos en el gráfico, dentro de un espacio transcripcional en función de su similitud. En la Figura 6, se muestran cuatro gráficos t -SNE que destacan la localización de los núcleos de cada cohorte específica (en azul), en relación a todos los núcleos del dataset 1. Estos mapas visuales revelan que los núcleos de las diferentes cohortes se agrupan en una secuencia continua, organizada de acuerdo con la edad neuronal (Figura 6).

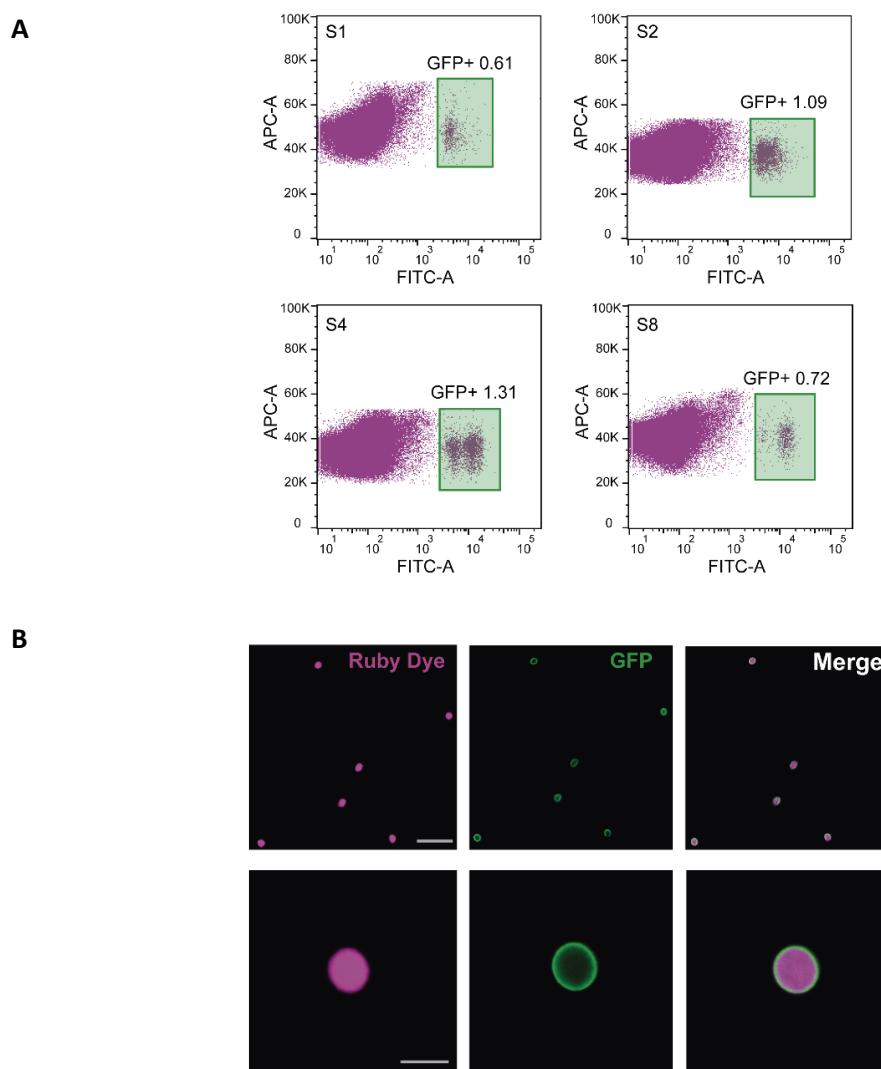


Figura 5. Purificación de núcleos Ruby+/GFP+. (A) Gráficos de densidad de puntos de la intensidad de la fluorescencia del colorante Ruby vs. log(intensidad de la fluorescencia de GFP) para purificar núcleos aislados en S1, S2, S4 y S8. Los recuadros verdes resaltan la población GFP+/Ruby+, y el número indica el % de núcleos GFP+ en la población total. (B) Imágenes confocales de núcleos Ruby+, purificados por FACS muestran GFP anclada a la membrana nuclear. Barras de escala: 50 μ m (paneles superiores) y 10 μ m (paneles inferiores).

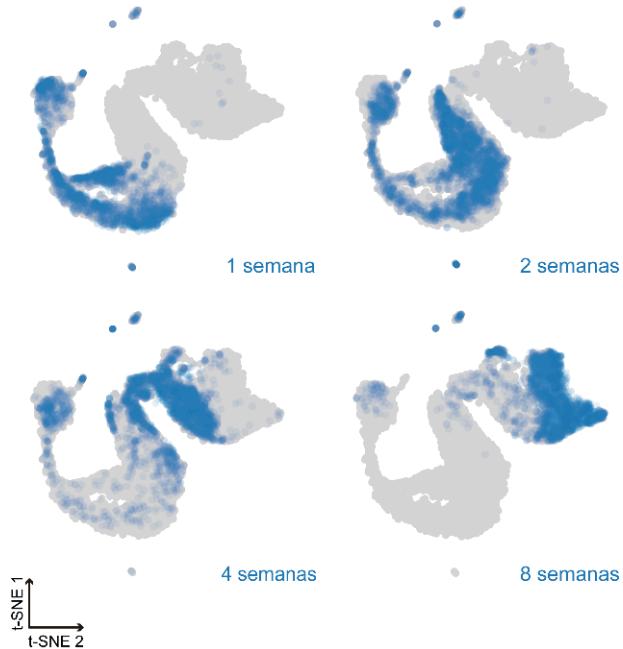


Figura 6. Orden secuencial de las cohortes neuronales. Localización de las cohortes neuronales en el gráfico de incrustación de vecinos estocásticos distribuidos en t (t -SNE), recolectadas a 1, 2, 4 y 8 semanas luego de la inducción para el marcado fluorescente (total: 14.367 núcleos).

Otra manera de visualizar los datos es mediante un gráfico de k vecinos más cercanos mutuos (mKNN, $k=40$). Este tipo de gráfico también muestra la secuencialidad de las cohortes neuronales cuando los núcleos son ordenados según sus perfiles transcripcionales (Figura 7A). Finalmente, sobre el mKNN se corrió un algoritmo de clusterización no supervisado (Louvain) para agrupar a los núcleos en comunidades según la similitud de su perfil molecular (Blondel et al., 2008). Esta partición inicial no supervisada se refinó aún más y reveló 13 clusters (Figura 7B). Las comunidades #1 a #10 parecen constituir una trayectoria de desarrollo lineal y continua, mientras que los clusters #11, #12 y #13 se observan separados entre sí y distantes de esta trayectoria principal.

Los resultados obtenidos muestran una organización secuencial de las aCGs, estructurada por el orden temporal de las cohortes neuronales. La clusterización no supervisada ha permitido identificar 13 comunidades celulares.

Caracterización de los grupos celulares y análisis de su progresión temporal

La identidad de cada cluster se determinó teniendo en cuenta la expresión de marcadores canónicos y las edades de los núcleos que lo componen. La mayoría de las células (aproximadamente el 88%) se distribuyen en las particiones #3 a #10. Esto resalta la especificidad de la disección, que apuntó a obtener exclusivamente aCGs. Los marcadores utilizados para la identificación de los clusters se listan a la izquierda del diagrama de puntos de la figura 7C. La expresión de *Rbfox3* (NeuN, marcador panneuronal), *Prox1* (aCGs) y doublecortin (*Dcx*), neuronas inmaduras) determina que los clusters desde el #3 hasta el #10 pertenecen al linaje neuronal, específicamente de aCGs (Figura 7C).

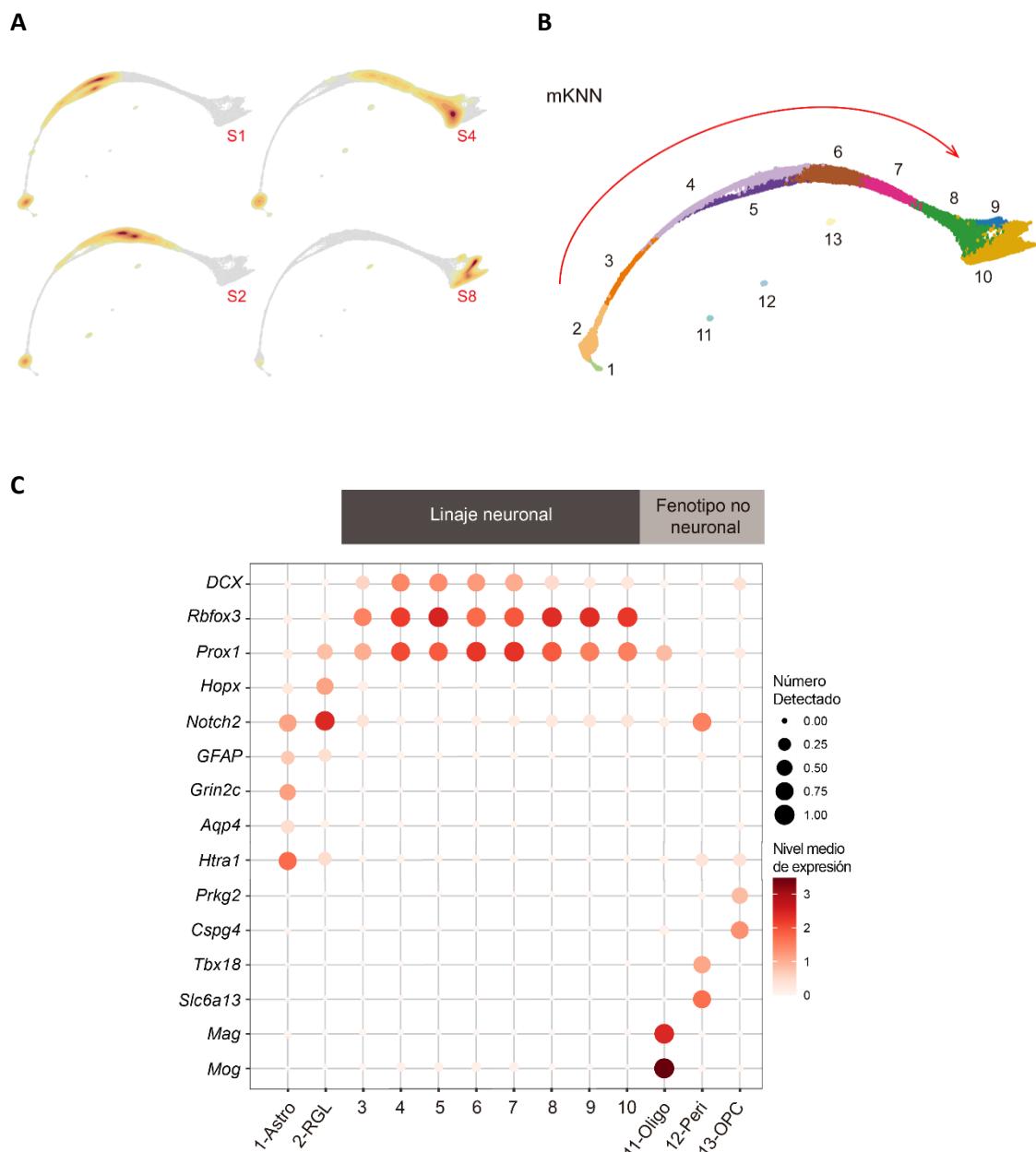


Figura 7. La clusterización de Louvain identificó 13 grupos celulares. (A) Progresión de cada cohorte y su localización sobre el gráfico mKNN (k mutuos vecinos más cercanos). La densidad de núcleos se indica mediante el gradiente de amarillo (bajo) a rojo (alto). (B) Gráfico mKNN, k=40, con 13 clusters indicados por color y número. La flecha roja denota el camino seguido por el proceso de neurogénesis adulta desde los estadios iniciales hasta los más avanzados. (C) Diagrama de puntos para marcadores canónicos para fenotipos neuronales y no neuronales. pericito (Peri): *Tbx18* y *Slc6a13*; oligodendrocyto (Oligo): *Mag* y *Mog*; célula progenitora de oligodendrocyto (OPC): *Prkg2* y *Cspg4*; astrocito (Astro): *Grin2c*, *Aqp4*, *Slc7a10*, *Htra1*, *Fam20a*; RGL: *GFAP*, *Hopx* y *Notch2*; neuronas (aCGs): *DCX*, *Rbfox3* y *Prox1*. Las escalas de la derecha corresponden a la fracción de núcleos que expresan al menos una cuenta de transcriptos en el cluster (tamaño del punto) y al log2(expresión génica media) (color).

Debido a su ancestro común, los astrocitos y las RGLs comparten la expresión de muchos genes como *GFAP*, *Notch2* y *HopX* (Figura 7C) (Tosoni et al., 2023). Con el fin de distinguir estos tipos celulares, estudiamos los genes expresados diferencialmente (GEDs) entre ambos clusters mediante un gráfico de volcán. Este tipo de gráfico permite observar de manera simultánea la magnitud del efecto y la significancia estadística de los GEDs. En el eje X se muestra el logaritmo en base 2 de la magnitud del cambio de la expresión génica (fold change, FC), lo que facilita la identificación de los genes con cambios significativos en su expresión. En el eje Y se representa el logaritmo negativo de los valores p ajustados (false discovery rate, FDR), destacando los datos con alta significancia estadística, situándolos en la parte superior del gráfico. Este análisis devela la activación de transcriptos asociados con linaje astrocítico en el cluster #1: *Glul*, *Trim9*, *Slc1a2*, *Htra1* (Figura 8). Finalmente, la expresión restringida de *Grin2c*, *Aqp4*, *GFAP* y *Htra1* define el cluster #1 como astrocitos y el cluster #2 como RGLs (Figura 7C) (Gebara et al., 2016; Hochgerner et al., 2018; Sueda & Kageyama, 2021).

La ausencia de expresión de *Rbfox3* sugiere que los grupos #11, #12 y #13 contienen células de linaje no neuronal (Figura 7C). El estudio de marcadores determina que estos clusters están constituidos por pericitos que expresan *Tbx18* y *Slc6a13* (#11), oligodendrocytos que expresan *Mag* y *Mog* (#12) y células precursoras de oligodendrocytos que expresan *Prkg2* y *Cspg4* (#13) (Figura 7C).

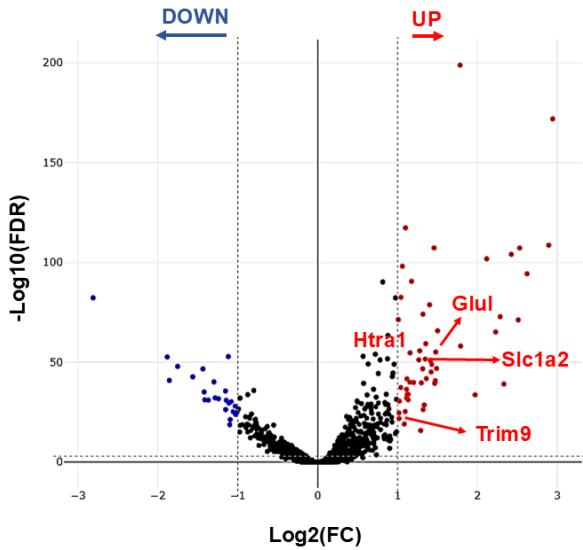


Figura 8. Genes expresados diferencialmente entre los clusters de RGL (down) y astrocitos (up). Gráfico de volcán para el análisis de expresión diferencial ($FC > 2$ o < -2 y $FDR > 0.05$) destacando ejemplos de genes con mayor cambio en sus niveles de expresión. FC: magnitud de cambio. FDR: tasa de falsos descubrimientos.

Los pericitos no han sido descriptos como linaje de *Ascl1*, y su escasa representación en todo el conjunto de datos (~0,4%) sugiere una expresión transitoria de *Ascl1* en esta población, o bien una expresión inespecífica de la recombinasa CreERT2. Por el contrario, se ha demostrado que los OPCs activan *Ascl1*, lo que sugiere que el etiquetado indeleble utilizado como estrategia experimental podría haber marcado a la progenie oligodendrocítica (Sueda & Kageyama, 2021).

Los gráficos *t*-SNE y mKNN muestran que las aCGs se distribuyen a lo largo de un camino continuo de desarrollo que abarca nueve etapas desde la diferenciación hasta la maduración neuronal (Figuras 6 y 7). La clusterización no supervisada se basó por completo en perfiles transcripcionales, y resultó en un orden secuencial de los núcleos según su edad neuronal (Figura 7A). Una vez diferenciadas las particiones de linaje neuronal (#3-#10) y no neuronal (Astro, RGL, Peri, Olig y OPC), nos propusimos identificar los estadios neuronales comprendidos por cada cluster teniendo en cuenta la expresión de marcadores canónicos y la edad celular (composición de cohortes) (Figuras 9 y 10).

La expresión de varios genes de función conocida se estudió utilizando gráficos de violín. Estos gráficos muestran el nivel de expresión de determinado gen a lo largo de los clusters, y además la forma del *violín* describe la distribución de los datos. El

gráfico de violín de la figura 9B, exhibe que el cluster #3 (consecutivo a RGL), contiene progenitores neuronales (CPN), determinado por la expresión de *Eomes*, *Top2a*, *Neil3*, *Cdk6*, *Lockd*, *Mcm6* y *Pola1*. Esto revela la existencia de un cluster con actividad de ciclo celular (Figura 9B). La presencia de *Elavl2*, *Igfbp1*, *Sox4* y *Sox11*, que denotan un compromiso neuronal, indica que este destino ya se establece en este estado temprano del desarrollo. El siguiente grupo, los neuroblastos (NB1 y NB2), carece de genes implicados en proliferación celular, expresa marcadores neuronales inmaduros como *Calb2*, *Dcx*, *Rgs6*, *Sox4*, *Sox11* y *Tac2*, y constituyen el primer estadio postmitótico de la diferenciación neuronal (clusters #4 y #5). Los clusters que continúan en la vía de desarrollo, CGinm1 y 2 (clusters #6 y #7), reducen la expresión de *Calb2* y *Elavl2*, y expresan *Dcx*, *Sox11*, *Igfbp1*, *Rgs6*, *Camk4* y *Chd5*. El cluster CGjov (cluster #8) muestra una menor expresión de marcadores neuronales inmaduros y mayores niveles de *Calb1*, *Icam5*, *Tenm1* y *Grin2a*, este último siendo una subunidad del receptor del tipo NMDA de relevancia crítica en la formación y plasticidad de sinapsis glutamatérgicas. Por último, los clusters pertenecientes a los fenotipos neuronales maduros CGmad1 y 2 (clusters #9 y #10) desactivan por completo la expresión de todos los marcadores inmaduros y expresan *Ntng1*. De este modo, definimos que los grupos pertenecientes al linaje neuronal (*Rbfox3+*, *Prox1+*) siguen una secuencia de desarrollo que contiene CPNs, neuroblastos (NB1, NB2), neuronas inmaduras (CGinm1, CGinm2), neuronas jóvenes (CGjov) y aCGs maduras (CGmad1, CGmad2).

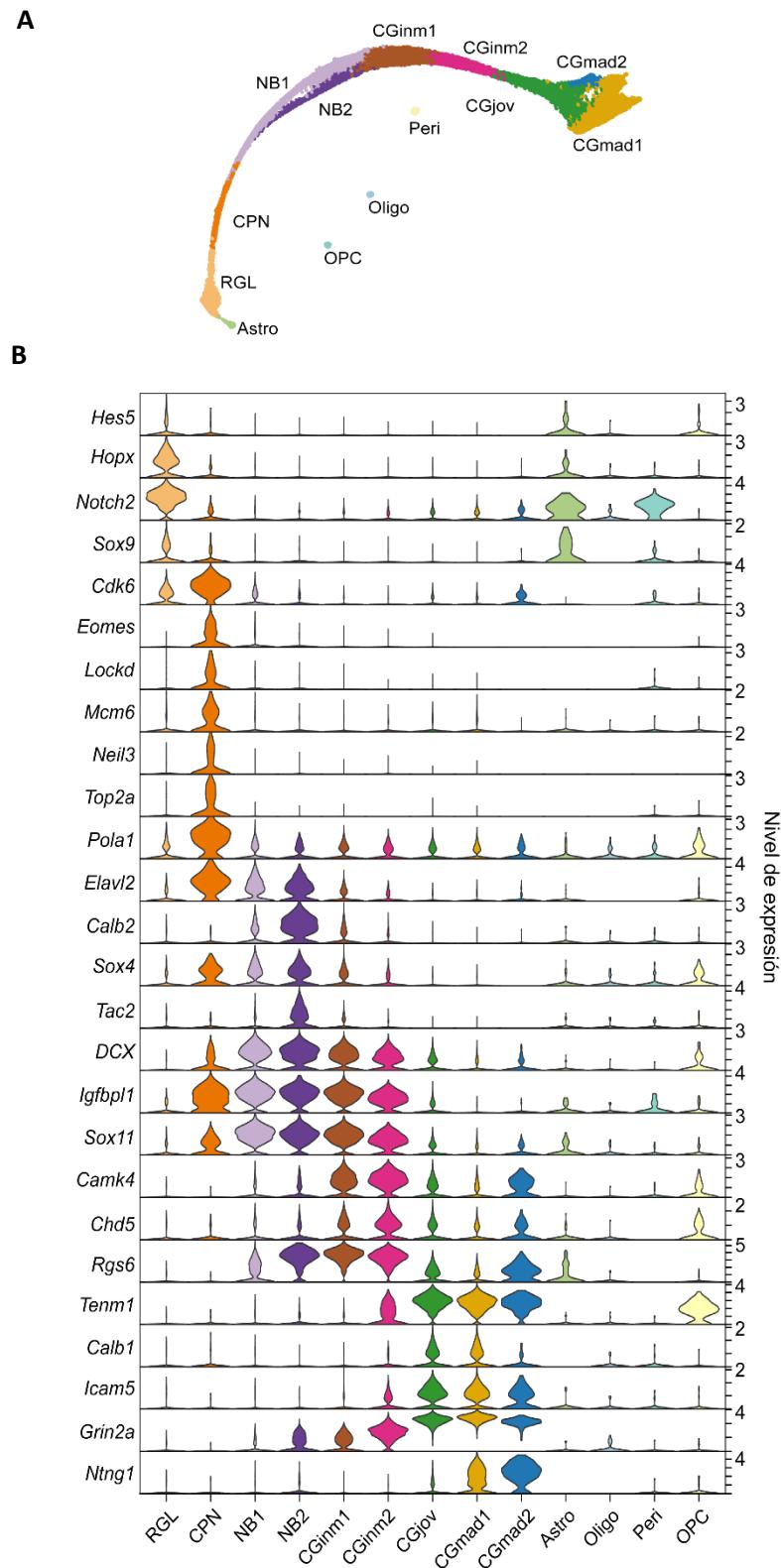


Figura 9. Complejidad de la neurogénesis adulta revelada por perfiles moleculares. (A) Gráfico mKNN describiendo la identidad de los clusters basándose en la expresión de genes canónicos: RGL (célula tipo glía radial), CPN (célula progenitora neuronal), NB (neuroblasto), CGinm (CG inmadura), CGjov (CG joven), CGmad (CG madura), Astro (astrocito), OPC (célula progenitora de oligodendroctos), Oligo (oligodendrocto) y Peri (pericitos). (B) Gráficos de violín plots representando el nivel de expresión de los genes canónicos utilizados para definir los clusters.

A continuación, se analizaron las cohortes (S1 a S8) con el fin de definir la aparición temporal de los clusters (Figura 10). Las RGLs se detectan en puntos temporales tempranos y disminuyen bruscamente en S8, de acuerdo con un agotamiento de la reserva de células madre que expresan Ascl1, con capacidad proliferativa y de autorrenovación limitadas (Bottes et al., 2021; Yang et al., 2015).

Las CPN son escasas, como era de esperar debido a su rápida división y diferenciación, y están presentes principalmente en S1 y S2. Los neuroblastos se distinguen por su aparición temprana, también en S1 y S2, y su rápida desaparición en S4. Las aCGs inmaduras y jóvenes aparecen secuencialmente. El grupo CGinm1 está compuesto principalmente por núcleos de S1 y alcanza su máximo en S2, mientras que la CGinm2 se observa en S2 y S4. CGjov se encuentra únicamente en S4, lo que sugiere que este grupo correspondería a la población de aCGs que atraviesan el periodo crítico de mayor plasticidad neuronal (Espósito et al., 2005; Gu et al., 2012; Piatti et al., 2006; Schmidt-Hieber et al., 2004). Finalmente, CGmad1 se observa principalmente en S8, lo cual es consistente con la idea previa de que las aCGs requieren varias semanas de desarrollo hasta alcanzar los estadios finales de maduración.

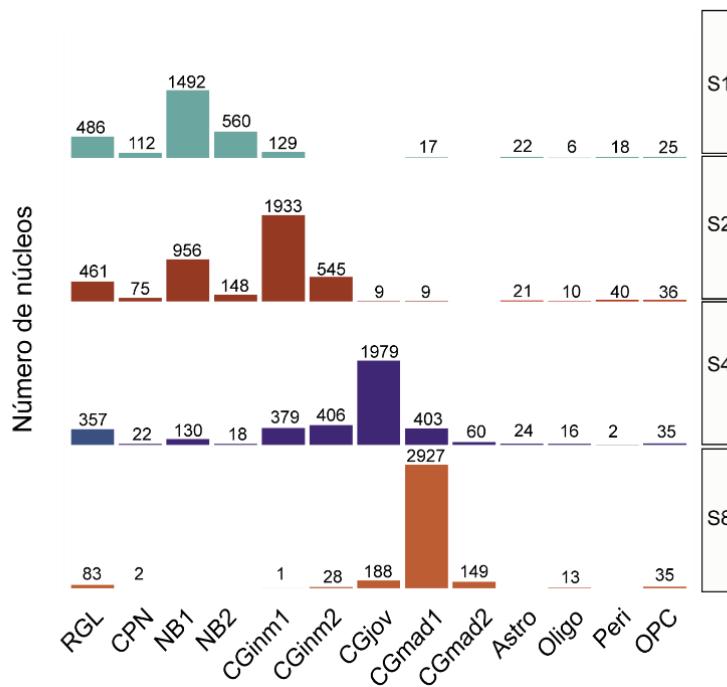


Figura 10. Temporalidad de la neurogénesis adulta revelada según perfiles moleculares.
Distribución de los núcleos de cada cohorte a lo largo de las agrupaciones.

Los resultados obtenidos muestran que la mayor parte de las células corresponden a clusters de linaje neuronal (#3 a #10). La expresión de genes asociados con neurogénesis y maduración neuronal revela una progresión secuencial en el desarrollo de las aCGs, desde progenitores neuronales hasta células maduras. Finalmente, se destaca un patrón temporal claro en la aparición y desaparición de estos clusters.

Reproducibilidad biológica de la neurogénesis adulta en datasets independientes

Los núcleos del dataset 1 pueden ordenarse formando un camino de desarrollo continuo, avanzando progresivamente por las cohortes S1, S2 a S4 y S4 a S8. Sin embargo, los tiempos inicialmente seleccionados podrían haber pasado por alto transiciones intermedias. Para mejorar la resolución temporal, obtuvimos el conjunto de datos 2 (dataset 2) con cohortes de 2, 3, 4, 5 y 8 semanas (S2 a S8; Figura 11). Se utilizó el paquete Seurat para transferir las etiquetas de los clusters del dataset 1 a los núcleos pertenecientes al dataset 2 (ver Métodos).

El análisis del dataset 2 en un gráfico mKNN revela que los núcleos de las distintas cohortes se ubican siguiendo una secuencia continua organizada según la edad neuronal, al igual que el dataset 1 (Figura 11A, B). Los clusters del dataset 2 muestran ciertas similitudes con respecto al dataset 1 como por ejemplo la expresión de los marcadores canónicos utilizados para identificar los tipos celulares que compone cada partición (Figura 11C).

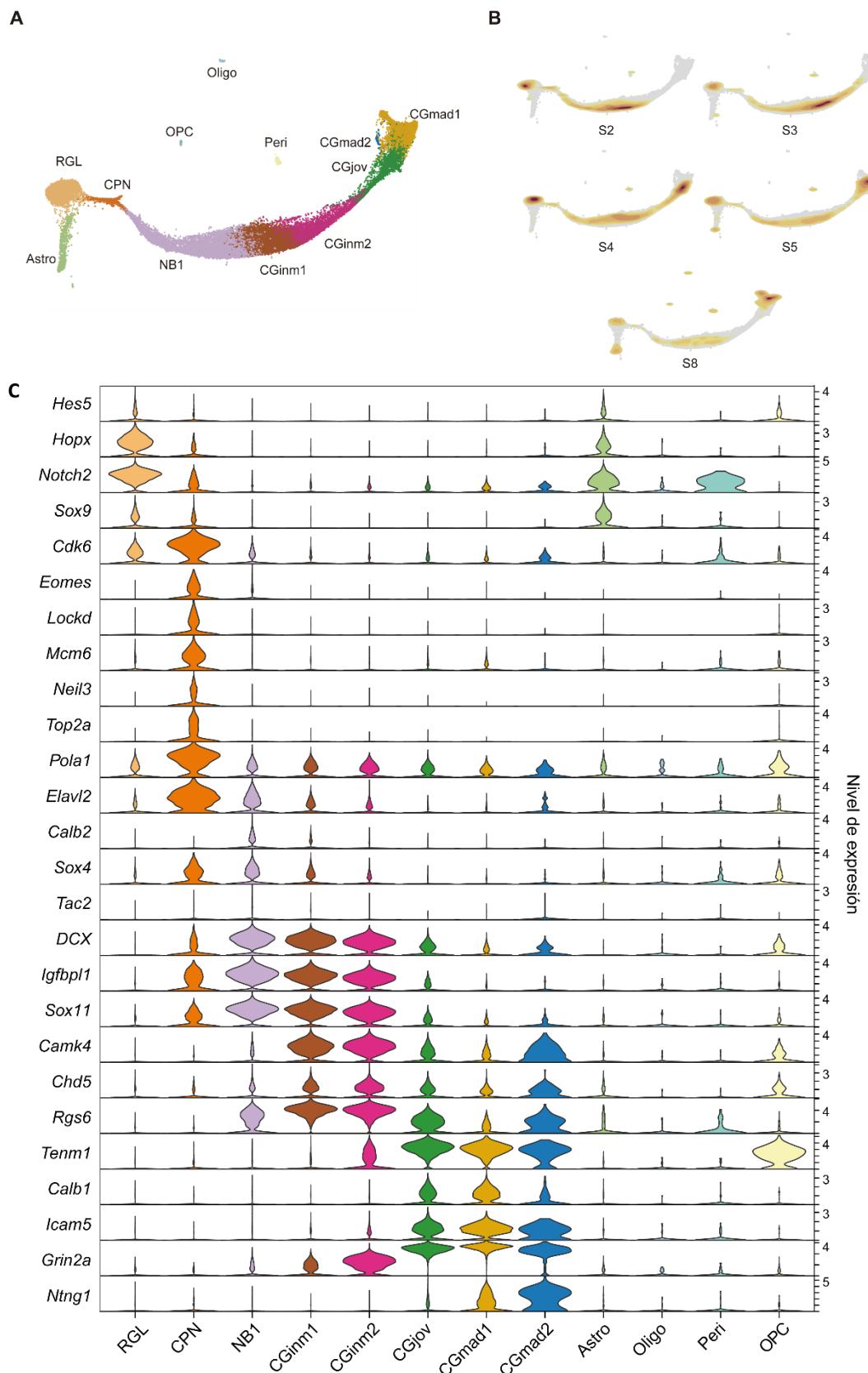


Figura 11. Identidad de clusters y transiciones en el dataset 2. **(A)** Gráfico mKNN que describe la identidad de los clusters. **(B)** Progresión de cada cohorte y su localización sobre el gráfico mKNN. La densidad de núcleos se indica mediante el gradiente de amarillo (bajo) a rojo (alto). **(C)** Gráfico de violín representando el nivel de expresión de los genes canónicos utilizados para definir los clusters.

Con el fin de evaluar la reproducibilidad biológica entre ambos datasets, se utilizó el paquete R Batchelor, que facilita la integración de datos corregidos por efectos de lote en un único espacio de expresión. Para visualizar esta integración de manera efectiva, se empleó la técnica *t*-SNE. Este enfoque es especialmente adecuado para representar datos de alta dimensión en un espacio reducido, ya que preserva las relaciones de proximidad entre los puntos, permitiendo una comparación clara de la distribución de los datos. Los mapas de *t*-SNE generados muestran que tanto las cohortes como los clusters de ambos datasets mantienen su estructura y localización relativa a través de los conjuntos de datos, lo que valida la reproducibilidad y consistencia biológica de los resultados obtenidos (Figura 12). Otra similitud observada entre ambos datasets es la cohorte neuronal en la que aparece cada cluster, por ejemplo en el dataset 1 CGjov aparece en la cuarta semana. Sin embargo, en el dataset 2 se observan clusters inmaduros aun en las cohortes avanzadas (Figura 13). Este comportamiento puede deberse a que dentro de cada cohorte se encuentran estados de desarrollo más variables.

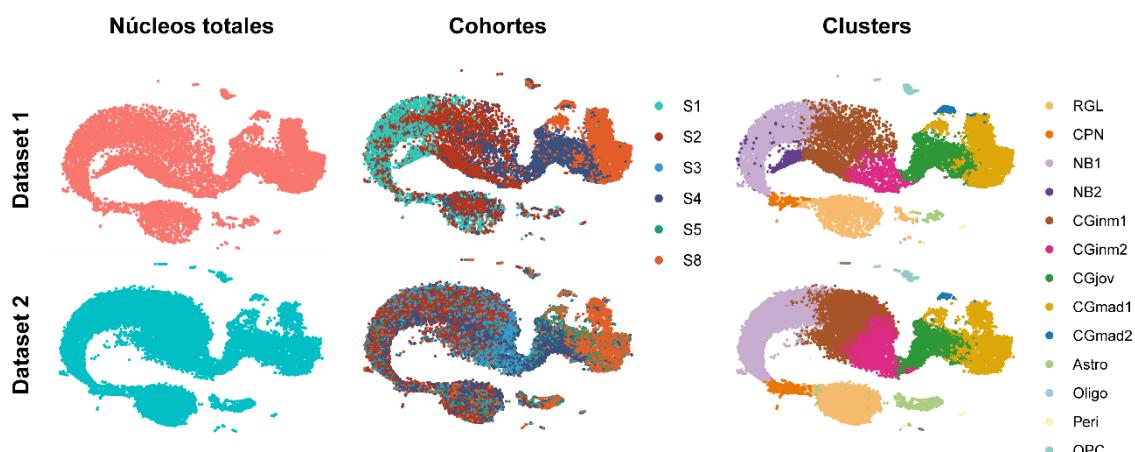


Figura 12. Integración de los datasets en un mismo espacio de expresión demostrando la reproducibilidad biológica del proceso de neurogénesis adulta. Gráficos *t*-SNE para visualizar la integración de los dataset 1 y 2 (rosa y turquesa, respectivamente, paneles de la izquierda). Las cohortes (paneles centrales) y los clusters (paneles de la derecha) también se distinguieron por color.

No se asignó ningún núcleo al cluster de NB2, lo que concuerda con la representación mayoritaria de este cluster en la cohorte S1 del conjunto de datos 1. Del mismo modo que en el dataset 1, CGinm2 es el grupo que aparece a continuación de CGinm1. CGjov vuelve a ser dominante en S4 y CGmad1 tiene su máxima representación en S8, aunque también está presente en S5, lo que sugiere una aparición más temprana.

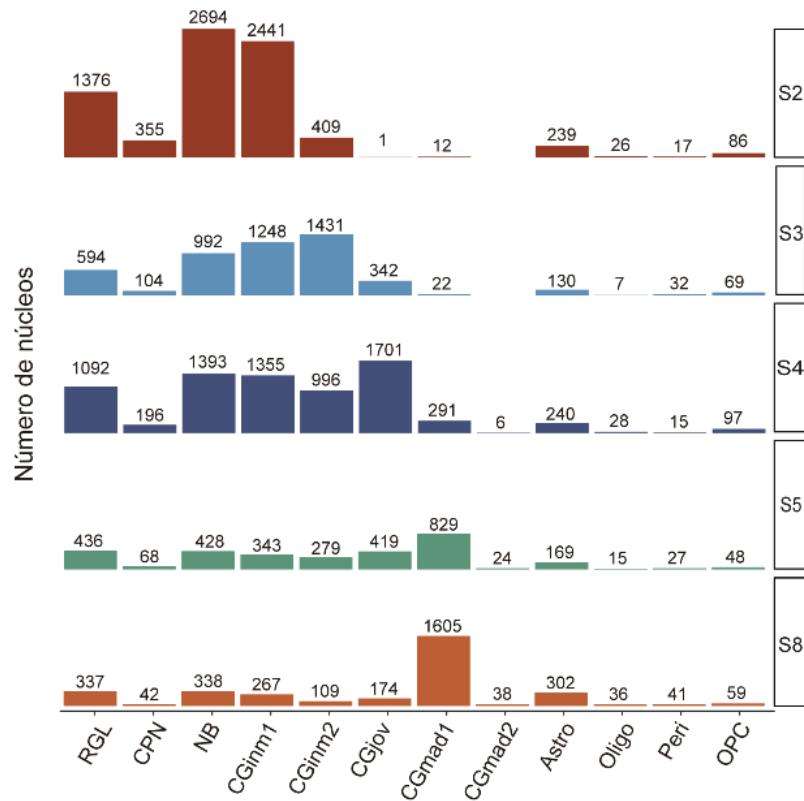


Figura 13. Temporalidad de la neurogénesis adulta para el dataset 2. Distribución de los núcleos de cada cohorte a lo largo de los clusters (Número total de núcleos para el dataset 2: 26.716)

Este análisis transcriptómico describe la trayectoria continua de un tipo neuronal único, la célula granular nacida en el giro dentado del hipocampo adulto, a través de distintas etapas que van desde RGL hasta CGmad. La detección de múltiples clusters sucesivos de estadios transcripcionales inmaduros denota una complejidad mayor que la predicha a partir de estudios funcionales, y establece la base molecular para los cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren durante la diferenciación de las aCGs.

Capítulo 2: Mecanismos moleculares que determinan la función neuronal

Distintos estados celulares en la trayectoria de célula madre a neurona madura

El paso de RGL a CPN y posteriormente a NB1 podría requerir profundas modificaciones transcripcionales, ya que implica la transición de un programa biológico quiescente a uno proliferativo, y luego a un neuroblasto postmitótico. Para determinar la complejidad de dichas transiciones, se analizó el número de genes (GEDs) que modifican su expresión entre clusters adyacentes (Figura 14). Las transiciones mencionadas (RGL-CPN-NB1) muestran cambios sustanciales en el número de GEDs, con una notable reducción en los niveles de expresión de transcriptos (barras azules, Figura 14). Este análisis también revela otra transición que requiere un elevado número de GEDs, el pasaje de CGinm2 a CGjov.

Es relevante destacar que ambos datasets comparten un elevado número de GEDs durante las transiciones, lo que respalda su reproducibilidad a nivel transcripcional (Figura 15). La gran mayoría de los GEDs presentes en el dataset 1 están también incluidos en el dataset 2.

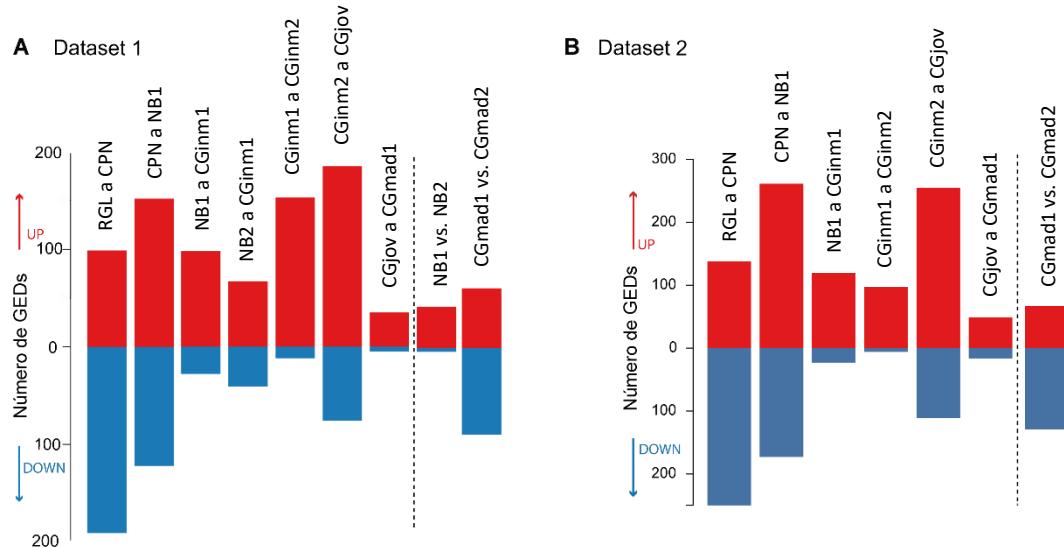


Figura 14. Análisis de genes expresados diferencialmente entre los clusters del dataset 1 y 2. GEDs correspondientes al dataset 1 (**A**) y 2 (**B**) entre transiciones de clusters adyacentes (transiciones indicadas en la parte superior de cada barra). A la derecha de cada gráfico se muestran comparaciones adicionales (entre clusters no consecutivos). El número de genes cuya expresión aumenta o disminuye se muestran en rojo y azul, respectivamente.

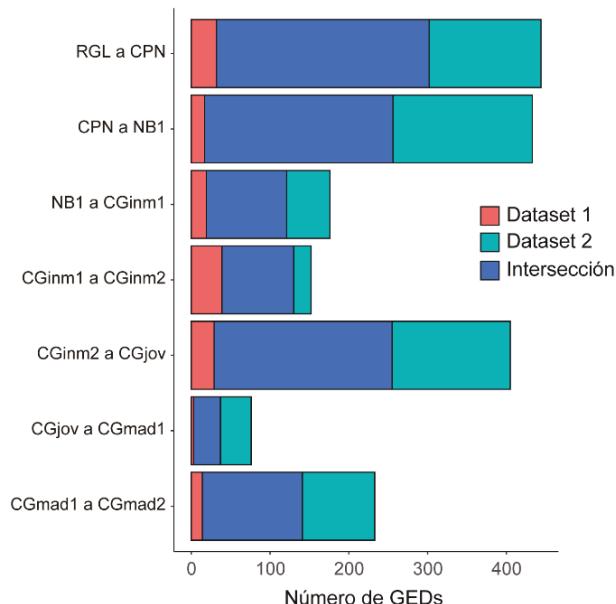


Figura 15. Comparación de genes expresados diferencialmente entre el datasets 1 y 2.
Gráfico de barras que indica el número de GEDs entre transiciones de cluster adyacentes para el conjunto de datos 1 (rosa), el conjunto de datos 2 (turquesa) y su intersección.

Para comprender con mayor precisión la dinámica de la vía de desarrollo, asignamos valores de pseudotiempo a todos los núcleos a lo largo de la trayectoria continua, desde RGL a CGmad1 (véase la sección Métodos). El análisis de pseudotiempo ordena a las células en función de su similitud a lo largo de la trayectoria de un proceso de desarrollo continuo. De esta manera, se generaron histogramas de densidad de núcleos a lo largo del pseudotiempo (Figura 16).

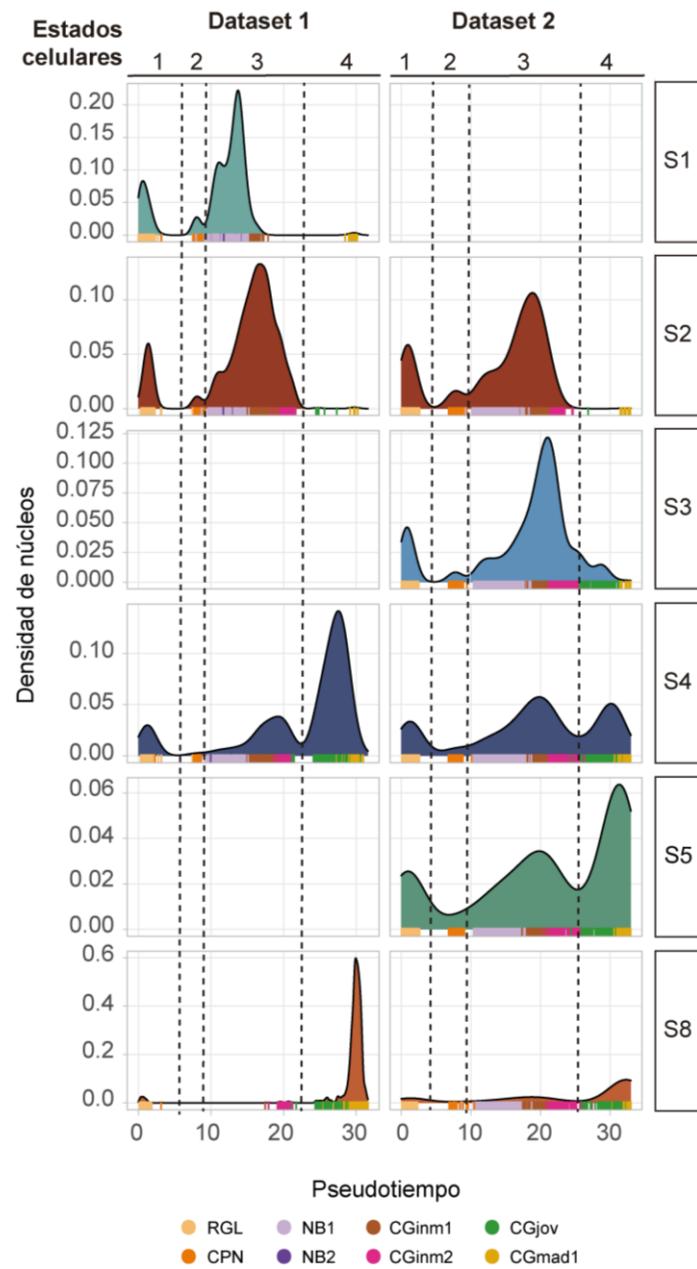


Figura 16. Distribución de la densidad de núcleos a lo largo de la progresión del pseudotiempo. Los valores de pseudotiempo para los núcleos se asignaron en función de sus perfiles moleculares y posteriormente se organizaron en gráficos de distribución de densidad (panel izquierdo, dataset 1; panel derecho, dataset 2). Los datos revelan cuatro estados celulares con distinta composición de clusters: 1º RGL; 2º CPN; 3º NB1-CGinm1-CGinm2; 4º CGjov-CGmad1. Las líneas discontinuas marcan los valles y representan las principales transiciones en el perfil de expresión génica. El código de color indica la identidad de los grupos. A la derecha se especifica la corte neuronal en estudio, desde la semana 1 a la 8 (S1-S8).

Los gráficos de densidad revelan cuatro picos donde se concentra la mayor cantidad de núcleos. Según el orden secuencial del pseudotiempo, el primer pico corresponde a las RGLs, el siguiente se compone de CPNs, el tercero abarca una ventana más larga que comprende estadios de neurona inmadura (NB1, CGinm1, CGinm2), y el último contiene CGjov y CGmad1. Estos picos están separados por valles que coinciden precisamente con las transiciones que implican mayor número de GEDs: RGL a CPN, CPN a NB, y CGinm2 a CGjov (Figura 14). La topografía de estas curvas sugiere la existencia de cuatro estados putativos a lo largo de la vía de diferenciación neuronal.

Con el fin de develar el significado biológico subyacente a estos estados, analizamos el perfil de expresión de los factores de transcripción (FTs). Se seleccionaron FTs cuya expresión varió a lo largo del pseudotiempo, y finalmente se analizaron aquellos que se ajustaron a cierto valor de FDR (ver métodos). La ventana de expresión de estos FTs revela cuatro segmentos que se distinguen fácilmente en los mapas de calor resultantes, cuyos períodos de actividad coinciden con los picos previamente descriptos (Figura 17). El análisis de expresión de estos genes exhibe diferentes patrones, con una mayoría de FTs restringida al cluster RGL (como *Etv4*, *Etv5*, *Hes5*, *Gli1*), otros expresados solamente en CPNs (*Ascl1*, *Sox6*, *Sox9*, *Fezf2*), y múltiples FTs abarcando la trayectoria desde NB a CGinm2 (*Sox4*, *Sox11*, *Tbr1*, *Klf12*). A su vez, varios FTs permanecen sin expresarse durante el desarrollo y su expresión se activó en CGjov (*Atf6*, *Runx2*, *Mkx*, *Foxk1*). Curiosamente, un subconjunto de FTs expresados en RGLs se apaga en CPNs y se expresa nuevamente en CGjov y CGmad1 (*Foxo1*, *Glis3*, *Bcl6*, *Hif*). Cabe destacar que, dentro de cada segmento (estados), los clusters muestran escasas modificaciones en cuanto a la expresión de los FTs.

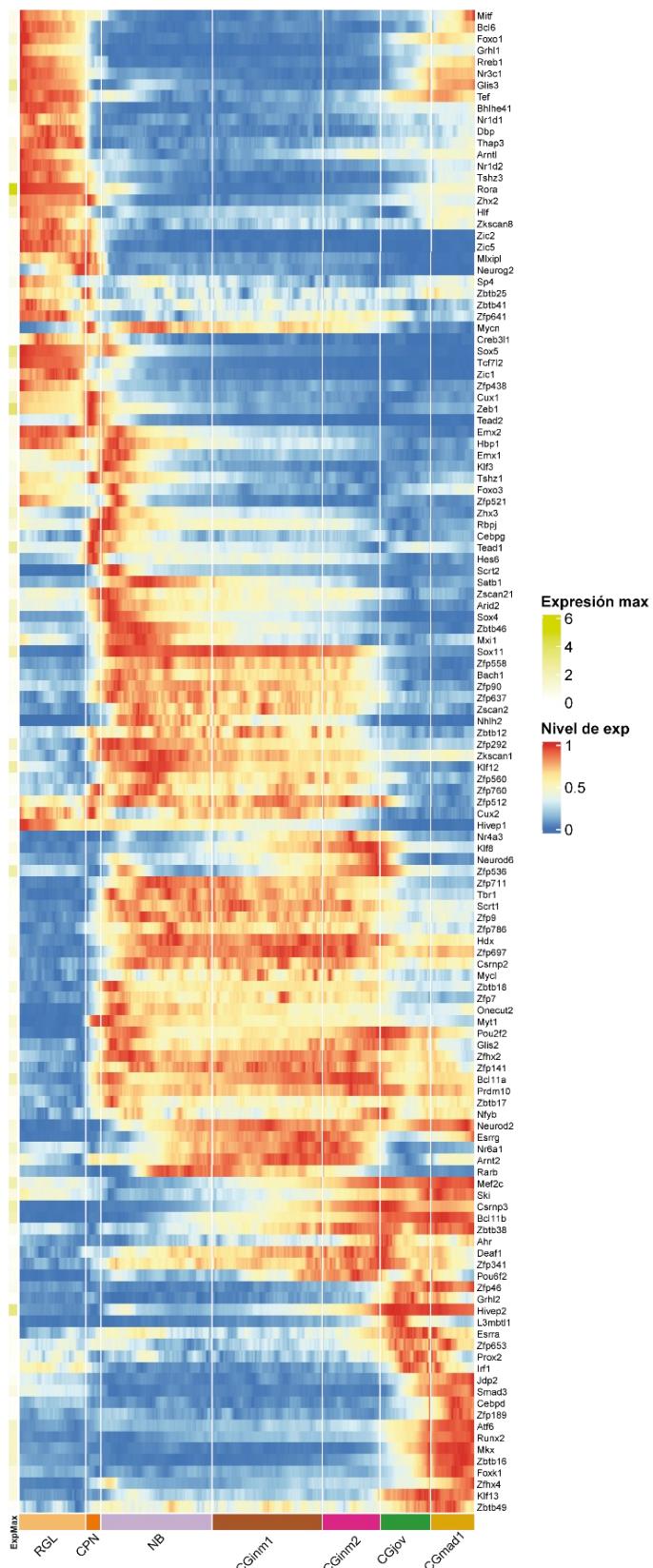


Figura 17. Dinámica de la expresión de los perfiles moleculares de los FTs a lo largo de los clusters. Mapa de calor para los niveles de expresión, normalizados por filas, de los factores de transcripción que presentan transiciones importantes de aumento/dismisión entre grupos. La expresión máxima (MaxExp, escala coloreada a la derecha) se muestra a la izquierda. La escala de pseudocolor de la derecha indica el nivel de expresión medio. Todos los datos de la figura corresponden al dataset 2.

En resumen, los cambios en la expresión de FTs, las transiciones críticas identificadas a través del análisis de GEDs y los valles que separan los picos en los gráficos de pseudotiempo coinciden en las mismas tres transiciones. Esto sugiere la existencia de cuatro estados clave durante el desarrollo de las aCGs en el giro dentado: uno asociado a las RGLs, otro que abarca los CPNs, un tercer estado que engloba las neuronas inmaduras desde NB1 hasta CGinm2, y un cuarto que comprende tanto a las CGjov como a las CGmad1.

Dinámica de expresión de las moléculas efectoras que determinan la función neuronal de una célula granular del giro dentado adulto

Con el fin de estudiar las transiciones entre clusters adyacentes, se utilizaron gráficos de volcán para evidenciar los números de GEDs, y diagramas de espigas, que grafican la expresión de genes o grupos de genes a lo largo de los núcleos ordenados en un pseudotiempo. La transición del primer estado celular (RGL) al segundo (CPN), implica la desactivación de ~200 genes (Figura 18A). El patrón de expresión de estos GEDs a lo largo del desarrollo se muestra en los diagramas de espigas. Estos gráficos ilustran la expresión promedio de los genes, tanto los activados como los desactivados, durante la transición de RGL a CPN a través de todos los clusters. Los resultados revelan que los 200 genes desactivados mantienen su expresión reducida durante el resto del desarrollo (Figura 18B).

El análisis de GEDs de esta transición muestra una desactivación masiva de transcriptos, y la identidad de estos refleja una transformación biológica que involucra el cambio de un programa pluripotente hacia un estado proliferativo. En cambio, el número de transcriptos que se activan en esta transición es menor, y están relacionados al control del ciclo celular. Los genes de ciclo celular se activan de manera restrictiva en el cluster de CPN, definiéndolo como el único estado con actividad mitótica (Figura 18C). Además, las CPNs muestran un compromiso neuronal temprano revelado por la expresión de *Rbfox3*, *Eomes*, *Sox4*, *Sox11* e *Igfbp1* (Figuras 10 y 12).

El final de la división celular marca la salida del segundo estado y el comienzo de la diferenciación postmitótica. Los clusters que limitan esta transición de estados son CPNs (estado 2) y NB (comienzo del estado 3). Este cambio hacia el tercer estado celular conlleva un aumento en la expresión de una serie de transcriptos que mantendrán elevados niveles de expresión durante toda la maduración neuronal (Figura 19A, B). El análisis de términos de ontología génica (GO) indica que estos transcriptos

controlan procesos clave como la diferenciación neuronal, la morfogénesis, la interacción célula-célula, el desarrollo y la orientación de las proyecciones neuronales, y la organización sináptica (Figura 19C).

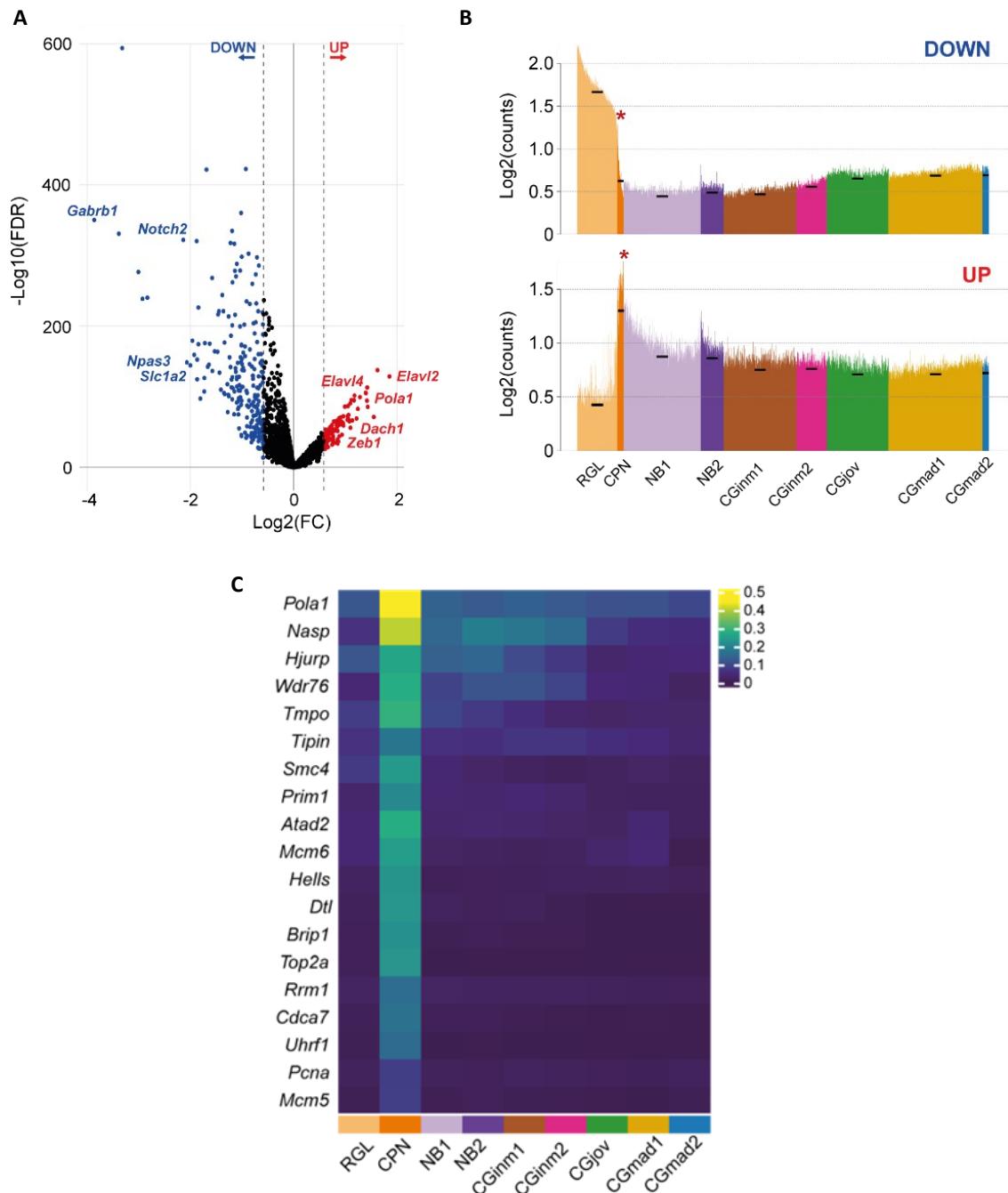


Figura 18. Análisis de las transiciones de RGL a CPN. (A) Gráfico de volcán para el análisis de genes con expresión diferencial ($\text{FC} > 1.5$ o < -1.5 y $\text{FDR} < 0.05$) con ejemplos relevantes. FC: magnitud de cambio. FDR: tasa de falsos desubrimientos. **(B)** Diagrama de espigas para la expresión media de los GEDs que disminuyen (arriba) o aumentan (abajo) para todos los núcleos ordenados según su valor de pseudotiempo estimado. Los guiones negros muestran la expresión media de cada grupo y los asteriscos rojos resaltan la transición analizada. **(C)** Los genes de ciclo celular se expresan exclusivamente en el cluster CPNs. Mapa de calor con la expresión media normalizada por filas de los marcadores canónicos del ciclo celular en todos los grupos. La escala de pseudocolor de la derecha indica el nivel de expresión medio.

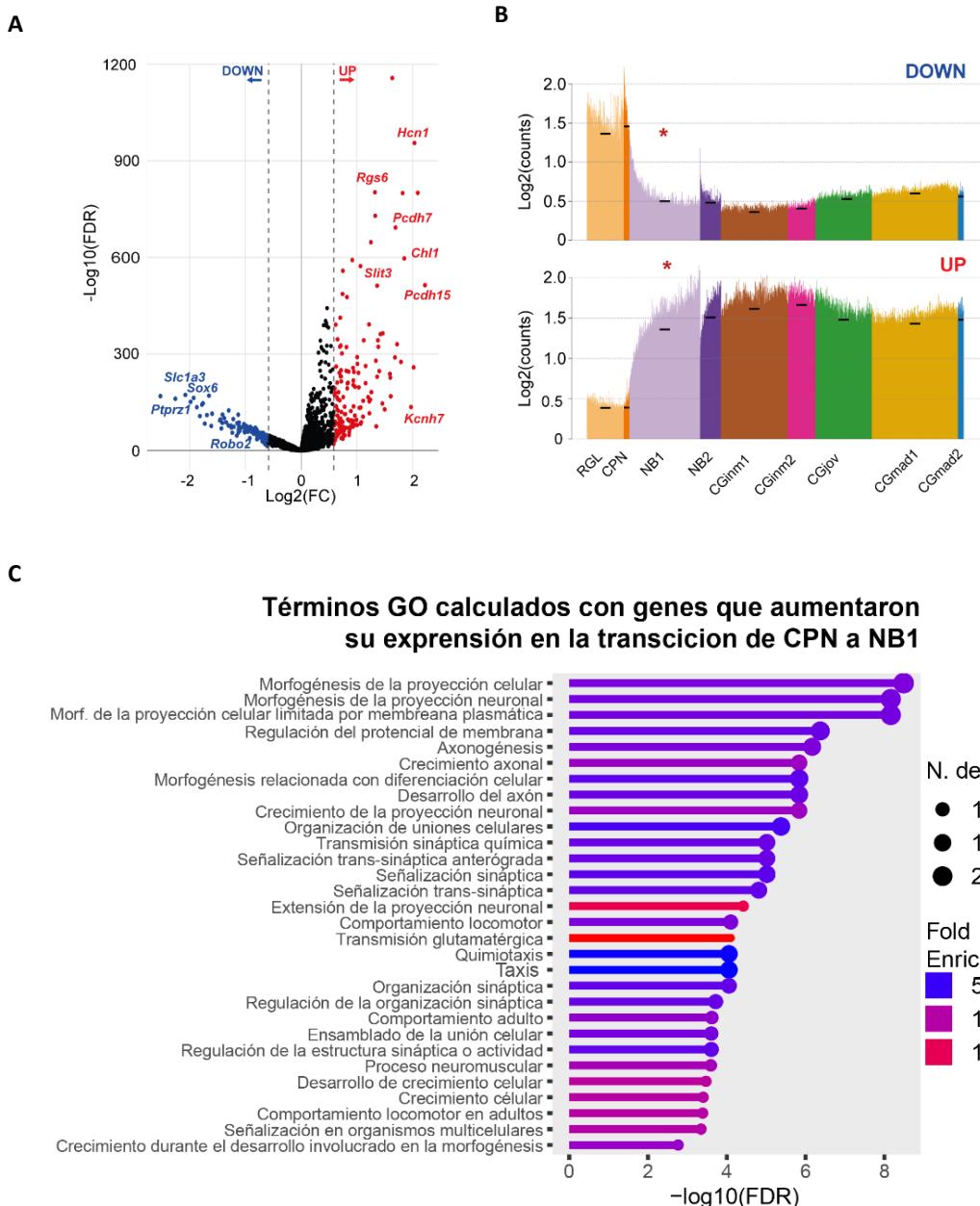


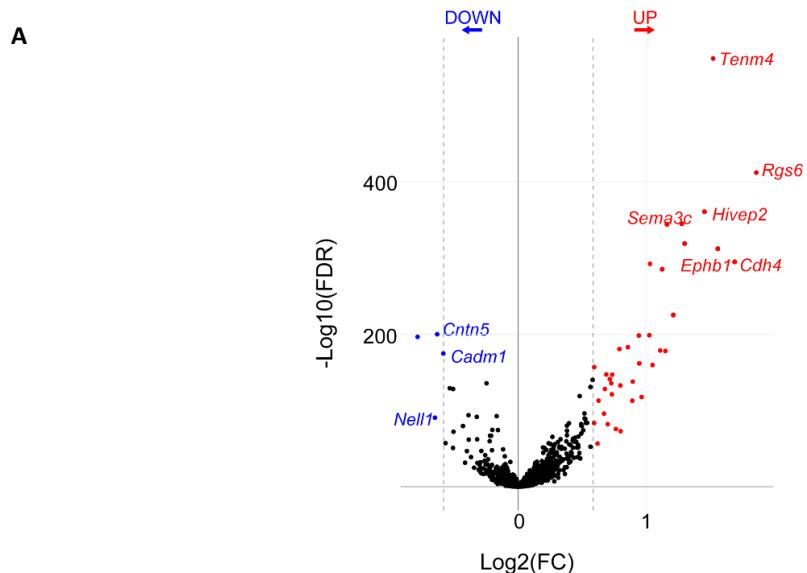
Figura 19. Análisis de las transiciones de CPN a NB1. (A) Gráfico de volcán para el análisis de genes con expresión diferencial ($FC \geq 1.5$ o ≤ -1.5 y $FDR \leq 0.05$) con ejemplos relevantes. FC: magnitud de cambio. FDR: tasa de falsos descubrimientos. (B) Diagrama de espigas para la expresión media de los GEDs que disminuyen (arriba) o aumentan (abajo) sus niveles de expresión para todos los núcleos ordenados según su valor de pseudotiempo estimado. Los guiones negros muestran la expresión media de cada grupo y los asteriscos rojos resaltan las transiciones analizadas (C) Términos GO calculados con genes que aumentaron y disminuyeron su expresión en la transición de CPN a NB1.

El tercer estado contiene dos tipos de neuroblastos, NB1 y NB2, que expresan niveles máximos de *DCX* e *Igfbp1* (Figura 9 y 11). Además, comprende otros grupos neuronales inmaduros, CGinn1 y CGinn2. Todos estos clusters comparten la expresión de marcadores canónicos del desarrollo neuronal temprano: *Dcx*, *Sox4*, *Sox11*, *Igfbp1* y *Rgs6* (Figura 9 y 11). El estudio de GEDs entre las transiciones de los clusters que

componen este estado, muestra principalmente la activación de un gran número de genes. Por el contrario, pocos transcriptos son desactivados, lo que sugiere que durante este periodo las aCGs continúan incorporando moléculas que amplían sus capacidades estructurales y funcionales (Figura 14). En general, los genes efectores que inician su expresión en NB1, aumentaron progresivamente y se mantuvieron expresados hasta alcanzar el fenotipo de maduración final (Figura 19B).

Hasta el momento se demostró que los clusters del tercer estado podrían compartir procesos biológicos que los agrupan. Sin embargo, expresan diferencias que son suficientes para definirlos como particiones separadas. A continuación, analizamos las características moleculares de cada una de las particiones que componen el tercer estado. El gráfico mKNN muestra que NB2 constituye una vía paralela a NB1, divergiendo de este mismo cluster y reincorporándose al camino principal de desarrollo en CGinm1. Durante la progresión de las cohortes de S1 a S2, la población de NB2 disminuye el doble de rápido que la de NB1, lo que sugiere una vida media más corta para NB2 (Figura 10). La población NB2 expresa marcadores canónicos del estadio de neuroblasto *Calb2*, *Tac2* y *Rgs6* (Figura 9). En comparación con NB1, NB2 muestra alrededor de 50 transcriptos adicionales, con pocos genes que disminuyen su expresión (Figura 20A). A continuación, realizamos un análisis de términos GO para los genes activados en esta transición. Algunos de estos genes aumentados están relacionados con el ensamblaje de receptores de glutamato (*Grin2a*, *Grid1*, *Grip1*), crecimiento axonal (*Robo2*, *Sema3c* y *Unc5d*) y la interacción célula-célula (*Ephb1*, *Cdh4*, *Pcdh7*, *Nrxn3*) (Figura 20B).

Las diferencias entre NB1 y CGinm1 se estudiaron mediante GEDs. El gráfico de volcán que representa la transición de NB1 a CGinm1 revela un marcado aumento de las subunidades para los receptores de GABA y glutamato (*Gabrb1*, *Grm5*, *Grm7*, *Gabbr2*, *Gabrg3*, *Grin2a*), canales iónicos activados por voltaje (*Kcnma1*, *Kcnd2*, *Cacna1e*), y crecimiento axonal (*Robo1*, *Nrp1*, *Epha7*, *Dscam*, *Ncam2*, *Epha6*, *Slit3*, *Ptpro*) (Figura 21B). Estos genes son críticos para el establecimiento de la excitabilidad de la membrana, el crecimiento neuronal y la formación de sinapsis aferentes en las aCGs.



B Términos de GO calculados con genes aumentados entre NB1 y NB2

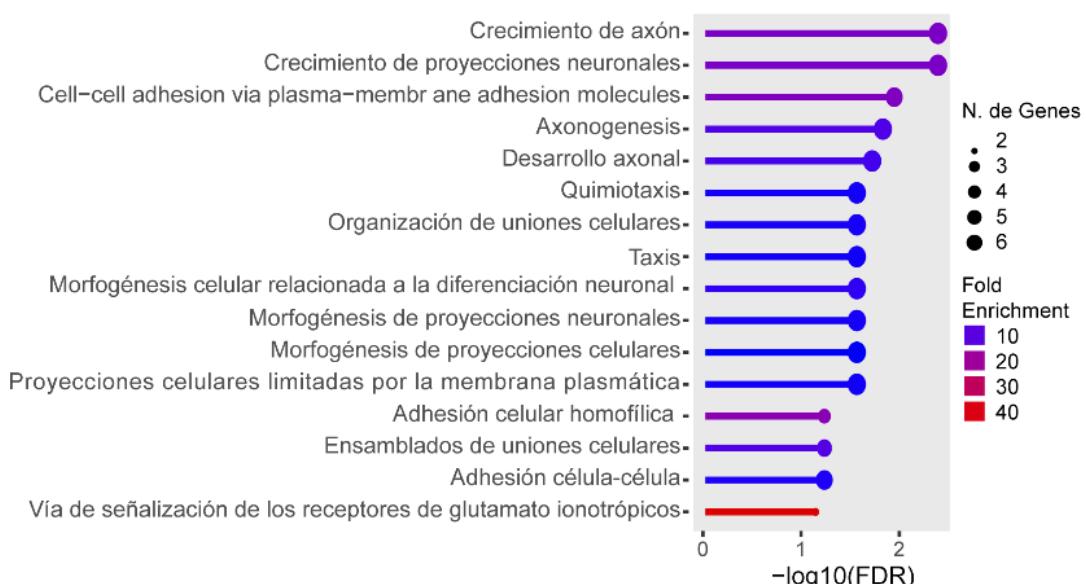


Figura 20. Análisis entre clusters NB1 vs NB2. (A) Gráfico de volcán para el análisis de genes con expresión diferencial ($FC \geq 1.5$ o ≤ -1.5 y $FDR \leq 0.05$) señalando ejemplos relevantes. FC: magnitud de cambio. FDR: tasa de falsos descubrimientos. (B) Términos GO calculados con genes que aumentaron y disminuyeron su expresión en la comparación entre NB1 vs NB2.

Por su parte, CGinm1 y CGinm2 comparten varios marcadores descriptos previamente para CG inmadura y están compuestos por células de 2 y 4 semanas de edad (Figuras 9-11, 13). A pesar de estas similitudes generales, el gráfico de volcán que compara estas particiones demuestra que CGinm2 presenta un perfil molecular que indica una fase de desarrollo más avanzada (Figura 22). Por ejemplo, CGinm2 expresa genes relacionados con la formación de sinapsis y plasticidad, como *Camk2a* y múltiples subunidades de receptores de glutamato: *Grm1*, *Grid1*, *Gria3*, *Grin2a*, *Grm5* y *Grm7* (Figura 22) (Chater & Goda, 2022; Gambrill & Barria, 2011; Yasuda et al., 2022). Estos hallazgos sugieren que en CGinm2 se inicia el ensamblado de un programa de sinaptogénesis glutamatérgica. A su vez, refuerzan lo observado en estudios electrofisiológicos previos, en los cuales se demostró que la sinapsis glutamatérgica comienza en aCGs de 2 semanas de edad (Espósito et al., 2005; Zhao et al., 2006).

En conclusión, los grupos iniciales, RGL, CPN y neuroblastos, representan diferentes estados celulares del proceso de diferenciación de las células madre neuronales hacia un estado neuronal postmitótico. Durante las transiciones dentro del tercer estado (NB a CGinm1 y luego a CGinm2), las aCGs en desarrollo incrementan sus capacidades funcionales mediante la incorporación de nuevas moléculas. Además, desactivan un número reducido de transcriptos, lo que sugiere un refinamiento progresivo de sus funciones.

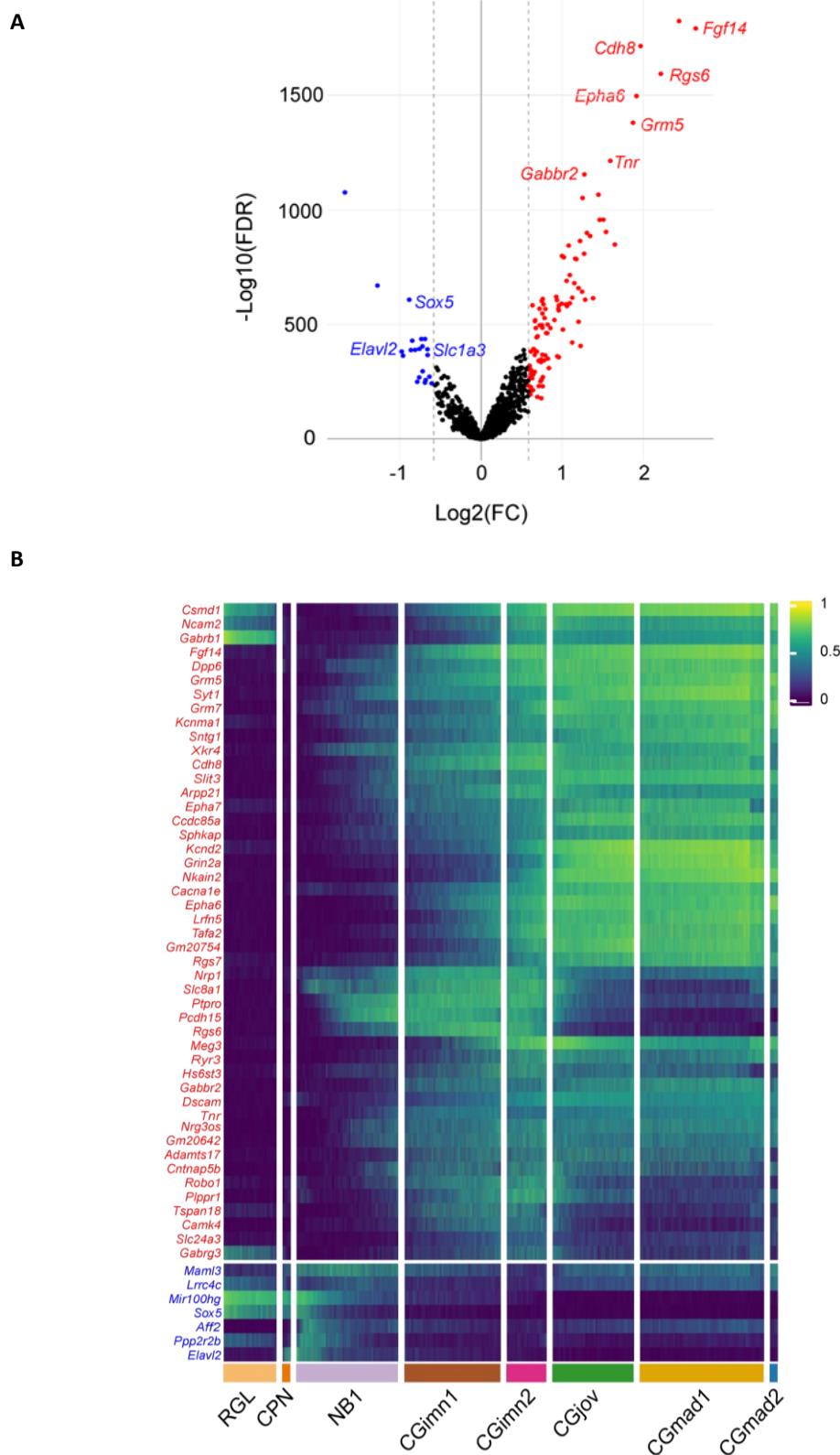


Figura 21. Análisis de la transición de NB1 a CGinm1 (A) Gráfico de volcán para el análisis de genes con expresión diferencial ($FC \geq 1.5$ o ≤ -1.5 y $FDR \leq 0.05$) señalando ejemplos relevantes. FC: magnitud de cambio. FDR: tasa de falsos descubrimientos. **(B)** Mapa de calor que representa la expresión normalizada de los GEDs, mostrando niveles de expresión aumentados (rojo) o disminuidos (azul) en todos los grupos (50 genes principales). La escala de pseudocolor de la derecha indica el nivel de expresión medio.

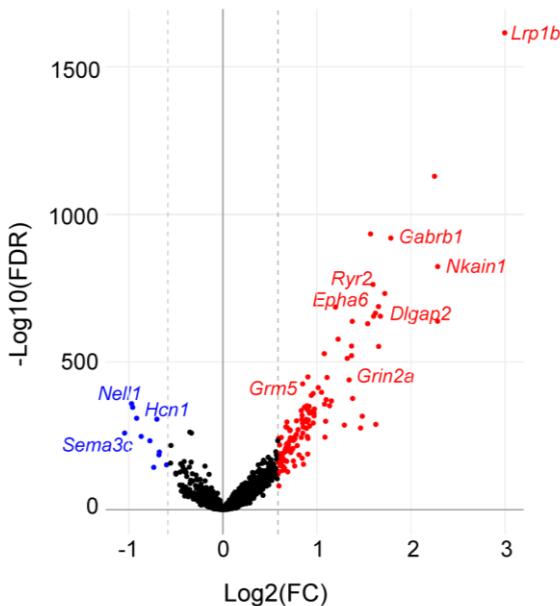
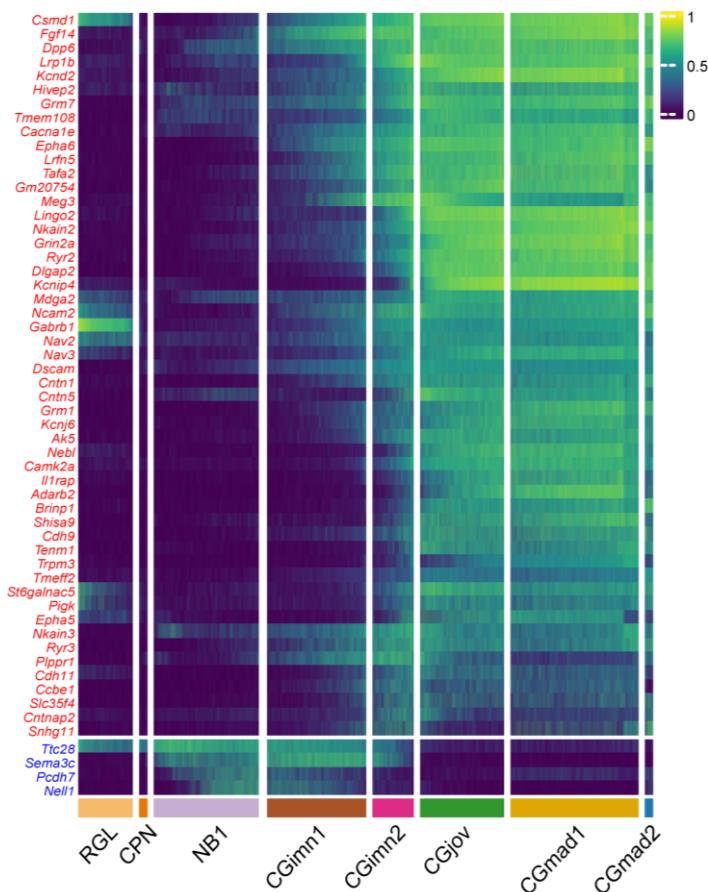
A**B**

Figura 22. Análisis de la transición entre CGinm1 y CGinm2. (A) Gráfico de volcán para el análisis de genes con expresión diferencial ($\text{FC} \geq 1.5$ o ≤ -1.5 y $\text{FDR} \leq 0.05$) mostrando ejemplos relevantes. FC: magnitud de cambio. FDR: tasa de falsos descubrimientos. (B) Mapa de calor que representa la expresión normalizada de los GEDs, mostrando niveles de expresión aumentados (rojo) o disminuidos (azul) los niveles de expresión en todos los grupos (50 genes principales). La escala de pseudocolor de la derecha indica el nivel de expresión medio.

Perfil molecular de neurotransmisión y actividad

El paso de CGinm2 a CGjov reveló un cambio importante que marca el final del periodo de inmadurez y el comienzo del cuarto estado (Figuras 14-17). Esta transición exhibe un gran número de GEDs, resaltando la complejidad requerida para alcanzar la maduración neuronal. De hecho, múltiples transcriptos que habían alcanzado su máxima expresión durante el desarrollo temprano, se apagan en CGjov como *Dcx*, *Igfbpl1*, *Rgs6*, *Sox4*, *Sox11* (Figuras 9 y 11). Es importante remarcar que durante esta transición un gran número de genes se desactiva, aunque la cantidad de genes que aumentan sus niveles de expresión, es mucho mayor.

Para comprender los cambios funcionales implicados en esta transición, realizamos un análisis de enriquecimiento de términos GO (Figura 23). Los genes que se apagan en esta transición están vinculados a términos GO relacionados con crecimiento axonal y desarrollo (Figura 23A), mientras que aquellos que orquestan la organización postsináptica, la transmisión y la plasticidad sináptica se activan durante este período (Figura 23B). El perfil de expresión de estos genes confirma que su expresión no sólo se desactiva en la transición de CGinm2 a CGjov, sino que además quedan en ese estado hasta el final de la maduración neuronal (Figuras 23C, D y 24). Del mismo modo, aquellos transcriptos cuya expresión aumenta en dicha transición, mantienen una expresión elevada hasta el final del proceso. Por ejemplo, *Kirrel3*, una molécula de adhesión sináptica aumenta su expresión durante esta transición. Estudios recientes demostraron que *Kirrel3* es fundamental para la formación de contactos de fibras musgosas en interneuronas GABAérgicas, proporcionando inhibición feed-forward en células piramidales de CA3 (Martin et al., 2015).

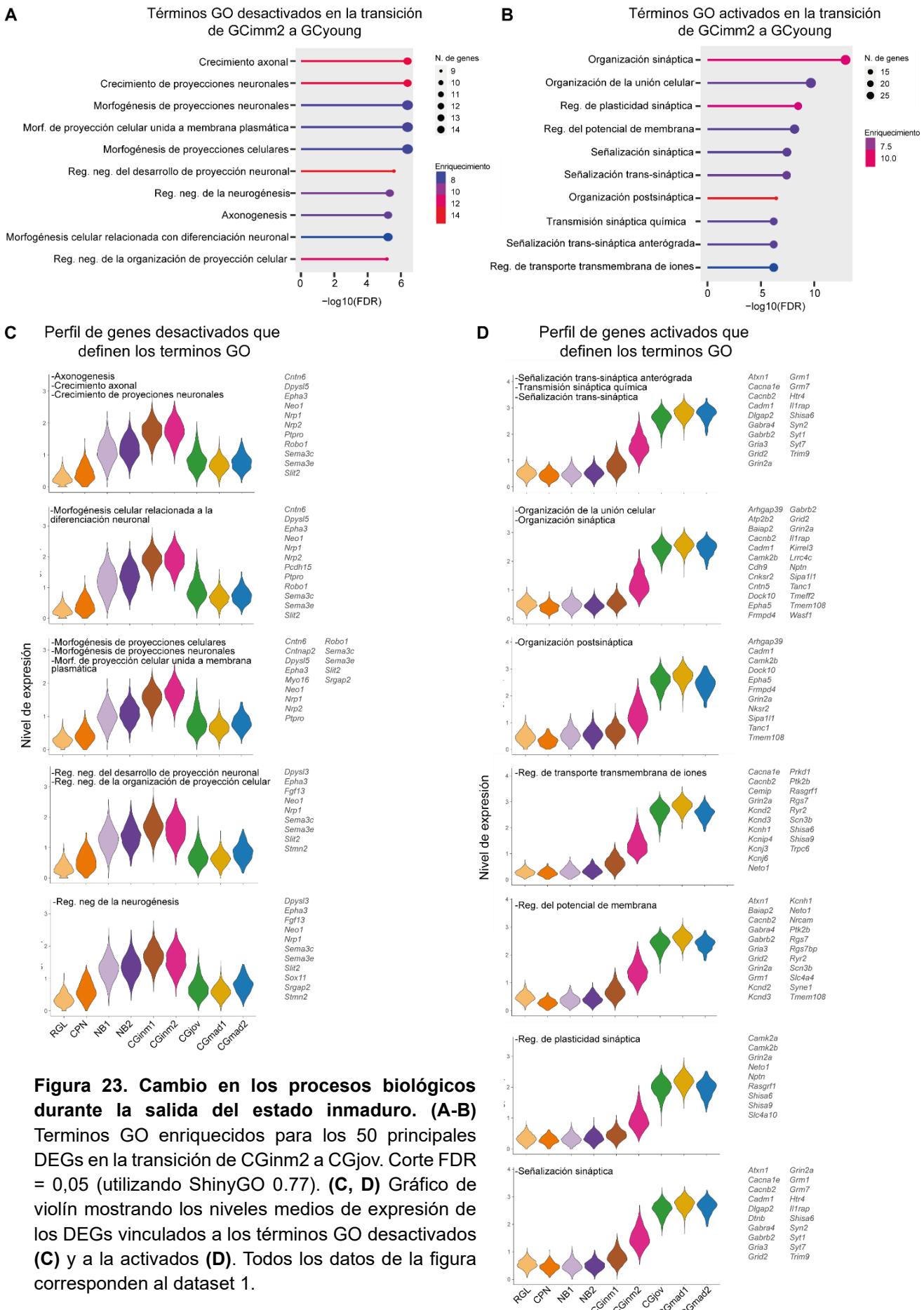


Figura 23. Cambio en los procesos biológicos durante la salida del estado inmaduro. (A-B)
Terminos GO enriquecidos para los 50 principales DEGs en la transición de CGimm2 a CGjov. Corte FDR = 0,05 (utilizando ShinyGO 0.77). **(C, D)** Gráfico de violín mostrando los niveles medios de expresión de los DEGs vinculados a los términos GO desactivados **(C)** y a la activados **(D)**. Todos los datos de la figura corresponden al dataset 1.

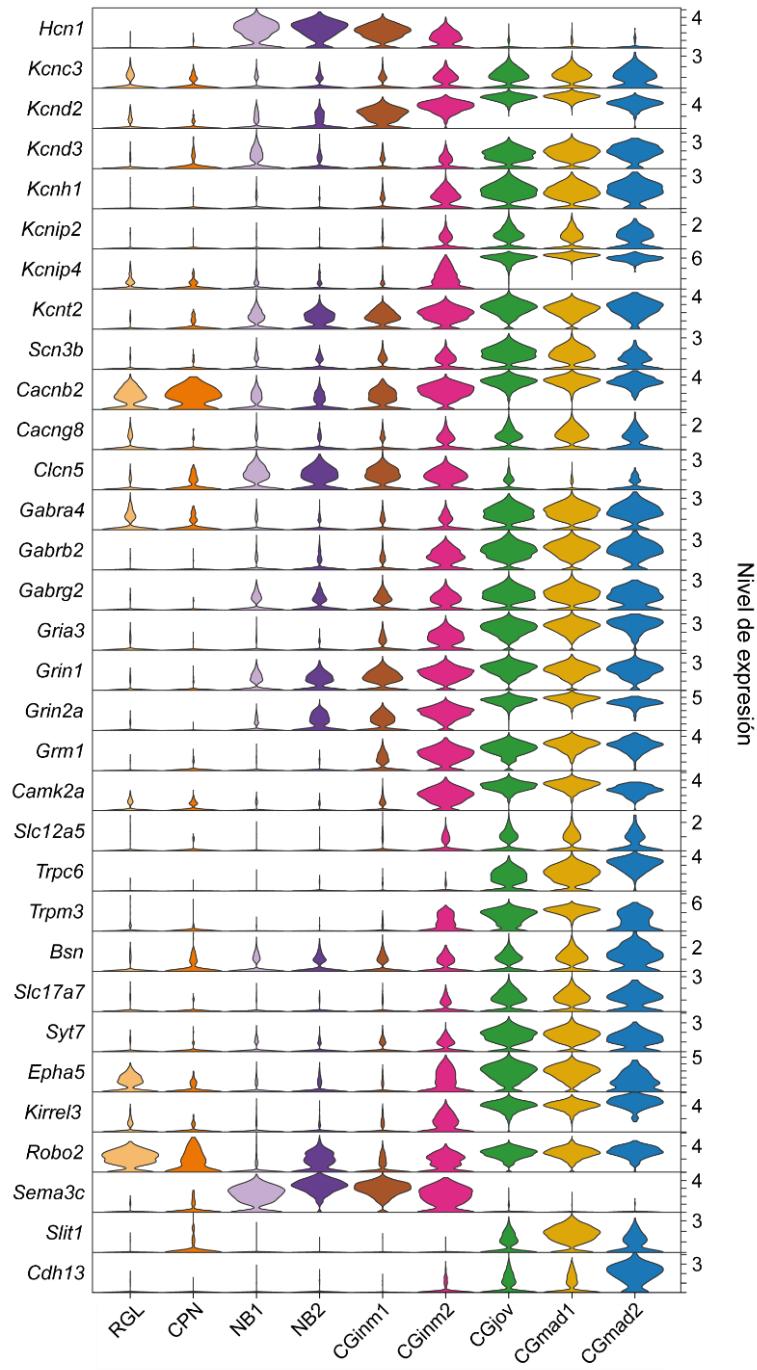


Figura 24. Genes con un rol crucial en la función de las aCGs aumentan su expresión en el cuarto estado. Gráfico de violín esquematizando la expresión de genes críticos para la función de aCGs.

A continuación, estudiamos la dinámica de expresión de genes efectores asociados con excitabilidad y neurotransmisión, incluyendo subunidades para los receptores de GABA (*Gabs*), glutamato (*Grs*), canales de Na⁺ (*Scn3b*), Ca²⁺ (*Cans*), y K⁺ (*Kcns*), así como moléculas de adhesión pre y postsinápticas (Figura 24). Los diagramas de espigas muestran que la expresión media de estos genes alcanza su punto máximo en el cluster CGjov, manteniéndose elevada hasta la última partición de

la trayectoria (Figura 25). Estas medias incluyen transcriptos como el transportador vesicular de glutamato *VGLUT1* (*Slc17a7*), el cotransportador K^+/Cl^- -KCC2 responsable de la conversión de la transmisión GABAérgica de excitatoria a inhibitoria (*Slc12a5*), y *Camk2a* y *Grin2a*, cruciales para la plasticidad sináptica (Figura 24). Los perfiles moleculares aquí estudiados se correlacionan con las propiedades electrofisiológicas de CGs de cuatro semanas de edad, que muestran alta excitabilidad y gran capacidad para potenciación sináptica glutamatérgica dependiente de actividad (Bergami et al., 2015; S. Ge et al., 2007; Gu et al., 2012; Marín-Burgin et al., 2012; Mugnaini et al., 2023).

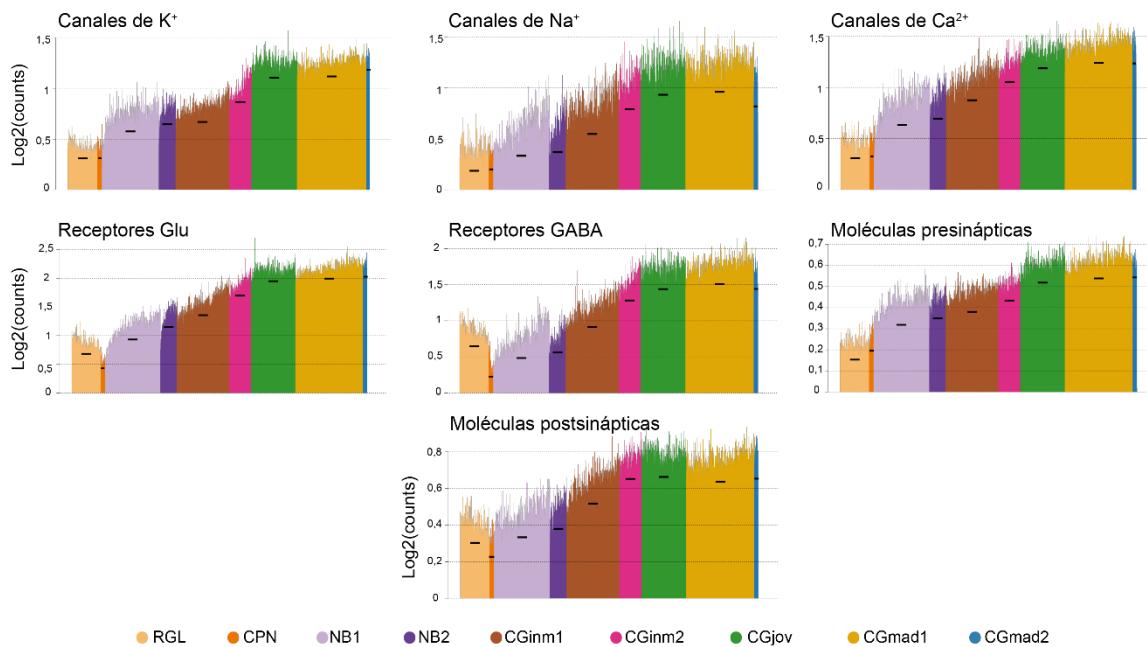


Figura 25. Expresión media de conjunto de genes efectores necesarios para la función neuronal en aCGs inmaduras. Diagrama de espigas que describen la expresión media de genes relevantes para la neurotransmisión (Tabla suplementaria 1). Los núcleos se ordenaron según su valor de pseudotiempo estimado. Los guiones negros muestran la expresión media del grupo de genes para cada cluster. Todos los datos de la figura corresponden al dataset 1.

Los clusters CGjov y CGmad1, correspondientes al cuarto estado, se observaron en los puntos temporales S4 y S8, respectivamente. Este es el intervalo en el que las aCGs se vuelven funcionalmente maduras (Marín-Burgin et al., 2012; Mongiat et al., 2009; Schinder et al., 2020). El gráfico de volcán de la transición entre CGjov y CGmad1 demuestra un bajo número de GEDs, y cambios sutiles en su nivel de expresión (Figura 26A, B). Un pequeño grupo de GEDs constituyen marcadores de CGmad1: *Car10*, *Chst9*, *Inpp4b*, *Ntng1* y *Rapgef5*. Otros genes fueron específicamente silenciados en CGmad1: *Lin7a*, *Meg3*, *Pcdh15*, *Plppr1* y *Slc8a1* (Figura 26C).

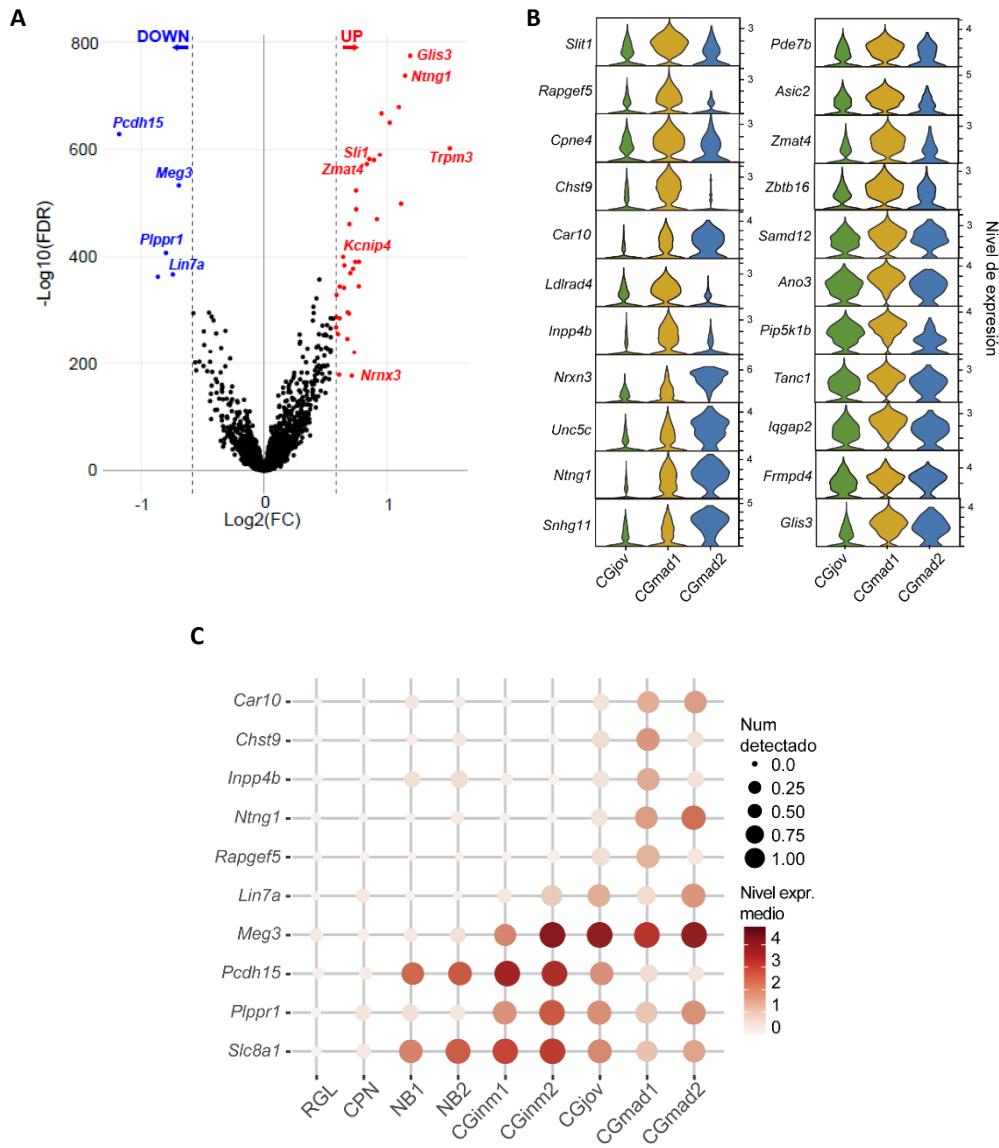


Figura 26. CGjov y CGmad1 muestran diferencias transcripcionales sutiles. (A) Gráfico de volcán para el análisis de genes con expresión diferencial ($\text{FC} \geq 1.5$ o ≤ -1.5 y $\text{FDR} \leq 0.05$) mostrando ejemplos relevantes. FC: magnitud de cambio. FDR: tasa de falsos descubrimientos. (B) Gráfico de violín describiendo el nivel de expresión de los GEDs activados en la transición de CGjov a CGmad1. Todos los datos de la figura corresponden al dataset 1. (C) Diagrama de puntos con los genes marcadores para CGmad1 y que disminuyen su nivel de expresión en CGmad1. Las escalas de la derecha corresponden a los niveles medios de expresión (color) y a la fracción de núcleos que expresan al menos un recuento del transcripto (tamaño del punto).

Como se mencionó anteriormente, las aCGs de 4 y 8 semanas presentan diferencias funcionales significativas (Bergami et al., 2015; S. Ge et al., 2007; Gu et al., 2012; Marín-Burgin et al., 2012). Sin embargo, los grupos CGjov y CGmad1 exhiben perfiles de expresión similares. Esta observación indica que la maduración fisiológica de estas células está modulada por factores adicionales a sus perfiles transcripcionales.

Por último, estudiamos el perfil molecular de CGmad2, un cluster pequeño, pero claramente definido, que contiene células de las cohortes S4 en adelante en ambos dataset (Figuras 10 y 13). CGmad2 presenta un mayor número de GEDs en comparación con CGmad1 (Figura 14). Específicamente, CGmad2 activa un conjunto de genes bien definidos, entre ellos *Acvr1c*, *Sorcs3*, *Nrxn3* y *Kcnip3*, cuya expresión ha sido reportada en células granulares activadas luego de una exposición corta a un ambiente enriquecido (Figura 27) (Jaeger et al., 2018). Entre ellos, *BDNF*, una neurotrofina cuya síntesis y secreción dependen de la actividad neuronal, sólo se expresó en este cluster (De Vincenti et al., 2019; Park & Poo, 2013). Además, se ha reportado previamente que *Rgs6* (un marcador de neuronas inmaduras) aumenta en las aCG de ratones corredores, y en nuestros datos está activado en CGmad2 (Gao et al., 2020). Curiosamente, *Cdh13*, un regulador negativo de la sinaptogénesis inhibitoria en el hipocampo, también se expresa en CGmad2 (Figura 24) (Mossink et al., 2022; Rivero et al., 2015).

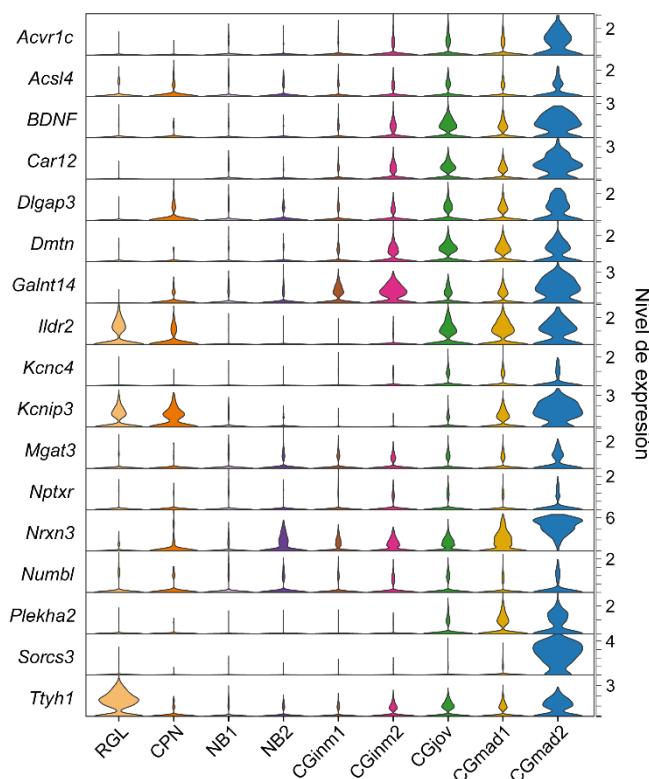


Figura 27. Huella molecular de CGmad2. Gráfico de violín exhibiendo la expresión de transcriptos inducidos por actividad (Jaeger et al., 2018). Todos los datos corresponden al dataset 1

Para confirmar este perfil dependiente de la actividad, se expuso a los ratones a un ambiente enriquecido durante 1 h, condición que aumenta la actividad neuronal de células granulares (Alvarez et al., 2016). Posteriormente se analizó el nivel de expresión de *Acvr1c*, gen expresado en CGmad2 (Figura 27), mediante hibridación *in situ* inmunofluorescente (RNAscope). La exposición a un ambiente enriquecido resultó en un marcado aumento de la expresión del receptor *Acvr1c* (Figura 28). Por lo tanto, se clasificó a CGmad2 como un clúster que contiene neuronas pertenecientes a los puntos temporales S4-S8 que podrían haber sido activadas eléctricamente antes de su aislamiento.

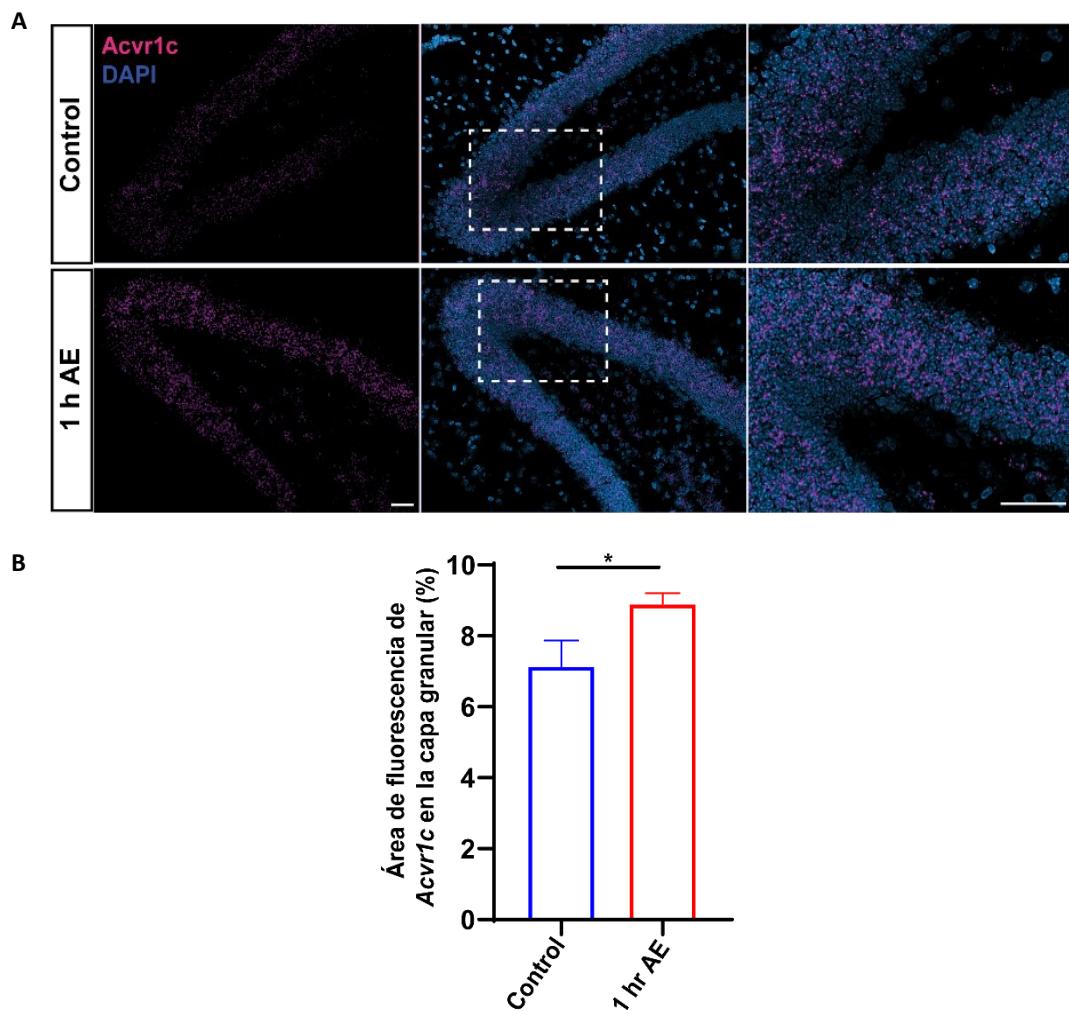


Figura 28. La exposición a un ambiente enriquecido aumenta la expresión de *Acvr1c* en la capa granular (A) Hibridación *in situ* revelando la expresión de *Acvr1c* inducida por actividad en la capa granular. Los ratones fueron expuestos a un ambiente enriquecido durante 1 hora (AE) o permanecieron en una jaula (control), y los hipocampos fueron congelados 5 horas después. Imágenes representativas de la expresión de *Acvr1c* (rosa) y DAPI (azul). Barras de escala, 50 μ m. Los recuadros delimitados con líneas discontinuas se amplían en los paneles de la derecha y representan zonas de la capa granular que expresan *Acvr1c*, donde se evidencia la ausencia de expresión en la zona subgranular. **(B)** Área de la capa granular que presenta fluorescencia de *Acvr1c* en ratones control y expuestos a AE. n = 10 secciones de 3 ratones (control) y n = 9 secciones de 3 ratones (AE). El asterisco (*) indica P < 0.05 en la prueba de Mann-Whitney. Los datos representan la media \pm SEM.

Validación de marcadores transcripcionales involucrados en la diferenciación de aCGs mediante hibridación *in situ*

Por último, algunos de los marcadores que surgieron de los análisis bioinformáticos se validaron mediante hibridación fluorescente *in situ*. El dot plot de la figura 29 muestra que *Slc1a3* es marcador de los estados 1 y 2, mientras que *Eomes* sólo se expresa en estado 2. *Igfbpl1* y *Elavl2*, son marcadores de estado 2 y 3; mientras que *Sema3c* y *Nell1* tienen expresión restringida en el estado 3 (Figura 29A, B). Los análisis *in situ* demuestran que la expresión de estos marcadores se limita a la capa interna de células granulares, donde se encuentran típicamente los estadios más tempranos de aCGs (Figura 30 A-F) (Encinas et al., 2006; Espósito et al., 2005; Mathews et al., 2010).

Bcl11b y *Plxna4* se expresan en los clusters del tercer y cuarto estado, mientras que *Cpne4*, *Slc17a7* y *Ptchd4*, son sólo marcadores del cuarto (Figura 29A, B). Las imágenes de hibridación *in situ* revelan que los genes del cuarto estado se expresan en la mayoría de las CGs maduras en toda la capa de granular, incluidas las aCGs (Figura 30A-F). Este resultado concuerda con lo ya descripto, reforzando que una vez maduras, las neuronas nuevas son indistinguibles de las nacidas en el desarrollo (Laplagne et al., 2006). Además, la especificidad de los marcadores se comprobó mediante su expresión combinada, mostrando patrones de etiquetado para cada estado celular o cluster, con distinta localización espacial.

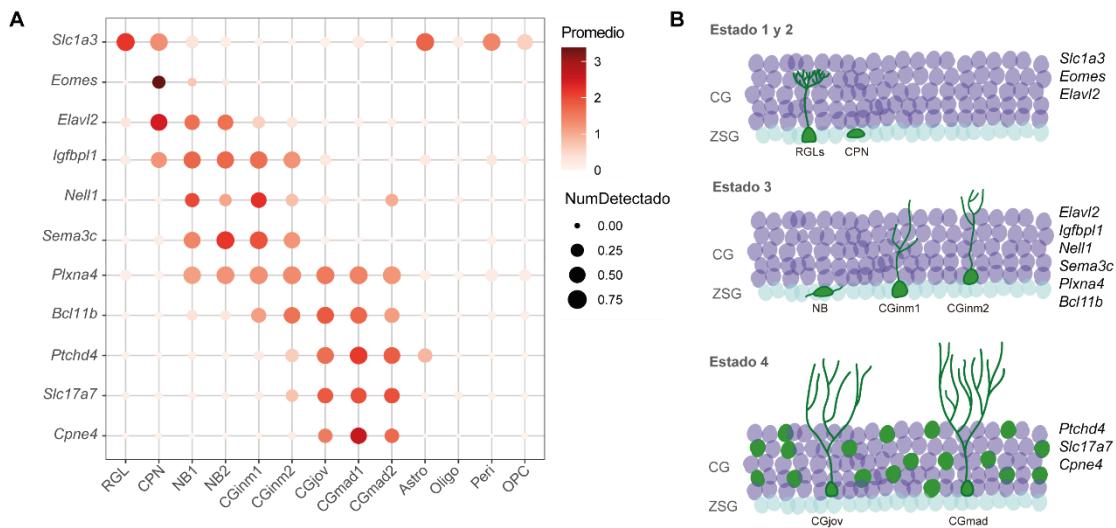


Figura 29. Expresión de marcadores específicos de estados celulares para su validacion por hibridacion *in situ* (A) Dot plot para la expresión de los marcadores a lo largo de los clusters. Las escalas corresponden al log2 (expresión génica media) (pseudocolor) y a la fracción de núcleos que expresan al menos un transcripto en el cluster (tamaño del punto). Todos los datos corresponden al dataset 1. **(B)** Representación esquemática de células pertenecientes a diferentes clusters (verde) distribuidos dentro de la capa granular (CG, púrpura) y la zona subgranular (ZSG; azul pálido). Los genes marcadores de cada estado celular se detallan a la derecha.

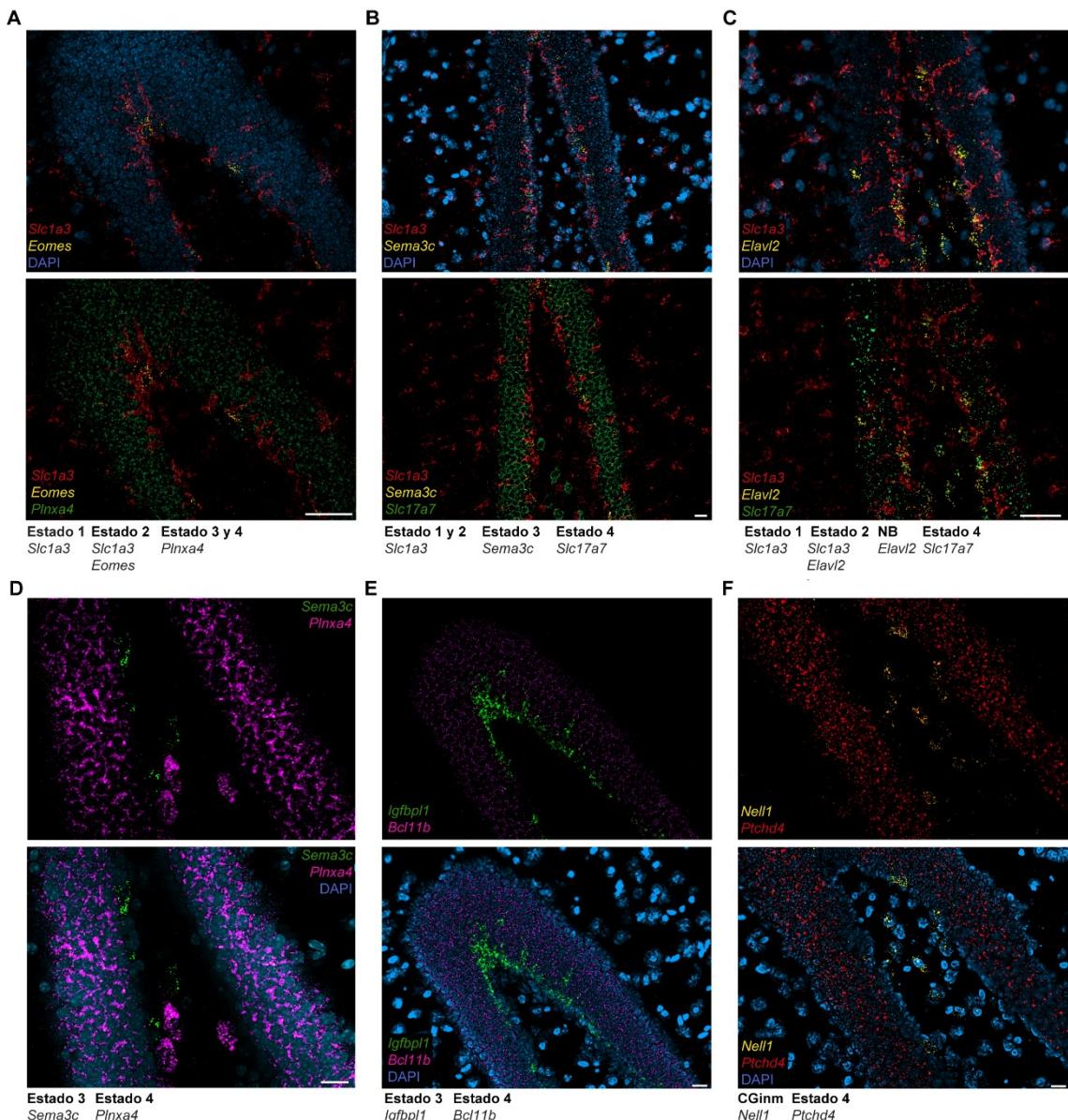


Figura 30. Validación espacial de marcadores específicos de estados celulares mediante hibridación *in situ* de ARN. Hibridación *in situ* de secciones del giro dentado de ratones de 6/7 semanas de edad. Ejemplo de imágenes de microscopía confocal por deconvolución. Se asignó un color distintivo a cada marcador. Las combinaciones de genes que definen los estados celulares se especifican debajo de los paneles. Los marcadores de estado 1, 2 o 3 se expresan en las células situadas cerca de la ZSG. Los marcadores del estado 4 se expresan en todas las CGs maduras, no sólo en las aCGs. Por lo tanto, las moléculas de ARN están distribuidas por toda la capa granular. Se utilizó DAPI (azul) para marcar los núcleos celulares. Barras de escala, 50 μ m.

Capítulo 3: Cambios de la regulación transcripcional subyacente a la maduración neuronal

Reguladores transcripcionales en las transiciones de estados celulares

Con el fin de identificar reguladores transcripcionales maestros en la trayectoria de desarrollo, evaluamos la expresión de los FTs y sus genes target (regulones; Figura 31). Para determinar los genes que constituyen cada regulón utilizamos SCENIC (ver Métodos), un algoritmo que identifica motivos conservados de unión al ADN en regiones reguladoras. Los regulones “extended” incluyen genes target inferidos por similitud en los motivos de unión, indicando que existe cierta variabilidad en las bases de la secuencia consenso. En particular, se consideraron los valores de especificidad de los regulones (RSS) para analizar cambios de actividad entre estados consecutivos (Suo et al., 2018).

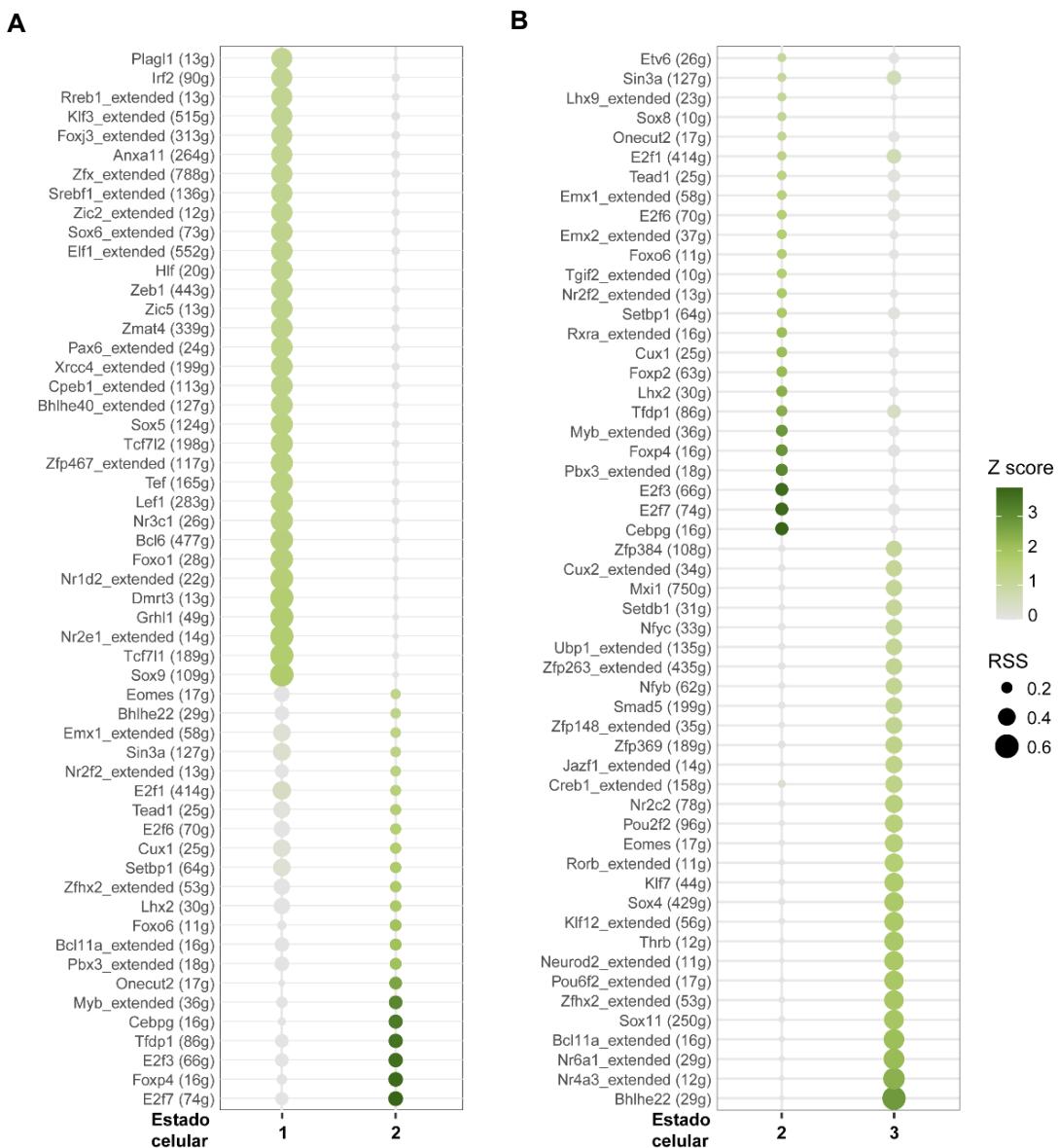


Figura 31. Expresión de regulones para los diferentes estados celulares tempranos. Análisis de regulones según niveles de expresión de los targets de cada FT, comparando el estado 1 y 2 (**A**), y 2 y 3 (**B**). El número de genes de cada regulón se muestra entre paréntesis. Los regulones extendidos incluyen target inferidas por similitud de motivos de unión. RSS: Indice de especificidad del regulón. La escala de colores de z score representa los valores estandarizados. El análisis se realizó utilizando SENIC.

La transición de los estados 1 a 2, y de 2 a 3 resalta genes implicados en programas biológicos que permiten el paso de estados quiescentes (*Sox6*, *Pax6*, *Sox5*, *Sox9*) a proliferativos (*Eomes*, *E2f1*, *E2f3*, *E2f6*, *E2f7*), y luego postmitóticos (*Neurod2*, *Sox4*, *Sox11*) (Figura 31).

La comparación entre el tercer y el cuarto estado (aCGs inmaduras a maduras) revela >20 regulones que muestran una expresión selectiva en el tercer estado, con altos niveles de especificidad y actividad para los genes de la familia SoxC: *Sox4* y *Sox11*. Los regulones presentes en el cuarto estado incluyen a *Bcl6*, *Foxo1*, *Anxa11*, *Tef* y *Hlf* (Figura 32). Se ha demostrado que todos estos FTs controlan las vías de señalización que regulan la homeostasis neuronal (Nahm et al., 2020; Schäffner et al., 2018; Valakh et al., 2023; Wiegreffe et al., 2022). Es decir, la eliminación de alguno de estos FTs puede generar crecimiento neuronal excesivo o hiperexcitabilidad de circuitos. La expresión media de los genes que componen estos regulones se representa en los gráficos de violín de la figura 33. Se observa un cambio abrupto en la expresión de estos genes entre los clusters CGinm2 y CGjov, particiones que delimitan la separación entre los estados 3 y 4 (Figura 33).

Sox4 y Sox11 en la regulación de la maduración neuronal

Sox4 y *Sox11* desempeñan un papel crítico en la diferenciación temprana y el crecimiento neuronal, tanto durante el desarrollo perinatal como en la neurogénesis adulta (Haslinger et al., 2009; Mu et al., 2012). Sin embargo, su función durante la maduración neuronal tardía sigue siendo desconocida. El apagado de los FTs de la familia SoxC en el último estado neuronal plantea dos posibles escenarios: 1) no son necesarios para la transición final y su baja en la expresión es un efecto secundario de un programa transcripcional global; 2) su ausencia es necesaria para que las neuronas en desarrollo realicen la transición final al estado maduro.

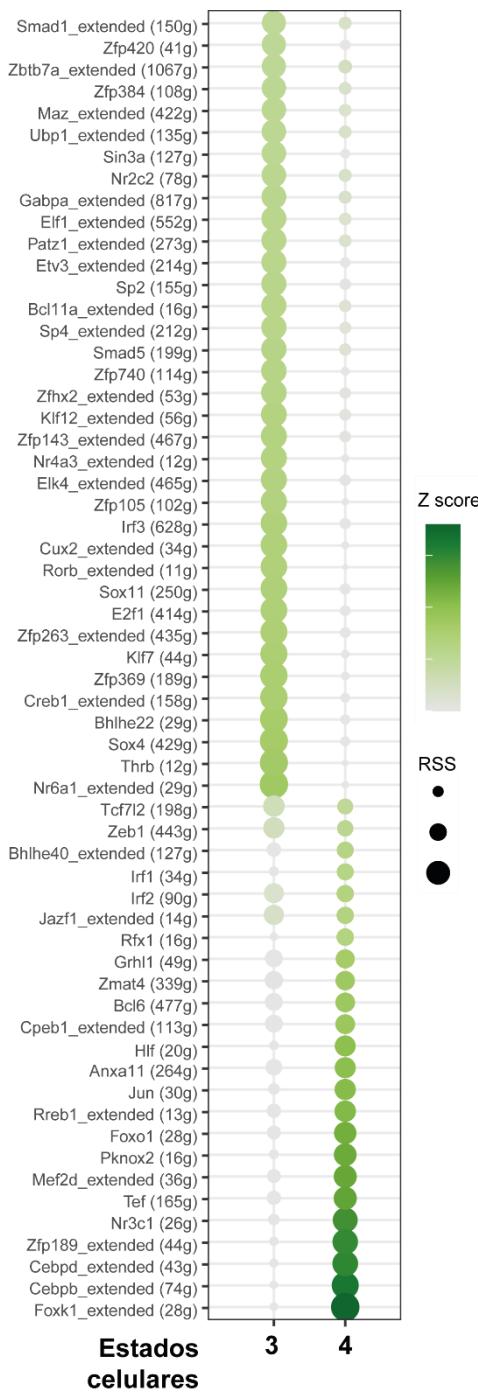


Figura 32. Expresión de regulones entre los estados celulares 3 y 4. Análisis de regulones basado en los niveles de expresión de los targets de cada FT comparando los estados 3 y 4. Cada regulón contiene genes target identificados por SCENIC. El numero de genes de cada regulon se muestra entre paréntesis. Los regulones extendidos incluyen targets inferidas por similitud de motivos de unión. RSS: indice de especificidad del regulón 46. La escala de colores de z score representa los valores estandarizados.

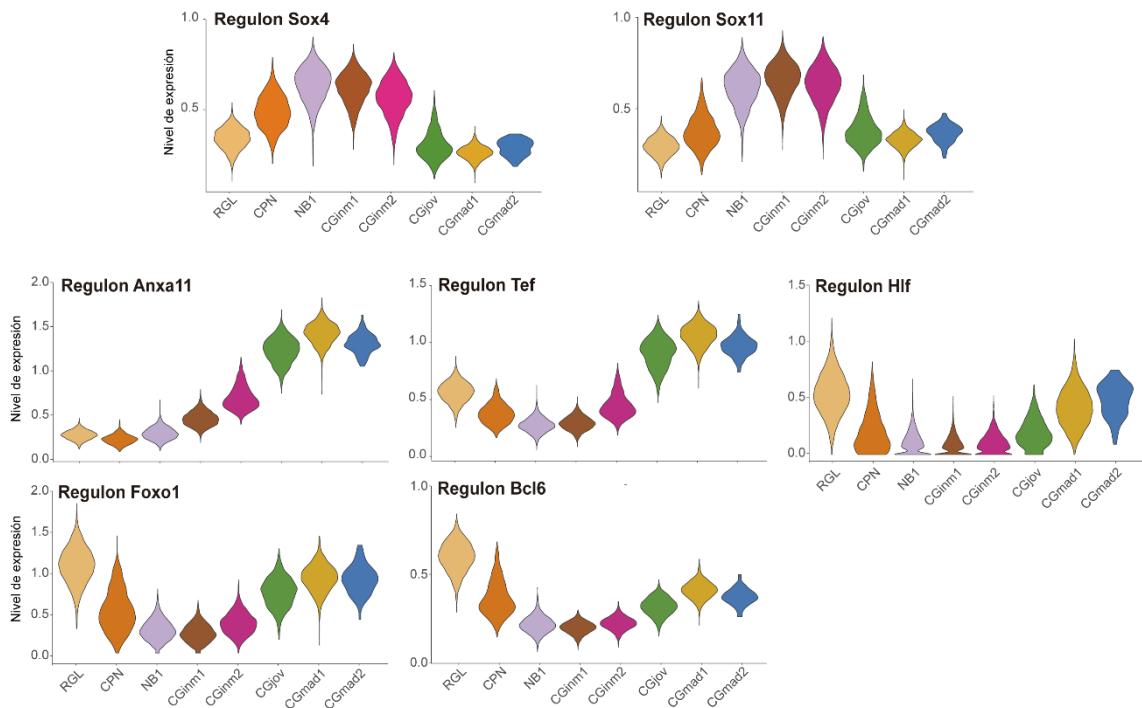


Figura 33. Dinámica de regulones de los estados celulares 3 y 4 a lo largo de los clústers. Violin plot para la expresión media de los transcriptos que componen los regulones indicados. Todos los datos de la figura corresponden al dataset 2.

Para discriminar entre estas posibilidades, investigamos el efecto de la expresión prolongada de *Sox4* o *Sox11* en la maduración de las aCGs. Se inyectaron retrovirus que sobreexpresan los FTs y la proteína fluorescente GFP, RV-*Sox4*-GFP o RV-*Sox11*-GFP, en el giro dentado de ratones adultos para infectar CPN mitóticas, coincidiendo con el inicio de la expresión endógena de *Sox4* y *Sox11*. El impacto de la sobreexpresión sostenida de estos FTs en la progenie neuronal se analizó a las 5 semanas post inyección, momento en el que las aCGs ya presentan un fenotipo maduro (Figura 34).

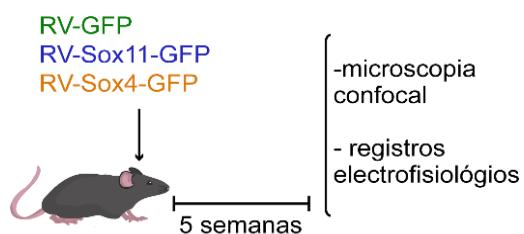
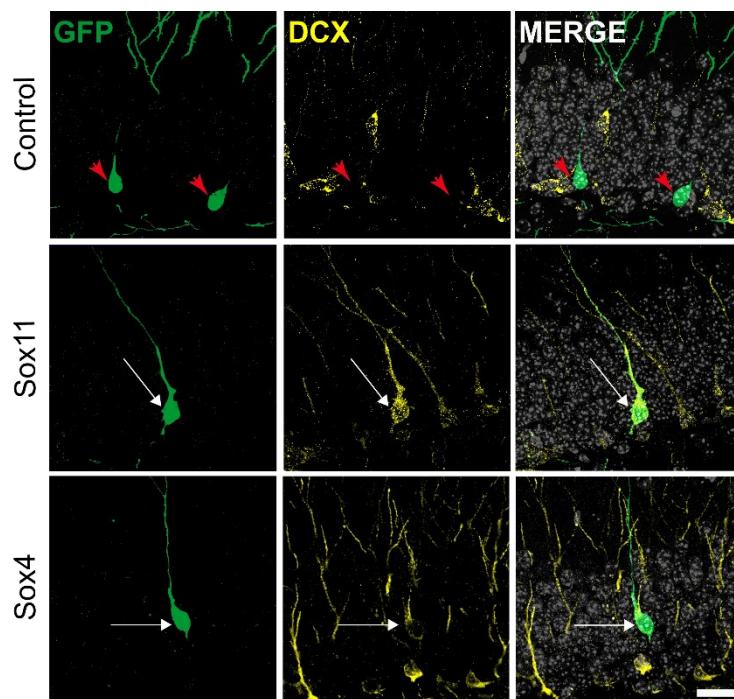


Figura 34. Esquema experimental de sobreexpresión de SoxC. Mediante la administración estereotáctica de RV-GFP, RV-*Sox11*-GFP o RV-*Sox4*-GFP según se indica, se marcó una cohorte de aCGs. Las CGs-GFP de 5 semanas post inyección se estudiaron morfológicamente por inmunofluorescencia y microscopía confocal. (Estado 4, CGmad).

Se estudió la persistencia en la expresión de DCX, marcador de inmadurez (expresión hasta la 2da semana del desarrollo neuronal) en aCGs maduras, tras la sobreexpresión de Sox4 y Sox11. Las imágenes de inmunofluorescencia revelan que DCX no se expresa en las aCGs control, sin embargo, su expresión se observa en el 60-80% de las neuronas que sobreexpresan Sox4 o Sox11. Este resultado demuestra que las neuronas que presentan una sobreexpresión sostenida de Sox4/11 durante su desarrollo no silencian la expresión de DCX, aún luego de 5 semanas (Figura 35).

A



B

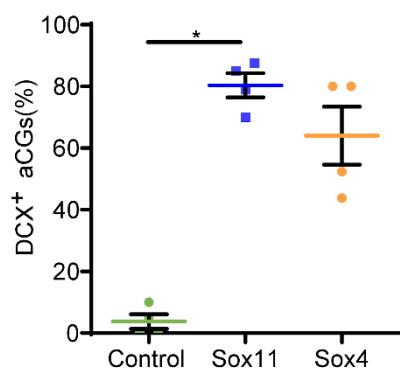


Figura 35. La sobreexpresión de SoxC prolonga la expresión de DCX (A) Imágenes confocales representativas de aCGs que expresan Sox11-GFP, Sox4-GFP o GFP (control) (verde) y DCX (amarillo). La colocalización se resalta con flechas blancas, y su ausencia con flechas rojas. Barras de escala, 20 μ m. (B) Proporción de neuronas GFP+ que expresan DCX, normalizada respecto al número total de neuronas GFP+. n = 20 neuronas/ratón. 4 ratones/condición. *P < 0,02, prueba de Kruskal-Wallis.

Posteriormente, y con el objetivo de caracterizar las propiedades electrofisiológicas de las aCGs maduras que sobreexpresan Sox11 (el miembro de SoxC con mayor potencial de transactivación (Kavyanifar et al., 2018), realizamos registros *ex vivo* de célula única en rodajas coronales de cerebro de ratón. Las aCGs de 5 semanas que sobreexpresan este FT exhiben propiedades electrofisiológicas típicas de aCGs inmaduras (Figura 36).

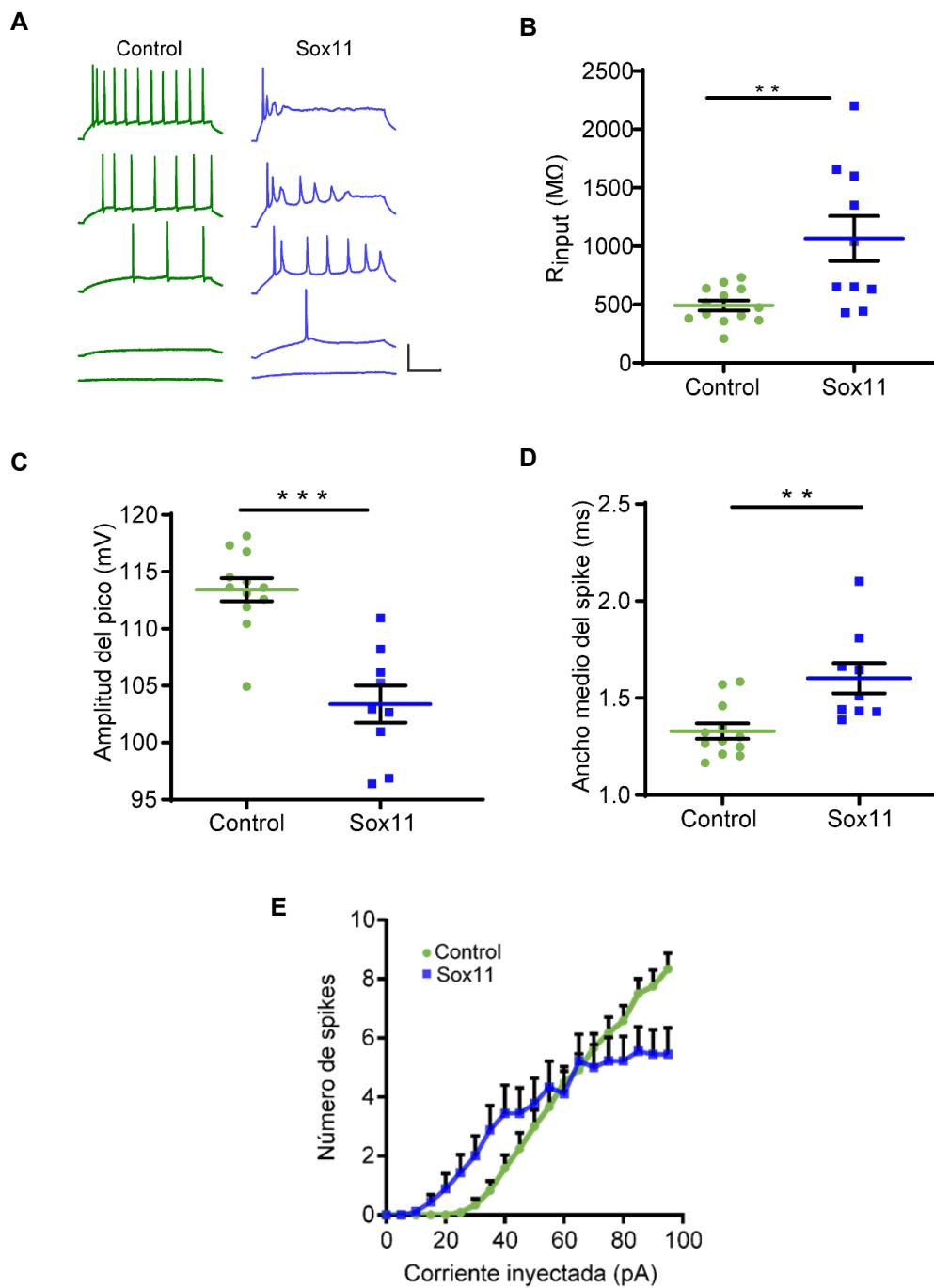


Figura 36. Estudios electrofisiológicos de células granulares en cortes coronales de aCGs que expresan RV-Sox11-GFP. (A) Trazos representativos de voltaje evocados por pulsos de corriente de amplitud creciente: 5, 20, 40, 60 y 95 pA. Escala: 50 mV, 100 ms. Potencial de reposo mantenido a -80 mV. (B) Resistencia de entrada (R_{input}). aCGs-GFP, n = 13; aCGs-Sox11, n = 10 (4 ratones/condición). **P < 0.005, t-test. (C-E) Potenciales de acción evocados por inyección de corriente (500 ms). Los gráficos muestran la amplitud del primer pico (C); el ancho medio del spike, medido a altura media y, (D) el número total de spikes por pulso (*P < 0.001) (E). Control, n = 11, y aCG- Sox11, n = 9 (4 ratones/condición). **P < 0.005 y ***P < 0.001. Los datos se expresan como media ± SEM. Experimentos realizados por M.G. Davies-Sala.

Se estudió la resistencia de membrana (R_{input}) que depende principalmente de la densidad de canales de K^+ en la membrana plasmática. Las neuronas inmaduras expresan menor densidad de canales y, por lo tanto, R_{input} es elevada (Espósito et al., 2005). Comparadas con los controles, las células que sobreexpresan Sox11 mostraron una R_{input} más alta que las aCGs controles (Figura 36B). También estudiamos la capacidad de disparar potenciales de acción (PA), una medida cuantitativa del grado de excitabilidad neuronal. Las aCGs que sobreexpresan Sox11 muestran valores de amplitud de pico y ancho medio, evocados por inyección de corriente, característicos de neuronas inmaduras de ~3 semanas de edad (Figura 36C, D) (Espósito et al., 2005; Mongiat et al., 2009). Finalmente, se midió la frecuencia de disparo de PAs en respuesta a inyecciones sucesivas de escalones de corriente. Las aCGs infectadas con RV-Sox11 exhiben menor capacidad para disparar potenciales de acción repetitivos comparadas con los controles (Figura 36E). En conjunto, estos resultados indican que la sobreexpresión prolongada de Sox4 o Sox11 mantiene a las aCGs en un estado con características de neurona inmadura (Mongiat et al., 2009; Piatti et al., 2011).

Por lo tanto, concluimos que silenciar la expresión de los FTs SoxC es una condición necesaria para que las aCGs en desarrollo alcancen su estadio de maduración final. La transición del estado inmaduro al maduro constituye una transformación crítica impulsada por un cambio transcripcional fuerte y único, que apaga cascadas moleculares que promueven el crecimiento celular y activa un estado final que parece estar dominado por factores que controlan la homeostasis neuronal.

DISCUSIÓN

Caracterización transcripcional de la neurogénesis adulta: diferenciación y maduración funcional de las aCGs en el hipocampo

Las bases moleculares que regulan la diferenciación e integración funcional de las aCGs son en gran medida desconocidas. La secuenciación de ARN de célula única (scRNA-seq) ha demostrado ser una herramienta fundamental para distinguir tipos celulares, describir trayectorias de linaje celular, identificar nuevos genes que impulsan la maduración, y construir redes reguladoras de genes (Armand et al., 2021; Cardona-Alberich et al., 2021; Zeisel et al., 2015).

Las aCGs nacidas en el hipocampo adulto representan una pequeña proporción de la población total del giro dentado. Debido a esto, fue crucial utilizar métodos de etiquetado y purificación altamente precisos para evitar la contaminación con CGs maduras. En los últimos años, varios trabajos han intentado capturar el proceso completo de neurogénesis adulta mediante datos transcriptómicos (Kalinina & Lagace, 2022). Shin y colaboradores, aprovechando los ratones transgénicos Nestin-CFPnuc, generaron por primera vez un conjunto de datos transcriptómicos a nivel de célula única (Shin et al., 2015). A partir de una población mixta de células precursoras, describieron las cascadas moleculares responsables de la activación de RGLs quiescentes y el inicio de la neurogénesis. En aquel trabajo, también se desarrolló una línea de análisis bioinformático denominada Waterfall que permitió diferenciar entre RGLs quiescentes y activas, y CPNs, basándose en la expresión diferencial de genes como de *Aldoc*, *Hopx* y *Stmn1*. En otro elegante trabajo, se logró extender la ventana temporal estudiada, examinando aCGs de hasta 2 semanas de maduración (Habib et al., 2016). Utilizando snRNA-seq combinado con pulsos de EdU, un análogo de timidina, siguieron las dinámicas de expresión de genes como *Sox9* y *Notch1*. En lugar de generar clusters celulares en distintos estadios de maduración, el trabajo reveló una progresión continua en la expresión génica. Los trabajos descriptos hasta aquí sugieren que el proceso molecular de neurogénesis adulta, al menos durante los primeros 14 días, sigue una trayectoria continua.

A pesar de los avances, los experimentos de scRNA-seq enfrentan desafíos técnicos, entre ellos la importante pérdida de ARN mensajeros durante la transcripción inversa (Saliba et al., 2014). Para superar esta limitación, Hochgerner y colaboradores llevaron a cabo un análisis transcriptómico a mayor escala (Hochgerner et al., 2018). Su trabajo examinó el desarrollo del giro dentado de ratones en diferentes etapas del

desarrollo, desde estadios embrionarios, perinatales, juveniles, y hasta adultos. Así demostraron que los fundamentos moleculares del proceso neurogénico se mantienen a lo largo de la vida del animal. Además, lograron distinguir transcripcionalmente por primera vez RGLs y astrocitos. En este estudio, las neuronas nacidas en etapas adultas no fueron específicamente marcadas. Como resultado, las aCGs se infirieron por sus estadios de maduración incipiente, pero formaban un continuo con las CGs nacidas en el desarrollo. Esto redujo la resolución temporal y dificultó la identificación de firmas transcripcionales para distintos estadios de maduración de las aCGs.

En este trabajo, llevamos a cabo un análisis transcriptómico exhaustivo para estudiar la diferenciación y maduración funcional de las aCGs. Nuestra estrategia consistió en el análisis de 6 cohortes de aCGs a lo largo de su trayectoria de desarrollo, asignando marcas temporales precisas a cada estadio (S1, S2, S3, S4, S5 y S8). Para obtener un conjunto de datos específico de neuronas nuevas y con mayor resolución temporal, aprovechamos el modelo de ratón transgénico que permite identificar de manera selectiva a la neurogénesis adulta, *Ascl1*^{CreERT2};CAG^{floxStopSun1sfGFP}. Este modelo experimental permite la expresión condicional de Sun-1/sfGFP en la membrana nuclear de las aCGs tras la administración de tamoxifeno. Una vez etiquetadas las células nuevas, aislamos el giro dentado de estos ratones en tiempos específicos posteriores a la inducción de la fluorescencia y purificamos los núcleos GFP+ por FACS. A continuación, se realizó la secuenciación de ARN de núcleo único y el procesamiento de los datos transcriptómicos resultantes. El análisis mediante clusterización no supervisada de dos datasets independientes (dataset 1: S1, S2, S4 y S8; dataset 2: S2, S3, S4, S5 y S8) identificó de manera reproducible múltiples particiones que definen una trayectoria transcripcional de diferenciación desde RGL hasta un fenotipo neuronal maduro. Además, caracterizamos varias particiones que representan estadios intermedios de maduración hasta ahora no descriptos.

Aunque estudios previos han demostrado que la progenie de Ascl1 incluye astrocitos, RGLs y CPNs, nuestros datos también revelaron un clúster que contenía OPCs (Kim et al., 2007; Yang et al., 2015). Trabajos recientes comprobaron que los OPC activan Ascl1, lo que sugiere que el etiquetado indeleble utilizado en nuestra estrategia experimental podría haber marcado a la progenie oligodendrocítica (Sueda & Kageyama, 2021). A su vez, nuestros datos exhiben la presencia de pericitos, aunque estos no han sido descriptos como linaje de Ascl1. Esto, sumada a la escasa cantidad de pericitos en el conjunto de datos, sugiere una expresión transitoria de Ascl1 en esta población, o bien una expresión inespecífica de la recombinasa CreERT2. Dado que nuestro estudio se enfoca en la neurogénesis adulta y que estos clústeres, no descriptos

anteriormente como progenie de Ascl1, contienen un número reducido de células consideramos que la interpretación de los datos transcriptómicos no se ve comprometida.

En contraste con los trabajos mencionados, este estudio caracterizó el desarrollo completo de las células granulares nacidas en el hipocampo adulto, abarcando neuronas de distintas edades. La técnica utilizada de purificación nuclear permitió secuenciar casi 40,000 células granulares adultas. Esta aproximación resultó en una alta resolución temporal, y de este modo se han logrado identificar nuevos estadios celulares previamente desconocidos en el proceso de neurogénesis adulta. La combinación de dicha resolución temporal y el tamaño de la muestra fue crucial para obtener precisiones moleculares sobre este proceso. Estos resultados posibilitan explorar las diferencias entre las etapas de maduración celular y abre nuevas posibilidades para investigar genes individuales que podrían estar involucrados en la neurogénesis y la diferenciación neuronal.

Redefiniendo la neurogénesis adulta: transiciones moleculares y heterogeneidad celular revelada por transcriptómica de célula única

Antes de la llegada de la transcriptómica de célula única, la neurogénesis adulta fue ampliamente estudiada mediante enfoques inmunohistoquímicos, morfológicos y electrofisiológicos. En particular, las fases tempranas del desarrollo neuronal han sido caracterizadas en profundidad mediante inmunohistoquímica. Las RGLs, anteriormente denominadas como células de tipo 1, dan origen a las células progenitoras intermedias (células de tipo 2), que a su vez se dividen en subpoblaciones de tipo 2a y 2b. Las células de tipo 2a se caracterizan por su elevada actividad proliferativa, expresan marcadores gliales y carecen de la morfología característica de las células radiales. Tanto las células de tipo 1 como las de tipo 2 expresan Nestina, un marcador asociado con el compromiso neuronal. A su vez, las células de tipo 2b también expresan DCX y Prox1, marcadores que indican un estado neuronal más avanzado (Steiner et al., 2006). Asimismo, las células de tipo 2 también se definen por la expresión de Eomes (Tbr2), un factor de transcripción crítico para la transición de células madre a células progenitoras intermedias (Hodge et al., 2008). Las células de tipo 3, son células DCX+ descritas como neuroblastos, que muestran una actividad proliferativa limitada y representan una etapa más avanzada en la diferenciación neuronal.

Si bien este enfoque tradicional ha sido extremadamente informativo para comprender los pasos iniciales de la neurogénesis, presenta limitaciones importantes. Sólo permite la detección de un número limitado de proteínas, contra las cuales se hayan diseñado anticuerpos. En cambio, las técnicas modernas de secuenciación de alto rendimiento de célula única, capturan una mayor cantidad de genes expresados, permitiendo definir clústeres (heterogeneidad celular) de forma imparcial y más sensible. La importancia de este trabajo de tesis radica en la cantidad de datos obtenidos, que permiten una visión integral, específica, y detallada del proceso de neurogénesis adulta, revelando nuevas transiciones moleculares que antes no pudieron ser detectadas.

Estos datos transcriptómicos han llevado a la redefinición de varios de los estadios celulares previamente descriptos según la expresión de proteínas. Nuestros resultados revelan que CPN es el único clúster mitótico que expresa genes del ciclo celular. A diferencia de lo que se sabía de estudios de inmunohistoquímica, los neuroblastos son células postmitóticas, con compromiso neuronal, que carecen de capacidad proliferativa. Identificamos dos tipos de neuroblastos: NB1 (*Sox4+*, *Sox11+*, *DCX+*, *Calb2-*, *Tac2-*) que emerge de las CPN, y NB2 (*Sox4+*, *Sox11+*, *DCX+*, *Calb2+*, *Tac2+*) que se desprende de NB1, formando una vía paralela que confluye en CGinm1. Estas dos poblaciones ya fueron descritas anteriormente, aunque los neuroblastos se observan secuencialmente y en orden inverso (Hochgerner et al., 2018). Esta diferencia podría deberse a que aquellos neuroblastos proceden principalmente de estadios postnatales tempranos (p12 y p16), y no fueron purificados de cerebro adulto como se hizo en este trabajo.

Las particiones CGinm1 y CGinm2 están compuestas principalmente por aCGs de entre 2 a 4 semanas de edad, y expresan marcadores característicos de neuronas inmaduras, como *DCX+*, *Igfbp1+* y *Camk4+*. La transición hacia CGinm2 revela una regulación positiva de más de 100 genes, incluidos aquellos relacionados con la transmisión glutamatérgica, como *Grm1+*, *Grid1+*, *Gria3+*, *Camk2a+*, *Grin2a+*, *Grm5+* y *Grm7+*. Este aumento en la expresión coincide con el establecimiento de la sinaptogénesis aferente proveniente de la corteza entorrinal, reportada alrededor de la segunda semana de desarrollo neuronal (Chancey et al., 2013; Espósito et al., 2005; S. Ge et al., 2006; Zhao et al., 2006). Este hallazgo sugiere que CGinm2 representa la transición molecular que acompaña el inicio de la sinaptogénesis glutamatérgica.

A medida que la célula avanza hacia el estado CGjov, se produce un fuerte cambio transcripcional. Por esto, la célula sintetiza moléculas esenciales para el establecimiento del fenotipo neuronal maduro, siendo capaz de integrarse

funcionalmente en el circuito preexistente y procesar información. Aunque estas células ya expresan los genes funcionales fundamentales, aún no están completamente conectadas. De hecho, se ha descripto que las aCGs de 4 semanas de edad (fase III, Figura 3) presentan una inhibición perisomática GABAérgica que resulta insuficiente para compensar el aumento de la densidad de las sinapsis glutamatérgicas. Esto genera una elevada tasa de excitación/inhibición que facilita la plasticidad sináptica dependiente de la actividad (Groisman et al., 2020; Marín-Burgin et al., 2012). Múltiples genes efectores relacionados con neurotransmisión y plasticidad alcanzan niveles máximos de expresión en CGjov, desde el transportador vesicular presináptico de glutamato *S/c17a7* y la liberación vesicular *Syt7*, hasta los receptores postsinápticos de glutamato y GABA. Dado que CGjov contiene predominantemente células de semana 4, proponemos que este clúster corresponde a las aCGs con excitabilidad y plasticidad sináptica aumentadas, descritas ampliamente en la literatura (Bergami et al., 2015; S. Ge et al., 2006, 2007; Gu et al., 2012; Marín-Burgin et al., 2012; Mugnaini et al., 2023). A pesar de contener los componentes básicos necesarios para la función neuronal, las aCGs de 4 semanas aún no han alcanzado su maduración completa, debido a su bajo acoplamiento a la red inhibitoria. Finalmente, la transición entre CGjov y CGmad1 sólo involucra un aumento en el nivel de expresión de moléculas ya expresadas, consolidando así el fenotipo neuronal maduro. Morfológica y fisiológicamente, las neuronas nuevas de 8 semanas (fase IV, Figura 3), se caracterizan por un aumento de los aferentes glutamatérgicos, junto con una maduración de la inhibición perisomática y dendrítica GABAérgica (Groisman et al., 2020; Remmers et al., 2020; Toni et al., 2007). Esto conlleva una disminución de la excitabilidad y, en consecuencia, de la plasticidad sináptica, haciendo que las aCGs sean indistinguibles de las neuronas nacidas en el cerebro en desarrollo embrionario (Laplagne et al., 2006, 2007; Marín-Burgin et al., 2012). Finalmente, encontramos pocos transcriptos con expresión exclusiva en la transición de CGjov a CGmad1, lo que sugiere que el clúster CGjov representa la fase inicial del último paso de maduración, el cual se consolida gradualmente con el tiempo.

El clúster CGmad2 se identificó como un grupo de células con una firma genética dependiente de actividad (Jaeger et al., 2018). Por lo tanto, se describe como una partición que contiene aCGs de 4-8 semanas que fueron activadas en algún momento antes de la disección del giro dentado. Recientemente, Erwin y colaboradores describieron un subgrupo de CGs del giro dentado que se activa preferencialmente ante experiencias dependiente del hipocampo, representando solo el 5% de la población total de CGs. Este subgrupo de células granulares, denominadas semilunares, presenta una morfología, fisiología, localización espacial y expresión génica específicas (Erwin et al.,

2020). Si bien encontramos una firma transcripcional similar (*Sorcs3*, *Necab3*, *Rgs4*, y *Nefm*) en CGmad2, aún es necesario investigar si esta expresión se correlaciona con células que comparten las propiedades morfológicas y fisiológicas distintivas descriptas en aquel trabajo.

Es relevante señalar que las diferencias moleculares observadas entre las células maduras activas (CGmad2) y las no activas (CGmad1) son mucho más pronunciadas que aquellas detectadas entre las células CGjov y CGmad1. Aunque una parte de esta diferencia podría explicarse por la activación de las neuronas (según lo informado por Jaeger et al., 2018), no son las únicas células que expresan genes dependientes de actividad. Por otra parte, una gran proporción de los transcriptos diferencialmente expresados en CGmad2 no estarían relacionados con actividad neuronal. Esto sugiere que la neurogénesis adulta podría aportar un grupo de aCGs no descripto hasta el momento.

Dinámicas moleculares de la neurogénesis adulta: estados celulares, regulones clave y homeostasis como estado final de maduración neuronal

El análisis de los GEDs, la trayectoria de pseudotiempo y la expresión de los FTs reveló tres transiciones críticas que definen cuatro estados celulares: RGL, NPC, neuronas inmaduras (NB1 a CGimm2), y un estado neuronal maduro (CGjov y CGmad; Figura 37).

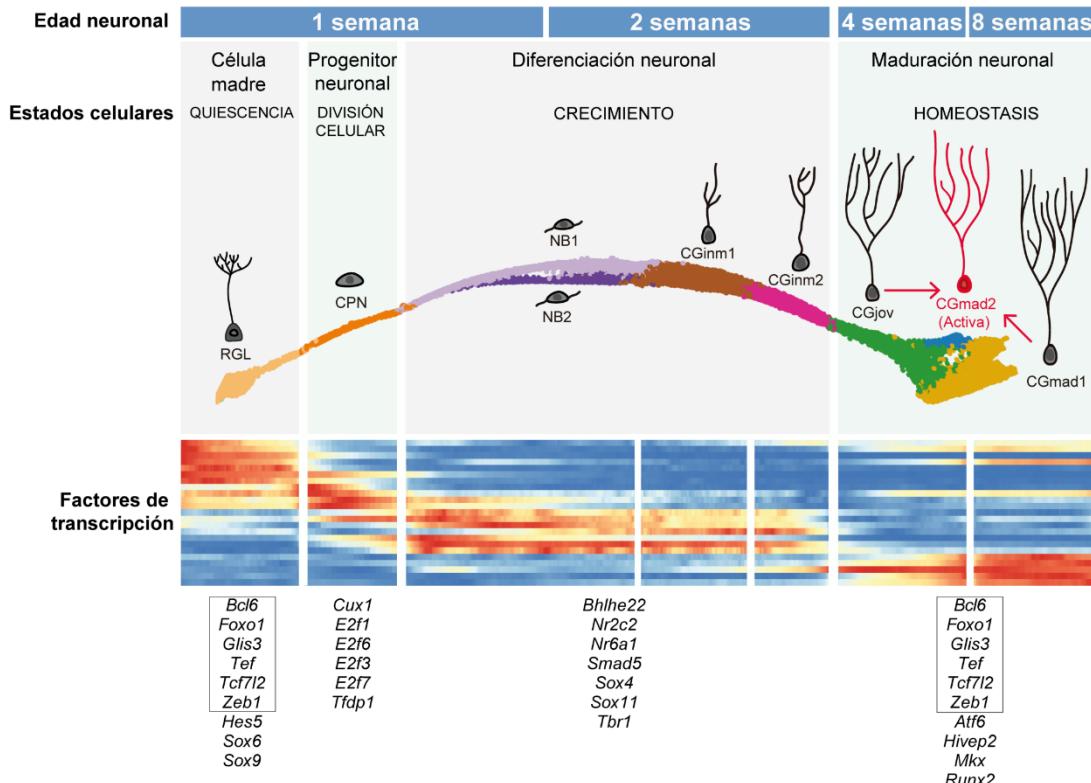


Figura 37. Representación esquemática de los estados celulares durante la maduración de las aCGs. El perfil transcriptómico de las aCGs en desarrollo revela una trayectoria molecular continua dividida en nueve clústers. A su vez, estos clústers se agrupan en cuatro estados celulares, definidos con precisión por la activación y desactivación de FTs específicos. A lo largo del proceso de maduración, que abarca aproximadamente 8 semanas, distintos FTs y genes efectores orquestan las características de los procesos biológicos de estos estados. Las RGLs abandonan el estado de quiescencia para volverse mitóticas (estado de división celular). Las CPNs en división adquieren rápidamente un destino neuronal, y comienza un estado de crecimiento celular. Estos pasajes se producen durante la primera semana de desarrollo. Las neuronas postmitóticas expresan un amplio número de FTs que impulsan la diferenciación. Hacia la cuarta semana, el crecimiento celular alcanza una meseta y los programas expresados previamente se apagan, dando paso a la activación de FTs que regulan la homeostasis de la función neuronal. El mapa de calor (panel inferior) muestra la expresión de los FT representativos listados debajo. Los FTs recuadrados se expresan tanto en el estado quiescente como en el homeostático.

Nuestros análisis demuestran que estas transiciones son críticas según: 1) el gran número de genes que modifican significativamente su expresión entre transiciones (evidenciado por los GEDs); 2) los cambios de los programas biológicos que caracterizan cada estado (evidenciado por los patrones de expresión de FTs); y 3) la acumulación de núcleos en los distintos clusters que definen los estados celulares (evidenciado a lo largo del pseudotiempo).

Finalmente, estudiamos regulones, que son grupos de genes regulados como una unidad, típicamente bajo el control de un FT común. Este análisis reveló que los regulones *Sox4* y *Sox11* desempeñan roles críticos como organizadores del estado inmaduro. Se sabe que estos FTs están implicados en las primeras etapas de la diferenciación neuronal, tanto durante la neurogénesis perinatal como en la adulta (Haslinger et al., 2009; Mu et al., 2012). Se ha demostrado que estos miembros de la familia SoxC se expresan en CPNs y neuroblastos, y se apagan en neuronas maduras. La sobreexpresión *in vitro* de *Sox11* es suficiente para promover la diferenciación neuronal (Haslinger et al., 2009). Además, *Sox11* se describió como un factor clave en la neurogénesis adulta y en la reprogramación de astrocitos a neuronas, junto con *Sox4* y *Neurog2*. De hecho, la delección condicional *in vivo* de *Sox4* y *Sox11* inhibe la neurogénesis, sin afectar la astrogénesis (Mu et al., 2012). Nuestros datos también muestran que el apagado de los FTs SoxC es un mecanismo crítico y necesario para alcanzar la maduración neuronal.

Los FTs y reguladores que dominan el cuarto estado incluyen *Bcl6*, *Foxo1*, *Klf9*, *Hlf*, *Tef*, *Anxa11* y *Atf6*. Las funciones reportadas de estos FTs sugieren que podrían coordinar una fina regulación homeostática neuronal. Por ejemplo, se ha demostrado que la delección de FTs de la familia *Foxo* deteriora la autofagia, lo que conduce a un crecimiento dendrítico anómalo y a un aumento en la densidad de espinas en aCGs (Schäffner et al., 2018). *Bcl6*, en parte a través de *Foxo1*, controla la supervivencia neuronal (Wiegreffe et al., 2022). La inactivación de *Klf9* resulta en un aumento de la densidad de espinas y un deterioro de la maduración funcional en las aCGs (Scobie et al., 2009). Además, la ablación genética de *Hlf* y *Tef* en neuronas en cultivo desencadenó un aumento desproporcionado de la excitación tras la privación de actividad (Valakh et al., 2023). En conjunto, esta evidencia apunta a un papel central de estos FTs en la regulación homeostática de la conectividad neuronal excitatoria. Asimismo, *Anxa11* y *Atf6* han sido asociados con la homeostasis del calcio intracelular (Hillary & FitzGerald, 2018; Nahm et al., 2020; Naranjo et al., 2016). *Foxo1*, *Tef*, *Atf6* y *Mkx* comparten un FT común corriente abajo, *Hivep2* (Schnurri-2), cuyo knockout generó alteraciones morfológicas globales en las CGs del giro dentado (Nakao et al., 2017). Por último, *Glis3*, un FT que se expresó selectivamente en RGLs y en CGmad1, se ha asociado con la autofagia y con la regulación del crecimiento y la complejidad neuronal (Calderari et al., 2018). En conjunto, las funciones regulatorias de estos FTs y su expresión tardía apoyan la siguiente hipótesis: la maduración neuronal se orquesta desactivando programas moleculares que promueven la diferenciación y activando vías de señalización que controlan la homeostasis celular.

Este análisis proporciona una visión integral de las dinámicas moleculares que intervienen en las fases de neurogénesis adulta en el giro dentado. Además, plantea un nuevo escenario para desentrañar la dinámica temporal de los reguladores transcripcionales maestros que controlan la maduración neuronal en el cerebro adulto sano. Estos hallazgos constituyen una base sólida para futuras investigaciones destinadas a identificar los mecanismos que contribuyen a la remodelación aberrante de los circuitos en los trastornos cerebrales.

Perfilado transcripcional de la neurogénesis hipocampal adulta en humanos: Desafíos metodológicos, variabilidad biológica y perspectivas clínicas

Como se mencionó en la *Introducción*, la persistencia de la neurogénesis hipocampal adulta en el cerebro humano sigue siendo objeto de amplio debate (Duque et al., 2022; Kempermann et al., 2018; Liu, 2022; Lucassen et al., 2020; Moreno-Jiménez et al., 2021; Paredes et al., 2018; Terreros-Roncal et al., 2023). Las discrepancias en los estudios inmunohistoquímicos que intentan detectar marcadores específicos de progenitores neuronales, neuroblastos y neuronas inmaduras pueden atribuirse a variaciones metodológicas y en el tratamiento del tejido (Boldrini et al., 2018; Cipriani et al., 2018; Dennis et al., 2016; Moreno-Jiménez et al., 2019; Sorrells et al., 2018; Tobin et al., 2019).

La secuenciación masiva (sn/scRNA-seq) se ha consolidado como una herramienta poderosa para definir estados y tipos celulares a partir de perfiles de expresión génica. Sin embargo, los estudios de neurogénesis basados en snRNA-seq en el hipocampo humano adulto han arrojado resultados inconsistentes. Mientras que dos trabajos identificaron RGLs o neuronas inmaduras, un tercero no detectó poblaciones neurogénicas (Franjic et al., 2022; Wang et al., 2022; Zhou et al., 2022). Más recientemente, Tosoni et al, advirtieron que los estudios sc/snRNA-seq en el nicho neurogénico del hipocampo humano plantean desafíos específicos que requieren ajustes conceptuales, metodológicos y computacionales (Tosoni et al., 2023). Entre los problemas más relevantes se destaca la variabilidad biológica entre individuos, ya documentada en primates no humanos, lo que podría complicar la elaboración de perfiles neurogénicos en humanos (Franjic et al., 2022). Sin embargo, los estudios a gran escala, necesarios para superar esta variabilidad, son limitados debido a la escasez de tejido cerebral postmortem de alta calidad.

También es crucial evaluar si los marcadores previamente identificados en modelos animales, como los roedores, son lo suficientemente fiables como para

etiquetar de forma precisa las mismas poblaciones neurogénicas en el cerebro humano adulto. Zhou y colaboradores observaron un solapamiento de 15.5% entre los genes ortólogos compartidos entre los CGinms de ratón y humanos. Por lo tanto, basarse en marcadores de roedores para delinear la trayectoria neurogénica en humanos podría conducir a una identificación que subestime el número de neuronas inmaduras.

Los métodos actuales de clustering y anotación presentan limitaciones inherentes. Estos requieren un conocimiento previo para asignar con precisión la identidad celular, y están diseñados para identificar poblaciones celulares bien definidas, pasando por alto estados de transición con características transcripcionales mixtas (Kong et al., 2022). De hecho, se ha demostrado que los métodos convencionales de agrupamiento y partición más fina no fueron capaces de separar adecuadamente las CGinm que se encontraban entremezcladas con las CGmad en un conjunto de datos snRNA-seq en giro dentado humano (Zhou et al., 2022). Para resolver este obstáculo, los autores emplearon un enfoque analítico basado en aprendizaje automático que permitió identificar una población de CGinm y cuantificar su abundancia en el hipocampo humano en diferentes etapas a lo largo de la vida.

Para maximizar el potencial clínico de los datos presentados en este estudio, es crucial avanzar en dos áreas: 1) implementar estrategias que permitan obtener mayor cantidad de tejido hipocampal humano en óptimas condiciones; 2) perfeccionar o desarrollar análisis capaces de profundizar y revelar procesos evolutivos fundamentales, facilitando la comprensión de la diversificación celular entre especies. Estos avances serán esenciales para traducir los hallazgos moleculares en aplicaciones clínicas concretas, contribuyendo a la comprensión de los trastornos neurodegenerativos y el desarrollo de terapias innovadoras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones de la cepa C57Bl6/J, tanto salvajes como genéticamente modificados, de ambos性os y de entre 2 y 3 meses de edad. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar, en jaulas grupales de 4-5 ratones, con acceso ad libitum a agua y comida. Los ratones fueron criados en el biorrio del Instituto Leloir, bajo supervisión de los responsables del mismo, en un rack microventilado. Todas las líneas transgénicas se mantuvieron en fondo genético C57Bl6/J.

Para los experimentos de snRNA-seq, ratones de la línea driver *Ascl1*^{CreERT2} (*Ascl1*^{tm1(Cre/ERT2)Jejo/J}) se cruzaron con la linea *CAG*^{floxStop-Sun1/sfGFP} (*B6.129-Gt(ROSA)26Sortm*^{5.1(CAG-Sun1/sfGFP)Nat/Mmba/J}) para generar ratones *Ascl1*^{CreERT2,CAG}^{floxStop-Sun1/sfGFP}. De este modo y tras la inducción con tamoxifeno (TAM), se marcó con fluorescencia la membrana nuclear de aCGs (Mo et al., 2015; Yang et al., 2015). La administración de TAM (120 µg/g, cuatro inyecciones en dos días consecutivos) indujo la expresión de Sun1-sfGFP en la envoltura nuclear de la progenie de células Ascl1+. Para la disección de giro dentado los ratones fueron anestesiados (150 µg de ketamina/15 µg de xilacina en 10 µl de solución salina por g) y sacrificados en los momentos indicados tras la inducción de TAM: 1, 2, 4 y 8 semanas para el dataset 1, y 2, 3, 4, 5 y 8 semanas para el dataset 2.

La identificación genética de los animales transgénicos se realizó mediante PCR para cada uno de los genes correspondientes. La reacción se realizó a partir de ADN purificado de una porción de la cola extraída de ratones a las 2-3 semanas de edad.

Ratones salvajes de entre 6 y 8 semanas de edad fueron utilizados para los experimentos de electrofisiología, inmunohistoquímica, e hibridación *in situ*.

Todos los procedimientos experimentales involucrando animales fueron realizados de acuerdo a protocolos aprobados por el Comité Institucional del Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto Leloir, y de acuerdo a las reglas Internacionales para la Investigación Biomédica involucrando animales de laboratorio.

Disecciones de giro dentado

Los ratones fueron anestesiados como se detalló anteriormente, se extrajeron cuidadosamente los cerebros y se colocaron en solución salina de Earl (EBSS, en mM: 117 NaCl, 5,4 KCl, 1 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 5,6 glucosa, 1,8 CaCl₂.2H₂O y 0,8 MgSO₄) helada, suplementada con trehalosa 5% v/v y ácido kinurénico (0,8 mM) (Hagihara et al., 2009). La solución de disección se equilibró en 95% O₂/ 5% CO₂ antes de su uso. Se cortó el cerebro a lo largo de la fisura longitudinal y se descartaron las regiones posteriores a lambda. Bajo lupa y tras retirar el diencéfalo, se expuso la cara medial del hipocampo (Figura 38A). Se aisló el giro dentado insertando una punta de aguja afilada y deslizándola superficialmente a lo largo del eje septotemporal del hipocampo (Figura 38B, C). El tejido disectado se colocó en un tubo de microcentrífuga de 0,5 ml, eliminando la mayor cantidad de medio posible, se congeló en hielo seco y se almacenó a -80°C hasta su uso.

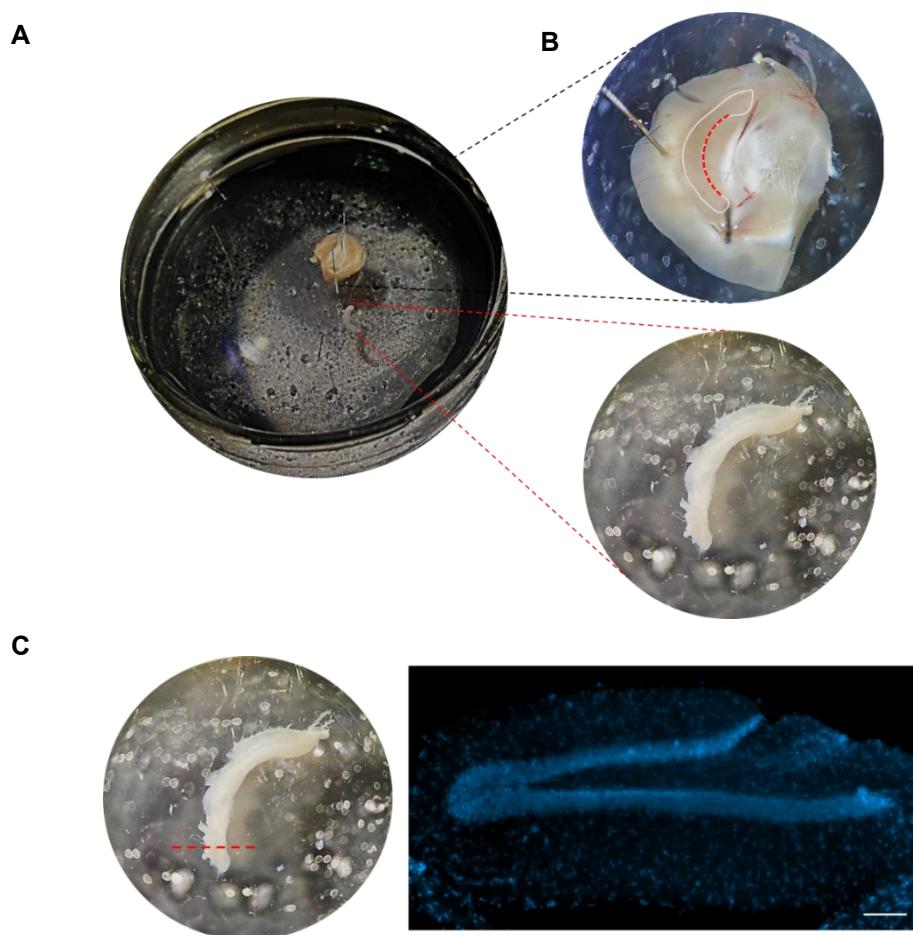


Figura 38. Representación detallada de la disección del giro dentado. (A) Vista lateral de un hemisferio cerebral, exponiendo la cara medial del hipocampo. (B) **Panel superior** La línea punteada roja delimita el giro dentado del resto del hipocampo. El esquema blanco detalla el área contorneada para aislar el giro dentado. **Panel inferior:** Giro dentado disectado. (C) **Panel izquierdo:** Dirección de corte para obtener secciones transversales del giro dentado. **Panel derecho:** Verificación de la disección a través de tinción con DAPI. Barra de escala: 100 µm.

Aislamiento de núcleos y clasificación por FACS

Todo el material y los buffers se enfriaron en hielo. Los núcleos fueron aislados según el protocolo descripto en la literatura con algunas modificaciones (Habib et al 2017). El homogeneizador de tejido Dounce y los pistilos se lavaron secuencialmente con EtOH 100%, RNase Zap (Sigma, Cat # R2020), 2-3 rondas con agua libre de RNAsa, y finalmente se enjuagaron con buffer EZ Lysis (Sigma, Cat # NUC-101). El tejido se transfirió a un homogenizador con 2 ml de buffer EZ Lysis helado y se homogeneizó lentamente con 20-25 golpes utilizando el pistilo A, seguidos de 20 golpes con el pistillo B. La suspensión se transfirió a un tubo eppendorf frio y se incubó en hielo durante 5 minutos. A continuación, se centrifugó a $500 \times g$ durante 5 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 4 ml de buffer EZ Lysis y, tras una segunda ronda de incubación en hielo y centrifugación, los núcleos aislados se resuspendieron en 4 ml de buffer de suspensión de núcleos (NSB) (1x PBS libre de RNasa, 0.1% de BSA 100 µg/ml y 0.2U/µl de inhibidor de RNasa). Por último, los núcleos se centrifugaron a $500 \times g$ durante 5 min a 4 °C y, tras eliminar el sobrenadante, se resuspendieron en 1 ml de NSB-Ruby (concentración final de Ruby dye 1:500) y se filtraron dos veces a través de un filtro de 35 µm para eliminar la mayor cantidad posible de restos de tejido. Los núcleos se mantuvieron en hielo hasta su clasificación (Universidad de Harvard, Bauer Core Facility, BD FACSAria II) en placas de 96 pocillos, pretratadas con BSA para reducir la adherencia y mejorar la recuperación, y con ~10-20 µl de Rich-NSB para su resuspensión (con 2U/µl de inhibidor de RNasa y 1% de BSA). La concentración final de núcleos se determinó utilizando una cámara de recuento de Neubauer C-chip y azul tripán (dilución final 1:2). Los núcleos se cargaron inmediatamente en el chip para la formación de gemas de gel en emulsión (GEMs) de célula única (10x Genomics, secuenciación de ARN unicelular 3', Chromium v3.1).

10x Chromium

El aislamiento de los núcleos y la generación de las GEMs se llevaron a cabo, procesando dos puntos temporales por experimento para minimizar los efectos de lote. Para cada punto temporal, se procesaron cuatro giros dentados (hemisferios izquierdos) de ratones machos y hembras. Para aumentar el número de núcleos en el dataset 2, también se procesaron los giros dentados del hemisferio derecho. Los núcleos se cargaron en los chips de 10x Genomics con el objetivo de recuperar entre 2.000 y 10.000 núcleos. La amplificación del ADN copia y la construcción de la librería se realizaron siguiendo los protocolos de 10x Genomics. De aquí en adelante, todos los puntos

temporales de cada dataset se procesaron juntos, con el fin de minimizar los efectos de lote. Las librerías se generaron utilizando Chromium v3.1, se cuantificaron en BioAnalyzer y se secuenciaron en un Illumina HiSeq o NovaSeq. La profundidad de secuenciación fue de 40-70.000 lecturas por núcleo.

Procesamiento de snRNAseq

Se utilizó STARsolo 2.7 para alinear las *reads* (secuencias cortas producto de la secuenciación) de snRNA-seq con el genoma del ratón GRCm38. Las *reads* multimapeadas fueron excluidas, y se consideraron secuencias exónicas e intrónicas. Utilizando los parámetros predeterminados se contaron los identificadores de molécula única (UMI) y se filtraron células de alta calidad con el fin de generar matrices de *count*, gen por célula (cuantificación gen/célula). El control de calidad y el procesamiento posterior de los datos se realizaron mediante las bibliotecas scran y scDblFinder de bioconductor (Amezquita et al., 2020; Germain et al., 2021). Todos los scripts utilizados para realizar el presente análisis se incluyeron en el sitio web: <https://github.com/chernolabs/NeuronalSwitch>.

Para el dataset 1, 17046 núcleos pasaron el filtro de calidad STARsolo, se eliminaron 80 núcleos con <1000 transcriptos (*features*) detectadas, y 636 núcleos identificados como dobletes por scDblFinder. También eliminamos 839 núcleos de baja calidad (función adjOutlyingness de la biblioteca robustbase R) basado en: 1) un procedimiento multivariado de detección de núcleos con valores atípicos que tiene en cuenta la cobertura de secuenciación, el número de *features* detectadas y el contenido mitocondrial (Mt), o 2) núcleos con un contenido mayor al 1% de ADN de Mt. Luego de este filtrado de los datos, se retuvieron los *features* con >20 moléculas detectadas, que además se encontraban en >1% y <80% de los núcleos filtrados. Finalmente, se eliminaron genes específicos para mitigar los posibles efectos de género y estrés en los análisis posteriores (*Ehd2*, *Espl1*, *Jarid1d*, *Pnpla4*, *Rps4y1*, *Xist*, *Tsix*, *Eif2s3y*, *Ddx3y*, *Uty*, *Kdm5d*, *Rpl26*, *Gstp1*, *Rpl35a*, *Erh*, *Slc25a5*, *Pgk1*, *Eno1*, *Tubb2a*, *Emc4*, *Scg5*) (Hochgerner et al., 2018). Los datos se normalizaron utilizando el paquete scran de acuerdo con el flujo de análisis establecido en OSCA (Orchestrating Single-Cell Analysis (Amezquita et al., 2020). Se ejecutó un análisis de clustering para cada punto temporal de forma independiente, normalizando los núcleos en cada cluster por separado y reescalando los factores de tamaño para que fueran comparables entre clusters. Por último, se calculó el log₂ de los datos y se consideró un valor de *pseudocount* de 1 para generar una matriz de expresión normalizada. Tras escalar y normalizar

logarítmicamente los valores de expresión génica, se empleó la función `modelGeneVar` de `scran` para identificar los 3000 genes más variables en sus perfiles de expresión. Para el dataset 2, 32.621 núcleos superaron con éxito el filtro de calidad STARSolo. Posteriormente, se identificaron y descartaron 1.015 dobletes y 4.808 núcleos de baja calidad mediante el protocolo de control de calidad aplicado al dataset 1. Todo el proceso de filtrado dio como resultado un conjunto de datos de alta calidad compuesto por 26.798 núcleos y 14.220 transcriptos. Consideramos las similitudes entre núcleos utilizando la medida de correlación de Pearson dentro del subespacio abarcado por los 20 componentes principales. Por último, se construyó un gráfico mKNN ($k=20$) y se retuvieron para el análisis 26.716 núcleos que formaban parte del gráfico principal o que contenían más de 30 nodos.

A continuación, se utilizó el paquete `batchelor` de `Bioconductor` para investigar la reproducibilidad biológica entre los datasets 1 y 2. Algunos núcleos del dataset 1 ocupaban una región en espacios de dimensionalidad reducida (PCA, t-SNE, UMAP) no representada en el dataset 2. Empleando un gráfico $k=20$ mKNN estimado a partir de los 20 componentes principales (similitudes obtenidas a partir de los valores de correlación de Pearson), verificamos que estos núcleos formaban dos clusters de Louvain compuestos por 1071 núcleos de muestras de 4 semanas de edad. Cabe destacar que el 85% de los núcleos de estos clusters mostraban una mayor expresión de genes asociados a sexo masculino (*Ddx3y*, *Uty*, *Eif2s3y*), lo que sugiere que podrían pertenecer a un único ratón macho, con características biológicas atípicas. Por lo tanto, volvimos a procesar el dataset 1, excluyendo estos núcleos, lo que dio como resultado 14.441 núcleos de alta calidad y 13.353 transcriptos. Para obtener una aproximación de la variabilidad biológicamente relevante, construimos un gráfico mKNN ($k=40$) considerando la medida de similitud de correlación de Pearson estimada a partir de los 20 componentes principales (PCA). Al igual que hicimos con el conjunto de datos 2, descartamos los núcleos que se encontraban en clusters pequeños (<30 nodos) de este gráfico mKNN. Los 14.367 núcleos restantes se agruparon en comunidades teniendo en cuenta el algoritmo de Louvain. Esta clusterización inicial se refinó aún más para producir 13 comunidades de las cuales se identificaron marcadores específicos (véase la sección Resultados). Se utilizó la función de transferencia de etiquetas de `Seurat` para imputar etiquetas en el dataset 2. Sólo 7 núcleos se identificaron como NB2, probablemente debido a que el dataset 2 no incluía el punto temporal de semana 1. Estos núcleos no se tuvieron en cuenta en los análisis posteriores. Se determinaron los genes expresados diferencialmente entre grupos de núcleos utilizando la función `FindMarkers` del paquete `scran` (test *t* pareado). Los genes marcadores de grupos se

identificaron como genes altamente expresados en el cluster analizado, comparado con el resto.

Determinación del pseudotiempo

Se utilizó el paquete de R slingshot 2.4.0 para ajustar las trayectorias de desarrollo a los núcleos de los siguientes clusters: RGL, CPN, NB1, NB2, CGinm1, CGinm2, CGjov y CGmad1 (Street et al., 2018). Excluimos de este análisis los núcleos CGmad2 y 383 CGmad1 con fuerte señal de expresión de genes ventrales. Consideramos las coordenadas de baja dimensión UMAP (3D) para ajustar curvas principales y producir estimaciones de pseudotiempo (PCA-3dim y PCA-20dim produjeron perfiles de densidad similares a lo largo de las coordenadas de pseudotiempo correspondientes). Se utilizó un procedimiento similar para dataset 2. Para el análisis de pseudotiempo, se llevó a cabo un refinamiento de clusters al transferir las etiquetas, con el fin de corregir errores de clasificación visibles observados en el espacio UMAP3D. Este problema afectó a <3% de los núcleos (principalmente implicando núcleos de Astrocytos, Pericitos, RGL y CPN, ver 05_DS2_SeuratLT.R en el sitio web proporcionado anteriormente).

Cascadas de expresión de FTs

Se consideraron 703 FTs de ratón, listados en el paquete dorothea 1.8.0 R, los cuales superaron el filtro de control de calidad (Holland et al 2020). Para comprobar la expresión significativa de estos genes a lo largo de la coordenada pseudo-temporal, empleamos la función difftest del paquete R TSCAN 1.34. Se realizaron *likelihood ratio test* para comparar un modelo aditivo generalizado frente a un modelo de ajuste constante y de esta manera obtener los p-valores correspondientes. Se identificaron 201 FTs con un valor $q<0.05$ ajustado por FDR. Se utilizó un script personalizado (09_cascades_Tfs.R en el sitio web proporcionado anteriormente) para identificar los FTs que estaban apagados (112) o encendidos (69) en clusters específicos (Figura 17).

Análisis de ontología génica

Los análisis de enriquecimiento de término GO se realizaron con ShinyGO 0.77 (<http://bioinformatics.sdsu.edu/go/>) (S. X. Ge et al., 2020).

Visualización de gráficos

El algoritmo de diseño Force Atlas 2, implementado en Gephi, se utilizó para generar una visualización en 2 dimensiones/bidimensional de los gráficos mKNN (Bastian et al., 2009; Jacomy et al., 2014). Los mapas de calor, gráficos de volcán, gráficos de violín, diagramas de puntos, y diagramas de espigas se crearon utilizando el paquete scX para R [<https://chernolabs.github.io/scX/>].

Regulones

Para analizar los cambios transcripcionales asociados con la maduración neuronal, consideramos las cohortes de 3, 4, 5 y 8 semanas del dataset 2 y seleccionamos núcleos situados alrededor del 1er, 2do, 3er y 4to pico de la distribución de densidad pseudotemporal. Se utilizó el paquete para R SCENIC 1.3.1 para analizar la expresión de los FTs relevantes y sus genes blancos (regulones) (Aibar et al., 2017). La función calcRSS se empleó para estimar la especificidad de los regulones (Suo et al., 2018).

Hibridación *in situ* de ARN

Para la validación de los marcadores moleculares que surgieron del análisis bioinformático, se anestesiaron los ratones, se extrajeron los cerebros, y se colocaron en solución de disección helada (descripta anteriormente). Los hipocampos se disectaron bajo una lupa, se embebieron en OCT y se congelaron sobre hielo seco. Finalmente se almacenaron a -80 °C. Cortando en un criostato se obtuvieron secciones de 14 µm que cubrían el eje anteroposterior del giro dentado. Las secciones se colocaron durante 1 h a -20 °C y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. La hibridación fluorescente multiplex de ARN *in situ* se realizó utilizando el RNAscope Fluorescent Multiplex Reagent Kit (Advanced Cell Diagnostics), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las secciones descongeladas se fijaron en PFA 4%, se deshidrataron en incubaciones secuenciales con etanol, seguidas por 10 min de blanqueo con H₂O₂, y 30 min de tratamiento con proteasa IV. Para el experimento de la figura 28 los ratones se expusieron a un ambiente enriquecido durante 1 h, y 5 h más tarde se prepararon las muestras de tejido como se ha descripto anteriormente. Las sondas de hibridación correspondientes (Advanced Cell Diagnostics, N° de catálogo): 429291-C1 (*Acvr1c*), 807961-C2 (*Nell1*), 441441-C1 (*Sema3c*), 430781-C3 (*Slc1a3*), 488851-C2 (*Igfbpl1*), 491961-C2 (*Elavl2*), 429641-C1 (*Eomes*), 474721-C1 (*Cpne4*), 501101-C2 (*Slc17a7*), 463451-C1 (*Ptchd4*), 413271-C1 (*Bcl11b*), y 515491-C2 (*Plxna4*) se incubaron durante 2 h a 40 °C, seguidas de los pasos de amplificación (según

protocolo), se utilizó DAPI para contratinción y el tejido se montó con gerbatol para evitar el desvanecimiento (o fotoblanqueo) de los fluoróforos.

Producción de vectores virales

Para la infección de neuronas nacidas en el giro dentado adulto, se utilizó un vector retroviral (RV) no replicativo derivado del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV), tanto codificante para la proteína fluorescente GFP como para los genes de interés Sox4 y Sox11 fusionados a la proteína reportera GFP, como se ha realizado anteriormente (Alvarez et al., 2016; Marín-Burgin et al., 2012). Las partículas retrovirales se ensamblaron en células HEK293T transfectadas con 3 plásmidos separados que expresan proteínas de la capside (CMV-vsvg), proteínas virales (CMV-gag/pol) y los transgenes: CAG-EGFP, CAG-EGFP-IRES-Sox11 y CAG-EGFP-IRES-Sox4. Los plásmidos se transfirieron en células HEK293T utilizando polietilenimina. Las células HEK293T se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco con alto contenido de glucosa, suplementado con suero fetal bovino (10 %) y glutamina (2 mM). El sobrenadante contenido las partículas virales se recolectó 48 h después de la transfección y concentró mediante dos rondas de ultracentrifugación. El título de los virus fue de ~10⁵ partículas/μl.

Cirugía estereotáctica

Con la finalidad de sobreexpresar los FTs SoxC en nuevas cohortes neuronales se inyectaron retrovirus en el giro dentado del hemisferio derecho mediante una cirugía estereotáctica en ratones salvajes de 6 semanas de edad. El ejercicio voluntario modula la tasa neurogénica mediante el aumento en la proliferación de células progenitoras neurales (van Praag et al., 1999, 2005). Teniendo en cuenta esto, los ratones fueron sometidos a ejercicio físico voluntario 3 días previos a la cirugía, hasta el día posterior a la misma. Se colocó una rueda cada dos ratones. Para la cirugía, los ratones fueron anestesiados por vía intraperitoneal (como se describió anteriormente) y se los colocó en el aparato estereotáxico, donde se inmovilizó su cráneo y se marcaron las coordenadas para realizar la inyección en el área dorsal del giro dentado. Las coordenadas se tomaron con referencia al bregma, siguiendo las indicaciones del atlas del cerebro de ratón (Paxinos & Franklin, 2001): -2 mm anteroposterior, -/+1.5 mm lateral, -1.9 mm ventral. Se administró 1 μl de RV por hemisferio a 0.15 μl/min mediante un microcapilar calibrado. Se monitoreó la recuperación adecuada de los animales luego

de la cirugía. Se prepararon secciones de cerebro 5 semanas después de la infección para inmunofluorescencia o registros electrofisiológicos.

Perfusión y corte coronales

Para la obtención de los cerebros, luego de cinco semanas de la inyección de las partículas retrovirales, los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal como se describió anteriormente. Luego de constatar la ausencia de reflejos visibles, se realizó una perfusión cardiaca a través del ventrículo izquierdo durante 20 minutos a un flujo de 6 ml/min. Durante los primeros 5 minutos se perfundieron 50 ml de solución fisiológica con heparina (2.5 U/ml) con el propósito de limpiar los capilares sanguíneos. Luego, se perfundieron 100 ml de parafomaldehído (PFA) al 4% en buffer fosfato (PB) 0.1 M (pH 7.2) para fijar los tejidos. Al finalizar la perfusión, los cerebros se mantuvieron en PFA a 4°C hasta el día siguiente. Posteriormente fueron transferidos a una solución de sacarosa al 30% en PB 0.1 M, y se mantuvieron a 4°C. Se obtuvieron secciones coronales de 60 µm utilizando un micrótomo de deslizamiento. Por último, las rodajas obtenidas se mantuvieron a -20°C en solución criopreservadora (3 volúmenes de glicerol, 3 volúmenes de etilenglicol y 4 volúmenes de PB 0.2 M) hasta el momento de realizar las inmunofluorescencias.

Inmunofluorescencia

Se utilizó la técnica de free-floating (rodajas libres en solución). Se incubaron las secciones con el anticuerpo primario de 24 a 48 horas, y con el anticuerpo secundario durante 2 horas. La inmunotinción para ratones *Ascl1^{CreERT2};CAG^{floxStop-Sun1/sfGFP}* o inyectados con retrovirus se realizó utilizando los anticuerpos primarios DCX (policlonal de conejo; 1:500; Abcam) y GFP (fracción IgY de pollo; 1:500; Aves Labs Inc.). Se utilizaron los anticuerpos secundarios donkey anti-chicken Cy2 o Cy3 y donkey anti-rabbit Cy5 1:250 (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Los anticuerpos se diluyeron en solución de bloqueo. Las secciones se incubaron con DAPI (10 minutos) para la contratinación nuclear. Los cortes se montaron y se cubrieron con gerbatol para evitar el desvanecimiento (o fotoblanqueo) de los fluoróforos.

El protocolo de inmunofluorescencia consistió en:

- 1) 3 lavados de 5 minutos con TBS 1X (TBS 10x: 132.2g de Trizma HCl; 19.4g de Trizma Base y 90 g de NaCl llevado a 1 l de agua pH 7.5) con agitación a temperatura ambiente.

- 2) 1 hora de bloqueo (Solución de bloqueo: TBS 1X, con 3% suero de burro y 0.25% de Triton X-100) con agitación a temperatura ambiente.
- 3) 48 a 72 horas de incubación con el anticuerpo primario con agitación a 4° C.
- 4) 2 lavados de 15 minutos con TBS 1X con agitación a temperatura ambiente.
- 5) 15 minutos de bloqueo con agitación a temperatura ambiente.
- 6) 2 horas de incubación con el anticuerpo secundario con agitación a temperatura ambiente.
- 7) 3 lavados de 5 minutos con TBS 1X con agitación a temperatura ambiente.
- 8) 10 minutos de incubación con solución de DAPI (4',6-daimidino-phenylindole, Sigma D9542), 5 µl del stock en 50 ml de TBS1X (Stock a -20° C 1mg/ml, 3mM)) para contraste fluorescente.
- 9) 4 lavados de 5 minutos con TBS 1X con agitación temperatura ambiente.
- 10) Montaje con PVA-DABCO (2.5% de polivinilalcohol y 2.5 % de DABCO en glicerol y 0.2 M de Tris HCl pH8,5)
- 11) Los portaobjetos fueron mantenidos en oscuridad y a 4° C para aumentar la estabilidad de los fluoróforos.

Microscopía

Se incluyeron secciones del hipocampo septal según el atlas cerebral del ratón (anteroposterior, de -0,94 a -2,46 mm desde el bregma) (Paxinos & Franklin, 2001). Las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio confocal LSM 880 Airyscan (Carl Zeiss, Jena, Alemania). El análisis de la expresión de anticuerpos se limitó a las células con niveles de intensidad de fluorescencia que permitían identificar claramente su soma. Para los experimentos Sox/GFP, se adquirieron imágenes (40x; NA 1.2) de secciones de 60 µm de grosor, y la colocalización se evaluó utilizando planos ópticos individuales (unidad airy=1). Para los experimentos de RNAscope, se adquirieron imágenes de cortes de hipocampo de 14 µm de grosor en un microscopio de deconvolución Zeiss Axio Examiner D1. La cuantificación del área de puntos se realizó en ImageJ/Fiji aplicando el umbral de Otsu sugerido por el fabricante (Advanced cell diagnostics). Durante todos los experimentos, tanto la toma de imágenes como el análisis posterior, se realizaron de forma ciega para el operador.

Electrofisiología

Cinco semanas después de la inyección retroviral, se anestesió a los ratones y se extrajeron los cerebros en una solución refrigerada carbogenada (95% O₂ / 5% CO₂) conteniendo (mM): 110 colina-Cl⁻, 2,5 KCl, 2,0 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 0,5 CaCl₂, 7 MgCl₂, 20 dextrosa, 1,3 Na⁺-ascorbato, 0,6 Na⁺-piruvato y 4 ácido kinurénico. Los cortes (400 µm de espesor) se realizaron en un vibrátomo (Leica VT1200S) y se transfirieron a una cámara conteniendo líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF; en mM): 125 NaCl, 2,5 KCl, 2,3 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1,3 MgCl₂, 1,3 Na⁺-ascorbato, 3,1 Na⁺-piruvato y 10 dextrosa (315 mOsm). Los cortes se mantuvieron con un 95% de O₂ / 5% de CO₂ a 30°C durante 1 h antes de iniciar los experimentos. Los registros se realizaron a 23 ± 2°C utilizando microelectrodos (3-5MΩ) de vidrio de borosilicato (KG-33; King Precision Glass) y rellenados con (mM): 120 K-gluconato, 20 KCl, 5 NaCl, 4 MgCl₂, 0,1 EGTA, 10 HEPES, 4 Tris-ATP, 0,3 Tris-GTP, 10 fosfocreatina, Alexa Fluor 488 o 594 (10 µg/ml; Invitrogen), pH 7,3 y 290 mOsm. Los registros se obtuvieron utilizando un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices), se digitalizaron (Digidata 1322A) y se adquirieron a 10 kHz en un ordenador personal utilizando el software pClamp 9 (Molecular Devices). Las neuronas registradas se identificaron visualmente en la capa de células granulares mediante microscopía de fluorescencia (óptica de fluorescencia FITC; DMLFS, Leica) y videomicroscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC) en infrarrojo. La resistencia de membrana (R_{input}) se obtuvo a partir de trazos de corriente evocados por un pulso hiperpolarizante de 10 mV. En los registros en modo *current-clamp*, el potencial de membrana en reposo se mantuvo a -70 mV mediante la aplicación de una corriente de mantenimiento. Los criterios para incluir células en el análisis fueron: 1) la confirmación visual de GFP en la punta de la pipeta; 2) una corriente de fuga absoluta <50 pA a -60 mV; 3) una resistencia de acceso <45 MΩ (típicamente fue menor a 25 MΩ). En todos los experimentos, los tratamientos de control o de sobreexpresión de Sox11 fueron realizados a ciegas para el operador.

Análisis estadístico

Los datos se presentaron como media ± SEM, y los análisis estadísticos fueron realizados a ciegas para el operador. Los datos electrofisiológicos se analizaron con el software Clampfit, la colocalización por inmunofluorescencia se verificó con Zen blue 3.2, y las imágenes de RNAscope se cuantificaron con el programa ImageJ. Los análisis se realizaron con GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, CA, EE.UU.). Las comparaciones entre dos grupos se realizaron mediante test *t* de Student no pareado

después de que los datos superaran tres pruebas de normalidad (D'Agostino y Pearson, Shapiro-Wilk y Kolmogorov-smirnov). En los casos en que no se cumplía la normalidad, los datos fueron analizados utilizando el test *U* de Mann-Whitney para datos no paramétricos. Las comparaciones entre grupos múltiples se realizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis, y los datos mostrados en la figura 36E se compararon mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA).

Tabla suplementaria 1

Canales de Ca ²⁺	Canales de K ⁺	Canales de Na ⁺	Receptores Glu	Receptores GABA	Moléculas presinápticas	Moléculas postsinápticas
Cacfd1	Hcn1	Nalcn	Gria1	Gabarap	Bsn	Cnih1
Cacna1a	Hcn2	Sclt1	Gria2	Gabarapl1	Liph	Cnih2
Cacna1b	Hcn3	Scn1a	Gria3	Gabbr1	Pclo	Cnih3
Cacna1c	Hcn4	Scn1b	Gria4	Gabbr2	Rims1	Cnih4
Cacna1d	Kcmf1	Scn2a	Grid1	Gabra1	Rims2	Dag1
Cacna1e	Kcnab1	Scn3a	Grid2	Gabra2	Rims3	Dlg1
Cacna1g	Kcnab2	Scn3b	Grik2	Gabra4	Rims4	Dlg2
Cacna1h	Kcnb1	Scn8a	Grik3	Gabra5	Snap23	Dlg3
Cacna2d1	Kcnb2	Scn9a	Grik4	Gabrb1	Snap25	Dlg4
Cacna2d3	Kcnc1	Scnm1	Grik5	Gabrb2	Snap29	Dlg5
Cacnb1	Kcnc3	Scnn1a	Grin1	Gabrb3	Snap47	Homer1
Cacnb2	Kcnd2		Grin2a	Gabrd	Snap91	Homer2
Cacnb3	Kcnd3		Grin2b	Gabrg2	Sv2a	Homer3
Cacnb4	Kcng2		Grin2d	Gabrg3	Sv2b	Nexmif
Cacng2	Kcnh1		Grin3a		Sv2c	Nfil3
Cacng3	Kcnh3		Grina		Syncrip	Nlgn1
Cacng4	Kcnh7		Grip1		Syngap1	Nlgn2
Cacng5	Kcnh8		Grip2		Syngr1	Nlgn3
Cacng7	Kcnip1		Grm1		Syngr3	Plppr1
Cacng8	Kcnip2		Grm2		Syngr4	Plppr2
Cbarp	Kcnip3		Grm3		Synj1	Plppr3
	Kcnip4		Grm5		Synj2	Plppr4
	Kcnj3		Grm7		Synm	Plppr5
	Kcnj6		Grm8		Synpo	Sdc1
	Kcnj9				Synpo2	Sdc2
	Kcnk1				Synpo2l	Sdc3
	Kcnk10				Synpr	Sdc4
	Kcnma1				Synrg	Sdcbp
	Kcnmb2				Syp	Sdcbp2
	Kcnmb4				Sypl	Shank1
	Kcnn2				Sypl2	Shank2
	Kcnn3				Sys1	Shank3
	Kcnq1				Syt1	Slitrk1
	Kcnq2				Syt10	Slitrk2
	Kcnq3				Syt11	Slitrk3
	Kcnq5				Syt12	Slitrk4
	Kcnrg				Syt13	Slitrk5
	Kcnt2				Syt14	Slitrk6
	Kctd1				Syt15	
	Kctd3				Syt16	
	Kctd4				Syt17	
	Kctd8				Syt2	
					Syt3	
					Syt4	
					Syt5	
					Syt6	
					Syt7	
					Syt9	
					Syt11	
					Syt12	
					Syt13	
					Syt14	
					Syt15	
					Unc13a	
					Unc13b	
					Unc13c	
					Unc13d	
					Vamp1	
					Vamp2	
					Vamp4	
					Vamp5	
					Vamp8	
					Vamp9	
					Vapa	
					Vapb	

Tabla suplementaria 1: Listado de genes cuya expresión media se grafica en la figura 25

Anexo: edición génica de células granulares nacidas en el hipocampo adulto mediante CRISPR

Introducción

CRISPR/Cas9

En la última década, nuestro laboratorio, junto con otros grupos de investigación, ha explorado la combinación de infecciones retrovirales con técnicas de interferencia de ARN, centrándose especialmente en el uso de ARN de horquilla (shARN) para modular la expresión génica en neuronas nuevas nacidas en el giro dentado del hipocampo adulto (Groisman et al., 2023; Trinchero et al., 2017). Sin embargo, esta estrategia presenta ciertas limitaciones, como una eficacia subóptima para lograr un silenciamiento completo de la transcripción y posibles problemas de especificidad, lo cual ha impulsado la búsqueda de métodos más avanzados de edición génica.

Recientemente, el sistema CRISPR-Cas9 ha emergido como una herramienta de edición génica robusta y precisa. CRISPR, que corresponde a las siglas “repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas”, es un mecanismo de defensa utilizado por las bacterias contra fagos. Gracias a los avances en biología molecular y genética, este sistema ha sido adaptado para la edición génica de varios tipos celulares mediante el uso de una enzima nucleasa y un ARN guía (gARN) (Figura anexo 1) (Cong et al., 2013; Gilbert et al., 2013; Joung et al., 2017; Torres-Ruiz & Rodriguez-Perales, 2017). El gARN se encuentra río abajo de un promotor de unión a la ARN polimerasa III, y consiste de una secuencia de ~20 nucleótidos complementaria al gen a editar, y un ARN scaffold que estabiliza la unión con la nucleasa. La endonucleasa Cas9, guiada por el gARN complementario al gen de interés, induce roturas de doble hebra (DSB), que pueden ser reparadas mediante dos mecanismos: la unión de extremos no homólogos (NHEJ) y la reparación por recombinación homóloga (HDR) (Bibikova et al., 2002).

Diversos estudios han utilizado exitosamente CRISPR en neuronas. Un trabajo publicado en 2014 validó un modelo de ratón con expresión condicional de la nucleasa Cas9, permitiendo su combinación con herramientas que expresen gARNs específicos y de esta manera investigar el efecto de mutaciones en diferentes procesos biológicos y enfermedades (Platt et al., 2014). En este contexto, proponemos un plan de trabajo orientado a optimizar el sistema CRISPR/Cas9 en neuronas nuevas del hipocampo adulto, basándonos en estrategias exitosas descritas en la literatura.

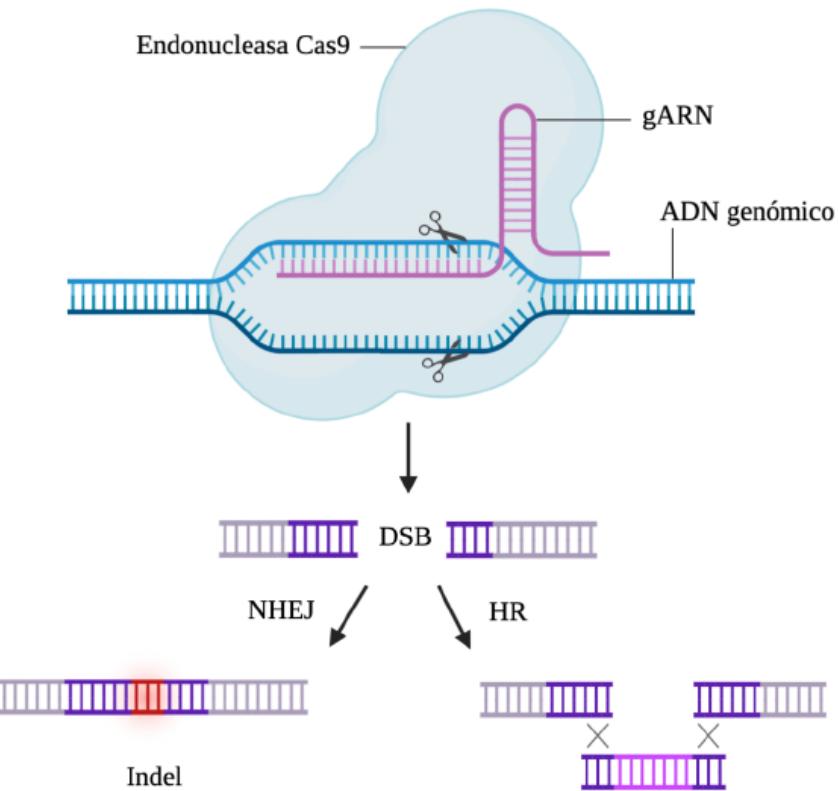


Figura anexa 1. Representación esquemática del funcionamiento del sistema CRISPR. La enzima Cas9 se une al gARN que contiene una secuencia complementaria al gen de interés. La actividad endonucleasa de Cas9 genera roturas de doble cadena en el ADN. En respuesta, la célula activa uno de dos mecanismos de reparación de la ruptura doble hebra (DSB): la unión de extremos no homólogos (NHEJ) o la reparación por recombinación homóloga (HDR). El mecanismo NHEJ introduce inserciones o delecciones de pares de bases (indels), generando mutaciones sin sentido que resultan en un codón stop prematuro y expresión de una proteína trunca, causando una pérdida de función (KO) del gen. En cambio, el mecanismo HDR utiliza un templado de ADN homólogo para la reparación del gen. (Figura adaptada de Torres-Ruiz R y Rodriguez-Perales S., 2017).

Objetivos y estrategia experimental

El objetivo general de esta sección es desarrollar estrategias que permitan estudiar la relevancia biológica de moléculas candidatas, identificadas a partir del análisis transcriptómico realizado en esta tesis, que regulan la maduración e integración de neuronas nuevas nacidas en el hipocampo adulto, utilizando tecnología de edición génica. Para ello, proponemos dos objetivos específicos:

1. Optimizar una herramienta de edición génica tejido-tiempo específico, basada en la tecnología CRISPR/Cas9, dirigida a neuronas nuevas del hipocampo adulto.
2. Evaluar el rol funcional de factores de transcripción y moléculas efectoras durante las distintas etapas de desarrollo de las neuronas nuevas nacidas en el hipocampo adulto empleando la técnica de CRISPR/Cas9.

Resultados

Edición génica de GFP como prueba de concepto para aplicar CRISPR a CGs nacidas en el hipocampo adulto

Para la puesta a punto de la tecnología CRISPR *in vivo*, se buscó eliminar el gen que codifica la proteína fluorescente GFP endógena en ratones transgénicos CAG^{floxStopCAS9-GFP}. El ARN guía dirigido contra *GFP* (gARN-GFPm-RFP) fue diseñado y utilizado con éxito en estudios previos (Merienne et al., 2017). Los gARN constan de una secuencia única de 20 nucleótidos complementaria al gen de interés, lo que permite su silenciamiento (Figura anexo 2). Como control, se empleó un vector similar, conteniendo el mismo promotor *U6* y ARN scaffold, aunque carece los 20 nucleótidos específicos que lo dirigen al gen blanco (ver Figura anexo 2).

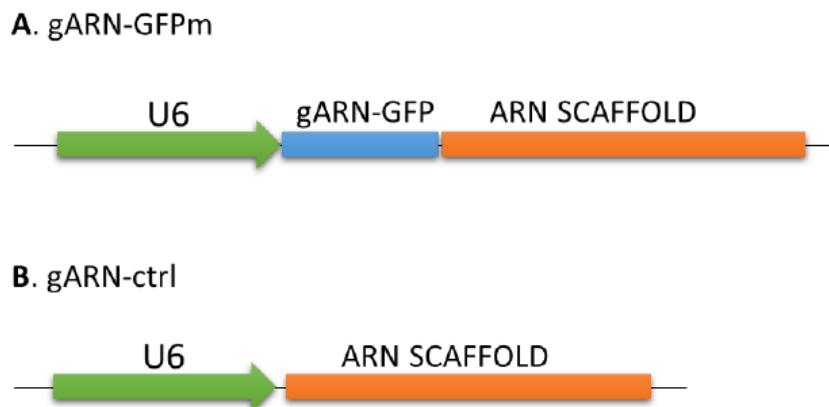


Figura anexa 2: Esquema de la región conteniendo al ARN guía en los vectores retrovirales. (A) El gARN-GFPm contiene al promotordel pequeño ARN nuclear U6 río arriba de la secuencia de 20 nucleótidos que dirige la edición del gen *GFP*. El ARN scaffold consiste en nucleótidos que se ensamblan por su secuencia complementaria y proporciona una estructura tridimensional permitiendo que Cas9 se una al gARN correctamente. (B) El gARN-ctrl contiene al promotor *U6* y el ARN scaffold, y carece los 20 nucleótidos específicos contra un gen específico.

Para infectar las células progenitoras neuronales, se inyectó una combinación de retrovirus (RV), RV-CRE y RV-gARN-GFPm-RFP en el giro dentado de ratones adultos mediante cirugía estereotáctica (Figura anexa 3A). Las neuronas infectadas, se identificaron mediante la técnica de inmunofluorescencia en secciones coronales del cerebro. Se obtuvieron imágenes confocales de aCGs que coexpresaban Cas9 y RFP (reportero del gARN) y se evaluó la expresión de GFP en estas neuronas (Figura anexa 3B).

El análisis de datos obtenidos de cinco ratones inyectados con RV-gARN-ctrl y cinco con RV-gARN-GFPm permitió cuantificar el porcentaje de aCGs que coexpresan Cas9 y RFP, y que además colocalizan con GFP. Se observó una colocalización cercana al 100% de GFP, RFP y Cas9 en el grupo control, mientras que en el grupo inyectado con el gARN específico contra GFP, la expresión de GFP disminuyó más del 50% (Figura anexo 3C). Estos resultados indican que la estrategia propuesta para la delección de moléculas en CGs nacidas en el hipocampo adulto fue exitosa.

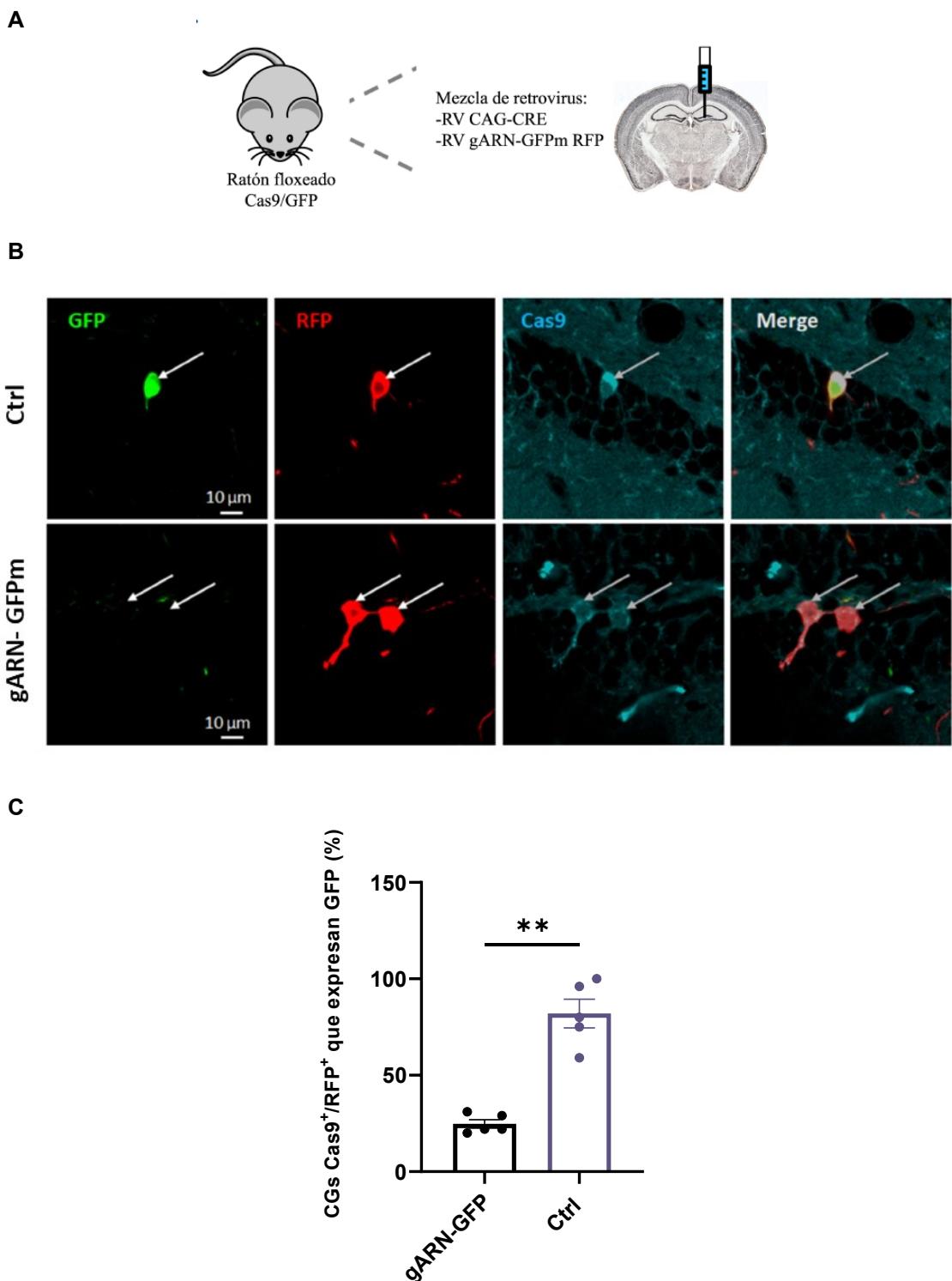


Figura anexa 3: Edición génica de GFP. (A) Coinfección de retrovirus expresando CRE y un gARN contra GFP en el giro dentado de ratones transgénicos CAG^{floxStopCAS9-GFP}. (B) Imágenes confocales representativas de CGs nuevas expresando Cas9 y gARN-GFPm-RFP. La inyección de gARN-GFPm-RFP eliminó la expresión de GFP. (C) Cuantificación de la proporción de neuronas Cas9+/RFP+ que coexpresa GFP. Las barras horizontales indican la media ± SEM. (Mann Whitney test, P-value=0.0079). N=5 ratones/condición.

Evaluación funcional de *Fryl* en neurogénesis adulta

Tras la exitosa edición de *GFP*, el siguiente paso fue cruzar nuestros datos de perfiles transcripcionales de aCGs de dos semanas de edad con datos publicados previamente a partir de ARN total (bulk RNA-seq) de neuronas de la misma región y edad neuronal (Chatzi et al., 2016). A partir de esta comparación, y tras una revisión bibliográfica que permitió comprender el rol de las diversas moléculas encontradas, se seleccionó un gen poco estudiado, potencialmente involucrado en el establecimiento de la morfología neuronal: *Fryl*.

El gen *Fryl*, identificado por primera vez en *Drosophila* en 2001, ha demostrado una diversidad de funciones y se encuentra altamente conservado evolutivamente, lo cual sugiere una fuerte presión selectiva para conservar sus características (Nagai & Mizuno, 2014). *Fryl* posee un rol crucial en la alineación de los cromosomas durante la mitosis en células de mamíferos al interactuar con componentes del citoesqueleto y regular de la dinámica de los microtúbulos (Chiba et al., 2009; Fang & Adler, 2010). A nivel del desarrollo neuronal, este gen es fundamental ya que preserva la integridad de las extensiones celulares durante la morfogénesis al regular el citoesqueleto de actina (Grueber et al., 2001, 2002). Juega un papel importante en la organización de los campos dendríticos de las neuronas sensoriales, promoviendo que las dendritas homólogas no se solapen y limitando su ramificación. Las células mutantes para *Fryl* pierden esta capacidad de evitar dendritas cercanas, dando lugar a un exceso de ramificaciones (Emoto et al., 2004).

Para evaluar el rol funcional de *Fryl* en neurogénesis adulta, se utilizó edición génica mediante CRISPR, diseñando un gARN3x, que consiste en tres secuencias dirigidas a distintos exones de *Fryl* (ver Figura anexa 4). Se emplearon dos programas gratuitos, Benchling y Broad, para diseñar las secuencias complementarias a la región del gen que se desea mutar. Las secuencias seleccionadas fueron aquellas que mostraron concordancia en ambos análisis y presentaban los mejores valores "on-target" y "off-target" (Doench et al., 2016; Ran et al., 2013)

- Puntaje On-target: Representa la probabilidad de que la secuencia complementaria se una específicamente a la región deseada del gen, lo cual indica una mayor precisión de edición.
- Puntaje Off-target: Indica la probabilidad de que la secuencia complementaria se une inespecíficamente a otras regiones del genoma, que no son las secuencias blanco a mutar. Un puntaje bajo sugiere una menor probabilidad de efectos no deseados (errores).

Además, se priorizan las secuencias que tienen como blanco los exones iniciales del gen, ya que la mutación inducirá un codón de terminación prematuro. Esto dará como resultado una proteína truncada sin actividad funcional.

Es importante destacar que ambos programas informáticos consideran la secuencia PAM (Protospacer Adjacent Motif) durante el diseño, ya que es esencial para que complejo CRISPR-Cas9 reconozca y se una específicamente al ADN.

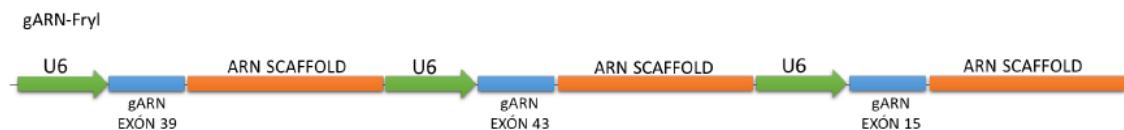


Figura anexa 4: Esquema de la región conteniendo al ARN guía en la construcción retroviral RV-gARN-Fryl3x. Este plásmido contiene 3 ARN guías dirigidos a tres exones distintos de Fryl en tandem. Cada una de ellas consiste en el promotor U6 seguido de la secuencia específica de 20 nucleótidos y el ARN scaffold.

Una vez diseñado y construidos los RV-gARN3x, fueron inyectados mediante cirugía estereotáctica en el giro dentado de ratones transgénicos CAG^{flxStopCAS9-GFP}, combinados con RV-CRE (Figura anexa 3A). Para este estudio, se analizaron características morfológicas de células granulares de 3 semanas de edad que coexpresaban GFP (reportero de Cas9) y RFP (reportero del gARN).

A partir de imágenes obtenidas en un microscopio confocal, se analizaron diferentes características morfológicas como número de ramificaciones y longitud del árbol dendrítico (Figura anexa 5A, B). Para evaluar los efectos de migración asociados a la mutación de *Fryl*, se examinó la localización de las neuronas RFP+/GFP+ en la capa granular dividida en 4 secciones: zona subgranular, capa granular 1, 2 y 3 (Figura anexa 5C, D).

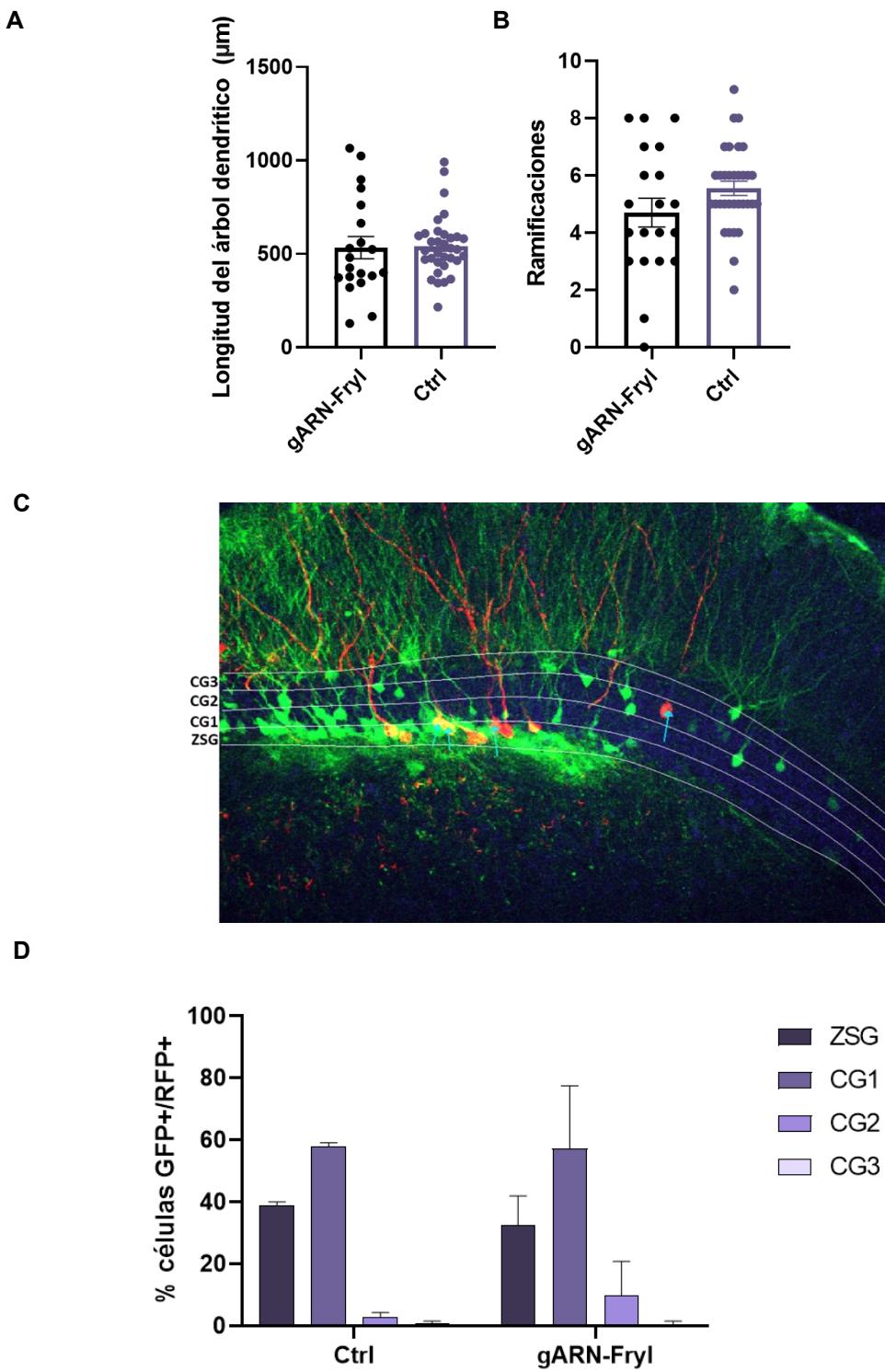


Figura anexa 5: Efectos morfológicos y de migración de la edición génica de *Fryl*.
Cuantificación de longitud del árbol dendrítico (**A**) y número de ramificaciones (**B**) para células GFP+/RFP+. (**C**) Imagen de microscopía esquematizando la división de la capa granular en: zona subgranular (ZSG), capa granular (CG) 1, 2 y 3. (**D**) Porcentaje de células RFP+/GFP+ en las subdivisiones de la capa granular. En todos los casos GFP se utiliza como reportero de la expresión de Cas9 y RFP del gARN-Fryl. Las barras horizontales indican la media ± SEM. N=2 ratones control, N= 4 ratones que expresan gARN-Fryl. Cuantificaciones realizadas por M. Couffignal.

Los análisis de la longitud del árbol dendrítico, ramificaciones y migración neuronal no mostraron diferencias significativas al comparar neuronas infectadas con el ARN control y el gARN-Fryl. Estos resultados sugerirían que *Fryl* no desempeña un papel relevante en el establecimiento de las características morfológicas evaluadas, ni en la migración neuronal. Sin embargo, la ausencia de un anticuerpo específico contra Fryl limita nuestra capacidad para confirmar que las células analizadas efectivamente no expresan esta proteína, lo cual impide asegurar la eficacia de la mutación introducida en *Fryl*.

Edición génica de *neuroligina-2* como prueba de concepto para aplicar CRISPR a CGs nacidas en el hipocampo adulto

La imposibilidad de confirmar la edición de *Fryl*, nos motivó a investigar otra molécula previamente estudiada en nuestro laboratorio: neuroligina-2 (NL2). Trabajos previos demostraron que el silenciamiento génico de NL2 mediante interferencia de ARN afecta la conectividad aferente GABAérgica de las neuronas nuevas. Para comparar la efectividad de la edición genética con CRISPR-Cas9, frente a la técnica de *silenciamiento génico*, diseñamos e inyectamos un retrovirus con un gARN específico para NL2 (gARN-NL2) en el giro dentado de ratones transgénicos *CAG^{flxStopCAS9-GFP}*.

Las neuroliginas son proteínas esenciales para la densidad postsináptica, facilitando el ensamblaje de la maquinaria de liberación presináptica (Huang & Scheiffele, 2008). En particular, NL2 es fundamental/clave para el establecimiento de las sinapsis GABAérgicas perisomáticas; su deleción resulta en una reducción selectiva de las corrientes postsinápticas perisomáticas (IPSC) en diversas regiones cerebrales (Chanda et al., 2017; Chubykin et al., 2007; Poulopoulos et al., 2009; Varoqueaux et al., 2004; Zhang et al., 2015).

Recientemente nuestro laboratorio, investigó el rol de NL2 en la maduración de los contactos aferentes perisomáticos en las aCGs. Se analizaron neuronas de 8 semanas de edad que expresaban un short hairpin ARN (shARN) para interferir la traducción de NL2 (RV-shNL2-GFP) en comparación con un virus control (RV-SCR-GFP, Figura anexa 6) (Groisman et al., 2023). Se empleó un shNL2 ampliamente reportado en la bibliografía por su alta eficacia. No obstante, corroboramos la reducción en los niveles de NL2 en células en cultivo mediante Western Blot. Para determinar el rol de NL2 en la formación de la sinapsis perisomática, se midió el área de las aposiciones somáticas de VGAT (transportador vesicular de GABA, una proteína presente en neuronas GABAérgicas) en las aCGs que expresaban el shNL2. A las 8 semanas, el

área de las aposiciones somáticas de VGAT se redujo a la mitad en las aCGs que expresaban el shNL2 en contraposición a las neuronas control (SCR), indicando que la función de NL2 es crucial para que se establezca una correcta sinapsis perisomática en las aCGs (Figura anexa 6) (Groisman et al., 2023).

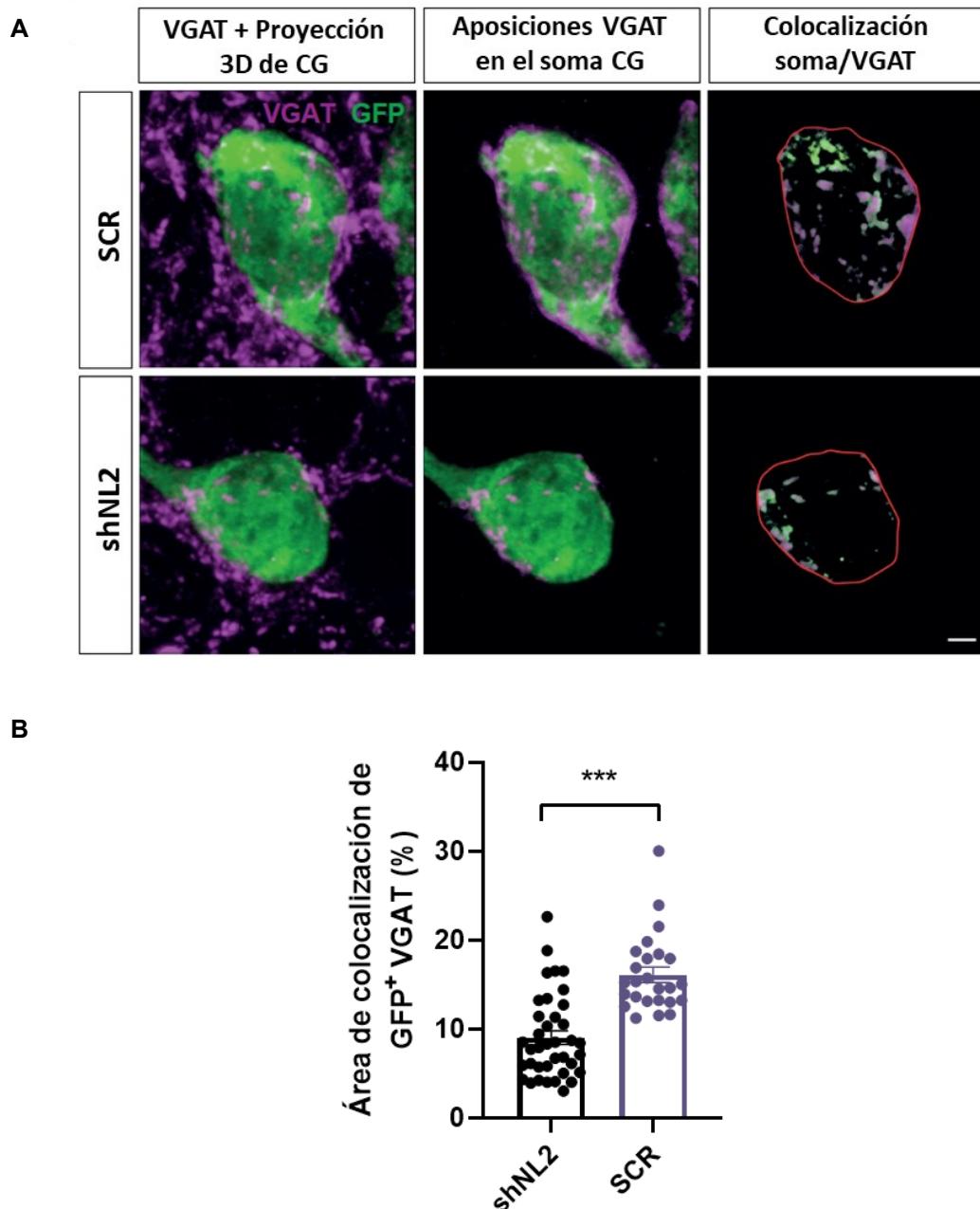


Figura anexa 6: Las sinaptogénesis perisomática requiere neuroligina-2. (Figura adaptada de Groisman et al 2023) **(A)** Reconstrucciones tridimensionales de aCG individuales que expresan SCR o shNL2. GFP se utiliza como reportero de los retrovirus y marca el soma neuronal. En color violeta se observa la inmunofluorescencia VGAT. Barra de escala: 2 μ m. **(B)** Cuantificación del área de aposición somática de terminales VGAT. (Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$). N = 29-72 para SCR (ocho ratones); y N = 38-82 para shNL2 (ocho ratones). Las barras horizontales indican la media \pm SEM.

Con el fin de evaluar el efecto de la edición génica mediante CRISPR, y compararlo con la efectividad del silenciamiento génico por reducción de ARN mensajero, se replicó el experimento anterior pero ahora utilizando un gARN específico para NL2 (gARN-NL2). El gARN-NL2 se diseñó siguiendo los mismos lineamientos detallados anteriormente para el caso del Fryl.

Posteriormente, se coinjectaron los retrovirus RV-gARN y RV-CRE en el giro dentado de ratones transgénicos *CAG^{flxStopCAS9-GFP}*. Replicando la metodología previamente empleada con shNL2, se analizaron las áreas de las aposiciones entre VGAT y los somas de las nuevas aCGs. Sin embargo, la comparación entre el grupo inyectado con gARN-NL2 y el grupo control no mostró diferencias significativas en el área de las aposiciones de VGAT en las aCGs de 8 semanas (Figura anexo 7).

Nuestros resultados no pudieron replicar los efectos observados en el silenciamiento génico de NL2 en neuronas nuevas de 8 semanas de edad, donde se había evidenciado una disminución en el área de las aposiciones de VGAT con las aCGs (Groisman et al., 2023). Aunque nuevamente carecemos de un anticuerpo específico para confirmar la edición de NL2, la imposibilidad de replicar estos resultados con la técnica CRISPR sugiere que el gARN diseñado contra NL2 no logró una edición génica efectiva.

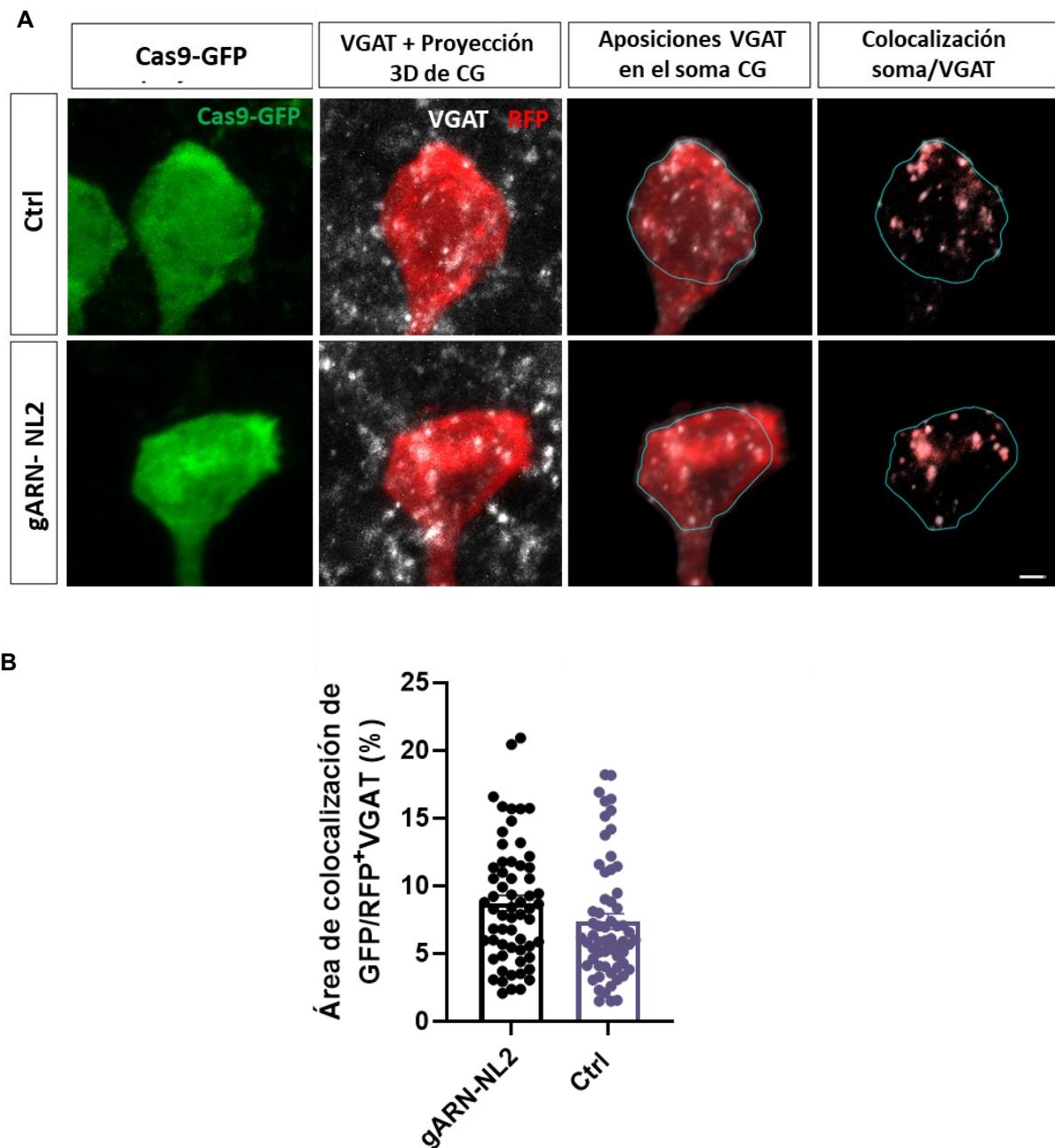


Figura anexa 7: La edición génica de *neuroligina-2* no replicó los resultados obtenidos en los experimentos de silenciamiento genico. (A) Reconstrucciones tridimensionales de aCG individuales que expresan gARN-NL2 o gARN-ctrl. GFP se utiliza como proteína reportera de la expresión de Cas9, mientras que RFP reporta la infección del retrovirus RV-gARN. En color blanco se observa la inmunofluorescencia VGAT. Barra de escala: 2 μ m. (B) Cuantificación del área de aposición somática de terminales VGAT. Las barras horizontales indican la media \pm SEM. N = 20 células/ratón para gARN-NL2 y control (3 ratones/condición).

Discusión

En el contexto de esta tesis, el principal objetivo de este anexo es optimizar el uso de la tecnología CRISPR/Cas9 para la eliminación de genes implicados en el proceso de neurogénesis adulta. De este modo, se dispondría una técnica de edición génica para estudiar el papel y la función de moléculas potencialmente relevantes en el desarrollo de nuevas neuronas en el hipocampo adulto. La tecnología CRISPR/Cas9, utiliza la endonucleasa Cas9 dirigida por un ARN guía específico para editar una secuencia de ADN complementaria. Esta herramienta ha demostrado ser exitosa en la corrección de mutaciones asociadas a enfermedades en órganos periféricos, y en la edición genética en regiones específicas del cerebro (Merienne et al., 2017; Platt et al., 2014; Williams et al., 2016).

En primer lugar, y para establecer CRISPR específicamente en aCGs del hipocampo, validamos su uso mediante una estrategia de eliminación del gen *GFP* en ratones transgénicos *CAG^{floxStopCas9-GFP}* *in vivo*. Inyectamos un retrovirus que expresa CRE en combinación con otro que contiene el gARN-GFP en el giro dentado, logrando una reducción de más del 50% en la expresión de GFP en las células editadas. Este resultado confirmó la efectividad de la herramienta CRISPR para inducir mutaciones *in vivo* en neuronas nuevas nacidas en el adulto.

Al explorar el rol del gen *Fryl* durante el proceso de neurogénesis adulta, no observamos cambios fenotípicos evidentes, como alteraciones en la morfología dendrítica o migración neuronal, tras su edición. Este resultado puede deberse a varios motivos. A diferencia de GFP, que es una molécula relativamente pequeña de 730 nucleótidos y con un gARN ya validado en bibliografía, *Fryl* es un coactivador de la transcripción de casi 300 mil pares de bases y varias isoformas, convirtiéndolo en un gen más complejo a editar. Es por ello que para aumentar las probabilidades de mutar *Fryl*, diseñamos un gARN dirigido a tres exones distintos, representando una estrategia más compleja que la existente para GFP. A su vez, debemos considerar la importancia funcional de la molécula a mutar. A diferencia de GFP, una proteína fluorescente de función no esencial para la neurona, *Fryl* es un regulador de la dinámica de microtúbulos. Dada la importancia del citoesqueleto durante la morfogénesis neuronal, la función de *Fryl*, podría ser redundante con otras moléculas de rol similar. A su vez, los efectos de la mutación podrían ser sutiles o incluso indetectables. Finalmente, la falta de un anticuerpo específico contra *Fryl* limitó nuestra capacidad de confirmar la expresión de la proteína, impidiendo una evaluación concluyente sobre la efectividad de

su edición génica. En conclusión, la falta de un fenotipo observable al editar a Fryl podría explicarse por todo lo expuesto.

Los intentos de editar el gen *NL2* utilizando CRISPR no replicaron los resultados obtenidos previamente con la interferencia de ARN mediada por shARN (Groisman et al., 2023). Esto demuestra que el diseño del gARN puede haber influido en la eficiencia de edición y subraya el rol relevante del gARN para el éxito de CRISPR. Para el diseño de los gARNs utilizamos programas ampliamente validados en bibliografía. Si bien estos algoritmos proporcionan predicciones sobre la especificidad y eficiencia de unión de los guías al ADN, no garantizan su efectividad en el contexto celular específico. Esto resalta la necesidad de realizar pruebas exhaustivas de la eficiencia de edición mediada por los gARN antes de su aplicación en estudios funcionales. Combinando técnicas de amplificación por PCR y posterior secuenciación de ADN se deben analizar los fragmentos de interés, y de esta manera se confirma el grado de edición (eventos de inserción y delección, indels). Una medición precisa de esta eficiencia es esencial para determinar el éxito de la edición genética deseada.

Ante estos desafíos, y para cumplir los objetivos de esta tesis, hemos optado por el uso de una herramienta alternativa: la sobreexpresión de moléculas candidatas. No obstante, es importante subrayar que CRISPR/Cas9 sigue representando una herramienta con potencial para la edición genética, y las investigaciones futuras deben centrarse en superar las barreras técnicas actuales para mejorar la eficiencia de edición en células *in vivo* y maximizar su potencial.

Materiales y Métodos

Animales

Los ratones transgénicos *CAG^{floxStopCAS9-GFP}* se obtuvieron en “The Jackson Laboratory”. Los ratones genéticamente modificados se mantuvieron en fondo genético C57BL/6. Se utilizaron ratones de ambos sexos, entre 2 y 3 meses de edad, considerados adultos jóvenes, alojados en jaulas grupales de 4-5 animales con agua y comida ad libitum. Todos los animales utilizados en este trabajo fueron tratados de acuerdo a protocolos experimentales aprobados por el Comité Institucional del Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto Leloir, y de acuerdo a las reglas Internacionales para la Investigación Biomédica involucrando animales de laboratorio.

Diseño y síntesis de gARN

Los gARNs usados en este trabajo se diseñaron utilizando el software de libre acceso Benchling (<http://benchling.com>), minimizando los efectos inespecíficos de unión a secuencia no deseadas (off-target). El gARN elegido para realizar el knock-out de GFP (gARN-GFPm) se obtuvo de bibliografía y su secuencia de 20 nucleótidos se detalla a continuación: 5'-GAAGTTCGAGGGCGACACCC-3' (Merienne et al., 2017).

Producción de vectores retrovirales

Para la infección de neuronas nacidas en el giro dentado adulto, se utilizó un vector retroviral (RV) no replicativo derivado del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV). De esta manera, solo se transducen progenitores neurales que se encuentran dividiéndose al momento de realizar la inyección del virus y su progenie queda marcada de manera indeleble. Las partículas retrovirales se ensamblan en células HEK293T transfectadas con 3 plásmidos separados que expresan las proteínas de la cápside, proteínas virales y la recombinasa CRE o los gARN (control, *GFP*, *Fryl* y *NL2*) río arriba del reportero RFP.

Cirugía estereotáctica

Con la finalidad de marcar nuevas cohortes neuronales se inyectó una mezcla de RV-CRE y un RV-gARN-RFP en el giro dentado de ambos hemisferios mediante una cirugía

estereotáxica en ratones de 2 a 3 meses de edad, que nos permitieron expresar Cas9/RV-gARN RFP.

El ejercicio voluntario modula la tasa neurogénica mediante el aumento en la proliferación de células progenitoras neurales (van Praag, H. et al, 1999, 2005). Teniendo en cuenta esto, los ratones fueron sometidos a ejercicio físico voluntario 3 días previos a la cirugía, hasta el día de su sacrificio. Se colocó una rueda cada dos ratones.

Para la cirugía, los ratones fueron anestesiados por vía intraperitoneal con una mezcla de 150 µg de ketamina y 15 µg de xilacina por gramo de peso corporal. Una vez anestesiado, cada animal se colocó en el aparato estereotáxico, donde se inmovilizó su cráneo y se marcaron las coordenadas para realizar la inyección en el área dorsal del GD de ambos hemisferios.

Las coordenadas fueron tomadas desde el bregma, según lo indicado por el atlas del cerebro de ratón (Paxinos & Franklin, 2001): -2 mm antero-posterior, -/+1.5 mm lateral, -1.9 mm ventral. Se administró 1 µl de RV en cada hemisferio a 0.15 µl/min mediante un microcapilar calibrado. La mezcla de virus consta de un RV-CRE y RV-gARN-RFP, en una proporción 1:2. Se monitoreó la recuperación adecuada de los animales luego de la cirugía.

Perfusión y cortes coronales

Para la obtención de los cerebros, luego de cuatro semanas de la inyección de las partículas retrovirales los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal con una mezcla de 150 µg de ketamina y 15 µg de xilacina por gramo. Luego de constatar la ausencia de reflejos visibles, se realizó una perfusión cardiaca a través del ventrículo izquierdo durante 20 minutos a un flujo de 6 ml/min. Durante los primeros 5 minutos se perfundió 50 ml de solución fisiológica con heparina (2.5 U/ml) con el propósito de limpiar los capilares sanguíneos. Luego, durante los 15 minutos restantes, se perfundió 100 ml de parafomaldehído (PFA) 4% en buffer fosfato (PB) 0.1 M (pH 7.2) para fijar los tejidos. Al finalizar la perfusión, los cerebros se mantuvieron en PFA a 4°C hasta el día siguiente.

Posteriormente fueron transferidos a una solución de sacarosa al 30% con PB 0.1, y se mantuvieron a 4°C. Se obtuvieron secciones coronales de 60 µm utilizando un micrótomo de deslizamiento. Por último, las rodajas obtenidas se mantuvieron a -20 C en solución criopreservadora hasta el momento de realizar las inmunofluorescencias.

Inmunofluorescencia

Para corroborar la eficiencia de la técnica CRISPR en aCGs nacidas en adulto y estudiar la morfología de las neuronas infectadas se realizaron inmunotinciones contra GFP, RFP, Cas9 y VGAT en secciones coronales provenientes del polo septal del hipocampo. Como paso inicial, las secciones coronales del cerebro se sometieron a un protocolo de recuperación de antígeno en buffer citrato a 65°C por 5 minutos. Posteriormente, se utilizó la técnica de free-floating, donde se incubaron las secciones con el anticuerpo primario anti-GFP de pollo (1/500, Aves), anti-RFP de conejo (1/500, Rockland), anti-Cas9 de mouse (1/10, Abcam), y anti-VGAT de conejo (1/250) de 24 a 48 horas, y con el anticuerpo secundario anti-pollo Cy2 (1/250, Jackson ImmunoResearch), anti-conejo Cy3 (1/250, Jackson ImmunoResearch), anti-rabbit Cy5 (1/250, Jackson ImmunoResearch), y anti-mouse Cy5 (1/250, Jackson ImmunoResearch) durante 2 horas. Los anticuerpos se aplicaron en Tris Buffer Salino (TBS) con suero de burro (3%) y Tritón X-100 (0.25%).

Microscopía y análisis de imágenes

Las imágenes analizadas en este trabajo fueron obtenidas mediante microscopía confocal (40X, objetivo de inmersión en aceite, NA 1.2 para imágenes de la figura anexa 3 y 4; 63X, objetivo de inmersión en aceite, NA 1.4, zoom digital 7x, para imágenes de la figura anexa 7).

La longitud dendrítica se midió a partir de proyecciones tridimensionales sobre un plano único en aCGs que expresaban tanto RFP como GFP en su soma. Las ramificaciones se cuantificaron manualmente en estas mismas imágenes.

La colocalización de los marcadores RFP y VGAT se evaluó en z-stacks que incluían 25-35 cortes ópticos para cada soma (unidad airy = 1 a intervalos de 0,25 µm). Las imágenes se analizaron utilizando el módulo de colocalización del software ZEN Pro 3.3 (Zeiss, Alemania). En primer lugar, la imagen se procesó manualmente plano a plano para delimitar la región del soma celular, correspondiente a un canal en toda la proyección 3D. Se obtuvo una proyección z-stack de todos los cortes ópticos y se trazó una región de interés (ROI) alrededor del perímetro del soma. A continuación, se procesó el segundo canal para sustraer el etiquetado fuera del ROI que delimitaba el soma. Por último, se midió el área de todo el soma y la región de colocalización con las aposiciones VGAT. Durante todos los experimentos, tanto la toma de imágenes como el análisis posterior, se realizaron de forma ciega para el operador.

Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó el software GraphPad Prism© 5. Los datos se presentan como media \pm SEM. Se utilizaron los tests de Shapiro-Wilk's, D'Agostino & Pearson ómnibus test y Kolmogórov-Smirnov's, a un valor de $p < 0.05$ para evaluar la normalidad, y se consideró dicha distribución en caso de que los tres test evaluados resultaron positivos. Debido a que las distribuciones no cumplen con la normalidad se utilizó el test estadístico no paramétrico de Mann-Whitney de dos colas para comparaciones simples entre dos grupos.

REFERENCIAS

- Acsády, L., Kamondi, A., Sík, A., Freund, T., & Buzsáki, G. (1998). GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(9), 3386–3403. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-09-03386.1998>
- Adlaf, E. W., Vaden, R. J., Niver, A. J., Manuel, A. F., Onyilo, V. C., Araujo, M. T., Dieni, C. V., Vo, H. T., King, G. D., Wadiche, J. I., & Overstreet-Wadiche, L. (2017). Adult-born neurons modify excitatory synaptic transmission to existing neurons. *eLife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.19886>
- Aibar, S., González-Blas, C. B., Moerman, T., Huynh-Thu, V. A., Imrichova, H., Hulselmans, G., Rambow, F., Marine, J.-C., Geurts, P., Aerts, J., van den Oord, J., Atak, Z. K., Wouters, J., & Aerts, S. (2017). SCENIC: single-cell regulatory network inference and clustering. *Nature Methods*, 14(11), 1083–1086. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4463>
- Aimone, J. B., Deng, W., & Gage, F. H. (2011). Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. *Neuron*, 70(4), 589–596. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.010>
- Aimone, J. B., Wiles, J., & Gage, F. H. (2006). Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nature Neuroscience*, 9(6), 723–727. <https://doi.org/10.1038/nn1707>
- Aimone, J. B., Wiles, J., & Gage, F. H. (2009). Computational influence of adult neurogenesis on memory encoding. *Neuron*, 61(2), 187–202. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.11.026>
- Alvarez, D. D., Giacomini, D., Yang, S. M., Trincheri, M. F., Temprana, S. G., Büttner, K. A., Beltramone, N., & Schinder, A. F. (2016). A disynaptic feedback network activated by experience promotes the integration of new granule cells. *Science (New York, N.Y.)*, 354(6311), 459–465. <https://doi.org/10.1126/science.aaf2156>
- Amaral, D. G., Ishizuka, N., & Claiborne, B. (1990). Neurons, numbers and the hippocampal network. *Progress in Brain Research*, 83, 1–11. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)61237-6](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)61237-6)
- Amaral, D. G., Scharfman, H. E., & Lavenex, P. (2007). The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in Brain Research*, 163, 3–22. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63001-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63001-5)
- Amaral, D. G., & Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3), 571–591. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90424-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90424-7)
- Amezquita, R. A., Lun, A. T. L., Becht, E., Carey, V. J., Carpp, L. N., Geistlinger, L., Marini, F., Rue-Albrecht, K., Risso, D., Soneson, C., Waldron, L., Pagès, H., Smith, M. L., Huber, W., Morgan, M., Gottardo, R., & Hicks, S. C. (2020). Orchestrating single-cell analysis with Bioconductor. *Nature Methods*, 17(2), 137–145. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0654-x>
- Andersen PO, Morris RG., Amaral DG., Bliss T, & O'Keefe J. (2007). *The Hippocampus Book*. Oxford University Press.

- Armand, E. J., Li, J., Xie, F., Luo, C., & Mukamel, E. A. (2021). Single-Cell Sequencing of Brain Cell Transcriptomes and Epigenomes. *Neuron*, 109(1), 11–26. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.12.010>
- Bastian, M., Heymann, S., & Jacomy, M. (2009). Bastian, M., HeGephi: An Open Source Software for Exploring and Manipulating Networks. *Proceedings of the International AAAI Conference on Web and Social Media*, 3, 361–362.
- Beckervordersandforth, R., Ebert, B., Schäffner, I., Moss, J., Fiebig, C., Shin, J., Moore, D. L., Ghosh, L., Trinchero, M. F., Stockburger, C., Friedland, K., Steib, K., von Wittgenstein, J., Keiner, S., Redecker, C., Hölter, S. M., Xiang, W., Wurst, W., Jagasia, R., ... Lie, D. C. (2017). Role of Mitochondrial Metabolism in the Control of Early Lineage Progression and Aging Phenotypes in Adult Hippocampal Neurogenesis. *Neuron*, 93(3), 560-573.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.017>
- Bergami, M., Masserdotti, G., Temprana, S. G., Motori, E., Eriksson, T. M., Göbel, J., Yang, S. M., Conzelmann, K.-K., Schinder, A. F., Götz, M., & Berninger, B. (2015). A critical period for experience-dependent remodeling of adult-born neuron connectivity. *Neuron*, 85(4), 710–717. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.01.001>
- Bibikova, M., Golic, M., Golic, K. G., & Carroll, D. (2002). Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 161(3), 1169–1175. <https://doi.org/10.1093/genetics/161.3.1169>
- Blondel, V. D., Guillaume, J.-L., Lambiotte, R., & Lefebvre, E. (2008). Fast unfolding of communities in large networks. *Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment*, 2008(10), P10008. <https://doi.org/10.1088/1742-5468/2008/10/P10008>
- Boldrini, M., Fulmore, C. A., Tartt, A. N., Simeon, L. R., Pavlova, I., Poposka, V., Rosoklja, G. B., Stankov, A., Arango, V., Dwork, A. J., Hen, R., & Mann, J. J. (2018). Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell*, 22(4), 589-599.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jstem.2018.03.015>
- Bonaguidi, M. A., Song, J., Ming, G., & Song, H. (2012). A unifying hypothesis on mammalian neural stem cell properties in the adult hippocampus. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(5), 754–761. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.03.013>
- Bonaguidi, M. A., Wheeler, M. A., Shapiro, J. S., Stadel, R. P., Sun, G. J., Ming, G., & Song, H. (2011). In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell*, 145(7), 1142–1155. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.05.024>
- Borzello, M., Ramirez, S., Treves, A., Lee, I., Scharfman, H., Stark, C., Knierim, J. J., & Rangel, L. M. (2023). Assessments of dentate gyrus function: discoveries and debates. *Nature Reviews Neuroscience*, 24(8), 502–517. <https://doi.org/10.1038/s41583-023-00710-z>
- Bottes, S., Jaeger, B. N., Pilz, G.-A., Jörg, D. J., Cole, J. D., Kruse, M., Harris, L., Korobeynyk, V. I., Mallona, I., Helmchen, F., Guillemot, F., Simons, B. D., & Jessberger, S. (2021). Long-term self-renewing stem cells in the adult mouse hippocampus identified by intravital imaging. *Nature Neuroscience*, 24(2), 225–233. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00759-4>
- Buckmaster, P. S., Strowbridge, B. W., Kunkel, D. D., Schmiege, D. L., & Schwartzkroin, P. A. (1992). Mossy cell axonal projections to the dentate gyrus molecular layer in the rat hippocampal slice. *Hippocampus*, 2(4), 349–362. <https://doi.org/10.1002/hipo.450020403>

- Burke, S. N., & Barnes, C. A. (2010). Senescent synapses and hippocampal circuit dynamics. *Trends in Neurosciences*, 33(3), 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.12.003>
- Calderari, S., Ria, M., Gérard, C., Nogueira, T. C., Villate, O., Collins, S. C., Neil, H., Gervasi, N., Hue, C., Suarez-Zamorano, N., Prado, C., Cnop, M., Bihoreau, M.-T., Kaisaki, P. J., Cazier, J.-B., Julier, C., Lathrop, M., Werner, M., Eizirik, D. L., & Gauguier, D. (2018). Molecular genetics of the transcription factor GLIS3 identifies its dual function in beta cells and neurons. *Genomics*, 110(2), 98–111. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.09.001>
- Cardona-Alberich, A., Tourbez, M., Pearce, S. F., & Sibley, C. R. (2021). Elucidating the cellular dynamics of the brain with single-cell RNA sequencing. *RNA Biology*, 18(7), 1063–1084. <https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1870362>
- Chancey, J. H., Adlaf, E. W., Sapp, M. C., Pugh, P. C., Wadiche, J. I., & Overstreet-Wadiche, L. S. (2013). GABA depolarization is required for experience-dependent synapse unsilencing in adult-born neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(15), 6614–6622. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0781-13.2013>
- Chanda, S., Hale, W. D., Zhang, B., Wernig, M., & Südhof, T. C. (2017). Unique versus Redundant Functions of Neuroligin Genes in Shaping Excitatory and Inhibitory Synapse Properties. *The Journal of Neuroscience*, 37(29), 6816–6836. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0125-17.2017>
- Chater, T. E., & Goda, Y. (2022). The Shaping of AMPA Receptor Surface Distribution by Neuronal Activity. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 14, 833782. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2022.833782>
- Chatzi, C., Zhang, Y., Shen, R., Westbrook, G. L., & Goodman, R. H. (2016). Transcriptional Profiling of Newly Generated Dentate Granule Cells Using TU Tagging Reveals Pattern Shifts in Gene Expression during Circuit Integration. *ENeuro*, 3(1). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0024-16.2016>
- Chiba, S., Ikeda, M., Katsunuma, K., Ohashi, K., & Mizuno, K. (2009). MST2- and Furry-mediated activation of NDR1 kinase is critical for precise alignment of mitotic chromosomes. *Current Biology : CB*, 19(8), 675–681. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.02.054>
- Chubykin, A. A., Atasoy, D., Etherton, M. R., Brose, N., Kavalali, E. T., Gibson, J. R., & Südhof, T. C. (2007). Activity-Dependent Validation of Excitatory versus Inhibitory Synapses by Neuroligin-1 versus Neuroligin-2. *Neuron*, 54(6), 919–931. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.029>
- Cipriani, S., Ferrer, I., Aronica, E., Kovacs, G. G., Verney, C., Nardelli, J., Khung, S., Delezoide, A.-L., Milenkovic, I., Rasika, S., Manivet, P., Benifla, J.-L., Deriot, N., Gressens, P., & Adle-Biassette, H. (2018). Hippocampal Radial Glial Subtypes and Their Neurogenic Potential in Human Fetuses and Healthy and Alzheimer's Disease Adults. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 28(7), 2458–2478. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhy096>
- Claiborne, B. J., Amaral, D. G., & Cowan, W. M. (1990). Quantitative, three-dimensional analysis of granule cell dendrites in the rat dentate gyrus. *The Journal of Comparative Neurology*, 302(2), 206–219. <https://doi.org/10.1002/cne.903020203>
- Clelland, C. D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson, G. D., Fragniere, A., Tyers, P., Jessberger, S., Saksida, L. M., Barker, R. A., Gage, F. H., & Bussey, T. J. (2009). A functional role for adult

- hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5937), 210–213. <https://doi.org/10.1126/science.1173215>
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6121), 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- Corenblum, M. J., Ray, S., Remley, Q. W., Long, M., Harder, B., Zhang, D. D., Barnes, C. A., & Madhavan, L. (2016). Reduced Nrf2 expression mediates the decline in neural stem cell function during a critical middle-age period. *Aging Cell*, 15(4), 725–736. <https://doi.org/10.1111/acel.12482>
- De Vincenti, A. P., Ríos, A. S., Paratcha, G., & Ledda, F. (2019). Mechanisms That Modulate and Diversify BDNF Functions: Implications for Hippocampal Synaptic Plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 135. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00135>
- Dennis, C. V., Suh, L. S., Rodriguez, M. L., Kril, J. J., & Sutherland, G. T. (2016). Human adult neurogenesis across the ages: An immunohistochemical study. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 42(7), 621–638. <https://doi.org/10.1111/nan.12337>
- Denny, C. A., Lebois, E., & Ramirez, S. (2017). From Engrams to Pathologies of the Brain. *Frontiers in Neural Circuits*, 11, 23. <https://doi.org/10.3389/fncir.2017.00023>
- Desmond, N. L., & Levy, W. B. (1985). Granule cell dendritic spine density in the rat hippocampus varies with spine shape and location. *Neuroscience Letters*, 54(2–3), 219–224. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(85\)80082-3](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(85)80082-3)
- Doan, T. P., Lagartos-Donate, M. J., Nilssen, E. S., Ohara, S., & Witter, M. P. (2019). Convergent Projections from Perirhinal and Postrhinal Cortices Suggest a Multisensory Nature of Lateral, but Not Medial, Entorhinal Cortex. *Cell Reports*, 29(3), 617–627.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.005>
- Doench, J. G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vainberg, E. W., Donovan, K. F., Smith, I., Tothova, Z., Wilen, C., Orchard, R., Virgin, H. W., Listgarten, J., & Root, D. E. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology*, 34(2), 184–191. <https://doi.org/10.1038/nbt.3437>
- Dupret, D., Revest, J.-M., Koehl, M., Ichas, F., De Giorgi, F., Costet, P., Abrous, D. N., & Piazza, P. V. (2008). Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PloS One*, 3(4), e1959. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001959>
- Duque, A., Arellano, J. I., & Rakic, P. (2022). An assessment of the existence of adult neurogenesis in humans and value of its rodent models for neuropsychiatric diseases. *Molecular Psychiatry*, 27(1), 377–382. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01314-8>
- Emoto, K., He, Y., Ye, B., Grueber, W. B., Adler, P. N., Jan, L. Y., & Jan, Y.-N. (2004). Control of dendritic branching and tiling by the Tricornered-kinase/Furry signaling pathway in *Drosophila* sensory neurons. *Cell*, 119(2), 245–256. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.09.036>
- Encinas, J. M., Michurina, T. V., Peunova, N., Park, J.-H., Tordo, J., Peterson, D. A., Fishell, G., Koulakov, A., & Enikolopov, G. (2011). Division-coupled astrocytic differentiation and age-

- related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, 8(5), 566–579. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.03.010>
- Encinas, J. M., Vaahokari, A., & Enikolopov, G. (2006). Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(21), 8233–8238. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601992103>
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., & Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*, 4(11), 1313–1317. <https://doi.org/10.1038/3305>
- Erwin, S. R., Sun, W., Copeland, M., Lindo, S., Spruston, N., & Cembrowski, M. S. (2020). A Sparse, Spatially Biased Subtype of Mature Granule Cell Dominates Recruitment in Hippocampal-Associated Behaviors. *Cell Reports*, 31(4), 107551. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107551>
- Espinoza, C., Guzman, S. J., Zhang, X., & Jonas, P. (2018). Parvalbumin+ interneurons obey unique connectivity rules and establish a powerful lateral-inhibition microcircuit in dentate gyrus. *Nature Communications*, 9(1), 4605. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06899-3>
- Espósito, M. S., Piatti, V. C., Laplagne, D. A., Morgenstern, N. A., Ferrari, C. C., Pitossi, F. J., & Schinder, A. F. (2005). Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(44), 10074–10086. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3114-05.2005>
- Fan, X., Wheatley, E. G., & Villeda, S. A. (2017). Mechanisms of Hippocampal Aging and the Potential for Rejuvenation. *Annual Review of Neuroscience*, 40, 251–272. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-072116-031357>
- Fang, X., & Adler, P. N. (2010). Regulation of cell shape, wing hair initiation and the actin cytoskeleton by Trc/Fry and Wts/Mats complexes. *Developmental Biology*, 341(2), 360–374. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.02.029>
- Franjic, D., Skarica, M., Ma, S., Arellano, J. I., Tebbenkamp, A. T. N., Choi, J., Xu, C., Li, Q., Morozov, Y. M., Andrijevic, D., Vrselja, Z., Spajic, A., Santpere, G., Li, M., Zhang, S., Liu, Y., Spurrier, J., Zhang, L., Gudelj, I., ... Sestan, N. (2022). Transcriptomic taxonomy and neurogenic trajectories of adult human, macaque, and pig hippocampal and entorhinal cells. *Neuron*, 110(3), 452-469.e14. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.10.036>
- Freund, T. F., & Buzsáki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6(4), 347–470. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1996\)6:4<347::AID-HIPO1>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:4<347::AID-HIPO1>3.0.CO;2-1)
- Frotscher, M., Seress, L., Schwerdtfeger, W. K., & Buhl, E. (1991). The mossy cells of the fascia dentata: a comparative study of their fine structure and synaptic connections in rodents and primates. *The Journal of Comparative Neurology*, 312(1), 145–163. <https://doi.org/10.1002/cne.903120111>
- Gambrill, A. C., & Barria, A. (2011). NMDA receptor subunit composition controls synaptogenesis and synapse stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(14), 5855–5860. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012676108>

- Gao, Y., Shen, M., Gonzalez, J. C., Dong, Q., Kannan, S., Hoang, J. T., Eisinger, B. E., Pandey, J., Javadi, S., Chang, Q., Wang, D., Overstreet-Wadiche, L., & Zhao, X. (2020). RGS6 Mediates Effects of Voluntary Running on Adult Hippocampal Neurogenesis. *Cell Reports*, 32(5), 107997. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107997>
- Garthe, A., Behr, J., & Kempermann, G. (2009). Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS One*, 4(5), e5464. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005464>
- Ge, S., Goh, E. L. K., Sailor, K. A., Kitabatake, Y., Ming, G., & Song, H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, 439(7076), 589–593. <https://doi.org/10.1038/nature04404>
- Ge, S. X., Jung, D., & Yao, R. (2020). ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 36(8), 2628–2629. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz931>
- Ge, S., Yang, C.-H., Hsu, K.-S., Ming, G.-L., & Song, H. (2007). A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron*, 54(4), 559–566. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.002>
- Gebara, E., Bonaguidi, M. A., Beckervordersandforth, R., Sultan, S., Udry, F., Gijs, P.-J., Lie, D. C., Ming, G.-L., Song, H., & Toni, N. (2016). Heterogeneity of Radial Glia-Like Cells in the Adult Hippocampus. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 34(4), 997–1010. <https://doi.org/10.1002/stem.2266>
- Germain, P.-L., Lun, A., Garcia Meixide, C., Macnair, W., & Robinson, M. D. (2021). Doublet identification in single-cell sequencing data using scDblFinder. *F1000Research*, 10, 979. <https://doi.org/10.12688/f1000research.73600.2>
- Gilbert, L. A., Larson, M. H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G. A., Torres, S. E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E. H., Doudna, J. A., Lim, W. A., Weissman, J. S., & Qi, L. S. (2013). CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. *Cell*, 154(2), 442–451. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.044>
- Gonçalves, J. T., Schafer, S. T., & Gage, F. H. (2016). Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell*, 167(4), 897–914. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.021>
- Groisman, A. I., Aguilar-Arredondo, A., Giacomini, D., & Schinder, A. F. (2023). Neuroligin-2 controls the establishment of fast GABAergic transmission in adult-born granule cells. *Hippocampus*, 33(4), 424–441. <https://doi.org/10.1002/hipo.23505>
- Groisman, A. I., Yang, S. M., & Schinder, A. F. (2020). Differential Coupling of Adult-Born Granule Cells to Parvalbumin and Somatostatin Interneurons. *Cell Reports*, 30(1), 202–214.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.12.005>
- Grueber, W. B., Graubard, K., & Truman, J. W. (2001). Tiling of the body wall by multidendritic sensory neurons in Manduca sexta. *The Journal of Comparative Neurology*, 440(3), 271–283. <https://doi.org/10.1002/cne.1385>
- Grueber, W. B., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (2002). Tiling of the Drosophila epidermis by multidendritic sensory neurons. *Development (Cambridge, England)*, 129(12), 2867–2878. <https://doi.org/10.1242/dev.129.12.2867>

- Gu, Y., Arruda-Carvalho, M., Wang, J., Janoschka, S. R., Josselyn, S. A., Frankland, P. W., & Ge, S. (2012). Optical controlling reveals time-dependent roles for adult-born dentate granule cells. *Nature Neuroscience*, 15(12), 1700–1706. <https://doi.org/10.1038/nn.3260>
- Guarente, L. (2014). Aging research-where do we stand and where are we going? *Cell*, 159(1), 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.041>
- Habib, N., Li, Y., Heidenreich, M., Swiech, L., Avraham-David, I., Trombetta, J. J., Hession, C., Zhang, F., & Regev, A. (2016). Div-Seq: Single-nucleus RNA-Seq reveals dynamics of rare adult newborn neurons. *Science (New York, N.Y.)*, 353(6302), 925–928. <https://doi.org/10.1126/science.aad7038>
- Hagihara, H., Toyama, K., Yamasaki, N., & Miyakawa, T. (2009). Dissection of hippocampal dentate gyrus from adult mouse. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 33. <https://doi.org/10.3791/1543>
- Hainmueller, T., & Bartos, M. (2020). Dentate gyrus circuits for encoding, retrieval and discrimination of episodic memories. *Nature Reviews Neuroscience*, 21(3), 153–168. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0260-z>
- Han, Z. S., Buhl, E. H., Lörinczi, Z., & Somogyi, P. (1993). A high degree of spatial selectivity in the axonal and dendritic domains of physiologically identified local-circuit neurons in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *The European Journal of Neuroscience*, 5(5), 395–410. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1993.tb00507.x>
- Harley, C. W. (2007). Norepinephrine and the dentate gyrus. *Progress in Brain Research*, 163, 299–318. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63018-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63018-0)
- Haslinger, A., Schwarz, T. J., Covic, M., & Lie, D. C. (2009). Expression of Sox11 in adult neurogenic niches suggests a stage-specific role in adult neurogenesis. *The European Journal of Neuroscience*, 29(11), 2103–2114. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06768.x>
- Henze, D. A., Wittner, L., & Buzsáki, G. (2002). Single granule cells reliably discharge targets in the hippocampal CA3 network in vivo. *Nature Neuroscience*, 5(8), 790–795. <https://doi.org/10.1038/nn887>
- Hillary, R. F., & FitzGerald, U. (2018). A lifetime of stress: ATF6 in development and homeostasis. *Journal of Biomedical Science*, 25(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0453-1>
- Hochgerner, H., Zeisel, A., Lönnberg, P., & Linnarsson, S. (2018). Conserved properties of dentate gyrus neurogenesis across postnatal development revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature Neuroscience*, 21(2), 290–299. <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0056-2>
- Hodge, R. D., Kowalczyk, T. D., Wolf, S. A., Encinas, J. M., Rippey, C., Enikolopov, G., Kempermann, G., & Hevner, R. F. (2008). Intermediate progenitors in adult hippocampal neurogenesis: Tbr2 expression and coordinate regulation of neuronal output. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(14), 3707–3717. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4280-07.2008>
- Hofmann, M. E., & Frazier, C. J. (2010). Muscarinic receptor activation modulates the excitability of hilar mossy cells through the induction of an afterdepolarization. *Brain Research*, 1318, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.01.011>

- Hosp, J. A., Strüber, M., Yanagawa, Y., Obata, K., Vida, I., Jonas, P., & Bartos, M. (2014). Morphophysiological criteria divide dentate gyrus interneurons into classes. *Hippocampus*, 24(2), 189–203. <https://doi.org/10.1002/hipo.22214>
- Houser, C. R. (2007). Interneurons of the dentate gyrus: an overview of cell types, terminal fields and neurochemical identity. *Progress in Brain Research*, 163, 217–232. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63013-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63013-1)
- Huang, Z. J., & Scheiffele, P. (2008). GABA and neuroligin signaling: linking synaptic activity and adhesion in inhibitory synapse development. *Current Opinion in Neurobiology*, 18(1), 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.05.008>
- Irwin, D. J., Lee, V. M.-Y., & Trojanowski, J. Q. (2013). Parkinson's disease dementia: convergence of α-synuclein, tau and amyloid-β pathologies. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(9), 626–636. <https://doi.org/10.1038/nrn3549>
- Izquierdo, I. (1991). Role of NMDA receptors in memory. *Trends in Pharmacological Sciences*, 12(4), 128–129. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(91\)90527-y](https://doi.org/10.1016/0165-6147(91)90527-y)
- Jacomy, M., Venturini, T., Heymann, S., & Bastian, M. (2014). ForceAtlas2, a continuous graph layout algorithm for handy network visualization designed for the Gephi software. *PloS One*, 9(6), e98679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098679>
- Jaeger, B. N., Linker, S. B., Parylak, S. L., Barron, J. J., Gallina, I. S., Saavedra, C. D., Fitzpatrick, C., Lim, C. K., Schafer, S. T., Lacar, B., Jessberger, S., & Gage, F. H. (2018). A novel environment-evoked transcriptional signature predicts reactivity in single dentate granule neurons. *Nature Communications*, 9(1), 3084. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05418-8>
- JOHNSTON, D., & AMARAL, D. G. (2004). Hippocampus. In *The Synaptic Organization of the Brain* (pp. 455–498). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195159561.003.0011>
- Josselyn, S. A., Köhler, S., & Frankland, P. W. (2015). Finding the engram. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(9), 521–534. <https://doi.org/10.1038/nrn4000>
- Joung, J., Konermann, S., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Platt, R. J., Brigham, M. D., Sanjana, N. E., & Zhang, F. (2017). Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening. *Nature Protocols*, 12(4), 828–863. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.016>
- Jungenitz, T., Beining, M., Radic, T., Deller, T., Cuntz, H., Jedlicka, P., & Schwarzacher, S. W. (2018). Structural homo- and heterosynaptic plasticity in mature and adult newborn rat hippocampal granule cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(20), E4670–E4679. <https://doi.org/10.1073/pnas.1801889115>
- Kalinina, A., & Lagace, D. (2022). Single-Cell and Single-Nucleus RNAseq Analysis of Adult Neurogenesis. *Cells*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/cells11101633>
- Kavyanifar, A., Turan, S., & Lie, D. C. (2018). SoxC transcription factors: multifunctional regulators of neurodevelopment. *Cell and Tissue Research*, 371(1), 91–103. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2708-7>
- Kempermann, G., Gage, F. H., Aigner, L., Song, H., Curtis, M. A., Thuret, S., Kuhn, H. G., Jessberger, S., Frankland, P. W., Cameron, H. A., Gould, E., Hen, R., Abrous, D. N., Toni, N., Schinder, A.

- F., Zhao, X., Lucassen, P. J., & Frisén, J. (2018). Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions. *Cell Stem Cell*, 23(1), 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.04.004>
- Kempermann, G., Kuhn, H. G., & Gage, F. H. (1998). Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(9), 3206–3212. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-09-03206.1998>
- Kepecs, A., & Fishell, G. (2014). Interneuron cell types are fit to function. *Nature*, 505(7483), 318–326. <https://doi.org/10.1038/nature12983>
- Kim, E. J., Leung, C. T., Reed, R. R., & Johnson, J. E. (2007). In vivo analysis of Ascl1 defined progenitors reveals distinct developmental dynamics during adult neurogenesis and gliogenesis. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(47), 12764–12774. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3178-07.2007>
- Knierim, J. J., Lee, I., & Hargreaves, E. L. (2006). Hippocampal place cells: parallel input streams, subregional processing, and implications for episodic memory. *Hippocampus*, 16(9), 755–764. <https://doi.org/10.1002/hipo.20203>
- Knierim, J. J., Neunuebel, J. P., & Deshmukh, S. S. (2014). Functional correlates of the lateral and medial entorhinal cortex: objects, path integration and local-global reference frames. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369(1635), 20130369. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0369>
- Knobloch, M., Braun, S. M. G., Zurkirchen, L., von Schoultz, C., Zamboni, N., Araúzo-Bravo, M. J., Kovacs, W. J., Karalay, O., Suter, U., Machado, R. A. C., Roccio, M., Lutolf, M. P., Semenkovich, C. F., & Jessberger, S. (2013). Metabolic control of adult neural stem cell activity by Fasn-dependent lipogenesis. *Nature*, 493(7431), 226–230. <https://doi.org/10.1038/nature11689>
- Kohler, S. J., Williams, N. I., Stanton, G. B., Cameron, J. L., & Greenough, W. T. (2011). Maturation time of new granule cells in the dentate gyrus of adult macaque monkeys exceeds six months. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(25), 10326–10331. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017099108>
- Kong, W., Fu, Y. C., Holloway, E. M., Garippler, G., Yang, X., Mazzoni, E. O., & Morris, S. A. (2022). Capybara: A computational tool to measure cell identity and fate transitions. *Cell Stem Cell*, 29(4), 635-649.e11. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2022.03.001>
- Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H., & Gage, F. H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(6), 2027–2033. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-06-02027.1996>
- Kuipers, S. D., Schroeder, J. E., & Trentani, A. (2015). Changes in hippocampal neurogenesis throughout early development. *Neurobiology of Aging*, 36(1), 365–379. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.07.033>
- Lacagnina, A. F., Brockway, E. T., Crovetti, C. R., Shue, F., McCarty, M. J., Sattler, K. P., Lim, S. C., Santos, S. L., Denny, C. A., & Drew, M. R. (2019). Distinct hippocampal engrams control

extinction and relapse of fear memory. *Nature Neuroscience*, 22(5), 753–761. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0361-z>

Laplagne, D. A., Espósito, M. S., Piatti, V. C., Morgenstern, N. A., Zhao, C., van Praag, H., Gage, F. H., & Schinder, A. F. (2006). Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS Biology*, 4(12), e409. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040409>

Laplagne, D. A., Kamienkowski, J. E., Espósito, M. S., Piatti, V. C., Zhao, C., Gage, F. H., & Schinder, A. F. (2007). Similar GABAergic inputs in dentate granule cells born during embryonic and adult neurogenesis. *The European Journal of Neuroscience*, 25(10), 2973–2981. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05549.x>

Lee, J. W., & Jung, M. W. (2017). Separation or binding? Role of the dentate gyrus in hippocampal mnemonic processing. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 75, 183–194. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.01.049>

Lie, D.-C., Colamarino, S. A., Song, H.-J., Désiré, L., Mira, H., Consiglio, A., Lein, E. S., Jessberger, S., Lansford, H., Dearie, A. R., & Gage, F. H. (2005). Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature*, 437(7063), 1370–1375. <https://doi.org/10.1038/nature04108>

Liu, H.-K. (2022). Human adult hippocampal neurogenesis is back, again? *Cell Research*, 32(9), 793–794. <https://doi.org/10.1038/s41422-022-00698-8>

Lods, M., Pacary, E., Mazier, W., Farrugia, F., Mortessagne, P., Masachs, N., Charrier, V., Massa, F., Cota, D., Ferreira, G., Abrous, D. N., & Tronel, S. (2021). Adult-born neurons immature during learning are necessary for remote memory reconsolidation in rats. *Nature Communications*, 12(1), 1778. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22069-4>

Lucassen, P. J., Fitzsimons, C. P., Salta, E., & Maletić-Savatic, M. (2020). Adult neurogenesis, human after all (again): Classic, optimized, and future approaches. *Behavioural Brain Research*, 381, 112458. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112458>

Marín-Burgin, A., Mongiat, L. A., Pardi, M. B., & Schinder, A. F. (2012). Unique processing during a period of high excitation/inhibition balance in adult-born neurons. *Science (New York, N.Y.)*, 335(6073), 1238–1242. <https://doi.org/10.1126/science.1214956>

Marr, D. (1971). Simple memory: a theory for archicortex. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 262(841), 23–81. <https://doi.org/10.1098/rstb.1971.0078>

Martin, E. A., Muralidhar, S., Wang, Z., Cervantes, D. C., Basu, R., Taylor, M. R., Hunter, J., Cutforth, T., Wilke, S. A., Ghosh, A., & Williams, M. E. (2015). The intellectual disability gene Kirrel3 regulates target-specific mossy fiber synapse development in the hippocampus. *eLife*, 4, e09395. <https://doi.org/10.7554/eLife.09395>

Mathews, E. A., Morgenstern, N. A., Piatti, V. C., Zhao, C., Jessberger, S., Schinder, A. F., & Gage, F. H. (2010). A distinctive layering pattern of mouse dentate granule cells is generated by developmental and adult neurogenesis. *The Journal of Comparative Neurology*, 518(22), 4479–4490. <https://doi.org/10.1002/cne.22489>

- Mattson, M. P. (2012). Energy intake and exercise as determinants of brain health and vulnerability to injury and disease. *Cell Metabolism*, 16(6), 706–722. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.08.012>
- McBain, C. J. (2008). Differential mechanisms of transmission and plasticity at mossy fiber synapses. *Progress in Brain Research*, 169, 225–240. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)00013-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)00013-1)
- McHugh, S. B., Lopes-Dos-Santos, V., Gava, G. P., Hartwich, K., Tam, S. K. E., Bannerman, D. M., & Dupret, D. (2022). Adult-born dentate granule cells promote hippocampal population sparsity. *Nature Neuroscience*, 25(11), 1481–1491. <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01176-5>
- Merienne, N., Vachey, G., de Longprez, L., Meunier, C., Zimmer, V., Perriard, G., Canales, M., Mathias, A., Herrgott, L., Beltraminelli, T., Maulet, A., Dequesne, T., Pythoud, C., Rey, M., Pellerin, L., Brouillet, E., Perrier, A. L., du Pasquier, R., & Déglon, N. (2017). The Self-Inactivating KamiCas9 System for the Editing of CNS Disease Genes. *Cell Reports*, 20(12), 2980–2991. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.075>
- Miller, S. M., & Sahay, A. (2019). Functions of adult-born neurons in hippocampal memory interference and indexing. *Nature Neuroscience*, 22(10), 1565–1575. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0484-2>
- Ming, G.-L., & Song, H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*, 70(4), 687–702. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.001>
- Mo, A., Mukamel, E. A., Davis, F. P., Luo, C., Henry, G. L., Picard, S., Urich, M. A., Nery, J. R., Sejnowski, T. J., Lister, R., Eddy, S. R., Ecker, J. R., & Nathans, J. (2015). Epigenomic Signatures of Neuronal Diversity in the Mammalian Brain. *Neuron*, 86(6), 1369–1384. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.05.018>
- Mongiat, L. A., Espósito, M. S., Lombardi, G., & Schinder, A. F. (2009). Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus. *PloS One*, 4(4), e5320. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005320>
- Moore, D., Pilz, G., Araúzo-Bravo, M., Barral, Y., & Jessberger, S. (2015). A mechanism for the segregation of age in mammalian neural stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 349(6254), 1334–1338. <https://doi.org/10.1126/science.aac9868>
- Moreno-Jiménez, E. P., Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Rábano, A., Cafini, F., Pallas-Bazarría, N., Ávila, J., & Llorens-Martín, M. (2019). Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 25(4), 554–560. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0375-9>
- Moreno-Jiménez, E. P., Terreros-Roncal, J., Flor-García, M., Rábano, A., & Llorens-Martín, M. (2021). Evidences for Adult Hippocampal Neurogenesis in Humans. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 41(12), 2541–2553. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0675-20.2020>
- Morgenstern, N. A., Lombardi, G., & Schinder, A. F. (2008). Newborn granule cells in the ageing dentate gyrus. *The Journal of Physiology*, 586(16), 3751–3757. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.154807>

- Mossink, B., van Rhijn, J.-R., Wang, S., Linda, K., Vitale, M. R., Zöller, J. E. M., van Hugte, E. J. H., Bak, J., Verboven, A. H. A., Selten, M., Negwer, M., Latour, B. L., van der Werf, I., Keller, J. M., Klein Gunnewiek, T. M., Schoenmaker, C., Oudakker, A., Anania, A., Jansen, S., ... Nadif Kasri, N. (2022). Cadherin-13 is a critical regulator of GABAergic modulation in human stem-cell-derived neuronal networks. *Molecular Psychiatry*, 27(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01117-x>
- Mu, L., Berti, L., Masserdotti, G., Covic, M., Michaelidis, T. M., Doberauer, K., Merz, K., Rehfeld, F., Haslinger, A., Wegner, M., Sock, E., Lefebvre, V., Couillard-Despres, S., Aigner, L., Berninger, B., & Lie, D. C. (2012). SoxC transcription factors are required for neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(9), 3067–3080. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4679-11.2012>
- Mugnaini, M., Trincheri, M. F., Schinder, A. F., Piatti, V. C., & Kropff, E. (2023). Unique potential of immature adult-born neurons for the remodeling of CA3 spatial maps. *Cell Reports*, 42(9), 113086. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113086>
- Nagai, T., & Mizuno, K. (2014). Multifaceted roles of Furry proteins in invertebrates and vertebrates. *Journal of Biochemistry*, 155(3), 137–146. <https://doi.org/10.1093/jb/mvu001>
- Nahm, M., Lim, S. M., Kim, Y.-E., Park, J., Noh, M.-Y., Lee, S., Roh, J. E., Hwang, S.-M., Park, C.-K., Kim, Y. H., Lim, G., Lee, J., Oh, K.-W., Ki, C.-S., & Kim, S. H. (2020). ANXA11 mutations in ALS cause dysregulation of calcium homeostasis and stress granule dynamics. *Science Translational Medicine*, 12(566). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aax3993>
- Nakao, A., Miyazaki, N., Ohira, K., Hagihara, H., Takagi, T., Usuda, N., Ishii, S., Murata, K., & Miyakawa, T. (2017). Immature morphological properties in subcellular-scale structures in the dentate gyrus of Schnurri-2 knockout mice: a model for schizophrenia and intellectual disability. *Molecular Brain*, 10(1), 60. <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0339-2>
- Naranjo, J. R., Zhang, H., Villar, D., González, P., Dopazo, X. M., Morón-Oset, J., Higueras, E., Oliveros, J. C., Arrabal, M. D., Prieto, A., Cercós, P., González, T., De la Cruz, A., Casado-Vela, J., Rábano, A., Valenzuela, C., Gutierrez-Rodriguez, M., Li, J.-Y., & Mellström, B. (2016). Activating transcription factor 6 derepression mediates neuroprotection in Huntington disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(2), 627–638. <https://doi.org/10.1172/JCI82670>
- Neunuebel, J. P., Yoganarasimha, D., Rao, G., & Knierim, J. J. (2013). Conflicts between local and global spatial frameworks dissociate neural representations of the lateral and medial entorhinal cortex. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(22), 9246–9258. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0946-13.2013>
- Nilssen, E. S., Doan, T. P., Nigro, M. J., Ohara, S., & Witter, M. P. (2019). Neurons and networks in the entorhinal cortex: A reappraisal of the lateral and medial entorhinal subdivisions mediating parallel cortical pathways. *Hippocampus*, 29(12), 1238–1254. <https://doi.org/10.1002/hipo.23145>
- Ogando, M. B., Pedroncini, O., Federman, N., Romano, S. A., Brum, L. A., Lanuza, G. M., Refojo, D., & Marin-Burgin, A. (2021). Cholinergic modulation of dentate gyrus processing through dynamic reconfiguration of inhibitory circuits. *Cell Reports*, 36(8), 109572. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109572>

- Olpe, C., & Jessberger, S. (2023). Cell population dynamics in the course of adult hippocampal neurogenesis: Remaining unknowns. *Hippocampus*, 33(4), 402–411. <https://doi.org/10.1002/hipo.23475>
- Paredes, M. F., Sorrells, S. F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K. W., James, D., Mayer, S., Chang, J., Auguste, K. I., Chang, E. F., Gutierrez Martin, A. J., Kriegstein, A. R., Mathern, G. W., Oldham, M. C., Huang, E. J., Garcia-Verdugo, J. M., Yang, Z., & Alvarez-Buylla, A. (2018). Does Adult Neurogenesis Persist in the Human Hippocampus? *Cell Stem Cell*, 23(6), 780–781. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.11.006>
- Park, H., & Poo, M. (2013). Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(1), 7–23. <https://doi.org/10.1038/nrn3379>
- Paxinos, G., & Franklin, K. B. J. (2001). The mouse brain in stereotaxic coordinates. *Academic Press*, 296.
- Piatti, V. C., Davies-Sala, M. G., Espósito, M. S., Mongiat, L. A., Trinchero, M. F., & Schinder, A. F. (2011). The timing for neuronal maturation in the adult hippocampus is modulated by local network activity. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(21), 7715–7728. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1380-11.2011>
- Piatti, V. C., Espósito, M. S., & Schinder, A. F. (2006). The timing of neuronal development in adult hippocampal neurogenesis. *The Neuroscientist : A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 12(6), 463–468. <https://doi.org/10.1177/1073858406293538>
- Piatti, V. C., Ewell, L. A., & Leutgeb, J. K. (2013). Neurogenesis in the dentate gyrus: carrying the message or dictating the tone. *Frontiers in Neuroscience*, 7, 50. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00050>
- Platt, R. J., Chen, S., Zhou, Y., Yim, M. J., Swiech, L., Kempton, H. R., Dahlman, J. E., Parnas, O., Eisenhaure, T. M., Jovanovic, M., Graham, D. B., Jhunjhunwala, S., Heidenreich, M., Xavier, R. J., Langer, R., Anderson, D. G., Hacohen, N., Regev, A., Feng, G., ... Zhang, F. (2014). CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*, 159(2), 440–455. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.014>
- Poulopoulos, A., Aramuni, G., Meyer, G., Soykan, T., Hoon, M., Papadopoulos, T., Zhang, M., Paarmann, I., Fuchs, C., Harvey, K., Jedlicka, P., Schwarzacher, S. W., Betz, H., Harvey, R. J., Brose, N., Zhang, W., & Varoqueaux, F. (2009). Neuroligin 2 Drives Postsynaptic Assembly at Perisomatic Inhibitory Synapses through Gephyrin and Collybistin. *Neuron*, 63(5), 628–642. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.08.023>
- Prince, L. Y., Bacon, T. J., Tigaret, C. M., & Mellor, J. R. (2016). Neuromodulation of the Feedforward Dentate Gyrus-CA3 Microcircuit. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 8, 32. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2016.00032>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Remmers, C. L., Castillon, C. C. M., Armstrong, J. N., & Contractor, A. (2020). Recruitment of parvalbumin and somatostatin interneuron inputs to adult born dentate granule neurons. *Scientific Reports*, 10(1), 17522. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74385-2>

- Restivo, L., Niibori, Y., Mercaldo, V., Josselyn, S. A., & Frankland, P. W. (2015). Development of Adult-Generated Cell Connectivity with Excitatory and Inhibitory Cell Populations in the Hippocampus. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(29), 10600–10612. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3238-14.2015>
- Rivero, O., Selten, M. M., Sich, S., Popp, S., Bacmeister, L., Amendola, E., Negwer, M., Schubert, D., Proft, F., Kiser, D., Schmitt, A. G., Gross, C., Kolk, S. M., Strekalova, T., van den Hove, D., Resink, T. J., Nadif Kasri, N., & Lesch, K. P. (2015). Cadherin-13, a risk gene for ADHD and comorbid disorders, impacts GABAergic function in hippocampus and cognition. *Translational Psychiatry*, 5(10), e655. <https://doi.org/10.1038/tp.2015.152>
- Rolls, E. T., Treves, A., Robertson, R. G., Georges-François, P., & Panzeri, S. (1998). Information about spatial view in an ensemble of primate hippocampal cells. *Journal of Neurophysiology*, 79(4), 1797–1813. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.79.4.1797>
- Sahay, A., Scobie, K. N., Hill, A. S., O'Carroll, C. M., Kheirbek, M. A., Burghardt, N. S., Fenton, A. A., Dranovsky, A., & Hen, R. (2011). Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*, 472(7344), 466–470. <https://doi.org/10.1038/nature09817>
- Sahay, A., Wilson, D. A., & Hen, R. (2011). Pattern separation: a common function for new neurons in hippocampus and olfactory bulb. *Neuron*, 70(4), 582–588. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.012>
- Sailor, K. A., Schinder, A. F., & Lledo, P.-M. (2017). Adult neurogenesis beyond the niche: its potential for driving brain plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 42, 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.12.001>
- Saliba, A.-E., Westermann, A. J., Gorski, S. A., & Vogel, J. (2014). Single-cell RNA-seq: advances and future challenges. *Nucleic Acids Research*, 42(14), 8845–8860. <https://doi.org/10.1093/nar/gku555>
- Schäffner, I., Minakaki, G., Khan, M. A., Balta, E.-A., Schlötzer-Schrehardt, U., Schwarz, T. J., Beckervordersandforth, R., Winner, B., Webb, A. E., DePinho, R. A., Paik, J., Wurst, W., Klucken, J., & Lie, D. C. (2018). FoxO Function Is Essential for Maintenance of Autophagic Flux and Neuronal Morphogenesis in Adult Neurogenesis. *Neuron*, 99(6), 1188-1203.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.017>
- Schinder, A. F., Trinchero, M. F., & Groisman, A. I. (2020). Synaptogenesis in the adult CNS—Hippocampus. In *Synapse development and maturation*. Academic Press., 235–253.
- Schmidt-Hieber, C., Jonas, P., & Bischofberger, J. (2004). Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature*, 429(6988), 184–187. <https://doi.org/10.1038/nature02553>
- Scobie, K. N., Hall, B. J., Wilke, S. A., Klemenhagen, K. C., Fujii-Kuriyama, Y., Ghosh, A., Hen, R., & Sahay, A. (2009). Krüppel-like factor 9 is necessary for late-phase neuronal maturation in the developing dentate gyrus and during adult hippocampal neurogenesis. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(31), 9875–9887. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2260-09.2009>
- Shin, J., Berg, D. A., Zhu, Y., Shin, J. Y., Song, J., Bonaguidi, M. A., Enikolopov, G., Nauen, D. W., Christian, K. M., Ming, G., & Song, H. (2015). Single-Cell RNA-Seq with Waterfall Reveals

Molecular Cascades underlying Adult Neurogenesis. *Cell Stem Cell*, 17(3), 360–372. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.013>

Snyder, J. S., Ferrante, S. C., & Cameron, H. A. (2012). Late maturation of adult-born neurons in the temporal dentate gyrus. *PLoS One*, 7(11), e48757. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048757>

Sokolov, E. N., & Vinogradova, O. S. (1975). *Neuronal mechanisms of the orienting reflex*. Hillsdale, NJ: L.

Song, J., Sun, J., Moss, J., Wen, Z., Sun, G. J., Hsu, D., Zhong, C., Davoudi, H., Christian, K. M., Toni, N., Ming, G.-L., & Song, H. (2013). Parvalbumin interneurons mediate neuronal circuitry-neurogenesis coupling in the adult hippocampus. *Nature Neuroscience*, 16(12), 1728–1730. <https://doi.org/10.1038/nn.3572>

Sorrells, S. F., Paredes, M. F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K. W., James, D., Mayer, S., Chang, J., Augste, K. I., Chang, E. F., Gutierrez, A. J., Kriegstein, A. R., Mathern, G. W., Oldham, M. C., Huang, E. J., Garcia-Verdugo, J. M., Yang, Z., & Alvarez-Buylla, A. (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*, 555(7696), 377–381. <https://doi.org/10.1038/nature25975>

Spalding, K. L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H. B., Boström, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B. A., Possnert, G., Mash, D. C., Druid, H., & Frisén, J. (2013). Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*, 153(6), 1219–1227. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.002>

Steiner, B., Klempin, F., Wang, L., Kott, M., Kettenmann, H., & Kempermann, G. (2006). Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia*, 54(8), 805–814. <https://doi.org/10.1002/glia.20407>

Straube, T., Korz, V., Balschun, D., & Frey, J. U. (2003). Requirement of beta-adrenergic receptor activation and protein synthesis for LTP-reinforcement by novelty in rat dentate gyrus. *The Journal of Physiology*, 552(Pt 3), 953–960. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049452>

Street, K., Risso, D., Fletcher, R. B., Das, D., Ngai, J., Yosef, N., Purdom, E., & Dudoit, S. (2018). Slingshot: cell lineage and pseudotime inference for single-cell transcriptomics. *BMC Genomics*, 19(1), 477. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4772-0>

Sueda, R., & Kageyama, R. (2021). Oscillatory expression of Ascl1 in oligodendrogenesis. *Gene Expression Patterns : GEP*, 41, 119198. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2021.119198>

Sun, X., Bernstein, M. J., Meng, M., Rao, S., Sørensen, A. T., Yao, L., Zhang, X., Anikeeva, P. O., & Lin, Y. (2020). Functionally Distinct Neuronal Ensembles within the Memory Engram. *Cell*, 181(2), 410-423.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.055>

Suo, S., Zhu, Q., Saadatpour, A., Fei, L., Guo, G., & Yuan, G.-C. (2018). Revealing the Critical Regulators of Cell Identity in the Mouse Cell Atlas. *Cell Reports*, 25(6), 1436-1445.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.045>

Tashiro, A., Makino, H., & Gage, F. H. (2007). Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(12), 3252–3259. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4941-06.2007>

- Tashiro, A., Sandler, V. M., Toni, N., Zhao, C., & Gage, F. H. (2006). NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature*, 442(7105), 929–933. <https://doi.org/10.1038/nature05028>
- Terreros-Roncal, J., Flor-García, M., Moreno-Jiménez, E. P., Rodríguez-Moreno, C. B., Márquez-Valadez, B., Gallardo-Caballero, M., Rábano, A., & Llorens-Martín, M. (2023). Methods to study adult hippocampal neurogenesis in humans and across the phylogeny. *Hippocampus*, 33(4), 271–306. <https://doi.org/10.1002/hipo.23474>
- Tobin, M. K., Musaraca, K., Disouky, A., Shetti, A., Bheri, A., Honer, W. G., Kim, N., Dawe, R. J., Bennett, D. A., Arfanakis, K., & Lazarov, O. (2019). Human Hippocampal Neurogenesis Persists in Aged Adults and Alzheimer's Disease Patients. *Cell Stem Cell*, 24(6), 974–982.e3. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.05.003>
- Toni, N., Laplagne, D. A., Zhao, C., Lombardi, G., Ribak, C. E., Gage, F. H., & Schinder, A. F. (2008). Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nature Neuroscience*, 11(8), 901–907. <https://doi.org/10.1038/nn.2156>
- Toni, N., & Schinder, A. F. (2015). Maturation and Functional Integration of New Granule Cells into the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(1), a018903. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018903>
- Toni, N., Teng, E. M., Bushong, E. A., Aimone, J. B., Zhao, C., Consiglio, A., van Praag, H., Martone, M. E., Ellisman, M. H., & Gage, F. H. (2007). Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nature Neuroscience*, 10(6), 727–734. <https://doi.org/10.1038/nn1908>
- Torres-Ruiz, R., & Rodriguez-Perales, S. (2017). CRISPR-Cas9 technology: applications and human disease modelling. *Briefings in Functional Genomics*, 16(1), 4–12. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elw025>
- Tosoni, G., Ayyildiz, D., Bryois, J., Macnair, W., Fitzsimons, C. P., Lucassen, P. J., & Salta, E. (2023). Mapping human adult hippocampal neurogenesis with single-cell transcriptomics: Reconciling controversy or fueling the debate? *Neuron*, 111(11), 1714–1731.e3. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.03.010>
- Treves, A., Tashiro, A., Witter, M. P., & Moser, E. I. (2008). What is the mammalian dentate gyrus good for? *Neuroscience*, 154(4), 1155–1172. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.04.073>
- Trinchero, M. F., Buttner, K. A., Sulkes Cuevas, J. N., Temprana, S. G., Fontanet, P. A., Monzón-Salinas, M. C., Ledda, F., Paratcha, G., & Schinder, A. F. (2017). High Plasticity of New Granule Cells in the Aging Hippocampus. *Cell Reports*, 21(5), 1129–1139. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.064>
- Valakh, V., Wise, D., Zhu, X. A., Sha, M., Fok, J., Van Hooser, S. D., Schechtman, R., Cepeda, I., Kirk, R., O'Toole, S. M., & Nelson, S. B. (2023). A transcriptional constraint mechanism limits the homeostatic response to activity deprivation in mammalian neocortex. *eLife*, 12. <https://doi.org/10.7554/eLife.74899>
- van Praag, H., Christie, B. R., Sejnowski, T. J., & Gage, F. H. (1999). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(23), 13427–13431. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13427>

- van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C., & Gage, F. H. (2005). Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(38), 8680–8685. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1731-05.2005>
- van Strien, N. M., Cappaert, N. L. M., & Witter, M. P. (2009). The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(4), 272–282. <https://doi.org/10.1038/nrn2614>
- Varoqueaux, F., Jamain, S., & Brose, N. (2004). Neuroligin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses. *European Journal of Cell Biology*, 83(9), 449–456. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00410>
- Wang, W., Wang, M., Yang, M., Zeng, B., Qiu, W., Ma, Q., Jing, X., Zhang, Q., Wang, B., Yin, C., Zhang, J., Ge, Y., Lu, Y., Ji, W., Wu, Q., Ma, C., & Wang, X. (2022). Transcriptome dynamics of hippocampal neurogenesis in macaques across the lifespan and aged humans. *Cell Research*, 32(8), 729–743. <https://doi.org/10.1038/s41422-022-00678-y>
- Wiegreffe, C., Wahl, T., Joos, N. S., Bonnefont, J., Liu, P., & Britsch, S. (2022). Developmental cell death of cortical projection neurons is controlled by a Bcl11a/Bcl6-dependent pathway. *EMBO Reports*, 23(8), e54104. <https://doi.org/10.15252/embr.202154104>
- Williams, M. R., Fricano-Kugler, C. J., Getz, S. A., Skelton, P. D., Lee, J., Rizzuto, C. P., Geller, J. S., Li, M., & Luikart, B. W. (2016). A Retroviral CRISPR-Cas9 System for Cellular Autism-Associated Phenotype Discovery in Developing Neurons. *Scientific Reports*, 6, 25611. <https://doi.org/10.1038/srep25611>
- Yang, S. M., Alvarez, D. D., & Schinder, A. F. (2015). Reliable Genetic Labeling of Adult-Born Dentate Granule Cells Using Ascl1 CreERT2 and Glast CreERT2 Murine Lines. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(46), 15379–15390. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2345-15.2015>
- Yasuda, R., Hayashi, Y., & Hell, J. W. (2022). CaMKII: a central molecular organizer of synaptic plasticity, learning and memory. *Nature Reviews. Neuroscience*, 23(11), 666–682. <https://doi.org/10.1038/s41583-022-00624-2>
- Zeisel, A., Muñoz-Manchado, A. B., Codeluppi, S., Lönnberg, P., La Manno, G., Juréus, A., Marques, S., Munguba, H., He, L., Betsholtz, C., Rolny, C., Castelo-Branco, G., Hjerling-Leffler, J., & Linnarsson, S. (2015). Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science (New York, N.Y.)*, 347(6226), 1138–1142. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1934>
- Zhang, B., Chen, L. Y., Liu, X., Maxeiner, S., Lee, S.-J., Gokce, O., & Südhof, T. C. (2015). Neuroligins Sculpt Cerebellar Purkinje-Cell Circuits by Differential Control of Distinct Classes of Synapses. *Neuron*, 87(4), 781–796. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.07.020>
- Zhao, C., Teng, E. M., Summers, R. G., Ming, G.-L., & Gage, F. H. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(1), 3–11. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3648-05.2006>
- Zhou, Y., Su, Y., Li, S., Kennedy, B. C., Zhang, D. Y., Bond, A. M., Sun, Y., Jacob, F., Lu, L., Hu, P., Viaene, A. N., Helbig, I., Kessler, S. K., Lucas, T., Salinas, R. D., Gu, X., Chen, H. I., Wu, H.,

Kleinman, J. E., ... Song, H. (2022). Molecular landscapes of human hippocampal immature neurons across lifespan. *Nature*, 607(7919), 527–533. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04912-w>