

Abstract

Microglia, the resident immune cells of the central nervous system (CNS), are critical for maintaining neuronal homeostasis, supporting synaptic plasticity, and mounting immune responses to injury and disease. Unlike most CNS-resident cell populations, microglia possess a unique regenerative capacity: following depletion, they are able to repopulate the brain and restore density within days. Microglia viability is regulated by colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) signaling. However, whether these repopulated microglia fully reacquire the functional heterogeneity and homeostatic states of their counterparts, and how this process is influenced by aging, remains poorly understood.

In this study, we combined pharmacological depletion using the CSF1R inhibitor BLZ-945 with single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) of CD11b⁺ cells to examine the molecular programs underlying microglial repopulation in both young and aged mice. Complete depletion was achieved after 21 days of BLZ-945 treatment, and repopulation occurred within 7 days following withdrawal of the inhibitor. The analyses of the acquired dataset revealed that repopulated microglia reestablish many of the transcriptional states observed in control animals, but only after passing through distinct, transiently activated phenotypes (Act-MG1, Act-MG2, Act-MG3). These activation states were marked by expression of genes involved in proliferation (*Mki67*, *Top2a*), motility and cytoskeletal remodeling (*Rac1*, *P2ry12*), extracellular matrix (ECM) degradation (*Cstb*, *Ctsd*), and inflammatory cytokine signaling (*Il1b*, *Tnf*, *Il6*).

Trajectory analyses demonstrated that repopulated microglia originate from proliferating precursors and move through activated states before reaching a homeostatic phenotype.

Age emerged as a major determinant of repopulation efficiency and outcome. While young mice successfully generated homeostatic microglia following transient activation, aged mice displayed impaired maturation of repopulated cells. Repopulated microglia from older animals exhibited heightened proliferation, persistent inflammatory signaling, and reduced representation of homeostatic clusters. Bulk RNA sequencing (RNA-seq) further confirmed downregulation of core homeostatic genes (*P2ry12*, *Tmem119*, *Trem2*) and upregulation of pro-apoptotic and senescence-associated genes in repopulated microglia from aged mice. Pathway-level analysis

implicated dysregulation of RhoA-ROCK signaling, which regulates microglial motility, cytoskeletal dynamics, and inflammatory responses, as a central feature of the aging-associated deficits.

Comparative analysis revealed striking similarities between the transient Act-MG states of repopulated microglia and the transcriptional programs of glioma-associated microglia. Integration of the presented scRNA-seq dataset with CITE-seq data from murine glioma models identified overlapping clusters enriched for migratory, phagocytic, and inflammatory signatures. These results suggest that microglia repopulation recapitulates transcriptional programs exploited in pathological contexts, highlighting conserved mechanisms of microglial plasticity.

These findings have several implications. First, they demonstrate that repopulation is not a simple return to baseline but a dynamic, multi-stage process requiring activation, migration, and eventual resolution to homeostasis. Second, they reveal that aging disrupts this trajectory, leaving microglia in maladaptive states that may compromise neuronal support and increase vulnerability to neurodegeneration. Third, the shared transcriptional features between repopulated and glioma-associated microglia suggest that cellular programs enabling regeneration may also predispose microglia to pathological reprogramming in disease.

In conclusion, our study establishes a comprehensive transcriptional framework for microglial repopulation in young and aged brains. By identifying conserved activation programs that bridge regeneration and pathological activation, we highlight new opportunities for therapeutic strategies aimed at harnessing microglial plasticity while mitigating age-related dysfunction. This work underscores the dual nature of microglial repopulation, as both a regenerative mechanism and a potential point of vulnerability in the aging brain.

Streszczenie

Mikroglej, komórki odpornościowe w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy, wspierają plastyczność synaptyczną oraz uczestniczą w odpowiedzi układu odpornościowego na urazy i choroby. W odróżnieniu od większości populacji komórek OUN, mikroglej ma unikalną zdolność do odnowy: po farmakologicznej eliminacji dochodzi do odnowy populacji w OUN i odtworzenia prawidłowej gęstości komórek w ciągu kilku dni. Nadal jednak nie wiadomo, czy nowe, zasiedlające OUN komórki mikrogleju w pełni odtwarzają heterogenność funkcjonalną i stan prawidłowego mikrogleju oraz w jaki sposób proces ten ulega modyfikacji w trakcie starzenia OUN.

W niniejszej pracy połączono farmakologiczne usunięcie mikrogleju przy użyciu inhibitora CSF1R (BLZ-945) z sekwencjonowaniem RNA pojedynczych komórek (scRNA-seq) w populacji komórek mieloidalnych sortowanych jako komórki CD11b⁺ w celu zbadania programów molekularnych leżących u podstaw odnowy mikrogleju u młodych i starych myszy. Całkowitą eliminację mikrogleju osiągnięto po 21 dniach podawania BLZ-945, a odnowa nastąpiła w ciągu 7 dni od odstawienia inhibitora. Uzyskane dane pokazały, że nowy mikroglej (MG) odtwarza wiele stanów transkrypcyjnych obserwowanych u zwierząt kontrolnych, ale przechodzi wcześniej przez przejściowe stany aktywacji (Act-MG1, Act-MG2, Act-MG3). Stany te charakteryzowały się ekspresją genów związanych z proliferacją (*Mki67*, *Top2a*), migracją i przebudową cytoszkieletu (*Rac1*, *P2ry12*), degradacją macierzy pozakomórkowej (*Cstb*, *Ctsd*) oraz sygnalizacją cytokin zapalnych (*Il1b*, *Tnf*, *Il6*).

Analizy trajektorii rozwojowych pokazały, że odtworzony mikroglej wywodzi się z nielicznych prekursorów, które proliferują i przechodzą przez stany aktywacji, zanim osiągną fenotyp homeostatyczny. Starzenie jest kluczowym czynnikiem determinującym efektywność i wynik odnowy MG. Podczas gdy w mózgu młodych myszy MG osiągał stan homeostatyczny po fazie przejściowej aktywacji, u starych osobników obserwowano upośledzone dojrzewanie MG. Komórki te cechowały się zwiększoną proliferacją, utrzymującą się sygnalizacją zapalną i zmniejszoną reprezentacją komórek w stanie homeostatycznym. Sekwencjonowanie RNA (bulk RNA-seq) mikrogleju dodatkowo potwierdziło obniżoną ekspresję genów homeostatycznych

(*P2ry12*, *Tmem119*, *Trem2*) oraz zwiększoną ekspresję genów proapoptotycznych i związanych ze starzeniem. Analizy szlaków powiązanych z ekspresją genów wskazały na deregulację sygnalizacji RhoA-ROCK – kluczowej dla migracji, dynamiki cytoszkieletu i odpowiedzi zapalnej mikrogleju związanych ze starzeniem.

Analiza porównawcza ujawniła uderzające podobieństwa między przejściowymi stanami Act-MG a programami transkrypcyjnymi mikrogleju związanego z glejakiem. Integracja przedstawionego w rozprawie zbioru danych scRNA-seq z danymi CITE-seq z modeli mysich glejaków wykazała obecność mikrogleju z ekspresją podobnych genów wzbogaconych w sygnatury migracyjne, fagocytarne i zapalne. Wyniki te sugerują, że programy transkrypcyjne w procesie odnowy mikrogleju są wykorzystywane w kontekstach patologicznych, co podkreśla konserwatywne mechanizmy plastyczności mikrogleju.

Podsumowując, wyniki przedstawionych badań dostarczyły kompleksowych profili transkrypcji występujących w czasie odnowy mikrogleju w młodym i starym mózgu. Pokazano, że choć mikroglej u młodych myszy odtwarza pełną różnorodność i funkcjonalność, starzenie głęboko zakłóca ten proces, uniemożliwiając przywrócenie pełnej homeostazy. Identyfikacja konserwatywnych programów aktywacji, które łączą odnowę mikrogleju z patologiczną aktywacją, otwiera nowe perspektywy terapeutyczne, ukierunkowane na wykorzystanie plastyczności mikrogleju przy jednoczesnym ograniczaniu dysfunkcji związanych z wiekiem. Nasze wyniki podkreślają dwoistą naturę odnowy mikrogleju – jako mechanizmu regeneracyjnego, ale również potencjalnego punktu podatności w starzejącym się mózgu.