

## **Streszczenie rozprawy doktorskiej „Analiza działania modulatorów receptorów dla sfingozyno-1-fosforanu w eksperymentalnych modelach choroby Alzheimera”**

Choroba Alzheimera (ChA) jest neurodegeneracyjnym schorzeniem, które odpowiada za większość przypadków otępienia. Według powszechnie przyjętej hipotezy kaskady amyloidowej u podstaw ChA leżą zaburzenia metabolizmu białka prekursorowego peptydu amyloidu  $\beta$  (APP), które prowadzą do powstania amyloidu  $\beta$  ( $A\beta$ ).  $A\beta$  występuje w postaci rozpuszczalnych monomerów i oligomerów oraz nierozpuszczalnych fibryli i płytek starczych, z których za najbardziej patogenne uważane są oligomery. Szkodliwe działanie  $A\beta$  związane jest z zaburzeniem funkcjonowania synaps, w tym z nieprawidłowościami dotyczącymi przekazywania synaptycznego. Obserwuje się również zaburzenia biogenezy i dynamiki mitochondriów oraz dysfunkcje czynnościowe tych organelli, które finalnie prowadzą do zaburzeń energetycznych w komórce i zwiększonej apoptozy neuronów. Gromadzący się  $A\beta$  powoduje aktywację mikrogleju i wzrost wytwarzania mediatorów stanu zapalnego, które zaostrzają zmiany neurodegeneracyjne. Dodatkowo,  $A\beta$  poprzez hamowanie prożyciowej ścieżki PI3K-AKT/stymulowanie aktywności GSK-3 $\beta$  przyczynia się do nadmiernej fosforylacji białka Tau i, co za tym idzie jego zwiększonej skłonności do agregacji w postaci wewnątrzkomórkowych splątków neurofibrylarnych (NFT), które obok płytek starczych są główną cechą obrazu neuropatologicznego ChA.

Jednocześnie w ostatnich latach istotnym tematem stała się rola bioaktywnych sfingolipidów w patogenezie/patomechanizmie ChA. Jednym z nich jest prożyciowy sfingozyno-1-fosforan (S1P), którego obniżony poziom i zaburzony metabolizm stwierdzono w mózgach osób z ChA. S1P wywiera swoje działanie dwutorowo. Wewnątrzkomórkowo działa jako przekaźnik drugiego rzędu, natomiast zewnątrzkomórkowo poprzez pięć receptorów (S1PR1-5) sprzężonych z białkami G. Niektóre agonisty (modulatory) S1PR, ze względu na ich właściwości immunosupresyjne, stały się lekami zatwierdzonymi do leczenia stwardnienia rozsianego. Jednak zdolność tych związków do przekraczania bariery krew-mózg i bezpośrednie działanie neuroprotektcyjne w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) umożliwiła ich zastosowanie w badaniach dotyczących innych chorób neurodegeneracyjnych, w tym w ChA.

Celem rozprawy było zbadanie wpływu modulatorów receptorów dla sfingozyno-1-fosforanu na zmiany na poziomie transkrypcyjnym i translacyjnym wybranych białek zaangażowanych w: przekazywanie synaptyczne, apoptozę, proces zapalny oraz ścieżkę prożyciową zależną od kinazy AKT w doświadczalnych modelach choroby Alzheimera.

Badania *in vivo* prowadzono na modelu rodzinnej postaci ChA – 3 i 12-miesięcznych transgenicznym myszach szczepu FVB-Tg transfekowanych ludzkim zmutowanym genem dla APP (myszy APP<sup>+</sup>). Mutacja londyńska w genie dla APP powoduje zwiększone wytwarzanie bardziej toksycznej i podatnej na agregację izoformy A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Grupę kontrolną stanowiły myszy bez odziedziczonego transgeny (myszy APP<sup>-</sup>). Przez 14 dni zwierzętom podawano dootrzewnowo fingolimod (modulator S1PR1,3-5) w dawce 1 mg/kg m.c. lub jego nośnik (0,9% NaCl). Następnie zwierzęta dekapitowano, a wybrane struktury mózgu (kora mózgu i hipokamp) wykorzystywano do analizy zmian ekspresji genów oraz immunoreaktywności/poziomu ufosforylowania białek. W doświadczeniach na zwierzętach skupiono się na białkach presynaptycznych zaangażowanych w fuzję pęcherzyków synaptycznych z błoną presynaptyczną i uwalnianie neuroprzekaźnika do szczeliny synaptycznej (białka kompleksu SNARE i białka regulatorowe tego kompleksu), ścieżce prożyciowej zależnej od kinazy AKT i fosforylacji białka Tau.

Analiza ekspresji genów kodujących białka tworzące kompleks SNARE wykazała istotne obniżenie ekspresji *Vamp1* w korze mózgu w obu grupach wiekowych oraz w hipokampie 3-miesięcznych myszy APP<sup>+</sup> (vs. APP<sup>-</sup>). Obniżenie poziomu mRNA *Stx1* i *Snap25* odnotowano jedynie w hipokampie 12-miesięcznych myszy APP<sup>+</sup>. Nie stwierdzono natomiast istotnych zmian w poziomie immunoreaktywności białek kompleksu SNARE. W przypadku białek regulatorowych kompleksu SNARE zaobserwowano znacząco obniżoną ekspresję *Syt1*, *Cplx1* i *Nrxn1* w hipokampie 12-miesięcznych myszy APP<sup>+</sup> (vs. APP<sup>-</sup>). Znacząco niższy poziom mRNA *Nrxn1* stwierdzono również w korze 12-miesięcznych myszy APP<sup>+</sup>, a niższą ekspresję *Syt1* w hipokampie 3-miesięcznych zwierząt transgenicznym. Zmiany w immunoreaktywności (znamienny wzrost poziomu SYP i SYT) zaobserwowano jedynie w korze mózgu 3-miesięcznych myszy APP<sup>+</sup>. Podanie fingolimodu 12-miesięcznym zwierzętom APP<sup>+</sup> znamiennie zwiększało obniżoną ekspresję *Stx1a*, *Snap25*, *Cplx1* i *Nrxn1* w hipokampie oraz *Vamp1* w korze mózgu. Nie stwierdzono natomiast istotnego wpływu fingolimodu na pozostałe zmiany.

W następnym etapie zbadano wpływ mutacji w genie dla APP na ekspresję genów i poziom ufosforylowania prożyciowej kinazy AKT oraz jej dwóch białek efektorowych – kinazy GSK-3 $\beta$  i proapoptotycznego białka BAD. Nie zaobserwowano zmian w poziomie mRNA *Akt1*, *Gsk3b* ani *Bad*. Istotnie statystycznie zmiany w stosunku formy ufosforylowanej do całkowitej AKT odnotowano w hipokampie – obniżenie u 3-miesięcznych i wzrost u 12-miesięcznych zwierząt transgenicznym. W hipokampie starszych zwierząt APP<sup>+</sup> stwierdzono również wzrost ufosforylowania GSK-3 $\beta$ . Podanie fingolimodu transgenicznym zwierzętom

nie miało istotnego wpływu na zaobserwowane zmiany w poziomie ufosforylowania AKT ani GSK-3 $\beta$ .

Nie zaobserwowano zmian w poziomie mRNA *Mapt* (gen kodujący białko Tau) ani immunoreaktywności całkowitego białka Tau. Mutacja londyńska w genie dla APP nie wpływała również na ufosforylowanie białka Tau przez GSK-3 $\beta$  na serynie 396 ani serynie 199/202 – kluczowych dla patomechanizmu ChA miejscach. W hipokampie 12-miesięcznych myszy APP<sup>+</sup> stwierdzono natomiast istotnie zwiększoną fosforylację na serynie 416, która jest zależna od CAMKII. Podanie fingolimodu nie miało istotnego wpływu na zaobserwowaną zmianę.

Wyniki uzyskane w badaniach *in vivo* wskazują, że mutacja londyńska w genie dla APP powoduje przede wszystkim zmiany w hipokampie, których nasilenie zależy od wieku zwierząt/zaawansowania choroby. Mutacja w genie dla APP wpływa na ekspresję białek presynaptycznych głównie na poziomie transkrypcyjnym, natomiast wpływ tej mutacji na prożyciową ścieżkę zależną od AKT ma miejsce wyłącznie na poziomie modyfikacji potranslacyjnych. Skuteczność fingolimodu ograniczona jedynie do zmian w ekspresji genów dla białek presynaptycznych w grupie 12-miesięcznych myszy sugeruje, że w zastosowanym modelu badawczym zaburzenia sygnalizacji zależnej od S1P mają znaczenie przede wszystkim w regulacji przekazywania synaptycznego w bardziej zaawansowanych fazach choroby.

Badania *in vitro* przeprowadzono na mysich liniach komórkowych neuronów hipokampa (HT22) i mikrogleju (BV2) traktowanych przez 24 godziny oligomerami A $\beta$ <sub>1-42</sub> (A $\beta$ ) w stężeniu końcowym 1  $\mu$ M. W powyższych modelach sprawdzano wpływ modulatorów receptorów dla S1P: 0,1  $\mu$ M ponesimodu (S1PR1), 1  $\mu$ M CYM5541 (S1PR3), 0,1  $\mu$ M CYM50308 (S1PR4), 0,1  $\mu$ M A971432 (S1PR5), 0,1  $\mu$ M siponimodu (S1PR1,5) oraz 1 nM ufosforylowanego fingolimodu na: żywotność komórek, potencjał błony mitochondrialnej oraz poziom wolnych rodników, a także na ekspresję genów kodujących receptory dla S1P, białka pro- i antyapoptotyczne oraz cytokiny prozapalne.

Analiza ekspresji genów kodujących S1PR wykazała znamienne obniżony poziom mRNA *S1pr1* w komórkach BV2 po podaniu A $\beta$ , który został istotnie zwiększony po podaniu A971432. W komórkach mikrogleju traktowanych A $\beta$  zaobserwowano także wyraźną tendencję do obniżenia poziomu mRNA *S1pr5*. Nie odnotowano wpływu A $\beta$  podanego samodzielnie na ekspresję *S1pr4* w żadnej z badanych linii komórkowych. Natomiast istotne obniżenie poziomu mRNA *S1pr4* stwierdzono w komórkach HT22 traktowanych A $\beta$  wraz z CYM5541, a znamienny wzrost w komórkach BV2 traktowanych A $\beta$  z pFTY720 i siponimodem.

A $\beta$  znamienne obniżały potencjał błony mitochondrialnej oraz żywotność komórek, przy czym obniżenie żywotności było bardziej zaznaczone w komórkach BV2. Badane modulatory w zastosowanych stężeniach nie miały wpływu na zaobserwowane zmiany. Nie stwierdzono istotnego wpływu A $\beta$  na wewnątrzkomórkowy poziom wolnych rodników w żadnej z badanych linii komórkowych.

W komórkach BV2 A $\beta$  wywołały znamienne obniżenie ekspresji *Bad*, któremu nie przeciwdziałał żaden z zastosowanych modulatorów. Nie stwierdzono istotnych zmian w poziomie mRNA *Bax* po podaniu A $\beta$  w żadnej z badanych linii komórkowych. Natomiast podanie A $\beta$  wraz z ponesimodem, CYM5541 i CYM50308 powodowało istotny wzrost ekspresji *Bax* w komórkach BV2 w porównaniu do komórek traktowanych wyłącznie A $\beta$ . W obu liniach komórkowych po podaniu A $\beta$  stwierdzono znamienne obniżoną ekspresję *Bcl2*, wyraźniej zaznaczoną w komórkach mikrogleju. W komórkach HT22 zastosowanie CYM50308 i A971432 w toksyczności A $\beta$  przywracało ekspresję *Bcl2* do wartości kontrolnych (ekspresji w komórkach nietraktowanych A $\beta$ ). Nie stwierdzono natomiast istotnych zmian w ekspresji *Bcl2l1* po podaniu A $\beta$  w żadnej z badanych linii komórkowych.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono ponad siedmiokrotny wzrost poziomu mRNA *Il1b* w komórkach BV2 traktowanych A $\beta$ , a badane modulatory (za wyjątkiem CYM5541 i pFTY720) pogłębiały prozapalny efekt A $\beta$ . W komórkach BV2 stwierdzono również znamienne wzrost ekspresji *Tnf* pod wpływem A $\beta$ . Zastosowane modulatory (poza A971432, który nieznacznie obniżał ekspresję) wykazywały tendencję do zwiększania poziomu mRNA *Tnf* w mikrogleju. W neuronach hipokampa, mimo braku znaczącego efektu A $\beta$ , znamienne wzrost poziomu mRNA *Il1b* wywołało podanie A $\beta$  wraz z siponimodem, a istotny wzrost ekspresji *Tnf* stwierdzono w komórkach traktowanych A $\beta$  wraz z ponesimodem. W obu badanych liniach komórkowych stwierdzono istotny wzrost poziomu mRNA *Il6*, przy czym był on dużo większy w komórkach BV2. Większość badanych związków (oprócz pFTY720) powodowała wyraźny, choć nieznaczny wzrost ekspresji *Il6* w mikrogleju (w porównaniu z komórkami traktowanymi A $\beta$ ). Z kolei w komórkach HT22 podanie pFTY720 znamienne obniżało poziom mRNA *Il6*. W przedstawionej rozprawie po raz pierwszy wykazano istotnie obniżony poziom mRNA *Il18* w liniach komórkowych HT22 i BV2 poddanych działaniu A $\beta$ , na który nie miały istotnego wpływu badane modulatory S1PR. Zaobserwowane obniżenie było wyraźniej zaznaczone w komórkach mikrogleju.

Wyniki uzyskane w badaniach *in vitro* wskazują na niewielki potencjał apoptotyczny A $\beta$  w badanych liniach komórkowych. Wyraźne działanie prozapalne A $\beta$  jest silniej zaznaczone w mikrogleju. Modulacja receptorów dla S1P w komórkach HT22 ma działanie

antyapoptotyczne, a także w niewielkim stopniu może łagodzić stan zapalny. Natomiast te same związki w komórkach BV2 mają tendencję do pogłębiania wywołanych przez A $\beta$  zmian zapalnych oraz proapoptotycznych. Zaobserwowane zmiany wskazują, że zarówno toksyczność A $\beta$ , jak i efekt pobudzenia S1PR zależy od linii komórkowej.

Podsumowując, w badaniach *in vivo* zaobserwowano negatywny wpływ mutacji londyńskiej w genie dla APP na ekspresję genów dla białek presynaptycznych oraz na prożyciową ścieżkę sygnałową zależną od kinazy AKT. Zastosowanie fingolimodu przeciwdziałało wywołanym przez mutację londyńską zmianom w ekspresji genów kodujących białka presynaptyczne u 12-miesięcznych zwierząt APP<sup>+</sup>, co wskazuje na istotne znaczenie sygnalizacji zależnej od S1P w regulacji przekazywania synaptycznego w bardziej zaawansowanych stadiach choroby. Dodatkowo badania *in vitro* wykazały niekorzystne działanie A $\beta$  na ekspresję genów dla białek pro- i antyapoptotycznych, cytokin prozapalnych i funkcjonowanie mitochondriów. Jednocześnie wyniki doświadczeń *in vitro* wskazują, że efekt modulacji receptorów dla S1P w toksyczności A $\beta$  może różnić się w zależności od linii komórkowej, co należy uwzględnić w dalszych badaniach dotyczących zastosowania tych związków w chorobie Alzheimera.

## **Summary of the doctoral dissertation “Analysis of the effect of sphingosine-1-phosphate receptor modulators in experimental models of Alzheimer's disease”**

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease that accounts for the majority of dementia cases. According to the widely accepted amyloid cascade hypothesis, AD is caused by disturbances in the metabolism of the amyloid- $\beta$  precursor protein (APP), which leads to the formation of amyloid  $\beta$  peptide ( $A\beta$ ).  $A\beta$  occurs in the form of soluble monomers and oligomers as well as insoluble fibrils and senile plaques, of which oligomers are considered the most pathogenic. The harmful effects of  $A\beta$  are related to the dysfunction of synapses, including abnormalities in synaptic transmission. Disturbances in the biogenesis and dynamics of mitochondria together with functional dysfunctions of these organelles, which finally lead to cell energy disturbances and increased neuronal apoptosis, are also observed. Accumulating  $A\beta$  causes the activation of microglia and an increase in the production of inflammatory mediators that exacerbate neurodegenerative changes. In addition,  $A\beta$ , by inhibiting the prosurvival PI3K-AKT pathway/stimulating the activity of GSK-3 $\beta$ , contributes to the excessive phosphorylation of Tau protein and, consequently, its increased tendency to aggregate in the form of intracellular neurofibrillary tangles (NFT), which, together with senile plaques, are the main neuropathological hallmarks of AD.

At the same time, the role of bioactive sphingolipids in the pathogenesis/pathomechanism of AD has recently become an important topic. One of them is the prosurvival sphingosine-1-phosphate (S1P), whose reduced level and disturbed metabolism have been found in the brains of AD patients. S1P exerts its action in a dual manner. Intracellularly, it acts as a second messenger, while extracellularly via five G protein-coupled receptors (S1PR1-5). Some S1PR agonists (modulators) have been approved for the treatment of multiple sclerosis due to their immunosuppressive properties. However, the ability of these compounds to cross the blood-brain barrier and direct neuroprotective effects in the central nervous system (CNS) allowed their use in studies concerning other neurodegenerative diseases, including AD.

The dissertation aimed to investigate the effect of sphingosine-1-phosphate receptor modulators on changes at the transcriptional and translational levels in selected proteins involved in: synaptic transmission, apoptosis, inflammation and AKT kinase-dependent prosurvival pathway in experimental models of Alzheimer's disease.

*In vivo* studies were carried out on 3- and 12-month-old FVB-Tg transgenic mice transfected with the human mutant gene for APP (APP<sup>+</sup> mice) – a model of familial AD. The

London mutation in the gene encoding APP causes increased production of the more toxic and aggregation-prone A $\beta$ <sub>1-42</sub> isoform. Mice without the inherited transgene (APP<sup>-</sup> mice) were used as a control. For 14 days, the animals were administered intraperitoneally fingolimod (S1PR1,3-5 modulator) at a dose of 1 mg/kg b.w. or its vehicle (0.9% NaCl). Then the animals were decapitated, and selected brain structures (brain cortex and hippocampus) were used to analyse changes in gene expression and immunoreactivity/level of protein phosphorylation. Animal experiments focused on presynaptic proteins involved in the fusion of synaptic vesicles with the presynaptic membrane and release of the neurotransmitter into the synaptic cleft (SNARE complex proteins and regulatory proteins of this complex), AKT kinase-dependent prosurvival pathway and Tau protein phosphorylation.

Analysis of the expression of genes encoding SNARE complex proteins showed a significant reduction in *Vamp1* expression in the brain cortex in both age groups and in the hippocampus of 3-month-old APP<sup>+</sup> mice (vs. APP<sup>-</sup>). Downregulation of *Stx1* and *Snap25* mRNA level was only seen in the hippocampus of 12-month-old APP<sup>+</sup> mice. No significant changes were found in the level of immunoreactivity of the SNARE complex proteins. In case of the regulatory proteins of the SNARE complex, significantly reduced expression of *Syt1*, *Cplx1* and *Nrxn1* was observed in the hippocampus of 12-month-old APP<sup>+</sup> mice (vs. APP<sup>-</sup>). Markedly lower mRNA level of *Nrxn1* was also found in the cortex of 12-month-old APP<sup>+</sup> mice, and lower expression of *Syt1* in the hippocampus of 3-month-old transgenic animals. Changes in immunoreactivity (substantial increase in SYP and SYT levels) were observed only in the brain cortex of 3-month-old APP<sup>+</sup> mice. Administration of fingolimod to 12-month-old APP<sup>+</sup> animals markedly increased the downregulated expression of *Stx1a*, *Snap25*, *Cplx1* and *Nrxn1* in the hippocampus and *Vamp1* in the brain cortex. There was no significant effect of fingolimod on other changes.

In the next step, the influence of mutation in the APP gene on gene expression and the level of phosphorylation of the prosurvival AKT kinase and its downstream proteins – GSK-3 $\beta$  kinase and the proapoptotic BAD protein was examined. No changes in *Akt1*, *Gsk3b* or *Bad* mRNA level were observed. Statistically significant changes in the ratio of the phosphorylated AKT to total AKT were noted in the hippocampus – a decrease in 3-month-old and an increase in 12-month-old transgenic animals. An increase in GSK-3 $\beta$  phosphorylation was also found in the hippocampus of older APP<sup>+</sup> animals. Administration of fingolimod to transgenic animals had no significant effect on the observed changes in AKT or GSK-3 $\beta$  phosphorylation level.

No changes were observed in the mRNA level of *Mapt* (the gene encoding Tau protein) or the immunoreactivity of the total Tau protein. The London mutation in the gene for APP also

did not affect the phosphorylation of the Tau protein by GSK-3 $\beta$  at serine 396 or serine 199/202, key sites for the pathomechanism of AD. In contrast, in the hippocampus of 12-month-old APP<sup>+</sup> mice, substantial increase in phosphorylation at serine 416 was observed, which is dependent on CAMKII. Administration of fingolimod had no significant effect on the observed change.

Results from *in vivo* studies indicate that the London mutation in the APP gene primarily causes changes in the hippocampus, the severity of which depends on the age of the animals/the stage of the disease. Mutation in the gene for APP affects the expression of presynaptic proteins mainly at the transcriptional level, while the effect of this mutation on the prosurvival AKT-dependent pathway occurs only at the level of posttranslational modifications. The effectiveness of fingolimod, limited only to changes in the expression of genes for presynaptic proteins in a group of 12-month-old mice, suggests that in the model of AD used, disturbances in S1P-dependent signaling are primarily important in the regulation of synaptic transmission in more advanced phases of the disease.

*In vitro* studies were performed on murine hippocampal neuronal (HT22) and microglial (BV2) cell lines treated for 24 hours with A $\beta$ <sub>1-42</sub> oligomers (A $\beta$ ) at a final concentration of 1  $\mu$ M. In the aforementioned models, the influence of following S1P receptor modulators: 0.1  $\mu$ M ponesimod (S1PR1), 1  $\mu$ M CYM5541 (S1PR3), 0.1  $\mu$ M CYM50308 (S1PR4), 0.1  $\mu$ M A971432 (S1PR5), 0.1  $\mu$ M siponimod (S1PR1,5), and 1 nM phosphorylated fingolimod on the cell viability, mitochondrial membrane potential and level of free radicals, as well as on the expression of genes encoding S1P receptors, pro- and antiapoptotic proteins and proinflammatory cytokines was tested.

Analysis of the expression of genes for S1PRs showed a significantly reduced mRNA level of *S1pr1* in BV2 cells after administration of A $\beta$ , which was markedly increased after administration of A971432. In A $\beta$ -treated microglial cells, there was also a clear tendency to downregulate *S1pr5* mRNA level. There was no effect of A $\beta$  administered alone on *S1pr4* expression in any of the cell lines tested. In turn, a significant decrease in the mRNA level of *S1pr4* was found in HT22 cells treated with a combination A $\beta$  and CYM5541, and a significant increase in BV2 cells treated with A $\beta$  together with pFTY720 and siponimod.

A $\beta$  significantly decreased the mitochondrial membrane potential and cell viability, with the reduction in viability being more pronounced in BV2 cells. The tested modulators in the concentrations used had no effect on the observed changes. No significant effect of A $\beta$  on the intracellular level of free radicals was observed in any of the studied cell lines.

In BV2 cells, A $\beta$  induced a significant decrease in *Bad* expression, which was not counteracted by any of the modulators used. There were no significant changes in *Bax* mRNA



level after A $\beta$  administration in any of the tested cell lines. In turn, the administration of A $\beta$  together with ponesimod, CYM5541 and CYM50308 caused a significant increase in *Bax* expression in BV2 cells compared to cells treated with A $\beta$  alone. Significantly reduced expression of *Bcl2* after A $\beta$  treatment was found in both cell lines, more clearly marked in microglial cells. In HT22 cells, the use of CYM50308 and A971432 in A $\beta$  toxicity restored *Bcl2* mRNA level to control values (those of A $\beta$ -untreated cells). In contrast, there were no significant changes in *Bcl2l1* expression after A $\beta$  administration in any of the studied cell lines.

An over sevenfold increase in mRNA level of *Il1b* in BV2 cells treated with A $\beta$  was found, and the tested modulators (except for CYM5541 and pFTY720) enhanced the proinflammatory effect of A $\beta$ . In BV2 cells, it was also found a significant increase in *Tnf* expression under the influence of A $\beta$ . The modulators used tended to increase mRNA level of *Tnf* in microglia (except for A971432, which slightly decreased *Tnf* expression). In hippocampal neurons, despite the lack of a significant effect of A $\beta$  alone, a marked increase in the mRNA level of *Il1b* was induced by the administration of A $\beta$  together with siponimod, and a significant increase in *Tnf* expression was found in cells treated with A $\beta$  together with ponesimod. A substantial increase in the mRNA level of *Il6* was found in both tested cell lines, and it was more pronounced in BV2 cells. Most of the tested compounds (except pFTY720) caused a clear, though insignificant, increase in *Il6* expression in microglia. On the other hand, in HT22 cells, the administration of pFTY720 significantly reduced the mRNA level of *Il6*. A significantly reduced mRNA level of *Il18* in the HT22 and BV2 cell lines treated with A $\beta$  was shown for the first time, which was not affected by the studied S1PR modulators. The observed reduction was more pronounced in microglial cells.

The results obtained in *in vitro* studies indicate a low apoptotic potential of A $\beta$  in the tested cell lines. The clear proinflammatory effect of A $\beta$  is more pronounced in microglia. Modulation of S1P receptors in HT22 cells has an antiapoptotic effect and may mitigate inflammation to a small extent. In contrast, the same compounds in BV2 cells tend to exacerbate A $\beta$ -induced inflammatory and proapoptotic changes. The observed alterations indicate that both the toxicity of A $\beta$  and the effect of S1PR stimulation depend on the cell line.

In summary, in *in vivo* studies, a negative effect of the London mutation in the APP gene on the expression of genes for presynaptic proteins and on the AKT kinase-dependent prosurvival signaling pathway was observed. The administration of fingolimod counteracted the London mutation-induced changes in the expression of genes encoding presynaptic proteins in 12-month-old APP<sup>+</sup> animals, indicating the importance of S1P-dependent signaling in the

regulation of synaptic transmission in more advanced stages of the disease. In addition, *in vitro* studies have shown the negative effect of A $\beta$  on the expression of genes for pro- and antiapoptotic proteins, proinflammatory cytokines, and on the mitochondrial functions. At the same time, the results of *in vitro* experiments point out that the effect of S1P receptor modulation in A $\beta$  toxicity may vary depending on the cell line, which should be taken into account in further studies on the use of these compounds in Alzheimer's disease.