

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 deprywacji 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 epitelialno-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.