

Stacjonarne Studia Doktoranckie
Biochemiczno-Biofizyczne

Marta Biesiekierska

**Analiza możliwości wykorzystania
ciał ketonowych i transferazy
bursztynilo-CoA:3-ketokwas-CoA
jako potencjalnych narzędzi w terapii
raka szyjki macicy w warunkach *in vitro***

Analysis of the possibility of using ketone bodies and
transferase succinyl-CoA:3-ketoacid-CoA as potential
tools in the treatment of cervical cancer *in vitro*

Praca doktorska
wykonana w Katedrze Biologii
Nowotworów i Epigenetyki
Instytutu Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego

pod kierunkiem
dr hab. Anety Balcerczyk, prof. UŁ

*Pragnę złożyć najserdeczniejsze podziękowania
Pani dr hab. Anecie Balcerczyk, prof. UŁ,
za poświęcony czas, zaangażowanie i pomoc
otrzymaną przy realizacji niniejszej pracy doktorskiej*

Spis treści

FINANSOWANIE BADAŃ	5
WYKAZ SKRÓTÓW	6
1. WSTĘP.....	8
1.1. Makroskładniki i produkcja energii	9
1.1.1. Węglowodany	9
1.1.2. Lipidy.....	9
1.1.3. Białka.....	11
1.1.4. Makroskładniki preferowane przez organizm do produkcji energii – węglowodany czy lipidy?	12
1.2. Biochemia i fizjologia komórki nowotworowej.....	13
1.3. Stan wiedzy w zakresie rozwoju raka szyjki macicy	16
1.3.1. Etiologia raka szyjki macicy.....	16
1.3.2. Konsekwencje modulacji mikroflory pochwy	18
1.3.3. Wpływ przeprogramowania metabolicznego na rozwój raka szyjki macicy.....	19
1.4. Dieta ketogeniczna jako środek terapeutyczny	20
1.4.1. Geneza i ograniczenia stosowania diety ketogenicznej w celach leczniczych	21
1.4.2. Wpływ diety ketogenicznej na mikrobiom.....	21
1.4.3. Potencjał diety ketogenicznej jako terapii uzupełniającej w leczeniu nowotworów	22
1.4.4. Rola ciał ketonowych w progresji nowotworu	23
1.4.5. Wpływ ciał ketonowych na epigenom.....	25
1.4.6. Gen OXCT1 i transferaza bursztynilo-CoA:3-ketokwas-CoA jako kluczowe czynniki metabolizmu ciał ketonowych i potencjalne narzędzia diagnostyczne.....	27
2. CELE PRACY.....	31
3. PRZYGOTOWANIE MODELI BADAWCZYCH	32
3.1. Przygotowanie komórek HeLa z wyciszoną monoallelicznie i biallelicznie ekspresją genu OXCT1 (HeLa OXCT1 KO)	32
3.2. Przygotowanie komórek HeLa z nadekspresją genu OXCT1 (HeLa OXCT1 OX)	35
3.3. Hodowla komórek HeLa w zmiennych warunkach glikemicznych.....	36
4. MATERIAŁ BIOLOGICZNY WYKORZYSTANY W BADANIACH.....	37
4.1. Hodowla komórkowa	37
4.2. Hodowla komórek bakteryjnych Escherichia coli	37
5. METODY BADAWCZE ZASTOSOWANE W PRACY	38
5.1. Ocena szybkości proliferacji komórek testem redukcji resazuryny	38
5.2. Ocena wrażliwości komórek na wybrane cytostatyki testem MTT.....	38
5.3. Analiza cyklu komórkowego techniką cytometrii przepływowej (FACS)	38
5.4. Immunofluorescencyjna analiza cyklu komórkowego	39

5.5.	Immunocytofluorescencyjna analiza antygenów związanych z cyklem komórkowym.....	39
5.6.	Barwienie immunofluorescencyjne.....	40
5.7.	Ocena zdolności do tworzenia sferoidów techniką wiszącej kropli.....	40
5.8.	Analiza potencjału migracyjnego i inwazyjnego	40
5.9.	Ocena zdolności do tworzenia kolonii testem klonogennym	41
5.10.	Izolacja RNA, synteza cDNA, Real-Time PCR	41
5.11.	Analiza poziomu białek techniką Western blotting.....	42
5.12.	Analiza uszkodzeń DNA przy użyciu alkalicznego testu kometowego	45
5.13.	Statystyka	45
6.	WYNIKI	46
6.1.	Analiza ekspresji genu OXCT1 w wybranych liniach komórkowych.....	46
6.2.	Analiza komórek HeLa z wyciszoną monoallelicznie i biallelicznie ekspresją genu OXCT1 (HeLa OXCT1 KO)	47
6.2.1.	Ekspresja OXCT1/SCOT na poziomie transkryptu i białka.....	47
6.2.2.	Proliferacja i wzrost komórek HeLa OXCT1 KO	48
6.2.3.	Wrażliwość komórek HeLa OXCT1 KO na wybrane cytostatyki.....	51
6.2.4.	Możliwości migracyjne i inwazyjne komórek HeLa OXCT1 KO	53
6.2.5.	Metabolizm ciał ketonowych komórek HeLa OXCT1 KO.....	55
6.2.6.	Wpływ ciał ketonowych na poziom modyfikacji potranslacyjnych w komórkach HeLa OXCT1 KO	56
6.3.	Analiza komórek z nadekspresją genu OXCT1 (HeLa OXCT1 OX).....	59
6.3.1.	Ekspresja OXCT1/SCOT na poziomie transkryptu i białka.....	59
6.3.2.	Proliferacja i wzrost komórek HeLa OXCT1 OX.....	59
6.3.3.	Wrażliwość komórek HeLa OXCT1 OX na wybrane cytostatyki.....	65
6.3.4.	Możliwości migracyjne i inwazyjne komórek HeLa OXCT1 OX	66
6.3.5.	Metabolizm ciał ketonowych komórek HeLa OXCT1 OX	68
6.4.	Analiza komórek HeLa hodowanych w zmiennych warunkach glikemicznych	70
7.	DYSKUSJA	72
8.	PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI	87
9.	UWAGI PODSUMOWUJĄCE	88
10.	STRESZCZENIE.....	89
11.	ABSTRACT.....	94
12.	LITERATURA.....	99
13.	CAŁKOWITY DOROBEK NAUKOWY	110

FINANSOWANIE BADAŃ

1. Doktorancki Grant Badawczy 2/DGB/IDUB/2022 (2022-2023) – „Analiza metabolizmu ciał ketonowych w komórkach raka szyjki macicy (HeLa) z poziomu transferazy bursztynilo-CoA:3-ketokwas-CoA (SCOT/*OXCT1*). Edycja genu *OXCT1* z wykorzystaniem techniki CRISPR/Cas9 i wynikające z tego konsekwencje dla potencjału proliferacyjnego komórek HeLa KO” (kierownik: mgr inż. Marta Biesiekierska).
2. Projekt NCN HARMONIA 2018/30/M/NZ3/00682 (2019-2022) – „Odżywianie, epigenetyka i choroby – Wpływ diety ketogenicznej i beta-hydroksymaślanu na kluczowe sygnatury kodu histonowego. Analiza ich potencjalnych wartości w zaburzeniach metabolicznych” (kierownik: dr hab. Aneta Balcerczyk, prof. UŁ).



NARODOWE CENTRUM NAUKI

WYKAZ SKRÓTÓW

2-DG	- ang. <i>2-deoxyglucose</i> ; 2-deoksyglukoza
AcAc	- ang. <i>acetoacetate</i> , acetoctan
ACAT1	- ang. <i>acetyl-CoA acetyltransferase 1</i> ; acetylotransferaza acetylo-CoA
ATP	- ang. <i>adenosine triphosphate</i> ; adenozylo-5'-trifosforan
ATR	- ang. <i>ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i> ; białko związane z ataksją-teleangiektazją i białkiem Rad3
ATRIP	- ang. <i>ATR-interacting protein</i> ; białko wchodzące w interakcję z białkiem ATR
BDH1	- ang. <i>β-hydroxybutyrate dehydrogenase</i> ; dehydrogenaza β -hydroksymaślanu
BHB	- ang. <i>β-hydroxybutyrate</i> ; β -hydroksymaślan
CAF1	- ang. <i>chromatin assembly factor 1</i> ; białko biorące udział w remodelowaniu chromatyny
Cas9	- ang. <i>caspase 9</i> ; kaspaza 9
Chk	- ang. <i>checkpoint kinase</i> ; kinaza punktu kontrolnego
ER	- ang. <i>estrogen receptor</i> ; receptor estrogenowy
ECM	- ang. <i>extracellular matrix</i> ; macierz zewnątrzkomórkowa
EMT	- ang. <i>epithelial-mesenchymal transition</i> ; przejście epitelialno-mezenchymalne
FBS	- ang. <i>fetal bovine serum</i> ; surowica płodów bydłych
GFP	- ang. <i>green fluorescent protein</i> ; białko zielonej fluorescencji
GLUT	- ang. <i>glucose transporter</i> ; transporter glukozy
H2AX	- ang. <i>H2A histone family member X</i> ; członek X rodziny histonów H2A
HER	- ang. <i>human epidermal growth factor receptor</i> ; receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu
HDL	- ang. <i>high-density lipoprotein</i> ; lipoproteina o wysokiej gęstości
HIF-1α	- ang. <i>hypoxia-inducible factor 1α</i> ; czynnik indukowany hipoksją 1 α
HMG-CoA	- ang. <i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA</i> ; 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA
HMCGS2	- ang. <i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2</i> ; syntaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA
HP1	- ang. <i>heterochromatin protein</i> ; białko heterochromatyny

HPV	– ang. <i>human papillomavirus</i> ; wirus brodawczaka ludzkiego
IFN-γ	– ang. <i>interferon γ</i> ; interferon γ
IL	– ang. <i>interleukin</i> ; interleukina
KO	– ang. <i>knock-out</i> ; celowe usunięcie lub inaktywacja określonego genu
LDH	– ang. <i>lactate dehydrogenase</i> ; dehydrogenaza mleczanowa
LDL	– ang. <i>low-density lipoprotein</i> ; lipoproteina o niskiej gęstości
MCT	– ang. <i>monocarboxylate transporter</i> ; transporter monokarboksylanów
NADH	– ang. <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i> ; dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
OX	– ang. <i>overexpression</i> ; nadekspresja
PPARα	– ang. <i>peroxisome proliferator-activated receptor α</i> ; receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów α
RFP	– ang. <i>red fluorescent protein</i> ; białko czerwonej fluorescencji
SCOT	– ang. <i>succinyl-CoA:3-ketoacid-CoA transferase</i> ; transferaza bursztynilo- CoA:3-ketokwas-CoA
TNF-α	– ang. <i>tumor necrosis factor α</i> ; czynnik martwicy guza
WT	– ang. <i>wild-type</i> ; naturalnie występujący fenotyp komórek
VEGF	– ang. <i>vascular endothelial growth factor</i> ; czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego

1. WSTĘP

Nowotwory odpowiadają za co szóstą śmierć na świecie. Tylko w 2020 roku odnotowano ok. 19,3 miliona nowych przypadków zachorowań i ok. 10 milionów zgonów na skutek chorób nowotworowych [Debela et al., 2021]. Według statystyk Światowej Organizacji Zdrowia, zauważalnym jest, że choć śmiertelność na skutek choroby niedokrwiennej serca i udaru wyraźnie spada, choroby nowotworowe wciąż znajdują się na wysokiej pozycji [Sung et al., 2021]. Do niedawna leczenie nowotworów opierało się na chirurgii, radioterapii i chemioterapii, stosowanej pojedynczo lub w połączeniu, w zależności od typu nowotworu i stopnia zaawansowania choroby. Intensywne badania naukowe nad etiologią i rozwojem nowotworów pozwoliły na wprowadzenie nowych metod walki z rakiem – od celowanych terapii lekowych poprzez terapie bazujące na wykorzystaniu komórek macierzystych, po terapię genową. Ciągłość badań nad chorobami nowotworowymi zapewnia modyfikacje obecnie stosowanych metod leczenia kierując je ku zredukowaniu efektów ubocznych terapii. W literaturze naukowej tematu dużo uwagi poświęca się substancjom pochodzenia naturalnego, jednocześnie wskazując rolę diety jako istotnego elementu wspomagającego leczenie pacjenta i regenerację organizmu po wyniszczającej chemioterapii.

Badania metabolizmu komórek nowotworowych wykazały zwiększone zużycie glukozy przy jednoczesnym utrzymaniu glikolizy na wyższym poziomie w porównaniu do komórek prawidłowych. Obserwacja ta doprowadziła do rozważań nad ograniczeniem/wyeliminowaniem glukozy z diety osób chorych na nowotwór jako potencjalnej formy terapii wspomagającej proces leczenia i zastąpienie węglowodanów alternatywnym źródłem energii – tłuszczami. Przeprogramowanie metaboliczne organizmu polegające na wykorzystywaniu tłuszczów, a dokładniej – ciał ketonowych – jako paliwa komórkowego możliwe jest dzięki stosowaniu diety ketogenicznej opartej na restrykcyjnej podaży węglowodanów przy jednoczesnej zwiększonej podaży tłuszczów. Badania nad możliwościami komórek nowotworowych do metabolizowania ciał ketonowych w celu produkcji energii wciąż trwają, prowadząc do pytania: czy leczenie raka dietą jest możliwe?

Wśród dotychczas udokumentowanych skutków przeprogramowania metabolicznego organizmu zauważalny jest zwykle skrajny efekt zastąpienia węglowodanów tłuszczami – hamujący lub stymulujący rozwój nowotworu [Phan et al., 2014]. W przypadku raka szyjki macicy, wciąż brakuje informacji na temat potencjalnego przestawienia komórek nowotworowych na wykorzystywanie ciał ketonowych jako źródła energii. Wydaje się to być obiecującą strategią nie tylko wobec samego powrotu do zdrowia, co także działaniem hamującym postęp możliwych współistniejących zaburzeń metabolicznych u kobiet, jako że ich gospodarka hormonalna jest ściśle związana z poziomem i dystrybucją tłuszczów w organizmie [Gupta et al., 2017].

1.1. Makroskładniki i produkcja energii

Zbilansowana dieta, składająca się z odpowiedniej ilości witamin, minerałów, białek, węglowodanów i lipidów, jest niezmiernie istotna dla zabezpieczenia substratów dla szlaków metabolicznych. Wieloletnie badania wykazały wspomagającą funkcję diety w leczeniu wielu zaburzeń. Oprócz odżywczych aspektów danego sposobu żywienia, jedną z jego głównych ról jest dostarczanie makroskładników do produkcji energii.

1.1.1. Węglowodany

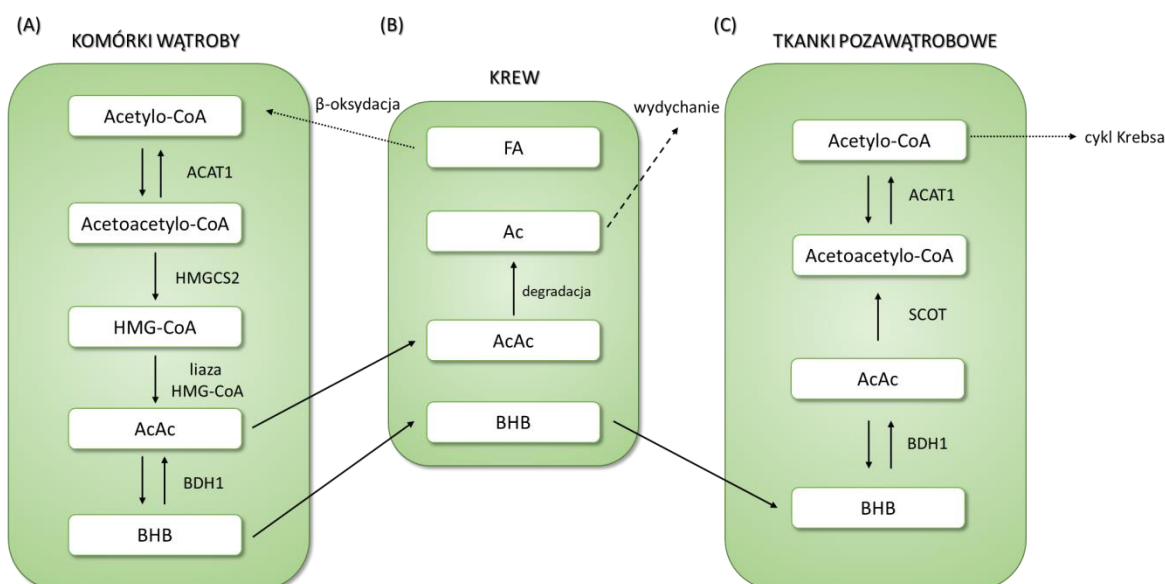
Trawienie węglowodanów prowadzi do rozkładu ich złożonych form (polisacharydów i oligosacharydów) do prostych monomerów (monosacharydów): glukozy, fruktozy, mannozy i galaktozy. Po resorpcji w jelicie, monosacharydy transportowane są przez żyłę wrotną do wątroby, gdzie wszystkie cukry proste niebędące glukozą są w nią przekształcane. Standardowy sposób produkcji energii opiera się na wykorzystaniu glukozy w procesie glikolizy, a następnie aktywnym przetransportowaniu przez błonę mitochondrialną powstałego w cytoplazmie pirogronianu. Następnie, pirogronian ulega przekształceniu do acetylo-CoA – głównego wyzwalacza serii reakcji zwanej cyklem Krebsa [Berg et al., 2019]. Przypuszcza się, iż głównym powodem preferencji organizmu do wykorzystywania glukozy jako źródła energii jest fakt, iż ten szlak metaboliczny był jednym z pierwszych, które wystąpiły u prawie wszystkich organizmów [Chandel, 2021]. Z uwagi na możliwość produkcji ATP bez udziału tlenu, glikoliza uważana jest za jeden z najbardziej uniwersalnych szlaków metabolicznych. Ponadto, glukoza jest łatwo dostępnym źródłem energii dzięki bardzo powszechnemu stosowaniu diety bogatej w węglowodany.

1.1.2. Lipidy

Metabolizm lipidów rozpoczyna się, gdy spożyte trójglicerydy rozkładane są do wolnych kwasów tłuszczowych i cząsteczki monoglicerydu. Kwasy tłuszczowe ulegając β -oksydacji transportowane są do mitochondriów z późniejszym utworzeniem acetylo-CoA [Berg et al., 2019]. Jak wspomniano, acetylo-CoA wykorzystywany jest dalej w cyklu Krebsa. Jednakże, jeśli wytworzone zostanie zbyt dużo acetylo-CoA i cykl Krebsa ulegnie przeciążeniu, acetylo-CoA zostanie użyty do produkcji ciał ketonowych w naturalnie zachodzącym w komórkach wątroby procesie zwanym „ketogenezą” [Puchalska et al., 2017].

Ketogeneza (**Ryc. 1A**) rozpoczyna się w celu uwolnienia energii przechowywanej w kwasach tłuszczowych. Acetylo-CoA, który transportowany jest do mitochondrium komórek wątroby, ulega odwracalnemu przekształceniu do acetoacetylo-CoA, a proces ten katalizowany jest przez acetylotransferazę acetylo-CoA (ACAT1, ang. *acetyl-CoA acetyltransferase 1*). Następnie, syntaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA (HMGCS2, ang. *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2*) łączy acetylo-CoA z acetoacetylo-CoA, formując 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA (HMG-CoA, ang. *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA*). Liaza HMG-CoA katalizuje formowanie acetoctanu z HMG-CoA. Acetoctan, po transporcie do krwi, może ulec

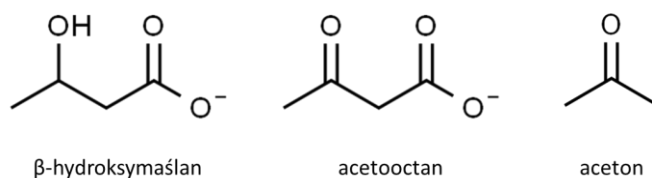
spontanicznej degradacji do acetonu wydychanego wraz z powietrzem (**Ryc. 1B**) lub zostać odwracalnie przekształcony w β -hydroksymaślan przez dehydrogenazę β -hydroksymaślanu (BDH1, ang. *β -hydroxybutyrate dehydrogenase*) w komórkach wątroby (**Ryc. 1A**). Kwasy tłuszczowe obecne są we krwi (**Ryc. 1B**) na skutek wcześniejszego rozkładu lipidów (w procesie lipolizy), stanowiąc substrat w procesie β -oksydacji. Po zakończeniu ketogenezy w wątrobie, ciała ketonowe są transportowane do krwi, gdzie β -hydroksymaślan jako metabolit sygnałowy może być dalej transportowany do tkanek pozawątrobowych, w których zachodzi proces ketolizy. Ketoliza (**Ryc. 1C**) opiera się na zdolności głównego ciała ketonowego – β -hydroksymaślanu – do bycia odwracalnie przekształconym do acetoocetanu przez BDH1. Następnie, acetoocetan jest włączany do acetoacetylo-CoA w reakcji katalizowanej przez transferazę bursztynilo-CoA:3-ketokwas-CoA (SCOT, ang. *succinyl-CoA:3-ketoacid-CoA transferase*). Z kolei, acetoacetylo-CoA może być odwracalnie przekształcany przez ACAT1 do acetylo-CoA wykorzystywanego w cyklu Krebsa.



Rycina 1. Metabolizm ciał ketonowych.

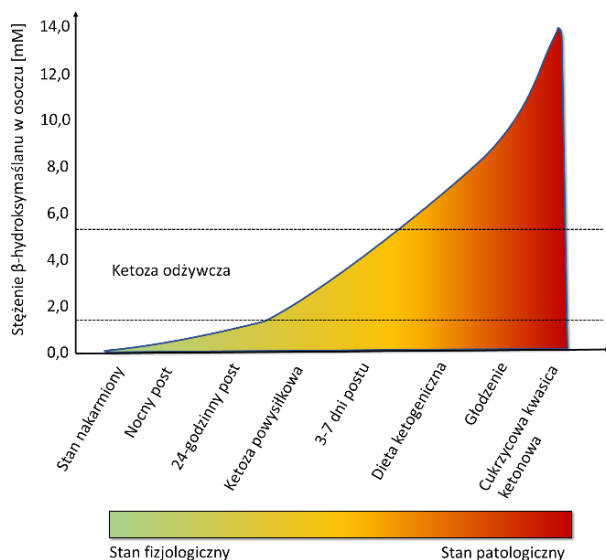
Objaśnienie skrótów: *Ac*, aceton; *AcAc*, acetoocetan; *ACAT1*, acetylotransferaza acetylo-CoA; *BHB*, β -hydroksymaślan; *BDH1*, dehydrogenaza β -hydroksymaślanu; *FA*, kwasy tłuszczowe; *HMG-CoA*, 3-hydrokso-3-metyloglutarylo-CoA; *HMGCS2*, syntaza 3-hydrokso-3-metyloglutarylo-CoA; *SCOT*, transferaza bursztynilo-CoA:3-ketokwas-CoA. Legenda schematu: przerywane strzałki sygnalizują proces zachodzący w tle; kropkowane strzałki zaznaczają kluczowe procesy metaboliczne; ciągłe strzałki prezentują kolejność zdarzeń w danym procesie.

Ciała ketonowe są endogennie syntetyzowanymi metabolitami, stanowiącymi istotne czynniki zaopatrujące organy o dużym zapotrzebowaniu energetycznym, takie jak mózg, serce czy mięśnie szkieletowe, zwłaszcza w specyficznych warunkach (długotrwały głód, krótkotrwały post, ciąża) lub na skutek przestrzegania diety niskowęglowodanowej i wysokotłuszczowej zarazem (np. diety ketogenicznej) [Puchalska et al., 2021]. Do najważniejszych ciał ketonowych zalicza się aceton, kwas acetylooctowy (w formie anionu – acetoocetan) oraz kwas β -hydroksymaślowy (w formie anionu – β -hydroksymaślan) (**Ryc. 2**).



Rycina 2. Wzory strukturalne najważniejszych ciał ketonowych produkowanych w procesie metabolizmu kwasów tłuszczowych.

Fizjologicznie, stężenie ciał ketonowych w surowicy krwi waha się w zakresie od 1 do 3 mM. Całonocny i 24-godzinny post, a także stan po zakończonych ćwiczeniach fizycznych



Rycina 3. Stężenie β-hydroksymaślanu w osoczu w stanach fizjologicznych i patologicznych.

20 mM) w stanach patologicznych, takich jak nieleczona cukrzyca, może rozwinąć się zagrażający życiu stan kwasicy ketonowej [Bashir et al., 2021], [Dąbek et al., 2020] (Ryc. 3).

1.1.3. Białka

Białka same w sobie nie stanowią głównego źródła energii, choć będąc spożywane w nadmiernej ilości, ulegają rozkładowi i magazynowane są jako złogi tłuszczu. Obrót białek, rozumiany jako ich rozkład i synteza, jest procesem ciągłym, a jego intensywność zmienia się w zależności od stanów fizjologicznych i patologicznych [Ross et al., 2021]. Po spożyciu, białka rozkładane są do aminokwasów i oligopeptydów przez enzymy proteolityczne w jelicie. W komórce, otrzymane w ten sposób aminokwasy mogą dalej służyć jako podstawa do budowy nowych białek lub syntezy amin biogennych, a także mocznika i produkcji energii [Chandel, 2021]. Aminokwasy glukogenne dostarczają węgla do utworzenia glukozy w procesie glukoneogenezy, zaś aminokwasy ketogenne (leucyna, lizyna) i aminokwasy zaliczające się do grupy zarówno gluko-, jak i ketogennych (fenyloalanina, izoleucyna, treonina, tryptofan i tyrozyna) degradowane są bezpośrednio do acetylo-CoA [Berg et al., 2019].

1.1.4. Makroskładniki preferowane przez organizm do produkcji energii – węglowodany czy lipidy?

Zarówno metabolizm glukozy, jak i ciał ketonowych, prowadzi do syntezy acetylo-CoA, który napędza cykl Krebsa do syntezy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH, ang. *nicotinamide adenine dinucleotide*), a następnie utleniania w łańcuchu transportu elektronów i syntezy adenosyno-5'-trifosforanu (ATP, ang. *adenosine triphosphate*). Jednakże, łańcuch reakcji biochemicznych zbiegających się w momencie syntezy acetylo-CoA różni się w obu tych przypadkach. Podczas gdy glukoza ulega glikolizie w cytoplazmie dostarczając pirogronianu, a następnie acetylo-CoA, który jest utleniany w mitochondriach, ciała ketonowe dostarczają acetylo-CoA poprzez bezpośrednie utlenianie wewnątrz tych organelli. Zarówno glukoza, jak i ciała ketonowe, dostarczają 2 cząsteczek acetylo-CoA z każdej cząsteczki glukozy lub ciała ketonowego [García-Rodríguez et al., 2021] (Tab. 1).

Tabela 1. Porównanie dwóch głównych ścieżek produkcji energii.

	Makroskładnik	Węglowodany	Lipidy
POZIOM ORGANIZMU	Źródła	Pełne ziarna, owoce, strączki, warzywa bogate w skrobię, nabiał, przekąski	Czerwone mięso, masło, miękki ser, śmietana, orzechy, olej, oliwki, awokado, nasiona, tłuste ryby
	Dostępność głównego składnika	Bardzo wysoka	Wysoka
	Trawienie	Szybkie	Powolne
	Przechowywanie energii	Długoterminowe	Krótkoterminowe
	Indeks glikemiczny	Wyższy	Niższy
	Kcal/g	4	9
POZIOM KOMÓRKOWY	Ścieżka metaboliczna	Glikoliza	Ketoliza
	Lokalizacja komórkowa	Cytoplazma	Mitochondrium
	Typ komórek	Wszystkie	Pozawątrobowe
	Tlenowa czy beztlenowa	Beztlenowa	Tlenowa
	Typ procesu	Kataboliczny	Kataboliczny
	Typ reakcji	Katalizowany enzymatycznie	Katalizowany enzymatycznie
	Ciągłość procesu w warunkach glikemicznych	Zachowana	Zachowana, ale z niską wydajnością
	Ciągłość procesu w warunkach deprivacji glukozy	Nieprowadzona	Zachowana, z wysoką wydajnością
	Główny składnik	Glukoza	Ciała ketonowe: aceton, acetoctan, β -hydroksymaślan
	Produkt końcowy	Pirogronian	Acetylo-CoA
Liczba cząsteczek acetylo-CoA wygenerowanych z pojedynczego substratu	2	2	

1.2. Biochemia i fizjologia komórki nowotworowej

Metabolizm komórek nowotworowych charakteryzuje się wzmożonym wychwytem i wykorzystaniem glukozy w celu promowania ich wzrostu, przeżycia i proliferacji. W odróżnieniu od komórek prawidłowych, opierających się na mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej, komórki nowotworowe do generowania energii wykorzystują głównie glikolizę tlenową [Jiang, 2017]. Zjawisko to, nazywane efektem Warburga, jest dość niespodziewane z uwagi na zachodzące w jego ramach przekształcenie glukozy do mleczału poprzez fermentację mlekową. Oznacza to, że komórki nowotworowe mają tendencję do wykorzystywania fermentacji nawet w warunkach tlenowych, a proces ten jest wystarczająco efektywny w wytwarzaniu energii potrzebnej do proliferacji [Vander Heiden et al., 2009]. Niemniej, zasadność występowania efektu Warburga jest zastanawiająca, nie biorąc pod uwagę czasu jego trwania i czasu całkowitego utlenienia 1 cząsteczki glukozy. Z pozoru konwersja glukozy do mleczału prowadzi do powstania zaledwie 2 cząsteczek ATP z każdej cząsteczki glukozy, podczas gdy fosforylacja oksydacyjna generuje do 36 cząsteczek ATP na skutek całkowitego utlenienia 1 cząsteczki glukozy [Berg et al., 2019] (**Tab. 2**). Istotne jest jednak zwrócenie uwagi na tempo zachodzenia obu tych procesów. Badania wykazały, iż na skutek glikolizy tlenowej przekształcenie glukozy do mleczału zachodzi nawet do 100 razy szybciej w porównaniu z całkowitym utlenianiem mitochondrialnym [Demetrius et al., 2010], [Vaupel et al., 2021]. Oznacza to, iż nawet w obliczu silnego zapotrzebowania energetycznego przez komórki nowotworowe, glikoliza tlenowa będzie zachodzić ze zwiększoną wydajnością, podczas gdy fosforylacja oksydacyjna pozostanie na niemalże tym samym poziomie [Vaupel et al., 2020].

Tabela 2. Porównanie generowania energii przez komórki prawidłowe i nowotworowe.

Typ komórek	Komórki prawidłowe	Komórki nowotworowe
Główne źródło energii	Glukoza	Glukoza
Rodzaj glikolizy	Beztlenowa	Tlenowa
Główne miejsce produkcji energii	Mitochondrium	Cytoplazma
Wydajność glikolizy beztlenowej	Wysoka	Wysoka
Wydajność glikolizy tlenowej	Niska	Wysoka
Liczba cząsteczek ATP wygenerowanych z 1 cząsteczki glukozy	36	2

Pierwotnie podejrzewano, iż glikoliza tlenowa zachodzi w komórkach nowotworowych na skutek potencjalnego uszkodzenia mitochondriów. Na podstawie dalszych badań zaobserwowano jednak, że efekt Warburga występuje zamiast oddychania mitochondrialnego nawet w obecności prawidłowo funkcjonujących mitochondriów [Orang et al., 2019]. Obserwacja ta doprowadziła do rozważań nad metabolicznymi preferencjami komórek nowotworowych. Jedną z teorii zakłada, iż komórki te wymagają ogromnej ilości energii w krótkim czasie, w związku z czym korzystniejsze może wydawać się przekształcenie

glukozy w mleczan w celu szybkiego wytworzenia ATP [Kadochi et al., 2017]. Inna hipoteza głosi, że glikoliza tlenowa jest preferowaną ścieżką pozwalającą na uniknięcie nadmiernego wytwarzania reaktywnych form tlenu podczas fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach, a następnie stresu oksydacyjnego, który prowadzi do uszkodzenia komórki [Chen et al., 2015], [Hess et al., 2015].

Podobnie, w trakcie przejścia epitelialno-mezenchymalnego komórki zaczynają wykazywać zwiększoną glikolizę tlenową w celu zredukowania produkcji reaktywnych form tlenu [Prasad et al., 2022]. Zjawisko to może tłumaczyć, dlaczego efekt Warburga jest zdecydowanie bardziej zauważalny w komórkach nowotworowych, w szczególności tych przerzutujących i o wysokim stopniu złośliwości [Kadochi et al., 2017].

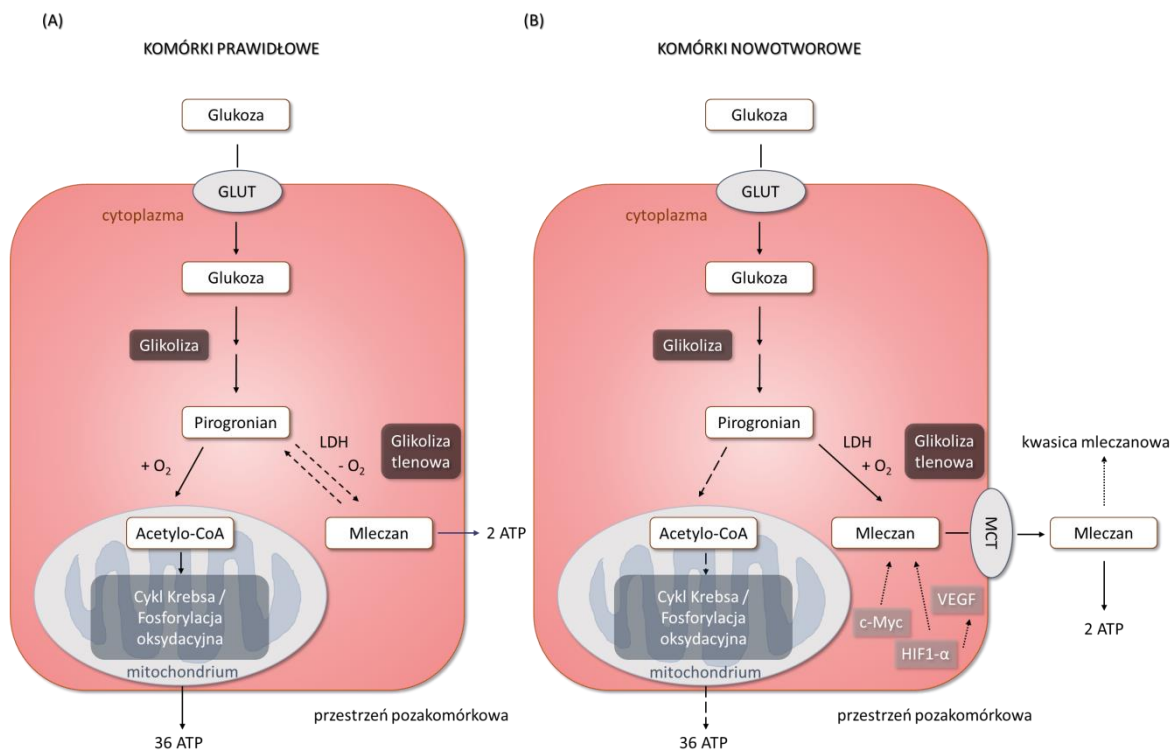
Przejście epitelialno-mezenchymalne polega na traceniu przez komórkę fenotypu epitelialnego na rzecz fenotypu mezenchymalnego poprzez promowanie utraty polarność i adhezji typu komórka-komórka przy jednoczesnym nabywaniu zdolności migracyjnych. Jest to proces związany ze skomplikowaną przemianą metaboliczną, niezbędną do zwiększonej proliferacji i motoryki, a także wzrostu w nieprzyjnym dla guza środowisku [Karvelsson et al., 2021]. Z uwagi na stres wynikający z możliwego ograniczenia dostępu do składników odżywczych, komórki nowotworowe modyfikują swój metabolizm na wszystkich etapach przerzutowania [Fedele et al., 2022]. Oprócz tego, zarówno przejście epitelialno-mezenchymalne, jak i metabolizm są procesami wielowymiarowymi, obejmującymi fenotypy hybrydowe, co oznacza, że komórki nowotworowe mogą dopasowywać różne aspekty produkcji i wykorzystywania energii, aby uzyskać mieszany fenotyp metaboliczny charakteryzujący się zarówno wysokim poziomem glikolizy, jak i fosforylacji oksydacyjnej [Jia et al., 2018], [Jia et al., 2019]. Ponadto, populacje komórek nowotworowych mogą dzielić się na komórki liderowe (ang. *leader cells*) opierające metabolizm na fosforylacji oksydacyjnej oraz komórki zwolennicze (ang. *follower cells*) korzystające z glikolizy [Commander et al., 2020]. Taka elastyczność komórek nowotworowych jest więc niezwykle problematyczna dla projektowania skutecznych terapii, ponieważ nawet w środowisku o zablokowanych ścieżkach potencjalnie zaangażowanych w przejście epitelialno-mezenchymalne i/lub przemianę metaboliczną, komórki te wykazują duże zdolności adaptacyjne do zmieniających się warunków [Jia et al., 2021].

Komórki nowotworowe zużywają duże ilości tlenu i składników odżywczych, powodując niedotlenienie, deficyt odżywczy i zwiększony poziom produktów ubocznych metabolizmu w mikrośrodowisku guza [Sahai et al., 2020]. Ponadto, charakteryzują się one wolniejszym tempem wzrostu niż odżywiają je naczynia krwionośne, co także przyczynia się do powstawania warunków hipoksji [Berg et al., 2019]. We wspomnianym stanie, aktywowany jest czynnik indukowany hipoksją 1 α (HIF-1 α , ang. *hypoxia-inducible factor 1 α*) powodujący wzrost ekspresji większości enzymów glikolitycznych oraz transporterów glukozy 1 (GLUT1, ang. *glucose transporter 1*) [Lin et al., 2018] i 3 (GLUT3, ang. *glucose transporter 3*) [Gao et al.,

2020], na skutek czego glikoliza w guzach przebiega efektywniej. Co więcej, HIF-1 α zwiększa ekspresję czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*), który ułatwia wzrost naczyń krwionośnych [Hu et al., 2016]. Ten adaptacyjny mechanizm komórek nowotworowych pozwala na ich dalszy wzrost, co z kolei przekłada się na zwiększenie złośliwości i możliwości do przerzutowania.

Trwała aktywacja glikolizy tlenowej w komórkach nowotworowych może być powiązana z aktywacją onkogenów lub utratą supresorów guza, tym samym znacznie przyspieszając progresję raka [Marbaniang et al., 2018]. HIF-1 α wraz z czynnikiem transkrypcyjnym c-Myc kodowanym przez onkogen zwiększają produkcję mleczanu, który działa jako źródło energii będąc transportowanym między różnymi populacjami komórek [Brown et al., 2020], [Masoud et al., 2015], [Certo et al., 2021]. Co więcej, nadmiernie generowany mleczan reguluje odpowiedź immunologiczną w mikrośrodowisku guza, gdy ulega transportowi przez transporter monokarboksylanów 1 (MCT1, ang. *monocarboxylate transporter 1*) (którego ekspresja indukowana jest przez c-Myc) i 4 (MCT4, ang. *monocarboxylate transporter 4*) (którego ekspresja indukowana jest przez HIF-1 α) do przestrzeni pozakomórkowej, gdzie powoduje kwasicę mleczanową związaną ze złą prognozą nowotworu [Doherty et al., 2013], [Certo et al., 2021], [Sun et al., 2017], [Parks et al., 2017].

Podsumowując i nieco upraszczając, generowanie energii w komórkach prawidłowych i nowotworowych zachodzi w innych warunkach, choć punkt wyjścia dla obu typów komórek stanowi glikoliza (**Ryc. 4**). W obecności tlenu, komórki prawidłowe produkują do 36 cząsteczek ATP na każdą cząsteczkę glukozy poprzez glikolizę, cykl Krebsa i fosforylację oksydacyjną. W warunkach hipoksji, zakumulowany pirogronian przekształcany jest przez dehydrogenazę mleczanową (LDH, ang. *lactate dehydrogenase*) do mleczanu, w wyniku czego generowane są 2 cząsteczki ATP (**Ryc. 4A**). Komórki nowotworowe wykorzystują głównie glikolizę tlenową, w wyniku której produkowane są 2 cząsteczki ATP z każdej cząsteczki glukozy. Powstały mleczan transportowany jest przez MCT do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, gdzie poprzez zwiększanie pH indukuje kwasicę mleczanową. Progresja nowotworu może być stymulowana zarówno przez nadmiernie produkowany mleczan, jak i przez VEGF, którego ekspresja zwiększona jest przez HIF-1 α . HIF-1 α wraz z c-Myc również przyczyniają się do zwiększonej produkcji mleczanu (**Ryc. 4B**).



Rycina 4. Produkcja energii w komórkach prawidłowych i nowotworowych.

Objaśnienie skrótów: *GLUT*, transporter glukozy; *LDH*, dehydrogenaza mleczanowa; *HIF-1 α* , czynnik indukowany hipoksją 1 α ; *VEGF*, czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego. Legenda schematu: przerywane strzałki prezentują zachodzenie procesu z obniżoną wydajnością; ciągłe strzałki odnoszą się do procesu zachodzącego ze zwiększoną wydajnością.

Zmniejszanie wydajności glikolitycznej i/lub przerywanie procesu fermentacji mleczanowej wydaje się być obiecującą strategią zapobiegania lub zatrzymywania rozwoju nowotworu. W tym celu zaproponowano wykorzystanie inhibitorów białek odpowiedzialnych za transport i przekształcanie glukozy do dalszych produktów pośrednich, takich jak GLUT4 czy heksokinazy [Akins et al., 2018], a także inhibitorów cząsteczek transportujących mleczan – MCT1 i MCT4 [Wang et al., 2021]. Innym, obecnie szeroko dyskutowanym sposobem oddziaływania na fenotyp glikolityczny komórek nowotworowych jest indukowana ketoza.

1.3. Stan wiedzy w zakresie rozwoju raka szyjki macicy

1.3.1. Etiologia raka szyjki macicy

Rak szyjki macicy jest czwartym najczęściej występującym nowotworem u kobiet, powodującym rocznie ponad 300 tysięcy zgonów [dane Cervical Cancer Action for Elimination, 2023]. Jego etiologia związana jest głównie z zakażeniem wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV, ang. *human papillomavirus*) – niezwykle powszechnym wirusem przenoszonym drogą płciową. Szacuje się, że do momentu ukończenia 50. roku życia, 4 na 5 kobiet będzie zarażonych HPV. Wirus ten jest również bardzo powszechny u mężczyzn, lecz zazwyczaj nie powoduje żadnych objawów. Szanse przeżycia po zachorowaniu na ten rodzaj nowotworu są proporcjonalne do czasu wykrycia – wcześniej zdiagnozowany rak szyjki macicy, przy odpowiedniej terapii, jest jednym z najskuteczniej uleczalnych chorób nowotworowych. Późne

stadia wymagają opieki paliatywnej z uwagi na wysoką złośliwość tej formy nowotworu [dane World Health Organization, 2014].

Rak szyjki macicy uważany jest za problem zdrowia publicznego ze względu na m.in. słabe metody profilaktyki, ograniczony zasięg badań przesiewowych, zwłaszcza kobiet z krajów nisko rozwiniętych. Globalna Strategia Eliminacji Raka Szyjki Macicy opiera się na kompleksowym podejściu obejmującym profilaktykę pierwotną poprzez szczepienia przeciw HPV, profilaktykę wtórną, badania przesiewowe i leczenie zmian przedrakowych oraz profilaktykę trzeciorzędową, diagnostykę i leczenie inwazyjnego raka szyjki macicy, a także opiekę paliatywną [dane World Health Organization, 2022]. Szacuje się, iż globalnie, tylko 15% dziewcząt w wieku kwalifikującym się do szczepienia przeciwko HPV, zostaje całkowicie zaszczepionych. Inne statystyki pokazują, że w krajach nisko i średnio rozwiniętych nawet mniej niż 20% kobiet jest badanych pod kątem raka szyjki macicy, podczas gdy w krajach wysoko rozwiniętych wskaźnik ten oscyluje w okolicach 60% [dane Cervical Cancer Action for Elimination, 2023].

Wirusy brodawczaka ludzkiego są często określane jako nieonkogenne (powodujące brodawki) i onkogenne (powodujące raka). Prawidłowo funkcjonujący układ immunologiczny zwykle radzi sobie z infekcją HPV (zarówno formy onkogennej, jak i nieonkogennej) w ciągu 2 lat [dane Centers for Disease Control and Prevention, 2022]. Ciągła infekcja HPV wysokiego ryzyka uważana jest za główny powód zachorowania na raka szyjki macicy. Wśród najbardziej pospolitych genotypów wyróżnia się HPV typu 16 i 18 (HPV16/18) [Fontham et al., 2020], wyposażone w białka promujące transformację komórek w guza – onkoproteiny E6 i E7, które są niezbędne do zaindukowania złośliwego fenotypu. Białka te regulują cykl komórkowy poprzez ich interakcję z białkiem p53 i białkiem retinoblastomy. Wraz z innymi białkami wirusowymi – E5 i E2 – onkoproteiny E6 i E7 sprzyjają metabolicznej przemianie na glikolizę tlenową oraz przyczyniają się do radio- i chemooporności przez zwiększenie aktywności enzymów glikolitycznych (enolazy A, heksokinazy II, dehydrogenazy mleczanowej A, fosfofruktokinazy i transporterów glukozy), a także inhibicję cyklu Krebsa i łańcucha oddechowego. Ogólnie, wirusy HPV16/18 wykorzystują maszynierię replikacyjną komórek gospodarza do powielania własnego zakaźnego materiału genetycznego. W niektórych przypadkach interakcje białek wirusowych z białkami gospodarza indukują złośliwą transformację, w której komórki zmuszone są sprostać wysokiemu zapotrzebowaniu energetycznemu z powodu wzrostu proliferacji [Martínez-Ramírez et al., 2018]. Onkoproteina E7 reguluje HIF-1 α , którego celem transkrypcyjnym jest GLUT1, podczas gdy E6 prowadzi do degradacji białka p53 skutkując nadekspresją GLUT1 i zwiększeniem wychwytu glukozy w komórkach nowotworowych [Yu et al., 1992].

Czas potrzebny do przejścia od infekcji HPV do złośliwej formy raka szyjki macicy może wynieść do 20 lat [Li et al., 2021]. W międzyczasie, wirus ten powoduje rearanżacje genetyczne, delecje, inwersje i translokacje chromosomów, aktywację protoonkogenów, a także utratę

heterozygotyczności, co prowadzi do niestabilności genomu i zwiększa ryzyko transformacji nowotworowej [Akagi et al., 2014]. Sama infekcja HPV nie jest jednak wystarczająca do transformacji zakażonej komórki – dużą rolę odgrywają tutaj również wszelakie zmiany w obrębie epigenomu oraz stan zapalny [Fernandes et al., 2015]. Istotnym elementem w rozwoju stanu zapalnego szyjki macicy są drobnoustroje wyściełające komórki nabłonkowe pochwy. W sytuacji, gdy homeostaza mikroflory (eubioza) zostaje naruszona (dysbioza), same drobnoustroje lub metabolity przez nie wydzielane wywołują szereg odpowiedzi immunologicznych w organizmie [Zhou et al., 2021].

1.3.2. Konsekwencje modulacji mikroflory pochwy

Mikroflorę pochwy stanowią głównie (90-95% całości) bakterie gatunku *Lactobacillus* (przede wszystkim *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii* i *L. gasseri*). Ich głównym zadaniem jest produkcja kwasu mlekowego, który poprzez utrzymywanie kwaśnego pH (w granicach od 3,8 do 4,4 w warunkach fizjologicznych) chroni przed infekcją drobnoustrojami patogennymi [Tidbury et al., 2021]. Kwas mlekowy może indukować wydzielanie przeciwzapalnej interleukiny IL-10, zmniejszać produkcję prozapalnej interleukiny IL-12 w komórkach dendrytycznych i zmniejszać cytotoksyczność limfocytów efektorowych znanych jako komórki NK (ang. *natural killer cells*) [Sun et al., 2017]. Z drugiej strony, mleczan jest jednym z głównych biomarkerów raka szyjki macicy, obniżającym pH mikrośrodowiska guza do zakresu 6,5-6,0, co sprzyja rozwojowi neoangiogenezy, immunosupresji i metastazy [de la Cruz-López et al., 2019]. Obserwacja ta świadczy o podwójnej roli mleczanu w stanach fizjologicznych i patologicznych, a także istotności badania jego związku ze stanem zapalnym narządów płciowych w kontekście nowotworów ginekologicznych [Ilhan et al., 2019].

Zmiany w mikroflorze pochwy związane są ze zwiększonym ryzykiem nabycia wirusowej choroby przenoszonej drogą płciową, w tym zakażenia HPV [Valenti et al., 2018]. Bakterie gatunku *Lactobacillus* są zależne od żeńskich hormonów, w szczególności estrogenu, który sprzyja zachowaniu eubiozy pochwy poprzez stymulację dojrzewania i proliferacji komórek nabłonka pochwy oraz gromadzenie glikogenu. Bogate w glikogen środowisko pochwy tworzy idealne warunki do namnażania się bakterii kwasu mlekowego, co wpływa na produkcję kwasu mlekowego i obniżone pH [Amabebe et al., 2018]. Obniżony poziom estrogenu, natomiast, zmniejsza dostępność glikogenu, co w konsekwencji prowadzi do spadku liczby *Lactobacillus* w pochwie [Brotman et al., 2014].

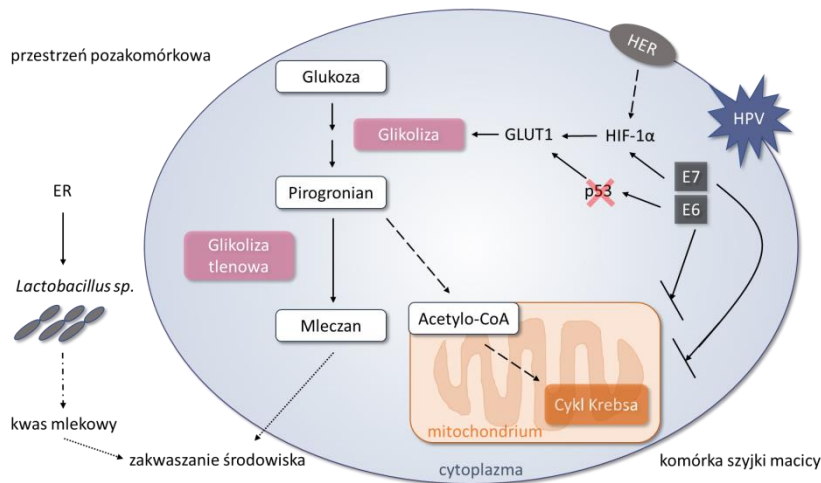
Innymi czynnikami wpływającymi na zmiany mikroflory pochwy jest stosowanie antybiotyków, probiotyków oraz żywności wysoko przetworzonej [Noormohammadi et al., 2022]. Badania wykazały, że diety wysokotłuszczowe o wysokim indeksie glikemicznym i niskiej gęstości odżywczej wpływają na rozwój dysbiozy pochwy, podczas gdy diety bogate w składniki odżywcze, takie jak kwas foliowy, witamina E czy wapń, wzmagają utrzymywanie eubiozy [Barrientos-Durán et al., 2020]. Dodatkowo, w celach prewencji infekcjom HPV,

proponuje się stosowanie diety śródziemnomorskiej opartej na warzywach, produktach pełnoziarnistych, strączkach, orzechach i owocach [Barchitta et al., 2018]. Klasyczna dieta zachodnia bogata w czerwone mięso, ziarna rafinowane, produkty smażone i wysokotłuszczowe produkty nabiałowe jest mocno związana z zakażeniem HPV i stanami zapalnymi [Koshiyama, 2019]. W przypadku diet eliminacyjnych, takich jak dieta ketogeniczna, brakuje danych, które pozwoliłyby określić, jaki dokładnie może mieć ona wpływ na zapobieganie i/lub już obecną infekcję HPV.

1.3.3. Wpływ przeprogramowania metabolicznego na rozwój raka szyjki macicy

Pacjentki chore na raka szyjki macicy wykazują oporność na radio- i chemioterapię, co częściowo spowodowane jest mikrośrodowiskiem guza charakteryzującym się deficytem tlenowym. W oparciu o przeprowadzone badania stwierdzono, że blokując mechanizmy obejmujące hipoksję i glikolizę, można uwrażliwić komórki nowotworowe na konwencjonalne leki i radioterapię, co stanowi potencjalną strategię leczenia [Granja et al., 2015]. W tym celu skupiono się na receptorach ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (HER, ang. *human epidermal growth factor receptor*), które z powodu wysokiej ekspresji w raku szyjki macicy stanowią teranostyczny biomarker tej choroby i pośredni cel terapeutyczny zarazem. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem komórek raka szyjki macicy SiHa wykazały słabą odpowiedź na inhibitory HER (lapatynib i AST1306), co związane jest ze zwiększeniem produkcji mleczanu. Inhibitory HER promują glikolizę w komórkach HPV-pozytywnych, co jest ciekawym zjawiskiem, gdyż do tej pory nie zaobserwowano takiej aktywności w komórkach HPV-negatywnych. Co więcej, połączenie lapatynibu z inhibitorami HER i niemetalizowanym analogiem glukozy – 2-deoksyglukozą (2-DG, ang. *2-deoxyglucose*) – poskutkowało zmniejszeniem poziomu mleczanu i obniżoną ekspresją HIF-1 α , prowadząc do spadku żywotności komórek i inhibicji wzrostu guza, podobnie jak i ograniczeniem neoangiogenezy w porównaniu do efektów cytotoksycznych uzyskanych wyłącznie przez oddziaływanie lapatynibu. Obserwacja ta sugeruje, że zastosowanie blokerów metabolizmu glukozy może być formą terapii uzupełniającej w celu zwiększenia cytotoksyczności konwencjonalnej chemioterapii w komórkach nowotworowych [Martinho et al., 2017].

Badania przeprowadzone na 78 pacjentkach cierpiących na raka szyjki macicy lub posiadających zmiany nowotworowe wykazały, że metabolity lipidowe, w tym β -hydroksymaślan, prowadzą do zwiększenia stanu zapalnego szyjki macicy [Ilhan et al., 2019]. Zauważono, że zwiększenie poziomu lipidów z plazmalogenów i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych nie tylko powoduje nieprawidłowości w metabolizmie komórkowym, ale również podkreśla znaczenie lipidów w rozwoju nowotworu z uwagi na ich rolę jako prekursorów prozapalnych cytokin, wywołujących nieprawidłową ekspresję genów [Wallner et al., 2018]. Co ciekawe, fosfatydylocholina, stanowiąca inną grupę lipidów, są znane ze swoich antyzapalnych właściwości, wpływając zarazem na proliferację komórek i zaprogramowaną śmierć komórki [Ridgway et al., 2013].



Rycina 5. Schematyczny proces rozwoju raka szyjki macicy z poziomu komórkowego.

Objaśnienie skrótów: *ER*, receptor estrogenowy; *GLUT1*, transporter glukozy 1; *HER*, receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu; *HIF-1α*, czynnik indukowany hipoksją 1α; *HPV*, wirus brodawczaka ludzkiego. Legenda schematu: przerywane strzałki prezentują zachodzenie procesu z obniżoną wydajnością; ciągłe strzałki odnoszą się do procesu zachodzącego ze zwiększoną wydajnością.

Podsumowując, na rozwój raka szyjki macicy ma wpływ szereg czynników – począwszy od infekcji HPV, poprzez zaindukowany stan zapalny, na mikroflorze pochwy kończąc (Ryc. 5). Wymienione elementy wpływają na siebie wzajemnie obnażając dwukierunkowe działanie mleczanu. Bakterie kwasu mlekowego *Lactobacillus sp.* są zależne od poziomu estrogeny regulowanego przez receptor estrogenowy (ER, ang. *estrogen receptor*). Kwas mlekowy produkowany przez bakterie zakwasza środowisko zewnętrzne komórek szyjki macicy, utrzymując pH na poziomie optymalnym dla zachowania przyjaznej mikroflory. Infekcja HPV prowadzi do ekspresji genów kodujących onkoproteiny E6 i E7, które wpływają na zahamowanie cyklu Krebsa. Onkoproteina E6 degraduje białko p53, co prowadzi do ekspresji GLUT1. Czynnik HIF-1α regulowany jest przez receptor HER i E7, wpływając na transkrypcję GLUT1, którego aktywacja jest niezbędna do przeprowadzenia glikolizy. Włączenie materiału genetycznego HPV do genomu gospodarza wraz z zachodzącymi zmianami epigenetycznymi i stanem zapalnym zwiększa prawdopodobieństwo zajścia transformacji nowotworowej. W tej sytuacji, konwersja pirogronianu do acetylo-CoA i późniejszy cykl Krebsa zachodzi z mniejszą wydajnością. Komórka preferuje glikolizę tlenową, w wyniku której powstały z pirogronianu mleczan transportowany jest do przestrzeni pozakomórkowej, zwiększając zakwaszenie środowiska.

1.4. Dieta ketogeniczna jako środek terapeutyczny

Obecnie jednym z najczęściej dyskutowanych modeli żywieniowych jest dieta ketogeniczna oparta na minimalnej podaży węglowodanów (mniej niż 5% dostarczanej energii z pożywienia) i optymalnej pod względem odżywczym ilości białka (10-20% energii) przy jednoczesnej wysokiej podaży tłuszczów (ok. 75-85% energii). Ograniczenie węglowodanów do mniej niż 50 g dziennie powoduje utratę glikogenu i produkcję ciał ketonowych z tłuszczu

zmagazynowanego w tkance tłuszczowej [Dąbek et al., 2020]. Tak zaindukowane przeprogramowanie metaboliczne zyskało popularność jako niezwykle skuteczne podejście terapeutyczne w leczeniu lekoopornej epilepsji u dzieci. W ciągu ostatniej dekady dieta ketogeniczna przyciągnęła uwagę naukowców dzięki pojawiającym się dowodom na jej obiecujący potencjał leczniczy w zaburzeniach metabolicznych i immunologicznych, a nawet w terapii nowotworowej [Zhu et al., 2022].

1.4.1. Geneza i ograniczenia stosowania diety ketogenicznej w celach leczniczych

Historia wprowadzenia diety ketogenicznej jako czynnika wspomagającego leczenie sięga lat 20-tych XX wieku, kiedy po raz pierwszy zastosowano ten model żywieniowy u dzieci chorujących na lekooporną epilepsję, co poskutkowało znaczącym ograniczeniem występowania napadów padaczkowych [Rogovik et al., 2010]. Do lat 70-tych XX wieku opisano ponad 1000 przypadków, wśród których 27% dzieci uzyskało zwiększoną kontrolę, a 52% – pełną kontrolę nad napadami padaczkowymi w trakcie stosowania tej diety [Wheless, 2008]. Ogólnie, wyłączając pacjentów cierpiących na epilepsję, niewiele jest dostępnych informacji na temat długoterminowego wpływu przestrzegania diety ketogenicznej, co prawdopodobnie ma związek z często występującymi efektami ubocznymi, takimi jak nudności, zaparcia, wymioty, ból i zawroty głowy, zmęczenie, bezsenność oraz trudności w podejmowaniu wysiłku fizycznego, czasami zbiorczo określanymi jako „grypa ketonowa” [Masood et al., 2022]. Choć wymienione objawy zazwyczaj ustępują w ciągu kilku tygodni od chwili rozpoczęcia stosowania diety ketogenicznej (okres nazywany „inicjacją”), potrafią one skutecznie zniechęcić do kontynuowania tego sposobu żywienia. Długoterminowe działania niepożądane obejmują stłuszczenie wątroby, hipoproteinemię, kamienie nerkowe oraz niedobory witamin i minerałów – skutki te zostały zaobserwowane u chorujących na epilepsję dzieci stosujących dietę ketogeniczną przez ponad 6 lat [Groesbeck et al., 2006]. Badania przeprowadzone na 276 chorujących na epilepsję lekooporną dzieciach wykazały, że po zaprzestaniu stosowania tej diety (średnio po upływie 5 lat), u 24% pacjentów nie zaobserwowano nawrotu napadów padaczkowych przez co najmniej 1 miesiąc. Jednak po upływie ok. 3 miesięcy, napady padaczkowe powróciły u 82% pacjentów [Taub et al., 2014].

1.4.2. Wpływ diety ketogenicznej na mikrobiom

Składniki diety są głównym czynnikiem decydującym o składzie mikroflory jelitowej. Badania wykazały, że stosowanie diety ketogenicznej przyczynia się do zwiększenia względnej liczebności *Akkermansia muciniphila*, których obecność związana jest z poprawą metabolizmu i ogólnego zdrowia [Macchione et al., 2019]. Bakterie te są głównym producentem krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych wytwarzanych na skutek fermentacji nietrawiennych polisacharydów (błonnik pokarmowego i skrobi odpornej) [Blaak et al., 2020]. Podwyższony poziom krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych jest powiązany z niższym poziomem otyłości i wyższym poziomem wrażliwości na insulinę. Wariant bardzo

niskowęglowodanowej diety ketogenicznej, natomiast, obniża poziom *A. muciniphila*. Prawdopodobną przyczyną tego zjawiska jest bardzo niska podaż węglowodanów złożonych (np. błonnika), które stanowią paliwo komórkowe dla tych bakterii. Dlatego też istotne jest określenie dokładnych ilości węglowodanów (złożonych) podawanych w trakcie stosowania diety ketogenicznej [Attaye et al., 2021].

Dysbioza przyczynia się do rozwoju różnych stanów patologicznych, w tym otyłości [Sun et al., 2018], cukrzycy [Livanos et al., 2016], chorób neurodegeneracyjnych [Rekdal et al., 2019] czy nowotworów [Tilg et al., 2018]. Przeprowadzone badania wykazały, że progresja nowotworu okrężnicy jest ściśle skorelowana z obecnością bakterii *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia*, *Alistipes finegoldii* czy *Thermanaerovibrio acidaminovorans*, które mogą być potencjalnymi markerami diagnostycznymi [Cheng et al., 2020]. Mikroorganizmy te zaangażowane są w takie szlaki metaboliczne jak biosynteza lipopolisacharydów, katabolizm białek i mucyny, degradacja węglowodanów [Wirbel et al., 2019] oraz produkcja energii [Dai et al., 2018]. Ponadto, drobnoustroje komensalne modulują odpowiedź immunologiczną zaindukowaną przez terapię [Cheng et al., 2020]. Bakterie rodzaju *Bifidobacterium* wykazują szereg właściwości terapeutycznych wobec takich chorób jak rak jelita grubego, martwicze zapalenie jelit czy nieswoiste zapalenie jelit [O'Callaghan et al., 2016]. *Bifidobacterium sp.* (np. *B. adolescentis*) pełni rolę w aktywacji Th17 – klasy prozapalnych komórek odpornościowych. Zauważono, że zwiększony poziom ciał ketonowych na skutek stosowania diety ketogenicznej selektywnie hamował wzrost *Bifidobacterium*, prowadząc do zmniejszenia ich liczby w jelicie [Ang et al., 2020], a tym samym – obniżenia poziomu komórek Th17 [Endo et al., 2017]. Zjawisko to sugeruje, że modulacja aktywacji komórek Th17 poprzez dietę ketogeniczną może być obiecującym podejściem terapeutycznym do łagodzenia zaburzeń immunologicznych, neurologicznych oraz chorób metabolicznych [Lim et al., 2022].

1.4.3. Potencjał diety ketogenicznej jako terapii uzupełniającej w leczeniu nowotworów

W próbie klinicznej, 11 pacjentów z zaawansowanym lub przerzutującym nowotworem różnego typu (nowotwór płuc, okrężnicy, trzustki, mózgu, prostaty, wątroby, tarczycy i skóry) zostało poddanych diecie ketogenicznej polegającej na dostarczeniu 20-40 g węglowodanów dziennie. Po upływie 4 tygodni, u 54,5% pacjentów zauważono częściowe zatrzymanie choroby lub jej ustabilizowanie. Wśród pacjentów wytypowanych do badania, żaden z nich nie był poddawany chemioterapii [Tan-Shalaby et al., 2016]. Inne badanie przeprowadzono na 28 pacjentach chorujących na raka szyi i głowy, wśród których 7 pacjentów stosowało dietę ketogeniczną, a 21 pacjentów – standardową dietę. Wyniki wykazały, że u pacjentów otrzymujących chemioterapię, średnie tygodniowe zmniejszenie masy ciała i masy mięśni szkieletowych wyniosło odpowiednio 0,9 kg i 0,31 kg w grupie stosującej dietę ketogeniczną, a w grupie stosującej standardową dietę – odpowiednio 1,2 kg i 0,57 kg. Pacjenci z grupy stosującej dietę ketogeniczną nieotrzymujący chemioterapii

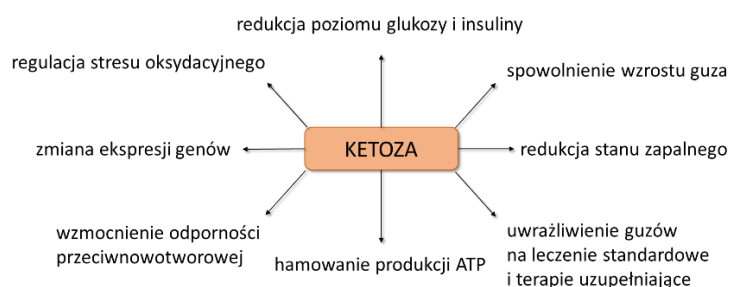
osiągnęli średni przyrost 0,04 kg masy ciała i 0,12 kg masy mięśni szkieletowych na tydzień. Po medianie czasu obserwacji wynoszącej 42 miesiące (zakres 6,7–78 miesięcy) nie stwierdzono istotnych różnic w czasie przeżycia wolnego od progresji choroby lub przeżycia całkowitego między grupami [Klement et al., 2022].

Zauważalny pozytywny efekt stosowania diety ketogenicznej u niektórych pacjentów onkologicznych jest prawdopodobnie związany z ogólnym polepszeniem stanu organizmu poprzez poprawę profilu lipidowego, w tym zmniejszenie całkowitego cholesterolu LDL oraz zwiększenie poziomu HDL [Weber et al., 2020]. Ponadto, dieta ketogeniczna znacząco obniża poziom insuliny [Cohen et al., 2018] i hemoglobiny [Dowis et al., 2021], a także ułatwia zredukowanie wagi u osób z otyłością [Ciaffi et al., 2021]. Otyłość jest szczególnie istotnym aspektem w kontekście choroby nowotworowej, gdyż uznawana jest za ogólnoustrojową chorobę zapalną niskiego stopnia. Permanentny stan zapalny organizmu związany jest z wydzielaniem prozapalnych cytokin, chemokin i innych czynników transkrypcyjnych bezpośrednio związanych z nowotworzeniem [Pahwa et al., 2022]. Podczas gdy stany zapalne zauważalne są jeszcze przed złośliwymi zmianami w niektórych typach nowotworów, przewrotnie, niektóre rodzaje stanów zapalnych mogą stymulować progresję nowotworu i przerzuty, a także zmniejszać skuteczność leczenia. Stosowanie diety ketogenicznej w takich przypadkach wykazało zmniejszoną ekspresję cytokin prozapalnych – czynnika martwicy guza (TNF- α , ang. *tumor necrosis factor α*), interleukiny 1 β (IL-1 β , ang. *interleukin 1 β*) i interferonu γ (IFN- γ , ang. *interferon γ*) – sugerując, że taki model żywienia może wzmacniać odpowiedź na leczenie i profilaktykę raka [Lu et al., 2018]. Zmniejszenie dostępności glukozy przy równoczesnym dostarczeniu ciał ketonowych jako alternatywnego źródła energii dla komórek prawidłowych wydaje się być obiecującą dodatkową strategią terapeutyczną u pacjentów chorujących na nowotwór [Seyfried et al., 2014]. Z założenia, dieta ketogeniczna powinna prowadzić do selektywnego zagłodzenia komórek nowotworowych, niezdolnych do zaadaptowania metabolizmu ciał ketonowych [Aminzadeh-Gohari et al., 2017].

1.4.4. Rola ciał ketonowych w progresji nowotworu

Ketoza jest stanem metabolicznym charakteryzującym się zwiększonym poziomem ciał ketonowych we krwi i moczu. Ze względu na tendencję do hamowania szlaków sygnałowych glukozy i insuliny, indukowana ketoza brana jest pod uwagę jako potencjalna terapia przeciwnowotworowa. Jednakże, w przeciwieństwie do większości strategii ukierunkowanych na pojedynczy cel w komórce, stan ketozy wywołuje rozległe zmiany metaboliczne, genetyczne i immunologiczne [Woolf et al., 2015], [Sheck et al., 2012]. Pierwotnie zakładano, iż deprivacja glukozy z jednoczesnym zwiększeniem stężenia ciał ketonowych wywrze bezpośredni wpływ na zahamowanie progresji nowotworu, lecz wyniki badań sugerują wiele innych mechanizmów poprzez które ketoza może wywoływać efekty antynowotworowe. Zalicza się do nich zredukowanie poziomu glukozy, insuliny i stanu zapalnego, zmniejszenie skali stresu oksydacyjnego, wzmocnienie odporności przeciwnowotworowej, zmiany w ekspresji genów

oraz uwrażliwienie guzów na leczenie standardowe i terapie uzupełniające (Ryc. 6). Obecnie uważa się, że wiele z tych mechanizmów indukowanych jest przez same ciała ketonowe, które oprócz działania jako substrat energetyczny wykazują również właściwości sygnalizacyjne [Newman et al., 2014].



Rycina 6. Efekty antynowotworowe stanu ketozy.

Bezpośrednie działanie przeciwnowotworowe ciał ketonowych, a dokładnie β -hydroksymaślanu, zostało zauważone już w 1979 roku w hamowaniu proliferacji ludzkich komórek chłoniaka (linia komórkowa Raji) i raka szyjki macicy (HeLa), a także mysiego czerniaka (B16). Ten sam zespół badaczy zaobserwował również znaczne zmniejszenie rozprzestrzeniania się przerzutów w mysim modelu CS7BL/6 czerniaka B16 w zależności od dostarczonej dawki BHB [Magee et al., 1979]. Podobnie wykazano, że acetoctan w sposób zależny od dawki hamuje produkcję ATP i proliferację komórek raka okrężnicy (linie komórkowe LoVo, RKO, Caco-2, SW48, SW480) i raka piersi (MDA-MB-231, MCF7), jednocześnie nie wywołując wspomnianych efektów w kontrolnych liniach komórek fibroblastów (RFP3, MCH 064, MCH 065) [Fine et al., 2009]. W innym doniesieniu wykazano, że zarówno β -hydroksymaślan, jak i acetoctan, hamują żywotność i indukują apoptozę komórek neuroblastomy SK-N-AS bez wpływu na kontrolne fibroblasty ludzkiego napletka [Skinner et al., 2009]. Fizjologiczne stężenia β -hydroksymaślanu natomiast, zmniejszały żywotność i proliferację mysich komórek glejaka VM-M3/Fluc w warunkach *in vitro* pomimo obecności wysokoglukozowej pożywki hodowlanej [Poff et al., 2014].

Stopień, w jakim zaobserwowane efekty ketozy w warunkach *in vitro* przyczyniają się do zakładanych efektów przeciwnowotworowych *in vivo* nie jest znany, choć w większości modeli przedklinicznych zauważa się korzystne działanie [Klement et al., 2016]. Otrzymane dotychczas informacje sugerują, że zarówno korzyści, jak i potencjalne ryzyko, mogą być specyficzne dla typu nowotworu, ponieważ niektóre analizy wykazały, że ciała ketonowe dostarczane bez jednoczesnej deprywacji węglowodanów mogą służyć jako substrat napędzający wzrost guza lub przerzutowanie nowotworu. Zostało to zauważone w trakcie badań nad nowotworem piersi (ludzka tkanka MDA-MB-231/GFP+ wprowadzona do myszy NCr), gdzie traktowanie β -hydroksymaślanem poskutkowało 2,5-krotnym wzrostem objętości guza bez jednoczesnego zwiększenia poziomu neoangiogenezy [Bonuccelli et al., 2010]. Z kolei, badania przeprowadzone z wykorzystaniem komórek raka okrężnicy HT-29 wykazały

antyproliferacyjny efekt β -hydroksymaślanu (w odróżnieniu od komórek HCT116, Caco-2 i RKO nie wykazujących żadnej odpowiedzi) [Dmitrieva-Posocco et al., 2022].

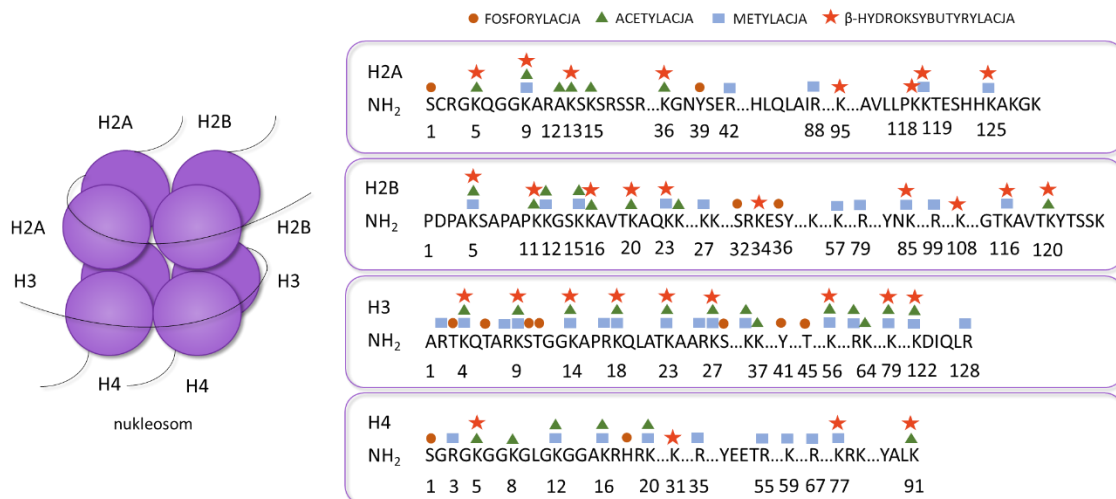
1.4.5. Wpływ ciał ketonowych na epigenom

Acetylo-CoA jest istotnym donorem grupy acetylowej w procesie acetylacji histonów – jednej z głównych modyfikacji epigenetycznych – regulując w ten sposób ekspresję onkogenów i supresorów nowotworu. Pośrednia modulacja poziomu acetylo-CoA zachodząca poprzez ograniczanie/zwiększanie dostępności głównych prekursorów tego metabolitu – glukozy, mleczanu, β -hydroksymaślanu i acetoocetanu – może prowadzić zatem do zmian w obrębie epigenomu [Hao et al., 2022].

Regulacja epigenetyczna obejmuje szereg procesów kluczowych z punktu widzenia komórki, takich jak metylację DNA, modyfikacje potranslacyjne histonów czy remodelowanie nukleosomów [Dawson et al., 201]. Reanranżacja epigenomu poprzez wprowadzenie zmian we wzorze metylacji DNA i modyfikacji histonów prowadzi do konwersji strukturalnych chromatyny, a tym samym zniszczenia prawidłowych wzorców ekspresji genów na rzecz nieprawidłowych modeli transkrypcyjnych, które sprzyjają powstawaniu i progresji nowotworu [Bennett et al., 2018].

Do najpowszechniej badanych modyfikacji histonów należy acetylacja (przyłączenie grupy acetylowej do lizyny) i metylacja lizyny oraz argininy polegająca na przyłączeniu grupy metylowej do odpowiedniego aminokwasu. Acetylacja histonów jest procesem odwracalnym, regulowanym przez acetylotransferazy (HAT) i deacetylazy histonów (HDAC). Przyłączenie grupy acetylowej do lizyny histonu promuje ekspresję genów poprzez zmianę struktury przestrzennej nukleosomu, tym samym indukując rozluźnienie chromatyny i zwiększenie intensywności procesów transkrypcji dzięki umożliwieniu przyłączenia się czynników transkrypcyjnych do DNA. Odłączenie grupy acetylowej, natomiast, powoduje zahamowanie transkrypcji na skutek zwiększonej kondensacji chromatyny [Liu et al., 2019].

Istnieje również szereg innych modyfikacji histonów (**Ryc. 7**), nazwanych zbiorczo acylacją, które obejmują m.in. fosforylację, ubikwitynację, deiminację, propionylację, krotonylację, malonylację, benzoilację, a także – potencjalnie mającą największy związek z acetylacją – β -hydroksybutyrylację [Balcerczyk et al., 2019], [Nitsch et al., 2021].



Rycina 7. Wybrane modyfikacje potranslacyjne histonów.

Schematyczne przedstawienie modyfikacji wybranych reszt ogonów aminokwasowych, tj. lizyn (K), arginin (R) i seryn (S) histonów rdzeniowych H2A, H2B, H3, H4, które w podwójnej kopii (oktamer), oplecione DNA i ustabilizowane histonem H1, stanowią podstawową jednostkę chromatyny – nukleosom.

Beta-hydroksybutyrylacja lizyny histonu zachodzi dzięki zwiększonej obecności β-hydroksymaślanu oraz aktywnej formie tioestru β-hydroksybutyrylo-CoA. Proces ten katalizowany jest przez białko p300 (HAT) [Huang et al., 2021], natomiast de-β-hydroksybutyrylacja następuje dzięki sirtuinom 1, 2 i 3 [Huang et al., 2021], [Zhang et al., 2019] (SIRT1, SIRT2, SIRT3) oraz deacetylazom histonów 1, 2, i 3 (HDAC1, HDAC2 i HDAC3) [Huang et al., 2021]. Badania wykazały, że na skutek 48-godzinnej głodzenia myszy, podwyższony poziom β-hydroksymaślanu prowadzi do β-hydroksybutyrylacji na wielu resztach lizyny histonu 3 i 4 w komórkach wątroby [Xie et al., 2016]. Co ciekawe, przyłączenie β-hydroksymaślanu do lizyny 9 histonu 3 (H3K9bhb) powiązane jest z genami odpowiedzi na głód różniącymi się od genów związanych z acetylacją na tej samej reszcie H3K9 (H3K9ac) [Koronowski et al., 2021]. Z kolei, badania przeprowadzone na nerkach myszy wykazały, że zwiększony poziom β-hydroksybutyrylacji lizyny (Kbhb) hamuje stres oksydacyjny, jednocześnie zwiększając poziom acetylacji (Kac) [Sabari et al., 2017].

Do tej pory zidentyfikowano co najmniej 31 miejsc modyfikacji histonów, w obrębie których zachodzi β-hydroksybutyrylacja, jednak w większości badania skupiały się na H3K9bhb. Przykładowo, aktywacja neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF) związana jest z H3K9bhb, wpływając na działanie leków przeciwdepresyjnych [Chen et al., 2017]. Podobnie, zwiększenie poziomu H3K9bhb w VEGF antagonizuje uszkodzenie komórek śródbłonna aorty na skutek cukrzycy [Wu et al., 2020]. Innymi miejscami ulegającymi β-hydroksybutyrylacji w obrębie histonów jest H4K14, H3K4, H3K79 i H3K56, których acetylacja i metylacja są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania chromatyny [Bannister et al., 2011]. Badania wykazały, że wywołana przez głód H3K9bhb związana jest z jednoczesną trimetylacją histonu 3 lizyny 4 (H3K4me3) i acetylacją histonu 3 lizyny 27 (H3K27ac), skutkującą aktywnym statusem chromatyny [Terranova et al., 2021]. Co więcej, na podstawie

wyników badań nad β -hydroksybutyrylacją białka p53 można wnioskować, iż modyfikacja ta na lizynach K120, K319 i K370 może prowadzić do inaktywacji p53 w komórkach nowotworowych traktowanych β -hydroksymaślanem, skutkując zmniejszoną acetylacją p53 i ekspresją genów p21 i PUMA, ułatwiając w ten sposób wzrost komórek [Liu et al., 2019]. Obserwacja ta silnie sugeruje, że ciała ketonowe mogą zachowywać się jak onkometabolity [Fu et al., 2022]. Choć pierwotnie pojęcie „onkometabolitów” odnosiło się do metabolitów akumulowanych w nadmiarze na skutek zakłóconego cyklu Krebsa, obecnie tym terminem coraz częściej opisuje się metabolity nadprodukowane przez enzymy metaboliczne zawierające mutacje, wpływające bezpośrednio na progresję nowotworu poprzez zmianę sygnalizacji komórkowej [Gill et al., 2022].

Modyfikacje potranslacyjne histonów zależne są również od działania kluczowych enzymów metabolizmu ciał ketonowych – syntazy HMG-CoA (HMGCS2) oraz BDH1. Zauważono, że utrata jelitowego HMGCS2 upośledza agregację β -hydroksymaślanu i wpływa na ekspresję genów metabolicznych związanych z H3K9bhb. Z kolei, inhibicja BDH1 skutkuje agregacją β -hydroksymaślanu i wzrostem H3K9bhb, sprzyjając progresji komórek raka wątrobowo-komórkowego HepG2, SNU387, Hep3B i PLC-PRF-5 poprzez indukowanie białka związanego z metastazą 2 (MAT2) [Zhang et al., 2021], [Zhang et al., 2019]. Inne badania, natomiast, jednoznacznie przedstawiły geny kodujące HMGCS2 i BDH1 jako metaboliczne onkogeny, które nadeksprimowane w komórkach raka piersi MDA-MB-231 zwiększają wzrost guza i metastazę [Martinez-Outschoorn et al., 2012].

1.4.6. Gen *OXCT1* i transferaza bursztynylo-CoA:3-ketokwas-CoA jako kluczowe czynniki metabolizmu ciał ketonowych i potencjalne narzędzia diagnostyczne

Gen *OXCT1* koduje transferazę bursztynylo-CoA:3-ketokwas-CoA (SCOT). W komórkach prawidłowych, gen *OXCT1* w dużym stopniu występuje w sercu, mózgu i nerkach, a ponadto jest wykrywalny we wszystkich komórkach pozawątrobowych. Nie jest natomiast eksprimowany w hepatocytach, czego powodem jest inhibicja aktywności jego promotora przez miRNA-122 podczas przejścia płód-noworodek oraz trimetylacja lizyny 27 histonu 3 (H3K27me3) [Huang et al., 2016], [Hwang et al., 2022]. Z tego powodu, w prawidłowych komórkach wątroby SCOT nie jest aktywny, co przeszkadza w wykorzystywaniu ciał ketonowych jako źródła energii.

Gen *OXCT1* gra istotną rolę nie tylko w metabolizmie ciał ketonowych, ale pośrednio także w rozwoju oporności na niektóre leki, progresji nowotworzenia i sygnalizowaniu międzykomórkowym. Przeprowadzone dotychczas badania sugerują, że *OXCT1* może być potencjalnym celem terapeutycznym w leczeniu nowotworów z uwagi na jego wysoką ekspresję negatywnie skorelowaną z przeżyciem wolnym od nawrotów. W chemioterapii skierowanej przeciwko gruczakolakowi przewodowemu trzustki najczęściej wykorzystuje się gemcytabinę. Analizy bioinformatyczne wykazały, że gen *OXCT1* jest kluczowym czynnikiem prowadzącym do oporności na ten lek. Pacjenci z wysoką ekspresją *OXCT1* wykazują krótkie

przeżycie wolne od nawrotów po leczeniu gemcytabiną, zaś obniżenie poziomu *OXCT1* daje odwrotny skutek [Ding et al., 2021]. Z kolei badania przeprowadzone na kostniakomięśaku wykazały, że zaindukowanie oporności na ifosfamid powoduje supresję *OXCT1*. Powszechnie, gen *OXCT1* w kostniakomięśaku jest nie tylko wysoce ekspresyjny, ale także zachodzące w jego obrębie delecje są zjawiskiem charakterystycznym dla tego typu nowotworu [de Oliveira Rodrigues et al., 2022].

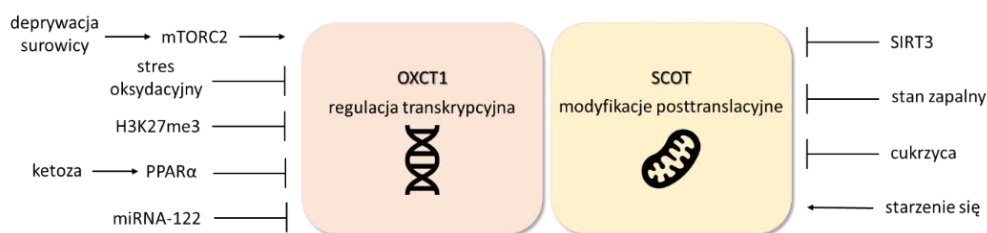
Analizy ekspresji *OXCT1* na poziomie transkrypcyjnym wykazały, że wspomniany gen jest zdecydowanie najbardziej ekspresyjny w komórkach raka szyjki macicy, co może mieć związek z wysokim stopniem złośliwości tego typu nowotworu [dane The Human Protein Atlas, 2023]. Równie zauważalny jest wysoki poziom ekspresji *OXCT1* w przerzutujących nowotworach okrężnicy [Lee et al., 2016], a także prostaty [Saraon et al., 2013]. Ponadto, badania wykazały, że nadekspresja genu *OXCT1* w komórkach raka piersi jest istotnym czynnikiem promującym wzrost guza i przerzutowanie do płuc. Z tego powodu *OXCT1* – podobnie jak geny kodujące ACAT1 [Ozsvari et al., 2017], HMGCS2 i BDH1 – został nazwany przez niektórych badaczy „metabolicznym onkogenem” [Martinez-Outschoorn et al., 2012]. Powyższe obserwacje sugerują, iż gen *OXCT1* może być potencjalnym markerem późnych stadiów nowotworów.

Podczas ekspresji genu *OXCT1* dochodzi do utworzenia kolistego RNA (circRNA) stanowiącego matrycę dla białka SCOT (circ-*OXCT1*). Ogólnie, circRNA działa jako regulator transkrypcji, grając istotną rolę w procesie nowotworzenia i służąc jako potencjalny biomarker [Zhang et al., 2021], [Zeng et al., 2021]. Jest to stabilna i licznie występująca forma RNA, generowana przez pre-mRNA w wyniku splicingu wstecznego [Chen et al., 2023], [Zeng et al., 2021]. W modelu ludzkim została odkryta po raz pierwszy w komórkach raka szyjki macicy HeLa [Hsu et al., 1979].

Badania skupione na circ-*OXCT1* wykazały jego plejotropowe działanie. W raku żołądka, wykazano, że obniżony poziom circ-*OXCT1* stanowi wskaźnik złej prognozy, będąc mocno skorelowanym z przerzutowaniem do węzłów chłonnych. Nadekspresja circ-*OXCT1*, natomiast, znacznie zahamowała migrację komórek, choć nie powstrzymała ich proliferacji [Liu et al., 2020]. W przypadku niedrobnokomórkowego raka płuc, obniżenie poziomu circ-*OXCT1* hamowało zarówno migrację, jak i proliferację komórek, przy jednoczesnym promowaniu apoptozy *in vitro*. Jednakże, w badaniach *in vivo*, wyciszenie circ-*OXCT1* całkowicie powstrzymało tworzenie się guza [Luo et al., 2023].

Ekspresja genu *OXCT1* stabilizowana jest podczas regulacji transkrypcyjnej, natomiast aktywność SCOT – podczas modyfikacji potranslacyjnych. Do modulatorów *OXCT1* należy surowica (głodzenie komórek w hodowli *in vitro* poprzez deprywację surowicy wpływa na mTORC2 – kompleks białkowy działający jako sensor energetyczny kontrolujący syntezę białek), stres oksydacyjny, stan ketozy, modyfikacje histonów (głównie H3K27me3) oraz miRNA-122. Z kolei, do modulatorów aktywności SCOT należy SIRT3. Zmiany aktywności SCOT

obserwowano pod wpływem stanu zapalnego, m.in. w przebiegu cukrzycy, a także – wraz z wiekiem – w procesie starzenia się [Hwang et al., 2022] (**Ryc. 8**).



Rycina 8. Regulacja ekspresji *OXCT1* i aktywności *SCOT*.

Objaśnienie skrótów: *H3K27me3*, trimetylowana lizyna 27 histonu 3; *mTORC2*, kompleks białkowy utworzony przez kinazę serynowo-treoninową; *PPARα*, receptor aktywowany przez proliferatory peroksisomów α; *SCOT*, transferaza bursztynilo-CoA:3-ketokwas-CoA; *SIRT3*, sirtuina 3

W komórkach raka wątrobowo-komórkowego HepG2, Hep3B, PLC, HEK293, THLE-3 i HEK293T głodzenie surowicą zwiększa ekspresję genu *OXCT1* poprzez aktywację szlaku mTORC1 [Huang et al., 2016]. Trwała ketoza zapobiega zużyciu ciał ketonowych przez supresję mRNA *OXCT1* w sercu i mięśniach, prawdopodobnie dzięki receptorowi aktywowanemu przez proliferatory peroksisomów α (*PPARα*, ang. *peroxisome proliferator-activated receptor α*) [Wentz et al., 2010], [Puchalska et al., 2017]. W innych badaniach wykazano, że ekspresja mRNA *OXCT1* i białka *SCOT* jest obniżona w niewydolnym mięśniu sercowym i kardiomiocytach na skutek stresu oksydacyjnego [Nagao et al., 2016]. Co więcej, stwierdzono, że *SCOT* jest hiperacetylowany w mózgu myszy z nokautem genu *SIRT3*, przyczyniając się do zmniejszonej zdolności ketolitycznej białka [Dittenhafer-Reed et al., 2015], [Puchalska et al., 2021].

Obniżona, a nawet całkowicie wyciszona ekspresja *SCOT* związana jest z jednostką chorobową zwaną niedoborem *SCOT*. Niedobór *SCOT* jest rzadką dziedziczną chorobą metaboliczną, upośledzającą zdolność organizmu do rozkładu ciał ketonowych na skutek zmian w obrębie genu *OXCT1*. Choroba ta dziedziczona jest w sposób autosomalny recesywny [Alghamdi et al., 2021], występując u mniej niż 1 osoby na milion [dane Orphanet, 2023]. Jednym z głównych objawów tego zaburzenia jest kwasica ketonowa charakteryzująca się problemami z oddychaniem, brakiem apetytu, wymiotami i letargiem. W niektórych przypadkach, kwasica ketonowa może prowadzić do utraty przytomności, a nawet śpiączki. Pomędzy epizodami chorobowymi, cierpiący na niedobór *SCOT* mogą nie doświadczać żadnych objawów [dane Genetic and Rare Diseases Information Center, 2023]. Większość opisanych przypadków pacjentów zmagających się z niedoborem *SCOT* to dzieci w okresie niemowlęctwa. Zaburzenie to nie jest wykrywane w trakcie badań przesiewowych u noworodków, gdyż odbiegające od normy wyniki laboratoryjne nie wskazują jednoznacznie na problem o podłożu genetycznym. Dopiero wysoki poziom ciał ketonowych we krwi i moczu może stanowić przesłankę do dalszej diagnostyki pod kątem niedoboru *SCOT*. Późniejsze

objawy, takie jak epizodyczna kwasica ketonowa lub wysoka luka anionowa kwasicy metabolicznej u niemowląt mogą być dodatkowymi wskazówkami do rozpoznania dziedzicznego zaburzenia metabolizmu ciał ketonowych [Kim et al., 2019].

U pacjentów z ostrymi epizodami kwasicy ketonowej zaleca się podawanie glukozy w ilości wystarczającej do zahamowania ketogenezy. Gdy stan pacjentów jest stabilny, zaleca się unikanie długotrwałego postu, nadmiernego spożycia tłuszczów i łagodne ograniczenie spożycia białka (2 g/kg/dzień), a także suplementowanie karnityny (100 mg/kg/dzień) [Fukao et al., 2014], [Kim et al., 2019]. Ponadto, niezbędne jest systematyczne wykonywanie testu paskowego w celu monitorowania poziomu ketonów, aby móc zapobiec zagrażającemu życiu stanowi.

Dotychczas opisano co najmniej 40 różnych mutacji nonsensownych w obrębie genu *OXCT1* odpowiadające za upośledzenie produkcji SCOT [Grünert et al., 2021], [dane The Human Gene Mutation Database, 2023]. Obecnie na rynku są już dostępne testy diagnostyczne, umożliwiające zidentyfikowanie potencjalnej podstawy genetycznej choroby. Wspomniany test może informować o rokowaniu lub być wykorzystany do badań przesiewowych pacjentów zdrowych (w tym członków rodziny) pod kątem zwiększonego genetycznego ryzyka niedoboru SCOT. Niemniej, w przypadku chorób nowotworowych zastosowanie genu *OXCT1* jako swoistego narzędzia diagnostycznego, a także jego potencjał jako nowego celu terapeutycznego wciąż stoją pod znakiem zapytania.

2. CELE PRACY

Głównym celem pracy doktorskiej było sprawdzenie roli genu *OXCT1* i produkowanego przez niego białka – SCOT – w regulacji potencjału metastatycznego komórek raka szyjki macicy HeLa.

Cele szczegółowe pracy doktorskiej:

- Scharakteryzowanie komórek HeLa z wyciszoną monoallelicznie i biallelicznie ekspresją i nadekspresją genu *OXCT1* w aspekcie potencjału proliferacyjnego, zdolności migracyjnych i inwazyjnych oraz przejścia epitelialno-mezenchymalnego;
- Podjęcie próby przestawienia komórek HeLa na wykorzystywanie ciał ketonowych (β -hydroksymaślanu i acetoctanu) zamiast glukozy jako źródła energii oraz analiza wpływu ciał ketonowych na komórki HeLa w zmiennych warunkach glikemicznych;
- Analiza wpływu ciał ketonowych na wybrane modyfikacje potranslacyjne komórek HeLa.

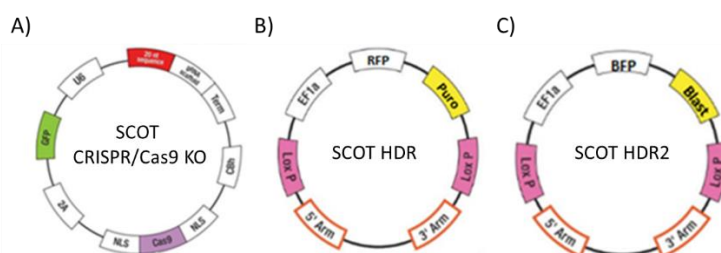
3. PRZYGOTOWANIE MODELI BADAWCZYCH

Badania prowadzono na trzech modelach badawczych: komórkach HeLa z (1) wyciszoną monoallelicznie i biallelicznie ekspresją genu *OXCT1* i (2) nadekspresją genu *OXCT1* oraz (3) na komórkach HeLa hodowanych w zmiennych warunkach glikemicznych.

Komórki HeLa z wyciszoną monoallelicznie i biallelicznie ekspresją genu *OXCT1* i nadekspresją genu *OXCT1* zostały przygotowane przez mgr. Macieja Studziana (Katedra Biologii Nowotworów i Epigenetyki, UŁ), a prezentowane wyniki są częścią manuskryptu przygotowywanego do publikacji. Umieszczenie procedury przygotowania transfektantów ma na celu ułatwienie dyskusji związanej z charakterystyką otrzymanych modeli badawczych.

3.1. Przygotowanie komórek HeLa z wyciszoną monoallelicznie i biallelicznie ekspresją genu *OXCT1* (HeLa *OXCT1* KO)

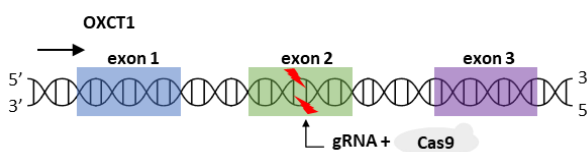
Do transfekcji komórek HeLa wykorzystano mieszankę 3 plazmidów SCOT CRISPR/Cas9 KO (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA; **Ryc. 9A**) kodujących nukleazę Cas9 (ang. *caspase 9*) i miejscowo-specyficzny 20-nukleotydowy odcinek gRNA (ang. *guide RNA*). Ponadto, każdy z plazmidów posiadał region kodujący białko zielonej fluorescencji (GFP, ang. *green fluorescent protein*). Do ko-transfekcji użyto mieszanki 2-3 plazmidów SCOT HDR (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA; **Ryc. 9B**) posiadających matrycę do naprawy DNA na drodze homologii (HDR, ang. *homology-directed repair*), odpowiadającej miejscom cięcia stworzonym przez plazmidy SCOT CRISPR/Cas9 KO. Każda matryca HDR posiadała dwa ramiona homologiczne o długości 800 par zasad, zaprojektowane do łączenia się w sposób specyficzny z genomowym DNA otaczającym odpowiednie miejsce pęknięcia podwójnej nici DNA zaindukowane przez Cas9. Plazmidy naprawcze HDR posiadały również sekwencje kodujące białko czerwonej fluorescencji (RFP, ang. *red fluorescent protein*) oraz gen oporności na puromycynę.



Rycina 9. Plazmidy wykorzystane do przeprowadzenia wyciszenia genu *OXCT1* metodą CRISPR/Cas9. (A) Mieszanka 3 plazmidów SCOT CRISPR/Cas9 KO zawierających sekwencję kodującą nukleazę Cas9, odcinek gRNA oraz białko GFP. **(B)** Mieszanka plazmidów SCOT HDR zawierających matrycę do naprawy DNA na drodze homologii oraz gen oporności na puromycynę i białko RFP. **(C)** Zmodyfikowany plazmid SCOT HDR – nazwany SCOT HDR2 – zawierający gen oporności na blastycydynę i białko BFP.

Do przeprowadzenia wyciszenia (KO, ang. *knock-out*) *OXCT1* w komórkach HeLa, kasetka z sekwencją kodującą Cas9 została wprowadzona do egzonu 2 genu *OXCT1* (**Ryc. 10**), a cięcie restrykcyjne nastąpiło na miejscu 5' sekwencji docelowej. Zastosowanie testu Surveyor

(Integrated DNA Technologies, Inc.) potwierdziło, że wszystkie mutacje wystąpiły dokładnie w egzonie 2 sekwencji *OXCT1*.



Rycina 10. Schematyczne przedstawienie fragmentu genu *OXCT1* wskazujące na miejsce wprowadzenia kasyety Cas9.

W celu uzyskania stabilnych klonów, przez 10 dni prowadzono selekcję antybiotykową puromycyną (10 µg/ml). Podłoże hodowlane zmieniano co 2-3 dni. Metodą klonowania przez rozcieńczanie graniczne (ang. *cloning by limiting dilution method*) uzyskano komórki wywodzące się z jednego klonu. Wybrane kolonie poddano analizie przerywania ciągłości sekwencji kodującej genu *OXCT1*. Oprócz poziomu ekspresji *OXCT1* zbadanego metodą qPCR, zaprojektowano zestaw diagnostycznych starterów PCR (*OXCT1_ex2_for* i *OXCT1_intr2_rev*; **Tab. 3**) do amplifikacji fragmentu genomowego DNA wokół miejsca docelowego cięcia CRISPR w egzonie 2 genu *OXCT1*. Dodatkowo, starter specyficzny dla integracji RFP w kasecie HDR (*RFP_rev*) został użyty razem ze starterem *OXCT1_ex2_for*, aby przetestować integrację kasyety z locus genu *OXCT1* (**Ryc. 11A**). Początkowo, we wszystkich otrzymanych komórkach wywodzących się z jednego klonu, kaseca oporności antybiotykowej została zintegrowana z genem *OXCT1* w tylko jednym allelu. Mimo to, przerywanie ciągłości genu doprowadziło do znacznego obniżenia poziomu ekspresji *OXCT1* (**Ryc. 13**).

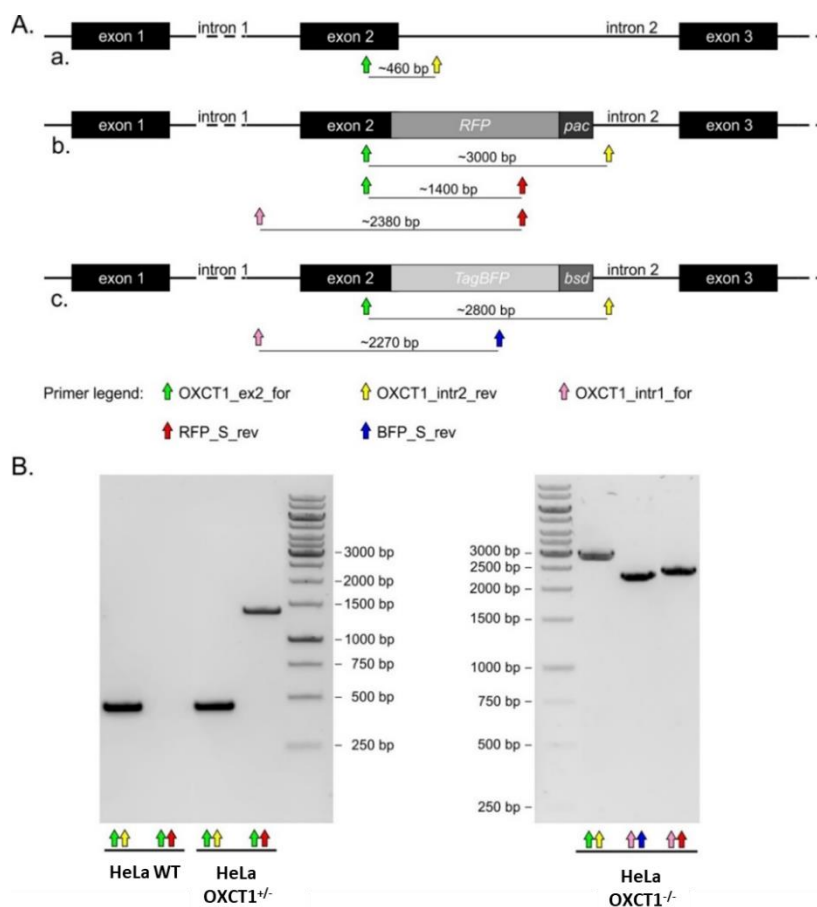
Tabela 3. Sekwencje starterów wykorzystanych w celu diagnostyki i analizy qPCR.

Nazwa starteru	Sekwencja starteru (5'→3')
<i>OXCT1_intr1_for</i>	AGGACTTGACACATGGTGGG
<i>OXCT1_intr2_rev</i>	ACGGGGTCTCTGAAGGTGTA
<i>OXCT1_ex2_for</i>	GTGCTCATCGCCATACCAAGT
<i>RFP_S_rev</i>	CCAGTCTGTGGTCCACGAAG
<i>BFP_S_rev</i>	TTCAGGGCCATGTCGTTTCT
<i>HPRT1_for</i>	TGACACTGGCAAAACAATGCA
<i>HPRT1_rev</i>	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
<i>OXCT1_qPCR_for</i>	ACGGTTTTGGTTGGTGGTTTT
<i>OXCT1_qPCR_rev</i>	GCGTTTTATCTGCTTGGACCG

W celu wymuszenia integracji biallelicznej, zmodyfikowano plazmid SCOT HDR (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA; **Ryc. 9C**). W obrębie kasyety integracyjnej, gen oporności na puromycynę został zamieniony na gen oporności na blastycydynę (zamplifikowano z plazmidu pcDNA6.2-DEST; Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), a gen RFP został zamieniony na gen TagBFP (zamplifikowano z plazmidu pTagBFP-actin; Evrogen, Moskwa, Rosja). Zmodyfikowany plazmid nazwano SCOT HDR2, a otrzymano go poprzez klonowanie niezależne od ligacji (metodą SLICE) przy użyciu wektora i fragmentów

wstawek otrzymanych przez amplifikację PCR z użyciem polimerazy o wysokiej wierności Phusion (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

W celu przygotowania komórek HeLa z biallelicznym wyciszeniem genu *OXCT1*, przeprowadzono przejściową ko-transfekcję komórek z mieszaniną plazmidów (Ryc. 9): SCOT CRISPR/Cas9 KO (powodujących dwuniciowe pęknięcia DNA w obrębie egzonu 2 genu *OXCT1*; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA), SCOT HDR (posiadającego gen oporności na puromycynę; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) i SCOT HDR2 (posiadającego gen oporności na blastycydynę). Obie kasety oporności na antybiotyki były otoczone tymi samymi ramionami sekwencji homologicznych dookoła miejsca docelowego CRISPR w egzonie 2 genu *OXCT1*, wymuszając integrację bialleliczną w komórkach opornych na te antybiotyki. Przez 10 dni prowadzono selekcję antybiotykową puromycyną (10 µg/ml) i blastycydyną (10 µg/ml). Metodą klonowania przez rozcieńczanie graniczne (ang. *cloning by limiting dilution method*) uzyskano komórki wywodzące się z jednego klonu. Następnie, tak jak w poprzednim wariantcie metody, wybrane kolonie poddano analizie przerywania ciągłości sekwencji kodującej genu *OXCT1*. Aby potwierdzić prawidłową insercję obu kaset HDR w obu allelach *OXCT1*, zbadano genomowe DNA przy użyciu starterów diagnostycznych (Tab. 3).



Rycina 11. Analiza integracji kaset oporności na antybiotyki w obrębie genu *OXCT1* w komórkach HeLa. (A) Schematyczne przedstawienie sekwencji genomowych loci genu *OXCT1* w niemodyfikowanych komórkach HeLa (a. oba allele), komórkach HeLa *OXCT1*^{+/-} (a. jeden allel, b. drugi allel) i komórkach HeLa *OXCT1*^{-/-} (b. jeden allel, c. drugi allel). (B) Wyniki diagnostycznej analizy PCR na matrycy genomowego DNA komórek HeLa. Startery wykorzystane do każdej amplifikacji zostały opisane w panelu (A).

Wybrano 3 klony komórek HeLa z monoallelicznie wyciszoną ekspresją genu *OXCT1* i 2 klony komórek HeLa z biallelicznie wyciszoną ekspresją genu *OXCT1*. W obrębie swoich grup tempo wzrostu klonów było identyczne, tzn. komórki HeLa *OXCT1*^{+/-} dzieliły się wolniej od komórek HeLa WT, a komórki HeLa *OXCT1*^{-/-} dzieliły się szybciej względem komórek HeLa WT. Do dalszych badań wybrano po 1 klonie z obu wariantów komórek HeLa.

Zestaw komórek HeLa analizowanych pod względem wpływu wyciszenia genu *OXCT1* został nazwany HeLa *OXCT1* KO i obejmował komórki HeLa WT (ang. *wild-type*; stosowane jako kontrola), HeLa *OXCT1*^{+/-} (komórki z monoallelicznym wyciszeniem genu *OXCT1*) i HeLa *OXCT1*^{-/-} (komórki z biallelicznym wyciszeniem genu *OXCT1*).

3.2. Przygotowanie komórek HeLa z nadekspresją genu *OXCT1* (HeLa *OXCT1* OX)

Sekwencję kodującą izoformy 1 genu *OXCT1* (GenBank ID: NG_011823.2) zamplifikowano za pomocą reakcji PCR przy użyciu polimerazy o wysokiej wierności Phusion (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Wektor ekspresyjny pIRES (Takara, Japonia) zlinearyzowano również za pomocą reakcji PCR, a następnie wprowadzono do niego zamplifikowaną sekwencję kodującą przez klonowanie niezależne od ligacji (metoda SLICE). Startery użyte do reakcji PCR przedstawiono w **Tabeli 4**. Otrzymany wektor pIRES_OXCT1 poddano analizie przez mapowanie restrykcyjne w celu potwierdzenia prawidłowej insercji pełnej długości sekwencji genu *OXCT1*.

Tabela 4. Sekwencje starterów wykorzystanych do klonowania.

Nazwa starteru	Sekwencja starteru (5' → 3')
pIRES-hyg_for	GCGGCCGCACTAGAGGAATTC
pIRES-hyg_rev	GGATCCGAGCTCGGTACC
OXCT1_cloning_for	ACCGAGCTCGGATCCATCGCCATGGCGGCTCTC
OXCT1_cloning_rev	CTCTAGTGGCGCCGCTCAATTTGCGATCTGCTGCATTG
HDR_vector_1_for	AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTG
HDR_vector_1_rev	AGGGCCGGGATTCTCCTC
blast_for	GAGAATCCCGCCCTATGGCCAAGCCTTTGTCTC
blast_rev	GTAATCCAGAGGTTGATTTTAGCCCTCCACACATAAC
HDR_vector_2_for	GAGGGCAGAGGAAGTCTTC
HDR_vector_2_rev	GGTGGCGTCTAGCGTAGG
BFP_for	ACGCTAGACGCCACCATGAGCGAGCTGATTAAGG
BFP_rev	ACTTCCTGCCCCTATTAAGCTTGTGCCCCAG

Transfekcję komórek HeLa z wektorami pIRES i pIRES_OXCT1 przeprowadzono za pomocą odczynnika Fugene HD (Promega, Madison, WI, USA) zgodnie z zaleceniami producenta. W celu uzyskania klonów stabilnie ekspresyjnych wprowadzoną kasetę z genem *OXCT1*, przez 10 dni prowadzono selekcję antybiotykową higromycyną (200 µg/ml). Podłoże hodowlane zmieniano co 2-3 dni. Stabilne komórki uległe transfekcji nazwano HeLa pIRES (kontrolne komórki odporne na higromycynę) i HeLa pIRES_OXCT1 (komórki odporne na

higromycynę i wykazujące nadekspresję genu *OXCT1*). Nadekspresja (OX, ang. *overexpression*) *OXCT1* została potwierdzona za pomocą RT-qPCR, immunofluorescencji oraz techniki Western blotting (**Ryc. 22**).

Zestaw komórek HeLa analizowanych pod względem wpływu nadekspresji genu *OXCT1* został nazwany HeLa *OXCT1 OX* i obejmował komórki HeLa pIRES (stosowane jako kontrola) oraz HeLa pIRES_*OXCT1* (komórki wykazujące nadekspresję genu *OXCT1*).

3.3. *Hodowla komórek HeLa w zmiennych warunkach glikemicznych*

Komórki HeLa hodowane były w podłożu hodowlanym DMEM z dodatkiem 10% surowicy płodów bydłych (FBS, ang. *fetal bovine serum*), 1% v/v roztworu penicyliny-streptomycyny i 5 mM L-glutaminy w warunkach wysokoglikemicznych (25 mM glukozy), niskoglikemicznych (1 mM) oraz całkowitej deprywacji glukozy (0 mM) z dodatkiem soli sodowej β -hydroksymaślanu (BHB; stężenie końcowe: 0,3 mM lub 10 mM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) lub soli sodowej acetoctanu (AcAc; 0,3 mM lub 3 mM; Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). Hodowla komórkowa prowadzona była w warunkach standardowych (37 °C, 5% CO₂).

Aby sprawdzić efektywność wyciszenia genu *OXCT1* w komórkach HeLa techniką CRISPR/Cas9, przeprowadzono analizy ekspresji *OXCT1* na poziomie transkryptu i białka (**Ryc. 13**). Poprzez subiektywną ocenę sygnału immunofluorescencji SCOT, dokonaną w oparciu o fotografie mikroskopowe (**Ryc. 13D**), oszacowano ekspresję tego białka na poziomie 5% na z uwagi na niewielką, lecz zauważalną, obecność poświaty przeciwciał identyfikujących SCOT. Zważywszy na fakt, iż wyciszenie genów uzyskiwane za pomocą takich technik jak siRNA lub shRNA nigdy nie jest w 100% efektywne, podjęto decyzję o przeprowadzeniu testu Surveyor, który wykazał integrację kasety oporności antybiotykowej z genem *OXCT1* w tylko 1 allelu (**Ryc. 11B**). Na podstawie tej obserwacji zdecydowano o wymuszeniu biallelicznego wyciszenia *OXCT1* w komórkach HeLa poprzez wykorzystanie kolejnego plazmidu – SCOT HDR2 (**Ryc. 9C**).

4. MATERIAŁ BIOLOGICZNY WYKORZYSTANY W BADANIACH

4.1. *Hodowla komórkowa*

Komórki raka szyjki macicy – HeLa – zakupione z kolekcji American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA) to powstałe na skutek transfekcji wirusem brodawczaka ludzkiego 18 (HPV18) komórki nabłonkowe, pobrane w 1951 roku od Henrietty Lacks (1920–1951). Swoją nazwę zawdzięczają dwóm pierwszym literom imienia i nazwiska pacjentki. Komórki HeLa uważane są za najstarszą i najczęściej wykorzystywaną do badań linię komórkową, zapoczątkowaną przez George'a Otto Gey'a – biologa komórkowego pracującego podczas hospitalizacji Lacks w The Johns Hopkins Hospital w Baltimore, Maryland, USA [dane The Embryo Project Encyclopedia, 2020].

Komórki hodowane były w wysokoglukozowym podłożu hodowlanym DMEM (Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Wrocław, Polska) suplementowanym 10% inaktywowaną termicznie płodową surowicą bydlęcą (FBS) (EurX, Gdańsk, Polska), 1% v/v roztworu penicyliny-streptomycyny (Gibco™, Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) i 10 mM L-glutaminą (Corning Life Sciences, NY, USA). Komórki były pasażowane co 3 dni w stosunku 1:9 za pomocą 0,25% roztworu trypsyna-EDTA z czerwienią fenolową (Gibco™, Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Ciała ketonowe pod postacią soli sodowej β -hydroksymaślanu (BHB; stężenie końcowe: 0,3 mM, 1 mM oraz 10 mM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) lub soli sodowej acetoctanu (AcAc; stężenie końcowe: 0,3 mM oraz 3 mM; Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) były dodawane do odpowiednich podłoży hodowlanych w zależności od przeprowadzanej analizy.

Hodowla komórkowa prowadzona była w warunkach standardowych (37 °C, 5% CO₂).

4.2. *Hodowla komórek bakteryjnych Escherichia coli*

Chemicznie kompetentne komórki pałeczki okrężnicy *Escherichia coli* szczep TOP 10 (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) hodowane były w podłożu hodowlanym LB (10 g/l peptonu, 5 g/l ekstraktu drożdżowego, 5 g/l NaCl) w temperaturze 37 °C. Wykorzystane zostały w celu przeprowadzenia transfekcji komórek HeLa metodą SLICE [Zhang et al., 2014].

5. METODY BADAWCZE ZASTOSOWANE W PRACY

5.1. Ocena szybkości proliferacji komórek testem redukcji resazuryny

Szybkość podziału komórek oceniano testem redukcji resazuryny. Komórki były wysiewane w gęstości 500 komórek/dołek płytki 96-dołkowej. Inkubacja prowadzona była w standardowych warunkach hodowli przez 24, 48, 72 i 96 godzin. Roztwór soli sodowej resazuryny (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) był dodawany do każdego dołka do końcowego stężenia 0,0125 mg/ml. Fluorescencja była mierzona w odstępach czasowych (0, 30, 60, 90 i 120 minut) przy długościach fali $\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$ korzystając z czytnika Fluoroscan Ascent Microplate Reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Wyniki przedstawiono jako procent kontroli (24 godzina pomiaru) uśrednionych wartości nachylenia wykresu regresji liniowej fluorescencji.

5.2. Ocena wrażliwości komórek na wybrane cytostatyki testem MTT

Cytotoksyczność dokсорubicyny, cisplatyny, wodoronadtlenku tert-butyłu (t-BOOH) oraz nadtlenku wodoru (H_2O_2) na komórki oceniano za pomocą testu MTT. Komórki wysiewano w gęstości 1000 komórek/dołek na płytce 96-dołkowej. Po 24-godzinnej inkubacji komórek w standardowych warunkach hodowlanych, dodawano cytostatyki w wybranych zakresach stężeń (dokсорubicyna: 5-500 nM; cisplatyna: 0,05-10 μM ; H_2O_2 : 0,5-30 μM ; t-BOOH: 0,1-20 μM). Komórki były inkubowane z badanymi związkami przez 72 godziny. Po tym czasie, do podłoża dodawano roztwór MTT (końcowe stężenie: 333 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; MedChemExpress, NJ, US) i kontynuowano inkubację w warunkach hodowlanych przez kolejne 2 godziny. Następnie, roztwór nad komórkami usuwano i dodawano DMSO w celu rozpuszczenia fioletowych kryształów formazanu. Odczyt absorbancji wykonywano przy długości fali $\lambda = 570 \text{ nm}$ na spektrofotometrze BioTek Eon™ Microplate Spectrophotometer (Winooski, VT, USA) korzystając z programu Gen5 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Wyniki pomiaru absorbancji zostały uśrednione i przedstawione jako procent kontroli.

5.3. Analiza cyklu komórkowego techniką cytometrii przepływowej (FACS)

Zdolności proliferacyjne komórek oceniano dokonując analizy rozkładu faz cyklu komórkowego techniką cytometrii przepływowej. Komórki były utrwalane w 70% etanolu i inkubowane przez 24 godziny w 4 °C. Następnego dnia, zawiesina komórek była odwirowywana (10 000 obr/min, 7 minut), a osad był ponownie zawieszany w roztworze PBS. Przed analizą cytometryczną, zawiesina komórek w roztworze była inkubowana przez 30 minut w 37°C z RNAzą A (końcowe stężenie: 0,1 mg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) i jodkiem propidyny (końcowe stężenie: 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Gibco™ Invitrogen™, Merelbeke, Belgia). Zawartość jądrowego DNA była mierzona za pomocą cytometru przepływowego LSRII i oprogramowania FACS Diva Software 6.2 (Becton Dickinson, NJ, USA).

Otrzymane dane poddano analizie za pomocą oprogramowania FlowJo Single Cell Analysis Software 10 (Becton Dickinson, NJ, USA). Do identyfikacji subpopulacji komórek

w różnych fazach cyklu komórkowego wykorzystano przednie (FSC) i boczne kanały rozpraszające (SSC). W pierwszym etapie analizy usunięto zanieczyszczenia, wykonując wykres SSC-A względem FSC-A. Następnie użyto wykresu FSC-H względem FSC-A, aby wykluczyć skupiska i dublety komórek. Aby pozbyć się pozostałości komórek i niektórych komórek apoptotycznych, użyto wykresu SSC-H względem SSC-A. W ostatnim etapie „zbramkowano” komórki zabarwione jodkiem propidyny (PE-A względem PE-W). Końcowy wykres histogramu został wygenerowany przy użyciu Count względem PE-A. Bramkowanie komórek zostało zweryfikowane w próbce kontrolnej, a przyjęte parametry bramkowania zastosowano do innych próbek. Dalsza analiza identyfikacji subpopulacji komórek w różnych fazach cyklu komórkowego została przeprowadzona za pomocą algorytmu matematycznego i oprogramowania Flow Jo (FlowJo, Williamson Way Ashland, USA), który dopasowuje krzywe Gaussa do każdej z faz cyklu.

5.4. Immunofluorescencyjna analiza cyklu komórkowego

Oznaczenie ilościowe komórek w trakcie mitozy określono przez barwienie kontrastowe 4',6-diamidyno-2-fenyloindolem (DAPI; końcowe stężenie: 1 mg/ml; Sigma-Aldrich, Saint Quentin, Francja) przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Komórki w fazie M obserwowano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego wyposażonego w filtr UV-2A (światło UV; długość fali $\lambda = 518$ nm) oraz kamerę CCD AxioCam MRc5 (Carl Zeiss AG, Jena, Niemcy). Indeks mitotyczny obliczono jako procentowy stosunek liczby dzielących się komórek do całej populacji.

5.5. Immunocytofluorescencyjna analiza antygenów związanych z cyklem komórkowym

Oceny proliferacji komórek dokonywano poprzez detekcję całkowitej i ufosforylowanej formy Chk1 i Chk2 (Chk1/Chk1 S317ph i Chk2/Chk2 S345ph), a także ATR i ATRIP oraz ufosforylowanego H2AX (H2AX S139ph). Komórki wysiewano na płytkach 8-dołkowych zawierających szkiełka nakrywkowe. Utrwalanie prowadzono przez 45 minut za pomocą 4% paraformaldehydu buforowanego PBS. Komórki wstępnie traktowano buforem blokującym (10% surowica końska, 1% albumina surowicy bydlęcej (BSA), 0,02% NaN_3 , 1X PBS) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej w celu zminimalizowania niespecyficznego adsorpcji przeciwciał do szkiełek. Następnie, komórki inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi przez noc w 4°C. Komórki przepłukiwano 3-krotnie PBT (PBS, 0,2% Triton X-100). Inkubację z przeciwciałami drugorzędowymi prowadzono przez 1 godzinę w 37°C w ciemności. Komórki ponownie przepłukiwano 3-krotnie w PBT, a następnie w PBS. Dodawano podłoża Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) zawierającego 4',6-diamidyno-2-fenyloindol (DAPI). Obserwacji mikroskopowych dokonywano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego AxioImager A1 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Niemcy) wyposażonego w filtr DAPI, białko zielonej fluorescencji

(GFP) i tetrametyloindo(di)-karbocyjaninę 3 (Cy3). Zdjęcia mikroskopowe były wykonywane korzystając z kamery AxioCam MRc5 CCD (Carl Zeiss, Oberkochen, Niemcy).

5.6. *Barwienie immunofluorescencyjne*

Komórki wysiewano w gęstości 1×10^4 komórek/dołek na płytce 96-dołkowej o cienkim dnie. Po 24 godzinach, komórki przemywano PBS i utrwalano w 4% formaldehydzie przez 15 minut. Następnie, komórki ponownie przemywano PBS i inkubowano przez 1 godzinę w buforze blokującym (10% surowica kozia, 0,1% Triton X-100, PBS o pH 7,4). Dalej, komórki inkubowano przez 1 godzinę z przeciwciałami pierwszorzędowymi. Komórki przemywano 3-krotnie buforem blokującym i inkubowano przez 1 godzinę z przeciwciałami drugorzędowymi. Po inkubacji, komórki ponownie przemywano 3-krotnie buforem blokującym, a jądra komórkowe wybarwiano kontrastowo barwnikiem $5 \mu\text{M}$ Hoechst 33342. Zdjęcia wykonywano na mikroskopie konfokalnym 780 LSM (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Niemcy) z obiektywem Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC M27 za pomocą oprogramowania ZEN2012 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Niemcy).

5.7. *Ocena zdolności do tworzenia sferoidów techniką wiszącej kropli*

Zdolność komórek do tworzenia struktur 3D (sferoidów) oceniano metodą wiszącej kropli. W pierwszym etapie przygotowano zawiesinę komórek (1×10^4 komórek/30 μl równe 1 kropli), z której nanoszono po 16 kropel na wieczko szalki o średnicy 10 cm. Dno szalki wypełniano roztworem PBS, aby zapobiec parowaniu. Komórki inkubowano w standardowych warunkach hodowlanych przez 7 dni. Po tym czasie dokonywano obserwacji mikroskopowych i pomiaru średnicy sferoidów korzystając z mikroskopu Nikon Eclipse TE200 (Minato, Japonia) za pomocą oprogramowania ZEN 3.3 software (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Niemcy).

5.8. *Analiza potencjału migracyjnego i inwazyjnego*

Potencjał migracyjny i inwazyjny komórek oceniano za pomocą testu migracji i inwazji przeprowadzanej w komorach Boydena (SPLInsert™ Hanging, SPL Life Sciences, Pochon, Kyonggi-do, Korea Południowa) zawierających membrany polikarbonowe. Dołek płytki 24-dołkowej pokrywano 0,4 ml podłoża hodowlanego DMEM z dodatkiem: kolagenu I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; *test migracji*) lub 20% FBS (EurX, Gdańsk, Polska; *test inwazji*) jako chemoatraktant. Komórki były zawieszane w DMEM bez dodatku surowicy i nanoszone na nieopłaszczoną komorę Boydena (1×10^6 komórek; *test migracji*) lub komorę Boydena opłaszczoną wcześniej warstwą preparatu Matrigel® (Corning Life Sciences, NY, USA; *test inwazji*). W tak stworzonych warunkach komórki inkubowano przez 8 godzin (*test migracji*) lub 10 godzin (*test inwazji*). Następnie, górną powierzchnię membrany przecierano aplikatorem z bawełnianą końcówką, aby usunąć wszelkie komórki, które nie uległy migracji. Utrwalanie komórek uległych migracji prowadzono przez 20 minut za pomocą 4% paraformaldehydu. Barwienie trwało 15 minut korzystając z 1% fioletu krystalicznego. Komórki uległe migracji fotografowano na mikroskopie Leica DM2000LED (Wetzlar, Niemcy)

przy powiększeniu 200x i każdorazowo zliczano z pięciu pól widzenia za pomocą oprogramowania ImageJ (National Institutes of Health, Laboratory for Optical and Computational Instrumentation, University of Wisconsin; USA).

5.9. Ocena zdolności do tworzenia kolonii testem klonogennym

Zdolność komórek do tworzenia kolonii oceniano testem klonogennym. Komórki wysiewano na płytkę 6-dołkową w gęstości 300 komórek/dołek i inkubowano przez 1 tydzień. W tym czasie podłoże hodowlane zmieniano co 2-3 dni. Po 1 tygodniu, podłoże usuwano, a komórki przepłukiwano roztworem PBS i dokonywano ich utrwalenia przy użyciu 100% metanolu. Po 10 minutach inkubacji w metanolu, komórki ponownie przepłukiwano PBS, a następnie barwiono używając 0,5% roztworu fioletu krystalicznego (inkubacja: 15 minut w temperaturze pokojowej). Komórki przepłukiwano 3-krotnie PBS. Zliczenia kolonii dokonywano na mikroskopie Nikon Eclipse TE200 (Minato, Japonia) za pomocą oprogramowania ZEN 3.3 software (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Niemcy). Obliczano wartość CFE (ang. *colony forming efficiency*) jako procent liczby utworzonych kolonii w stosunku do liczby komórek wysianych, zgodnie ze wzorem: $CFE (\%) = (\text{kolonie zliczone} / \text{komórki wysiane}) \times 100$.

5.10. Izolacja RNA, synteza cDNA, Real-Time PCR

5.10.1. Izolacja RNA i synteza cDNA

Całkowite RNA było izolowane i oczyszczane za pomocą zestawu Total RNA Mini (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska) zgodnie z protokołem producenta. Do izolacji i oczyszczania RNA były wykorzystywane załączone do zestawu minikolumny. Liza komórek przeprowadzana była za pomocą fenozolu – mieszaniny soli chaotropowych oraz fenolu. Do otrzymanego lizatu dodawany był chloroform. Następnie, po rozdziale frakcji, zbierano górną frakcję i dodawano do niej izopropanol. Roztwór elucyjny stanowiła ultraczysta woda.

Synteza cDNA była przeprowadzana za pomocą PrimeScript™ RT Reagent Kit (Perfect Real Time, Takara, Japonia) zgodnie z instrukcją załączoną do produktu.

5.10.2. Real-time PCR

Analiza ekspresji genów na poziomie transkrypty była oceniana techniką PCR w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR) na Eco Real-Time PCR (Illumina; San Diego, CA, USA). Końcowa objętość reakcji (10 µl) obejmowała 0,2 nM startery 5' → 3' (Genomed, Łódź, Polska), matrycę cDNA, SYBR Green (Perfect Real Time, Takara, Japonia) oraz wodę wolną od DNaz i RNaz (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Profil temperaturowy reakcji: etap początkowy w temperaturze 95°C przez 30 sekund, następnie 40 cykli w temperaturze 95°C przez 5 sekund, 60°C przez 15 sekund.

W celu normalizacji ekspresji genów na poziomie transkrypcyjnym, gen metabolizmu podstawowego (HPRT1) został wykorzystywany jako referencyjny, a obliczeń dokonywano metodą Livaka ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Tabela 5. Sekwencje starterów wykorzystanych w badaniach.

Gen	Sekwencja starteru 1 (5' → 3')	Sekwencja starteru 2 (5' → 3')
HPRT1	AGCCCTGGCGTCGTGATTAG	AGCCCTGGCGTCGTGATTAG
p21	CCAGACCAGCATGACAGATTC	GCTTCCTCTTGGAGCAGATCAG
p53	TCTGGGACTTAGTGCCTTTATGG	CAGTCAGAAACTGTCAAATCACCA
CCNA	ATCAACCCGGAAAAGGCAGC	GTGCAACCCGTCTCGTCTTC
CCNB	ACCTGTGTCAGGCTTCTCTG	ACTGCTTGCTCTTCTCAAGT
CCND	GACCGGTGCTGCGG	GTTCTCGCAGACCTCCAG
CCNE	TGGCGTTAAGTCCCCTGAC	ACAGAGATCCAACAGCTCTGC
CCNY	GTTTCATCACGGCCCTCTC	GCGTTTTTCTCTCACGTCCG
OXCT1	GCTTTGGTGAAAGCCTGGAAGG	GCTTTGGTGAAAGCCTGGAAGG
OXCT2	ACCGCATCATCACCGAGAAG	TTGATGTCGTCCACCGTCAG
BDH1	CTGCCAGCTAAGAACCACCG	TGGGCGTCTTGCTCCATTTT
BDH2	TTCCAGCGTCAAAGGAGTTGT	TTCCTGGGCACACACAGTTG
SNAI1	CTATGCCGCGCTCTTCTCTC	GCTGCTGGAAGGTAACCTCTGGA
SNAI2	CGAACTGGACACACATACAGTGAT	ACAGTGATGGGGCTGTATGC
CDH1	ATGCTGATGCCCCCAATACC	CCTCAAAATCCAAGCCCTTGC
CDH2	GCGTCTGTAGAGGCTTCTGG	TGCAGTTGCTAAACTTCACATTGAG
VIM	AGGCGAGGAGAGCAGGATTT	GGGTATCAACCAGAGGGAGTGA
MUC1	CTCACAGTGCTTACAGTTGTTACG	TTCTCAGTAGAGCTGGGCACT

5.11. Analiza poziomu białek techniką Western blotting

5.11.1. Przygotowanie całkowitych lizatów komórkowych

Komórki były wysiewane w odpowiedniej gęstości na szalkach o średnicy 6 cm. Inkubacja prowadzona była w standardowych warunkach hodowli. Całkowite ekstrakty komórkowe przygotowywano za pomocą odczynnika M-PER (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) oraz inhibitorów proteaz Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100X) (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) postępując zgodnie z instrukcją producenta.

5.11.2. Izolacja frakcji białek kwasorozpuszczalnych metodą kwasowej ekstrakcji

Komórki były wysiewane w gęstości 5 milionów na szalkach o średnicy 10 cm. Inkubacja prowadzona była w standardowych warunkach hodowli. Frakcję białek kwasorozpuszczalnych uzyskiwano za pomocą buforu ekstrakcyjnego (1 M HEPES, 1 M MgCl₂, 3 M KCl, 1 M DTT, 0,5 M PMSF) z dodatkiem 18 M H₂SO₄. Dalej, inkubowano ekstrakty z dodatkiem acetonu przez 2 godziny w temperaturze -20 °C. Otrzymany osad zawieszano w buforze o składzie: 20 mM Tris o pH 8,0, 100 mM KCl, 0,1% Tween 20, 10% C₂H₅NO₂, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 0,2 mM EDTA.

5.11.3. Oznaczenie stężenia białka

Białka oznaczano ilościowo stosując odczynnik Pierce™ 660 nm Protein Assay Reagent (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Pomiaru absorbancji przy długości fali λ = 660 nm dokonywano na spektrofotometrze BioTek Eon™ Microplate Spectrophotometer

(Winooski, VT, USA) korzystając z programu Gen5 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

5.11.4. Przygotowanie prób

Próbki do analizy przygotowywane były poprzez zmieszanie ekstraktów z roztworem obciążającym (1X buforem Laemmli'ego; Bio-Rad, Hercules, CA, USA; z dodatkiem β -merkaptopoetanolu w stosunku 1:9) i ogrzewane przez 5 minut w 85 °C w termobloku.

5.11.5. Elektroforeza i transfer białek na membranę

Przygotowane próbki naniesiono na żel poliakryloamidowy (3% żel zagęszczający: 30% roztwór akrylamid:N,N-metylenobisakrylamid (37,5:1), 0,5 M bufor Tris-HCl o pH 6,8, 10% SDS, 10% APS, TEMED; 10% żel rozdzielający: 30% roztwór akrylamid:N,N-metylenobisakrylamid (37,5:1), 1,12 M bufor Tris-HCl o pH 8,8, 10% SDS, 10% APS, TEMED) wraz ze standardem mas (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Etap rozdziału białek (SDS-PAGE) przeprowadzano w 1X buforze elektrodowym (250 mM Tris, 1,92 M $C_2H_5NO_2$, 10% SDS) w warunkach: 120 V przez 1,5 godziny.

Transfer białek na membranę PVDF (Merck, Rahway, NJ, USA) odbywał się w buforze do transferu (250 mM Tris, 1,92 M $C_2H_5NO_2$, 20% v/v CH_3OH) w warunkach: 370 mA przez 1,5 godziny.

5.11.6. Inkubacja membran z przeciwciałami

Membrany przepłukiwano 3-krotnie 1X buforem TBST (1 M Tris, 3 M NaCl, pH 7,9, 0,5% Tween 20), a następnie inkubowano w 5% beztłuszczowym mleku w 1X buforze TBST przez 1 godzinę. Inkubację z przeciwciałami pierwszorzędowymi przeprowadzano przez noc w 4°C na kołysce laboratoryjnej. Następnego dnia, po 3-krotnym przepłukaniu membran 1X buforem TBST, przeprowadzano 2-godzinną inkubację membran z przeciwciałami drugorzędowymi skonjugowanymi z peroksydazą chrzanową. Jako kontrola używano przeciwciał skierowanych przeciwko β -aktynie (dla całkowitych lizatów komórkowych) lub przeciwko całkowitemu histonowi H3 (dla frakcji białek kwasorozpuszczalnych).

5.11.7. Detekcja białek

Sygnal był wizualizowany chemiluminescencyjnie za pomocą SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) na chemiluminometrze Azure 300 (Azure Biosystems, Dublin, CA, USA). W celu normalizacji sygnału ekspresji na poziomie białka, przeprowadzano densytometrię korzystając z programu ImageJ (National Institutes of Health, Laboratory for Optical and Computational Instrumentation, University of Wisconsin; USA).

Tabela 6. Przeciwciała pierwszorzędowe wykorzystane w badaniach.

Analiza	Przeciwciała pierwszorzędowe	Rozcieńczenie	Pochodzenie	Producent	Numer katalogowy
IF	Anti-SCOT	1:500	Królik	Proteintech Group, Rosemont, IL, USA	12175-1-AP
ICC	Anti-Chk1	1:750	Królik	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania	ab47574
	Phospho-Chk1 (Ser345)	1:750	Królik	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	2348
	Phospho-Chk1 (Ser317)	1:750	Królik	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	12302
	Anti-Chk2	1:750	Królik	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania	ab47433
	Phospho-Chk2 (Thr68)	1:750	Królik	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	2197
	Phospho-Histone H2A.X (Ser139)	1:750	Królik	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	9718
	ATR	1:750	Królik	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	2790
	ATRIP	1:750	Królik	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	2737
WB	Anti-SCOT	1:1000	Królik	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania	ab241125
	Anti-ACAT1	1:1000	Królik	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	44276
	Anti-BDH1	1:500	Mysz	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Teksas, USA	sc-514413
	Anti-E-cadherin	1:1000	Królik	Affinity Biosciences, Cincinnati, Ohio, USA	AF0131
	Anti-N-cadherin	1:1000	Królik	Affinity Biosciences, Cincinnati, Ohio, USA	AF5239
	Anti-vimentin	1:1000	Królik	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	5741
	Anti-SNAIL	1:1000	Królik	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	3879
	Anti-SLUG	1:1000	Królik	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	9585
	Anti-Beta-actin	1:1000	Mysz	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Teksas, USA	sc-47778
	Anti-H3K4me3	1:1000	Królik	Active Motif, Tegernheim, Niemcy	39159
	Anti-H3K9me3	1:1000	Królik	Active Motif, Tegernheim, Niemcy	39161
	Anti-H3K9/K14ac	1:1000	Królik	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	9677
	Anti-H3	1:1000	Królik	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	4499
	Anti-H3K4bhb	1:1000	Królik	PTM Biolabs, Chicago, IL, USA	PTM-1258

Objaśnienie skrótów: ICC – immunocytochemia; IF – immunofluorescencja; WB – Western blotting

Tabela 7. Przeciwciała drugorzędowe wykorzystane w badaniach.

Analiza	Przeciwciała drugorzędowe	Rozcieńczenie	Pochodzenie	Producent	Numer katalogowy
IF	(H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 488	1:500	Koza	Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	A11034
ICC	(H+L), F(ab') ₂ Fragment (Alexa Fluor® 488 Conjugate)	1:1000	Koza	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	4412
WB	Anti-rabbit	1:20 000	Koza	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Cambridge, Wielka Brytania	111-007-003
	Anti-mouse	1:20 000	Koza	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Cambridge, Wielka Brytania	115-006-003

Objaśnienie skrótów: *ICC* – immunocytochemia; *IF* – immunofluorescencja; *WB* – Western blotting

5.12. Analiza uszkodzeń DNA przy użyciu alkalicznego testu kometowego

Uszkodzenia DNA komórek oceniano za pomocą testu kometowego. Szkiełka mikroskopowe pokrywano 1% roztworem agarozy i suszono w 37°C. Komórki w gęstości 1×10^5 komórek/ml po inkubacji ze związkami (H_2O_2 o stężeniu końcowym 20 μM i t-BOOH o stężeniu końcowym 5 μM) наносzono na pokryte agarozą szkiełko podstawowe i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Komórki inkubowano przez 15 minut w 4°C w celu unieruchomienia komórek w agarozie. Następnie, przez 1 godzinę przeprowadzano lizę komórek w 4°C za pomocą roztworu lizującego (2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 10 mM Tris-HCl o pH 10) z dodatkiem schłodzonego Triton X-100, aby spowodować uwolnienie DNA z jądra komórkowego i dysocjację białek od DNA. Po zakończeniu etapu lizy komórek, szkiełka przepłukiwano buforem enzymatycznym (10 mM HEPES, 0,1 M KCl, 0,5 mM EDTA, 0,2 mg/ml BSA; pH 8,0) i dodawano enzymy (FPG i NTH, aktywność końcowa: 1 U/ml). Preparaty inkubowano w wilgotnej komorze w 37°C przez 30 minut, po czym szkiełka umieszczano w buforze rozwijającym (30 mM NaOH, 1 mM EDTA) na 20 minut w 4°C. Dalej, prowadzono elektroforezę agarozową w warunkach: 29 V przez 20 minut. Szkiełka z komórkami przepłukiwano 3-krotnie wodą i wykonywano barwienie za pomocą DAPI (stężenie końcowe: 1 $\mu g/ml$). W każdym z przeprowadzanych eksperymentów analizie poddawano 100 komórek. Pomiary i zdjęcia wykonywano na mikroskopie Nikon Eclipse TE200 (Minato, Japonia) za pomocą oprogramowania ZEN 3.3 software (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Niemcy).

5.13. Statystyka

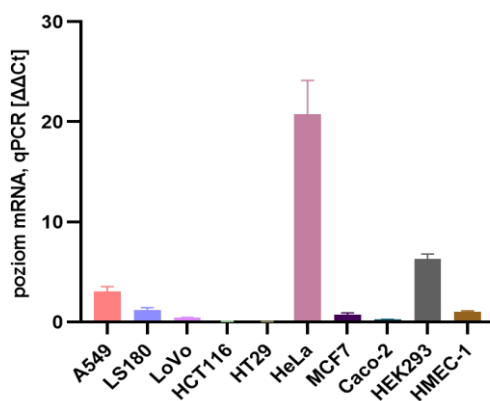
Eksperymenty były przeprowadzane w co najmniej trzech niezależnych powtórzeniach. Aby zweryfikować istotność statystyczną, użyto programu GraphPad Prism 8.3.0 Software, LLC (Insightful Science, California, US) wykorzystując test t-Studenta (dla komórek HeLa z nadekspresją genu *OXCT1*) oraz jednoczynnikową analizę wariancji (one-way ANOVA), a następnie test post-hoc Dunnetta (dla komórek HeLa z wyciszoną monoallelicznie i biallelicznie ekspresją genu *OXCT1* oraz komórek HeLa hodowanych w zmiennych warunkach glikemicznych). Prawdopodobieństwo $p < 0,05$ uznano za istotne statystycznie*.

6. WYNIKI

6.1. Analiza ekspresji genu *OXCT1* w wybranych liniach komórkowych

Badania rozpoczęto od wybrania nowotworowej linii komórkowej charakteryzującej się wysoką ekspresją genu *OXCT1*. W tym celu, analizie poddano 10 wybranych linii komórkowych, głównie nowotworowych, zróżnicowanych pod względem pochodzenia tkankowego, jak i potencjału nowotworowego, tj. agresywności, zdolności do przerzutowania. W analizowanej grupie komórek znalazły się linie nowotworu płuc (komórki A549), okrężnicy (LS180, LoVo, HCT116, HT29), szyjki macicy (HeLa), piersi (MCF7) i jelita grubego (Caco-2), a także unieśmiertelniona linia komórkowa wywodząca się z embrionalnej komórki nerki człowieka (HEK293) i immortalizowane komórki śródbłonna mikronaczyniowego (HMEC-1).

Wyniki uzyskane za pomocą techniki RT-qPCR wykazały, iż spośród wszystkich analizowanych linii komórkowych, komórki raka szyjki macicy HeLa wyróżniają się najwyższą ekspresją genu *OXCT1* (**Ryc. 12**). Ten model komórkowy został wybrany do dalszych badań wpływu wyciszenia/nadekspresji *OXCT1* na regulację metabolizmu, a także potencjału nowotworowego. Poprowadzona ocena poziomu ekspresji *OXCT1* na poziomie transkryptu wstępnie wykazała, że ekspresja genu jest zróżnicowana w obrębie analizowanych linii komórkowych, i poziom *OXCT1* nie koreluje z poziomem agresywności. Ekspresja *OXCT1* w komórkach HeLa była ponad 20-krotnie wyższa od poziomu zarejestrowanego dla HCT116 czy Caco-2, które prezentują czwarty stopień różnicowania w skali CMS (CMS4).



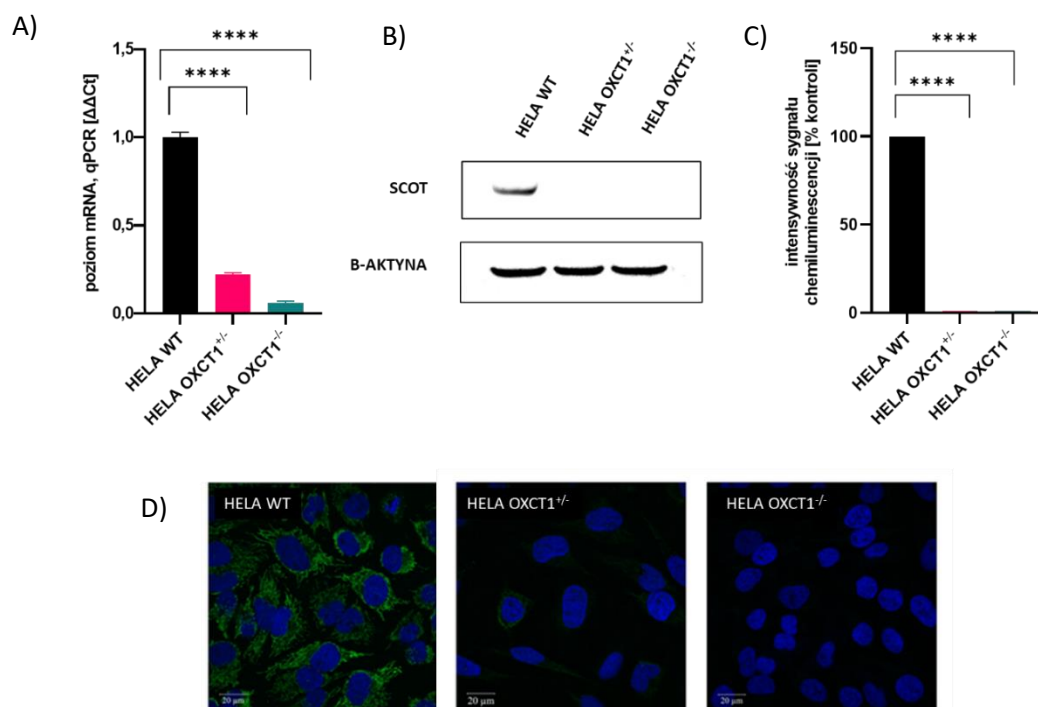
Rycina 12. Ekspresja genu *OXCT1* w wybranych liniach komórkowych.

Wyniki przedstawiono jako średnią \pm odchylenie standardowe z 3 niezależnych powtórzeń ($n = 3$).

6.2. Analiza komórek HeLa z wyciszoną monoallelicznie i biallelicznie ekspresją genu *OXCT1* (HeLa *OXCT1* KO)

6.2.1. Ekspresja *OXCT1*/SCOT na poziomie transkryptu i białka

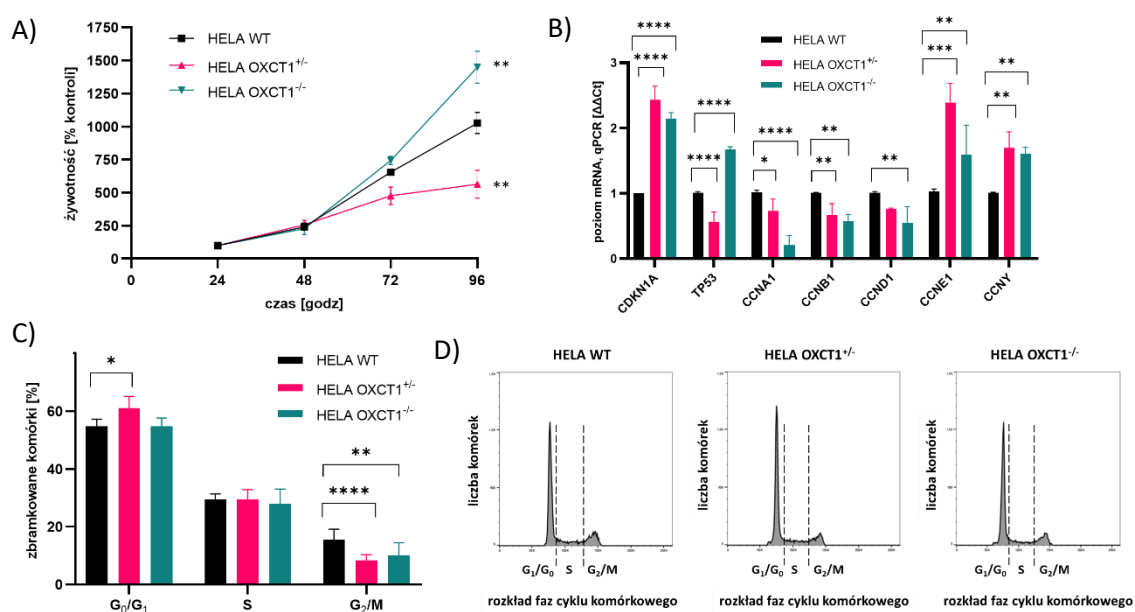
Efektywność wyciszenia *OXCT1* techniką CRISPR/Cas9 oceniono poprzez analizę ekspresji genu metodą RT-qPCR oraz analizę poziomu kodowanego przez *OXCT1* białka SCOT za pomocą techniki Western blotting i barwienia immunofluorescencyjnego. Stwierdzono, iż ekspresja *OXCT1* na poziomie transkryptu była znacząco obniżona (o ponad 80% względem kontroli), zarówno w komórkach HeLa biallelicznie wyciszonych (HeLa *OXCT1*^{-/-}), jak i monoallelicznie wyciszonych (HeLa *OXCT1*^{+/-}) (**Ryc. 13A**). Przeprowadzone analizy poziomu białka metodą Western blotting (**Ryc. 13B, 13C**) i mikroskopii fluorescencyjnej (**Ryc. 13D**) potwierdziły wyciszenie ekspresji *OXCT1*. W przypadku komórek HeLa *OXCT1*^{-/-} nie zarejestrowano żadnego sygnału ze strony przeciwciał rozpoznających antygen SCOT, zaś w przypadku HeLa *OXCT1*^{+/-} w analizach identyfikacji SCOT techniką Western blotting, sygnał był na granicy detekcji, czasem niewykrywalny (w zależności od powtórzenia). Niemniej, wykonane barwienie immunofluorescencyjne, które jest znacznie czulszą techniką, zwizualizowało, że redukcja sygnału (w domyśle: poziomu SCOT) jest znacząca, ale nie całkowita. Obserwacja ta również prowadzi do wniosku o monoallelicznym wyciszeniu *OXCT1* przy zastosowaniu transfekcji z użyciem jednego plazmidu (**Ryc. 13D**).



Rycina 13. Ekspresja *OXCT1* na poziomie transkryptu i białka; **(A)** Zmiany w poziomie ekspresji *OXCT1* na poziomie transkryptu w komórkach HeLa *OXCT1* KO; **(B)** Reprezentatywny blot; **(C)** Kalkulacja intensywności sygnału chemiluminescencji; **(D)** Zdjęcia immunofluorescencyjne. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm odchylenie standardowe z 3 niezależnych powtórzeń. Różnice w ekspresji *OXCT1* na poziomie transkryptu i na poziomie białka w komórkach HeLa *OXCT1* KO identyfikowano w stosunku do kontroli (komórki HeLa WT) za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (one-way ANOVA), a następnie testu post-hoc Dunnetta (**** $p < 0,0001$).

6.2.2. Prolifercja i wzrost komórek HeLa *OXCT1* KO

Charakterystykę otrzymanych komórek HeLa z monoallelicznym (*HeLa OXCT1*^{+/-}) i biallelicznym wyciszeniem genu *OXCT1* (*HeLa OXCT1*^{-/-}) rozpoczęto od analizy proliferacji komórek. W tym celu przeprowadzono fluorymetryczny test oparty na redukcji rezazuryny, która metabolizowana jest przez żywe komórki do fluoryzującej rezorufiny. Wykonane krzywe wzrostu, opierające się na zarejestrowanej intensywności fluorescencji rezorufiny mierzonej w odstępach 24-godzinnych, wykazały, iż komórki *HeLa OXCT1*^{+/-} proliferują zdecydowanie wolniej od komórek *HeLa WT*, podczas gdy komórki *HeLa OXCT1*^{-/-} dzielą się szybciej (**Ryc. 14A**). Różnice były szczególnie widoczne po 96 godzinach od momentu rozpoczęcia eksperymentu, ukazując (odpowiednio) wzrost i spadek szybkości proliferacji o ok. 50% w komórkach *HeLa OXCT1*^{-/-} i *HeLa OXCT1*^{+/-} względem komórek *HeLa WT*. Wynik ten potwierdził obserwacje poczynione podczas pracy z komórkami i standardowego ich pasażowania.

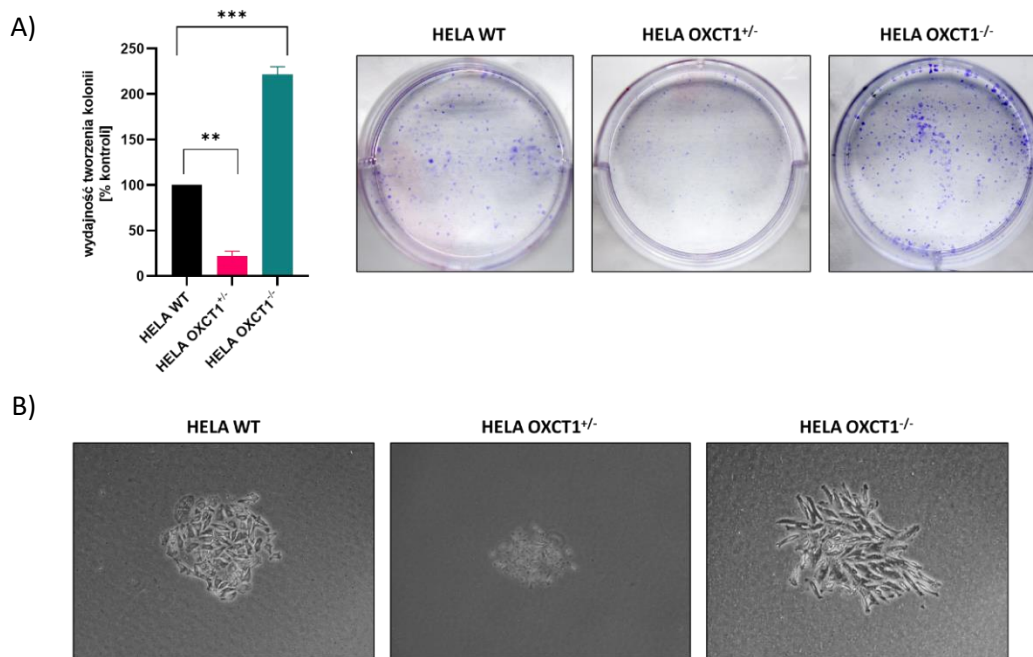


Rycina 14. Prolifercja komórek *HeLa OXCT1* KO. **(A)** Krzywe wzrostu komórek *HeLa WT*, *HeLa OXCT1* KO. **(B)** Analiza ekspresji wybranych genów zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego. **(C)**, **(D)** Analiza rozkładu faz cyklu komórkowego. Wyniki przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe z 3 niezależnych powtórzeń (n = 3). Różnice w proliferacji komórek *HeLa OXCT1* KO porównano do kontroli *HeLa WT* za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (one-way ANOVA), a następnie testu post-hoc Dunnetta (**** p < 0,0001; *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05).

Zidentyfikowane różnice w szybkości proliferacji komórek zasugerowały, iż wyciszenie genu *OXCT1* może mieć wpływ na cykl komórkowy. Aby to sprawdzić, przeprowadzono analizę rozkładu faz cyklu komórkowego komórek za pomocą cytometrii przepływowej (**Ryc. 14C, 14D**). Otrzymane wyniki wykazały o ok. 50% zmniejszony poziom populacji komórek w fazie *G*₂/*M* w komórkach *HeLa OXCT1*^{+/-} i *HeLa OXCT1*^{-/-} względem komórek *HeLa WT*. Dodatkowo, zauważono zwiększoną o ok. 5% dystrybucję populacji komórek *HeLa OXCT1*^{+/-} w fazie *G*₀/*G*₁ (**Ryc. 14C, 14D**).

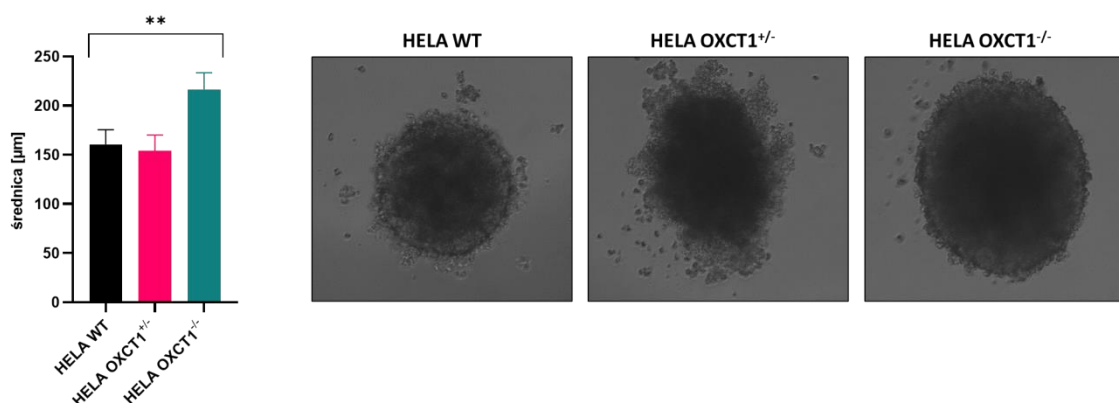
W celu uzyskania pełniejszego obrazu potencjalnych różnic w cyklu komórkowym badanych komórek, przeprowadzono analizę ekspresji genów zaangażowanych w cykl komórkowy metodą RT-qPCR. Zaobserwowano, iż poziom ekspresji genów *CCNA1* i *CCNB1* kodujących cykliny CCNA i CCNB, odpowiednio, regulujące fazę G₂/M cyklu komórkowego był niższy w komórkach HeLa OXCT1^{+/-} i HeLa OXCT1^{-/-} w porównaniu do HeLa WT (ekspresja genu *CCNA1* o ok. 30% i 70%, odpowiednio, natomiast ekspresja *CCNB1* o prawie 50% w obu typach komórek). Ponadto, ekspresja genu *CCNE1* kodującego cyklinę CCNE zaangażowaną w regulację fazy G₀/G₁ cyklu komórkowego jest zwiększona niemalże 2,5-krotnie w komórkach HeLa OXCT1^{+/-}. W komórkach HeLa OXCT1^{+/-} i HeLa OXCT1^{-/-} zauważono również ponad 2-krotny wzrost ekspresji genu *CDKN1A* kodującego białko p21 i ok. 1,5-krotny wzrost ekspresji genu *CCNY* kodującego cyklinę CCNY regulującą fazę G₂/M cyklu komórkowego. W przeciwieństwie do komórek HeLa OXCT1^{+/-}, komórki HeLa OXCT1^{-/-} wykazały także zwiększoną o ok. 50% ekspresję genu *TP53* kodującego białko p53 w porównaniu do komórek HeLa WT (**Ryc. 14B**).

W kolejnym etapie poddano ocenie zdolność komórek HeLa OXCT1^{+/-} i HeLa OXCT1^{-/-} do tworzenia kolonii. Wyniki testu klonogenego wykazały, że monoalleliczne wyciszenie genu *OXCT1* spowodowało 5-krotnie mniej efektywne formowanie kolonii przez komórki HeLa OXCT1^{+/-}, w przeciwieństwie do komórek HeLa OXCT1^{-/-}, które formują kolonie z ponad 2-krotnie zwiększoną wydajnością w porównaniu do komórek HeLa WT (**Ryc. 15A**). Obserwacje mikroskopowe (**Ryc. 15B**) dostarczyły informacji o różnicach morfologicznych komórek HeLa OXCT1 KO, a także sposobie formowania kolonii. Komórki HeLa OXCT1^{+/-} utworzyły niewielkie kolonie, częściowo składające się z minimalnej liczby komórek pozwalającej na zaakceptowanie skupiska jako pojedynczej kolonii (≤ 50 komórek). Komórki HeLa OXCT1^{-/-} tworzyły mniej koliste kolonie w porównaniu do komórek HeLa WT. Ponadto, mocniejsze zabarwienie komórek HeLa OXCT1^{-/-} po wybarwieniu fioletem krystalicznym zasugerowało, iż kolonie zostały utworzone z większej liczby komórek w porównaniu do komórek HeLa WT, co potwierdzałyby zwiększoną proliferację [Rundén-Pran et al., 2022].



Rycina 15. Analiza zdolności komórek HeLa OXCT1 KO do tworzenia kolonii. **(A)** Wydajność tworzenia kolonii wraz z **(B)** obserwacjami mikroskopowymi (powiększenie 40x). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm odchylenie standardowe z 3 niezależnych powtórzeń ($n = 3$). Różnice w proliferacji komórek HeLa OXCT1 KO porównano do kontroli HeLa WT za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (one-way ANOVA), a następnie testu post-hoc Dunnetta (** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$).

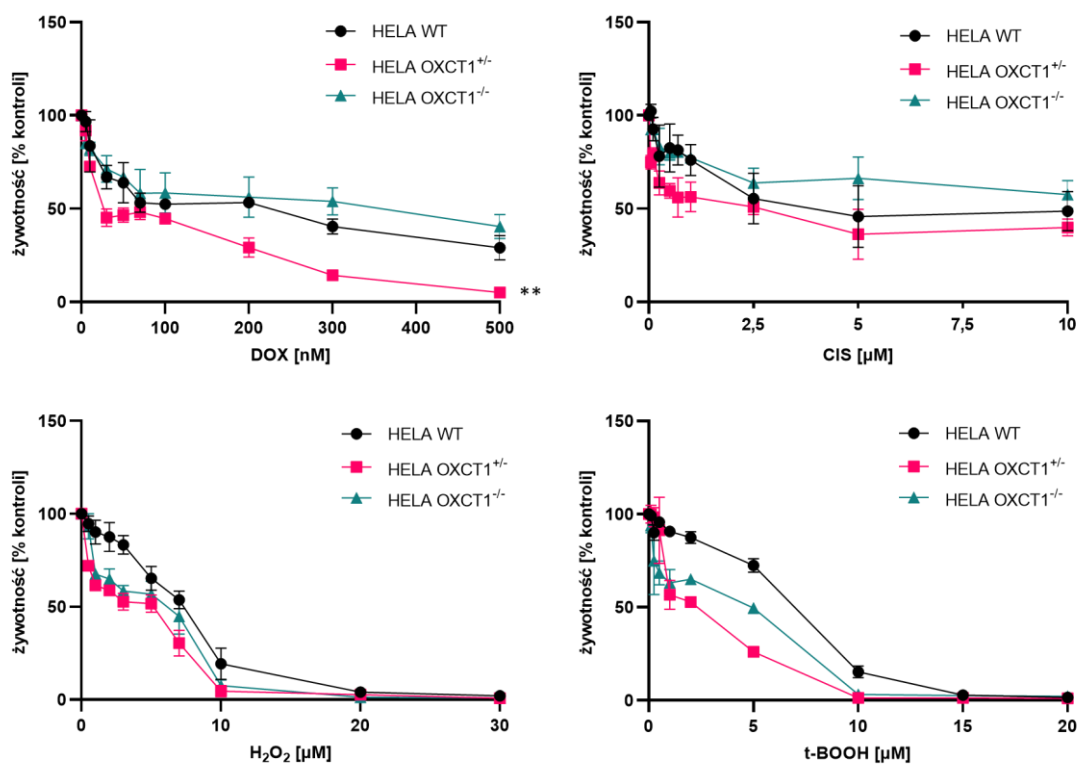
Następnie, analiza zdolności komórek HeLa OXCT1 KO do tworzenia struktur 3D wykazała, iż wyciszenie genu *OXCT1* nie wpływa na potencjał komórek do formowania sferoidów (**Ryc. 16**). Podobnie jak w przypadku tworzenia kolonii, komórki HeLa OXCT1^{+/-} wykazały tendencję do formowania sfer z nieco rozproszonymi komórkami na brzegach. Komórki HeLa OXCT1^{-/-} utworzyły większe sferoidy. Mocne zaciemnienie obrazu w ich obrębie sugeruje, iż mogły one zostać utworzone z większej liczby komórek w porównaniu do komórek HeLa WT.



Rycina 16. Sferoidy utworzone przez komórki HeLa OXCT1 KO (powiększenie 100x). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm odchylenie standardowe z 3 niezależnych powtórzeń ($n = 3$). Różnice w średnicy sferoidów HeLa OXCT1 KO porównano do kontroli HeLa WT za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (one-way ANOVA), a następnie testu post-hoc Dunnetta (** $p < 0,01$).

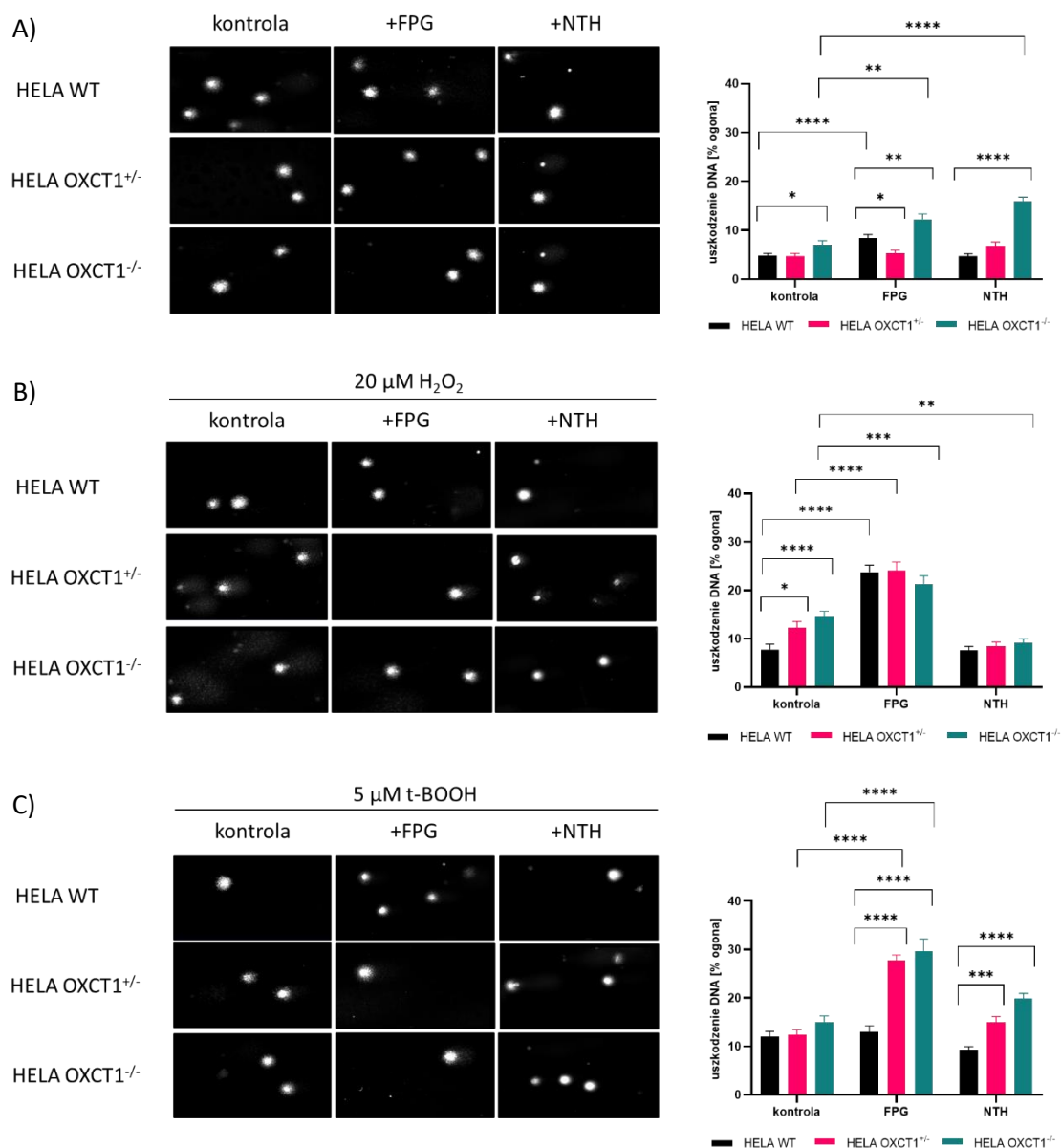
6.2.3. Wrażliwość komórek HeLa OXCT1 KO na wybrane cytostatyki

Chcąc sprawdzić potencjalne różnice we wrażliwości komórek HeLa OXCT1 KO na działanie powszechnie stosowanych w terapii raka szyjki macicy leków (doksorubicyny i cisplatyny) oraz czynników utleniających (nadtlenku wodoru i wodoronadtlenku tert-butylu), przeprowadzono kolorymetryczny test do oceny aktywności metabolicznej komórek za pomocą soli tetrazolowej (MTT). Test ten bazował na sprawdzeniu aktywności enzymów mitochondrialnych w komórkach poprzez ich inkubację z roztworem MTT o żółtym zabarwieniu, a następnie zredukowaniu tego barwnika przez NAD(P)H-zależne oksydoreduktazy do fioletowego formazanu zauważalnego pod postacią kryształków. Wyniki wykazały, iż komórki HeLa OXCT1^{-/-} są najmniej wrażliwe na działanie doksorubicyny (CIS) (żywołność na poziomie 40% w najwyższym stężeniu – 500 nM) i cisplatyny (CIS) (żywołność na poziomie 60% w najwyższym stężeniu – 10 μM). Inkubacja komórek z czynnikami utleniającymi – nadtlenkiem wodoru (H₂O₂) i wodoronadtlenkiem tert-butylu (t-BOOH) – wykazała, iż najbardziej opornymi na ich działanie są komórki HeLa WT w zakresie stężeń niepowodującym 100% umieralności komórek, tj. 0,5-20 μM H₂O₂ i 0,1-15 μM t-BOOH. Komórki HeLa OXCT1^{+/-} wykazały największą wrażliwość na wszystkie zastosowane cytostatyki – ich żywołność na skutek działania danym stężeniem związku była średnio 3-krotnie niższa w porównaniu do komórek HeLa OXCT1^{-/-} i ok. 1,5-krotnie niższa względem komórek HeLa WT.



Rycina 17. Wpływ wybranych cytostatyków na żywołność komórek HeLa OXCT1 KO. Wyniki przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe z 3 niezależnych powtórzeń (n = 3). Różnice we wrażliwości komórek HeLa OXCT1 KO porównano do kontroli HeLa WT za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (one-way ANOVA), a następnie testu post-hoc Dunnetta (** p < 0,01).

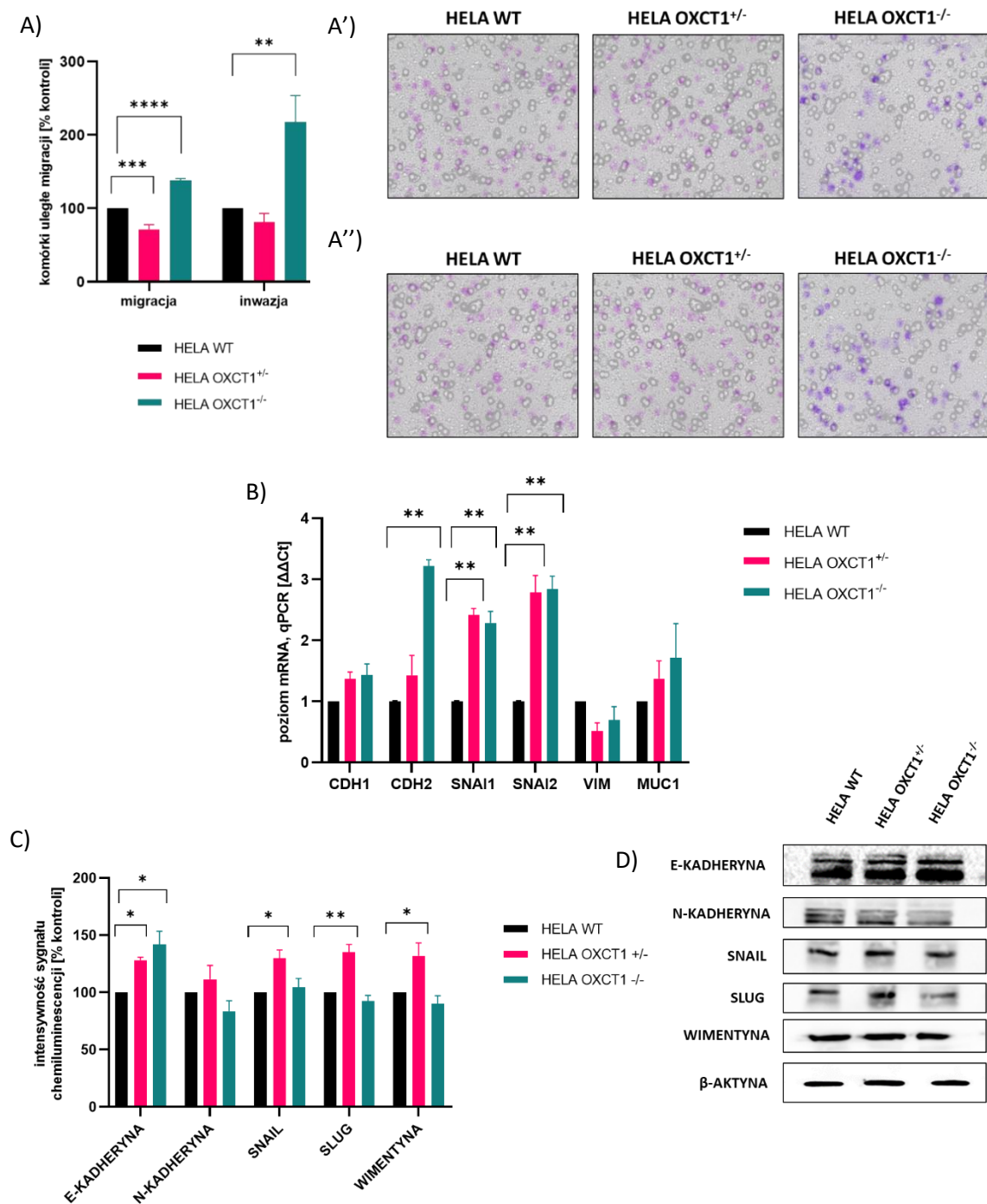
Następnie, zbadano potencjalny poziom uszkodzenia DNA przeprowadzając test kometowy. W pierwszym modelu testu, komórki inkubowane były z H_2O_2 i t-BOOH. Modyfikacja testu obejmowała inkubację komórek z czynnikami utleniającymi wraz z enzymami – endonukleazą III (NTH) i N-glikozylazą formamidopirymidyny (FPG) – a także bez nich. FPG identyfikuje i usuwa 8-oksoguaninę i puryny z otwartym pierścieniem (formamidopirymidyny) z DNA, prowadząc do powstania miejsc apurynowych/apirymidynowych. Natomiast NTH jest specyficzną dla stanów patologicznych endonukleazą restrykcyjną, odpowiedzialną za identyfikację utlenionych pirymidyn i ich transformację w podwójne pęknięcia nici DNA. Na skutek przeprowadzonej analizy, zaobserwowano, że komórki OXCT1^{-/-} są prawie o 50% bardziej podatne na uszkodzenia DNA w porównaniu do komórek HeLa WT (**Ryc. 18A**, komórki nietraktowane, bez dodatku enzymów). W modyfikacji testu obejmującej indukcję stresu oksydacyjnego na skutek inkubacji komórek z H_2O_2 i t-BOOH, zauważalne było ok. 2-krotnie (po traktowaniu komórek HeLa OXCT1^{+/-} i HeLa OXCT1^{-/-} H_2O_2) i ok. 30% (po inkubacji komórek HeLa OXCT1^{-/-} z t-BOOH) zwiększone uszkodzenie DNA w porównaniu do komórek HeLa WT (**Ryc. 18B, 18C**, bez dodatku enzymów). Ponadto, działanie t-BOOH zaindukowało utlenienie puryn i pirymidyn, co potwierdził prawie 2,5-krotnie zwiększony poziom uszkodzeń DNA po dodaniu enzymu FPG w komórkach HeLa OXCT1^{+/-} i HeLa OXCT1^{-/-} (**Ryc. 18C**). Zauważono również większy poziom uszkodzeń DNA na skutek działania t-BOOH w komórkach HeLa OXCT1 KO w porównaniu do inkubacji tych samych komórek z H_2O_2 , tj. wzrost poziomu uszkodzeń DNA o 40% w komórkach HeLa WT bez dodatku enzymów oraz 2-krotny wzrost w tych samych komórkach z dodatkiem FPG, wzrost uszkodzeń o 20% w komórkach HeLa OXCT1^{+/-} z dodatkiem FPG i o 75% po dodaniu enzymu NTH, a także wzrost poziomu uszkodzeń DNA o 30% w komórkach HeLa OXCT1^{-/-} po dodaniu FPG i 2-krotny wzrost uszkodzeń po dodaniu NTH do tych samych komórek (**Ryc. 18B, Ryc. 18C**). W przypadku dodania enzymu NTH do komórek inkubowanych z H_2O_2 , zauważono mniejsze o ok. 30% uszkodzenie DNA w porównaniu do komórek bez dodatku enzymu (**Ryc. 18B**). Różnice w poziomie uszkodzeń między komórkami HeLa OXCT1 KO inkubowanych z H_2O_2 z dodanym enzymem NTH nie są zauważalne (**Ryc. 18B**) w przeciwieństwie do komórek traktowanych t-BOOH z dodatkiem tego samego enzymu (ok. 50% wzrost uszkodzeń DNA w komórkach HeLa OXCT1^{+/-} i 2-krotny wzrost w komórkach HeLa OXCT1^{-/-} w porównaniu do komórek HeLa WT) (**Ryc. 18C**).



Rycina 18. Analiza uszkodzeń DNA. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SEM z 3 niezależnych powtórzeń ($n = 3$). Różnice we wrażliwości komórek HeLa OXCT1 KO porównano do kontroli HeLa WT za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (one-way ANOVA), a następnie testu post-hoc Dunnetta (**** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

6.2.4. Możliwości migracyjne i inwazyjne komórek HeLa OXCT1 KO

Kolejny etap badań polegał na sprawdzeniu zdolności migracyjnych i inwazyjnych komórek HeLa OXCT1 KO przy wykorzystaniu komory Boydena, a także na ocenie ekspresji genów zaangażowanych w EMT techniką RT-qPCR i poziomu kodowanych przez nich białek za pomocą techniki Western blotting. Analiza migracji i inwazji dostarczyła informacji o zwiększonym potencjale do zajścia obu tych procesów (o 40% do migracji i o prawie 120% do inwazji) w komórkach HeLa OXCT1^{-/-} w porównaniu do komórek HeLa WT. Komórki HeLa OXCT1^{+/-}, natomiast, wykazały ok. 30% mniejszą tendencję do migracji i inwazji zarazem (Ryc. 19A).



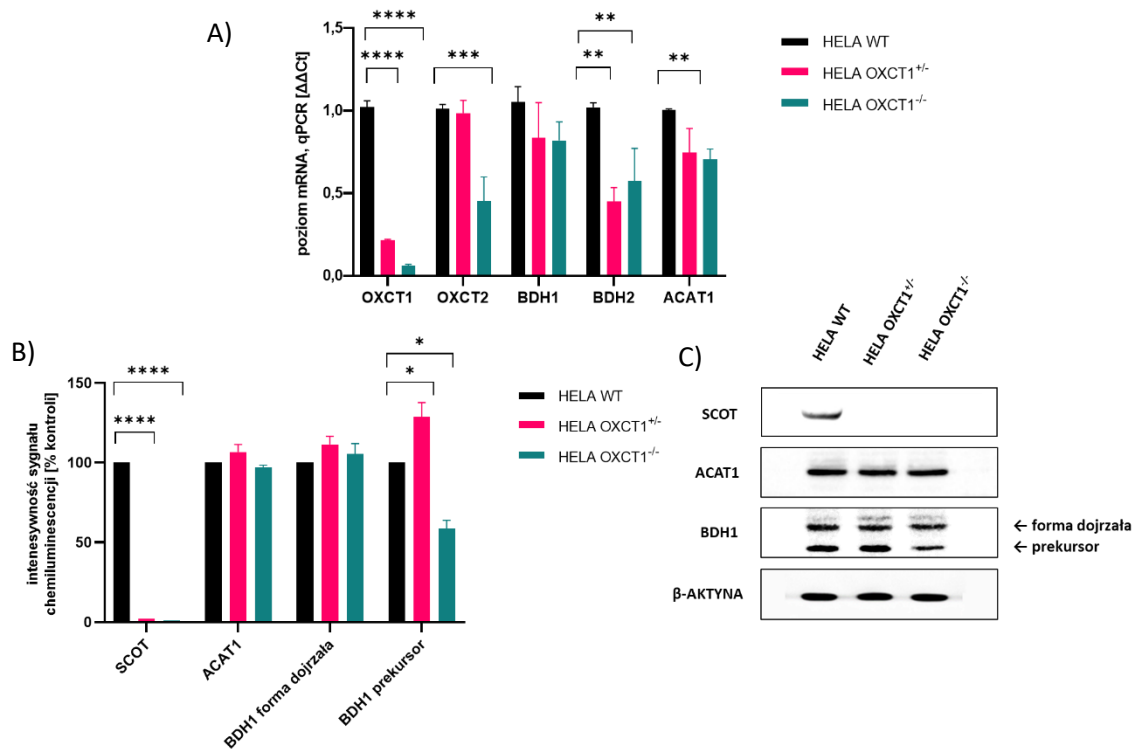
Rycina 19. Możliwości migracyjne i inwazyjne komórek HeLa OXCT1 KO. **(A)** Ocena potencjału **(A')** migracyjnego i **(A'')** inwazyjnego (obserwacje mikroskopowe przeprowadzone pod powiększeniem 100x). Analiza ekspresji markerów przejścia epitelialno-mezenchymalnego na poziomie **(B)** transkrypcyjnym i **(C)** białka; **(D)** Reprezentatywny blot. Wyniki przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe z 3 niezależnych powtórzeń (n = 3). Różnice w potencjale migracyjnym i inwazyjnym komórek HeLa OXCT1 KO porównano do kontroli HeLa WT za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (one-way ANOVA), a następnie testu post-hoc Dunnetta (**** p < 0,0001; *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05).

Wyniki analizy ekspresji genów zaangażowanych w EMT zasugerowały, iż komórki HeLa OXCT1^{+/-} mogą wykazywać hybrydowy charakter epitelialno-mezenchymalny [Sinha et al., 2020] z uwagi na zwiększoną o średnio 30% ekspresję zarówno markerów epitelialnych (*CDH1*, *MUC1*), jak i markera mezenchymalnego *CDH2*, w porównaniu do komórek HeLa WT.

Poziom ekspresji markerów mezenchymalnych *SNAI1* i *SNAI2* w komórkach HeLa OXCT1^{+/-} był zwiększony 2,5-krotnie względem komórek HeLa WT. W komórkach HeLa OXCT1^{-/-} analiza wykazała 3-krotny wzrost ekspresji *CDH2*, ponad 2-krotny wzrost ekspresji *SNAI1* i *SNAI2* oraz o ponad 50% zwiększoną ekspresję *MUC1*. Ekspresja *VIM* dla komórek HeLa OXCT1^{+/-} i HeLa OXCT1^{-/-} była (odpowiednio) o 50% i 30% obniżona względem komórek HeLa WT (**Ryc. 19B**). Analiza poziomu białek zaangażowanych w EMT dostarczyła informacji o prawie 40% wzroście ekspresji E-kadheryny w komórkach HeLa OXCT1^{-/-} względem komórek HeLa WT, przy jednoczesnym obniżeniu poziomu SLUG i wimentyny o ok. 10% oraz N-kadheryny o 20%. Poziom SNAIL w komórkach HeLa OXCT1^{-/-} był na tym samym poziomie, co w komórkach HeLa WT. W przypadku komórek HeLa OXCT1^{+/-}, natomiast, odnotowano wzrost poziomu E-kadheryny o 30%, SNAIL, SLUG i wimentyny o prawie 50% oraz N-kadheryny o ok. 10% w porównaniu do komórek HeLa WT (**Ryc. 19C**). Przedstawione wyniki sugerują, że zarówno komórki HeLa OXCT1^{+/-}, jak i HeLa OXCT1^{-/-}, oprócz niejednoznacznego charakteru świadczącego najprawdopodobniej o fenotypie hybrydowym, mogą mieć potencjał do zmian w kierunku mezenchymalnym.

6.2.5. Metabolizm ciał ketonowych komórek HeLa OXCT1 KO

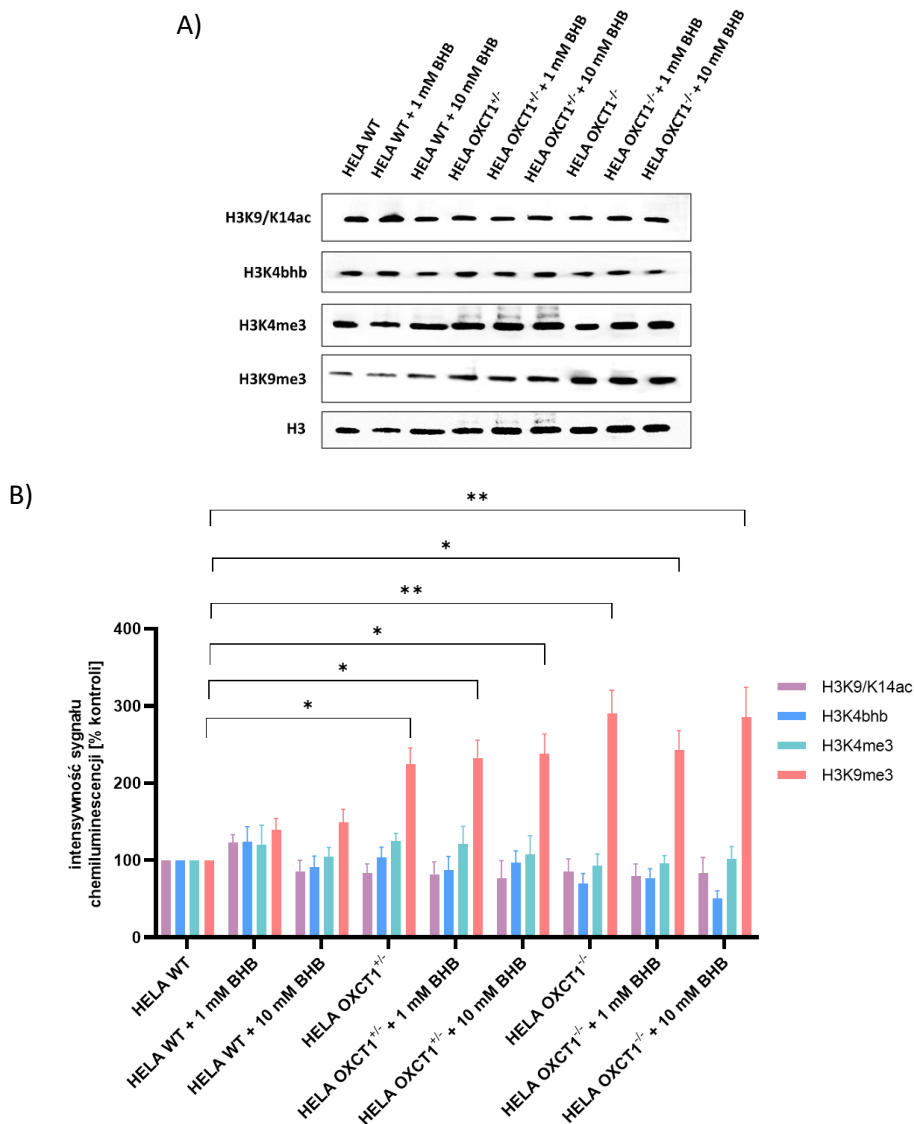
W celu sprawdzenia potencjalnego wpływu wyciszenia genu *OXCT1* na pozostałe czynniki zaangażowane w metabolizm ciał ketonowych, przeprowadzono analizy tychże czynników na poziomie transkrypty i białka. Na podstawie przeprowadzonej analizy RT-qPCR zauważono spadek poziomu ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm ciał ketonowych w komórkach HeLa OXCT1^{+/-} (spadek *OXCT1* o 80%, *OXCT2* poniżej 5%, *BDH1* o 20%, *BDH2* o ponad 50% i *ACAT1* o 25%) i HeLa OXCT1^{-/-} (spadek *OXCT1* o ok. 95%, *OXCT2* o ponad 50%, *BDH1* o 20%, *BDH2* o prawie 50% i *ACAT1* 30%) w porównaniu do komórek HeLa WT. Geny *ACAT1*, *OXCT1*, *OXCT2* i *BDH1* kodują enzymy mitochondrialne, a ich ekspresja jest większa o ok. 30% w porównaniu do genu *BDH2* kodującego enzym cytozolowy, w szczególności w komórkach HeLa OXCT1^{+/-} (**Ryc. 20A**). Analizy poziomu białek wykazały, że acetylotransferaza acetylo-CoA (*ACAT1*) oraz forma dojrzała dehydrogenazy β-hydroksymaślanu (*BDH1*) są na podobnym poziomie we wszystkich badanych komórkach HeLa OXCT1 KO (wzrost poziomu o 5% dla białka *ACAT1* w komórkach HeLa OXCT1^{+/-} oraz – odpowiednio – wzrost o 5% i 10% dla dojrzałej formy *BDH1* w komórkach HeLa OXCT1^{-/-} i HeLa OXCT1^{+/-}). Prekursor *BDH1*, natomiast, jest na najwyższym poziomie w komórkach HeLa OXCT1^{+/-} (wzrost o ok. 30% względem kontroli), podczas gdy w komórkach HeLa OXCT1^{-/-} jest niższy o prawie 50% w porównaniu do komórek HeLa WT (**Ryc. 20B**).



Rycina 20. Ekspresja czynników zaangażowanych w metabolizm ciał ketonowych na poziomie **(A)** transkryptu i **(B)** białka; **(C)** Reprezentatywny blot. Wyniki przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe z 3 niezależnych powtórzeń (n = 3). Różnice w ekspresji badanych czynników w komórkach HeLa OXCT1 KO porównano do kontroli HeLa WT za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (one-way ANOVA), a następnie testu post-hoc Dunnetta (**** p < 0,0001; *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05).

6.2.6. Wpływ ciał ketonowych na poziom modyfikacji potranslacyjnych w komórkach HeLa OXCT1 KO

Potencjalną zdolność ciał ketonowych do regulacji transkrypcji zbadano na dwóch modelach: (i) komórkach HeLa z wyciszonym monoallelicznie i biallelicznie genem *OXCT1* oraz (ii) tychże komórkach dodatkowo suplementowanych solą sodową β-hydroksymaślanu (BHB) w stężeniu imitującym fizjologiczną (1 mM) oraz głęboką ketozę (10 mM) *in vivo*. Analiz poziomu markerów modyfikacji potranslacyjnych białek histonowych związanych z aktywacją (H3K9/K14ac i H3K4me3) oraz wyciszeniem (H3K9me3) procesu transkrypcji dokonano za pomocą techniki Western blotting. Ponadto, zakładając, iż zwiększony poziom ciał ketonowych (w szczególności β-hydroksymaślanu) doprowadzi do zwiększenia poziomu β-hydroksybutyrylacji histonów, zbadano poziom teŹe modyfikacji lizyny 4 histonu 3 (H3K4bhb).



Rycina 21. Poziom markerów modyfikacji potranslacyjnych białek histonowych związanych z aktywacją oraz wyciszeniem procesu transkrypcji w komórkach HeLa OXCT1 KO; **(A)** Reprezentatywny blot; **(B)** Kalkulacja intensywności sygnału chemiluminescencji. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm odchylenie standardowe z 3 niezależnych powtórzeń ($n = 3$). Różnice w ekspresji badanych czynników w komórkach HeLa OXCT1 KO porównano do kontroli HeLa WT za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (one-way ANOVA), a następnie testu post-hoc Dunnetta (** $p < 0,001$; * $p < 0,01$).

Analiza wykazała średnio 2,5-krotnie zwiększony poziom H3K9me3 w komórkach HeLa OXCT1^{+/-} i HeLa OXCT1^{-/-}, samych oraz z dodatkiem β -hydroksymaślanu, w porównaniu do komórek HeLa WT. W komórkach HeLa OXCT1^{+/-} i HeLa OXCT1^{-/-}, samych oraz z dodatkiem 1 mM i 10 mM BHB, odnotowano spadek poziomu acetylacji histonów o ok. 15%. Wzrost (w komórkach HeLa OXCT1^{+/-} z dodatkiem 10 mM BHB) i obniżenie (w komórkach HeLa OXCT1^{+/-} z dodatkiem 1 mM BHB) poziomu β -hydroksybutyrylacji nie wynosiło więcej niż 5% względem komórek HeLa WT. W komórkach HeLa OXCT1^{-/-} spadek poziomu β -hydroksybutyrylacji histonów wyniósł ok. 30% bez suplementacji β -hydroksymaślanem i z dodatkiem 1 mM BHB. Dodatek 10 mM BHB do komórek HeLa OXCT1^{-/-} spowodował obniżenie poziomu β -hydroksybutyrylacji o połowę względem komórek HeLa WT.

W przypadku poziomu H3K4me3 w komórkach HeLa OXCT1^{-/-} odnotowano ok. 20% wzrost w samych komórkach i z dodatkiem 1 mM BHB, podczas gdy po dodaniu 10 mM BHB poziom wzrósł o ok. 5%. W komórkach HeLa OXCT1^{-/-} zauważalny był, natomiast, spadek poziomu H3K4me3 o ok. 10% w komórkach nietraktowanych i z dodatkiem 1 mM BHB. Dodatek 10 mM BHB do komórek HeLa OXCT1^{-/-} nie spowodował zmian. Suplementacja 1 mM BHB komórek HeLa WT poskutkowała wzrostem o 20% poziomu H3K4me3, acetylacji i β-hydroksybutyrylacji histonów, a także 40% wzrostem poziomu H3K9me3 w porównaniu do komórek HeLa WT nietraktowanych. Co ciekawe, zwiększenie stężenia β-hydroksymaślanu do 10 mM w komórkach HeLa WT dało rezultat pod postacią obniżenia o ok. 10% poziomu acetylacji i β-hydroksybutyrylacji, a także wzrostu o 50% poziomu H3K9me3 przy braku zmian w poziomie H3K4me3 (Ryc. 21B).

6.2.7. Podsumowanie charakterystyki komórek HeLa z wyciszeniem monoallelicznym i biallelicznym genu *OXCT1* względem kontroli

Z założenia, zachowanie komórek HeLa OXCT1^{-/-} miało potwierdzić wcześniej zaobserwowane zmiany w komórkach HeLa OXCT1^{+/-}, jednak przeprowadzone analizy wykazały znaczne różnice między badanymi komórkami z wyciszeniem genu *OXCT1*. Zauważone rozbieżności zostały przedstawione w Tabeli 8.

Tabela 8. Porównanie komórek HeLa OXCT1^{+/-} i HeLa OXCT1^{-/-}. Wyniki dla obu typów komórek przedstawione są względem kontroli – komórek HeLa WT.

Analiza / badany parametr	Test	Komórki HeLa OXCT1 ^{+/-}	Komórki HeLa OXCT1 ^{-/-}
Szybkość proliferacji	Test redukcji resazuryny	--	++
Wydatność tworzenia kolonii	Test klonogenny	--	+++
Zdolność do tworzenia sferoidów	Test wiszącej kropli	-	++
Wrażliwość na cytostatyki	MTT	++ (DOX) - (CIS) ++ (H ₂ O ₂) ++ (t-BOOH)	- (DOX) + (CIS) + (H ₂ O ₂) + (t-BOOH)
Podatność na uszkodzenia oksydacyjne	Test kometowy	bz (H ₂ O ₂ + FPG) bz (H ₂ O ₂ + NTH) ++ (t-BOOH + FPG) + (t-BOOH + NTH)	- (H ₂ O ₂ + FPG) bz (H ₂ O ₂ + NTH) +++ (t-BOOH + FPG) ++(t-BOOH + NTH)
Potencjał migracyjny i inwazyjny	Test migracji i inwazji	--	+++

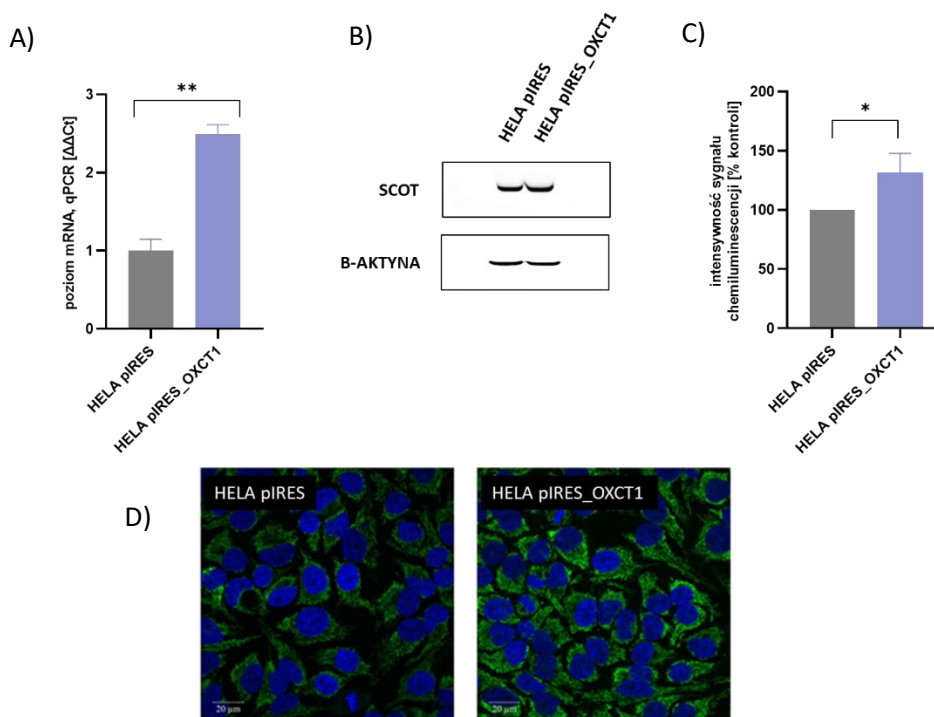
Objaśnienia skrótów: bz – bez zmian; CIS – cisplatyna; DOX – doksorubicyna.

Legenda: „+”, „++”, „+++”, „-”, „--”, „---” – intensywność zmian

6.3. Analiza komórek z nadekspresją genu *OXCT1* (HeLa *OXCT1* OX)

6.3.1. Ekspresja *OXCT1*/SCOT na poziomie transkryptu i białka

Nadekspresję genu *OXCT1* w komórkach HeLa początkowo stwierdzono za pomocą metody RT-qPCR (**Ryc. 22A**). Następnie, przeprowadzono analizę poziomu białka techniką Western blotting (**Ryc. 22B**) i za pomocą barwienia immunofluorescencyjnego (**Ryc. 22D**) potwierdzając, iż komórki HeLa pIRES_oxct1 charakteryzują się zwiększoną ekspresją SCOT.

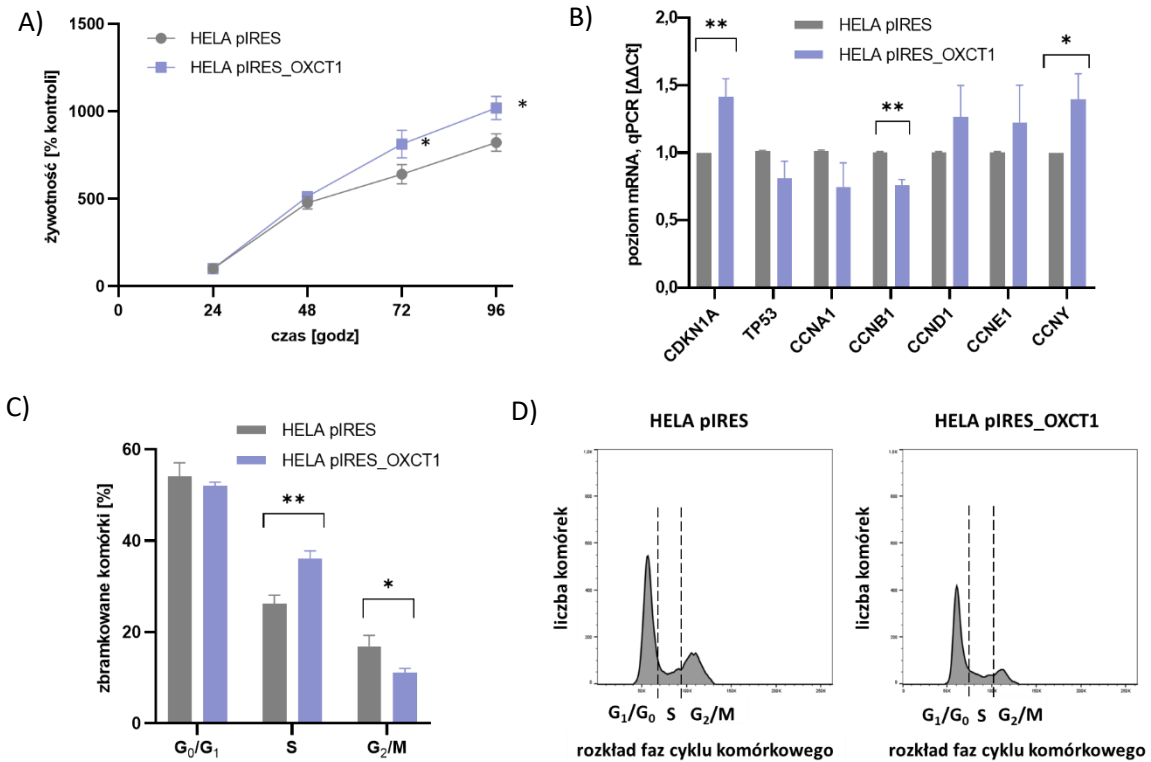


Rycina 22. Ekspresja *OXCT1* na poziomie transkryptu i białka; **(A)** Zmiany w poziomie ekspresji *OXCT1* na poziomie transkryptu w komórkach HeLa *OXCT1* OX; **(B)** Reprezentatywny blot; **(C)** Kalkulacja intensywności sygnału chemiluminescencji; **(D)** Zdjęcia immunofluorescencyjne. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm odchylenie standardowe z 3 niezależnych powtórzeń ($n = 3$). Różnice w ekspresji *OXCT1* na poziomie transkryptu i na poziomie białka w komórkach HeLa pIRES_oxct1 identyfikowano w stosunku do kontroli HeLa pIRES za pomocą testu t-Studenta (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

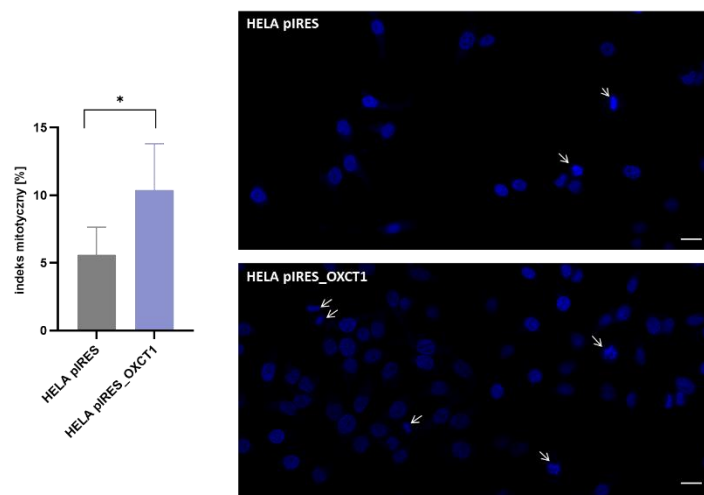
6.3.2. Prolifерacja i wzrost komórek HeLa *OXCT1* OX

Rozpoczynając charakterystykę komórek HeLa *OXCT1* OX (HeLa pIRES i HeLa pIRES_oxct1), przeprowadzono analizę szybkości proliferacji za pomocą testu redukcji resazuryny. Otrzymane wyniki wykazały, iż komórki HeLa pIRES_oxct1 od 72 godziny inkubacji proliferują o 20% szybciej od komórek HeLa pIRES (**Ryc. 23A**), natomiast wyniki analizy indeksu mitotycznego wykazały 2-krotnie szybsze podziały komórkowe (**Ryc. 24**). Obserwacja ta doprowadziła do sprawdzenia potencjalnych różnic w cyklu komórkowym komórek HeLa *OXCT1* OX. W tym celu, poddano komórki analizie rozkładu faz cyklu komórkowego na cytometrze przepływowym, wykazując, iż w komórkach HeLa pIRES_oxct1 zauważalny jest zmniejszony o 30% poziom populacji komórek w fazie G_2/M przy zwiększonej o 40% dystrybucji populacji komórek w fazie S w porównaniu do komórek HeLa pIRES (**Ryc. 23C**). Następnie, zbadano ekspresję genów zaangażowanych w przebieg cyklu

komórkowego. Zaobserwowano, iż ekspresja genów *CCNA1* i *CCNB1* kodujących cykliny CCNA i CCNB zaangażowane w regulację fazy G₂/M cyklu komórkowego jest niższa, a ekspresja *CCND1* oraz *CCNE1* kodujących cykliny CCND i CCNE zaangażowanych w regulację fazy G₀/G₁ cyklu komórkowego jest zwiększona o ok. 25% w komórkach HeLa pIRES_OXCT1 w porównaniu do HeLa pIRES, odpowiednio. Ponadto, zauważono zwiększoną o 40% ekspresję genu *CDKN1A* kodującego białko p21 oraz genu *CCNY* przy jednoczesnym obniżeniu o 20% ekspresji genu *TP53* produkującego białko p53 w komórkach HeLa pIRES_OXCT1 (Ryc. 23B).



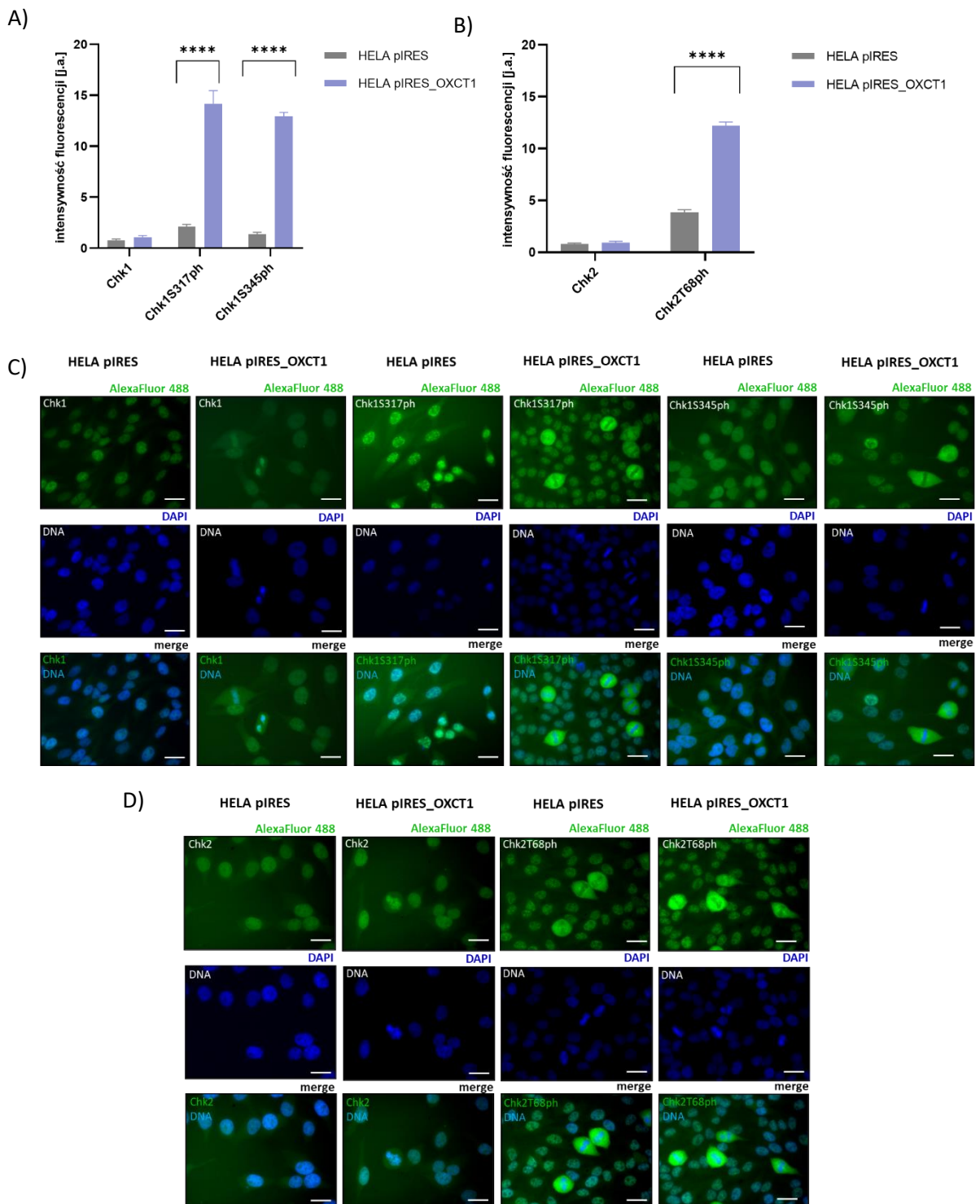
Rycina 23. Proliferacja komórek HeLa OXCT1 OX. (A) Różnice w szybkości proliferacji. (B) Ekspresja genów zaangażowanych w przebieg cyklu komórkowego. (C), (D) Rozkład faz cyklu komórkowego. Wyniki przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe z 3 niezależnych powtórzeń (n = 3). Różnice w proliferacji komórek HeLa pIRES_OXCT1 porównano do kontroli HeLa pIRES za pomocą testu t-Studenta (** p < 0,01; * p < 0,05).



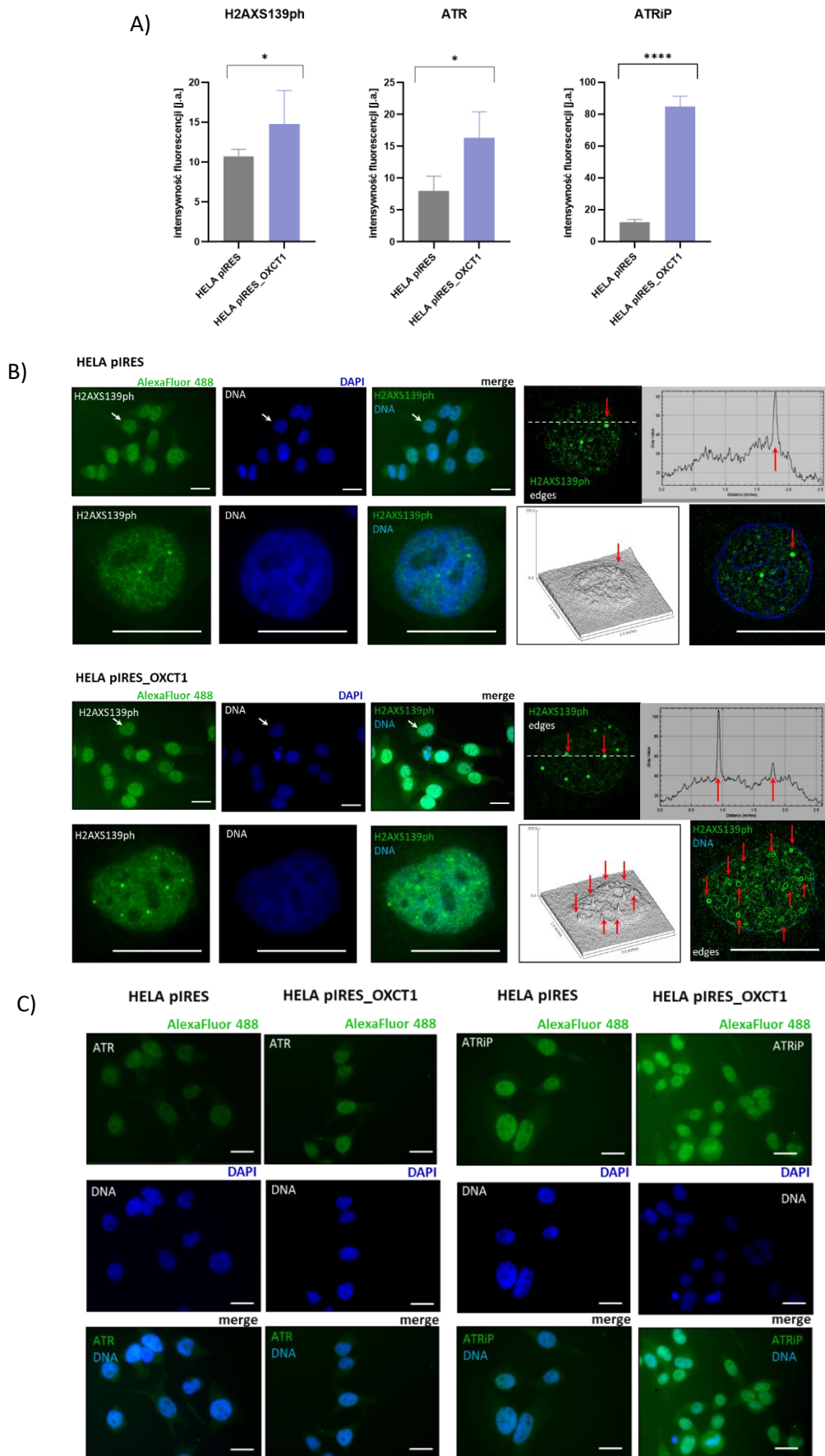
Rycina 24. Indeks mitotyczny komórek (skala na zdjęciach równa 10 μm, komórki mitotyczne wskazano białą strzałką). Wyniki przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe z 3 niezależnych powtórzeń (n = 3).

Różnice w indeksie mitotycznym komórek HeLa pIRES_OXCT1 porównano do kontroli HeLa pIRES za pomocą testu t-Studenta (* $p < 0,05$).

Ze względu na odnotowane różnice w rozkładzie faz cyklu komórkowego komórek HeLa OXCT1 OX, dokonano analizy aktywacji kinazy punktu kontrolnego 1 (Chk1) i 2 (Chk2) zaangażowanych w naprawę uszkodzeń DNA i odpowiedź punktów kontrolnych cyklu komórkowego [Zhang et al., 2014], [van Jaarsveld et al., 2020] (**Ryc. 25**). Barwienie immunofluorescencyjne wykazało ponad 7-krotnie zwiększony poziom ufosforylowanych form Chk1 (Chk1S317ph i Chk1S345ph) w komórkach HeLa pIRES_OXCT1 w porównaniu do komórek HeLa pIRES (**Ryc. 25C**). Silniejszą o ok. 15% odpowiedź odnotowano dla Chk1 w porównaniu do Chk2 (**Ryc. 25A, 25B**), a także dla formy Chk1S317ph względem Chk1S345ph (**Ryc. 25A**). Podobnie w przypadku ufosforylowanej formy Chk2 (Chk2T68ph), zaobserwowano 3-krotny wzrost poziomu tej formy białka w komórkach HeLa pIRES_OXCT1 względem HeLa pIRES (**Ryc. 25D**). Ponadto, w przypadku Chk1S317ph, Chk1S345ph i Chk2T68ph analizowanych w komórkach HeLa pIRES_OXCT1 na fotografiach mikroskopowych łatwo zauważalne są komórki będące w trakcie podziału, a same formy analizowanych białek wykazują lokalizację jądrową pod postacią świecących *foci* (**Ryc. 25C, 25D**). Fosforylacja Chk1 regulowana jest działaniem kompleksu ATR-ATRIP, którego poziom białek ATR i jego jednostki regulatorowej ATRIP jest 2-krotnie i ponad 7-krotnie zwiększony w komórkach HeLa pIRES_OXCT1, odpowiednio (**Ryc. 26A**). Podobnie, kinaza ATP odpowiedzialna jest za fosforylację histonu H2AX (H2AXS139ph, znanej także jako γ H2AX) na skutek pojawienia się dwuniciowych pęknięć DNA. Półtorakrotnie zwiększony poziom H2AXS139ph zauważalny jest również dla komórek HeLa pIRES_OXCT1 w porównaniu do HeLa pIRES (**Ryc. 26A**).

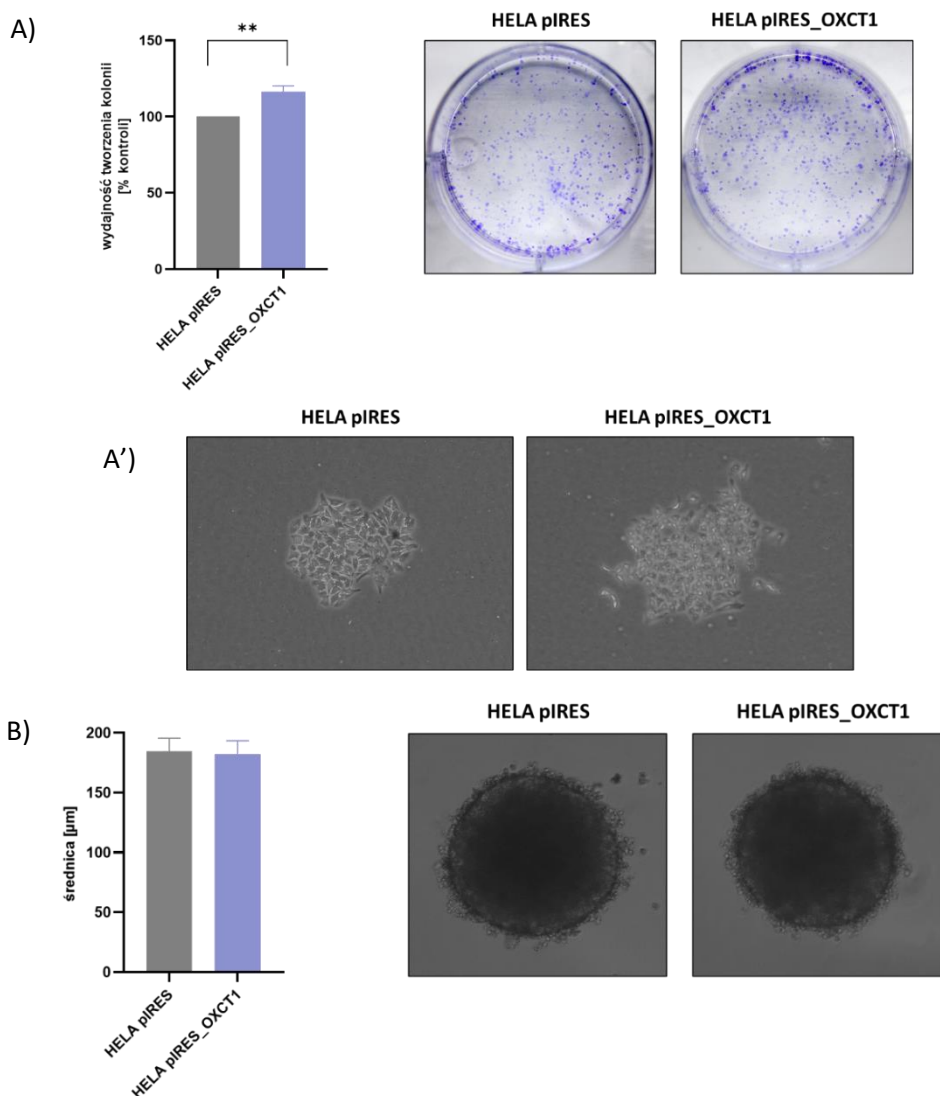


Rycina 25. Poziom (aktywacji) kinaz punktów kontrolnych cyklu komórkowego (skala na zdjęciach równa 10 μm). Wyniki analizy przedstawiono jako średnią \pm odchylenie standardowe z 3 niezależnych powtórzeń ($n = 3$). Różnice w proliferacji komórek HeLa pIRES_OXCT1 porównano do kontroli HeLa pIRES za pomocą testu t-Studenta (**** $p < 0,0001$).



Rycina 26. Analiza poziomu markerów uszkodzeń DNA (skala na zdjęciach równa 10 μ m). Strzałki wskazują na *foci*. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm odchylenie standardowe z 3 niezależnych powtórzeń ($n = 3$). Różnice we wrażliwości komórek HeLa pIRES_OXCT1 porównano do kontroli HeLa pIRES za pomocą testu t-Studenta (**** $p < 0,0001$; * $p < 0,05$).

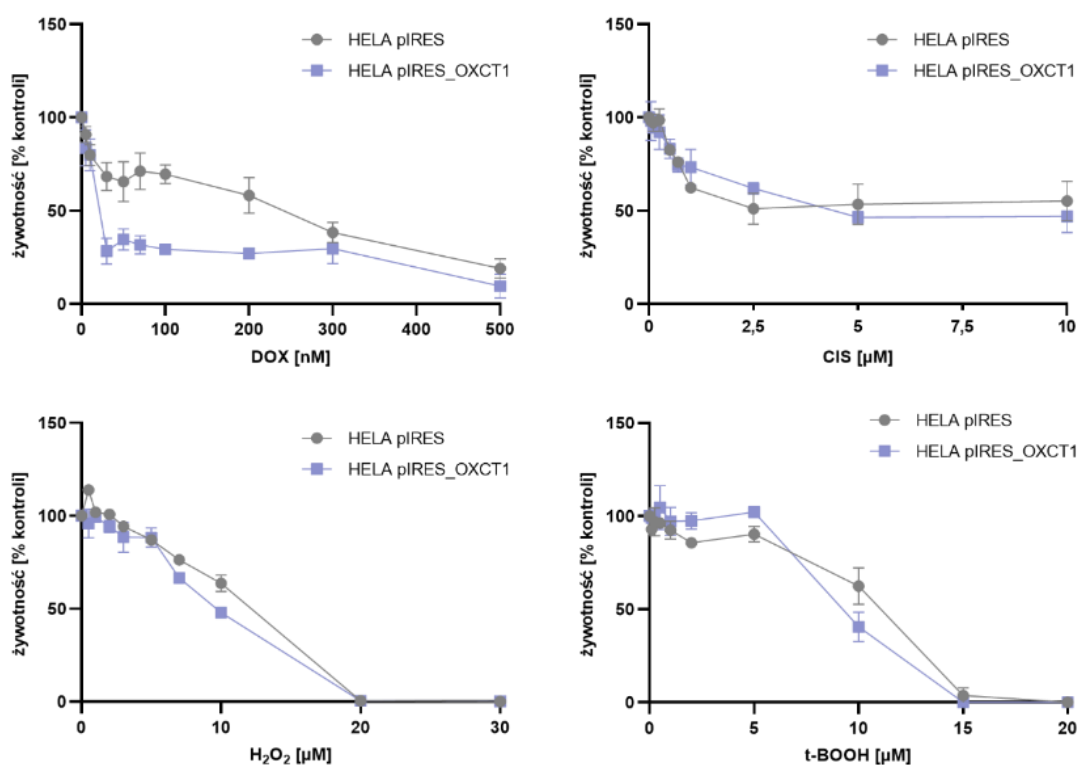
W kolejnym etapie badań sprawdzono potencjalne różnice we wzroście komórek HeLa OXCT1 OX. Na podstawie testu klonogenego, wykazano, iż komórki HeLa pIRES_OXCT1 efektywniej tworzą kolonie w porównaniu do komórek HeLa pIRES (wzrost wydajności o 15%) (**Ryc. 27A**). Obserwacje mikroskopowe (**Ryc. 27A'**) dostarczyły informacji o wielkości tworzonych kolonii. Kolonie utworzone przez komórki HeLa pIRES_OXCT1 były niewiele większe od HeLa pIRES, a delikatnie mocniejsza barwa na skutek barwienia fioletem krystalicznym sugerowała, iż kolonie HeLa pIRES_OXCT1 są nieco liczniejsze w komórki. Obserwacja potwierdza zwiększone tempo proliferacji komórek HeLa pIRES_OXCT1 [Rundén-Pran et al., 2022]. Następnie, sprawdzono zdolność komórek HeLa OXCT1 OX do tworzenia struktur 3D. Wykazano, że nadekspresja genu *OXCT1* nie ma wpływu na potencjał komórek do formowania sferoidów. Ponadto, sferoidy utworzone przez komórki HeLa OXCT1 OX praktycznie nie różniły się wielkością (**Ryc. 27B**).



Rycina 27. Proliferacja i wzrost komórek HeLa OXCT1 OX. **(A)** Zdolność komórek do tworzenia kolonii wraz z **(A')** obserwacjami mikroskopowymi. **(B)** Sferoidy utworzone przez komórki (powiększenie 100x). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm odchylenie standardowe z 3 niezależnych powtórzeń ($n = 3$). Różnice w proliferacji i wzroście komórek HeLa pIRES_OXCT1 porównano do kontroli HeLa pIRES za pomocą testu t-Studenta (** $p < 0,01$).

6.3.3. Wrażliwość komórek HeLa OXCT1 OX na wybrane cytostatyki

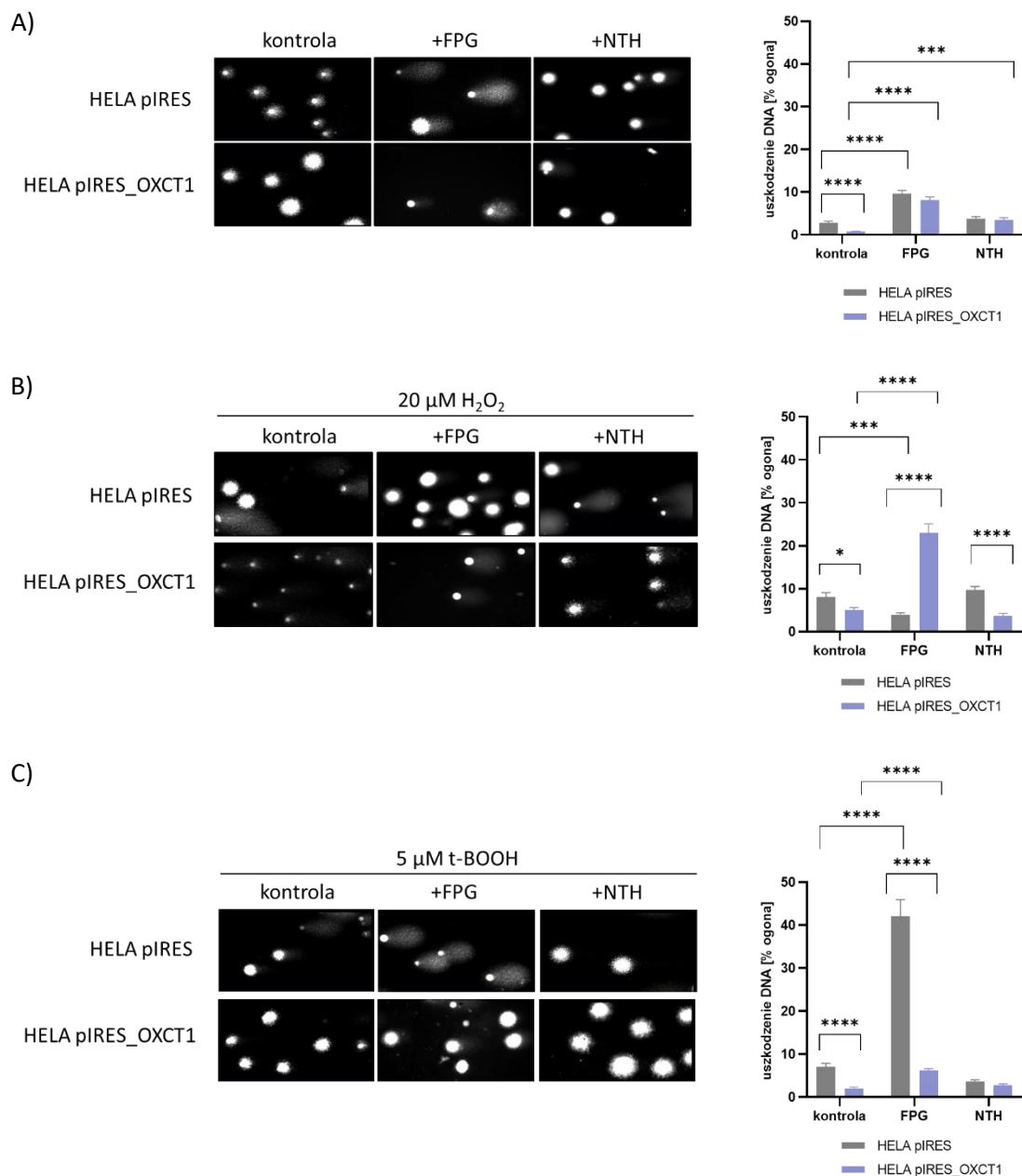
Potencjalne różnice we wrażliwości komórek HeLa OXCT1 OX na działanie powszechnie stosowanych w terapii raka szyjki macicy leków (doksorubicyny [DOX] i cisplatyny [CIS]) oraz czynników utleniających (H_2O_2 i t-BOOH) poddano analizie testem MTT. Wykazano, iż komórki HeLa pIRES wykazują nieznacznie większą wytrzymałość (średnio o ok. 10% dla danego stężenia związku) na działanie wszystkich zbadanych cytostatyków w przedstawionym zakresie stężeń w porównaniu do komórek HeLa pIRES_OXCT1 (za wyjątkiem doksorubicyny, gdzie w przedziale stężeń 5-200 nM różnica żywotności komórek HeLa OXCT1 OX wynosiła średnio 50%).



Rycina 28. Wpływ wybranych cytostatyków na żywotność komórek. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm odchylenie standardowe z 3 niezależnych powtórzeń ($n = 3$).

Za pomocą testu kometowego z dodatkiem enzymów – endonukleazą III (NTH) i N-glikozylazą formamidopirymidyny (FPG) – a także bez nich, poddano analizie potencjalny poziom uszkodzenia DNA. Zaobserwowano, że komórki HeLa pIRES_OXCT1 są mniej podatne na uszkodzenia DNA w porównaniu do komórek HeLa pIRES (prawie 3-krotny spadek uszkodzeń DNA) (**Ryc. 29A**, komórki nietraktowane, bez dodatku enzymów). Dalej, zaindukowano stres oksydacyjny inkubując komórki z H_2O_2 i t-BOOH. Na skutek tego, zauważalne jest zmniejszenie o 40% i ok. 30%, odpowiednio, uszkodzenia DNA w komórkach HeLa pIRES_OXCT1 w porównaniu do komórek HeLa pIRES (**Ryc. 29B, 29C**, bez dodatku enzymów). Ponadto, działanie czynnikami utleniającymi zaindukowało utlenienie puryn i pirymidyn, co potwierdza zwiększony poziom uszkodzeń DNA po dodaniu enzymu FPG w komórkach HeLa pIRES (7-krotnie zwiększone uszkodzenia DNA po inkubacji z t-BOOH)

i komórkach HeLa pIRES_OXCT1 (prawie 6-krotnie zwiększone uszkodzenia DNA po inkubacji z H₂O₂). W przypadku dodania enzymu NTH, w komórkach inkubowanych z H₂O₂, zauważono 2-krotnie zwiększone uszkodzenie DNA w komórkach HeLa pIRES przy jednoczesnym braku różnic w komórkach inkubowanych z t-BOOH (Ryc. 29B, 29C).

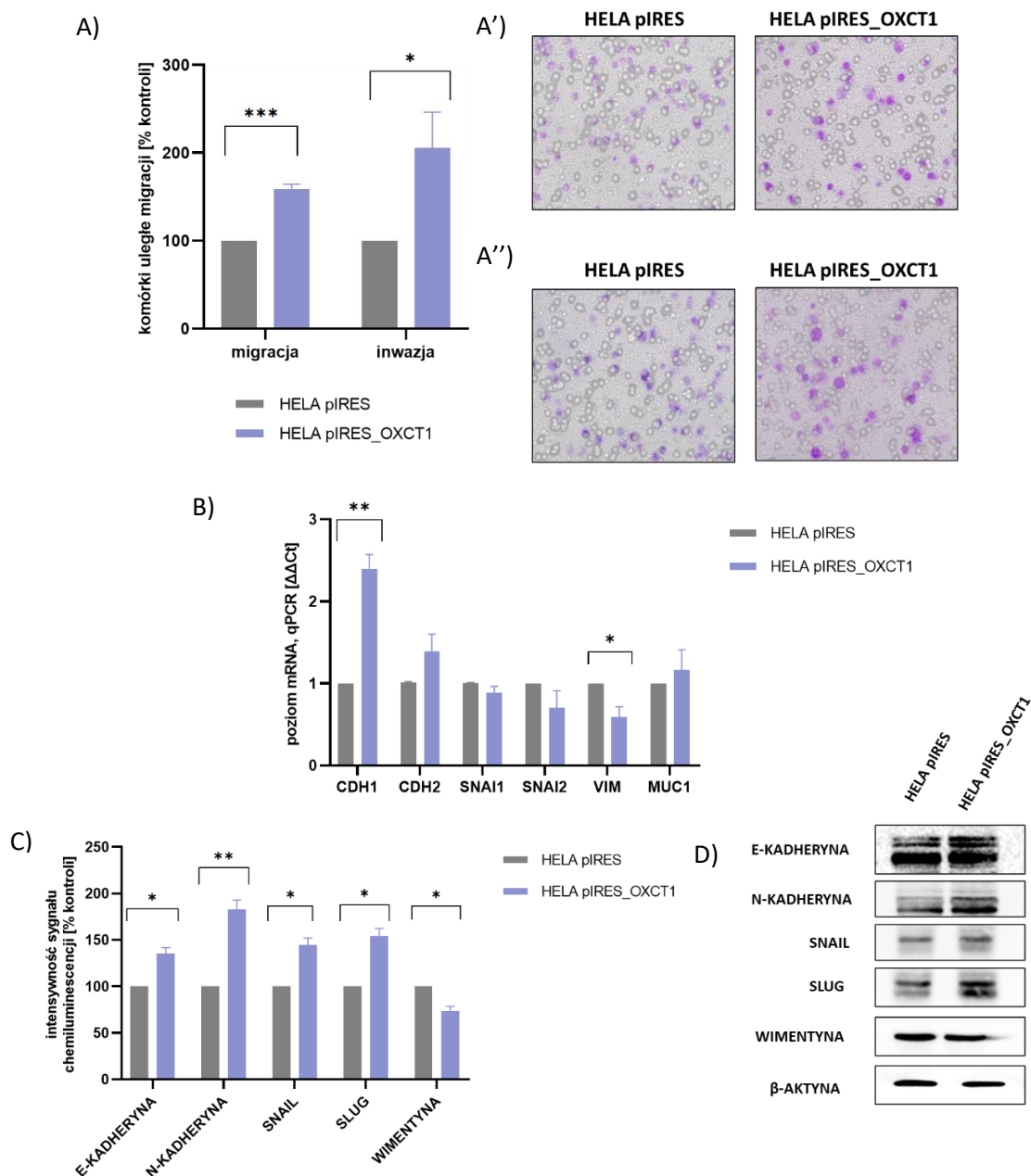


Rycina 29. Analiza uszkodzeń DNA. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SEM z 3 niezależnych powtórzeń (n = 3). Różnice we wrażliwości komórek HeLa pIRES_OXCT1 porównano do kontroli HeLa pIRES za pomocą testu t-Studenta (**** p < 0,0001; *** p < 0,001; * p < 0,05).

6.3.4. Możliwości migracyjne i inwazyjne komórek HeLa OXCT1 OX

Korzystając z komory Boydena sprawdzono zdolność komórek HeLa OXCT1 OX do migracji i inwazji. Na podstawie przeprowadzonych analiz zauważono, że komórki HeLa pIRES_OXCT1 wykazują znacznie większy potencjał migracyjny (wzrost komórek uległych migracji o 60%) i inwazyjny (wzrost o ponad 100%) w porównaniu do komórek HeLa pIRES (Ryc. 30A). Obserwacja ta zasugerowała, iż komórki z nadekspresją *OXCT1* mogą wykazywać

zwiększoną ekspresję genów zaangażowanych w EMT. Aby to sprawdzić, przeprowadzono analizę na poziomie transkryptu metodą RT-qPCR. Na skutek tych badań, zauważono, iż poziom ekspresji markerów epitelialnego charakteru komórek (*CDH1*, *MUC1*), podobnie jak jednego z markerów mezenchymalnego charakteru (*CDH2*) był zwiększony w komórkach HeLa pIRES_OXCT1 (2,5-krotny wzrost poziomu *CDH1*, wzrost *CDH2* o 40% oraz wzrost *MUC1* o 15%). Pozostałe markery EMT w komórkach HeLa pIRES_OXCT1 były obniżone w porównaniu do kontroli – HeLa pIRES (*SNAI1* o 10%, *SNAI2* o 30% oraz *VIM* o 40%) (Ryc. 30B).

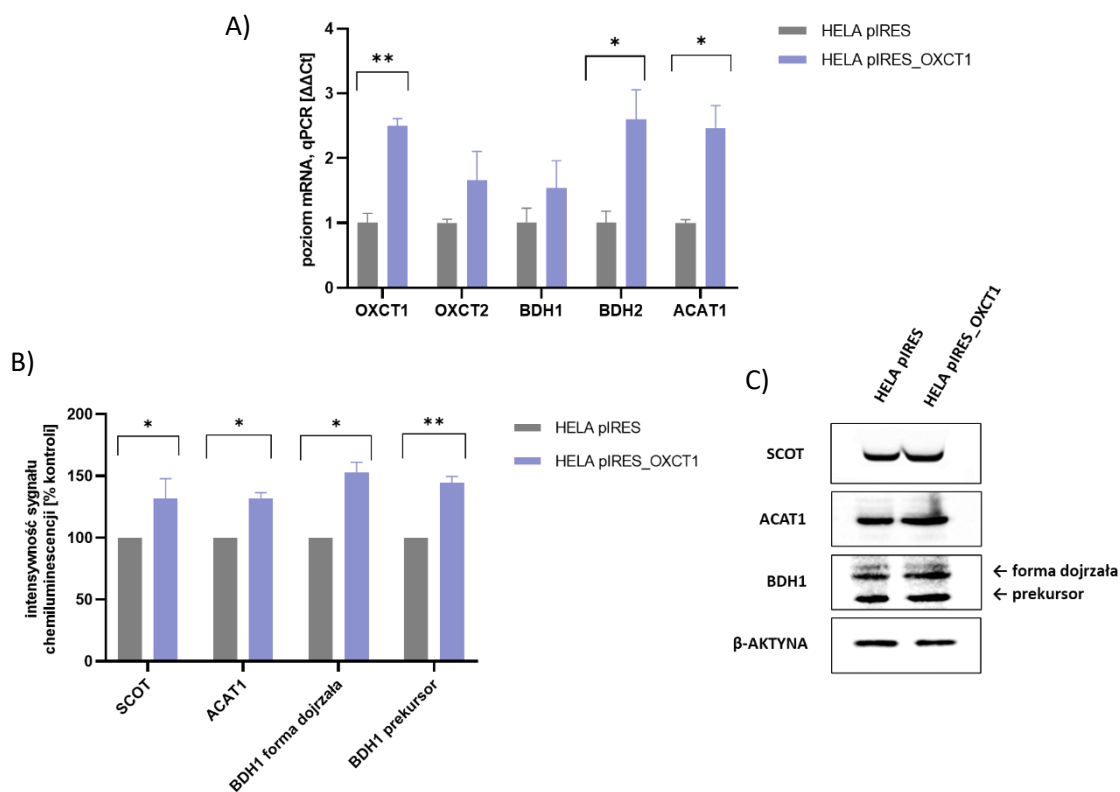


Rycina 30. Możliwości migracyjne i inwazyjne komórek HeLa OXCT1 OX. **(A)** Ocena potencjału **(A')** migracyjnego i **(A'')** inwazyjnego (obserwacje mikroskopowe przeprowadzone pod powiększeniem 100x). Analiza ekspresji markerów przejścia epitelialno-mezenchymalnego na poziomie **(B)** transkrypcyjnym i **(C)** białka; **(D)** reprezentatywny blot. Wyniki przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe z 3 niezależnych powtórzeń (n = 3). Różnice w potencjale migracyjnym i inwazyjnym komórek HeLa pIRES_OXCT1 porównano do kontroli HeLa pIRES za pomocą testu t-Studenta (***) p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05).

Analizy poziomu białek regulujących EMT przeprowadzone za pomocą techniki Western blotting, przedstawiły nieco odmienny charakter komórek HeLa pIRES_OXCT1. Białka SNAIL i SLUG kodowane odpowiednio przez geny *SNAIL1* i *SNAIL2* zostały zaobserwowane na wyższym poziomie w porównaniu do komórek HeLa pIRES (oba wykazały wzrost poziomu ekspresji o ok. 50%, podobnie jak E-kadheryna). Ponadto, wykazano 2-krotny wzrost poziomu N-kadheryny oraz 30% spadek poziomu wimentyny w komórkach HeLa pIRES_OXCT1 względem HeLa pIRES. Obserwacje te sugerują, iż komórki HeLa pIRES_OXCT1 mogą wykazywać hybrydowy charakter epitelialno-mezenchymalny, z potencjałem na zwiększony charakter mezenchymalny [Sinha et al., 2020] (**Ryc. 30C**).

6.3.5. Metabolizm ciał ketonowych komórek HeLa OXCT1 OX

Aby zbadać potencjalny wpływ nadekspresji genu OXCT1 na czynniki zaangażowane w metabolizm ciał ketonowych, przeprowadzono analizy na poziomie transkryptu metodą RT-qPCR oraz na poziomie białka metodą Western blotting.



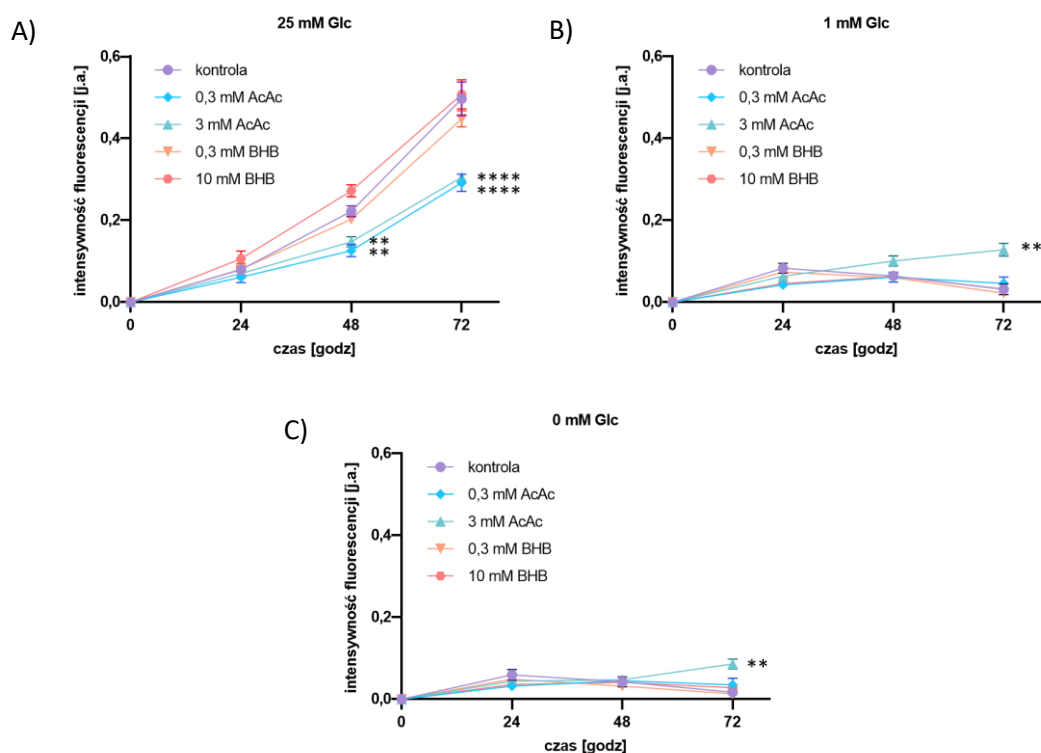
Rycina 31. Ekspresja czynników zaangażowanych w metabolizm ciał ketonowych na poziomie (A) transkryptu i (B) białka; (C) reprezentatywny blot. Wyniki przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe z 3 niezależnych powtórzeń (n = 3). Różnice w ekspresji badanych czynników w komórkach HeLa pIRES_OXCT1 porównano do kontroli HeLa pIRES za pomocą testu t-Studenta (** p < 0,01; * p < 0,05).

Zaobserwowano, iż ekspresja genów kodujących zarówno białka mitochondrialne (*OXCT1*, *OXCT2*, *ACAT1*, *BDH1*), jak i cytozolowe (*BDH2*) jest zwiększona w komórkach HeLa pIRES_OXCT1 (*OXCT1*, *BDH2* i *ACAT* ok. 2,5-krotnie, *OXCT2* o 60%, *BDH1* o 50%) (**Ryc. 31A**). Zbadany poziom białek również okazał się być zwiększony w komórkach HeLa pIRES_OXCT1 (SCOT i ACAT1 o 30%, dojrzała forma BDH1 i jego prekursor o ok. 50%) (**Ryc. 31B**).

Obserwacja ta potwierdza, iż nadekspresja *OXCT1* w komórkach HeLa może prowadzić do zwiększonej ekspresji genów i zwiększonego poziomu kodowanych przez nich białek metabolizmu ciał ketonowych.

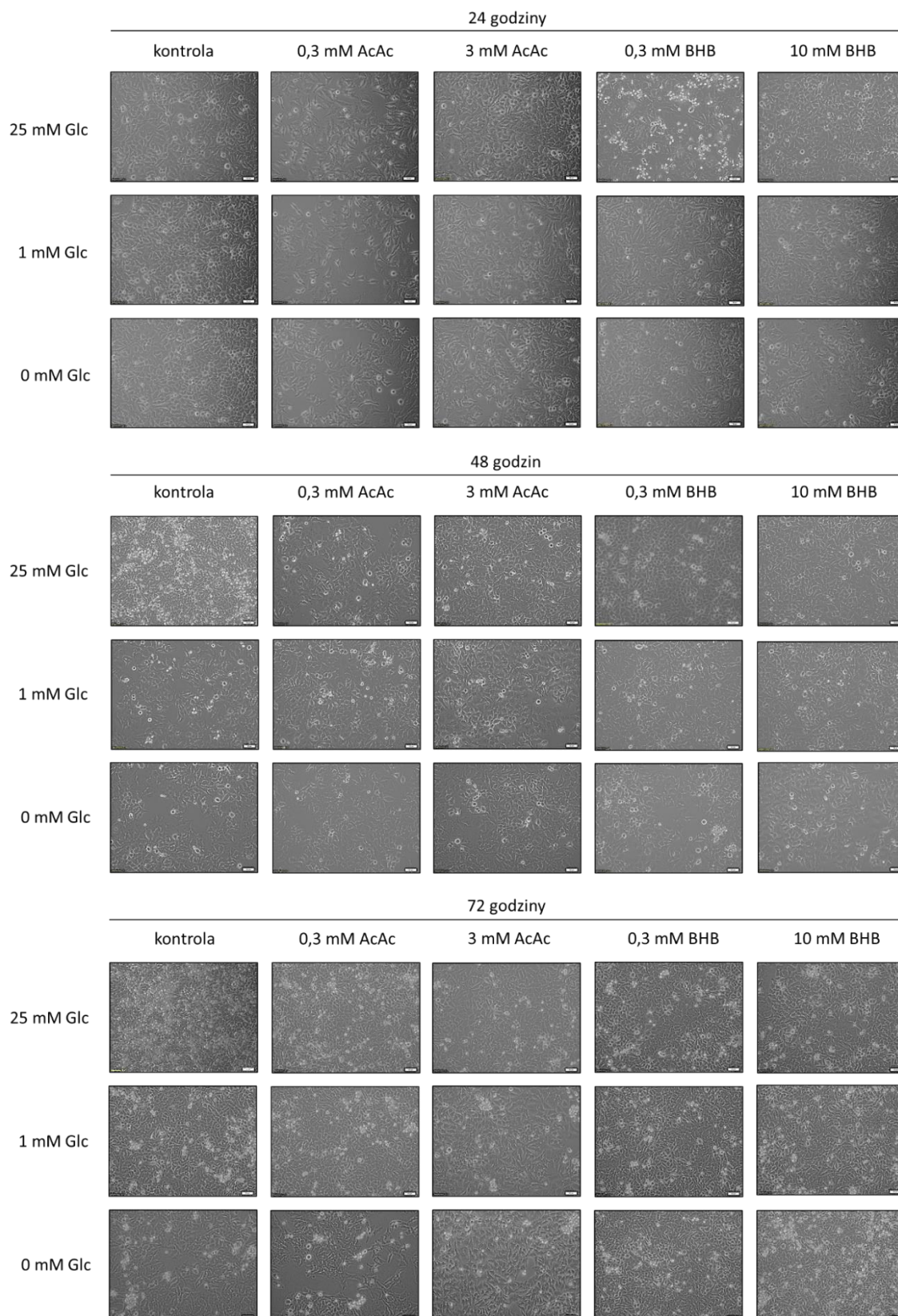
6.4. Analiza komórek HeLa hodowanych w zmiennych warunkach glikemicznych

Chcąc sprawdzić, czy zmienne warunki glikemiczne wraz z dodatkiem ciał ketonowych – β -hydroksymaślanu (BHB) i acetoctanu (AcAc) – wpłyną na szybkość proliferacji komórek HeLa, przeprowadzono 72-godziną inkubację komórek w podłożu hodowlanym wysokoglukozowym (25 mM Glc), niskoglukozowym (1 mM Glc) i pozbawionym glukozy (0 mM Glc). Początkowo, dodane stężenia ciał ketonowych odwzorowywały stan optymalnej (0,3 mM BHB i AcAc) ketozy *in vivo*. W kolejnym etapie zwiększono stężenia ciał ketonowych, aby zimitować stan głębokiej ketozy *in vivo* w naturalnie występującym stosunku 1:3 (3 mM AcAc i 10 mM BHB). Na podstawie testu redukcji resazuryny (**Ryc. 32**) i obserwacji mikroskopowych (**Ryc. 33**), zauważono, iż komórki HeLa reagują wzmożoną (**Ryc. 32A**) lub zahamowaną (**Ryc. 32B, 32C**) proliferacją w zależności od zastosowanych warunków hodowlanych. Ogólnie, zmniejszenie stężenia glukozy w podłożu hodowlanym znacznie wpływa na obniżenie szybkości proliferacji komórek, nawet podczas dodatkowej suplementacji ciałami ketonowymi. Jedynie w warunkach niskoglikemicznych (1 mM Glc) z dodatkiem 3 mM AcAc (**Ryc. 32B**), komórki HeLa kontynuowały podział komórkowy (zaobserwowany 60-procentowy i 4-krotny wzrost intensywności fluorescencji w 48 i 72 godzinie inkubacji, odpowiednio). Podobnie w warunkach całkowitej deprivacji glukozy (**Ryc. 32C**), gdzie komórki wydawały się być zastymulowane do podziału między 48 a 72 godziną inkubacji dzięki suplementacji 3 mM AcAc (odnotowany 3-krotny wzrost intensywności fluorescencji w 72 godzinie).



Rycina 32. Szybkość proliferacji komórek HeLa hodowanych z dodatkiem soli sodowej β -hydroksymaślanu (BHB) lub soli sodowej acetoctanu (AcAc) w warunkach (A) wysokoglikemicznych, (B) niskoglikemicznych oraz (C) deprivacji glukozy. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm odchylenie standardowe z 3 niezależnych

powtórzeń ($n = 3$). Różnice w proliferacji komórek HeLa inkubowanych z ciałami ketonowymi porównano do kontroli stanowiącej nietraktowane komórki HeLa za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (one-way ANOVA), a następnie testu post-hoc Dunnetta (**** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$).



Rycina 33. Obserwacje mikroskopowe (powiększenie 100x) komórek HeLa hodowanych z dodatkiem soli sodowej β -hydroksymaślanu (BHB) lub soli sodowej acetoctanu (AcAc) w warunkach wysokoglikemicznych (25 mM Glc), niskoglikemicznych (1 mM Glc) oraz deprivacji glukozy (0 mM Glc).

7. DYSKUSJA

Ostatnimi czasy, dieta ketogeniczna – wysokotłuszczowa i zarazem niskowęglowodanowa, z odpowiednią podażą białka – została zaproponowana jako forma terapii wspomagającej leczenie nowotworów. Założeniem ograniczenia węglowodanów w diecie jest osłabienie efektu Warburga, zjawiska biochemicznego wykorzystującego głównie glikolizę zamiast fosforylacji oksydacyjnej do produkcji ATP przez komórki nowotworowe. Z uwagi na poddawaną w wątpliwość zdolność komórek nowotworowych (w zależności od różnego pochodzenia i stopnia agresywności) do efektywnego metabolizowania ciał ketonowych na drodze ketolizy, wprowadzenie pacjentów onkologicznych w stan podwyższonego poziomu ciał ketonowych, zwanego stanem ketozy, wydaje się być kluczowym dla pozbawienia komórek rakowych energii przy jednoczesnym przestawieniu komórek prawidłowych na wykorzystywanie ketolizy jako głównego procesu wytwarzania energii. W katabolizmie ciał ketonowych istotną rolę odgrywa transferaza bursztynylo-CoA:3-ketokwas-CoA (SCOT, ang. *succinyl-CoA:3-ketoacid-CoA transferase*), enzym kodowany przez gen *OXCT1*, którego wyciszenie potencjalnie prowadzi do zwiększenia poziomu ciał ketonowych na skutek zahamowanego ich dalszego rozkładu. Aby sprawdzić, czy podwyższony poziom ciał ketonowych doprowadzi do spowolnienia proliferacji komórek nowotworowych, przeprowadzono szereg analiz z wykorzystaniem komórek raka szyjki macicy HeLa z wyciszoną monoallelicznie i biallelicznie ekspresją genu *OXCT1* oraz nadekspresją genu *OXCT1*, a ponadto dokonano inkubacji niemodyfikowanych komórek HeLa w zmiennych warunkach glikemicznych z dodatkiem ciał ketonowych – β -hydroksymaślanu i acetooctanu.

Otrzymane rezultaty badań podkreślają istotność ostrożnej interpretacji wyników analiz z wykorzystaniem komórek manipulowanych genetycznie. Prace nad rolą genu *OXCT1* w regulacji potencjału nowotworowego komórek HeLa rozpoczęto od charakterystyki tychże komórek z monoallelicznie wyciszoną ekspresją *OXCT1*. Zaobserwowane na skutek przeprowadzonego testu redukcji resazuryiny znaczne spowolnienie proliferacji (spadek o ok. 50% w 96 godzinie inkubacji) komórek HeLa *OXCT1*^{+/-} względem komórek HeLa WT (**Ryc. 14A**) początkowo zdawało się potwierdzać hipotezę o spowolnieniu proliferacji komórek HeLa na skutek zwiększonego poziomu ciał ketonowych. Przeprowadzenie tej samej analizy z wykorzystaniem komórek HeLa z nadekspresją genu *OXCT1* dodatkowo potwierdziło tę hipotezę, gdyż wyniki przedstawiły zwiększoną o 20% proliferację komórek HeLa pIRES_*OXCT1* w porównaniu do komórek HeLa pIRES (**Ryc. 23A**) (wyniki korelujące z późniejszą analizą indeksu mitotycznego [**Ryc. 24**]). Obserwacje te wstępnie zasugerowały, iż akumulacja ciał ketonowych na skutek zahamowanego ich rozkładu w komórkach HeLa *OXCT1*^{+/-} prowadzi do zmniejszenia podziałów komórkowych, podczas gdy zwiększony katabolizm ciał ketonowych dzięki nadekspresji *OXCT1* skutkuje przyspieszeniem proliferacji komórek. Jednakże, równocześnie otrzymane rezultaty oceny efektywności wyciszenia

i nadekspresji genu *OXCT1* w komórkach HeLa (a dokładnie: odnotowany słaby sygnał immunofluorescencji białka SCOT w komórkach HeLa *OXCT1*^{+/-}) poprowadziły ku rozważaniom nad skutecznością zastosowanej metody CRISPR/Cas9. Pamiętając, iż inne powszechnie stosowane techniki manipulacji genowej, takie jak siRNA czy shRNA, nie skutkują 100% wydajnością, zdecydowano o przeprowadzeniu testu Surveyor. Uzyskane wyniki dla komórek HeLa WT i HeLa *OXCT1*^{+/-} wykazały, iż wyciszenie nastąpiło w 1 allelu genu *OXCT1* (**Ryc. 11B**). Zakładając, iż bialleliczne wyciszenie *OXCT1* jedynie potwierdzi dotychczasowe obserwacje, przeprowadzono transfekcję komórek HeLa plazmidem SCOT HDR2 (**Ryc. 9C**). Zaskakująco, analiza szybkości proliferacji otrzymanych komórek HeLa *OXCT1*^{-/-} wykazała zwiększone o 50% podziały komórkowe w porównaniu do komórek HeLa WT (**Ryc. 14A**). Zauważone różnice między komórkami HeLa *OXCT1*^{+/-} i HeLa *OXCT1*^{-/-} są zastanawiające – podejrzewa się, że zjawisko spowolnionych podziałów komórkowych HeLa *OXCT1*^{+/-} najprawdopodobniej jest konsekwencją tzw. „off-targetu” polegającego na wyciszeniu oprócz *OXCT1* jeszcze innego, bliżej nieokreślonego genu, co dalszej perspektywie badań będzie analizowane techniką sekwencjonowania nowej generacji (NGS, ang. *next-generation sequencing*) – RNAseq.

Na skutek zauważalnych różnic w szybkości proliferacji komórek HeLa *OXCT1* KO (HeLa WT, HeLa *OXCT1*^{+/-} i HeLa *OXCT1*^{-/-}), przeprowadzono analizę rozkładu faz cyklu komórkowego. Eksperymenty z wykorzystaniem cytometru przepływowego wykazały nieco zwiększoną (o ok. 5%) liczebność komórek HeLa *OXCT1*^{+/-} w fazie G₀/G₁, co wskazuje na niewielkie zatrzymanie komórek w tej fazie na skutek możliwych uszkodzeń DNA i/lub zakłóceń w szlakach sygnałowych wywołanych zmniejszoną dostępnością czynników wzrostu i/albo składników odżywczych. Brak różnic między dystrybucją komórek HeLa *OXCT1*^{+/-} i *OXCT1*^{-/-} w fazie S sugeruje, iż zaburzenia w fazie G₀/G₁ komórek HeLa *OXCT1*^{-/-} zostały sprawnie naprawione. Zauważalny spadek (o ok. 50%) liczebności komórek HeLa *OXCT1*^{+/-} i HeLa *OXCT1*^{-/-} względem HeLa WT w fazie G₂/M świadczy o pozytywnym przejściu przez punkt kontroli zduplikowanego DNA i pozwoleniu komórce na podział (**Ryc. 14C**). W przypadku komórek HeLa *OXCT1* OX, otrzymane wyniki dostarczyły informacji o przesunięciu komórek HeLa pIRES_*OXCT1* z fazy G₀/G₁ do fazy S. Zmniejszony o 30% poziom populacji komórek HeLa pIRES_*OXCT1* w fazie G₂/M względem komórek HeLa pIRES sugeruje sprawniejsze przejście komórek przez punkty kontrolne i dopuszczenie komórek do podziału (**Ryc. 23C**).

Ocena ekspresji genów zaangażowanych w cykl komórkowy umożliwiła uzyskanie pełniejszego obrazu różnic w obrębie HeLa *OXCT1* KO i HeLa *OXCT1* OX. Ponad dwukrotnie zwiększona ekspresja genu *CDKN1A* wraz z prawie 2,5-krotnie zwiększoną ekspresją *CCNE1* w komórkach HeLa *OXCT1*^{-/-} może potwierdzać ich zatrzymanie w fazie G₀/G₁. Blisko 1,5-krotnie zwiększony poziom ekspresji genu *CCNY* w komórkach może świadczyć o pełnieniu przez białko CCNY funkcji czynnika wzrostu w komórkach HeLa *OXCT1*^{+/-}

i HeLa *OXCT1*^{-/-}, a ponadto o zwiększaniu ekspresji *CCNE1*, a zatem cykliny CCNE, jak dotychczas udokumentowano w komórkach raka krtani Hep2 [Zhao et al., 2020]. Obniżony (odpowiednio: o 30% i prawie 50%) poziom ekspresji *CCNA1* i *CCNB1* w komórkach HeLa *OXCT1*^{+/-} i HeLa *OXCT1*^{-/-} w porównaniu do HeLa WT koresponduje z ich obniżoną liczebnością w fazie G₂/M (**Ryc. 14B, 14C**). Analizując ekspresję genów zaangażowanych w przebieg cyklu komórkowego komórek HeLa *OXCT1* OX, zaobserwowano obniżenie ekspresji genu *TP53* o 20% w komórkach HeLa pIRES_*OXCT1*. Może to mieć związek z nieco obniżoną (poniżej 5%) liczebnością komórek w fazie G₀/G₁ na rzecz fazy S, w której to standardowa zwiększona (w niniejszej pracy: o ok. 20%) ekspresja *CCNE1* potwierdzona jest przez otrzymane wyniki. Podobnie jak w komórkach HeLa *OXCT1* KO, zwiększona o 40% ekspresja *CCNY* w komórkach HeLa pIRES_*OXCT1* względem komórek HeLa pIRES może świadczyć o funkcjonowaniu tego białka jako czynnik wzrostu, a na dodatek modulator ekspresji genu *CCNE*. Obniżona o 25% ekspresja *CCNA1* i *CCNB1* w komórkach HeLa pIRES_*OXCT1* pokrywa się z zaobserwowanym obniżeniem o ok. 30% poziomu populacji komórek w fazie G₂/M (**Ryc. 23B, 23C**).

Wyciszenie genu *OXCT1* w komórkach HeLa bezsprzecznie zaburzyło ich maszynię cyklu komórkowego, jednakże przeprowadzona analiza rozkładu faz cyklu komórkowego za pomocą cytometru przepływowego, jak i analiza ekspresji genów zaangażowanych w cykl komórkowy przeprowadzona metodą RT-qPCR, nie wykazały jednoznacznie, aby którykolwiek z badanych czynników miał decydujący wpływ na obserwowane różnice w szybkości proliferacji komórek HeLa *OXCT1*^{+/-} i HeLa *OXCT1*^{-/-}. Najprawdopodobniej, odpowiedzialny za wspomniane zmiany jest inny mechanizm, który nie został zbadany w niniejszej pracy. Choć zmiany na poziomie molekularnym nie tłumaczą rozbieżności w szybkości podziałów komórkowych HeLa *OXCT1*^{+/-} i HeLa *OXCT1*^{-/-}, były one mocno zauważalne podczas codziennej pracy z komórkami.

Kontynuując analizę proliferacji komórek HeLa *OXCT1* KO i HeLa *OXCT1* OX, skupiono się na ocenie ich zdolności do tworzenia kolonii. Test klonogeny wykazał, że monoalleliczne wyciszenie genu *OXCT1* znacząco zmniejszyło (o 80%) zdolność komórek HeLa *OXCT1*^{+/-} do formowania kolonii w porównaniu do komórek HeLa WT. Kolonie utworzone przez komórki HeLa *OXCT1*^{+/-} składały się częściowo z minimalnej liczby komórek pozwalającej na zaakceptowanie danego skupiska jako pojedynczej kolonii (≤ 50 komórek). W przypadku komórek HeLa *OXCT1*^{-/-} zauważono, natomiast, znacznie zwiększoną wydajność tworzenia kolonii (**Ryc. 15A**). Dzięki obserwacjom mikroskopowym, zaobserwowano również różnice morfologiczne między komórkami HeLa *OXCT1* KO. Komórki HeLa *OXCT1*^{-/-} są większe, bardziej wydłużone, w porównaniu do HeLa WT. Przeciwny obraz jest zauważalny dla komórek HeLa *OXCT1*^{+/-}, które wydają się być skurczone (**Ryc. 15B**). W komórkach z nadekspresją genu *OXCT1* zaobserwowano, iż komórki HeLa pIRES_*OXCT1* o 15% wydajniej tworzą kolonie niż komórki HeLa pIRES (**Ryc. 27A**). Dodatkowo, obrazowanie mikroskopowe wykazało niewielkie różnice w wielkości formowanych kolonii – komórki HeLa pIRES_*OXCT1*

tworzyły kolonie z nieco większej liczby komórek w porównaniu do komórek HeLa pIRES (Ryc. 27A').

Komórki HeLa są modelową linią komórkową służącą do badania zdolności do tworzenia kolonii – to właśnie na nich opracowano pierwszy test klonogenny w 1956 roku [Puck et al., 1956]. Komórki HeLa WT efektywnie tworzą kolonie w przeciwieństwie do komórek HeLa OXCT1^{+/-}, które dodatkowo słabo zabarwiają się fioletem krystalicznym. Fiolet krystaliczny jest barwnikiem wnikałym do jąder komórkowych skutkując głęboką fioletową barwą. Zaobserwowane delikatne zabarwienie komórek HeLa OXCT1^{+/-} może sugerować uszkodzenie jąder, sprawdzenie tej hipotezy wymagałoby jednak bardziej dokładnych analiz immunocytochemicznych. Komórki HeLa OXCT1^{-/-}, natomiast, zabarwione były na głęboki fioletowy kolor, sugerując, iż kolonie zostały utworzone z większej liczby komórek w porównaniu do komórek HeLa WT [Rundén-Pran et al., 2022]. Obserwacja ta potwierdzałaby zwiększoną proliferację zauważoną we wcześniejszych analizach. Dodatkowo, przypuszcza się, iż zauważone różnice morfologiczne komórek związane są z momentem fazy cyklu komórkowego, w którym się znajdują. Intensywniejsze zabarwienie fioletem krystalicznym komórek HeLa OXCT1^{-/-} może wskazywać na moment podziału komórek, w którym pośrednio obserwowane jest zwiększenie liczby jąder komórkowych. Choć komórki HeLa pIRES_OXCT1 tworzyły liczniejsze w komórki kolonie w porównaniu do HeLa pIRES, nie znalazło to silnego przełożenia na intensywność zabarwienia fioletem krystalicznym (Ryc. 27A).

Obserwacje zebrane na skutek przeprowadzonych analiz proliferacji oraz rozkładu faz cyklu komórkowego komórek HeLa OXCT1 KO sugerują, iż gen *OXCT1* może być zaangażowany w szlaki sygnałowe kontrolujące podziały komórkowe w raku szyjki macicy. W literaturze naukowej tematu informacje odnoszące się do potencjalnej roli *OXCT1* w progresji nowotworu są dość ubogie. Udokumentowano, że wyciszenie *OXCT1* w komórkach raka wątrobowokomórkowego HepG2 znacznie osłabiło wzrost guza *in vivo* [Maldonado et al., 2021]. Podobnie, wykazano, że wyciszenie ekspresji *OXCT1* antysensownego RNA 1 (*OXCT1-AS1*) znacząco obniża proliferację komórek glejaka wielopostaciowego (linie komórkowe A172, LN229, U87, U251 i U373) [Zhong et al., 2021]. Badania przeprowadzone na tkankach drobnokomórkowego raka płuc wykazały, że obniżenie poziomu kolistego *OXCT1* (*circ-OXCT1*) również zahamowało proliferację i formowanie guza [Luo et al., 2023]. Przedstawione przykłady są sprzeczne z wynikami otrzymanymi na skutek przeprowadzonych analiz w niniejszej pracy, co dowodzi, iż wpływ wyciszenia *OXCT1* na proliferację i wzrost komórek rakowych jest zależny od rodzaju nowotworu. Dokładne mechanizmy będące u podstaw tego zjawiska pozostają niejasne.

Badając zdolność komórek HeLa OXCT1 KO do tworzenia struktur 3D, zauważono, iż komórki HeLa OXCT1^{-/-} tworzą większe sferoidy (~200 µm średnicy) w porównaniu do komórek HeLa WT. Komórki HeLa OXCT1^{+/-} utworzyły sferoidy o wielkości zbliżonej do HeLa

WT (~150 μm średnicy) z nieco rozproszonymi pojedynczymi komórkami na brzegach (**Ryc. 16**). Otrzymane wielkości sfer utworzonych przez komórki HeLa OXCT1 KO znajdują się w zakresie wskazanym w literaturze naukowej tematu [Roy et al., 2023], [Pereira et al., 2017]. Dotychczas nie przedstawiono wyników badań obejmujących wpływ wyciszenia genu *OXCT1* na zdolność tworzenia sferoidów przez komórki ludzkie. Formowanie się sferoidów obejmuje kilka etapów, wśród których wyróżnia się (i) agregację rozproszonych komórek przez włókna macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix*) prowadząc do zwiększonej produkcji kadheryny, (ii) akumulację kadheryny na powierzchni komórki oraz (iii) tworzenie połączeń typu kadheryna-kadheryna między sąsiadującymi komórkami pozwalając na zacieśnienie połączeń między tymi komórkami [Białkowska et al., 2020]. Zauważona dyspersja komórek na brzegach sferoidów utworzonych przez komórki HeLa OXCT1^{+/-} może sugerować, że wraz z czasem trwania hodowli komórki tracą połączenia typu kadheryna-kadheryna. Jednymi z głównych kadheryn odpowiadających za połączenia międzykomórkowe jest E-kadheryna i N-kadheryna, których poziom ekspresji jest istotny dla zaindukowania EMT. Ogólnie, formowanie sferoidów może być związane z EMT. Między sferoidami utworzonymi przez komórki HeLa OXCT1 OX nie zaobserwowano różnic w średnicy (**Ryc. 27B**). Otrzymane wyniki sugerują, iż choć komórki HeLa pIRES_OXCT1 charakteryzują się szybszą proliferacją względem komórek HeLa pIRES, ich wzrost nie jest związany z nadekspresją genu *OXCT1*.

Ogólnie, analizy ekspresji genów zebrane w atlasie The Cancer Genome Atlas (TCGA, PanCancer Atlas) i Breast Invasive Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas) przedstawiają zwiększoną tendencję do przeżycia u pacjentów chorujących na raka piersi charakteryzujących się nadekspresją *OXCT1* [dane cBioPortal for Cancer Genomics, 2023]. Jednocześnie, analizy wzrostu guza przeprowadzone *in vitro* i *in vivo* na komórkach raka wątrobowokomórkowego (linie komórkowe HepG2, Hep3B, PLC, HEK293 i HEK293T) wykazały, że nadekspresja *OXCT1* promuje progresję nowotworu [Huang et al., 2016]. Jest to ciekawa obserwacja biorąc pod uwagę, że zarówno ekspresja genu *OXCT1*, jak i cały proces ketolizy, są nieobecne w prawidłowych komórkach wątroby, co czyni *OXCT1* potencjalnym celem terapeutycznym w leczeniu raka wątrobowokomórkowego.

Ze względu na zaobserwowane różnice w rozkładzie faz cyklu komórkowego między komórkami HeLa OXCT1 OX, dokonano immunocytofluorescencyjnej analizy poziomu kinazy punktu kontrolnego (Chk, ang. *checkpoint kinase*) 1 i 2. Przeprowadzone eksperymenty wykazały 7-krotnie zwiększony poziom ufosforylowanych form Chk1 (Chk1S317ph i Chk1S345ph), jak i 3-krotny wzrost poziomu ufosforylowanej formy Chk2 (Chk2T68ph) w komórkach HeLa pIRES_OXCT1 w kontroli (HeLa pIRES), jak i do nieaktywnych form analizowanych kinaz (nieufosforylowanych) komórek HeLa pIRES_OXCT1 (**Ryc. 25A, 25B**). Nieufosforylowane Chk1 i Chk2 w komórkach HeLa OXCT1 OX są na poziomie konstytutywnym. Silniejsza odpowiedź Chk1 w porównaniu do Chk2 zdaje się potwierdzać istotność Chk1 w regulacji cyklu komórkowego stanowiąc ją głównym efektem punktów

kontrolnych intra-S i G₂/M, podczas gdy Chk2 pełni raczej rolę wspomagającą, wywierając częściowy wpływ na punkty kontrolne intra-S i G₁/S [Stracker et al., 2009]. Podobnie, silniejsza odpowiedź dla Chk1S317ph w porównaniu do Chk1S345ph potwierdzałyby rolę Chk1S317ph w fosforylacji seryny 345 (S345ph) tego samego białka [Wang et al., 2012]. Z kolei, fosforylacja obu kinaz (Chk1S317ph, Chk1S345ph, Chk2T68ph) jako „kontrolerów” punktów kontrolnych może być związana z zatrzymaniem komórek HeLa pIRES_OXCT1 w fazie S na skutek prawdopodobnych uszkodzeń. Warto zauważyć, iż fosforylacja Chk1 i Chk2 odgrywa również rolę w aktywacji białek uczestniczących w szlakach naprawy DNA [Dai et al., 2010], [Patil et al., 2013] – obserwacja ta może być związana ze zmniejszoną liczbą komórek HeLa pIRES_OXCT1 w fazie G₂/M, sugerując, iż potencjalne uszkodzenia zostały sprawnie naprawione, a komórki weszły w mitozę szybciej w porównaniu do komórek HeLa pIRES (**Ryc. 23C**). Szybszą proliferację komórek HeLa pIRES_OXCT1 względem komórek HeLa pIRES zaobserwowano już wcześniej (**Ryc. 23A, 24**), a obserwacje mikroskopowe wybarwionych immunofluorescencyjnie ufosforylowanych kinaz Chk1 i Chk2 (zauważalne komórki w trakcie podziału) silnie podkreślają zwiększoną zdolność komórek HeLa z nadekspresją genu *OXCT1* do podziałów komórkowych. Podobnie, zwiększona fosforylacja histonu H2AX skutkująca formą H2AXS139ph (γ H2AX) na 1,5-krotnie wyższym poziomie od formy nieufosforylowanej w komórkach HeLa pIRES_OXCT1 względem HeLa pIRES (**Ryc. 26A**) może być związana z blokiem komórek w fazie S, a następnie naprawą prawdopodobnych uszkodzeń lub odpowiadać wyłącznie na stres replikacyjny [Dhuppar et al., 2020].

Różnice w szybkości proliferacji komórek HeLa OXCT1 KO doprowadziły do pytania, czy komórki na skutek wyciszenia genu *OXCT1* stały się upośledzone (HeLa OXCT1^{+/-}) czy wręcz w pewien sposób usprawnione (HeLa OXCT1^{-/-}). Podobnie w przypadku komórek HeLa OXCT1 OX, gdzie zwiększona szybkość proliferacji komórek HeLa pIRES_OXCT1 mogłaby sugerować lepsze mechanizmy adaptacyjne wobec warunków środowiska, a tym samym zwiększoną oporność na cytostatyki. Aby to sprawdzić, przeprowadzono analizę wrażliwości komórek HeLa OXCT1 KO i HeLa OXCT1 OX na związki powszechnie stosowane u pacjentek poddanych terapii raka szyjki macicy, tj. doksorubicyny i cisplatyny. Dodatkowo, komórki poddane były inkubacji z czynnikami utleniającymi – wodoronadtlenkiem tert-butyłu (t-BOOH) oraz nadtlenkiem wodoru (H₂O₂). Przeprowadzony test badający aktywność mitochondriów z wykorzystaniem soli tetrazolowej wykazał, iż komórki HeLa OXCT1^{-/-} są najbardziej odporne na działanie cisplatyny i doksorubicyny w wybranym zakresie stężeń. W przypadku czynników utleniających, komórki HeLa WT okazały się być bardziej wytrzymałe na działanie tych związków od komórek HeLa OXCT1^{-/-}. Komórki HeLa OXCT1^{+/-} w obu przypadkach zaś cechowały się najmniejszą opornością (**Ryc. 17**). Otrzymane wyniki dla komórek HeLa OXCT1 OX wskazują na większą wrażliwość komórek HeLa pIRES_OXCT1 na działanie wszystkich związków (**Ryc. 28**).

Cisplatylna jest najskuteczniejszym lekiem stosowanym w terapii raka szyjki macicy, zarówno zaawansowanego miejscowo, jak i przerzutuującego, a oporność na ten związek jest główną przyczyną nawrotów choroby i śmiertelności [dane American Cancer Society]. Mechanizm działania cisplatylny opiera się na przyłączeniu tego związku do reszt purynowych w strukturze DNA generując uszkodzenia skutkujące zablokowaniem podziałów komórkowych i śmiercią apoptotyczną komórek [Dasari et al., 2014]. W komórkach raka jajnika cechujących się opornością na cisplatylnę (linie komórkowe OVCAR-3, OV-90 i SK-OV-3), ekspresja *OXCT1* na poziomie transkryptu była znacznie obniżona w porównaniu do komórek wrażliwych na cisplatylnę (linie komórkowe PA-1, TOV-21G, TOV-112D, Caov-3 i A2780). Jednocześnie wykazano, że nadekspresja genu *OXCT1* zwiększa wrażliwość komórek na ten związek [Yang et al., 2018]. Na skutek tych obserwacji można by wysnuć hipotezę, iż wyciszenie ekspresji *OXCT1* spowoduje zwiększenie oporności na cisplatylnę w komórkach raka szyjki macicy. Wspomniane rezultaty badań częściowo korelują z wynikami otrzymanymi w niniejszej pracy. Komórki HeLa *OXCT1*^{-/-} faktycznie cechują się zarówno najniższą ekspresją *OXCT1* na poziomie transkryptu (**Ryc. 13A**), jak i wykazują największą oporność na cisplatylnę (**Ryc. 17**). Jednakże, komórki HeLa *OXCT1*^{+/-} pomimo znacznie obniżonej ekspresji *OXCT1* względem komórek HeLa WT (**Ryc. 13A**) okazały się najbardziej wrażliwe na działanie cisplatylny (**Ryc. 17**). Może być to spowodowane ogólnym obniżeniem proliferacji komórek na skutek monoallelicznego wyciszenia *OXCT1*.

Dokсорubicyna prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego poprzez wiązanie się z topoizomerazą II i hamowanie replikacji DNA [Paskeh et al., 2022]. W literaturze naukowej tematu obecnie brak jest informacji łączących wyciszenie genu *OXCT1* w komórkach nowotworowych z wrażliwością na dokсорubicynę. Zaobserwowany efekt działania tego związku na komórki HeLa *OXCT1* KO pokrywa się z opisanym powyżej efektem wywołanym przez cisplatylnę.

Uważa się, że t-BOOH silnie oddziałuje na mitochondria, skutkując obniżeniem poziomu syntezy ATP i wzrostem przepuszczalności błon mitochondrialnych [Bartoli et al., 1994]. Ponadto, związek ten prowadzi do peroksydacji lipidów – łańcucha reakcji oksydacyjnej degradacji lipidów, skutkującej śmiercią komórki [Perez et al., 2022]. Dochodzi do tego na skutek generowanych przez t-BOOH rodników uszkadzających zasady w obrębie DNA oraz poprzez utlenianie grupy tiolowej białek, prowadząc do zahamowania ich aktywności enzymatycznej [Ferrer-Sueta et al., 2011]. Podobnie, ostatnie doniesienia wskazują na rolę H₂O₂ w utlenianiu grupy tiolowej białek, skutkując progresją cyklu komórkowego, choć związek ten był dotychczas znany głównie jako indukujący uszkodzenia komórkowe i powodujący zatrzymanie cyklu komórkowego [Heo et al., 2020].

Potencjalny poziom uszkodzenia DNA zbadano za pomocą testu kometowego w dwóch modelach: (i) komórki HeLa *OXCT1* KO i HeLa *OXCT1* OX inkubowane z H₂O₂ i t-BOOH bez dodatku enzymów oraz (ii) komórki HeLa *OXCT1* KO i HeLa *OXCT1* OX inkubowane z H₂O₂

i t-BOOH wraz z enzymami stanowiącymi część maszyneryi naprawczej komórek (FPG i NTH). W pierwszym modelu testu zaobserwowano zwiększone uszkodzenie DNA w komórkach HeLa OXCT1^{-/-} w porównaniu do komórek HeLa WT (**Ryc. 18**). Poziom uszkodzeń był większy w komórkach inkubowanych z H₂O₂ i t-BOOH w porównaniu do komórek nietraktowanych. Na skutek modyfikacji testu, w komórkach inkubowanych z czynnikami utleniającymi zauważono wzrost uszkodzeń we wszystkich komórkach HeLa OXCT1 KO, szczególnie po dodaniu enzymu FPG (**Ryc. 18B, 18C**). Obserwacja ta potwierdza, iż stres oksydacyjny zaindukowany przez H₂O₂ i t-BOOH spowodował utlenienie puryn i pirymidyn. Porównując wpływ obu czynników utleniających na komórki HeLa OXCT1 KO, można zauważyć, iż t-BOOH silniej uszkadza DNA w porównaniu do H₂O₂. Analizując komórki HeLa OXCT1 OX, zaobserwowano, że komórki HeLa pIRES_OXCT1 są bardziej odporne na uszkodzenia DNA spowodowane stresem oksydacyjnym od komórek HeLa pIRES (**Ryc. 29**). Podobnie jak w komórkach z wyciszoną monoallelicznie i biallelicznie ekspresją genu *OXCT1*, działanie H₂O₂ i t-BOOH zaindukowało utlenienie puryn i pirymidyn, na skutek czego zaobserwowany został zwiększony poziom uszkodzeń DNA po dodaniu enzymu FPG (**Ryc. 29B, 29C**). Badany wpływ czynników utleniających wydaje się być zależny od poziomu genu *OXCT1* – zwiększony poziom uszkodzenia DNA zaindukowany przez H₂O₂ zauważalny jest w komórkach HeLa pIRES_OXCT1, podczas gdy niemal 2-krotnie silniejsze działanie t-BOOH pod tym kątem dostrzegalne jest w komórkach HeLa pIRES (w obu przypadkach po dodaniu enzymu FPG). Dodatek enzymu NTH, natomiast, wykazał zwiększone utlenienie puryn i pirymidyn w komórkach HeLa pIRES względem komórek HeLa pIRES_OXCT1 po inkubacji z H₂O₂ (**Ryc. 29B**).

Zwiększona oporność na działanie cisplatyny i doksorubicyny, a także szybsza proliferacja komórek HeLa OXCT1^{-/-} doprowadziła do rozważań, czy bialleliczne wyciszenie genu *OXCT1* ma związek z metastazą, gdyż komórki nowotworowe zdolne do przerzutowania charakteryzują się niekontrolowaną proliferacją oraz znacznie obniżoną wrażliwością na działanie chemioterapeutyków. Celem potwierdzenia lub zaprzeczenia tej hipotezie, dokonano analizy zdolności migracyjnych i inwazyjnych komórek HeLa OXCT1 KO. Wykazano, że komórki HeLa OXCT1^{-/-} charakteryzują się zwiększonym potencjałem migracyjnym (o 40%) i inwazyjnym (o prawie 120%) od komórek HeLa WT, w przeciwieństwie do komórek HeLa OXCT1^{+/-} (**Ryc. 19A**). W przypadku komórek HeLa OXCT1 OX, gdzie wcześniej zaobserwowano szybszą proliferację przy jednoczesnej zwiększonej wrażliwości na badane cytostatyki komórek HeLa pIRES_OXCT1, otrzymano wyniki wskazujące na znacznie zwiększone możliwości migracyjne (o 60%) i inwazyjne (o ponad 100%) komórek z nadekspresją genu *OXCT1* (**Ryc. 30A**).

Wśród dostępnych informacji na temat wpływu wyciszenia genu *OXCT1* na zdolności migracyjne i inwazyjne komórek nowotworowych, zauważalny jest skrajny efekt. Komórki niedrobnokomórkowego raka płuc wykazały zmniejszoną tendencję do migracji i inwazji na

skutek wyciszenia kolistego *OXCT1* (circ-*OXCT1*) [Luo et al., 2023], co stanowi wynik przeciwny do zaprezentowanego w niniejszej pracy. Podobnie, analizy przeprowadzone na tkankach raka pęcherza moczowego zademonstrowały zmniejszenie potencjału inwazyjnego komórek, a tym samym ich przerzutowanie do węzłów chłonnych, na skutek obniżenia ekspresji JAK1 promowanego przez wyciszenie *OXCT1-AS1*. Jednakże, nadekspresja *OXCT1* w tych samych tkankach skutkowałą zwiększonym potencjałem inwazyjnym komórek, a w rezultacie przerzutowaniem do węzłów chłonnych [Chen et al., 2019]. Warto zauważyć, iż zjawisko to wskazuje na sposób oddziaływania *OXCT1* na szlak sygnałowy, w który zaangażowane jest białko JAK1. Wyciszenie *OXCT1-AS1* w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc (A549, H1299, H23 i HCC827) [Li et al., 2021] i w komórkach glejaka wielopostaciowego (A172, LN229, U87, U251 i U373) [Zhong et al., 2021] również doprowadziło do supresji migracji i inwazji. Natomiast, badania nad rakiem żołądka, przedstawiły ujemną korelację między ekspresją circ-*OXCT1* a zdolnością do migracji i inwazji [Liu et al., 2020]. Udokumentowano także, że nadekspresja *OXCT1* w komórkach raka piersi MCF7 promuje rozwój nowotworu, a nawet przerzutowanie do płuc [Ozsvari et al., 2017]. Na podstawie powyższych rezultatów analiz wpływu wyciszenia *OXCT1* na potencjał migracyjny i inwazyjny komórek nowotworowych, można wysnuć wniosek, iż *OXCT1* może działać jako metaboliczny promotor guza, a efekt zależny jest od rodzaju raka.

Zaobserwowany zwiększony potencjał migracyjny i inwazyjny komórek z biallelicznym wyciszeniem i nadekspresją genu *OXCT1* w połączeniu z wcześniejszymi obserwacjami doprowadził do rozważań nad możliwą zmianą ekspresji markerów epithelialnych i mezenchymalnych EMT na skutek modyfikacji genetycznej komórek HeLa [Nantajit et al., 2015]. Tym samym, przeprowadzono analizę ekspresji genów oraz poziomu kodowanych przez nie białek zaangażowanych w ten proces. Otrzymane wyniki sugerują hybrydowy epithelialno-mezenchymalny komórek HeLa *OXCT1*^{+/-} i HeLa *OXCT1*^{-/-} oraz HeLa pIRES-*OXCT1* z uwagi na zwiększoną ekspresję zarówno markerów epithelialnych (*CDH1*, *MUC1*), jak i mezenchymalnych (*CDH2*, *SNAI1*, *SNAI2*) w porównaniu do – odpowiednio – komórek HeLa WT oraz komórek HeLa pIRES (**Ryc. 19B, 19C, 30B, 30C**). W trakcie EMT komórki tracą połączenia typu komórka-komórka oraz zdolność do interakcji z błoną podstawną, zmieniając swoją biegunowość. Z morfologicznego punktu widzenia, komórki zaczynają bardziej przypominać fibroblasty [Yang et al., 2020]. Choć dzięki obserwacjom mikroskopowym (**Ryc. 15B**) zaobserwowano zmiany morfologiczne komórek HeLa *OXCT1*^{-/-}, nie jest to typowy obraz komórek o charakterze mezenchymalnym. Ponadto, w przypadku pierwotnych komórek gruczolakoraka trzustki izolowanych z myszy, wykazano, iż EMT nie jest procesem niezbędnym do metastazy, aczkolwiek indukuje chemooporność na gemcytabinę [Zheng et al., 2015]. Jest to ciekawa obserwacja, gdyż przeprowadzone wcześniej analizy wykazały zwiększoną oporność komórek HeLa *OXCT1*^{-/-} na doksorubicynę i cisplatynę, co w połączeniu ze zwiększonym potencjałem migracyjnym i inwazyjnym, może mieć związek

z hybrydowym charakterem epitelialno-mezenchymalnym. Powyższe spostrzeżenie zostało również poczynione na skutek badań nad niedrobnokomórkowym rakiem płuc (linie komórkowe HCC827 i HCC4006), gdzie wykazano, że hybrydowy fenotyp EMT ma związek ze zwiększoną opornością na erlotynib [Fustaino et al., 2017]. Według niektórych doniesień, już samo zwiększenie zdolności migracyjnych i inwazyjnych komórek świadczy o hybrydowym charakterze EMT, jak stwierdzono w badaniach nad rakiem piersi (linie komórkowe FC-IBC-02, MDA-IBC-3, SUM 190, FC-IBC-02 i SUM149) [Jolly et al., 2017]. Skupiając się na wpływie poziomu genu *OXCT1* na EMT, wykazano, iż wyciszenie kolistego *OXCT1* (circ-*OXCT1*) w tkankach raka żołądka zmniejszyło ekspresję białka sygnałowego SMAD4 regulującego ekspresję E-kadheryny, N-kadheryny i wimentyny, skutkując zwiększeniem EMT, migracji, inwazji i przerzutowania do płuc. Nadekspresja circ-*OXCT1* dała odwrotny do wspomnianego efekt [Liu et al., 2020].

Ekspresja wimentyny, zarówno na poziomie transkryptu, jak i białka, jest obniżona w komórkach HeLa *OXCT1*^{+/−} i HeLa *OXCT1*^{−/−} oraz HeLa pIRES-*OXCT1* średnio o ok. 20-30%. Jako marker mezenchymalny EMT, wimentyna gra istotną rolę w ukierunkowanej migracji komórek, która wymaga interakcji ze składnikami cytoszkieletu – aktyną i tubuliną. Migracja kierunkowa polega na polaryzacji komórki w oparciu o jej reakcję na sygnały zewnątrzkomórkowe, co jest ważne dla skutecznego rozprzestrzeniania się komórek nowotworowych w kierunku naczyń krwionośnych. Ponadto, wimentyna może ułatwiać przeżycie komórek nowotworowych dzięki zwiększeniu ich sztywności, co wpływa na obniżenie stresu związanego z migracją w skupiskach [Kuburich et al., 2022]. Zestawiając te informacje z otrzymanymi wynikami badań, można zaobserwować brak spójności, gdyż komórki HeLa *OXCT1*^{−/−} oraz HeLa pIRES-*OXCT1* wykazują zwiększoną zdolność do migracji i inwazji pomimo obniżonej ekspresji wimentyny. Ponadto, doniesienia literaturowe wskazują, iż wimentyna może odgrywać rolę w oporności na chemioterapeutyki – badania przeprowadzone na komórkach HeLa wykazały ich zwiększoną oporność na kwas gambogowy [Yue et al., 2016], który jest obecnie jednym z kandydatów do stosowania w terapii nowotworowej [Liu et al., 2020]. W przypadku komórek HeLa *OXCT1*^{−/−}, nie zaobserwowano jednak powiązania między obniżeniem ekspresji wimentyny i obniżeniem oporności na dotychczas stosowane cytostatyki – doksorubicynę czy cisplatinę.

Ogólnie, komórki HeLa silnie ekspresjują wimentynę i w stanie bazowym, niemodyfikowanym, wykazują raczej charakter mezenchymalny [Komura et al., 2012]. Zmiany w ekspresji wimentyny na skutek wyciszenia i nadekspresji genu *OXCT1* sugerują, iż modyfikacje te mogą w bliżej nieokreślony sposób zaburzać ekspresję wimentyny, jednak bez dalszego wpływu na zdolności migracyjne i proliferacyjne.

Przejście epitelialno-mezenchymalne jest skomplikowanym procesem obejmującym wiele etapów, które zachodzą w każdej komórce w swoisty dla niej sposób. Szczególnie zauważalne dla tego procesu jest, iż komórki nowotworowe mają tendencję do dzielenia się na

dwie odrębne populacje, tj. komórki liderowe (ang. *leader cells*) i zwolennicze (ang. *follower cells*), których podział wynika z eksponowanej przez nie kinetyki przemian polaryzacji [Qin et al., 2021]. Ponadto, ekspresja czynników zaangażowanych w EMT jest różna, zależna od badanej populacji komórek [Xin et al., 2022]. Otrzymane niejednoznaczne wyniki na skutek przeprowadzonych analiz w niniejszej pracy mogą być spowodowane badaniem mieszanej populacji komórek.

Jak wspomniano wcześniej, oprócz zauważalnego związku potencjału migracyjnego i inwazyjnego komórek z EMT, obserwowane jest również połączenie tego zjawiska ze zdolnością do tworzenia sferoidów. Badając komórki niedrobnokomórkowego raka płuc H460, wykazano, że w warunkach *in vitro*, nadekspresja E-kadheryny wpływa na zwiększoną wydajność tworzenia sferoidów [Powan et al., 2017]. Przeciwnie, obniżenie poziomu E-kadheryny w komórkach raka języka CALC33 zostało powiązane z tworzeniem sferoidów o luźnej budowie, z wieloma rozszanymi pojedynczymi komórkami wokół [Essid et al., 2018]. Jest to obserwacja podobna do poczynionej wobec komórek HeLa OXCT1^{+/-} (**Ryc. 16**). Choć w przedstawionych wynikach badań nad komórkami CALC33, zauważalny jest również rosnący poziom wimentyny wraz z formowaniem się nowych sfer, analizy nad rakiem piersi (linie komórkowe T47D i 4T1) podkreśliły, iż oprócz wimentyny za sposób tworzenia i upakowania sferoidów odpowiedzialne są również aktyna i tubulina, które nie były analizowane w niniejszej pracy doktorskiej. Ponadto, we wspomnianych wynikach badań nad rakiem piersi udowodniono, iż nie wszystkie sferoidy produkują macierz zewnątrzkomórkową, co również ma wpływ na sposób adhezji, agregacji i upakowania komórek [Smyrek et al., 2019].

Z uwagi na dane literaturowe wymieniające obok OXCT1 również OXCT2, ACAT1, BDH1 oraz BDH2 jako geny nie tylko zaangażowane w metabolizm ciał ketonowych, ale również potencjalne onkogeny [Martinez-Outschoorn et al., 2012], sprawdzono ich poziom oraz kodowanych przez nie białek. Zgodnie z przewidywaniami, w komórkach HeLa OXCT1^{+/-} i HeLa OXCT1^{-/-} zaobserwowano spadek ekspresji genów oraz produkowanych przez nie enzymów zaangażowanych w metabolizm ciał ketonowych (**Ryc. 20**), w przeciwieństwie do komórek HeLa pIRES_OXCT1 (**Ryc. 31**).

Nieco zaskakujące okazały się, natomiast, wyniki poziomu markerów modyfikacji potranslacyjnych białek histonowych związanych z aktywacją i wyciszeniem procesu transkrypcji w komórkach HeLa OXCT1 KO (**Ryc. 21**). Choć zakładano, iż zwiększony poziom ciał ketonowych (w szczególności β -hydroksymaślanu) na skutek wyciszenia genu OXCT1 skutkuje zwiększonym poziomem β -hydroksybutyrylacji histonów, otrzymane wyniki zaprzeczyły tej hipotezie. Podobnie, poziom acetylacji nie uległ zmianie w badanych komórkach (**Ryc. 21B**). Biorąc pod uwagę potencjalny *cross-talk* między analizowanymi modyfikacjami potranslacyjnymi, na podstawie badań przeprowadzonych z wykorzystaniem tkanek wątroby myszy, nie zauważono znaczącego związku β -hydroksybutyrylacji histonu 3

(a dokładnie H3K9bhb, H3K18bhb i H3K4bhb) oraz histonu 4 (H4K8bhb) z poziomem acetylacji histonów (H3K9ac, H3K18ac i H4K8ac) [Xie et al., 2016]. Jednakże, analizy dokonane na szczurach wykazały, iż β -hydroksymaślan jest w stanie indukować acetylację H3K14 poprzez inhibicję deacetylazy histonów 3 (HDAC3) [Li et al., 2021]. Obserwacje te sugerują, iż β -hydroksymaślan prowadzi do β -hydroksybutyrylacji i indukcji acetylacji histonów w sposób wybiórczy, a poznanie dokładnego mechanizmu działania tego związku wymaga dalszych badań. Co więcej, β -hydroksybutyrylacja histonów może być negatywnie skorelowana z metylacją histonów (dokładnie H3K9me3) – warto jednak zauważyć, iż ta obserwacja z danych literaturowych odnosi się do modyfikacji H3K9bhb, a nie badanej w niniejszej pracy H3K4bhb [Xie et al., 2016].

Zaobserwowany zwiększony (średnio 2,5-krotnie) poziom markera wyciszonej chromatyny – H3K9me3 – w komórkach HeLa OXCT1^{+/-} oraz HeLa OXCT1^{-/-} (wraz z suplementacją solą sodową β -hydroksymaślanu i bez) może podkreślać niedawno odkrytą rolę tej modyfikacji w progresji komórek nowotworowych. Analizy immunohistochemiczne z wykorzystaniem tkanek raka okrężnicy wykazały, iż H3K9me3 jest na znacznie wyższym poziomie w komórkach złośliwych z uwagi na nadekspresję metylotransferazy SUV39H1 pośredniczącej w trimetylacji lizyny 9 histonu 3 (H3K9me3), mającej zdolność aktywacji migracji komórek nowotworowych w sposób niezależny od transkrypcji [Hieda et al., 2015]. Podwyższony poziom H3K9me3 zauważono także w komórkach raka piersi (linie komórkowe MDA-MB-231 i ZR75-30) i przerzutach do węzłów chłonnych nowotworu okrężnicy [Yokoyama et al., 2013] oraz nowotworu jamy ustnej [Tanaka et al., 2023].

Otrzymane wyniki analiz poziomu przedstawionych modyfikacji potranslacyjnych białek histonowych stanowią punkt wyjściowy do dalszych badań nad wpływem wyciszenia/nadekspresji genu *OXCT1* i roli β -hydroksymaślanu w regulacji stanu chromatyny. Brak spodziewanego wzrostu poziomu β -hydroksybutyrylacji oraz acetylacji w komórkach HeLa OXCT1 KO (samych i suplementowanych β -hydroksymaślanem) jest wysoce zastanawiający, gdyż β -hydroksymaślan stanowi substrat dla acetylo-CoA, a zatem powinna być zaobserwowana chociażby zwiększona acetylacja histonów (jeśli nie wraz z równoczesnym zwiększeniem poziomu β -hydroksybutyrylacji). Tymczasem, odnotowany został spadek poziomu oby tych modyfikacji potranslacyjnych histonów wszystkich komórek HeLa OXCT1 KO we wszystkich badanych wariantach suplementacji, za wyjątkiem komórek HeLa WT z dodatkiem 1 mM BHB. Obserwacja ta rodzi pytanie, czy nadmiar β -hydroksymaślanu może być inhibitorem acetylotransferaz histonów (HAT)? Literatura naukowa tematu częściej wspomina o potencjalnych możliwościach β -hydroksymaślanu do funkcjonowania jako inhibitor HDAC [Li et al., 2020], jednakże w świetle zaprezentowanych wyników w niniejszej pracy, powyższe rozważanie wydaje się być całkowicie bezzasadne, przynajmniej w analizowanych komórkach HeLa. Z drugiej strony, nie należy zapominać, iż modyfikacje potranslacyjne zachodzą na wielu różnych resztach aminokwasowych (głównie

lizyny i argininy) histonów, a ich *cross-talk* jest niezwykle obszerną, a przez to także skomplikowaną, siecią połączeń regulujących proces transkrypcji. Przeprowadzone analizy poziomu modyfikacji potranslacyjnych w ramach prezentowanej tematyki badań były na zbyt małą skalę, aby móc przedstawić szerszy obraz epigenetyczny dla komórek HeLa OXCT1 KO. Tym samym, omawiany obszar badań wymaga bardziej szczegółowych analiz.

Zaprezentowane rezultaty badań doprowadziły także do rozważań, czy na skutek zwiększonego poziomu ciał ketonowych w komórkach HeLa OXCT1 KO (samych i suplementowanych β -hydroksymaślanem) może dochodzić do lokalnego zwiększenia kondensacji chromatyny. Jednakże, przeprowadzone analizy poziomu białek biorących udział w remodelowaniu chromatyny – HP1 α oraz HP1 γ (ang. *heterochromatin proteins α , γ*), a także CAF1 (ang. *chromatin assembly factor 1*) metodą Western blotting (wyniki nieprzedstawione w niniejszej pracy) nie wykazały zmian między komórkami HeLa OXCT1 KO. Być może analiza immunofluorescencyjna dostarczyłaby informacji w aspekcie lokalizacji podejrzewanej miejscowej kondensacji chromatyny (również z uwagi na fakt, iż jest to znacznie czulsza metoda niż immunoblotting).

Aby sprawdzić, jak zwiększony poziom ciał ketonowych wpływa na proliferację niemodyfikowanych komórek HeLa, przeprowadzono ich 72-godziną inkubację w podłożu hodowlanym wysokoglukozowym (25 mM glukozy), niskoglukozowym (1 mM glukozy) i pozbawionym glukozy wraz z solą sodową β -hydroksymaślanu (BHB) i acetoctanu (AcAc) w stężeniach imitujących optymalną ketozę – 0,3 mM BHB i AcAc – oraz głęboką ketozę – 3 mM AcAc i 10 mM BHB – *in vivo* (Ryc. 32). Wykazano, że dodatek β -hydroksymaślanu do podłoża hodowlanego nie wpływa na proliferację komórek HeLa, co koreluje z dostępnymi danymi literaturowymi – tj. brakiem wpływu suplementacji 10 mM BHB komórek HeLa hodowanych w podłożu wysokoglukozowym [Zhang et al., 2018] oraz brakiem wpływu dodatku BHB w szeregu stężeń sięgającym aż do 25 mM do komórek raka piersi MCF7 hodowanych w zmiennych warunkach glikemicznych, w tym w warunkach deprywacji glukozy [Maldonado et al., 2021]. Zaskakująco, acetoctan w stężeniu odpowiadającym głębokiej ketozie *in vivo* – 3 mM – utrzymał proliferację komórek w warunkach niskoglukozowych (tj. 1 mM Glc) i pozbawionych glukozy. Ogólnie, zahamowana proliferacja komórek HeLa w warunkach obniżonej glukozy i braku glukozy z jednoczesną suplementacją ciałami ketonowymi wskazuje na upośledzoną zdolność komórek nowotworowych do wykorzystywania tychże związków jako źródło energii. Niemniej, prowadzenie dłuższej hodowli komórkowej w przedstawionych warunkach pozwoliłoby na dokonanie bardziej dogłębnych analiz.

Zastosowane warunki hodowlane do podjęcia próby przestawienia komórek HeLa na wykorzystywanie ciał ketonowych zamiast glukozy w celu produkcji energii były bardzo teoretyczne z uwagi na dostarczanie komórkom egzogennych ciał ketonowych (badania opierały się całkowicie na modelu *in vitro*, a więc wyłączone jest w tym układzie produkowanie ciał ketonowych przez wątrobę, a także brak jest możliwości obserwacji wpływu gospodarki

hormonalnej na zachowanie komórek nowotworowych). Organizm ludzki w warunkach ograniczonego dostępu do glukozy korzysta z przechowywanego w wątrobie i mięśniach szkieletowych glikogenu, a dopiero po wykorzystaniu jego rezerwuarów, korzysta z lipidów nagromadzonych w tkance tłuszczowej. W zastosowanym modelu *in vitro* komórki HeLa miały trwały dostęp do L-glutaminy obecnej w podłożu hodowlanym, bez względu na stosowane warunki glikemiczne. Mimo to, obniżona obecność glukozy w środowisku komórek wydaje się być czynnikiem decydującym w zauważonym znacznym zahamowaniu proliferacji komórek wraz z czasem trwania hodowli. Suplementacja acetoctanem w stężeniu odpowiadającym głębokiej ketozie *in vivo*, tj. 3 mM, poskutkowała kontynuacją proliferacji komórek, co z jednej strony sugeruje, iż związek ten może być istotniejszym źródłem energii niż β -hydroksymaślan dla komórek HeLa przy obniżonym dostępie lub całkowitej deprivacji glukozy. Z drugiej strony, zjawisko to obserwowane jest przez krótki czas (nieprzekraczający 72 godzin, gdyż tyle trwał eksperyment), a sam stan głębokiej ketozy oczywiście nie jest stanem optymalnym i prawdopodobnie nawet przy zauważonym potencjale do długotrwałego przestawienia komórek nowotworowych na wykorzystywanie ciał ketonowych, utrzymanie głębokiej ketozy byłoby problematyczne dla człowieka z uwagi na szereg skutków ubocznych i/lub restrykcyjność diety ketogenicznej, która jest głównym czynnikiem indukującym wzrost poziomu ciał ketonowych. Niemniej, choć na podstawie przedstawionych wyników można wnioskować, iż komórki HeLa nie są w stanie efektywnie metabolizować ciał ketonowych w celu produkcji energii, potencjalne wprowadzenie pacjentów onkologicznych w stan ketozy pozostaje kwestią mocno kontrowersyjną.

Kliniczne zastosowanie diety ketogenicznej jako terapii wspomagającej u pacjentów chorujących na raka wymaga zbadania podwyższonego poziomu ciał ketonowych pod kątem jego potencjalnego działania antynowotworowego dla każdego typu nowotworu w warunkach przedklinicznych, ponieważ bezpieczeństwo i skuteczność tej diety silnie zależy od pochodzenia i fenotypu nowotworu. W oparciu o wyniki badań przedklinicznych przeprowadzonych do tej pory, dieta ketogeniczna wydaje się być obiecującą formą terapii uzupełniającej w szeregu nowotworów. Niemniej istotne jest również zbadanie dokładnej roli enzymów zaangażowanych w metabolizm ciał ketonowych, o których niejednokrotnie wypowiedziano się w literaturze naukowej tematu jako „metabolicznych onkogenach”.

Badania nad enzymami zaangażowanymi w metabolizm ciał ketonowych mają duży potencjał w odniesieniu do projektowania związków specyficznie ukierunkowanych na zwiększenie lub zatrzymanie działania tychże enzymów, czego przykładem są zaproponowane przez Michaela P. Lisanti i Federicę Sotgia z zespołem tzw. „mitoketoscyny”. Wspomniani badacze wykazali, że inhibicja *OXCT1* i *ACAT1* w komórkach raka piersi MCF7 skutkuje zatrzymaniem wzrostu guza i zdolności do przerzutowania tego typu nowotworu. Za pomocą przewidywania bioinformatycznego, zaproponowali 8 związków, które przyłączając się do *OXCT1* i/lub *ACAT1* efektywnie blokują produkcję ATP w mitochondrium. Zgłoszenie

patentowe obejmujące zaprojektowane związki zostało opublikowane w 2020 roku i obecnie oczekuje na akceptację [dane Google Patents, 2023]. Przykład ten podkreśla istotność pracy nad enzymami uczestniczącymi w metabolizmie ciał ketonowych z uwagi na ich silne zaangażowanie w procesy związane z progresją nowotworzenia.

8. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI

W niniejszej pracy zaprezentowano bardzo szeroki przekrój modeli badawczych – od komórek raka szyjki macicy HeLa z monoallelicznym i biallelicznym wyciszeniem genu *OXCT1*, poprzez komórki HeLa z nadekspresją genu *OXCT1*, na niemodyfikowanych komórkach HeLa hodowanych w zmiennych warunkach glikemicznych z równoczesną suplementacją ciałami ketonowymi kończąc. Otrzymane wyniki, choć momentami niejednoznaczne, w połączeniu z poczynionymi obserwacjami w trakcie wykonywanych eksperymentów kreują jednak ogólny obraz komórek HeLa *OXCT1*^{-/-} i HeLa pIRES_*OXCT1* jako szybciej proliferujących, o zwiększonym potencjale migracyjnym i inwazyjnym w porównaniu do kontroli (HeLa WT i HeLa pIRES, odpowiednio). Dodatkowo, bialleliczne wyciszenie genu *OXCT1* w komórkach HeLa zdaje się zwiększać oporność komórek na klasyczne chemioterapeutyki stosowane w terapii raka szyjki macicy, tj. doksorubicynę, cisplatynę. Odwrotnie, nadekspresja genu *OXCT1* w komórkach HeLa miała wpływ na zwiększenie wrażliwości komórek na działanie tych samych związków. Fenotyp komórek HeLa *OXCT1*^{-/-} i HeLa pIRES_*OXCT1* zdaje się być raczej hybrydowy z uwagi na brak jednoznacznego ukierunkowania względem strony epitelialnej lub mezenchymalnej w badaniach nad EMT, aczkolwiek potencjał do nabywania przez te komórki cech mezenchymalnych był dostrzegalny. Próba przestawienia niemodyfikowanych komórek HeLa na wykorzystywanie ciał ketonowych jako źródła energii w warunkach obniżonego dostępu glukozy i całkowitej deprivacji glukozy nie zakończyła się powodzeniem, choć odnotowana została zdolność acetoctanu w warunkach imitujących głęboką ketozę do krótkoterminowej (≤ 72 godziny) stymulacji proliferacji komórek HeLa.

Wnioski z przeprowadzonych badań:

- Nadekspresja genu *OXCT1* wpływa stymulująco na proliferację, a także zdolności migracyjne i inwazyjne komórek HeLa, sugerując, iż gen *OXCT1* może być zaangażowany w szlaki sygnałowe kontrolujące podziały komórkowe w raku szyjki macicy i/lub działać jako metaboliczny promotor guza;
- Nadekspresja genu *OXCT1* wpływa na ekspresję genów i kodowanych przez nie białek zaangażowanych w przejście epitelialno-mezenchymalne, natomiast zaobserwowany fenotyp jest raczej o charakterze hybrydowym;
- Obniżona zawartość glukozy i całkowita deprivacja glukozy w hodowli komórek HeLa hamuje ich proliferację pomimo suplementacji ciałami ketonowymi, sugerując upośledzoną zdolność komórek nowotworowych do wykorzystywania ciał ketonowych jako główne źródło energii.

Wniosek końcowy:

Gen *OXCT1* może stanowić potencjalne narzędzie do rozwoju nowych terapii raka szyjki macicy.

9. UWAGI PODSUMOWUJĄCE

Analiza wyników przeprowadzonych badań pozwoliła na poczynienie kilku uwag. Niniejsze komentarze do prezentowanej pracy mogą być przedmiotem rozważań i punktem zaczepienia w przyszłych eksperymentach nad omawianą tematyką.

- Z uwagi na rozbieżność w zachowaniu komórek z HeLa z monoallelicznym i biallelicznym wyciszeniem genu *OXCT1*, istnieje wyraźna potrzeba wykonania analizy kariotypu. Otrzymane wyniki analizy mogłyby również dostarczyć informacji istotnych z punktu widzenia tak wysokiej ekspresji genu *OXCT1* w porównaniu do innych linii komórkowych.
- Sekwencjonowanie nowej generacji (NGS, ang. *next-generation sequencing*), a dokładnie RNA-seq, komórek HeLa *OXCT1*^{+/-} i HeLa *OXCT1*^{-/-} pozwoliłoby na zidentyfikowanie możliwego „off-targetu”.
- W niniejszej pracy komórki poddawano inkubacji z ciałami ketonowymi: acetoocetanem i β -hydroksymaślanem. Wydaje się, że zasadnym byłoby wykonanie eksperymentów z alternatywnym sposobem zwiększenia stężenia ciał ketonowych w komórkach, jakim mogłoby być głodzenie komórek poprzez prowadzenie hodowli w podłożu hodowlanym pozbawionym surowicy i/lub L-glutaminy przez określony czas. Jak dotąd, w literaturze naukowej tematu przedstawiono stosunkowo niewiele wyników badań opierających się na analizie wpływu głodzenia komórek na ich wrażliwość cytotoksyczną, niemniej, z dotychczas opisanych wyłania się obraz krótkoterminowej ochrony komórek przed czynnikami chemioterapeutycznymi (dokładnie etopozydem) [Shi et al., 2023]. Co więcej, badania wykazały, że stres wynikający z głodzenia komórek prowadzi do zwiększonej absorpcji składników odżywczych poprzez zwiększenie ilości mikroosmków. Zjawisko to dodatkowo pokazuje, iż głodzenie wpływa na zmiany morfologiczne komórek HeLa [Liu et al., 2019]. Inni badacze wysnuli hipotezę, iż obniżenie dostępności składników odżywczych (dokładnie deprywacja glukozy) komórek HeLa zaindukuje przesyłanie sygnałów między jedną komórką a drugą, prowadząc do uwolnienia cytokin i chemokin [Püschel et al., 2020]. Są to ciekawe obserwacje, które warto wziąć pod uwagę przy planowaniu dalszych badań w obrębie przedstawianej tematyki.
- Zastosowany test klonogeny mógłby być rozbudowany o analizę cytotoksyczności. Inkubacja komórek z wybranymi związkami w odpowiednim szeregu stężeń dostarczyłaby dodatkowych informacji na temat wpływu cytostatyków na zdolności proliferacyjne komórek charakteryzujących się wyciszeniem/nadekspresją genu *OXCT1*. Ciekawym byłoby również przeprowadzenie modyfikacji testu klonogenego w miękkim agarze w celu pomiaru zdolności komórek do wzrostu w sposób niezależny od zakotwiczenia.

10. STRESZCZENIE

Choroby nowotworowe od lat znajdują się w czołówce śmiertelnych schorzeń, odpowiadając za co szósty zgon na świecie. Obecnie, oprócz standardowych terapii onkologicznych opierających się na chirurgii, radioterapii i chemioterapii, stosowanych pojedynczo lub w połączeniu, dostępne są nowoczesne metody walki z rakiem – od celowanych terapii lekowych, poprzez terapie bazujące na wykorzystaniu komórek macierzystych, po terapię genową. Prowadzenie intensywnych badań nad nowotworami prowadzi do stworzenia nowych podejść terapeutycznych, a także modyfikacji już istniejących, głównie w celu zredukowania występujących efektów ubocznych. Coraz większą uwagę zwraca się także na potencjał antynowotworowy substancji pochodzenia naturalnego, podkreślając rolę diety jako istotnego czynnika wspomagającego leczenie pacjenta i regenerację organizmu po wyniszczającej chemioterapii.

Badania metabolizmu komórek nowotworowych wykazały zwiększone zużycie glukozy przy równoczesnym utrzymywaniu glikolizy na wyższym poziomie w porównaniu do komórek prawidłowych. Na podstawie tej obserwacji rozpoczęto rozważania nad możliwym ograniczeniem, a nawet całkowitym wyeliminowaniem glukozy z diety pacjentów onkologicznych jako potencjalnej formy terapii wspomagającej, i zastąpienie węglowodanów alternatywnym źródłem energii – tłuszczami. Przeprogramowanie metaboliczne organizmu oparte na wykorzystywaniu tłuszczów, a dokładniej – ciał ketonowych – jako paliwa komórkowego jest osiągalne dzięki stosowaniu diety ketogenicznej polegającej na restrykcyjnej podaży węglowodanów wraz ze zwiększoną podażą tłuszczów. Badania nad możliwościami komórek nowotworowych do metabolizowania ciał ketonowych w celu produkcji energii wciąż trwają, prowadząc do pytania, czy leczenie raka dietą jest możliwe.

Wśród dotychczas udokumentowanych skutków przeprogramowania metabolicznego organizmu zauważalny jest zwykle skrajny efekt zastąpienia węglowodanów tłuszczami – hamujący lub stymulujący rozwój nowotworu. W przypadku raka szyjki macicy, brak jest informacji dotyczących potencjalnego przestawienia komórek nowotworowych na wykorzystywanie ciał ketonowych jako źródła energii. Przedstawione podejście wydaje się być obiecujące, choć kontrowersyjne, nie tyle wobec samego powrotu do zdrowia, co wobec hamowania postępujących możliwych współistniejących zaburzeń metabolicznych, w szczególności u kobiet z uwagi na ścisłe powiązanie ich gospodarki hormonalnej z poziomem i dystrybucją tłuszczów w organizmie.

Metabolizm lipidów prowadzi do utworzenia acetylo-CoA wykorzystywanego w cyklu Krebsa. Na skutek wyprodukowania acetylo-CoA w nadmiernej ilości, dochodzi do przeciążenia cyklu Krebsa, a acetylo-CoA zostaje użyty do produkcji ciał ketonowych w naturalnie zachodzącym w komórkach wątroby procesie zwanym „ketogenezą”. Ciała ketonowe, natomiast, stanowią grupę metabolitów wykorzystywanych przez organy o dużym zapotrzebowaniu energetycznym, takie jak mózg, serce czy mięśnie szkieletowe.

Do najważniejszych ciał ketonowych zalicza się aceton, kwas acetylooctowy (w formie anionu – acetoocetan) oraz kwas β -hydroksymasłowy (w formie anionu – β -hydroksymaślan). Katabolizm ciał ketonowych scentralizowany jest wokół transferazy bursztynilo-CoA:3-ketokwas-CoA (SCOT, ang. *succinyl-CoA:3-ketoacid-CoA transferase*) produkowanej przez gen *OXCT1* i ograniczającej prędkość ketolizy.

Głównym celem badań w niniejszej pracy doktorskiej była analiza roli genu *OXCT1* oraz produkowanego przez niego białka – SCOT – w regulacji potencjału metastatycznego komórek raka szyjki macicy HeLa. Dokonano tego poprzez charakterystykę komórek HeLa z wyciszoną monoallelicznie i biallelicznie ekspresją genu *OXCT1* i nadekspresją genu *OXCT1* w aspekcie potencjału proliferacyjnego, zdolności migracyjnych i inwazyjnych oraz przejścia epitelialno-mezenchymalnego. Ponadto, podjęto próbę przestawienia niemodyfikowanych komórek HeLa na wykorzystywanie ciał ketonowych zamiast glukozy jako źródła energii oraz przeprowadzono analizę wpływu ciał ketonowych (β -hydroksymaślanu i acetoocetanu) na komórki HeLa w zmiennych warunkach glikemicznych. Dodatkowo, zbadano wpływ ciał ketonowych na wybrane modyfikacje potranslacyjne komórek HeLa.

Badania zostały przeprowadzone na trzech modelach badawczych: komórkach HeLa z (1) wyciszoną monoallelicznie i biallelicznie ekspresją genu *OXCT1* i (2) nadekspresją genu *OXCT1*, a także (3) na komórkach HeLa hodowanych w zmiennych warunkach glikemicznych, dodatkowo suplementowanych ciałami ketonowymi. W ramach przygotowania komórek HeLa z wyciszoną monoallelicznie i biallelicznie ekspresją genu *OXCT1*, zastosowano innowacyjną metodę edytowania genomowego CRISPR/Cas9. Otrzymany zestaw komórek (HeLa *OXCT1* KO) obejmował komórki HeLa WT (zastosowane jako kontrola), HeLa *OXCT1*^{+/-} (komórki z monoallelicznym wyciszeniem genu *OXCT1*) i HeLa *OXCT1*^{-/-} (komórki z biallelicznym wyciszeniem genu *OXCT1*). Drugi model badawczy – komórki HeLa z nadekspresją genu *OXCT1* (HeLa *OXCT1* OX) – uzyskano poprzez transfekcję komórek HeLa wektorem ekspresyjnym pIRES (HeLa pIRES) oraz wektorem ekspresyjnym pIRES_*OXCT1* z wprowadzoną zamplifikowaną sekwencją kodującą genu *OXCT1* (HeLa pIRES_*OXCT1*). Niemodyfikowane komórki HeLa hodowano w podłożu hodowlanym w warunkach wysokoglikemicznych (25 mM glukozy), niskoglikemicznych (1 mM) oraz całkowitej deprivacji glukozy (0 mM) z dodatkiem β -hydroksymaślanu lub acetoocetanu w odpowiednich stężeniach odwzorowujących stan optymalnej i głębokiej ketozy *in vivo*.

Efektywność przeprowadzonego wyciszenia genu *OXCT1* w komórkach HeLa, a także transfekcji tychże komórek wspomnianymi wektorami ekspresyjnymi oceniono za pomocą analizy ekspresji genu *OXCT1* (metodą RT-qPCR) i poziomu białka SCOT (techniką Western blotting i barwienia immunofluorescencyjnego). Po potwierdzeniu monoallelicznego i biallelicznego wyciszenia oraz nadekspresji genu *OXCT1* w komórkach HeLa, przystąpiono do charakterystyki komórek.

Pierwszy etap charakterystyki komórek HeLa OXCT1 KO i HeLa OXCT1 OX skupiony był wokół analiz proliferacji obejmujących ocenę szybkości proliferacji komórek testem redukcji resazuryny, analizę cyklu komórkowego techniką cytometrii przepływowej wraz z analizą ekspresji genów zaangażowanych w przebieg cyklu komórkowego (*CDKN1A*, *TP53* oraz szeregu cyklin), immunocytofluorescencyjną analizę antygenów związanych z cyklem komórkowym (całkowitej oraz ufosforylowanej formy Chk1, Chk2, ATR i ATRIP oraz ufosforylowanego H2AX) i ilościowe oznaczenie komórek mitotycznych za pomocą immunofluorescencji, a także ocenę zdolności do tworzenia kolonii testem klonogennym. Następnie, w ramach analizy wzrostu, oceniono zdolność komórek do tworzenia struktur 3D – sferoidów – metodą wiszącej kropli.

W kolejnym etapie badań, sprawdzono różnice we wrażliwości komórek na powszechnie stosowane w terapii raka szyjki macicy cytostatyki, tj. doksorubicynę i cisplatynę, a także czynniki utleniające – nadtlenek wodoru i wodoronadtlenek tert-butylu – za pomocą testu MTT oraz testu kometowego. Analiza uszkodzeń DNA przy użyciu alkalicznego testu kometowego została przeprowadzona w dwóch modelach: (i) w obecności oraz (ii) nieobecności enzymów FPG i NTH. Następnie, poddano ocenie zdolności migracyjne i inwazyjne komórek za pomocą testu migracji i inwazji przeprowadzanego z wykorzystaniem komory Boydena. Dodatkowo, sprawdzono ekspresję genów i poziom produkowanych przez nie białek zaangażowanych w przejście epithelialno-mezenchymalne, techniką RT-qPCR i Western blotting, odpowiednio.

W końcowym etapie charakterystyki komórek HeLa OXCT1 KO i HeLa OXCT1 OX, sprawdzono ekspresję genów zaangażowanych w metabolizm ciał ketonowych (metodą RT-qPCR) oraz kodowanych przez nie białek (techniką Western blotting). Komórki z wyciszoną monoallelicznie i biallelicznie ekspresją genu *OXCT1* (HeLa OXCT1 KO) poddano suplementacji β -hydroksymaślanem w stężeniu odwzorowującym fizjologiczną (1 mM) i głęboką ketozę (10 mM) *in vivo*, a następnie oceniono wpływ ciał ketonowych na poziom modyfikacji potranslacyjnych – β -hydroksybutyrylacji lizyny 4 histonu 3 (H3K4bhb), acetylacji lizyny 9 i 14 histonu 3 (H3K9/14ac) oraz trimetylacji lizyny 4 i 9 histonu 3 (H3K4me3, H3K9me) za pomocą techniki Western blotting. Szybkość proliferacji niemodyfikowanych komórek HeLa hodowanych w zmiennych warunkach glikemicznych z dodatkiem ciał ketonowych oceniono testem redukcji resazuryny. Morfologię komórek HeLa we wszystkich stosowanych modelach badawczych opisano na podstawie obserwacji mikroskopowych.

Założeniem przygotowywania komórek HeLa OXCT1 KO i HeLa OXCT1 OX było uzyskanie dwóch przeciwstawnych modeli badawczych. Jednakże, wykonane analizy komórek HeLa OXCT1 KO wykazały, iż komórki z monoallelicznie wyciszoną ekspresją genu *OXCT1* (HeLa OXCT1^{+/-}) zachowują się w sposób odmienny względem komórek z biallelicznie wyciszoną ekspresją *OXCT1* (HeLa OXCT1^{-/-}) biorąc pod uwagę większość badanych parametrów. Najprawdopodobniej jest to konsekwencją tzw. „off-targetu” powstałego

w trakcie przeprowadzanego wyciszenia genu *OXCT1* metodą CRISPR/Cas9. Podejrzanie to może być potwierdzone poprzez analizę transkryptomu za pomocą sekwencjonowania nowej generacji, która jest w trakcie realizacji. Przeprowadzone analizy proliferacji komórek HeLa OXCT1 OX wykazały, iż nadekspresja *OXCT1* wpływa stymulująco na podziały komórkowe. Otrzymane rezultaty tych samych analiz wykonanych na komórkach HeLa OXCT1 KO nie są tak jednoznaczne w aspekcie monoallelicznego i biallelicznego wyciszenia *OXCT1* z uwagi na zauważone dość skrajne wyniki między komórkami HeLa OXCT1^{+/-} i HeLa OXCT1^{-/-}. Zaskakująco względem założenia, iż monoalleliczne i bialleliczne wyciszenie genu *OXCT1* w komórkach HeLa spowoduje zahamowanie proliferacji, komórki HeLa OXCT1^{-/-} wykazały wzmożone podziały komórkowe. Obserwacja ta, wraz z odnotowanym zwiększeniem oporności na doksorubicynę i cisplatynę komórek HeLa OXCT1^{-/-}, doprowadziła do rozważań nad możliwym związkiem biallelicznego wyciszenia genu *OXCT1* z metastazą. Celem sprawdzenia tej teorii, dokonano analizy potencjału migracyjnego i inwazyjnego komórek HeLa OXCT1 KO, wykazując zwiększone zdolności do migracji i inwazji komórek HeLa OXCT1^{-/-} od komórek HeLa WT, w przeciwieństwie do komórek HeLa OXCT1^{+/-}. Komórki HeLa pIRES_OXCT1, pomimo zaobserwowanej zwiększonej wrażliwości na badane cytostatyki, również wykazały większe możliwości migracyjne i inwazyjne niż komórki kontrolne – HeLa pIRES.

Zidentyfikowany zwiększony potencjał migracyjny i inwazyjny komórek HeLa OXCT1^{-/-} i HeLa pIRES_OXCT1 w połączeniu z wcześniejszymi obserwacjami doprowadził do rozważań nad możliwą zmianą ekspresji markerów epitelialnych i mezenchymalnych przejścia epitelialno-mezenchymalnego na skutek modyfikacji genetycznej komórek HeLa. Tym samym, przeprowadzono analizę ekspresji genów oraz poziomu kodowanych przez nie białek zaangażowanych w ten proces. Otrzymane wyniki zasugerowały hybrydowy charakter epitelialno-mezenchymalny komórek HeLa OXCT1^{+/-} i HeLa OXCT1^{-/-} oraz HeLa pIRES_OXCT1 z uwagi na zwiększoną ekspresję zarówno markerów epitelialnych (*CDH1*, *MUC1*), jak i mezenchymalnych (*CDH2*, *SNAI1*, *SNAI2*) w porównaniu do odpowiednich kontroli. Analizując związek między przejściem epitelialno-mezenchymalnym a zdolnością komórek HeLa OXCT1 KO i HeLa OXCT1 OX do tworzenia sferoidów, znaleziono możliwe powiązanie między obniżonym poziomem E-kadheryny w komórkach HeLa OXCT1^{+/-} a formowaniem przez nie sferoidów o luźnej budowie.

Zgodnie z przewidywaniami, w komórkach HeLa z wyciszoną monoallelicznie i biallelicznie ekspresją genu *OXCT1* zaobserwowano spadek ekspresji genów oraz produkowanych przez nie enzymów zaangażowanych w metabolizm ciał ketonowych, podczas gdy w komórkach HeLa z nadekspresją *OXCT1* zaobserwowano wzrost badanych czynników. Dzięki otrzymanym wynikom analizy poziomu markerów modyfikacji potranslacyjnych białek histonowych związanych z aktywacją oraz wyciszeniem procesu transkrypcji w komórkach HeLa OXCT1 KO, zaprzeczono hipotezie, iż wyciszenie genu *OXCT1* doprowadzi do

zwiększonego poziomu β -hydroksybutyrylacji histonów. Podobnie, poziom acetylacji nie uległ zmianie w badanych komórkach. Zaobserwowany, natomiast, zwiększony poziom markera wyciszonej chromatyny – H3K9me3 – w komórkach HeLa *OXCT1*^{+/-} oraz HeLa *OXCT1*^{-/-} (wraz z dodatkiem β -hydroksymaślanu i bez) może podkreślać niedawno odkrytą rolę tej modyfikacji w progresji komórek nowotworowych.

Zahamowana proliferacja niemodyfikowanych komórek HeLa w warunkach obniżonego dostępu glukozy i braku glukozy z jednoczesną suplementacją ciałami ketonowymi sugeruje obniżenie zdolności komórek nowotworowych do wydajnego wykorzystywania tychże związków jako źródło energii.

Podsumowując, otrzymane wyniki badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej pozwoliły na sformułowanie wniosku, iż gen *OXCT1* może stanowić potencjalne narzędzie do rozwoju nowych terapii raka szyjki macicy.

Na podstawie analizy wyników przeprowadzonych badań poczyniono kilku uwag, które mogą stanowić przedmiot rozważań i punkt wyjściowy w przyszłych eksperymentach nad omawianą tematyką. Przedstawiono sposoby modyfikacji zastosowanych w niniejszej pracy testów, podkreślając, jak wykorzystanie ich mogłoby się przyczynić do poszerzenia wiedzy w obrębie rozpatrywanego zagadnienia.

11. ABSTRACT

Cancer has been one of the leading deadly diseases for years, accounting for every sixth death worldwide. Currently, in addition to standard cancer therapies based on surgery, radiotherapy, and chemotherapy, used alone or in combination, modern methods of combating cancer – from targeted drug therapies, through stem cells-based therapies, to gene therapy – are available. Conducting intensive research on cancer leads to the creation of new therapeutic approaches, as well as modifications to existing ones, mainly in order to reduce the side effects. More and more attention is also paid to the anti-cancer potential of substances of natural origin, emphasizing the role of diet as an important factor supporting the treatment of the patient and its regeneration after devastating chemotherapy.

Studies on the metabolism of cancer cells have shown its increased glucose consumption while maintaining glycolysis at a higher level compared to normal cells. On the basis of this observation, considerations on the possible reduction or even complete elimination of glucose from the diet of cancer patients as a potential form of supportive therapy and the replacement of carbohydrates with an alternative source of energy – fats – began. Metabolic reprogramming of the body based on the use of fats, or more precisely – ketone bodies – as cellular fuel is achievable through the use of a ketogenic diet consisting of a restrictive supply of carbohydrates with an increased supply of fats. Research on the ability of cancer cells to metabolize ketone bodies for energy production is still ongoing, leading to the question of whether it is possible to treat cancer with diet.

Among the documented effects of metabolic reprogramming of the body so far, there is usually an extreme effect of replacing carbohydrates with fats – inhibiting or stimulating the development of cancer. In the case of cervical cancer, there is no information regarding the potential of cancer cells to switch to using ketone bodies as an energy source. The presented approach seems to be promising, although controversial, not so much in terms of the recovery itself, but in terms of inhibiting the progressive possible metabolic comorbidities, especially in women due to the close connection of their hormonal balance with the level and distribution of fats in the body.

Lipid metabolism leads to the formation of acetyl-CoA used in the Krebs cycle. As a result of the production of acetyl-CoA in excessive amounts, the Krebs cycle is overloaded, and acetyl-CoA is used to produce ketone bodies in a naturally occurring process in the liver cells called "ketogenesis". Ketone bodies, on the other hand, are a group of metabolites used by high energy-demanding organs such as the brain, heart, and skeletal muscles. The most important ketone bodies include acetone, acetoacetic acid (in the form of an anion – acetoacetate) and β -hydroxybutyric acid (in the form of anion – β -hydroxybutyrate). The catabolism of ketone bodies is centralized around the ketolytic rate-limiting succinyl-CoA:3-ketoacid-CoA transferase (SCOT) produced by the *OXCT1* gene.

The main aim of the research in this doctoral thesis was to analyze the role of the *OXCT1* gene and the protein encoded by it – SCOT – in the regulation of the metastatic potential of HeLa cervical cancer cells. This was done by characterizing HeLa cells with a monoallelic and biallelic knockout of the *OXCT1* gene and HeLa cells with overexpressed *OXCT1* gene in terms of proliferative potential, migration and invasive abilities, and epithelial-mesenchymal transition. In addition, an attempt to switch unmodified HeLa cells to use ketone bodies instead of glucose as an energy source was made, and an analysis of the effect of ketone bodies (β -hydroxybutyrate and acetoacetate) on HeLa cells under variable glycemic conditions was performed. In addition, the effect of ketone bodies on selected post-translational modifications of HeLa cells was investigated.

The research was carried out using three research models: HeLa cells with (1) a monoallelic and biallelic knockout of the *OXCT1* gene and (2) overexpression of the *OXCT1* gene, and (3) HeLa cells cultured under variable glycemic conditions, supplemented with ketone bodies, additionally. As part of the preparation of HeLa cells with monoallelic and biallelic knockout of the *OXCT1* gene, an innovative CRISPR/Cas9 genomic editing method was used. The obtained set of cells (HeLa OXCT1 KO) consisted of HeLa WT cells (used as control), HeLa OXCT1^{+/-} cells (with monoallelic *OXCT1* knockout), and HeLa OXCT1^{-/-} cells (with biallelic *OXCT1* knockout). The second research model – HeLa cells overexpressing the *OXCT1* gene (HeLa OXCT1 OX) – was obtained by transfecting HeLa cells with the pIRES expression vector (HeLa pIRES) and the pIRES_OXCT1 expression vector with the inserted amplified *OXCT1* gene coding sequence (HeLa pIRES_OXCT1). Unmodified HeLa cells were cultured in culture medium under high glycemic (25 mM glucose), low glycemic (1 mM), and total glucose deprivation (0 mM) conditions with the addition of β -hydroxybutyrate or acetoacetate at appropriate concentrations mimicking the state of optimal and deep ketosis *in vivo*.

The effectiveness of the *OXCT1* gene silencing in HeLa cells, as well as the transfection of these cells with the aforementioned expression vectors, was assessed by analyzing the expression of the *OXCT1* gene (using RT-qPCR) and the SCOT protein level (Western blotting and immunofluorescence staining). After confirmation of monoallelic and biallelic silencing and overexpression of the *OXCT1* gene in HeLa cells, the characterization of the cells was started.

The first stage of the characterization of HeLa OXCT1 KO and HeLa OXCT1 OX cells was focused on proliferation analyzes including the assessment of cell proliferation rate using the resazurin reduction test, cell cycle analysis using flow cytometry together with the analysis of the expression of genes involved in the cell cycle (*CDKN1A*, *TP53* and a number of cyclins), immunocytofluorescent analysis of antigens related to the cell cycle (total and phosphorylated forms of Chk1, Chk2, ATR and ATRIP and phosphorylated H2AX) and quantitative determination of mitotic cells by immunofluorescence, as well as evaluation of colony-forming

efficiency by a clonogenic assay. Then, as part of the growth analysis, the ability of the cells to form 3D structures – spheroids – using the hanging drop technique was assessed.

In the next stage of the research, the differences in the sensitivity of cells to commonly used drugs in the treatment of cervical cancer, i.e. doxorubicin and cisplatin, as well as oxidizing agents – hydrogen peroxide and tert-butyl hydroperoxide – were checked using the MTT test and the comet assay. DNA damage analysis using the alkaline comet assay was performed in two models: (i) in the presence of and (ii) absence of FPG and NTH enzymes. Then, the migration and invasion ability of cells was assessed using the Boyden chamber (migration and invasion assay). In addition, the expression of genes and the level of proteins produced by them involved in the epithelial-mesenchymal transition were checked using the RT-qPCR technique and Western blotting, respectively.

In the final stage of the characterization of HeLa OXCT1 KO and HeLa OXCT1 OX cells, the expression of genes involved in the metabolism of ketone bodies and the proteins encoded by them was checked by RT-qPCR and Western blotting, accordingly. Cells containing the monoallelic and biallelic knockout of the *OXCT1* gene (HeLa OXCT1 KO) were supplemented with β -hydroxybutyrate at a concentration that mimics physiological (1 mM) and deep ketosis (10 mM) *in vivo*, and then the effect of ketone bodies on the level of post-translational modifications – β -hydroxybutyrylation of histone 3 lysine 4 (H3K4bhb), acetylation of histone 3 lysine 9 and 14 (H3K9/14ac), and trimethylation of histone 3 lysine 4 and 9 (H3K4me3, H3K9me) – was assessed by Western blotting. The rate of proliferation of unmodified HeLa cells cultured in variable glycemc conditions with the supplement of ketone bodies was assessed by the resazurin reduction test. The morphology of HeLa cells in all research models used was described on the basis of microscopic observations.

The assumption of the preparation of HeLa OXCT1 KO and HeLa OXCT1 OX cells was to obtain two opposing research models. However, analyzes of HeLa OXCT1 KO cells showed that cells containing monoallelic knockout of the *OXCT1* gene (HeLa OXCT1^{+/-}) behaved differently from cells possessing biallelic knockout of *OXCT1* (HeLa OXCT1^{-/-}), taking into account most of the parameters tested. This is probably a consequence of the off-target created during the silencing of the *OXCT1* gene by the CRISPR/Cas9 method. This speculation can be confirmed by analysis of the transcriptome using next-generation sequencing, which is in progress. The analyzes of HeLa OXCT1 OX cell proliferation showed that overexpression of *OXCT1* stimulates cell division. The results of the same analyzes performed on HeLa OXCT1 KO cells are quite ambiguous in terms of monoallelic and biallelic *OXCT1* silencing due to the observed quite extreme results between HeLa OXCT1^{+/-} and HeLa OXCT1^{-/-} cells. Surprisingly, given the assumption that monoallelic and biallelic silencing of the *OXCT1* in HeLa cells will inhibit proliferation, HeLa OXCT1^{-/-} cells showed enhanced cell division. This observation, together with the reported increase in resistance to doxorubicin and cisplatin of HeLa OXCT1^{-/-} cells, has led to consideration of the possible association between biallelic silencing of the *OXCT1* gene

and metastasis. In order to test this theory, the migration and invasion potential of HeLa OXCT1 KO cells was analyzed, showing an increased migration and invasion ability of HeLa cells OXCT1^{-/-} in comparison to HeLa WT cells as opposed to HeLa OXCT1^{+/-} cells. HeLa pIRES_OXCT1 cells, despite the observed increased sensitivity to the tested drugs, also showed greater migration and invasive abilities than control cells – HeLa pIRES.

The identified increased migration and invasive potential of HeLa OXCT1^{-/-} and HeLa pIRES_OXCT1 cells, in conjunction with previous observations, led to the consideration of a possible alteration in the epithelial and mesenchymal markers expression of the epithelial-mesenchymal transition due to genetic modification of HeLa cells. Thus, an analysis of gene expression and the level of proteins encoded by them involved in this process was carried out. The obtained results suggested a hybrid epithelial-mesenchymal character of HeLa OXCT1^{+/-}, HeLa OXCT1^{-/-}, and HeLa pIRES_OXCT1 due to the increased expression of both epithelial (*CDH1*, *MUC1*) and mesenchymal markers (*CDH2*, *SNAI1*, *SNAI2*) compared to the respective controls. By analyzing the relationship between the epithelial-mesenchymal transition and the ability of HeLa OXCT1 KO and HeLa OXCT1 OX cells to form spheroids, a possible link between reduced levels of E-cadherin in HeLa OXCT1^{+/-} cells and their formation of loose spheroids was found.

As expected, HeLa cells containing monoallelic and biallelic knockout of the *OXCT1* gene showed a decrease in the expression of genes and enzymes encoded by them involved in ketone body metabolism, while *OXCT1*-overexpressed HeLa cells showed an increase in the factors tested. Based on the obtained results of the analysis of post-translational modifications markers levels of histone proteins associated with the activation and silencing of the transcription process in HeLa OXCT1 KO cells, the hypothesis that silencing the *OXCT1* gene will lead to an increased histone β -hydroxybutyrylation, was denied. Similarly, the level of acetylation did not change in the tested cells. However, the observed increased level of the silenced chromatin marker – H3K9me3 – in HeLa OXCT1^{+/-} and HeLa OXCT1^{-/-} cells (with the supplementation of β -hydroxybutyrate and without) may underline the recently discovered role of this modification in cancer cell progression.

The inhibited proliferation of unmodified HeLa cells in the conditions of reduced glucose access and no glucose with simultaneous supplementation with ketone bodies suggests a decrease in the ability of cancer cells to efficiently use these compounds as an energy source.

To sum up, the results of the research conducted allowed us to formulate the conclusion that the *OXCT1* gene may be a potential tool for the development of new therapies for cervical cancer.

On the basis of the results of the conducted research, several remarks were made, which may be the subject of consideration and a starting point for future experiments on the discussed topic. The ways of modifying the tests used in this work were presented,

emphasizing how their use could contribute to the expansion of knowledge in the area of the considered issue.

12. LITERATURA

1. Akagi K, Li J, Broutian TR, et al. *Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability*. Genome Res. 2014 Feb;24(2):185-99
2. Akins NS, Nielson TC, Le HV. *Inhibition of Glycolysis and Glutaminolysis: An Emerging Drug Discovery Approach to Combat Cancer*. Curr Top Med Chem. 2018;18(6):494-504
3. Alghamdi MA, Tohary M, Alzaidan H, et al. *Clinical variability and outcome of succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase deficiency caused by a single OXCT1 mutation: Report of 17 cases*. JIMD Reports. Volume62, Issue1. November 2021. Pages 91-96
4. Amabebe E, Anumba DOC. *The Vaginal Microenvironment: The Physiologic Role of Lactobacilli*. Front Med (Lausanne). 2018 Jun 13;5:181
5. Aminzadeh-Gohari S, Feichtinger RG, Vidali S et al. *A ketogenic diet supplemented with medium-chain triglycerides enhances the anti-tumor and anti-angiogenic efficacy of chemotherapy on neuroblastoma xenografts in a CD1-nu mouse model*. Oncotarget. 2017 Aug 8;8(39):64728-64744
6. Ang QY, Alexander M, Newman JC, et al. *Ketogenic Diets Alter the Gut Microbiome Resulting in Decreased Intestinal Th17 Cells*. Cell. 2020 Jun 11;181(6):1263-1275.e16
7. Attaye I, van Oppenraaij S, Warmbrunn MV, et al. *The Role of the Gut Microbiota on the Beneficial Effects of Ketogenic Diets*. Nutrients. 2021 Dec 31;14(1):191
8. Balcerzyk A, Biesiekierska M, Vialichka V, et al. *Chapter 7 – Histone acylation in the epigenomic regulation of insulin action and metabolic disease*. Nutritional Epigenomics. Volume 14 in Translational Epigenetics. 2019, Pages 101-117
9. Bannister AJ, Kouzarides T. *Regulation of chromatin by histone modifications*. Cell Res. 2011 Mar;21(3):381-95
10. Barchitta M, Maugeri A, Quattrocchi A, et al. *The Association of Dietary Patterns with High-Risk Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: A Cross-Sectional Study in Italy*. Nutrients. 2018 Apr 11;10(4):469
11. Barrientos-Durán A, Fuentes-López A, de Salazar A, et al. *Reviewing the Composition of Vaginal Microbiota: Inclusion of Nutrition and Probiotic Factors in the Maintenance of Eubiosis*. Nutrients. 2020 Feb 6;12(2):419
12. Bartoli GM, Piccioni E, Agostara G, et al. *Different mechanisms of tert-butyl hydroperoxide-induced lethal injury in normal and tumor thymocytes*. Arch Biochem Biophys. 1994 Jul;312(1):81-7
13. Bashir B, Fahmy AA, Raza F, et al. *Non-diabetic ketoacidosis: a case series and literature review*. Postgrad Med J. 2021 Oct;97(1152):667-671
14. Bennett RL, Licht JD. *Targeting Epigenetics in Cancer*. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2018 Jan 6;58:187-207
15. Berg J, Stryer L, Tymoczko J. Biochemistry. 2019
16. Białkowska K, Komorowski P, Bryszewska M, et al. *Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures-Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application*. Int J Mol Sci. 2020 Aug 28;21(17):6225
17. Blaak EE, Canfora EE, Theis S, et al. *Short chain fatty acids in human gut and metabolic health*. Benef Microbes. 2020 Sep 1;11(5):411-455

18. Bonuccelli G, Tsirigos A, Whitaker-Menezes D, et al. *Ketones and lactate "fuel" tumor growth and metastasis: Evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism*. Cell Cycle. 2010 Sep 1;9(17):3506-14
19. Brotman RM, Shardell MD, Gajer P, et al. *Association between the vaginal microbiota, menopause status, and signs of vulvovaginal atrophy*. Menopause. 2014 May;21(5):450-8
20. Brown TP, Ganapathy V. *Lactate/GPR81 signaling and proton motive force in cancer: Role in angiogenesis, immune escape, nutrition, and Warburg phenomenon*. Pharmacol Ther. 2020 Feb;206:107451
21. cBioPortal for Cancer Genomics, 2023, www.cbioportal.org (data dostępu: 16.06.2023)
22. Certo M, Tsai C-H, Pucino V, et al. *Lactate modulation of immune responses in inflammatory versus tumour microenvironments*. Nat Rev Immunol. 2021 Mar;21(3):151-161
23. Cervical Cancer Action for Elimination, 2023, dostępu: www.cervicalcanceraction.org/cervical-cancer-elimination/ (data dostępu: 16.06.2023)
24. Cervical Cancer Action for Elimination, 2023, www.cancer.org (data dostępu: 16.06.2023)
25. Chandel NS. *Amino Acid Metabolism*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2021 Apr 1;13(4):a040584
26. Chandel NS. *Glycolysis*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2021 May 3;13(5):a040535
27. Chen J-B, Zhu Y-W1, Guo X, et al. *Microarray expression profiles analysis revealed lncRNA OXCT1-AS1 promoted bladder cancer cell aggressiveness via miR-455-5p/JAK1 signaling*. J Cell Physiol. 2019 Aug;234(8):13592-13601
28. Chen L, Miao Z, Xu X. *β -hydroxybutyrate alleviates depressive behaviors in mice possibly by increasing the histone3-lysine9- β -hydroxybutyrylation*. Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 19;490(2):117-122
29. Chen R, Wang K, Belk JA, et al. *Engineering circular RNA for enhanced protein production*. Nat Biotechnol. 2023 Feb;41(2):262-272
30. Chen X, Qian Y, Wu S. *The Warburg effect: evolving interpretations of an established concept*. Free Radic Biol Med. 2015 Feb;79:253-63
31. Cheng WY, Wu C-Y. *The role of gut microbiota in cancer treatment: friend or foe?* Gut 2020;69:1867-1876
32. Ciaffi J, Mitselman D, Mancarella L, et al. *The Effect of Ketogenic Diet on Inflammatory Arthritis and Cardiovascular Health in Rheumatic Conditions: A Mini Review*. Front. Med. 14 December 2021, Volume 8 – 2021
33. Cohen CW, Fontaine KR, Arend RC, et al. *A Ketogenic Diet Reduces Central Obesity and Serum Insulin in Women with Ovarian or Endometrial Cancer*. J Nutr. 2018 Aug 1;148(8):1253-1260
34. Commander R, Wei C, Sharma A, et al. *Subpopulation targeting of pyruvate dehydrogenase and GLUT1 decouples metabolic heterogeneity during collective cancer cell invasion*. Nat Commun. 2020 Mar 24;11(1):1533
35. Dąbek A, Wojtala M, L Pirola, et al. *Modulation of Cellular Biochemistry, Epigenetics and Metabolomics by Ketone Bodies. Implications of the Ketogenic Diet in the Physiology of the Organism and Pathological States*. Nutrients. 2020 Mar 17;12(3):788
36. Dai Y, Grant S. *New insights into checkpoint kinase 1 in the DNA damage response signaling network*. Clin Cancer Res. 2010 Jan 15;16(2):376-83

37. Dai Z, Oluwabukola Coker O, Nakatsu G, et al. *Multi-cohort analysis of colorectal cancer metagenome identified altered bacteria across populations and universal bacterial markers*. Microbiome. 2018 Apr 11;6(1):70
38. Dasari S, Tchounwou PB. *Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action*. Eur J Pharmacol. 2014 Oct 5;740:364-78
39. Dawson MA, Kouzarides T. *Cancer epigenetics: from mechanism to therapy*. Cell. 2012 Jul 6;150(1):12-27
40. de la Cruz-López KG, Castro-Muñoz LJ, Reyes-Hernández DO, et al. *Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches*. Front Oncol. 2019 Nov 1;9:1143
41. de Oliveira Rodrigues MT, Pereira da Silva L, Pogue RE, et al. *Induced resistance to ifosfamide in osteosarcoma cells suggests a more aggressive tumor profile*. Biochem Biophys Rep. 2022 Oct 4;32:101357
42. Debela DT, Muzazu SG, Heraro KD, et al. *New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives*. SAGE Open Med. 2021 Aug 12;9:20503121211034366
43. Dhuppar S, Roy S, Mazumder A. *γ H2AX in the S Phase after UV Irradiation Corresponds to DNA Replication and Does Not Report on the Extent of DNA Damage*. Mol Cell Biol. 2020 Sep 28;40(20):e00328-20
44. Ding J, Li H, Liu Y, et al. *OXCT1 Enhances Gemcitabine Resistance Through NF- κ B Pathway in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*. Front Oncol. 2021 Nov 5;11:698302
45. Dittenhafer-Reed KE, Richards AL, Fan J, et al. *SIRT3 mediates multi-tissue coupling for metabolic fuel switching*. Cell Metab. 2015 Apr 7;21(4):637-46
46. Division of Cancer Prevention and Control, Centers for Disease Control and Prevention; dostęp: www.cdc.gov (data dostępu: 16.06.2023)
47. Dmitrieva-Posocco O, Wong AC, Lundgren P, et al. *β -Hydroxybutyrate suppresses colorectal cancer*. Nature. 2022 May;605(7908):160-165
48. Doherty JR, Cleveland JL. *Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics*. J Clin Invest. 2013 Sep;123(9):3685-92
49. Dowis K, Banga S. *The Potential Health Benefits of the Ketogenic Diet: A Narrative Review*. Nutrients. 2021 May 13;13(5):1654
50. Endo Y, Yokote K, Nakayama T. *The obesity-related pathology and Th17 cells*. Cell Mol Life Sci. 2017 Apr;74(7):1231-1245
51. Essid N, Chambard JC, Benammar Elgaaïed A. *Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) and Gli1 expression in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) spheroid cultures*. Bosn J Basic Med Sci. 2018 Nov 7;18(4):336-346
52. Fedele M, Sgarra R, Battista S, et al. *The Epithelial-Mesenchymal Transition at the Crossroads between Metabolism and Tumor Progression*. Int J Mol Sci. 2022 Jan 12;23(2):800
53. Fernandes JV, DE Medeiros Fernandes TAA, DE Azevedo JCV, et al. *Link between chronic inflammation and human papillomavirus-induced carcinogenesis (Review)*. Oncol Lett. 2015 Mar;9(3):1015-1026
54. Ferrer-Sueta G, Manta B, Botti H, et al. *Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction*. Chem Res Toxicol. 2011 Apr 18;24(4):434-50

55. Fine EJ, Miller A, Quadros EV, et al. *Acetoacetate reduces growth and ATP concentration in cancer cell lines which over-express uncoupling protein 2*. *Cancer Cell Int*. 2009 May 29;9:14
56. Fontham ETH, Wolf AMD, Church TR, et al. *Cervical cancer screening for individuals at average risk: 2020 guideline update from the American Cancer Society*. *CA Cancer J Clin*. 2020 Sep;70(5):321-346
57. Fu Y, Yu J, Li F, et al. *Oncometabolites drive tumorigenesis by enhancing protein acylation: from chromosomal remodelling to nonhistone modification*. *J Exp Clin Cancer Res*. 2022 Apr 15;41(1):144
58. Fukao T, Mitchell G, Sass JO, et al. *Ketone body metabolism and its defects*. *J Inherit Metab Dis*. 2014 Jul;37(4):541-51
59. Fustaino V, Presutti D, Colombo T, et al. *Characterization of epithelial-mesenchymal transition intermediate/hybrid phenotypes associated to resistance to EGFR inhibitors in non-small cell lung cancer cell lines*. *Oncotarget*. 2017 Sep 22;8(61):103340-103363
60. Gao H, Hao Y, Zhou X, et al. *Prognostic value of glucose transporter 3 expression in hepatocellular carcinoma*. *Oncol Lett*. 2020 Jan;19(1):691-699
61. García-Rodríguez D, Giménez-Cassina A. *Ketone Bodies in the Brain Beyond Fuel Metabolism: From Excitability to Gene Expression and Cell Signaling*. *Front Mol Neurosci*. 2021 Aug 27;14:732120
62. Genetic and Rare Diseases Information Center, 2023, dostęp: www.rarediseases.info.nih.gov (data dostępu: 16.06.2023)
63. Gill EL, Patel K, Rakheja D. *Oncometabolites and their role in cancer*. *Cancer Biomarkers. Clinical Aspects and Laboratory Determination*. 2022, Pages 393-408
64. Google Patents, 2023, dostęp: www.patents.google.com/patent/US20200148688A1/en (data dostępu: 16.06.2023)
65. Granja S, Pinheiro C, Reis RM, et al. *Glucose Addiction in Cancer Therapy: Advances and Drawbacks*. *Curr Drug Metab*. 2015;16(3):221-42
66. Groesbeck DK, Bluml RM, Kossoff EH. *Long-term use of the ketogenic diet in the treatment of epilepsy*. *Dev Med Child Neurol*. 2006 Dec;48(12):978-81
67. Grünert SC, Foster W, Schumann A, et al. *Succinyl-CoA:3-oxoacid coenzyme A transferase (SCOT) deficiency: A rare and potentially fatal metabolic disease*. *Biochimie*. 2021 Apr;183:55-62
68. Gupta L, Khandelwal D, Kalra S, et al. *Ketogenic diet in endocrine disorders: Current perspectives*. *J Postgrad Med*. 2017 Oct-Dec;63(4):242-251
69. Hao Y, Yi Q, XiaoWu. X *Acetyl-CoA: An interplay between metabolism and epigenetics in cancer*. *Front. Mol. Med*, 16 November 2022
70. Heo S, Kim S, Kang D. *The Role of Hydrogen Peroxide and Peroxiredoxins throughout the Cell Cycle*. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Mar 26;9(4):280
71. Hess JA, Khasawneh MK. *Cancer metabolism and oxidative stress: Insights into carcinogenesis and chemotherapy via the non-dihydrofolate reductase effects of methotrexate*. *BBA Clin*. 2015 Feb 7;3:152-61
72. Hieda M, Matsuura N, Kimura H. *Histone modifications associated with cancer cell migration and invasion*. *Methods Mol Biol*. 2015;1238:301-17
73. Hsu MT, Coca-Prados M. *Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells*. *Nature*. 1979 Jul 26;280(5720):339-40

74. Hu K, Babapoor-Farrokhran S, Rodrigues M, et al. *Hypoxia-inducible factor 1 upregulation of both VEGF and ANGPTL4 is required to promote the angiogenic phenotype in uveal melanoma*. *Oncotarget*. 2016 Feb 16;7(7):7816-28
75. Huang D, Li T, Wang L, et al. *Hepatocellular carcinoma redirects to ketolysis for progression under nutrition deprivation stress*. *Cell Res*. 2016 Oct;26(10):1112-1130
76. Huang H, Zhang D, Weng Y, et al. *The regulatory enzymes and protein substrates for the lysine β -hydroxybutyrylation pathway*. *Sci Adv*. 2021 Feb 24;7(9):eabe2771
77. Hwang CY, Choe W, Yoon K-S, et al. *Molecular Mechanisms for Ketone Body Metabolism, Signaling Functions, and Therapeutic Potential in Cancer*. *Nutrients*. 2022 Nov 21;14(22):4932
78. Ilhan ZE, Łaniewski P, Thomas N, et al. *Deciphering the complex interplay between microbiota, HPV, inflammation and cancer through cervicovaginal metabolic profiling*. *EBioMedicine*. 2019 Jun;44:675-690
79. Jia D, Lu M, Jung KH, et al. *Elucidating cancer metabolic plasticity by coupling gene regulation with metabolic pathways*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Feb 26;116(9):3909-3918
80. Jia D, Park JH, Jung KH, et al. *Elucidating the Metabolic Plasticity of Cancer: Mitochondrial Reprogramming and Hybrid Metabolic States*. *Cells*. 2018 Mar 13;7(3):21
81. Jia D, Park JH, Kaur H, et al. *Towards decoding the coupled decision-making of metabolism and epithelial-to-mesenchymal transition in cancer*. *Br J Cancer*. 2021 Jun;124(12):1902-1911
82. Jiang B. *Aerobic glycolysis and high level of lactate in cancer metabolism and microenvironment*. *Genes Dis*. 2017 Feb 14;4(1):25-27
83. Jolly MK, Boareto M, Debeb BG, et al. *Inflammatory breast cancer: a model for investigating cluster-based dissemination*. *NPJ Breast Cancer*. 2017 Jun 6;3:21
84. Kadochi Y, Mori S, Fujiwara-Tani R, et al. *Remodeling of energy metabolism by a ketone body and medium-chain fatty acid suppressed the proliferation of CT26 mouse colon cancer cells*. *Oncol Lett*. 2017 Jul;14(1):673-680
85. Karvelsson ST, Sigurdsson A, Seip K, et al. *EMT-Derived Alterations in Glutamine Metabolism Sensitize Mesenchymal Breast Cells to mTOR Inhibition*. *Mol Cancer Res*. 2021 Sep;19(9):1546-1558
86. Kim YA, Kim SH, Cheon CK, et al. *A Rare Cause of Life-Threatening Ketoacidosis: Novel Compound Heterozygous OXCT1 Mutations Causing Succinyl-CoA:3-Ketoacid CoA Transferase Deficiency*. *Yonsei Med J*. 2019 Mar;60(3):308-311
87. Klement RJ, Champ CE, Otto C, et al. *Anti-Tumor Effects of Ketogenic Diets in Mice: A Meta-Analysis*. *PLoS One*. 2016 May 9;11(5):e0155050
88. Klement RJ, Sweeney RA. *Impact of a ketogenic diet intervention during radiotherapy on body composition: V. Final results of the KETOCOMP study for head and neck cancer patients*. *Strahlenther Onkol*. 2022 Nov;198(11):981-993
89. Komura K, Ise H, Akaike T. *Dynamic behaviors of vimentin induced by interaction with GlcNAc molecules*. *Glycobiology*. 2012 Dec;22(12):1741-59
90. Koronowski KB, Greco CM, Huang H, et al. *Ketogenesis impact on liver metabolism revealed by proteomics of lysine β -hydroxybutyrylation*. *Cell Rep*. 2021 Aug 3;36(5):109487

91. Koshiyama M. *The Effects of the Dietary and Nutrient Intake on Gynecologic Cancers*. Healthcare (Basel). 2019 Jul 7;7(3):88
92. Kuburich NA, den Hollander P, Pietz JT, et al. *Vimentin and cytokeratin: Good alone, bad together*. Semin Cancer Biol. 2022 Nov;86(Pt 3):816-826
93. Lee C-L, Huang C-J, Yang S-H, et al. *Discovery of genes from feces correlated with colorectal cancer progression*. Oncol Lett. 2016 Nov;12(5):3378-3384
94. Li B, Sui L. *Metabolic reprogramming in cervical cancer and metabolomics perspectives*. Nutr Metab (Lond). 2021 Oct 19;18(1):93
95. Li B, Yu Y, Liu K, et al. *β -Hydroxybutyrate inhibits histone deacetylase 3 to promote claudin-5 generation and attenuate cardiac microvascular hyperpermeability in diabetes*. Diabetologia. 2021 Jan;64(1):226-239
96. Li B, Zhu L, Li L, et al. *lncRNA OXCT1-AS1 Promotes Metastasis in Non-Small-Cell Lung Cancer by Stabilizing LEF1, In Vitro and In Vivo*. Biomed Res Int. 2021 Jul 21;2021:4959381
97. Lim J-M, Letchumanan V, Tan LT-H et al. *Ketogenic Diet: A Dietary Intervention via Gut Microbiome Modulation for the Treatment of Neurological and Nutritional Disorders (a Narrative Review)*. Nutrients. 2022 Aug 30;14(17):3566
98. Lin W, Yin C-Y, Yu Q, et al. *Expression of glucose transporter-1, hypoxia inducible factor-1 α and beclin-1 in head and neck cancer and their implication*. Int J Clin Exp Pathol. 2018 Jul 1;11(7):3708-3717
99. Liu J, Dai X, Guo X, et al. *Circ-OXCT1 Suppresses Gastric Cancer EMT and Metastasis by Attenuating TGF- β Pathway Through the Circ-OXCT1/miR-136/SMAD4 Axis*. Onco Targets Ther. 2020 May 11;13:3987-3998
100. Liu K, Li F, Sun Q et al. *p53 β -hydroxybutyrylation attenuates p53 activity*. Cell Death Dis. 2019 Mar 11;10(3):243
101. Liu L, Wang K, Liu J, et al. *Starvation effect on the morphology of microvilli in HeLa cells*. Biochem Biophys Res Commun. 2019 Jul 5;514(4):1238-1243
102. Liu S, Chang W, Jin Y, et al. *The function of histone acetylation in cervical cancer development*. Biosci Rep. 2019 Apr 12;39(4):BSR20190527
103. Liu Y, Chen Y, Lin L, et al. *Gambogic Acid as a Candidate for Cancer Therapy: A Review*. Int J Nanomedicine. 2020 Dec 22;15:10385-10399
104. Livanos AE, Greiner TU, Vangay P, et al. *Antibiotic-mediated gut microbiome perturbation accelerates development of type 1 diabetes in mice*. Nat Microbiol. 2016 Aug 22;1(11):16140
105. Lu Y, Yang Y-Y, Zhou M-W, et al. *Ketogenic diet attenuates oxidative stress and inflammation after spinal cord injury by activating Nrf2 and suppressing the NF- κ B signaling pathways*. Neurosci Lett. 2018 Sep 14;683:13-18
106. Luo H, Peng J, Yuan Y. *CircRNA OXCT1 promotes the malignant progression and glutamine metabolism of non-small cell lung cancer by absorbing miR-516b-5p and upregulating SLC1A5*. Cell Cycle. 2023 May;22(10):1182-1195
107. Macchione IG, Lopetuso LR, Ianiro G, et al. *Akkermansia muciniphila: key player in metabolic and gastrointestinal disorders*. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2019 Sep;23(18):8075-8083
108. Magee BA, Potezny N, Rofe AM, et al. *The inhibition of malignant cell growth by ketone bodies*. Aust J Exp Biol Med Sci. 1979 Oct;57(5):529-39

109. Maldonado R, Talana CA, Song C, et al. *β -hydroxybutyrate does not alter the effects of glucose deprivation on breast cancer cells*. *Oncol Lett*. 2021 Jan;21(1):65
110. Marbaniang C, Kma L. *Dysregulation of Glucose Metabolism by Oncogenes and Tumor Suppressors in Cancer Cells*. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018 Sep 26;19(9):2377-2390
111. Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Whitaker-Menezes D, et al. *Ketone body utilization drives tumor growth and metastasis*. *Cell Cycle*. 2012 Nov 1;11(21):3964-71
112. Martínez-Ramírez I, Carrillo-García A, Contreras-Paredes A. *Regulation of Cellular Metabolism by High-Risk Human Papillomaviruses*. *Int J Mol Sci*. 2018 Jun 22;19(7):1839
113. Martinho O, Silva-Oliveira R, Cury FP, et al. *HER Family Receptors are Important Theranostic Biomarkers for Cervical Cancer: Blocking Glucose Metabolism Enhances the Therapeutic Effect of HER Inhibitors*. *Theranostics*. 2017 Jan 15;7(3):717-732
114. Masood W, Annamaraju P, Uppaluri KR. *Ketogenic Diet*. W: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan
115. Masoud GN, Li W. *HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy*. *Acta Pharm Sin B*. 2015 Sep;5(5):378-89
116. Nagao M, Toh R, Irino Y, et al. *β -Hydroxybutyrate elevation as a compensatory response against oxidative stress in cardiomyocytes*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Jul 8;475(4):322-8
117. Nantajit D, Lin D, Li JJ. *The network of epithelial-mesenchymal transition: potential new targets for tumor resistance*. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015 Oct;141(10):1697-713
118. Newman JC, Verdin E. *Ketone bodies as signaling metabolites*. *Trends Endocrinol Metab*. 2014 Jan;25(1):42-52
119. Nitsch S, Shahidian LZ, Schneider R, et al. *Histone acylations and chromatin dynamics: concepts, challenges, and links to metabolism*. *EMBO Rep*. 2021 Jul 5;22(7):e52774
120. Noormohammadi M, Eslamian G, Kazemi SN, et al. *Association between dietary patterns and bacterial vaginosis: a case-control study*. *Sci Rep*. 2022 Jul 16;12(1):12199
121. O'Callaghan A, van Sinderen D. *Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota*. *Front Microbiol*. 2016 Jun 15;7:925
122. Orang AV, Petersen JP, McKinnon RA, et al. *Micromanaging aerobic respiration and glycolysis in cancer cells*. *Mol Metab*. 2019 May;23:98-126
123. Orphanet, dostęp: www.orpha.net (data dostęp: 16.06.2023)
124. Ozsvari B, Sotgia F, Simmons K, et al. *Mitoketoscins: Novel mitochondrial inhibitors for targeting ketone metabolism in cancer stem cells (CSCs)*. *Oncotarget*. 2017 Sep 24;8(45):78340-78350
125. Pahwa R, Goyal A, Jialal I. *Chronic Inflammation*. W: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan 2022
126. Parks SK, Pouysségur J. *Targeting pH regulating proteins for cancer therapy-Progress and limitations*. *Semin Cancer Biol*. 2017 Apr;43:66-73
127. Paskeh MDA, Saebfar H, Mahabady MK, et al. *Overcoming doxorubicin resistance in cancer: siRNA-loaded nanoarchitectures for cancer gene therapy*. *Life Sci*. 2022 Jun 1;298:120463
128. Patil M, Pabla N, Dong Z. *Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation*. *Cell Mol Life Sci*. 2013 Nov;70(21):4009-21

129. Pereira PMR, Berisha N, Bhupathiraju DK, et al. *Cancer cell spheroids are a better screen for the photodynamic efficiency of glycosylated photosensitizers*. PLoS One. 2017 May 17;12(5):e0177737
130. Perez MA, Clostio AJ, Houston IR, et al. *Ether lipid deficiency disrupts lipid homeostasis leading to ferroptosis sensitivity*. PLoS Genet. 2022 Sep 30;18(9):e1010436
131. Phan LM, Yeung S-CJ, Le M-H. *Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies*. Cancer Biol Med. 2014 Mar;11(1):1-19
132. Poff AM, Ari C, Arnold P, et al. *Ketone supplementation decreases tumor cell viability and prolongs survival of mice with metastatic cancer*. Int J Cancer. 2014 Oct 1;135(7):1711-20
133. Powan P, Luanpitpong S, He X, et al. *Detachment-induced E-cadherin expression promotes 3D tumor spheroid formation but inhibits tumor formation and metastasis of lung cancer cells*. Am J Physiol Cell Physiol. 2017 Nov 1;313(5):C556-C566
134. Prakash Prasad C, Gogia A, Batra A. *Essential role of aerobic glycolysis in epithelial-to-mesenchymal transition during carcinogenesis*. Clin Transl Oncol. 2022 Oct;24(10):1844-1855
135. Puchalska P, Crawford PA. *Metabolic and Signaling Roles of Ketone Bodies in Health and Disease*. Annu Rev Nutr. 2021 Oct 11;41:49-77
136. Puchalska P, Crawford PA. *Multi-dimensional Roles of Ketone Bodies in Fuel Metabolism, Signaling, and Therapeutics*. Cell Metab. 2017 Feb 7;25(2):262-284
137. Puck TT, Marcus PI. *Action of x-rays on mammalian cells*. J Exp Med. 1956 May 1;103(5):653-66
138. Püschel F, Favaro F, Redondo-Pedraza J, et al. *Starvation and antimetabolic therapy promote cytokine release and recruitment of immune cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 May 5;117(18):9932-9941
139. Qin L, Yang D, Yi W, et al. *Roles of leader and follower cells in collective cell migration*. Mol Biol Cell. 2021 Jul 1;32(14):1267-1272
140. Rekdal VM, Bess EN, Bisanz JE, et al. *Discovery and inhibition of an interspecies gut bacterial pathway for Levodopa metabolism*. Science. 2019 Jun 14;364(6445):eaau6323
141. Ridgway ND. *The role of phosphatidylcholine and choline metabolites to cell proliferation and survival*. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2013 Jan-Feb;48(1):20-38
142. Rogovik AL, Goldman RD. *Ketogenic diet for treatment of epilepsy*. Can Fam Physician. 2010 Jun;56(6):540-2
143. Ross AB, Langer JD, Jovanovic M. *Proteome Turnover in the Spotlight: Approaches, Applications, and Perspectives*. Mol Cell Proteomics. 2021;20:100016
144. Roy M, Alix C, Bouakaz A, et al. *Tumor Spheroids as Model to Design Acoustically Mediated Drug Therapies: A Review*. Pharmaceutics. 2023 Mar 1;15(3):806
145. Rundén-Pran E, Mariussen E, El Yamani N, et al. *The colony forming efficiency assay for toxicity testing of nanomaterials-Modifications for higher-throughput*. Front Toxicol. 2022 Sep 7;4:983316
146. Sabari BR, Zhang D, Allis CD, et al. *Metabolic regulation of gene expression through histone acylations*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2017 Feb;18(2):90-101
147. Sahai E, Astsaturrov I, Cukierman E, et al. *A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts*. Nat Rev Cancer. 2020 Mar;20(3):174-186

148. Saraon P, Cretu D, Musrap N, et al. *Quantitative proteomics reveals that enzymes of the ketogenic pathway are associated with prostate cancer progression*. Mol Cell Proteomics. 2013 Jun;12(6):1589-601
149. Scheck AC, Abdelwahab MG, Fenton KE, et al. *The ketogenic diet for the treatment of glioma: insights from genetic profiling*. Epilepsy Res. 2012 Jul;100(3):327-37
150. Seyfried TN, Flores RE, Poff AM et al. *Cancer as a metabolic disease: implications for novel therapeutics*. Carcinogenesis. 2014 Mar;35(3):515-27
151. Shi M, Hou J, Shao S, et al. *Short-Term Starvation Weakens the Efficacy of Cell Cycle Specific Chemotherapy Drugs through G1 Arrest*. Int J Mol Sci. 2023 Jan 28;24(3):2498
152. Sinha D, Saha P, Samanta A, et al. *Emerging Concepts of Hybrid Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer Progression*. Biomolecules. 2020 Nov 16;10(11):1561
153. Skinner R, Trujillo A, Ma X, et al. *Ketone bodies inhibit the viability of human neuroblastoma cells*. J Pediatr Surg. 2009 Jan;44(1):212-6; discussion 216
154. Smyrek I, Mathew B, Fischer SC, et al. *E-cadherin, actin, microtubules and FAK dominate different spheroid formation phases and important elements of tissue integrity*. Biol Open. 2019 Jan 24;8(1):bio037051
155. Stracker TH, Usui T, Petrini JHJ. *Taking the time to make important decisions: the checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response*. DNA Repair (Amst). 2009 Sep 2;8(9):1047-54
156. Sun L, Ma L, Ma Y, et al. *Insights into the role of gut microbiota in obesity: pathogenesis, mechanisms, and therapeutic perspectives*. Protein Cell. 2018 May;9(5):397-403
157. Sun S, Li H, Chen J, et al. *Lactic Acid: No Longer an Inert and End-Product of Glycolysis*. Physiology (Bethesda). 2017 Nov;32(6):453-463
158. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA: A Cancer Journal for Clinicians. Volume 71, Issue 3 p. 209-249
159. Tanaka M, Harada H, Kimura H. *The role of H3K9me3 in oral squamous cell carcinoma*. Biochem Biophys Res Commun. 2023 Jan 15;640:56-63
160. Tan-Shalaby JL, Carrick J, Edinger K, et al. *Modified Atkins diet in advanced malignancies – final results of a safety and feasibility trial within the Veterans Affairs Pittsburgh Healthcare System*. Nutr Metab (Lond). 2016 Aug 12;13:52
161. Taub KS, Kilaru Kessler S, Bergqvist AGC. *Risk of seizure recurrence after achieving initial seizure freedom on the ketogenic diet*. Epilepsia. 2014 Apr;55(4):579-83
162. Terranova CJ, Stemler KM, Barrodia P, et al. *Reprogramming of H3K9bhb at regulatory elements is a key feature of fasting in the small intestine*. Cell Rep. 2021 Nov 23;37(8):110044
163. The Embryo Project Encyclopedia, 2020, dostęp: www.embryo.asu.edu (data dostępu: 16.06.2023)
164. The Human Gene Mutation Database, 2023, dostęp: www.hgmd.cf.ac.uk (data dostępu: 16.06.2023)
165. The Human Protein Atlas, 2023, dostęp: www.proteinatlas.org (data dostępu: 16.06.2023)
166. Tidbury FD, Langhart A, Weidlinger S, et al. *Non-antibiotic treatment of bacterial vaginosis-a systematic review*. Arch Gynecol Obstet. 2021 Jan;303(1):37-45

167. Tilg H, Adolph TE, Gerner RR, et al. *The Intestinal Microbiota in Colorectal Cancer*. *Cancer Cell*. 2018 Jun 11;33(6):954-964
168. Valenti P, Rosa L, Capobianco D, et al. *Role of Lactobacilli and Lactoferrin in the Mucosal Cervicovaginal Defense*. *Front Immunol*. 2018 Mar 1;9:376
169. van Jaarsveld MTM, Deng D, Ordoñez-Rueda D, et al. *Cell-type-specific role of CHK2 in mediating DNA damage-induced G2 cell cycle arrest*. *Oncogenesis*. 2020 Mar 13;9(3):35
170. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. *Science*. 2009 May 22;324(5930):1029-33.
171. Wallner S, Orsó E, Grandl M, et al. *Phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine plasmalogens in lipid loaded human macrophages*. *PLoS One*. 2018 Oct 11;13(10):e0205706
172. Wang J, Han X, Zhang Y. *Autoregulatory mechanisms of phosphorylation of checkpoint kinase 1*. *Cancer Res*. 2012 Aug 1;72(15):3786-94
173. Wang Z-H, Peng W-B, Zhang P, et al. *Lactate in the tumour microenvironment: From immune modulation to therapy*. *EBioMedicine*. VOLUME 73, 103627, NOVEMBER 2021
174. Weber DD, Aminzadeh-Gohari S, Tulipan J, et al. *Ketogenic diet in the treatment of cancer – Where do we stand?* *Mol Metab*. 2020 Mar;33:102-121
175. Wentz AE, D d'Avignon A, Weber ML, et al. *Adaptation of myocardial substrate metabolism to a ketogenic nutrient environment*. *J Biol Chem*. 2010 Aug 6;285(32):24447-56
176. Wheless JW. *History of the ketogenic diet*. *Epilepsia*. 2008 Nov;49 Suppl 8:3-5
177. Wirbel J, Pyl PT, Kartal E, et al. *Meta-analysis of fecal metagenomes reveals global microbial signatures that are specific for colorectal cancer*. *Nat Med*. 2019 Apr;25(4):679-689
178. Woolf EC, Curley KL, Liu Q, et al. *The Ketogenic Diet Alters the Hypoxic Response and Affects Expression of Proteins Associated with Angiogenesis, Invasive Potential and Vascular Permeability in a Mouse Glioma Model*. *PLoS One*. 2015 Jun 17;10(6):e0130357
179. World Health Organization, 2022, dostęp: www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer (data dostępu: 16.06.2023)
180. World Health Organization. *Comprehensive Cervical Cancer Control: A Guide to Essential Practice. 2nd edition*. 2014
181. Wu X, Miao D, Liu Z, et al. *β -hydroxybutyrate antagonizes aortic endothelial injury by promoting generation of VEGF in diabetic rats*. *Tissue Cell*. 2020 Jun;64:101345
182. Xie Z, Zhang D, Chung D, et al. *Metabolic Regulation of Gene Expression by Histone Lysine β -Hydroxybutyrylation*. *Mol Cell*. 2016 Apr 21;62(2):194-206
183. Xin Z, Deguchi K, Suye S, et al. *Quantitative Analysis of Collective Migration by Single-Cell Tracking Aimed at Understanding Cancer Metastasis*. *Int J Mol Sci*. 2022 Oct; 23(20): 12372.
184. Yang J, Antin P, Berx G, et al. *Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition*. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020 Jun;21(6):341-352
185. Yang S-D, Ahn SH, Kim J-I. *3-Oxoacid CoA transferase 1 as a therapeutic target gene for cisplatin-resistant ovarian cancer*. *Oncol Lett*. 2018 Feb;15(2):2611-2618
186. Yokoyama Y, Hieda M, Nishioka Y, et al. *Cancer-associated upregulation of histone H3 lysine 9 trimethylation promotes cell motility in vitro and drives tumor formation in vivo*. *Cancer Sci*. 2013 Jul;104(7):889-95

187. Yu C, Roy RJ, Kaufman H, et al. *Multiple-model adaptive predictive control of mean arterial pressure and cardiac output*. IEEE Trans Biomed Eng. 1992 Aug;39(8):765-78
188. Yue Q, Feng L, Cao B, et al. *Proteomic Analysis Revealed the Important Role of Vimentin in Human Cervical Carcinoma HeLa Cells Treated With Gambogic Acid*. Mol Cell Proteomics. 2016 Jan;15(1):26-44
189. Zeng X, Yuan X, Cai Q, et al. *Circular RNA as An Epigenetic Regulator in Chronic Liver Diseases*. Cells. 2021 Jul 30;10(8):1945
190. Zhang H, Chang Z, Qin L-N, et al. *MTA2 triggered R-loop trans-regulates BDH1-mediated β -hydroxybutyrylation and potentiates propagation of hepatocellular carcinoma stem cells*. Signal Transduct Target Ther. 2021 Apr 2;6(1):135
191. Zhang J, Jia P-P, Liu Q-L, et al. *Low ketolytic enzyme levels in tumors predict ketogenic diet responses in cancer cell lines in vitro and in vivo*. J Lipid Res. 2018 Apr;59(4):625-634.
192. Zhang S, Sun J, Gu M, et al. *Circular RNA: A promising new star for the diagnosis and treatment of colorectal cancer*. Cancer Med. 2021 Dec;10(24):8725-8740
193. Zhang X, Ruili R, Niu J, et al. *Molecular basis for hierarchical histone de- β -hydroxybutyrylation by SIRT3*. Cell Discov. 2019 Jul 9;5:35
194. Zhang Y, Hunter T. *Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy*. Int J Cancer. 2014 Mar 1;134(5):1013-23
195. Zhang Y, Werling U, Edelmann W. *Seamless Ligation Cloning Extract (SLiCE) cloning method*. Methods Mol Biol. 2014;1116:235-44
196. Zhao X, Jiang M, Wang Z, et al. *CCNY Accelerates Cyclin E Expression to Regulate the Proliferation of Laryngeal Carcinoma Cells via MEK/ERK Signaling Pathway*. Cancer Manag Res. 2020 Jun 23;12:4889-4898
197. Zheng X, Carstens JL, Kim J, et al. *Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer*. Nature. 2015 Nov 26;527(7579):525-530
198. Zhong C, Yu Q, Peng Y, et al. *Novel LncRNA OXCT1-AS1 indicates poor prognosis and contributes to tumorigenesis by regulating miR-195/CDC25A axis in glioblastoma*. J Exp Clin Cancer Res. 2021 Apr 8;40(1):123
199. Zhou Z-W, Long H-Z, Cheng Y. *From Microbiome to Inflammation: The Key Drivers of Cervical Cancer*. Front Microbiol. 2021 Nov 15;12:767931
200. Zhu H, Bi D, Zhang Y, et al. *Ketogenic diet for human diseases: the underlying mechanisms and potential for clinical implementations*. Signal Transduct Target Ther. 2022 Jan 17;7(1):11

13. CAŁKOWITY DOROBEK NAUKOWY

PUBLIKACJE NAUKOWE:

1. Ciesielski O, **Biesiekierska M**, Panthu B, Soszyński M, Pirola L, Balcerczyk A. Citrullination in the pathology of inflammatory and autoimmune disorders – recent advances and future perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2022; 79(2): 94. IF = 9,234; pkt MEiN = 140; cytowania = 17
2. Stiborova H, Kracmarova M, Vesela T, **Biesiekierska M**, Cerny J, Balik J, Demnerova K. Impact of Long-Term Manure and Sewage Sludge Application to Soil as Organic Fertilizer on the Incidence of Pathogenic Microorganisms and Antibiotic Resistance Genes. *Agronomy*. 2021, 11(7), 1423. IF = 3,949; pkt MEiN = 100; cytowania = 4
3. Ciesielski O, **Biesiekierska M**, Balcerczyk A. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) Alters Histone Acetylation and Methylation and Impacts Chromatin Architecture Profile in Human Endothelial Cells. *Molecules*. 2020; 25(10): 2326. IF = 4,411; pkt MEiN = 140; cytowania = 26
4. Nasser S, Vialichka V, **Biesiekierska M**, Balcerczyk A, Pirola L. Effects of ketogenic diet and ketone bodies on the cardiovascular system: Concentration matters. *World Journal of Diabetes*. 2020;11(12):584-595. IF = 4,560; pkt MEiN = 100; cytowania = 38
5. Ciesielski O, **Biesiekierska M**, Panthu B, Vialichka V, Pirola L, Balcerczyk A. The Epigenetic Profile of Tumor Endothelial Cells. Effects of Combined Therapy with Antiangiogenic and Epigenetic Drugs on Cancer Progression. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(7):2606. IF = 4,556; pkt MEiN = 140; cytowania = 18

ROZDZIAŁY W MONOGRAFII:

1. Pirola L, Ciesielski O, **Biesiekierska M**, Balcerczyk A. Modulation of non-coding RNAs (ncRNAs) and their potential role as therapeutics, *Medical Epigenetics*, Second Edition, Elsevier, Chapter 32. 2021. Pages 721-740
2. Balcerczyk A, **Biesiekierska M**, Vialichka V, Pirola L. Histone acylation in the epigenomic regulation of insulin action and metabolic disease, Bradley Ferguson CH07, Nutritional Epigenomics. 2019. Pages 101-117

Wartości IF oraz MEiN podano wg roku publikacji.

Cytowania podano na dzień 4.06.2023 r.

Całkowity IF = 26,71

Punkty MeiN (po ujednoczeniu punktacji) = 620

Sumaryczne cytowania (wg Scopus) = 103

Indeks Hirscha = 4

DONIESIENIA KONFERENCYJNE:

Prezentacje ustne:

1. **Biesiekierska M**, Studzian M, Gabryanczyk A, Nasser S, Sobierajska K, Śliwińska A, Pirola L, Balcerczyk A, „The key ketone body catabolic gene *OXCT1* as a target of anticancer therapy? Findings on the cervical cancer cell line HeLa with CRISPR/Cas9-mediated *OXCT1* silencing and overexpression”, 6th Colossal Facet Cancer World Congress, 28-30.09.2022 r., Lizbona, Portugalia
2. **Biesiekierska M**, Studzian M, Balcerczyk A, „The effect of cell metabolic switch for alternative energy sources – ketone bodies”, 25th Symposium of Biology Students in Europe, SymBioSE 2022, 23-30.07.2022 r., Fryburg Bryzgowijski, Niemcy – wyróżnienie
3. Chrzan N, Górecka K, **Biesiekierska M**, Balcerczyk A, „Ketone bodies – a new window for anti-cancer therapy?”, Young in Cancer Research, 7-8.05.2022 r., konferencja online
4. **Biesiekierska M**, Balcerczyk A, „Indukowana ketoza jako potencjalny czynnik wspomagający terapię chorób metabolicznych i współistniejących“, VII Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BIOOPEN, 7-8.04.2022 r., konferencja online
5. **Biesiekierska M**, Studzian M, Hikisz P, Nasser S, Pirola L, Balcerczyk A, „CRISPR/Cas9-mediated gene silencing of *OXCT1* in HeLa cells favors cell proliferation”, 6th Young Researchers in Biosciences, 22-25.07.2021 r., Kluż Napoka, Rumunia – wyróżnienie
6. **Biesiekierska M**, Balcerczyk A, „Dieta ketogeniczna jako panaceum XXI wieku?”, XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka i pasja kluczem do sukcesu”, 11.06.2021 r., konferencja online
7. **Biesiekierska M**, Balcerczyk A, „Dieta ketogeniczna jako panaceum XXI wieku?”, Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Profilaktyka prozdrowotna”, 9.05.2021 r., konferencja online
8. Nasser S, **Biesiekierska M**, Solé T, Pirola L, Strigini M, Balcerczyk A, „ L’effet du regime cétoène et du β -hydroxybutyrate sur les modifications épigénétiques et le contrôle transcriptionnel du métabolisme cellulaire dans les cellules et tissus sensibles à l’insuline”, Journées Francophones de Nutrition 2020, 25-27.11.2020 r., konferencja online

Plakaty:

1. **Biesiekierska M**, Studzian M, Sobierajska K, Pirola L, Balcerczyk A, „Ketone bodies as a supporting strategy in cancer therapy? Findings on cervical cancer cell line HeLa with CRISPR/Cas9-mediated silencing of the key ketone body metabolism gene – *OXCT1*”, Young Scientists’ Forum 2022, 6-9.07.2022 r., Vimeiro, Portugalia
2. **Biesiekierska M**, Studzian M, Sobierajska K, Pirola L, Balcerczyk A, „Ketone bodies as a supporting strategy in cancer therapy? Findings on cervical cancer cell line HeLa with CRISPR/Cas9-mediated silencing of the key ketone body metabolism gene – *OXCT1*”, 46th FEBS Congress, 9-14.07.2022 r., Lizbona, Portugalia
3. **Biesiekierska M**, Ciesielski O, Pirola L, Balcerczyk A, „The link between ketogenesis and epigenetics – the impact of ketone body modulation on cervical cancer”, FASEB 2021 The Epigenome in Human Health and Diseases, 18-20.10.2021 r., konferencja online
4. Ciesielski O, **Biesiekierska M**, Balcerczyk A, „Inhibition of peptidylarginine deiminases driven histone citrullination affects the angiogenic potential of endothelial cells”, FASEB 2021 The Epigenome in Human Health and Diseases, 18-20.10.2021 r., konferencja online
5. **Biesiekierska M**, Ciesielski O, Balcerczyk A, „Rola ciał ketonowych w metabolizmie komórek nowotworowych szyjki macicy”, II Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Doktorantów Nauk Biologicznych BIO-IDEA 2021, 15.05.2021 r., konferencja online
6. Ciesielski O, **Biesiekierska M**, Balcerczyk A, „Wpływ galusanu epigallokatechiny na proliferację komórek śródbłonna naczyniowego. Epigenetyczny potencjał związku do modyfikacji struktury chromatyny”, XI Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Tygiel 2019, 23-24.03.2019 r., Lublin